Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Investigating changes in some oxidative stress indicators in blood, mucus, brain, liver and gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) anesthetized with clove essential oil

Ali Khosravanizadeh[*1], Somayyeh Mirshekari[2]

1. Corresponding Author, Dept. of Aquatic Sciences, Hamoun International Wetland Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: akhosravanizadeh@gmail.com
2. Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: somayyeh.mirshekari@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 12.31.2023
Revised: 01.17.2024
Accepted: 01.21.2024

Keywords:
Anesthesia,
Antioxidant enzymes,
Eugenia cairyophillata,
Oncorhynchus mykiss

ABSTRACT

The use of anesthesia is a common practice in aquaculture to sedate fish and mitigate handling stress. Although the employ of anesthesia is considered beneficial for fish, as it reduces stress utilization improves welfare, at the same time it may induce hazardous side-effects. The aim of the present study was to investigate anesthesia by clove (*Eugenia cairyophillata*) essential oil on oxidative stress parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In the first experiment, times of sedation, loss of equiblarium, induction, return of equiblarium and recovery from anesthesia were determined in the fish anesthetized with clove essential oil at the concentrations of 10, 25, 50, 75, 100 and ppm. In the second experiment, oxidative stress effects of clove essential oil were investigated in the fish after at 0 and 24 h after induction anesthesia. After induction of anesthesia, sampling of tissues (gill, brain, liver, blood and mucus) of 10 fish was done at 0 (10 minutes after anesthesia) and 24 hours after anesthesia. The samples were analyzed to evaluate the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The results showed that anesthesia with clove essential oil did not cause significant changes in the activity of SOD and GPx enzymes in different tissues of fish. However, in some tissues, there were limited changes in the concentration of CAT enzyme due to anesthesia. Based on this, the concentration of 50 ppm of clove essential oil can be introduced as a suitable anesthetic in terms of not inducing oxidative stress in rainbow salmon. Considering that the changes in the concentrations of SOD, GPx and CAT in mucus and blood were mainly in line with the changes in other fish tissues (brain, liver and gills), non-invasive sampling (sampling of blood and mucus tissues) can be suggested to evaluate oxidative stress in fish anesthesia studies.

Cite this article: Khosravanizadeh, Ali, Mirshekari, Somayyeh. 2025. Investigating changes in some oxidative stress indicators in blood, mucus, brain, liver and gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) anesthetized with clove essential oil. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (4), 131-152.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2024.22048.1841
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

بررسی تغییرات برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو در خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بیهوش‌شده با اسانس میخک

علی خسروانی‌زاده*[1]، سمیه میرشکاری[2]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم آبزیان، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: akhosravanizadeh@gmail.com
۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: somayyeh.mirshekari@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

واژه‌های کلیدی:
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی،
بیهوشی،
Eugenia cairyophillata،
Oncorhynchus mykiss

چکیده

استفاده از بیهوشی یک روش معمول در صنعت آبزی‌پروری برای آرام کردن ماهی‌ها و کاهش استرس در حین حمل و نقل است. با وجود این‌که استفاده از تکنیک بیهوشی به دلیل کم‌تر نمودن استرس و ارتقا رفاه، برای ماهی مفید است، در عین‌حال ممکن است عوارض جانبی خطرناکی را برای ماهی ایجاد کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات بیهوشی با اسانس میخک (*Eugenia cairyophillata*) بر برخی از پارامترهای استرس اکسیداتیو در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بود. در آزمایش اول، زمان‌های تسکین، از دست رفتن تعادل، القا بیهوشی، بازگشت تعادل و احیا کامل در ماهیان بیهوش شده با اسانس میخک در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppm تعیین شد. در آزمایش دوم، اثرات استرس اکسیداتیو بیهوشی با اسانس میخک در ساعات صفر و ۲۴ ساعت پس از بیهوشی در ماهیان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور پس از القای بیهوشی، در ساعات صفر (۱۰ دقیقه بعد از بیهوشی) و ۲۴ ساعت پس از بیهوشی نمونه‌برداری از بافت‌های (آبشش، مغز کبد، خون و موکوس) ۱۰ ماهی انجام شد. نمونه‌ها برای ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) بررسی شدند. نتایج نشان داد که بیهوشی با اسانس میخک تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx در بافت‌های مختلف ماهیان ایجاد نکرد. با این‌حال، در برخی از بافت‌ها، تغییرات محدودی در غلظت آنزیم CAT در اثر بیهوشی به‌وجود آمد. بر این اساس غلظت ۵۰ ppm اسانس میخک (حداقل غلظت بیهوش‌کننده اسانس گل میخک) را می‌توان به عنوان یک داوری بیهوشی مناسب از نظر عدم ایجاد استرس اکسیداتیو در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان معرفی کرد. با توجه به این‌که تغییرات در غلظت آنزیم‌های SOD، GPx و CAT در موکوس و خون عمدتاً

با تغییرات در سایر بافت‌های ماهی (مغز، کبد و آبشش) هم‌راستا بود، می‌توان نمونه‌گیری غیرتهاجمی (استفاده از خون و موکوس) را برای ارزیابی استرس اکسیداتیو در مطالعات بیهوشی ماهیان پیشنهاد کرد.

استناد: خسروانی‌زاده، علی، میرشکاری، سمیه (۱۴۰۳). بررسی تغییرات برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو در خون، موکوس، مغز، کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بیهوش‌شده با اسانس میخک. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۴)، ۱۵۲-۱۳۱.
DOI: 10.22069/japu.2024.22048.1841

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

استفاده از بیهوشی در ماهیان برای حفظ سلامت و تامین رفاه آن‌ها، جلوگیری از صدمات فیزیکی و سهولت کار در طول دوره پرورش یا برای برخی اهداف تحقیقاتی ضروری است (۱). داروهای بیهوشی برای تسهیل کار در طول فرآیند زیست‌سنجی، تخم‌کشی از مولدین در طول عملیات تکثیر مصنوعی ماهیان، واکسیناسیون، رقم‌بندی، بیوپسی، خونگیری، جراحی، برچسب‌گذاری، نقل و انتقال ماهیان و مرگ برنامه‌ریزی شده آن‌ها، استفاده می‌شود (۲ و ۳).

بیهوشی در ماهیان از دو طریق فیزیکی و شیمیایی القا می‌گردد. القای بیهوشی در ماهیان از طریق شیمیایی توسط داروهای بیهوشی طبیعی و صناعی صورت می‌گیرد. معروف‌ترین داروهای بیهوشی صناعی در صنعت آبزی‌پروری عبارتند از: ۲-فنوکسی اتانول (٤)، تریکائین متین سولفانات (MS222) (٥)، بنزوکائین (٦)، اتومیدات (۷)، سولفات کینالدین (۸)، لیدوکائین (۹). یک داروی بیهوشی ایده آل باید بتواند ماهی را در حداقل زمان ممکن بیهوش کند، دارای قدرت عملکرد مناسبی باشد، به فراوانی در دسترس باشد، به لحاظ اقتصادی به صرفه باشد و سمیت کم و حداقلی داشته باشد؛ یک داروی بیهوشی مناسب نباید در بافت‌ها و اندام‌های ماهی رسوب کند، برای مصرف‌کننده انسانی یا خود ماهی ایجاد مشکل نماید و هم‌چنین باید دفع سریعی از بدن ماهی داشته باشد (۱، ۳، ۱۰، ۱۱ و ۱۲). عوارض جانبی نامطلوب استفاده از داروهای بیهوشی صناعی مانند افزایش کِشنگ ماهیچه‌ای، رفتارهای ناهنجار و بیش‌فعالی، افزایش ترشح مخاط، آسیب به قرنیه، تحریک پوست، القای استرس و قیمت نسبتاً بالای این مواد سبب شده در سال‌های اخیر پژوهش‌گران و پرورش‌دهندگان تمایل کم‌تری به استفاده از این نوع داروها داشته باشد و در مقابل توجه‌ها به‌سمت داروهای بیهوش‌کننده طبیعی و گیاهی معطوف شده است (۱۳، ١٤ و ١٥).

در سه دهه اخیر استفاده از اسانس و عصاره تعدادی از گیاهان دارویی به عنوان داروی بیهوشی در گونه‌های مختلف ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال استفاده از اسانس و عصاره گیاهانی مانند میخک (١٦)، نعناع (۱۷) و نعناع فلفلی (۱۸)، اسطوخودوس (۱۹)، زیره (۲۰)، آویشن شیرازی (۲۱)، سنبل‌الطیب و علف لیمو (۲۲) بادرنجبویه، خشخاش و شقایق (۲۳) توسط پژوهش‌گران مختلف بر روی گونه‌های متفاوتی از ماهیان صورت گرفته است.

استفاده از فرآورده‌های میخک (*Eugenia sp.*) در بیهوشی آبزیان، به علت القا بیهوشی (در سطوح مختلف) در غلظت‌های کم، احیا آرام و بدون ناهنجاری ماهیان بیهوش‌شده، عدم القا رفتارهای نامتعارف در ماهیان بیهوش شده پس از احیا، درصد مرگ و میر بسیار اندک ماهیان بیهوش شده با این ماده در غلظت‌های توصیه شده، عدم ایجاد معضلات زیست‌محیطی، فراوانی و در دسترس عموم بودن، در سال‌های اخیر به‌شدت در صنعت آبزی‌پروری و پژوهش‌ها در این زمینه مورد توجه قرار گرفته است (١٦) و از سوی بسیاری از پژوهش‌گران به‌عنوان جایگزینی شایسته برای بیهوش‌کننده‌های متداول در این صنعت معرفی شده است. از برگ‌ها، جوانه‌ها و ساقه‌های درخت میخک برای تولید روغن میخک استفاده می‌شود. اوژنول (4-allyl-2-methoxyphenol) و ایزو اوژنول (4-propenyl-2-methoxyphenol)، که می‌توانند ۹۰ تا ۹۵ درصد وزن روغن میخک را تشکیل دهند، اجزای فعال آن هستند (٢٤).

اگرچه بیهوشی برای کاهش اختلالات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که در اثر جابجایی یا دستکاری ماهی ایجاد می‌شود، در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما خود ماده بیهوشی یا فرآیند بیهوشی و احیا ماهی ممکن است تغییراتی را در شاخص‌های بیوشیمیایی

بدن ماهیان ایجاد کند؛ طبیعی است برخی از این تغییرات ممکن است منجر به استرس اکسیداتیو شود (۲۵). در سناریوی استرس اکسیداتیو تغییرات فیزیولوژیکی در اثر القا بیهوشی و احیا در ماهیان، می‌تواند به عدم تعادل میان تولید پرو اکسیدان‌ها و سلول‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی منجر و تولید استرس اکسیداتیو کند (۲٦). این تغییرات ممکن است به دلیل هیپوکسی ناشی از اختلال در تهویه، زمانی که ماهی بیهوش می‌شود و یا به دلیل اکسیژن‌رسانی مجدد که ممکن است منجر به شرایط هایپراکسی شود در لحظه‌ای که ماهی‌ها در طول فرآیند احیا، به آب اشباع از اکسیژن طبیعی برمی‌گردند، رخ دهد (۲۷). پرو اکسیدان‌ها یا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که به علت کاهش اکسیژن در بافت‌ها شکل می‌گیرند (۲۸) و معمولاً در جاندارانی که در معرض زنبیوتیک‌ها (مواد شیمیایی خارجی در یک ارگانیسم که به‌طور طبیعی تولید نشده است) قرار دارند (۲۹ و ۳۰) و یا در شرایط استرس قرار دارند به شکل بیش از حدی ایجاد می‌شوند. گونه‌های فعال اکسیژن مسئول آسیب به پروتئین‌های سلولی، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و سایر ساختارها در حیوانات مختلف هستند که منجر به آسیب دائمی در بافت‌ها و اندام‌ها می‌شوند (۲٦، ۳۱ و ۳۲).

از آن‌جا که در شیوه القای بیهوشی از طریق غوطه‌وری ماهی در داروی بیهوشی، مواد القاکننده بیهوشی از طریق بافت آبشش به بدن ماهیان وارد و سپس از طریق جریان خون به سراسر بدن انتقال پیدا می‌کند، احتمال بروز اثرات جانبی این داروها در اندام‌های مختلف ماهی وجود دارد؛ بنابراین ضروری است با مطالعه تغییر غلظت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی که یکی از اصلی‌ترین دیوارهای دفاعی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان محسوب می‌شوند، ارزیابی ایمنی داروهای بیهوشی در این زمینه را برای ماهیان انجام داد (٤). با عنایت به وجود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف بدن جانوران، پژوهش در خصوص تعیین بهترین بافت برای نمونه‌برداری در خصوص ارزیابی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان پس از مواجهه با داروهای بیهوشی که در ضمن این‌که به بهترین شکل تغییرات سطوح آنزیم‌ها را نمایش دهد، کم‌ترین عوارض جانبی را در طی نمونه‌برداری برای ماهیان به همراه داشته باشد ضروری است. با توجه به مطالعات محدود در این زمینه در مطالعه حاضر اثرات احتمالی بیهوشی با اسانس گل میخک بر برخی از آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در بافت‌های آبشش، مغز، کبد، خون و موکوس مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

ماهی و سازگاری: به‌منظور ارزیابی اثر اسانس میخک (*Eugenia cairyophillata*) بر سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های گوناگون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از مزرعه‌ای خصوصی تعداد ۲۵۲ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۱/۰۳±۷/۱۵ گرم تهیه و جهت انجام آزمایش‌های مربوطه به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون پژوهشگاه زابل انتقال یافت. ماهیان منتقل شده به جهت همخوانی با شرایط محیطی جدید برای دو هفته در مخازنی با حجم ٤۰۰ لیتر دارای ۳۰۰ لیتر آب تازه و هوادهی نگهداری شدند. در طول دوره سازگاری جهت تغذیه این ماهیان از جیره تجاری SFT2 شرکت فرادانه به‌صورت دو بار هر روز استفاده شد، هم‌چنین به‌صورت روزانه ۳۰ درصد از آب مخزن تعویض می‌شد. با عنایت به این‌که آب مورد استفاده آب شهری کلرزدایی شده بود، در کل دوره سازگاری و

انجام آزمایش‌ها، شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب مانند درجه حرارت آب، pH آب، مقدار اکسیژن محلول آب و درجه سختی آب مورد ارزیابی و نگارش قرار گرفت. شایان ذکر است اسانس میخک به‌کار رفته در این بررسی با محتوی ۸۰ درصد اوژنول از شرکت زردبند خریداری شد.

گروه‌های آزمایش: این پژوهش در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی انجام شد. پس از طی شدن زمان تطابق‌پذیری ماهیان با شرایط جدید، تعداد ۱۸۰ قطعه از ماهیان به صورت تصادفی به ٦ گروه ۱۰ تایی تقسیم و جهت تخمین حداقل دوز بیهوش‌کننده به آکواریوم‌های جداگانه‌ای منتقل شدند. برای بیهوش کردن گروه‌های ٦ گانه از غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ قسمت در میلیون اسانس میخک استفاده شد (۳۳ و ۳٤). القا بیهوشی در ماهیان در آکواریومی با ۲۰ لیتر آب حاوی غلظت مربوطه از اسانس میخک انجام شد. بدین‌منظور هر ماهی به ظرفی که دارای ماده بیهوشی با غلظت‌های تعریف شده بود (جدول ۱)، منتقل و با استفاده از زمان‌سنج، زمان‌های رسیدن به مراحل تسکین، از دست‌دادن تعادل و بیهوشی سبک قرائت و ثبت شد. ماهیان بیهوش‌شده برای احیا به تانک حاوی آب تازه و اکسیژن اشباع منتقل و زمان‌های رسیدن به مراحل مختلف احیا (جدول ۱) در آن‌ها تعیین و ثبت شد (۳۵). با توجه به اطلاعات به دست آمده و انجام آنالیزهای آماری حداقل غلظت مورد نیاز جهت القا بیهوشی با کمک اسانس میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان محاسبه شد.

در ادامه ۷۲ قطعه ماهی باقی‌مانده با وزن تقریبی ۰/۸۱±۷/۱۲ گرم به طور کاملاً تصادفی به ۲ گروه (هر گروه دارای ۳ تکرار؛ در هر تکرار ۱۲ عدد ماهی در نظر گرفته شد) تقسیم شدند. گروه اول به عنوان شاهد فرض شد و ماهیان این گروه تحت بیهوشی قرار نگرفتند. ماهی‌های گروه دوم را در آکواریوم‌هایی که حاوی آب تازه و داروی بیهوشی (حداقل غلظت اسانس میخک مورد نیاز برای القا بیهوشی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان که در مرحله قبلی آزمایش محاسبه شد یعنی ۵۰ قسمت در میلیون) بود به روش غوطه‌وری مورد القا بیهوشی قرار گرفتند. به منظور احیای ماهی‌های بیهوش شده، ماهیان به آکواریومی ۵۰ لیتری با آب تازه و اکسیژن اشباع منتقل و مراحل مختلف احیا شامل مرحله برگشت دوباره تعادل به ماهیان و مرحله واکنش نشان دادن ماهیان به محرک‌های بیرونی مانند ضربه به شیشه آکواریوم (احیا کامل) با نهایت دقت مورد بررسی و ثبت شد.

تهیه نمونه‌های آزمایش: جهت سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف ماهیان از هر تکرار ۳ نمونه برای هر بافت تهیه شد، صید ماهیان مورد ارزیابی به‌صورت تصادفی انجام و نمونه‌برداری از آن‌ها شامل تهیه نمونه موکوس از سطح پوست ماهیان، تهیه نمونه خون و جمع‌آوری بافت‌های مغز، کبد و آبشش صورت پذیرفت. شایان ذکر است نمونه‌برداری در ۵۰ درصد ماهیان هر تکرار گروه‌های آزمایش، بلافاصله بعد از بیهوشی (۱۰ دقیقه بعد از بیهوشی) و ۵۰ درصد دیگر در ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی (۱۱٤۰ دقیقه بعد از بیهوشی) انجام شد.

از هر یک از ماهیان صید شده با کمک سرنگ استریل ۱ سی‌سی خون از ناحیه سیاهرگ ساقه دمی جمع‌آوری شد. برای تهیه سرم نمونه‌های خون، پس لخته شدن نمونه، با کمک سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور گردش در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه) سرم نمونه‌ها جدا و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها ذخیره شد (۲۵ و ۳٦).

به‌منظور اندازه‌گیری تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های آبشش، مغز و کبد، بافت‌های مذکور با دقت از بدن ماهیان (از هر تکرار ۳ ماهی) استخراج و

پس از توزن با ترازوی با دقت ۱ میلی‌گرم به سرعت در نیتروژن مایع، منجمد و سپس در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از بافت‌های مذکور پس از شستشو با سرم فیزیولوژی سرد با استفاده از هموژنایزر و فسفات بافر سالین (PBS, pH=۷/٤) سرد محلول هموژن تهیه شد (۵۸). پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها (در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه) بخش بالایی هر نمونه جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۵).

جمع‌آوری موکوس پوست ماهیان بر اساس روش کار رز و همکاران (۲۰۰۰) به اندکی تغییرات صورت گرفت. به این منظور از هر تکرار ۳ ماهی مورد بررسی قرار گرفت؛ ماهیان به صورت فردی به کیسه‌ای پلی‌اتیلنی با محتوی ۱۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین انتقال یافتند و به مدت یک دقیقه در محلول مذکور تکان داده شدند، در ادامه ماهی از کیسه خارج و محلول حاوی موکوس، سانتریفیوژ و بخش فوقانی تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۷).

جدول ۱- طبقه‌بندی مراحل بیهوشی در ماهیان (۳۵).

Table 1. Classification of anesthesia stages in fish (35).

مرحله	رفتار ماهی
تسکین	تعداد تنفس‌های ماهی کاهش می‌یابد، تعادل ماهی عادی است و ماهی به محرک‌های خارجی دیداری و شنیداری پاسخ نمی‌دهد.
ازدست‌دادن تعادل	شمار تنفس‌های ماهی موقتاً افزایش می‌یابد، تعادل ماهی کاملاً از دست می رود و ماهی به محرک‌های لمس قوی پاسخ می‌دهد.
القا بیهوشی سبک	تونیسیته عضلانی به شکل کامل از دست می‌رود، ماهی به محرک‌های خارجی واکنش نشان نمی‌دهد و ضربان قلب ماهی آهسته می‌گردد.
بازگشت تعادل	تعادل ماهی به شکل کامل بازمی‌گردد و تعداد تنفس‌های ماهی افزایش می‌یابد.
احیا کامل	شنا ماهی عادی است و ماهی نسبت به انواع محرک‌های خارجی واکنش نشان می‌دهد.

سنجش تغییرات آنزیم‌ها: در عصاره‌های بافت‌ها، نمونه‌های سرم و موکوس تهیه شده از ماهیان تیمارهای مختلف، تغییرات میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) اندازه‌گیری شد.

سنجش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با بهره‌گیری از کیت شرکت پادگین طب از محصولات شرکت زلبیوی آلمان (Zelbio, Germany) و به شیوه رنگ‌سنجی و قرائت در طول‌موج ٤۲۰ نانومتر صورت پذیرفت (۳۸). سنجش آنزیم کاتالاز به‌وسیله کیت شرکت پادگین طب محصول زلبیوی آلمان انجام شد. اندازه‌گیری به روش رنگ‌سنجی و با طول‌موج ٤۰۵ نانومتر صورت گرفت (۳۸ و ۳۹). برای سنجش آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از شیوه آنزیمی بهره گرفته شد. این شیوه فعالیت GPx را به طور غیرمستقیم با یک واکنش وابسته به گلوتاتیون ردوکتاز (GR) اندازه‌گیری می‌کند. اکسید حاصله از گلوتاتیون (GSSG)، بار دیگر و به کمک آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) احیا و NADPH به NADP بدل گردید. با قرائت تغییرات در جذب NADPH در طول‌موج ۳٤۰ نانومتر سرعت تولید گلوتاتیون را سنجش شد (٤۰).

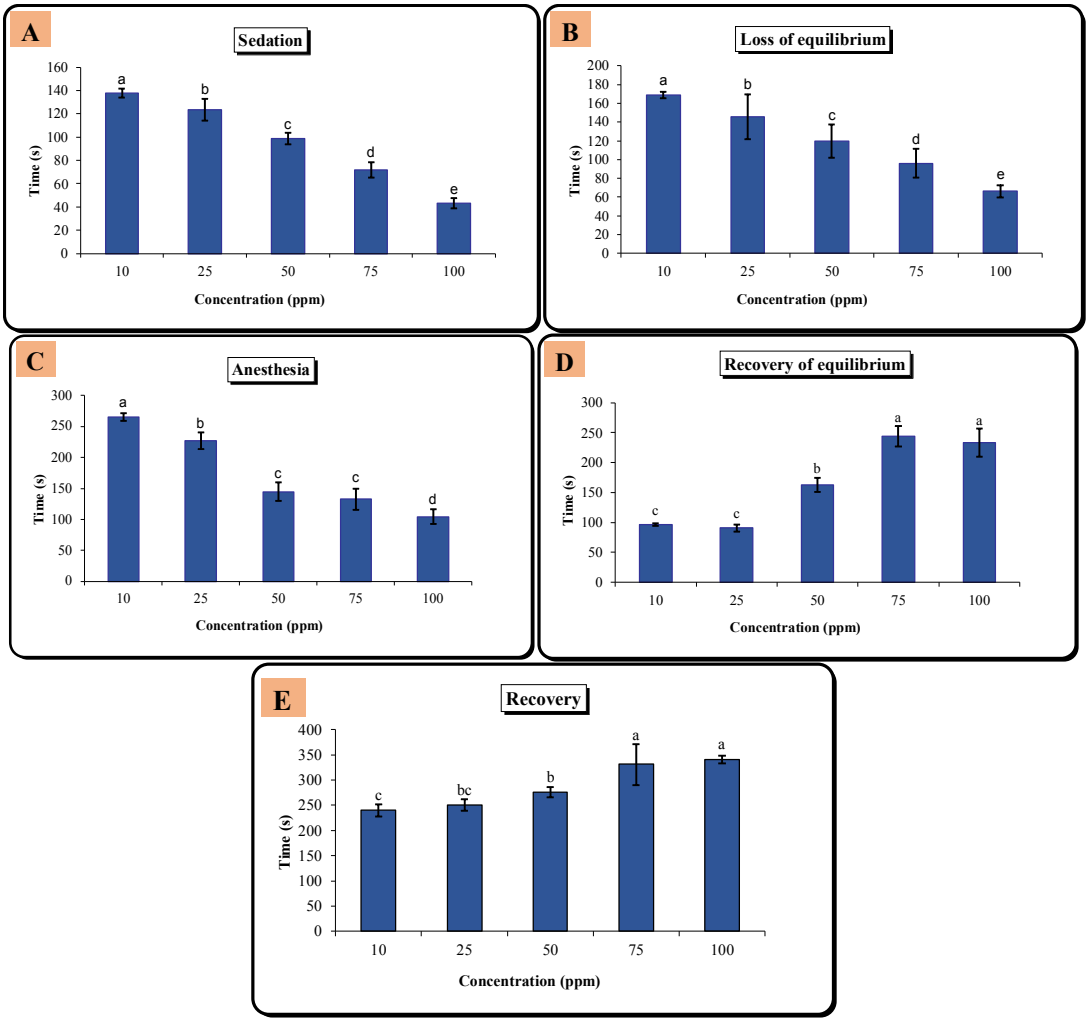
سنجش پروتئین با استفاده از کیت بیونیک Bionik ساخت کشور ایران به روش بیوره–رنگ‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (به صورت دستی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت در طول موج ٥٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با استفاده از آزمون Shapiro–Wilk نرمال بودن داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور آنالیزی آماری داده‌ها از نرم‌افزارهای Excel و SPSS (ویرایش ۲۲) استفاده شد. ارزیابی آماری داده‌های گردآوری شده، با به‌کارگیری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way-ANOVA) و کمک آزمون آماری توکی (Tukey's) و در سطح معنی‌داری ۰/۰٥ صورت پذیرفت.

نتایج

بررسی ویژگی‌های کیفی آب مخازن نگهداری ماهیان در دوره پیش آزمایش و مدت انجام آزمایش‌ها نشان داد شاخص‌های مربوطه با نوسانات کم، همگی در حد توصیه شده (میانگین دما: ۱/۲٥±۱٤/۲۹ درجه سانتی‌گراد، میانگین pH آب: ۰/۱۹±۸/۲۷، میانگین اکسیژن محلول آب: ۰/٤۳±۸/۰۹ میلی‌گرم در لیتر و میانگین سختی آب بر حسب کربنات کلسیم ۱۲/۹۸±۲۱۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر) بودند. نتایج حاصله از بیهوشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با مقادیر مختلفی از اسانس گل میخک و سنجش و ثبت شاخص‌های مختلف مانند زمان مورد نیاز جهت تسکین ماهیان، زمان مورد نیاز جهت از دست رفتن تعادل ماهیان، زمان مورد نیاز جهت القا بیهوشی در ماهیان، زمان مورد نیاز جهت بازگشت تعادل ماهی و زمان مورد نیاز جهت احیاء کامل ماهیان در شکل ۱ آمده است. بر اساس نتایج حاصله (شکل ۱) حداقل دوز لازم از اسانس گل میخک جهت القا بیهوشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در این مطالعه ٥۰ قسمت در میلیون بود که به طور متوسط در یک بازه زمانی ۱٤/۸±۱٤٤/٤ ثانیه‌ای بیهوشی را در ماهیان ایجاد کرد. هم‌چنین متوسط زمان مورد نیاز جهت احیا کامل ماهیان یا بازگشت واکنش‌پذیری آن‌ها در برابر محرک‌های خارجی مانند ضربه به شیشه آکواریوم در این غلظت ۱۰/۲±۲۷٦ ثانیه بود.

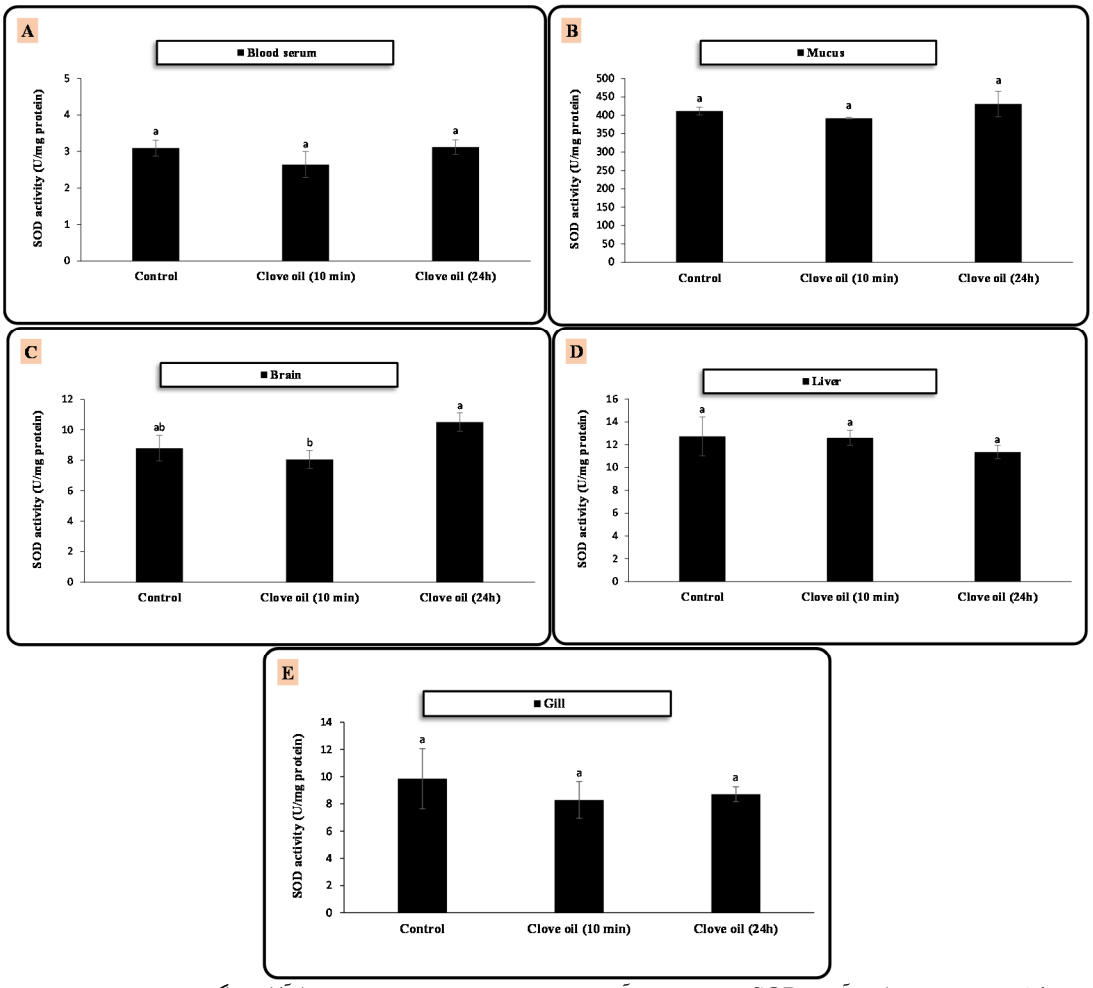
زمان‌های ثبت شده در مورد مراحل مختلف بیهوشی نشان داد رابطه‌ای معکوس بین غلظت داروی بیهوشی (اسانس گل میخک) و زمان لازم جهت ایجاد بیهوشی در ماهیان وجود دارد به نحوی که با افزایش دوز دارو از ۱۰ به ۱۰۰ قسمت در میلیون، سرعت بیهوش شدن ماهیان به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰٥$) افزایش و ماهیان در مدت زمان کوتاه‌تری به مرحله بیهوشی سبک (در غظت ۱۰ قسمت در میلیون متوسط زمان لازم برای القا بیهوشی در ماهیان ٦/۱٤±۲٦٥/۰۸ ثانیه و در غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون ۱۱/۷٦±۱۰٤/۳٤ ثانیه بود) رسیدند. در مقابل بین غلظت داروی بیهوشی (اسانس گل میخک) و زمان لازم برای احیا کامل ماهیان رابطه مستقیم مشاهده شد. به نحوی که زمان مورد نیاز به منظور احیا کامل ماهیان در غلظت ۱۰ قسمت در میلیون (پایین‌ترین دوز به‌کار گرفته شده) به طور میانگین ۱۱/۷۸±۲٤۰/۰٥ ثانیه و به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰٥$) کم‌تر از زمان لازم (۷/۳۹±۳٤۰/٥٦ ثانیه) جهت احیا ماهیان در غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون (بالاترین دوز به‌کار گرفته شده) بود.



شکل ۱- اثرات بیهوش‌کننده غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ قسمت در میلیون اسانس میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

Figure 1. Anesthetic effects of 10, 25, 50, 75 and 100 ppm of clove essential oil on rainbow trout.

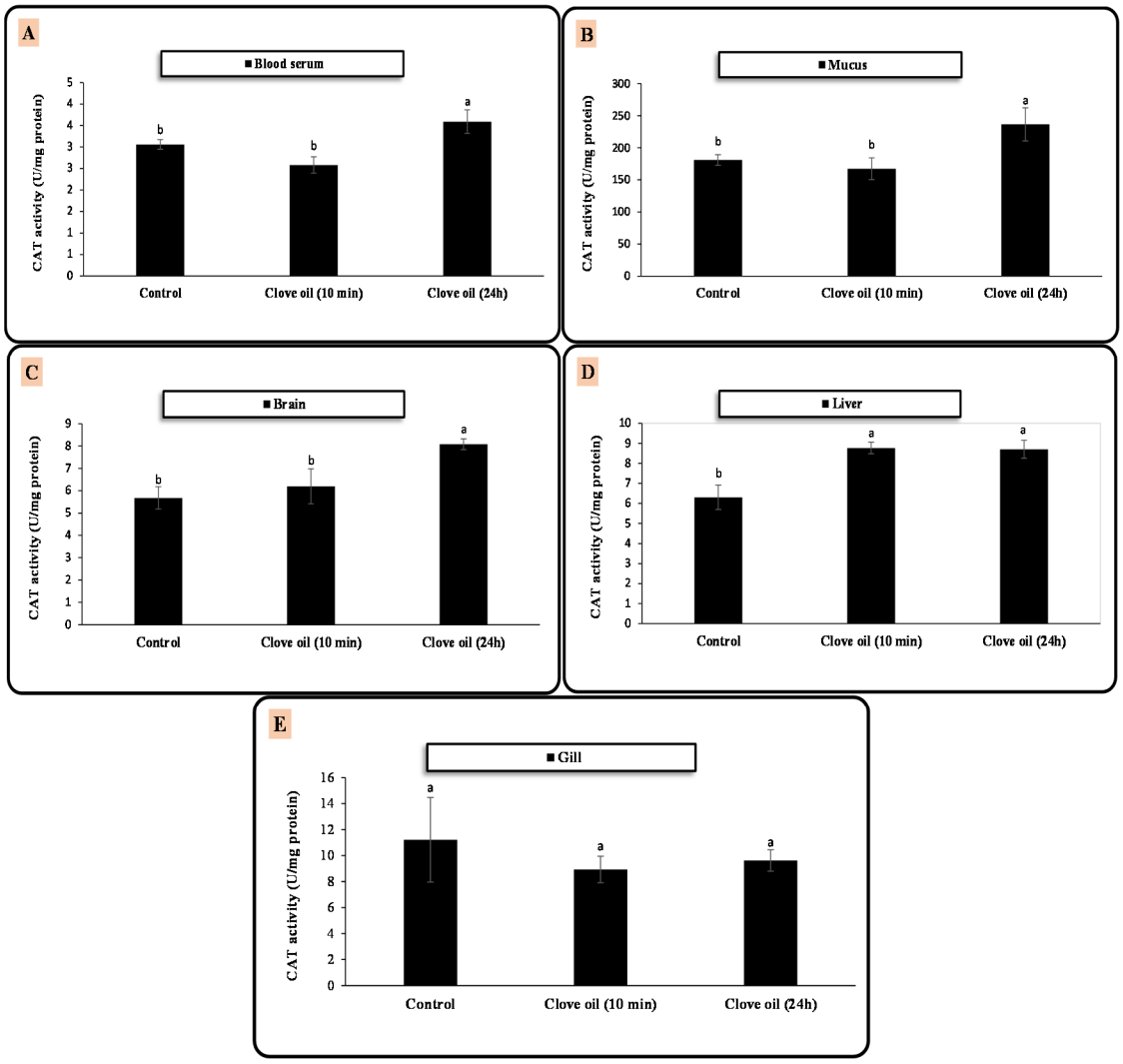
رصد حرکات و رفتار ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان مواجهه با داروی بیهوشی تا ۹۶ ساعت بعد از آن نشان داد اسانس میخک در غلظت‌های به‌کارگرفته شده در این بررسی، اثرات جانبی مانند تغییر رفتار مشهود در نحوه شناگری یا تنفس ماهیان و یا تغییرات ظاهری مانند تغییر در رنگ بدن را به همراه نداشت، هم‌چنین تا یک هفته پس از القا بیهوشی، در ماهیان مورد آزمایش تلفاتی ثبت نشد؛ بنابراین می‌توان تمامی دوزهای به‌کارگرفته شده اسانس میخک در این مطالعه را برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بی‌خطر در نظر گرفت.



شکل ۲- مقایسه فعالیت آنزیم SOD در مغز، کبد، آبشش، سرم خون و موکوس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوشی شده با کم‌ترین غلظت بیهوش‌کننده اسانس گل میخک در زمان‌های ۱۰ و ۱۱٤۰ دقیقه پس از بیهوشی.

Figure 2. Comparison of SOD activity in the brain, liver, gill, blood serum and mucus of anesthetized rainbow trout with the lowest anesthetic concentration of clove essential oil at 10 and 1140 minutes after anesthesia.

نتایج مربوط به سنجش تغییرات فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در مغز، کبد، آبشش، سرم خون و موکوس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض قرار گرفته با کم‌ترین غلظت بیهوش‌کننده اسانس میخک (۵۰ قسمت در میلیون) در زمان‌های ۱۰ و ۱۱٤۰ دقیقه پس از القا بیهوشی در شکل ۲ ارائه شده است. مطابق نتایج به‌دست آمده، القا بیهوشی با کم‌ترین غلظت اسانس گل میخک در مقایسه با ماهیان گروه شاهد اثر معنی‌داری بر سطح فعالیت آنزیم SOD در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد (P>۰/۰۵). تنها در بافت مغز (شکل ۲-C) سطح آنزیم مذکور در زمان ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی نسبت به زمان ۱۰ دقیقه بعد از بیهوشی به شکل معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۵). مقایسه میزان فعالیت آنزیم SOD در بافت‌های مورد بررسی نشان داد که در تمامی تیمارها (شاهد، ۱۰ دقیقه پس از القا بیهوشی و ۲٤ ساعت پس از القا بیهوشی) بیش‌ترین فعالیت آنزیم در ماهیان بیهوش‌شده با ۵۰ قسمت در میلیون اسانس میخک در موکوس ٤۳۱/۰۳±۳٤/٤۵ واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین و کم‌ترین فعالیت در سرم خون ۲/٦٤±۰/۳۵ واحد بین‌الملل بر میلی‌گرم پروتئین سنجش شده است (P<۰/۰۵) (شکل ۲).

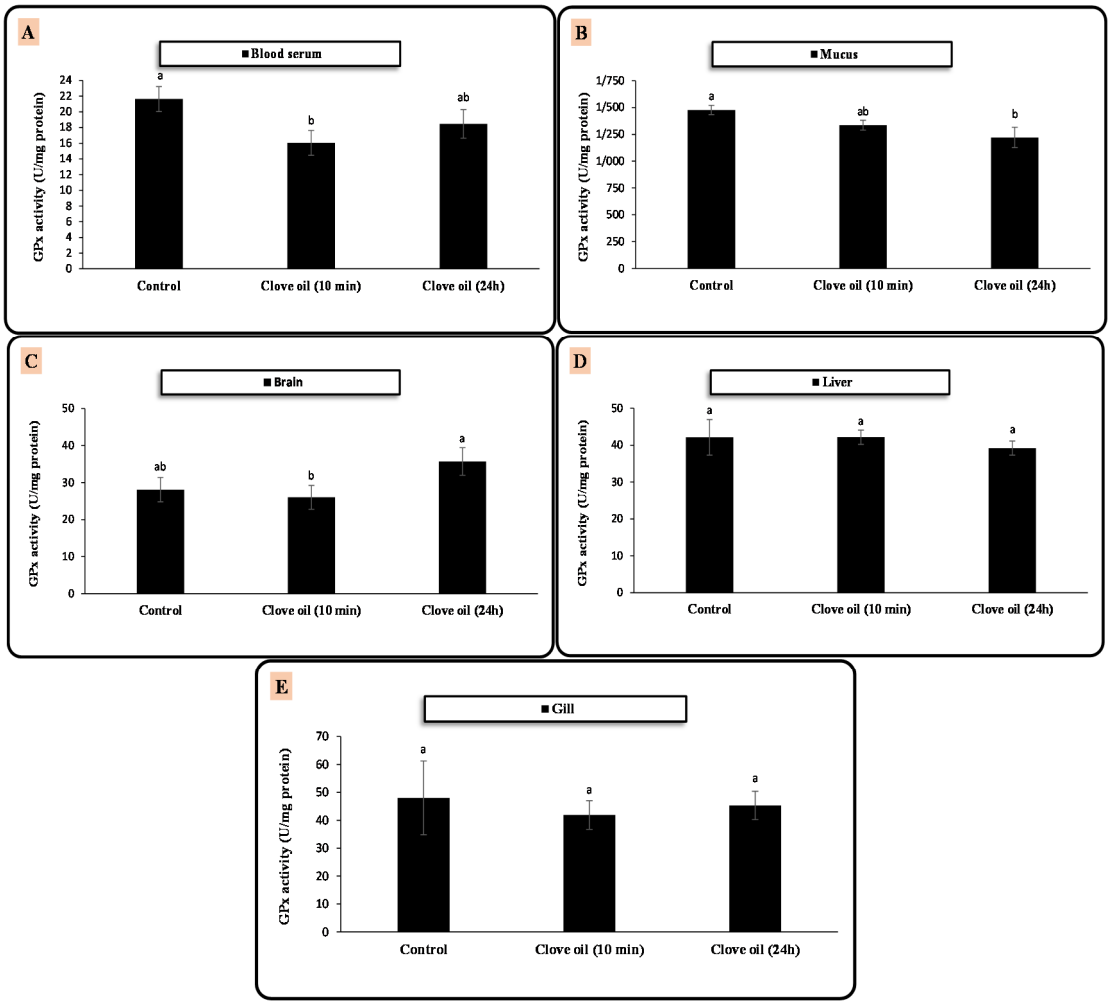


شکل ۳- مقایسه فعالیت آنزیم CAT در مغز، کبد، آبشش، سرم خون و موکوس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوشی شده با کم‌ترین غلظت بیهوش‌کننده اسانس گل میخک در زمان‌های ۱۰ و ۱۱۴۰ دقیقه پس از بیهوشی.

Figure 3. Comparison of CAT activity in brain, liver, gill, blood serum and mucus of rainbow trout anesthetized with the lowest anesthetic concentration of clove essential oil at 10 and 1140 minutes after anesthesia.

نتایج مربوط به سنجش تغییرات فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT) در مغز، کبد، آبشش، سرم خون و موکوس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض قرار گرفته با کم‌ترین غلظت بیهوش‌کننده اسانس میخک (۵۰ قسمت در میلیون) در زمان‌های ۱۰ و ۱۱٤۰ دقیقه پس از القا بیهوشی در شکل ۳ ارائه شده است. مطابق نتایج به‌دست آمده، القا بیهوشی با کم‌ترین غلظت اسانس گل میخک در مقایسه با ماهیان گروه شاهد اثر معنی‌داری بر سطح فعالیت آنزیم CAT در بافت آبشش (شکل ۳-E) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد (P>۰/۰۵). در بافت‌های مغز (شکل ۳-C) خون (شکل ۳-A) و موکوس (شکل ۳-B) سطح آنزیم مذکور در زمان ۱۰ دقیقه پس از بیهوشی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشته است اما در زمان ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی در مقایسه با تیمار شاهد و زمان ۱۰ دقیقه بعد از بیهوشی به شکل معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۵). تنها در بافت کبد (شکل ۳-D) ملاحظه می‌شود بیهوشی با اسانس میخک در هر دو زمان نمونه‌برداری سطح فعالیت آنزیم را در مقایسه با تیمار شاهد به شکل معنی‌داری افزایش داده است (P<۰/۰۵). مقایسه میزان فعالیت آنزیم CAT در بافت‌های مورد بررسی نشان داد که در تمامی تیمارها (شاهد، ۱۰ دقیقه پس از القا بیهوشی و ۲٤ ساعت پس از القا بیهوشی) بیش‌ترین فعالیت آنزیم در ماهیان بیهوش شده با ۵۰ قسمت در میلیون اسانس میخک در موکوس ۲۵/۷۵±۲۳٦/٤۵ و کم‌ترین فعالیت در سرم خون ۰/۱۹±۲/۵۸ سنجش شده است (P<۰/۰۵) (شکل ۳).

نتایج مربوط به سنجش تغییرات فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در مغز، کبد، آبشش، سرم خون و موکوس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض قرار گرفته با کم‌ترین غلظت بیهوش‌کننده اسانس میخک (۵۰ قسمت در میلیون) در زمان‌های ۱۰ و ۱۱٤۰ دقیقه پس از القا بیهوشی در شکل ٤ ارائه شده است. مطابق نتایج به‌دست آمده، القا بیهوشی با کم‌ترین غلظت اسانس گل میخک در مقایسه با ماهیان گروه شاهد اثر معنی‌داری بر سطح فعالیت آنزیم GPx در بافت‌های مختلف مورد ارزیابی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد (P>۰/۰۵). تنها در بافت مغز (شکل ٤-C) سطح آنزیم مذکور در زمان ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی نسبت به زمان ۱۰ دقیقه بعد از بیهوشی به شکل معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۵). بر خلاف بافت مغز در موکوس (شکل ٤-B) سطح آنزیم مذکور در زمان ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی نسبت به ماهیان شاهد که بیهوشی در آن‌ها اعمال نشده بود به شکل معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵). در سرم خون (شکل ٤-A) سطح آنزیم مذکور در زمان ۱۰ دقیقه بعد از اعمال بیهوشی نسبت به ماهیان شاهد که بیهوشی در آن‌ها اعمال نشده بود به شکل معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵). مقایسه میزان فعالیت آنزیم GPx در بافت‌های مورد بررسی نشان داد که در تمامی تیمارها (شاهد، ۱۰ دقیقه پس از القا بیهوشی و ۲٤ ساعت پس از القا بیهوشی) بیش‌ترین فعالیت آنزیم در ماهیان بیهوش شده با ۵۰ قسمت در میلیون اسانس میخک در موکوس ٤۲/۹۳±۱٤۷۷/۸۲ و کم‌ترین فعالیت در سرم خون ۱/۵۹±۱٦/۰۵ سنجش شده است (P<۰/۰۵) (شکل ٤).



شکل ٤- مقایسه فعالیت آنزیم GPx در مغز، کبد، آبشش، سرم خون و موکوس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوشی شده با کم‌ترین غلظت بیهوش‌کننده اسانس گل میخک در زمان‌های ۱۰ و ۱۱٤۰ دقیقه پس از بیهوشی.

Figure 4. Comparison of GPx activity in brain, liver, gill, blood serum and mucus of anesthetized rainbow trout with the lowest anesthetic concentration of clove essential oil at 10 and 1140 minutes after anesthesia.

بحث

یکی از اصلی‌ترین شاخص‌های یک داروی بیهوش‌کننده ایده‌آل برای استفاده در صنعت آبزی‌پروری، ایجاد بیهوشی در زمانی حداکثر ۳ دقیقه‌ای و احیا ماهیان بیهوش شده در حداکثر ۵ دقیقه است (٤۱). با در نظر گرفتن همین شاخص در مطالعه پیش‌رو کم‌ترین غلظت لازم از اسانس گل میخک برای القا بیهوشی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۵۰ قسمت در میلیون تعیین شد که به طور میانگین در ۱٤٤/٤±۱٤/۸ ثانیه بیهوشی و ۲۷٦±۱۰/۲ ثانیه احیا کامل را در ماهیان ایجاد کرد. در مطالعات متعدد غلظت‌های متفاوتی از این دارو برای بیهوشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌کار گرفته شده است دامنه به‌کار گرفته شده برای این منظور از ۲۰ تا ۲۵۰ میلیون در قسمت متغیر بوده است (٦، ٤۲، ٤۳ و ٤٤). عوامل متعددی از جمله جنسیت ماهیان مورد مطالعه، تفاوت در سن، فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مانند دما، اسیدیه و قلیائیت، قابلیت انحلال ماده بیهوشی در چربی و مقدار یونیزاسیون آن در آب می‌تواند به‌عنوان دلیل برای این تفاوت‌های گسترده مطرح باشد

(۳۵، ٤۵ و ٤٦). هم‌چنین بررسی نتایج به‌دست آمده مشخص کرد، با افزایش میزان دوز اسانس میخک در آکواریوم بیهوشی، مدت زمان لازم برای رخ دادن مراحل مختلف بیهوشی کم‌تر می‌شود و در مقابل مدت زمان مورد نیاز برای بازگشت ماهیان بیش‌تر (اگرچه این افزایش در دوزهای نزدیک به هم خیلی قابل توجه نیست) می‌شود. مشابه این نتایج در مطالعات متعدد دیگری از جمله مطالعه خسروانی‌زاده و همکاران (۱۳۹۰) (١٦) به‌دست آمده است.

در یک دهه گذشته مطالعات متعددی در زمینه بیهوشی آبزیان نشان داده است که القا بیهوشی در ماهیان می‌تواند سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را نیز تحت‌تأثیر قرار دهد (٤٧). کاهش سرعت تنفس ماهیان در طول مدت بیهوشی باعث ایجاد هیپوکسی پایدار می‌شود که به نوبه خود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون-S-ترانسفراز) و غیرآنزیمی (مانند گلوتاتیون کاهش یافته) را فعال می‌کند (٤٨). فعال شدن دفاع آنتی‌اکسیدانی با هدف جبران استرس اکسیداتیوی است که در دقایق اولیه احیا ماهی بعد از بیهوشی در اثر اکسیژن‌رسانی مجدد به بافت‌ها و در نتیجه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در بافت‌های مختلف رخ می‌دهد، صورت می‌گیرد (٤٩). بر همین اساس ضرورت دارد در بررسی ایمنی یک داروی بیهوشی در ماهیان رصد تغییرات در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در بافت‌های مختلف صورت پذیرد تا در صورتی که این تغییرات در یک دامنه قابل‌قبول بوده و در یک زمان حداقلی به حالت عادی برمی‌گردد، اقدام به توصیه آن ماده بیهوشی (در غلظت مورد بررسی) شود.

نتایج کسب شده در مطالعه حاضر نشان داد، بیهوش نمودن بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون اسانس گل میخک اثر معنی‌داری بر سطح فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در بافت‌های مختلف ماهی ندارد (P>۰/۰۵). واکنش‌های بیولوژیکی متعددی رادیکال سوپراکسید تولید می‌کنند که گونه‌ای بسیار سمی است. با وجود این‌که این رادیکال‌ها نمی‌توانند مستقیماً اکسیداسیون لیپیدی را آغاز کنند، آنیون‌های رادیکال سوپراکسید پیش‌سازهای بالقوه گونه‌های بسیار واکنش‌پذیری مانند رادیکال هیدروکسیل هستند و بنابراین مطالعه مهار این رادیکال در ارزیابی‌های ایمنی داروها در جانوران مهم است (۵۰). بر همین اساس بدیهی است که ظرفیت مهار آنیون سوپراکسید در موجودات زنده اولین خط دفاعی آن‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محسوب می‌شود (۵۱). با وجود این‌که سوپراکسیدها اکسیدان‌های نسبتاً ضعیفی هستند و واکنش‌پذیری شیمیایی محدودی از خود نشان می‌دهند، اما می‌توانند گونه‌های خطرناک‌تری از جمله رادیکال‌های اکسیژن و هیدروکسیل تولید کنند که باعث پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (۵۲). این گونه‌ها توسط تعدادی از سیستم‌های آنزیمی در واکنش‌های خوداکسیداسیون و با انتقال الکترون غیرآنزیمی تولید می‌شوند که به‌طور یک‌ظرفیتی اکسیژن مولکولی را کاهش می‌دهند. آنیون‌های سوپراکسید پیش‌ساز رادیکال‌های آزاد فعال هستند که پتانسیل واکنش با ماکرومولکول‌های بیولوژیکی و در نتیجه ایجاد آسیب‌های بافتی را دارند (۵۳). از طرف دیگر آنیون سوپراکسیدها نقش مهمی در تشکیل ROSهای دیگر مانند پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن منفرد دارند که باعث ایجاد آسیب اکسیداتیو در لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود (٥٤). در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نقش مهمی در دیسموتاسیون سوپر اکسید به هیدروژن پروکسید دارد (۵۵). از همین رو روند تغییرات این آنزیم می‌تواند شاخص مهمی در مطالعه وضعیت دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان

در مواجهه با زنبیوتیک‌های مختلف می‌باشد.بیهوشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با اسانس گل میخک اثر معنی‌داری بر سطح آنزیم SOD در بافت‌های آبشش، کبد، ماهیچه و روده ماهیان نداشت و تنها باعث کاهش سطح این آنزیم در بافت مغز شد (۲۵). بیهوشی گربه‌ماهیان نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) با استفاده از اسانس *Aloysia triphylla* اثر معنی‌داری بر سطح فعالیت آنزیم SOD نداشت (٤٧). هم‌چنین بیهوشی ماهی باس دریایی چینی (*Lateolabrax maculatus*) با استفاده از اوژنول سطح SOD را آبشش ماهیان تا ٤٨ ساعت بعد از بیهوشی نسبت به گروه کنترل کاهش داد (٥٦). القا بیهوشی با استفاده از اسانس میخک در سس ماهی (*Barbus barbus*) نیز سبب کاهش سطح آنزیم SOD در بافت های کبد و ماهیچه و در مقابل افزایش این آنزیم در مغز و آبشش ماهیان در زمان ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی شد (٥٧). استفاده از اوژنول برای القا بیهوشی در ماهی تیلاپیا اثر معنی‌داری بر میزان آنزیم SOD در ماهیان نشان نداد (٥٨). کاهش معنی‌دار سطح آنزیم SOD در بافت مغز ماهیان تحت‌تأثیر مواد بیهوشی شیمیایی مانند ۲-فنوکسی اتانول، Propiscin و MS_{222} در مقایسه با گروه شاهد گزارش شده است (۲۵). با توجه به این‌که گزارش شده است که خواص آنتی‌اکسیدانی برخی فلاونوئیدها در از بین بردن رادیکال آنیون سوپراکسید مؤثر است (٥٩) و این‌که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان یک سیستم چندلایه است و حضور ترکیبات آنتی اکسیدانی دیگر در بدن از طریق مهار بخشی از رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن ماهی، می تواند در عدم تحلیل سایر بخش‌های این سیستم دفاعی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD مؤثر باشد (٤)؛ بر همین اساس می‌توان تغییرات ناچیز سطوح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مواجه با داروهای بیهوشی گیاهی را به این موضوع ارتباط داد، اما تأیید قطعیت این موضوع نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد. در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس گل میخک ثابت شده غلظت ١٥ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس میخک، حدود ٥٧ درصد تولید رادیکال آنیون سوپراکسید را مهار می‌کند که از ظرفیت بالقوه این ماده در کاهش سطح ROS های تولیدی در روند احیا ماهیان از بیهوشی حکایت دارد. نتایج این مطالعه نشان داد اگرچه بلافاصله بعد از بیهوشی افت جزئی در میزان فعالیت این آنزیم در بافت‌های مختلف دیده می‌شود اما این کاهش سطح معنی‌دار نبود و عمدتاً در طول ٢٤ ساعت به سطح این آنزیم در ماهیان گروه شاهد رسیده است. در نقطه مقابل در برخی مطالعات دیگر نتایجی متضاد با نتایج به‌دست آمده به عنوان مثال القا بیهوشی در ماهی پاکوی سیاه *Colossoma macropomum* با استفاده از اسانس *Myrcia sylvatica* و *Curcuma longa* سبب افزایش معنی‌دار سطح آنزیم SOD در بافت مغز ماهیان بلافاصله بعد از بیهوشی شد (٦٠). استفاده از اسانس *Ocimum gratissimum* جهت بیهوشی ماهی سبب کاهش سطح SOD در کبد و افزایش این آنزیم در مغز ماهی *Lophiosilurus alexandri* شد هم‌چنین پژوهش‌گران نشان دادند با افزایش غلظت داروی بیهوش سطح ROSها در بافت مغز و کبد به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابد (٦١). در مطالعاتی نیز نتایج نشان داد افزایش غلظت داروی بیهوشی (اسانس *Ocimum gratissimum*) سبب افزایش غلظت ROS ها در بافت کبد ماهیان می‌گردد که یک ساعت بعد از بیهوشی کاهش سطح SOD را در بافت‌های کبد، کلیه و مغز را به همراه دارد (٦٢). بیهوشی ماهی شانک سر طلایی (*Sparus aurata*) با استفاده از اسانس میخک سبب افزایش بیان ژن SOD در زمان ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی در بافت آبشش شد در حالی‌که بیهوشی با MS222 کاهش معنی‌دار بیان ژن این آنزیم را در آبشش به همراه داشت، در بافت مغز

نیز اسانس گل میخک در زمان ٦ ساعت بعد از بیهوشی افزایش معنی‌دار SOD را نسبت به گروه شاهد رقم زد (٦٣). در مطالعات دیگر نیز نتایج نشان داد افزایش غلظت اوژنول برای بیهوشی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از ۱۰ به ۲۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری سطح آنزیم SOD را در خون ماهیان به همراه دارد (٦٤). دلیل اختلاف میان نتایج مطالعات اخیر با بررسی حاضر را می‌توان علاوه‌بر تفاوت در گونه ماهیان و داروهای به‌کار گرفته شده و هم‌چنین کیفیت داروهای مصرفی و شرایط آب و تفاوت‌های کاربران در تشخیص مراحل بیهوشی و خطا در نمونه‌برداری به وضعیت متفاوت ماهیان از نظر سلامت و تغذیه که در آمادگی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در سطوح مختلف مؤثر است مرتبط دانست.

استفاده از غلظت ۵۰ قسمت در میلیون اسانس میخک در این مطالعه برای القا بیهوشی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش غلظت آنزیم کاتالاز در خون، موکوس، کبد و مغز ماهیان در زمان ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی شد، اما تغییر معنی‌داری بر سطح این آنزیم در بافت آبشش نداشت. القا بیهوشی با استفاده از اسانس میخک در سس ماهی (*Barbus barbus*) نیز سبب افزایش سطح آنزیم کاتالاز در ماهیچه در ماهیان بیهوش شده در زمان ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی شد، اما در مورد کبد، مغز و آبشش ماهیان تغییرات رخ داده معنی‌دار نبود (۵۷). بیهوشی ماهی شانک سر طلایی (*Sparus aurata*) با استفاده از اسانس میخک سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن کاتالاز در زمان ٦ ساعت بعد از بیهوشی در بافت مغز شد اما کاهش رخ داده در بیان این ژن در بافت آبشش معنی‌دار نبود (٦٣). بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز در موکوس، خون، مغز، کبد و آبشش ماهیان بیهوش شده با ۲-فنوکسی اتانول نشان داده که سطح این آنزیم بلافاصله بعد از بیهوشی در بافت‌های مغز و کبد به شکل معنی‌داری افزایش‌یافته ولی ٢٤ ساعت پس از بیهوشی کاهش و به شرایط طبیعی نزدیک‌تر شده است (٤). که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کنند در مقابل در مطالعات دیگری عمس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه انتشار یافته است از جمله: افزایش غلظت داروی بیهوشی اوژنول سبب کاهش معنی‌دار غلظت آنزیم کاتالاز در خون ماهیان کپور معمولی شد (٦٤). بیهوشی ماهی باس دریایی چینی (*Lateolabrax maculatus*) با استفاده از اوژنول سطح آنزیم کاتالاز را در آبشش ماهیان در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت بعد از بیهوشی نسبت به گروه شاهد کاهش داد (٥٦). در بررسی دیگر نیز استفاده از اسانس میخک برای بیهوشی دو گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان و قزل‌آلای خال قرمز (*Salmo trutta fario*) سبب کاهش سطح آنزیم کاتالاز در خون ماهیان در مقایسه با گروه شاهد شد (٦٥). استفاده از اوژنول برای القا بیهوشی در ماهی تیلاپیا به شکل معنی‌داری میزان آنزیم کاتالاز را در ماهیان کاهش داد (۵۸). تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش سطح آنزیم کاتالاز در مواجهه با ۲-فنوکسی اتانولنیز مورد تأکید قرار گرفته است (٦٦). فرآیندهای بیولوژیکی مختلفی منجر به تولید پراکسید هیدروژن می‌شوند (٦٧). برای مثال، پراکسید هیدروژن می‌تواند در داخل بدن توسط بسیاری از آنزیم‌های اکسیدکننده مانند سوپراکسید دیسموتاز تشکیل شود. این ترکیب می‌تواند از میان غشاها عبور کند و به آرامی تعدادی از ترکیبات زیستی را اکسید کند. ثابت شده است که H_2O_2 سمی است و باعث مرگ سلولی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (٦٨)؛ هم‌چنین این ترکیب می‌تواند به بسیاری از سیستم‌های تولید انرژی سلولی حمله کند. آنزیم کاتالاز وظیفه حذف هیدروژن پروکسیدهای تولید شده در بدن از طرق مختلف از جمله توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را بر عهده دارد. بر همین اساس مطالعه در خصوص تغییرات این آنزیم در مواجهه با

داروهای بیهوشی دارای اهمیت است. ثابت شده که اسانس میخک می‌تواند نقش مؤثری در مهار پراکسید هیدروژن داشته باشد. احتمالاً به همین دلیل در لحظات اولیه القا بیهوشی در ماهیان افزایش قابل‌توجهی در غلظت کاتالاز در بافت‌های مختلف (به‌جز کبد) دیده نمی‌شود، اما با گذشت زمان و کاهش ظرفیت مهارکنندگی اسانس میخک شاهد افزایش غلظت این آنزیم در برخی بافت‌های ماهی هستیم تا در مهار پراکسیدهای هیدروژن تولید در ماهیان به سایر خطوط دفاعی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی کمک کنند.

گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) یک آنزیم سیتوزولی است که کاهش پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن و هم‌چنین کاهش رادیکال‌های پراکسید به الکل و اکسیژن را کاتالیز می‌کند. در بررسی حاضر استفاده از ۵۰ قسمت در میلیون اسانس میخک جهت بیهوشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغییر معنی‌داری بر سطح فعالیت آنزیم GPx در بافت‌های مختلف ماهیان نداشت. در نتایج به دست آمده با استفاده از اسانس *Ocimum gratissimum* تغییر معنی‌داری در غلظت آنزیم GPx در بافت‌های مغز و کبد ماهیان (*Lophiosilurus alexandri*) بیهوش شده مشاهده نشد (٦١). بررسی سطح بیان ژن GPx در بافت آبشش، کبد (٢٤ ساعت بعد از بیهوشی) و مغز (٢٤ ساعت بعد از بیهوشی) ماهیان بیهوش شده با اسانس میخک تغییرات معنی‌داری را نشان نداد اما در بافت‌های مغز و کبد ٦ ساعت بعد از بیهوشی افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد (٦٣). در مطالعه دیگر نیز استفاده از غلظت‌های مختلف اوژنول برای بیهوشی ماهیان تغییر معنی‌دار در سطح آنزیم GPx ایجاد نکرد (٦٤). القا بیهوشی در ماهیان با استفاده از ٢-فنوکسی اتانول تغییر معنی‌داری در سطح آنزیم GPx در بافت‌های کبد، مغز و آبشش ماهیان گزارش نشد تنها در بافت‌های خون و موکوس ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی سطح آنزیم مذکور به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد به ترتیب کاهش و افزایش نشان داد (٤). بیهوشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با اسانس گل میخک کاهش معنی‌داری سطح آنزیم GPx را در بافت‌های آبشش، مغز و روده ماهیان (٢٤ ساعت بعد از بیهوشی) به همراه داشت اما تغییرات معنی‌داری در بافت‌های کبد، ماهیچه و روده (زمان ١٠ دقیقه بعد از بیهوشی) ایجاد نکرد (٢٥). در عمده مطالعات بالا نتایج به‌دست آمده در این بررسی را تأیید می‌کند.

در مطالعه حاضر سنجش سه نشانگر مهم در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان برای بررسی اثرات بیهوشی با حداقل غلظت بیهوش‌کننده اسانس گل میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در القا استرس اکسیداتیو در ماهیان نشان داد، در خصوص دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، اسانس میخک تغییرات معنی‌داری در میزان آن‌ها در بافت‌ها مختلف ماهی ایجاد نشد و تنها در برخی بافت‌ها تغییرات محدودی در غلظت آنزیم کاتالاز در اثر بیهوشی ایجاد شد، بر این اساس می‌توان غلظت ۵۰ قسمت در میلیون اسانس میخک را به‌عنوان یک داروی بیهوشی مناسب از نظر عدم القای استرس اکسیداتیو در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان معرفی کرد. هم‌چنین با توجه به این‌که تغییرات ایجاد شده در مورد این سه شاخص در موکوس و خون عمدتاً با تغییرات در سایر بافت‌های ماهی (مغز، کبد و آبشش) هم‌راستا بود، می‌توان نمونه‌برداری کم تهاجمی در ماهیان برای سنجش میزان استرس اکسیداتیو را در مطالعات مربوط به بیهوشی ماهیان از طریق نمونه‌گیری از بافت‌های خون و موکوس که آسیب و مرگ ماهی را به همراه نخواهد داشت توصیه کرد.

منابع

1. Aydın, B., & Barbas, L. A. L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture*, 520, 734999.
2. Maricchiolo, G., & Genovese, L. (2011). Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. *The Open Marine Biology Journal*, 5 (1), 24-33.
3. Javahery, S., Nekoubin, H., & Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish. *Fish physiology and biochemistry*, 38, 1545-1552.
4. Khosravanizadeh, A., Rahdari, A., Pakzad Toochaei, S. (2023). Effect of 2-phenoxyethanol on antioxidant enzymes capacity in the various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 32 (2), 47-62.
5. Tubío, R. C., Weber, R. A., & Aldegunde, M. (2010). Home tank anesthesia: a very efficient method of attenuating handling stress in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). *Journal of applied ichthyology*, 26 (1), 116-117.
6. Cotter, P. A., & Rodnick, K. J. (2006). Differential effects of anesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145 (2), 158-165.
7. Kazuń, K., & Siwicki, A. K. (2001). Propiscin–a safe new anaesthetic for fish. *Fisheries & Aquatic Life*, 9 (2), 183-190.
8. Munday, P. L., & Wilson, S. K. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of Pomacentrus amboinensis, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*, 51 (5), 931-938.
9. Carrasco, S., Sumano, H., & Navarro-Fierro, R. (1984). The use of lidocaine-sodium bicarbonate as anaesthetic in fish. *Aquaculture*, 41 (4), 395-398.
10. Mylonas, C. C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., & Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246 (1-4), 467-481.
11. Azad, I. S., Al-Yaqout, A., & Al-Roumi, M. (2014). Antibacterial and immunity enhancement properties of anaesthetic doses of thyme (*Thymus vulgaris*) oil and three other anaesthetics in Sparidentax hasta and Acanthopagrus latus. *Journal of King Saud University-Science*, 26 (2), 101-106.
12. Roohi, Z., & Imanpoor, M. R. (2015). The efficacy of the oils of spearmint and methyl salicylate as new anesthetics and their effect on glucose levels in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. *Aquaculture*, 437, 327-332.
13. Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., & Hoseini, S. M. (2016). Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio*- Comparison with eugenol. *Aquaculture*, 464, 165-170.
14. Cunha, J. A. D., Scheeren, C. Á., Salbego, J., Gressler, L. T., Madaloz, L. M., Bandeira-Junior, G., Bianchini, A. E., Pinheiro, C. G., Bordignon, S. A., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2017). Essential oils of Cunila galioides and Origanum majorana as anesthetics for Rhamdia quelen: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Neotropical Ichthyology*, 15, e160076.
15. Teixeira, R. R., de Souza, R. C., Sena, A. C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Couto, R. D., & Copatti, C. E. (2017). Essential oil of Aloysia triphylla in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquaculture Research*, 48 (7), 3383-3392.

16. Khosravanizadeh, A., Ghafari, M., Khajeh, M., Abtahi, B., Salehi, H., Zakipour Rahimabadi, E., & Ahmadipour Nezamabadi, K. (2012). Using clove oil (*Eugenia caryophillata*) loaded on the iron nanoparticles to induce anesthesia in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal,* 20 (4), 43-52.
17. Rahdari, A., Khosravanizadeh, A., Dahmardeh, H., Gharaei, A., & Mirdar Harijani, J. (2017). Anesthetic effects and biochemical changes of peppermint essence (*Mentha spicata*) in snow trout (*Schizothorax zarudnyi*). *Aquatic Animals Nutrition*, 3 (2), 35-46.
18. Rakhshani, M., Mirdar Harijani, J., & Gharaei, A. (2018). Investigating the anesthetic vigor and histopathological effects of Peppermint (*Mentha piperita*) essential oils in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Scientific Fisheries Journal,* 27 (1), 1-10.
19. Golshan, N., Harijani, J. M., Gharaei, A., & Jamshidian, A. (2018). The effect of anesthetic Lavender (*Lavendula officinalis*) essential oil on histopathological and blood biochemical enzymes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Veterinary Research*, 73 (1), 9-15.
20. Khosravanizadeh, A., Rahdari, A., & Gharaei, A. (2020). Anesthetic effects of *Cuminum cyminum* essential oil and 2-phenoxyethanol on zebrafish (*Danio rario*). *Journal of Ornamental Aquatics*, 7 (1), 17-25.
21. Sharifrohani, M., Haghighi, M., Asaeian, H., & Lashto Aghaei, Gh. (2008). A study of the anesthetic effect of *Zataria multiflora Boiss* (Labiatae) essence on *Oncorhynchus mykiss* and cultured *Salmo trutta caspius*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 16 (4), 99-106.
22. Sedigh Bazkiagourab, M., Sattari, M., & Imanpour Namin, J. (2021). Anesthetic effects of valerian extract (*Valeriana officinalis*), lemongrass extract (*Cymbopogon citratus*) and clove powder (*Eugenia caryophyllata*) on Sterlet sturgeon, (*Acipenser ruthenus*). *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 9 (2), 59-86.
23. Eteghad, S., Ghavami, S., Mortazavi, J., & Mirzaei, H. (2008). Comparative survey on anesthetizing effects of medicinal herbs valerian officinalis, melissa officinalis, papaver somniferum, and papaver bracteatum on gold fish (*Carassius auratus*). *Iranian Scientific Fisheries Journal,* 17 (1), 91-98.
24. Nambiar, S. P., Banuru, S. C., Vahab, R. A., Ittoop, G., Nair, S. N., & Pillai, D. (2023). Augmentation of the anesthetic potency of clove oil for immersion anesthesia in fishes. *Aquaculture International*, 1-9.
25. Velisek, J., Stara, A., Li, Z. H., Silovska, S., & Turek, J. (2011). Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture*, 310 (3-4), 369-375.
26. Stringhetta, G. R., Barbas, L. A., Maltez, L. C., Sampaio, L. A., Monserrat, J. M., & Garcia, L. O. (2017). Oxidative stress responses of juvenile tambaqui Colossoma macropomum after short-term anesthesia with benzocaine and MS-222. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 2209-2218.
27. Azambuja, C. R., Mattiazzi, J., Riffel, A. P. K., Finamor, I. A., de Oliveira Garcia, L., Heldwein, C. G., ... & Llesuy, S. F. (2011). Effect of the essential oil of Lippia alba on oxidative stress parameters in silver catfish (Rhamdia quelen) subjected to transport. *Aquaculture*, 319 (1-2), 156-161.
28. Belló, A. R. R., Fortes, E., Belló-Klein, A., Belló, A. A., Llesuy, S. F., Robaldo, R. B., & Bianchini, A. (2000). Lipid peroxidation induced by Clinostomum detruncatum in muscle of the freshwater fish Rhamdia quelen. *Diseases of aquatic organisms*, 42 (3), 233-236.
29. Tew, K. D., & Ronai, Z. E. (1999). GST function in drug and stress response. *Drug Resistance Updates*, 2 (3), 143-147.

30. Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Amado, L. L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., & Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146 (1-2), 221-234.
31. Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian journal of medical and biological research*, 29, 1715-1733.
32. Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, V., & Storey, K. B. (2005). Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37 (8), 1670-1680.
33. Adel, M., Sadegh, A. B., Yeganeh, S., Movafagh, A. N., & Saoud, I. P. (2016). Anesthetic efficacy of clove oil, propofol, 2-phenoxyethanol, and ketamine hydrochloride on Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47 (6), 812-819.
34. Velíšek, J., Svobodova, Z., & Piačková, V. (2005). Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, 74 (1), 139-146.
35. Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., & Soto, C. G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29 (2), 89-101.
36. Gharaei, A., Khajeh, M., Khosravanizadeh, A., Mirdar, J., & Fadai, R. (2020). Fluctuation of biochemical, immunological, and antioxidant biomarkers in the blood of beluga (*Huso huso*) under effect of dietary ZnO and chitosan–ZnO NPs. *Fish physiology and biochemistry*, 46 (2), 547-561.
37. Ross, N. W., Firth, K. J., Wang, A., Burk,a J. F., & Jojnson, S. C. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. *Disease of Aquatic Organisems*, 41, 43-51.
38. Zelen, I., Mitrovic, M., Jurisic-Skevini, A., & Arsenijevic, S. (2010). Activity of SOD and Catalase and MDA content in seminal plasma of infertile patients. Med. Preg, LXIII (9-10), 624-629.
39. Barbaneagra, T., Cristica, M., Ciornea, E., & Manoliu, A. (2012). Influence of nutritive substrate and pH on catalase and peroxidase production in saprophytic fungus Rhizopus nigricans. *Journal of Experimental and Molecular Biology*, 13 (3), 71.
40. Andersen, H. R., Nielsen, J. B., Nielsen, F., & Grandjean, P. (1997). Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical chemistry*, 43 (4), 562-568.
41. Marking, L. L., & Meyer, F. P. (1985). Are better fish anaesthects needed in fisheries? Fisheries, 10, 2-5.
42. Anderson, W. G., McKinley, R. S., & Colavecchia, M. (1997). The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, 17 (2), 301-307.
43. Soltani, M., Omidbeigi, R., Rezvani, S., Mehrabi, M. R., & Chitsaz, H. (2001) study of anesthetic effects induced by clove flower (*Eugenia caryophillata*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under various water quality conditions, *Journal of Veterinary Research*, 56 (4), 85-89.
44. Woolsey, J., Holcomb, M., & Ingermann, R. L. (2004). Effect of temperature on clove oil anesthesia in steelhead fry. *North American Journal of Aquaculture*, 66 (1), 35-41.
45. Hikasa, Y., Takase, K., Ogasawara, T., & Ogasawara, S. (1986). Anaesthesia and recovery with tricane methanesul

phonate, eugenol and thiopental sodium in the carp (*Cyprinus carpio*). *Japanese Journal of Veterinary Science*, 48, 341-351.

46. Sonawane, U. D., & Kulkarni, G. N. (2001). Anaesthetic effects of clove oil and sodium bicarbonate on the fry of *Liza parsia*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 3 (2), 49-62.
47. Gressler, L. T., Riffel, A. P. K., Parodi, T. V., Saccol, E. M. H., Koakoski, G., da Costa, S. T., Pavanato, M.A., Heinzmann, B.M., Caron, B., Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2014). Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture research*, 45 (6), 1061-1072.
48. Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M. G., Petochi, T., Marino, G., Lemarie, G., Alexis, M., Alberti, A., & Macciantelli, D. (2008). Plasma total oxidant/ antioxidant status in Dicentrarchus labrax after exposure to experimental hypoxia, hyperoxia and hypercapnia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151 (1), S15.
49. Buzadzić, B., Spasić, M. B., Saicić, Z. S., Radojicić, R., & Petrović, V. M. (1992). Seasonal dependence of the activity of antioxidant defence enzymes in the ground squirrel (*Citellus citellus*): the effect of cold. *Comparative Biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry*, 101 (4), 547-551.
50. Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food chemistry*, 100 (2), 451-458.
51. Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., Agarwal, A., Jensen, G. S., Hart, A. N., & Shanbrom, E. (2006). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, Euterpe oleraceae mart. (acai). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (22), 8604-8610.
52. Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57 (5), 715-725.
53. Gülçin, İ., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil–A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of chemistry*, 5 (4), 489-499.
54. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63 (7), 1035-1042.
55. Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49 (3), 481-493.
56. Wang, W., Dong, H., Sun, Y., Sun, C., Duan, Y., Gu, Q., Li, Y., Xie, M., & Zhang, J. (2020). Immune and physiological responses of juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) to eugenol and tricaine methanesulfonate (MS-222) in gills. *Aquaculture Reports*, 18, 100554.
57. Priborsky, J., Stara, A., Rezabek, J., Zuskova, E., Lepic, P., & Velisek, J. (2015). Comparison of the effect of four anaesthetics on haematological profiles, oxidative stress and antioxidant enzymes in barbel (*Barbus barbus*). *Neuroendocrinology Letters*, 36 (1).
58. Zahran, E., Risha, E., & Rizk, A. (2021). Comparison propofol and eugenol anesthetics efficacy and effects on general health in Nile Tilapia. *Aquaculture*, 534, 736251.
59. Yen, G. C., & Duh, P. D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42 (3), 629-632.
60. Saccol, E. M., Toni, C., Pês, T. S., Ourique, G. M., Gressler, L. T., Silva, L. V., Mourão, R. H., Oliveira, R. B., Baldisserotto, B., & Pavanato, M. A.

(2016). Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture Research*, 48 (5), 2012-2031.

61. Boaventura, T. P., Souza, C. F., Ferreira, A. L., Favero, G. C., Baldissera, M. D., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., & Luz, R. K. (2020). Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753) as anesthetic for Lophiosilurus alexandri: induction, recovery, hematology, biochemistry and oxidative stress. *Aquaculture*, 529, 735676.
62. Ferreira, A. L., Favero, G. C., Boaventura, T. P., de Freitas Souza, C., Ferreira, N. S., Descovi, S. N., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., & Luz, R. K. (2021). Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753): efficacy for anesthesia and transport of Oreochromis niloticus. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47 (1), 135-152.
63. Teles, M., Oliveira, M., Jerez-Cepa, I., Franco-Martínez, L., Tvarijonaviciute, A., Tort, L., & Mancera, J. M. (2019). Transport and recovery of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) sedated with clove oil and MS222: Effects on oxidative stress status. *Frontiers in physiology*, 10, 523.
64. Yousefi, M., Hoseini, S. M., Vatnikov, Y. A., Nikishov, A. A., & Kulikov, E. V. (2018). Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. *Aquaculture*, 495, 376-383.
65. Uçar, A., Atamanalp, M., Cankaya, M., & Özdemir, H. (2013). Effects of anesthetic substances on some antioxidan enzyme activities of Trouts. *Journal of Fisheries Sciences.* 7 (2), 152.
66. Akgündüz, M. Ç., Çavuşoğlu, K., & Yalçın, E. (2020). The potential risk assessment of phenoxyethanol with a versatile model system. *Scientific reports*, 10 (1), 1209.
67. MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (13), 2046-2056.
68. Aoshima, H., Tsunoue, H., Koda, H., & Kiso, Y. (2004). Aging of whiskey increases 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (16), 5240-5244.