مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال پنجم، شماره سوم، پیاپی نوزدهم، زمستان ۱۳۹۵ (۹۶-۷۹)

مقایسه کارایی روغن گل میخک و کتامین و تغییرات فیزیولوژیک در بیهوشی بچه ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

خیام دل افکار[۱]، مسعود ستاری[۲]، حسین خارا[۳]، بهرام فلاحتکار[۴*]
۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، گیلان، صندوق پستی: ۱۱۴۴
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، گیلان، صندوق پستی: ۱۱۴۴
۳. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، گیلان، صندوق پستی: ۱۶۱۶
۴. دانشیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، گیلان، صندوق پستی: ۱۱۴۴
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰)

چکیده
مطالعه حاضر به‌منظور بررسی کارایی دو ماده بیهوشی روغن گل میخک و کتامین، مقایسه پارامترهای هماتولوژی و شاخص‌های بیوشیمیایی خون تحت غلظت بهینه مواد بیهوشی در بچه ماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* با تعداد ۲۷۶ و میانگین وزنی ۳/۴± ۶۴/۱ گرم انجام شد. شش غلظت mg/l ۱۴، ۳۵، ۵۶، ۷۷، ۹۸ و ۱۱۹ روغن گل میخک و غلظت‌های mg/l ۳۵، ۳۷/۵، ۴۰، ۴۲/۵، ۴۵ و ۵۰ کتامین در سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. در هر دو ماده زمان تأثیر (جزیی و کلی) با افزایش غلظت کاهش پیدا کرد، درصورتی که با افزایش غلظت، زمان به هوش آمدن نیز زیاد شد. غلظت mg/l ۵۶ روغن گل میخک و غلظت mg/l ۴۵ کتامین، با توجه به زمان‌های بیهوشی و بازگشت به‌عنوان غلظت بهینه استفاده شد. کاهش معنی‌داری در پارامترهای هماتولوژیک در تیمارهای بیهوشی با روغن گل میخک وکتامین و تیمار استرس دستکاری بدون ماده بیهوشی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. بچه ماهیان بیهوش شده با روغن گل میخک تغییر معنی‌داری را در غلظت کورتیزول، گلوکز و لاکتات پلاسما نشان ندادند؛ درحالی که ماهیان قرارگرفته در معرض استرس دستکاری در هر سه شاخص بیوشیمیایی تغییر معناداری را نشان دادند، از طرفی بیهوشی با کتامین تغییر معنی‌داری را در غلظت لاکتات و کورتیزول پلاسما به دنبال داشت و غلظت گلوگز بدون تغییر ماند. در مجموع با توجه به کارایی بهتر روغن گل میخک در بیهوشی کامل و برگشت به حالت اولیه نسبت به کتامین و عدم مشاهده تغییر در غلظت شاخص‌های بیوشیمیایی، به‌منظور استفاده در آبزی پروری این گونه توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیهوشی، ماهی استرلیاد، اسانس گل میخک، کتامین، استرس دستکاری.

Comparison of efficacy of clove oil and ketamine on anesthesia and physiological changes in juvenile Sterlet (*Acipenser ruthenus*)

Khayam Delafkar[1], Masoud Sattari[2], Hossein Khara[3], Bahram Falahatkar[4*]
1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, P.O. Box: 1144 Sowmeh Sara, Iran
2. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, P.O. Box: 1144 Sowmeh Sara, Iran
3. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Islamic Azad University of Lahijan, P.O. Box: 1616 Lahijan, Iran
4. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, P.O. Box: 1144 Sowmeh Sara, Iran
(Received: Jun. 27, 2016 - Accepted: Feb. 18, 2017)

Abstract
The present study was carried out to investigate the efficacy of two anesthetics, clove oil and ketamine, comparison of hematological parameters, and blood biochemical indices under optimum doses of the two anesthetics in juvenile Sterlet *Acipenser ruthenus* (n=276) with an average weight of 64.1 ± 3.4 g. Clove oil was used in concentrations of 14, 35, 56, 77, 98 and 119 mg/l, and those of 35, 37.5, 40, 42.5, 45 and 50 mg/l for ketamine in three replicates. Both losing time of equilibrium and induced time of anesthesia were reduced by increasing the concentrations of these two agents, whereas time of recovery increased. Optimum doses regarding the time of anesthesia and recovery were obtained as 56 mg/l and 45 mg/l for clove oil and ketamine, respectively. There were significant decreases in hematological parameters for all treatments compared to control group ($P<0.05$). No significant changes were observed in cortisol, glucose, and lactate concentrations for fish treated with clove oil ($P>0.05$), whereas, fish exposed to handling stress showed significant changes in all biochemical indices ($P<0.05$). On the other hand, glucose concentration did not change significantly in ketamine treatment ($P>0.05$), but cortisol and lactate changed significantly ($P<0.05$). Considering appropriate efficacy of clove oil in both induction and recovery times, and rendering no changes in biochemical indices, clove oil would be recommended as an alternative to ketamine for this species during aquaculture practices.

Keywords: Anesthesia, Sterlet, Clove oil, Ketamine, Handling stress

* نویسنده مسئول: بهرام فلاحتکار E-mail: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

شرایط اسارت و روند دستکاری روی ماهی اغلب سبب افزایش پاسخ های استرسی فیزیولوژیک می‌شود (Ross & Ross, 2008) از اثرات منفی استرس می‌توان به کاهش ایمنی بدن، استعداد ابتلا به بیماری و کاهش کیفیت تخمک و اسپرم اشاره کرد (Wagner *et al.*, 2002). از این‌رو، جهت کاهش استرس و آسیب‌های فیزیولوژیک ناشی از تراکم، اسارت، دستکاری و رهاسازی، امروزه بیهوشی به‌عنوان ابزاری ارزشمند در آبزی‌پروری، صید ماهی و مدیریت شیلاتی به‌کار می‌رود (Palić *et al.*, 2006). مواد بیهوشی حساسیت به استرس را از طریق ایجاد نقصان در عملکرد عصبی کاهش می‌دهند (Iwama *et al.*, 1989). اگرچه بیهوشی می‌تواند اختلالات ایجادشده در اثر استرس دستکاری را در ماهی کاهش دهد، خود مواد بیهوشی می‌توانند اثراتی را القا کنند که سبب بی نظمی در پارامترهای بیوشیمیایی شود (Velisek *et al.*, 2011). بنابراین استفاده از موادی که حداقل مضرات را داشته باشد ضروری است. فاکتورهای مختلفی برای ارزیابی یک ماده بیهوشی مطلوب در آبزی پروری و تحقیقات مربوطه بیان شده است که از آن جمله می‌توان به شل شدن مناسب عضلانی، عدم تحریک کنندگی، کاربرد و دسترسی آسان، حاشیه ایمنی وسیع و قیمت مناسب اشاره کرد (Pirhonen *et al.*, 2003).

روغن گل میخک مایع قهوه‌ای تیره‌رنگی است که از ریشه، ساقه و برگ‌های گیاه میخک (*Eugenia caryophyllata*) به‌دست می‌آید. سال‌های زیادی است که این ماده به‌عنوان بی‌حس‌کننده در دندان پزشکی استفاده می‌شود (Soto *et al.*, 1995). اوژنول [2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol] ماده فعال (۹۰–۷۰ درصد وزن) گل میخک است (Veliesk *et al.*, 2005a; Weber *et al.*, 2009). مهمترین مزایای این ماده ارزان بودن، دسترسی آسان و همچنین زیان‌بار نبودن برای انسان و ماهی است (Keene *et al.*, 1998)؛ از معایب آن هم می‌توان به حساس بودن به نور اشاره کرد (Cho & Heath, 2000). کتامین پودر کریستالی سفید رنگی است که دارای قابلیت حلالیت ۲۰۰ g/l در دمای ۲۰°C است و از آن به‌صورت گسترده‌ای در بیهوشی انسان و مصارف دامپزشکی استفاده می‌شود، برای حمل‌ونقل‌ها بی‌خطر و دارای اثرات فوق‌العاده و خواص ویژه‌ای است (Ackerman *et al.*, 2002). خصوصیات کتامین به‌عنوان یک ماده بیهوشی، استفاده وسیع آن در دامپزشکی، آسانی کار با دارو، قیمت ارزان‌تر و در دسترس‌تر بودن نسبت به MS_{222}، لزوم مطالعه و بررسی امکان استفاده از آن را در بیهوشی ماهیان طلب می‌کند (Papahn *et al.*, 2005).

ماهیان خاویاری به علت کیفیت بالای گوشت و ارزش خاویار جزء گران‌ترین و با ارزش‌ترین ماهیان محسوب می‌شوند، اما به دلایل مختلفی از جمله صید بیش از حد، مدیریت ضعیف صید، عدم حفاظت، آلودگی‌های شدید زیست‌محیطی و ساخت سد روی رودخانه‌ها، محیط زیست و محل تولیدمثل آنها با محدودیت روبه‌رو شده است و جمعیت آنها در سراسر جهان رو به کاهش است (Hurvitz *et al.*, 2007). با توجه به اهمیت و ارزش ذکر شده این ماهیان، باید در طی بررسی‌های مختلفی که بر روی آنها انجام می‌شود نهایت دقت را داشت و برای حفظ آنان و کاهش آسیب‌های ناشی از انواع عملیات، استفاده از داروهای بیهوشی اهمیت و ضرورت پیدا می‌کند. با این وجود، نوع ماده بیهوشی، غلظت و زمان در معرض‌گذاری می‌تواند بر روی پارامترهای خونی به خصوص شاخص‌های استرس و فیزیولوژی ماهی اثرگذار باشد (Velisek *et al.*, 2011)، به‌طوری‌که، قرار گرفتن در معرض طولانی مدت و یا غلظت نامناسب ماده بیهوشی نیز ممکن است سبب افزایش استرس شود. بنابراین به‌دست آوردن غلظت مناسب مواد بیهوش‌کننده برای به حداقل رساندن استرس بسیار ضروری است (Feng *et al.*, 2011). برای یافتن بهترین نوع ماده بیهوشی برروی گونه‌های

مختلف ماهیان خاویاری مطالعات مختلفی صورت گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به بررسی‌های صورت گرفته توسط Abtahi *et al.* (2002) و Imanpour *et al.* (2010) اشاره کرد که اثرات بیهوشی اسانس گل میخک بر بچه تاسماهی ایرانی *Acipenser percicus* را مورد مطالعه قرار دادند. Feng *et al.* (2011) اثرات بیهوش‌کنندگی روغن گل میخک و MS_{222} را بر روی پارامترهای بیوشیمیایی خون تاسماهی سیبری *Acipenser baerii* مورد بررسی قرار دادند. Hoseini & Ghelichpour (2012) اثرات بیهوش کنندگی روغن گل میخک و Shaluei *et al.* (2012) اثرات بیهوشی 2-phenoxyethanol را بر روی فیل ماهی *Huso huso* بررسی کردند.

اگرچه مطالعات مختلفی بر روی بیهوشی تاسماهیان انجام شده است، تاکنون مطالعات اندکی در مورد اثر بیهوش‌کنندگی کتامین در این ماهیان صورت گرفته است (Fleming *et al.*, 2003). از طرفی ماهی استرلیاد یکی از گونه‌های با ارزش تاسماهیان می‌باشد که شرایط زیستی و رسیدگی جنسی کوتاه‌تر نسبت به سایر تاسماهیان، این ماهی را به‌عنوان یک الگوی مناسب جهت مطالعات بیولوژیک، تغذیه‌ای و دستکاری‌های کروموزومی در بین سایر ماهیان خاویاری معرفی کرده است (Williot *et al.*, 2005b). بنابراین با توجه به کاربرد بالای این ماهی در مطالعات مختلف، بررسی حاضر به‌منظور تعیین غلظت بهینه روغن گل میخگ و کتامین در بچه ماهی استرلیاد و همچنین بررسی اثر غلظت بهینه این مواد برروی پارامتراهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی انجام پذیرفت تا نتایج حاصل از این مطالعه در آبزی‌پروری و سایر عملیات دستکاری مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط نگهداری

تعداد ۲۷۶ عدد بچه ماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* با میانگین (± انحراف معیار) وزنی ۰/۷±۵۴ گرم و طول کل ۰/۳±۲۵/۳ سانتی‌متر در مجتمع تکثیر و پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی (رشت، گیلان) مورد استفاده قرار گرفت. بچه ماهیان به‌مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش به‌منظور سازگاری در محل جدید نگهداری شدند. برای نگهداری ماهی‌ها قبل و بعد از انجام آزمایش‌های بیهوشی، از ۱۰ تانک فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری به ابعاد ۰/۵×۲×۲ متر (آبگیری ۱۰۵۰ لیتر) که به‌خوبی هوادهی می‌شدند، استفاده شد. به‌منظور تأمین آب ورودی سیستم، تانک‌ها با سیستم جریان مداوم آب سفیدرود و آب چاه به‌صورت توأم (جهت حفظ ثبات دمایی در آب تانک‌ها) با دبی ۰/۲۱±۱۴/۴۲ L/min آبرسانی شدند. دمای آب تانک‌ها و pH در طول دوره سازگاری و انجام آزمایش به ترتیب ۱۵°C و ۰/۱ ± ۷/۷ (Feng *et al.*, 2011) و میزان اکسیژن محلول ۰/۲±۷/۱ mg/L بود. غذادهی به‌صورت روزانه به اندازه ۲-۱ درصد وزن بدن با استفاده از جیره تجاری بیومار (Nersac، France، پروتئین خام ۵۳٪ و چربی خام۱۰٪). ۲۴ ساعت پیش از انجام آزمایش‌ها و نیز در مدت انجام آزمایش‌ها برای مشخص شدن بهتر اثرات ماده بیهوشی بر روند بیهوشی و بازگشت آن، ماهی‌ها تغذیه نمی‌شدند (Sharifpour *et al.*, 2002).

آزمایش اول

تعیین غلظت بهینه

برای تعیین غلظت بهینه تعداد ۱۸۰ عدد ماهی مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌ها با استفاده از ۲ ماده بیهوشی کتامین و روغن گل میخک که هریک شامل ۶ غلظت مختلف بودند، انجام گرفت. برای هر کدام از غلظت‌ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد و هر تکرار بر روی ۵ عدد بچه ماهی انجام گردید. روغن گل میخک (حاوی ۷۰ درصد اوژنول) از شرکت سبحان دارو شهر رشت تهیه شد و کتامین مورد استفاده در

این تحقیق محصول شرکت Rotexdemica (Trittau آلمان) بود. روغن گل میخک با نسبت ۱ به ۱۰ در اتانول ۹۶٪ حل شد و نهایتاً غلظت‌های ۱۴، ۳۵، ۵۶، ۷۷، ۹۸ و ۱۱۹میلی گرم بر لیتر از آن به دست آمد. کتامین در غلظت‌های ۳۵، ۳۷/۵، ۴۰، ۴۲/۵، ۴۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در آب مقطر حل شد. غلظت‌های پایین تر از غلظت‌های فوق فاقد اثر و یا اثرات اندک بیهوشی را به همراه داشت و غلظت‌های بالاتر عوارض جانبی و تلفات را به دنبال داشت.

کلیه آزمایش‌ها با روش غوطه‌ورسازی ماهی در محلول بیهوشی انجام شد. قبل از انجام هر یک از ترکیب‌های آزمایشی، ماهی‌ها به‌طور تصادفی از تانک‌های فایبرگلاس به‌وسیله تور دستی کوچکی گرفته شدند و به تعداد مورد نیاز به ظروف بیهوشی محتوی ۱۰ لیتر آب منتقل شدند. برای مشاهده دقیق اثرات ماده بیهوشی بر ماهی، هوادهی به ظرف بیهوشی قطع شد. پس از بیهوشی ماهی‌ها به مخازن محتوی ۲۰ لیتر آب که با استفاده از سنگ هوا هوادهی می‌شدند به‌منظور بازگشت از بیهوشی منتقل گشتند. پس از اتمام بیهوشی با هر یک از غلظت‌ها، ماهی‌ها از مخازن بازگشت به تانک‌های فایبرگلاس منتقل شدند و به‌مدت یک هفته برای مشاهده تلفات احتمالی تحت‌نظر قرار می‌گرفتند. هنگام القای بیهوشی زمان از دست دادن تعادل و زمان ایجاد بیهوشی برای هر یک از غلظت‌ها و همچنین زمان بازگشت تعادل، زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی پس از انتقال ماهی از ظرف حاوی محلول بیهوشی به مخزن بازگشت، با یک کورنومتر ثبت شد.

برای اندازه‌گیری زمان‌های بیهوشی و بازگشت، از طبقه‌بندی ۵ مرحله‌ای Stoskopf (1993) استفاده شد (جدول ۱). در بررسی حاضر مرحله ۳ بیهوشی، زمان از دست دادن تعادل ماهی و مرحله ۴ بیهوشی زمان ایجاد بیهوشی در نظر گرفته شد. مرحله ۳ بازگشت، به‌عنوان زمان بازگشت کامل تعادل در نظر گرفته شد و مرحله ۴ بازگشت، زمان بازگشت واکنش ماهی به محرک خارجی در نظر گرفته شد. غلظت بهینه بر اساس مشاهدات رفتار ماهی و زمان رفت و برگشت از بیهوشی تعیین گردید.

جدول ۱. مراحل بیهوشی و بازگشت در ماهی استرلیاد بر اساس معیار طبقه‌بندی Stoskopf (1993)

مراحل بیهوشی	شرح
I	شروع نامنظم حرکات آبششی
II	از دست دادن جزئی تعادل، ماهی سعی می‌کند خود را مستقیم نگه دارد.
III	از دست دادن کامل تعادل، ماهی کوششی جهت مستقیم نگه داشتن خود انجام نمی‌دهد.
Iv	القا: از دست دادن کامل حرکات اختیاری و فعالیتی
V	کلاپس مغزی: از کارافتادن حرکات حفره آبششی
مراحل بازگشت	**شرح**
I	ظهور دوباره حرکات آبششی
II	بازگشت جزئی تعادل، تلاش برای مستقیم نگه داشتن خود
III	بازگشت کامل تعادل، ماهی قادر به مستقیم نگه داشتن خود می‌شود.
Iv	پاسخ به محرک بیرونی، مثل ضربه به دیواره آکواریوم
V	بازگشت به حالت اولیه، فعالیت شنا کردن به حالت عادی

آزمایش دوم

اندازه‌گیری پارامترهای خونی

جهت تعیین اثر بیهوشی روغن گل میخک و کتامین بر روی پارامترهای خونی، تعداد ۲۴ عدد بچه ماهی استرلیاد از تانک‌های فایبرگلاس جمع‌آوری شدند و سپس به‌صورت تصادفی به ۴ گروه هر یک با ۳ تکرار تقسیم‌بندی شدند. گروه‌های آزمایشی شامل یک گروه قرار گرفته در معرض استرس دستکاری (بدون قرار گرفتن در معرض ماده بیهوشی) و یک گروه شاهد (بدون قرار گرفتن در معرض ماده بیهوشی و استرس دستکاری) و دو گروه بیهوش‌شده با غلظت بهینه از مواد بیهوش‌کننده روغن گل میخک و کتامین بودند. جهت انجام این مرحله از آزمایش، ابتدا ماهیان با غلظت‌های بهینه بدست آمده (روغن گل میخک ۵۶ mg/l، کتامین ۴۵ mg/l) بیهوش شدند. بلافاصله بعد از بیهوشی و القای استرس دستکاری، نمونه‌برداری خون از هر ۴ گروه صورت گرفت، به‌طوری‌که ۲ عدد از هر تکرار، مجموعاً ۶ عدد از هر تیمار مورد استفاده قرار گرفت. برای جلوگیری از ورود آب و موکوس به نمونه خون، ابتدا ماهی‌ها با حوله خشک شدند. خونگیری با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۲ میلی لیتری هپارینه از سیاهرگ دمی ماهیان انجام شد، سپس نمونه‌های خون بلافاصله به آزمایشگاه جهت انجام شمارش سلول‌های خونی منتقل شد. پارامترهای خونی شامل تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، هماتوکریت (Hct)، هموگلوبین (Hb)، میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH)، میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بود.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی

به‌منظور تعیین غلظت کورتیزول، گلوکز و لاکتات پلاسما در پاسخ به بیهوشی، نمونه‌برداری از ماهیان در ۴ نوبت و در زمان‌های بلافاصله بعد از بیهوشی، ۱، ۳ و ۶ ساعت پس از بیهوشی صورت پذیرفت. ۷۲ عدد بچه ماهی استرلیاد از تانک‌های فایبرگلاس گرفته شدند و به‌صورت تصادفی به ۳ گروه هر یک با ۳ تکرار تقسیم‌بندی شدند. گروه‌های آزمایشی شامل یک گروه قرار گرفته در معرض استرس دستکاری (بدون قرار گرفتن در معرض ماده بیهوشی) و دو گروه بیهوش شده با غلظت بهینه از مواد بیهوش‌کننده روغن گل میخک و کتامین بود. بلافاصله بعد از القای بیهوشی و استرس دستکاری، ۲ عدد ماهی از هر تکرار (۶ عدد از هر تیمار) به سرعت گرفته شد و خونگیری با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری هپارینه از سیاهرگ دمی ماهیان انجام شد. سپس ماهیان خونگیری شده به تانک‌های فایبرگلاس بازگردانده شدند. تمام ماهیان هر تکرار به مخازن محتوی ۲۰ لیتر آب که با استفاده از سنگ هوا هوادهی می شدند منتقل شدند. بعد از ۱، ۳ و ۶ ساعت، خونگیری از ماهیان انجام شد، به‌طوری‌که برای هر مرحله زمانی دو ماهی از هر تکرار خونگیری شدند. نمونه‌های خونی در نظر گرفته شده برای بررسی‌های بیوشیمیایی با سرعت g ۱۶۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پلاسما پس از جداسازی، در دمای ºC ۸۰- نگهداری شد.

آنالیز نمونه‌های خونی

جهت شمارش گلبول‌های سفید، خون منعقد نشده با محلول ریس رقیق شد و سپس به‌وسیله لام نئوبار در ۴ مربع حاشیه‌ای شمارش گردید و عدد به‌دست آمده در ۵۰ ضرب شد. تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌مترمکعب خون محاسبه گردید (Daisley & Blaxhall, 1973).

جهت شمارش گلبول قرمز، خون منعقد نشده با محلول ریس رقیق شد و سپس از مربع میانی (۵ خانه وسط) لام نئوبار برای شمارش گلبول قرمز استفاده و عدد به‌دست آمده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد. تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید (Daisley & Blaxhall, 1973). برای اندازه‌گیری میزان هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت

استفاده شد، به طوری که لوله‌های هماتوکریت درون دستگاه سانتریفوژ میکروهماتوکریت قرار داده شد و پس از سپری شدن ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰g مقدار هماتوکریت به‌وسیله صفحه مدرج مخصوص قرائت شد. اندازه‌گیری هموگلوبین با واحد گرم در دسی لیتر با روش اتوماسیون Lysing Sysmex با استفاده از دستگاه (Sysmex, Kobe, Japan) سنجیده شد (Dacie & Lewis, 1995). برای محاسبه شاخص‌های خونی از روابط زیر استفاده گردید (Dacie & Lewis, 1995):

$$MCV\ (fl) = \frac{\text{(مقدار هماتوکریت)}}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)}} \times ۱۰$$

$$MCH\ (pg/cell) = \frac{\text{(مقدار هموگلوبین)}}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)}} \times ۱۰$$

$$MCHC\ (g/dL) = \frac{\text{(مقدار هموگلوبین)}}{\text{(مقدار هماتوکریت)}} \times ۱۰۰$$

به‌منظور تعیین درصد هر یک از گلبول‌های سفید خون (لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و نوتروفیل) پس از تهیه گسترش نازک خونی بر روی لام و انجام مراحل رنگ‌آمیزی (Houston, 1990)، مشاهده سلول‌ها با عدسی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری (Model Boeco Binocular, Germany) و با استفاده از روغن امرسیون انجام گرفت. شمارش سلول‌های موردنظر با استفاده از دستگاه شمارنده صورت گرفت و درصد هر کدام به طور جداگانه محاسبه شد (Řehulka, 2000).

اندازه‌گیری هورمون کورتیزول با واحد نانوگرم در میلی‌لیتر با روش رادیوایمنواسی (Redding *et al.*, 1984) بر اساس واکنش رقابتی با استفاده از کیت تجاری (Immunotech, Marseille, France) انجام شد. اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از کیت تجاری (پارس‌آزمون، تهران، ایران) با روش آنزیمی رنگ‌سنجی با دستگاه اتوآنالایزر (Technicon RA-1000, USA) با طول موج ۵۰۰ nm انجام گرفت (Bayunova *et al.*, 2002). لاکتات پلاسما با روش رنگ‌سنجی و براساس یک واکنش آنزیمی اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری با استفاده از کیت تجاری (زیست‌شیمی، تهران، ایران) و با دستگاه اتوآنالایزر (Technicon RA-1000, USA) با طول موج ۵۲۰nm انجام شد (Barton *et al.*, 2005).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای بررسی آماری داده‌ها، ارزیابی نرمال بودن آن‌ها توسط آزمون One-Sample Kolmogorov-Smirnov و بررسی همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Levene انجام شد. سپس جهت تعیین اثر غلظت‌های مختلف بر روی زمان‌های القا و بازگشت و همچنین مقایسه پارامترهای هماتولوژیک از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) جهت تعیین تفاوت‌های پارامترهای بیوشیمیایی بین تیمارها و در طول زمان استفاده شد. اختلاف بین میانگین‌ها به‌وسیله آزمون چند دامنه‌ای Tukey بررسی گردید. در این بررسی، اختلاف در سطح معنی‌دار $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (version 16) انجام گرفت.

نتایج

از آنجایی‌که هیچ‌گونه عوارض جانبی و تلفات در مطالعه حاضر مشاهده نشد، تمام غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش برای القای بیهوشی در بچه ماهیان استرلیاد مؤثر و بی‌خطر بودند. میانگین‌های چهار متغیر زمان از دست دادن تعادل، زمان ایجاد بیهوشی، زمان بازگشت تعادل و زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی بچه ماهیان استرلیاد، تحت تأثیر روغن گل میخک و کتامین در جدول ۲ نشان داده

شده است. تفاوت معنی‌داری بین میانگین زمان ایجاد بیهوشی و زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کتامین و روغن گل میخک وجود داشت (P<۰/۰۵). کمترین زمان بروز بیهوشی با میانگین زمان (±انحراف معیار) ۳/۲±۶۴/۶ ثانیه با غلظت ۱۱۹ mg/l متعلق به تیمار روغن گل میخک بود، همچنین کوتاه‌ترین زمان واکنش به محرک خارجی با میانگین زمان ۱۸/۹±۱۵۱ ثانیه با غلظت ۵۶ mg/l مربوط به تیمار روغن گل میخک بود. از طرفی طولانی‌ترین زمان بیهوشی و بازگشت به ترتیب ۲/۵ ± ۵۵۷/۵ ثانیه و ۴ ± ۴۸۴ ثانیه متعلق به غلظت ۳۵ mg/l کتامین بود.

جدول ۲. میانگین (± انحراف معیار) زمان‌های رسیدن به مراحل مختلف بیهوشی و بازگشت از آن در بچه ماهیان استرلیاد تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کتامین و روغن گل میخک

نوع ماده بیهوشی	غلظت (میلی‌گرم/ لیتر)	زمان از دست رفتن تعادل (ثانیه)	زمان بروز بیهوشی (ثانیه)	زمان بازگشت تعادل (ثانیه)	زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی (ثانیه)
روغن گل میخک	۱۴	۱۹۹/۳ ± ۲۸/۶^{a}	۲۸۰ ± ۴۲/۴^{a}	۱۲۱/۳ ± ۰/۸^{b}	۲۲۷/۳ ± ۸/۹^{ab}
	۳۵	۱۳۳/۶ ± ۱۱/۶^{ab}	۱۷۶ ± ۱۳/۶^{b}	۱۵۹/۳ ± ۹/۱^{ab}	۲۱۰/۶ ± ۲۹/۸^{b}
	۵۶	۱۰۲ ± ۱۰/۰۶^{b}	۱۳۹/۶ ± ۱۴/۹^{bc}	۸۱/۳ ± ۲۱/۷^{c}	۱۵۱ ± ۱۸/۹^{c}
	۷۷	۶۸/۳ ± ۶^{c}	۱۰۸/۳ ± ۱/۶^{bc}	۹۸/۶ ± ۱/۴^{c}	۱۶۰/۶ ± ۸/۸^{c}
	۹۸	۶۴/۳ ± ۲/۳^{c}	۱۰۶/۶ ± ۴/۴^{bc}	۲۰۵ ± ۱۱/۴^{a}	۲۹۶/۶ ± ۱۴/۲^{a}
	۱۱۹	۴۸/۶ ± ۴/۶^{c}	۶۴/۶ ± ۳/۲^{c}	۲۰۷/۶ ± ۶/۶^{a}	۲۹۸/۵ ± ۷/۵^{a}
کتامین	۳۵	۴۸۲/۵ ± ۲/۵^{a}	۵۵۷/۵ ± ۲/۵^{a}	۱۷۲/۵ ± ۲/۵^{b}	۴۸۴ ± ۴^{a}
	۳۷/۵	۵۰۶ ± ۵/۵^{a}	۵۵۲/۳ ± ۲/۰۲^{a}	۲۵۲ ± ۲۹/۰۵^{ab}	۴۳۵/۳ ± ۹/۵^{ab}
	۴۰	۴۲۶/۶ ± ۱۲/۰۱^{b}	۵۳۷/۳ ± ۳/۷^{a}	۲۴۱/۳ ± ۳/۷^{ab}	۲۸۹ ± ۵/۸^{c}
	۴۲/۵	۳۱۸/۶ ± ۸/۵^{cd}	۴۳۸/۳ ± ۱۰/۱^{b}	۲۱۰/۳ ± ۲۵^{ab}	۲۵۶/۶ ± ۱۸/۷^{c}
	۴۵	۳۳۲/۳ ± ۱۵/۸^{c}	۳۸۰ ± ۲۰^{bc}	۲۳۱ ± ۴/۹^{ab}	۱۹۳/۳ ± ۸۲/۹^{c}
	۵۰	۲۶۸/۶ ± ۱۰/۴^{d}	۳۴۱/۶ ± ۱۹/۲^{c}	۲۶۵ ± ۱۷/۷^{a}	۳۷۳/۳ ± ۲۶/۰۳^{b}

حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P < ۰/۰۵) (n =۱۵).

تفاوت معنی‌داری در میزان RBC، WBC، Hb و Hct بین تیمارهای آزمایش با تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵) (جدول ۳)، به طوری‌که کاهش معنی‌داری در میزان شاخص‌های هماتولوژیک فوق در ماهیان قرار گرفته در معرض بیهوشی با کتامین و روغن گل میخک و تیمار استرس نسبت به گروه شاهد وجود داشت. میزان MCHC بین تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد اختلاف معناداری را نشان نداد (P>۰/۰۵) (جدول ۳)، در حالی‌که افزایش معنی‌داری در میزان MCV و MCH در تیمارهای کتامین، روغن گل میخک و استرس نسبت به گروه شاهد وجود داشت (P<۰/۰۵). جدول ۳ درصد افتراقی سلول‌های سفید خون را در تیمارهای آزمایش نشان می‌دهد. بیشترین میزان نوتروفیل به‌طور معنی‌داری در تیمار شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵)، همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان لنفوسیت و ائوزینوفیل در بین تیمارهای آزمایش مشاهده شد (P<۰/۰۵)، در حالی‌که مونوسیت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

بلافاصله بعد از القای بیهوشی، ۱، ۳ و۶ ساعت بعد، بین گروه‌های مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌داری در غلظت کورتیزول مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۱)، به‌طوری‌که کمترین میزان غلظت هورمون کورتیزول متعلق به گروه آزمایشی بیهوش شده با کتامین بود و تنها با تیمار استرس اختلاف معنی‌داری نشان داد. غلظت کورتیزول یک ساعت پس از القا بیهوشی در ماهیان بیهوش شده با

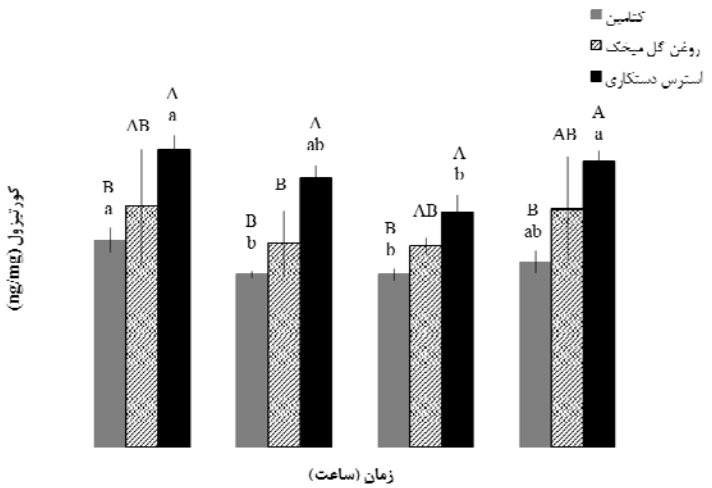
روغن گل میخک کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری را با تیمار استرس نشان داد (P<۰/۰۵). در تیمار روغن گل میخک اختلاف معنی‌داری در مقادیر کورتیزول در طول دوره آزمایش مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۱). افزایش معنی‌داری در غاظت کورتیزول در ماهیان قرار گرفته در معرض استرس دستکاری بلافاصله بعد از القا مشاهده شد، سپس روند کاهشی را در طول آزمایش نشان داد (شکل ۱)، به‌طوری‌که ۳ ساعت بعد از القا، غلظت کورتیزول به حداقل خود رسید. در طول دوره آزمایش غلظت هورمون کورتیزول در تیمار کتامین به‌طور معنی‌داری تغییر کرد (P<۰/۰۵). در دومین مرحله از خونگیری غلظت آن کاهش یافت که اختلاف معنی‌داری نسبت به شروع آزمایش داشت و حداکثر غلظت کورتیزول بلافاصله بعد از القا بود (P<۰/۰۵).

جدول ۳. میانگین (± انحراف معیار) پارامترهای هماتولوژیک بچه ماهی استرلیاد، بلافاصله بعد از قرار گرفتن در معرض استرس و بیهوشی با کتامین و روغن گل میخک

پارامترهای هماتولوژیک	شاهد	استرس	روغن گل میخک	کتامین
WBC ($\times 10^3$ cell/mm^3)	۷/۸ ± ۰/۱^a	۵/۶ ± ۰/۱۸^b	۶/۱ ± ۰/۱^b	۴/۴ ± ۰/۱^c
RBC ($\times 10^3$ cell/mm^3)	۱۲۵۵ ± ۵۵^a	۸۸۲/۵ ± ۱۳/۲^b	۷۷۶/۶ ± ۵/۵^c	۹۰۵/۵ ± ۴/۶^b
Hb (g/dL)	۹/۲ ± ۰/۲^a	۷/۴ ± ۰/۱^b	۶/۶ ± ۰/۰۵^c	۷/۶ ± ۰/۰۵^b
Hct (%)	۳۶ ± ۱^a	۲۸/۶ ± ۰/۳^b	۲۵/۳ ± ۰/۳^c	۲۸/۸ ± ۰/۳^b
MCV (fl)	۲۸۶/۵ ± ۴/۵^b	۳۲۴/۵ ± ۱/۸^a	۳۲۵/۶ ± ۲/۳^a	۳۱۷/۸ ± ۲/۸^a
MCH (pg/cell)	۷۳/۵ ± ۱/۵^b	۸۴/۱ ± ۰/۳^a	۸۵ ± ۰/۲^a	۸۴ ± ۰/۲^a
MCHC (g/dl)	۲۵/۶ ± ۰/۰۵	۲۵/۹ ± ۰/۱	۲۶/۱ ± ۰/۱	۲۶/۴ ± ۰/۲
لنفوسیت (٪)	۶۲/۵ ± ۱/۵^c	۶۷/۸ ± ۰/۶^b	۶۸/۳ ± ۰/۳^b	۷۱/۶ ± ۰/۶^a
نوتروفیل (٪)	۳۳/۵ ± ۱/۵^a	۲۷/۶ ± ۰/۳^b	۲۷/۶ ± ۰/۷^b	۲۲/۳ ± ۰/۷^c
مونوسیت (٪)	۲/۵ ± ۰/۵	۳/۱ ± ۰/۱	۳/۳۳ ± ۰/۳۳	۳/۱ ± ۰/۴
ائوزینوفیل (٪)	۱/۵ ± ۰/۵^{ab}	۰/۶ ± ۰/۳^c	۱ ± ۰/۲^b	۱/۸ ± ۰/۱^a

حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (P < ۰/۰۵) (n =۶).

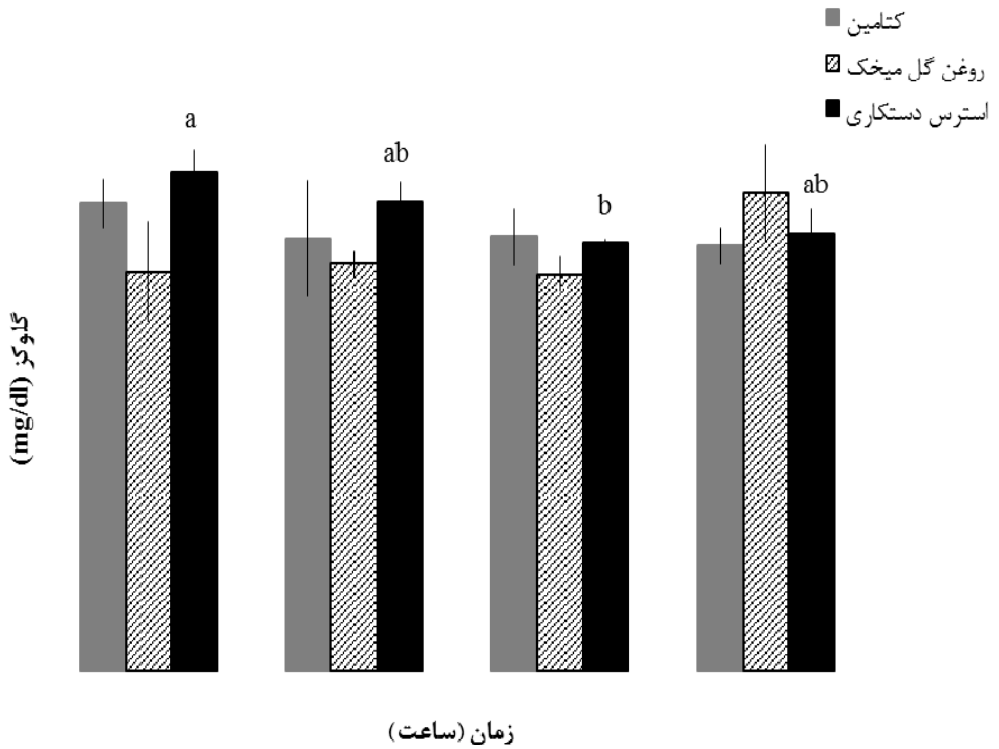
WBC = White Blood Cell; RBC = Red Blood Cell; Hb = Hemoglobin; Hct = Hematocrit; MCV = Mean Corpuscular Volume; MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC = Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration.



شکل ۱. روند تغییرات کورتیزول پس از بیهوشی با کتامین و روغن گل میخک و قرار گیری در معرض استرس دستکاری در بچه ماهی استرلیاد در زمان‌های متفاوت نمونه‌برداری در طول دوره آزمایش. حروف A و B بیانگر اختلاف معنی‌دار در یک زمان نمونه‌گیری بین تیمارهای مختلف (P<۰/۰۵). حروف a و b بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های یک تیمار در طول

آزمایش است (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند (n = ۲۴).

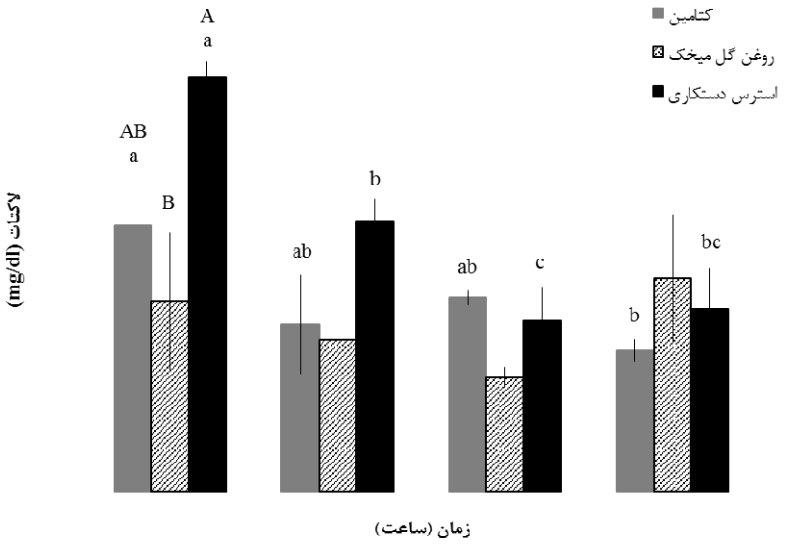
اختلاف معنی‌داری در مقادیر گلوکز بین تیمارهای مختلف آزمایشی بلافاصله بعد از القا بیهوشی، ۱، ۳ و ۶ ساعت بعد مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۲). نتایج مقایسه غلظت گلوکز در بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان داد که تغییرات دوره‌ای غلظت گلوکز در تیمارهای آزمایشی روغن گل میخک و کتامین در طول دوره آزمایش معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، درحالی‌که در ماهیان قرار گرفته در معرض استرس دستکاری، یک روند کاهشی و معنی‌دار در مقادیر گلوکز در طول دوره آزمایش مشاهده شد (P<۰/۰۵) که حداکثر مقادیر گلوکز بلافاصله بعد از القای بیهوشی بود.



شکل ۲. روند تغییرات گلوکز پس از بیهوشی با کتامین و روغن گل میخک و قرارگیری در معرض استرس دستکاری در بچه ماهی استرلیاد در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در طول دوره آزمایش. حروف a و b بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های یک تیمار در طول آزمایش است (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند (n = ۲۴).

بلافاصله بعد از القای بیهوشی در غلظت لاکتات، بین گروه‌های مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۳)، به طوری که بیشترین و کمترین مقادیر لاکتات به ترتیب در تیمارهای استرس و روغن گل میخک اندازه‌گیری شد. یک ساعت، سه ساعت و شش ساعت بعد از القا تغییر معنی‌داری در غلظت لاکتات بین تیمارهای آزمایش مشاهده نشد (P>۰/۰۵). غلظت لاکتات در ماهیان بیهوش‌شده با کتامین در بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که روند کاهشی در غلظت لاکتات در طول دوره آزمایش مشاهده شد. حداکثر غلظت لاکتات بلافاصله بعد از القای استرس در ماهیان قرار گرفته در معرض استرس دستکاری مشاهده شد، سپس کاهش معنی‌داری در

غلظت لاکتات را در طول دوره آزمایش نشان داد (P<۰/۰۵). ماهیان بیهوش شده با روغن گل میخک اختلاف معنی‌داری را در طول دوره آزمایش نشان ندادند (P>۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۳. روند تغییرات لاکتات پس از بیهوشی با کتامین و روغن گل میخک و قرار گیری در معرض استرس دستکاری در بچه ماهی استرلیاد در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در طول دوره آزمایش. حروف A و B بیانگر اختلاف معنی‌دار در یک زمان نمونه‌گیری بین تیمارهای مختلف (P<۰/۰۵). حروف a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های یک تیمار در طول آزمایش است (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند (n = ۲۴).

بحث

در مطالعه حاضر، با افزایش غلظت ماده بیهوشی، زمان‌های از دست دادن تعادل و بروز بیهوشی در هر دو ماده مورد آزمایش کاهش یافت، از طرفی با افزایش غلظت ماده بیهوش‌کننده زمان بازگشت تعادل و بازگشت از بیهوشی نهایتاً افزایش یافت. مطالعات بسیار اندکی در خصوص اثر بیهوشی با کتامین بر روی ماهیان وجود دارد (Fleming *et al*., 2003). مطالعه صورت گرفته بر روی تاسماهی ایرانی نیز کاهش زمان بیهوشی و افزایش زمان بازگشت را با افزایش در غلظت روغن گل میخک نشان داد (Imanpoor *et al*., 2010). نتایج ارائه شده بر روی فیل ماهی همچنین کاهش زمان بیهوشی و افزایش زمان بازگشت را با افزایش در غلظت روغن گل میخک نشان داد (Hoseini & Ghelichpour, 2012). Hajek (2006) اثر روغن گل میخک بر روی کپورمعمولی *Cyprinus carpio* را با غلظت ۱۰-۲۰۰ mg/l مورد بررسی قرار داد و به نتیجه مشابهی دست یافت. همچنین در بررسی که توسط Mitjana *et al.* (2014) بر روی ماهی آنجل *Pterophyllum scalare* صورت گرفت، مشاهده شد که با افزایش غلظت روغن گل میخک، زمان شروع بیهوشی کاهش و بازگشت افزایش می‌یابد. کمترین زمان رسیدن به بیهوشی ۳/۲±۶۴/۶ ثانیه، در غلظت بالا یعنی ۱۱۹ mg/l به‌دست آمد که متعلق به تیمار گل میخک بود. روغن گل میخک در مقایسه با دیگر مواد بیهوشی سبب القای سریع و پایدار بیهوشی می‌شود (Sladky *et al*., 2001; Bressler & Ron, 2004; Detar & Mattingly, 2004)؛ از طرفی کتامین به تنهایی، بدون ترکیب با دیگر مواد بیهوشی، برای هر یک از گونه‌های ماهی اثر ویژه‌ای را به همراه دارد، که اغلب با ایجاد بیهوشی ناقص و زمان بازگشت طولانی مشخص شده است (Oswald, 1978; Graham & Iwama, 1990; Bruecker

& Graham, 1993)؛ به‌طوری‌که در مطالعه حاضر نیز، طولانی‌ترین زمان بازگشت (۴±۴۸۴ ثانیه) متعلق به غلظت mg/l ۳۵ کتامین بود. تفاوت در زمان‌های القا و بازگشت در ماهی استرلیاد تحت شرایط آزمایشگاهی یکسان و همچنین با وزن یکسان می‌تواند به‌خاطر ویژگی‌های هر ماده بیهوشی و عمدتاً مکانیسم عملکردشان باشد. در بررسی حاضر، غلظت بهینه بر اساس زمان‌های القای بیهوشی و بازگشت انتخاب شد. با توجه به معیار ارائه‌شده توسط Gilderhus & Marking (1987) برای بیهوش کننده‌های ایده‌آل (القا بیهوشی در حدود ۳ تا ۱۵ دقیقه و بازگشت در عرض ۱۰ دقیقه)، در بین غلظت‌های مورد آزمایش، غلظت mg/l ۵۶ روغن گل میخک و غلظت mg/l ۴۵ کتامین به‌عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شدند. اگرچه زمان القا کوتاه‌تری در غلظت‌های بالاتر دو ماده بیهوش‌کننده بدست آمد، اما هنگامی که با معیارهای تأثیرگذار فوق مقایسه شد، غلظت‌های انتخاب‌شده، مؤثر بوده و به‌علت عدم مشاهده تلفات، تغییرات رفتاری و عوارض جانبی می‌توان گفت حاشیه امنیت مناسبی داشتند.

مواد بیهوشی می‌توانند سبب آزاد شدن هورمون‌های استرس شوند که این موضوع سبب می‌شود اریتروسیت‌ها متورم شوند و به دنبال آن طحال اریتروسیت‌های جدید را به خون آزاد کند (Wendelaar Bonga, 1997; Tort *et al.*, 2002). تغییر در تعداد اریتروسیت‌ها می‌تواند سبب تغییر در میزان هماتوکریت و هموگلوبین ماهیان قرار گرفته در معرض استرس شود (Wedemeyer *et al.*, 1990; Iwama *et al.*, 1995) این تغییرات به‌عنوان استراتژی احتمالی محسوب می شود تا ماهی اکسیژن مورد نیاز را در پاسخ به شرایط استرسی مهیا کند (Caruso *et al.*, 2005) و به دنبال آن تغییر در میزان شاخص‌های هماتولوژیک شامل MCV، MCHC و MCH ممکن است ایجاد شود. بر اساس نتایج به‌دست آمده، مقادیر RBC، Hb و Hct در بچه ماهیان استرلیاد قرار گرفته در معرض غلظت بهینه از روغن گل میخک و کتامین و تیمار استرس نسبت به نمونه شاهد مقدار کاهشی داشته است. همچنین کاهش معنی‌داری در میزان MCV و MCH در تیمارهای کتامین، روغن گل میخک و استرس دستکاری نسبت به گروه شاهد وجود داشت. در مطالعه صورت گرفته توسط Falahatkar & Barton (2007) بر روی فیل ماهی، افزایش اندکی در غلظت Hct بعد از قرارگیری در معرض استرس دستکاری مشاهده شد. Shaluei et al. (2012) در بررسی خود بر روی فیل ماهی افزایش معنی‌داری را در مقادیر RBC، Hb و Hct بعد از قرارگیری در معرض 2-phenoxyethanol مشاهده نمودند. Velisek *et al.* (2005a,b) تغییر معنی‌داری را در پارامترهای هماتولوژیک کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین کمان بعد از قرارگیری در معرض روغن گل میخک گزارش نکردند. عدم تطابق در تغییرات پارامترهای هماتولوژیک در بین مطالعات مختلف را می‌توان به استفاده از مواد بیهوشی مختلف، تفاوت‌های بین گونه‌ای و شرایط آزمایش نسبت داد. در مطالعه حاضر، کاهش معنی‌داری در میزان WBC برای همه تیمارها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. کاهش در میزان WBC پاسخ معمول به استرس در ماهیان است (Wedemeyer *et al.*, 1990) که از طریق آزاد شدن اپی‌نفرین در طول شرایط استرس‌زا ایجاد می‌شود و ضعف سیستم ایمنی را نشان می‌دهد (Adeyemo, 2007).

اگرچه مواد بیهوشی در کاهش استرس ناشی از شرایط اسارت و دستکاری مؤثر هستند، دلایلی وجود دارد مبنی بر این که خود بیهوشی می‌تواند سبب القای پاسخ استرسی شود که این امر از طریق اندازه‌گیری سطح کورتیزول پلاسما ارزیابی می‌شود (Zahl *et al.*, 2012). بعضی از مواد بیهوشی مانند MS_{222} (Zahl *et al.*, 2012) می‌توانند افزایش قابل توجهی را در غلظت کورتیزول پلاسما ایجاد کنند (Iwama *et al.*, 1989;

(Thomas & Robertson, 1991; Small, 2004). در بررسی حاضر، افزایش معنی‌داری در سطح کورتیزول پلاسما بلافاصله پس از القا در ماهیان بیهوش شده با کتامین و همچنین ماهیان قرار گرفته در معرض استرس دستکاری مشاهده شد، از طرفی تغییری در میزان هورمون کورتیزول در ماهیان قرار گرفته در معرض روغن گل میخک مشاهده نشد. مطالعات مختلفی در رابطه با توانایی روغن گل میخک در کاهش استرس در شرایط دستکاری صورت گرفته است و مشخص شده است که غلظت کورتیزول در پاسخ به استرس در گربه ماهی کانالی *Ictalurus punctatus* و ماهی آزاد اطلس *Salmo salar* کاهش یافته است (Iversen *et al.*, 2003; Small, 2004; Small & Chatakondi, 2005). به‌نظر می‌رسد روغن گل میخک احتمالاً در مهار محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–اینتررنال و رهاشدن کورتیزول در پاسخ به استرس بیهوشی به‌صورت مؤثری عمل می کند. با این وجود، Pirhonen & Schreck (2003) نشان دادند که استفاده از MS_{222} و عصاره گل میخک بر روی ماهی قزل‌آلا مقادیر کورتیزول را تا ۲۴ ساعت پس از بیهوشی بالا نگه می‌دارد. می‌توان گفت در این گونه ها، صرفاً قرارگیری در معرض ماده بیهوشی برای القای استرس کافی است (Davis & Griffin, 2004). Sarkhosh *et al.* (2002)، با بررسی تأثیر داروهای بیهوشی زایلازین هیدروکلراید و کتامین هیدروکلراید برای ایجاد بیهوشی در ماهیان ازون برون *Acipenser stallatus* و تاسماهی ایرانی به این نتیجه رسیدند که داروهای بیهوشی کتامین و زایلازین (رامپون) می‌توانند به‌عنوان یک عامل استرس‌زا در ماهی معرفی شوند. همچنین Fleming *et al.* (2003) تأثیر ترکیب کتامین–مدوتومیدین را بر روی تاسماهی مکزیک *Acipenser oxyrinchus* بررسی کردند و نشان دادند که ترکیب کتامین می‌تواند کندکاری قلب، توقف در تنفس و عدم تحرک ناقص را به‌دنبال داشته باشد. همانطور که ماده بیهوشی شروع به اثرگذاری می‌کند، کوششی که ماهی در ابتدا به‌منظور اجتناب از استرس می‌کند ممکن است سبب القای استرس شود. شیوه عمل هر یک از مواد بیهوشی مختلف، پاسخ استرسی متفاوتی را به دنبال دارد، به‌طوری‌که خود مواد بیهوشی بر روی سیستم درون‌ریز اثر می‌گذارند و سبب افزایش در غلظت کورتیزول پلاسما می‌شوند (Oyama, 1973; Oyama & Wakayama, 1988). اثر یک ماده بیهوشی دقیقا به ویژگی‌های دارویی ماده بیهوشی مثل جذب، پخش و حذف ماده بستگی دارد (Zahl *et al.*, 2010). علاوه بر این، تغییرات در پاسخ به مواد بیهوشی به فاکتورهای زیستی مختلف (جنسیت، سن، وزن بدن، نرخ رشد، شرایط فیزیولوژیک و وضعیت سلامت ماهی) و همچنین فاکتورهای محیطی (درجه حرارت، شوری، pH، سطح اکسیژن محلول) بستگی دارد (Zahl *et al.*, 2012).

کورتیزول به‌عنوان اصلی ترین کورتیکوستروییید در تاسماهیان است (Cataldi *et al.*, 1998) و اغلب در ماهی به‌عنوان پاسخ اولیه به استرس درنظر گرفته می شود (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002). تغییرات زیاد درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای در اندازه این پاسخ استرسی آشکار شده است (Barton, 2000; Barton & Iwama, 1991). در مطالعات صورت گرفته بر روی فیل ماهی، افزایش در غلظت کورتیزول و گلوکز پلاسما بعد از قرار گیری در معرض استرس دستکاری مشاهده شد (Falahatkar & Barton, 2007)، از طرفی به دنبال استرس ناشی از تراکم، تغییری در غلظت کورتیزول و گلوکز پلاسما مشاهده نشد (Falahatkar & Poursaeid, 2013). علیرغم افزایش در غلظت فاکتورهای بیوشیمیایی در بررسی حاضر، افزایش اندکی در مقایسه با ماهیان استخوانی مشاهده شد. غلظت کورتیزول در آزادماهیان تحت استرس حاد بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ ng/ml گزارش شده است (Barton & Iwama, 1991). همچنین در تاسماهی سیبری که به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض هیپوکسی قرار گرفته بودند، سطح کورتیزول تنها ۳۰ ng/ml افزایش یافت (Maxime *et al.*, 1995). به‌نظر می‌رسد این

گونه‌ها نسبتاً در برابر استرس ناشی از دستکاری در طول عملیات آبزی‌پروری مقاوم هستند، اما با این حال در برابر استرس واکنش نشان می‌دهند (Falahatkar & Poursaeid, 2013).

افزایش در گلوکز پلاسما می‌تواند به‌عنوان شاخص استرسی مفید و پاسخ ثانویه به استرس در ماهیان محسوب شود (Wedemeyer *et al.*, 1990). افزایش معنی‌داری در سطح گلوکز پلاسما تنها در تیمار استرسی بلافاصله بعد از القا مشاهده شد، درحالی که تیمارهای دیگر تفاوتی را در غلظت گلوکز در طول دوره آزمایش نشان ندادند. در مطالعه Feng *et al.* (2011) بر روی تاسماهی سیبری تغییرات قابل توجهی در میزان گلوکز در ماهیان بیهوش شده با روغن گل میخک مشاهده نشد که نتایج آنها در توافق با مطالعه حاضر بود. عدم مشاهده تغییر در غلظت گلوکز ممکن است به این خاطر باشد که تحت شرایط استرس زا، نیاز به انرژی افزایش می‌یابد و ماهی انرژی (گلوکز) تولید شده را در پاسخ به این شرایط به سرعت مصرف می‌کند، چرا که عملکرد اصلی سیستم اعصاب مرکزی، حفظ هموستازی است (Martinez-Porchas *et al.*, 2009). از طرفی بسیاری از مطالعات گذشته نشان داده‌اند که افزایش سطح گلوکز می‌تواند در طول چند دقیقه یا چند روز رخ دهد (Wendelaar-Bonga, 1997; Barcellos *et al.*, 2004; Falahatkar & Barton, 2007).

سطح لاکتات پلاسما بلافاصله بعد از القا در تیمار کتامین و استرس در بالاترین حد خود قرار داشت و سپس روند کاهشی معنی‌داری داشت، درحالی‌که ماهیان بیهوش‌شده با روغن گل میخک تغییری را در غلظت لاکتات نشان ندادند. افزایش سطح لاکتات خون در ماهی آزاد اطلس به‌دنبال بیهوشی با روغن گل‌میخک (Iversen *et al.*, 2003) و فیل‌ماهی بعد از قرارگیری در معرض استرس (Falahatkar *et al.*, 2009) مشاهده شد. افزایش سطح لاکتات خون در نتیجه فعالیت تنفسی تحت شرایط بی‌هوازی اتفاق می‌افتد، به‌طوری‌که تحت چنین شرایطی منابع گلیکوژن تخلیه شده و لاکتات در بافت ماهیچه انباشته می‌شود (Milligan & Girard, 1993). بنابراین، زمانی‌که ماهی در معرض سایر مزاحمت‌های فیزیکی قرار می‌گیرد مقدار لاکتات ممکن است افزایش یابد (Barton, 1998).

با توجه به نتایج مطالعه، میزان کورتیزول آزاد شده در تیمار کتامین و روغن گل میخک نسبت به تیمار استرس کمتر بود. مقدار کورتیزول آزاد شده در پاسخ به بیهوشی در مقایسه با کورتیزول آزاد شده در اثر استرس ناشی از اسارت و دستکاری پایین است، اما ممکن است فشار اضافی را در ماهی تحت شرایط استرس‌زا ایجاد کند (Zahl *et al.*, 2012)، به‌طوری‌که مواد بیهوشی می‌توانند اثرات جانبی ناخواسته‌ای را ایجاد کنند که سلامت ماهی را به خطر بیاندازد و بنابراین بایستی در استفاده از نوع ماده بیهوشی، غلظت مورد استفاده و مدت زمان قرارگیری نهایت دقت را داشت. در بررسی حاضر، روغن گل میخک کارایی بهتری را در بیهوشی کامل و برگشت از آن نسبت به کتامین داشت. از طرفی تغییر معنی‌داری در میزان ترشح کورتیزول در ماهیان بیهوش‌شده با غلظت بهینه روغن گل میخک مشاهده نشد، بنابراین با توجه به دسترسی آسان، اقتصادی بودن و کارایی بالا، این ماده برای استفاده در ماهی استرلیاد پیشنهاد می‌شود. با این وجود، مطالعات تکمیلی بیشتری در خصوص اثر بیهوشی کتامین به‌ویژه بر روی تاسماهیان می بایست انجام گردد.

سپاسگزاری

از مسئولین و پرسنل محترم مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر، به خصوص از آقای مهندس عباسعلیزاده و همچنین از تمامی همکارانی که ما را در اجرای این پروژه یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abtahi, B.; Sharifpour, A.; Aghajanpour, M.; Rasouli, A.; Faghihzadeh, S.; Omibbeigi, R.; Nazari, R.M.; (2002). Comparison of LC50 of clove oil and MS222 in Persian sturgeon, rainbow trout and common carp. Iranian Journal of Fisheries Science; 3: 8-10. (in Persian)
2. Ackerman, J.L.; Bellwood D.R.; (2002). Comparative efficiency of clove oil and rotenone for sampling tropical reef fish assemblages. Journal of Fish Biology; 60: 893-901.
3. Adeyemo, O.K.; (2007). Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science; 7: 163-169
4. Barcellos, L.J.G.; Kreutz, L.C.; De Souza, C.; Rodrigues, L.B.; Fioreze, I.; Quevedo, R.M.; Cericato, L.; Soso, A.B.; Fagundes, M.; Conrad, J.; Lacerda, L.A; Terra, S.; (2004). Hematological changes in jundia (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture; 237: 229-236.
5. Barton, B.A.; Iwama, G.K.; (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases; 1: 3-26.
6. Barton, B.A.; (2000). Stress. In: Stickney, R.R.; (editor) Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley and Sons, New York, NY, USA; 892-898.
7. Barton, B.A.; (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology; 42: 517-525.
8. Barton, B.A.; Rahn, A.B.; Feist, G.; Bollig, H.; Schreck, C.B.; (1998). Physiological stress responses of the freshwater chondrostean paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. Comparative Biochemistry and Physiology; 120A: 355-363.
9. Barton, B.A.; Ribas, L.; Acerete, L.; Tort, L.; (2005). Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. Aquaculture Research; 36: 172-179.
10. Bayunova, L.; Barannikova, I.; Semenkova, T.; (2002). Sturgeon stress reaction in aquaculture. Journal of Applied Ichthyology, 18: 397-404.
11. Bressler, K.; Ron, B.; (2004). Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead bream (*Sparus aurata*). Israeli Journal of Aquaculture; 56: 5-13.
12. Bruecker, P.; Graham, M.; (1993). The effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on oxygen consumption rates and behavior in the fish Heros, *Cichlasoma citrinellum* (Günther 1864). Comparative Biochemistry and Physiology; 104: 57-59.
13. Caruso, G.; Genovese, L.; Marcchiolo, G.; Mopica, A.; (2005). Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. Aquaculture International; 13: 67-73.
14. Cataldi, E.; Di Marco, P.; Mandich, A.; Catandella, S.; (1998). Serum parameters of Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. Comparative Biochemistry and Physiology; 121A: 351-354.
15. Cho, G.K.; Heath, D.D.; (2000). Comparison of tricane metanesulfonate (MS 222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*.

Aquaculture Research; 31: 537-546.
16. Dacie J.K. and Lewis S.M., 1995. Practical Haematology. 8th ed: Edinburgh, Churchill Livingstone, London, UK. 609 p.
17. Daisley, K.W.; Blaxhall, P.C.; (1973). Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology; 5: 771-781.
18. Davis, K.B.; Griffin, B.R.; (2004). Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. Aquaculture; 233: 531-548.
19. Detar, J.E.; Mattingly, H.; (2004). Response of southern redbelly dace to clove oil and MS-222: Effects of anesthetic concentration and water temperature. Proceedings of the Annual Conference/ Southeastern Association Fish Wildlife Agencies; 58: 219-227.
20. Falahatkar, B.; Barton, B.A.; (2007). Preliminary observations of physiological responses to acute handling and confinement in juvenile beluga *Huso huso* L. Aquaculture Research; 38: 1786-1789.
21. Falahatkar, B.; Poursaeid, S.; (2013). Stress responses of great sturgeon *Huso huso* subjected to husbandry stressors. Aquaculture International; 38: 1786-1789.
22. Falahatkar, B.; Poursaeid, S.; Shakoorian, M.; Barton, B.; (2009). Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. Journal of Fish Biology; 75: 784-796.
23. Feng, G.; Zhuang, P.; Zhang, L.; Kynard, B.; Shi, X.; Liu, J.; Huang, X.; (2011). Effect of anaesthetics MS-222 and clove oil on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Journal of Applied Ichthyology; 27: 595-599.
24. Fleming, G.J.; Heard, D.J.; Floyd, R.F.; Riggs, A.; (2003). Evaluation of propofol and medetomidine-ketamine for short-term immobilization of Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus de soti*). Journal of Zoology and Wildlife Medicine; 34: 153-158.
25. Gilderhus, P.A.; Marking, L.L.; (1987). Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management; 7: 288-292.
26. Graham, M.S.; Iwama; G.K.; (1990). The physiologic effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on two Salmonid species. Aquaculture, 90: 323-332.
27. Hajek, G.J.; Klyszejko, B.; Dziaman, R.; (2006). The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio L*. Acta Ichthyologica et Piscatoria; 36: 93-97.
28. Hoseini, S.M.; Ghelichpour, M.; (2012). Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in Beluga, *Huso huso* (L.). Fish Physiology and Biochemistry; 38: 493-498.
29. Houston, A.H.; (1990). Blood and circulation. In: Schreck C.B.; Moyle, P.B.; (editors), Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA; 273-334.
30. Hurvitz, A.; Jackson, K.; Degani, G.; Levavi-Sivan, B.; (2007). Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. Aquaculture; 270: 158-166.
31. Imanpour, M.R.; Bagheri, T.; Hedayati, A. A.; (2010). The anesthetic effects of clove essence in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. World Journal of Fish and Marine Science; 2: 29-36.
32. Iverzen, M.; Finstad, B.; Mckinley, R.S.; Eliassen, R.A.; (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI–S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon stress-reducing capacity. Aquaculture; 221: 549-566.

33. Iwama, G.K.; McGeer, J.C.; Pawluk, M.P.; (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. Canadian Journal of Zoology; 67: 2065-2073.
34. Iwama, G.K.; Morgan, J.D.; Barton, B.A.; (1995). Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. Aquaculture Research; 26: 273-282.
35. Keene, J.L.; Noakes, D.L.G.; Moccia, R.D.; Soto, C.G.; (1998). The efficacy of clove oil as an anasthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research; 29: 89-101.
36. Martinez-Porchas, M.; Martinez-Cordova, L.R.; Ramos-Enriquez, R.; (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? Pan-American Journal of Aquatic Science; 4: 158-178.
37. Maxime, V.; Nonotte, G.; Peyraud, C.; Williot, P.; Trouchot, J.P.; (1995). Circulatory and respiratory effects of hypoxic stress in the Siberian sturgeon. Respiratory Physiology; 100: 203-212.
38. Milligan, C.L.; Girard, S.S.; (1993). Lactate metabolism in rainbow trout. Journal of Experimental Biology; 180: 175-193.
39. Mitjana, O.; Bonastre, C.; Insua, D.; Flaceto, M.V.; Esteban, J.; Josa, A.; Espinosa, E.; (2014). The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetics agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). Aquaculture; 433: 491-495.
40. Oswald, R.L.; (1978). Injection anesthesia for experimental studies in fish. Comparative Biochemistry and Physiology; 60: 19-26.
41. Oyam, T.; Wakayama, S.; (1988). The endocrine responses to general anesthesia. International Anesthesiology Clinic; 26: 176-181.
42. Oyama, T.; (1973). Endocrine responses to anesthetic agents. British Journal of Anesthesia; 45: 276-281.
43. Palić, D.; Herolt, D.M.; Andreasen, C.B.; Menzel, B.W.; Roth, J.A.; (2006). Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). Aquaculture; 254: 675-685.
44. Papahn, A.A.; Peyghan R.; Modarresi, Sh.; (2005) Electrecardiographic changes in anesthesia with ketamine in grass carp. Journal of faculty of Veterinary medicine, University of Tehran; 60 (1): 59-64. (In Persian)
45. Pirhonen, J.; Schreck, C.B.; (2003). Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture; 220: 507-514.
46. Redding, J.M.; Schreck, C.B.; Birks, E.K.; Ewing, R.D.; (1984). Cortisol and its effect on plasma thyroid hormone and electrolyte concentrations in freshwater and during seawater acclimation in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. General and Comparative Endocrinology; 56: 146-155.
47. Řehulka, J.; (2000). Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout. Aquaculture; 190: 27-47.
48. Ross G.L.; Ross B.; (2008). Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, UK. 222 p.
49. Sarkhosh, A.; Oryan, SH.; Yousefiyan, M.; (2002) Effects of xylazine hidrochloride and ketamine hydrochloride anesthesia on sturgeon fish. Iranian Journal of Marine Science and Technology; 62: 53-47. (in Persian).

50. Shaluei, F.; Hedayati, A.; (2012). Physiological responses of great Sturgeon (*Huso huso*) to different concentration of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. Fish Physiology and Biochemistry; 38: 1627-1634.
51. Sharifpour, A.; Soltani, M.; Abdolhay, H.; Ghayumi, R.; (2002). The effect of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) under different conditions of pH and temperature in common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Fisheries Science; 4: 59-74. (in Persian)
52. Sladky, K.K.; Swanson, C.R.; Stoskopf, M.; Loomis, M.R.; Lewbart, G.A.; (2001). Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). American Journal of Veterinary Research; 62: 337-342.
53. Small, B.C.; Chatakondi, N.; (2005). Routine measures of stress are reduced in mature channel catfish during and after AQUI- S anesthesia and recovery. North American Journal of Aquaculture; 67: 72-78.
54. Small, C.B.; (2004). Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulphonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel *catfish Ictalurus punctatus*. Aquaculture; 218: 177-185.
55. Stoskopf, M.; (1993). Anaesthesia. In: Brown, L.; (editor) Aquaculture for Veterinarians, Fish Husbandary and Medicine. New York: Pergamon Press; 161-167.
56. Thomas, P.; Robertson, L.; (1991). Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. Aquaculture; 96: 69-86.
57. Tort, L.; Puigcerver, M.; Crespo, S.; Padro's, F.; (2002). Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. Aquaculture Research; 33: 907-910.
58. Velisek, J.; Stara, A.; Li, Z.H.; Silovska, S.; Turek, J.; (2011). Comparison of effects of four anaesthetics on blood chemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. Aquaculture; 310: 369-375.
59. Velisek, J.; Svobodova, Z.; Piackova, V.; (2005a). Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Acta Veterinaria Brno; 74: 139-146.
60. Velisek, J.; Svobodova, Z.; Piackova, V.; Groch, L.; Nepejchalova, L.; (2005b). Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio).* Veterinary Medicine Czech; 50: 269-275.
61. Wagner, E.; Arndt, R.; Hilton, B.; (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. Aquaculture; 211: 353-366.
62. Weber, R.A.; Peleteiro, J.B.; García Martín, L.O.; Aldegunde M.; (2009). The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Aquaculture; 288: 147-150.
63. Wedemeyer, G.A.; Barton, B.A.; McLeay, D.J.; (1990). Stress and acclimation. In: Schreck C.B.; Moyle, P.B.; (editors) Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA; 451-489.
64. Wendelaar Bonga, S.E.; (1997). The stress response in fish. Physiological Reviews; 77: 591-625.
65. Williot, P.; Brun, R.; Rouault, T.; Pelard, M.; Mercier, D.; Ludwig, A.; (2005b). Artificial spawning in cultured Sterlet sturgeon, *Acipenser*

ruthenus L., with special emphasis on hermaphrodites. Aquaculture; 246: 263-273.

66. Zahl, I.H.; Kiessling, A.; Samuelsen, O.B.; Olsen, R.E.; (2010). Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Fish Physiology Biochemistry; 36: 719-730.
67. Zahl, I.H.; Samuelsen O.; Kiessling, A.; (2012). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. Fish Physiology Biochemistry; 38: 201-218.