

کارایی دو ماده بیهوشی تر کائین متان سولفانات (MS-222) و عصاره توتون و اثر بر تغییرات فیزیولوژیک بچه ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

خیام دل افکار^۱، مسعود ستاری^۲، حسین خارا^۳، بهرام فلاحتکار^{*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه تکثیر و پرورش، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان

۲- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان

۳- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، گیلان

پذیرش: ۹۶/۰۸/۰۸

دریافت: ۹۴/۰۵/۲۲

* نویسنده مسئول مقاله: falahatkar@guilan.ac.ir

چکیده:

کارایی دو ماده بیهوشی MS-222 در غلظت‌های ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ میلی گرم در لیتر و عصاره توتون در غلظت‌های ۳۷۵، ۴۵۰، ۵۲۵، ۶۰۰، ۶۷۵ و ۷۵۰ میلی گرم در لیتر بر روی بچه ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با میانگین وزن 54 ± 0.7 گرم در سه تکرار بررسی و شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی پلاسما آنها تحت این دو ماده بیهوشی مقایسه گردید. نتایج نشان داد که زمان تأثیر یعنی از دست رفتن تعادل و بروز بیهوشی با افزایش غلظت در هر دو ماده کاهش پیدا کرد، ولی زمان بازگشت تعادل و واکنش به محرک خارجی نیز طولانی‌تر شد. با توجه به زمان‌های بیهوشی و بازگشت، غلظت MS-222 60 mg/l و عصاره توتون به عنوان غلظت بهینه انتخاب شدند. تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان در معرض MS-222 کاهش معناداری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند ($p < 0.05$) و به دنبال آن تغییر در میزان میانگین حجم یک گلبول قرمز و میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز بین تیمارها مشاهده شد ($p < 0.05$). همچنین تفاوت معناداری در تعداد گلبول‌های سفید، لنفوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل بین تیمارها مشاهده شد ($p < 0.05$). برهمکنش تیمار و زمان بر روی سطح کورتیزول پلاسما در زمان صفر و یک ساعت پس از بهوش آمدن ماهی در تیمار عصاره توتون نسبت به سایر تیمارها در زمان‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0.05$). برهمکنش تیمار و زمان بر روی سطح گلوکز پلاسما معنادار نبود ($p > 0.05$), به طوری که تغییرات گلوکز تنها در تیمار شاهد در طول زمان معنادار بود ($p < 0.05$). برهمکنش تیمار و زمان بر روی سطح لاکتات پلاسما هم معنادار بود ($p < 0.05$) و حداکثر غلظت آن به طور معناداری در ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون در زمان صفر در مقایسه با سایر گروه‌ها و زمان‌ها مشاهده شد. در مجموع با توجه به مشاهده تغییرات کمتر در غلظت شاخص‌های بیوشیمیایی ماهیان بیهوش شده با MS-222 در مقایسه با عصاره توتون، به نظر می‌رسد این ماده پاسخ استرسی کمتری را در بچه ماهیان استرلیاد به همراه داشته و بنابراین استفاده از آن نسبت به عصاره توتون، توصیه می‌شود.

کلید واژگان: استرلیاد، بیهوشی، MS-222، عصاره توتون، استرس

مقدمه

در آب است و به‌طور گسترده‌ای در بیهوشی ماهی و دیگر حیوانات خونسرد استفاده می‌شود (Mitjana et al., 2014). MS-222 تنها داروی بیهوشی است که از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration) به‌منظور استفاده در ماهی تأیید شده است (Harper, 2003). این ماده از طریق مسدود کردن کانال سدیم موجود در غشای سلولی بر روی ماهی اثر می‌گذارد (Neumcke et al., 1981) و در ماهیان بیهوشی عمومی ایجاد می‌کند، به‌طوری‌که از انتقال پیام عصبی از محیط به قسمت‌های بالاتر سیستم عصبی جلوگیری می‌کند. تاکنون مطالعات گسترده‌ای بر روی اثر بیهوش‌کنندگی MS-222 انجام شده است که از جمله می‌توان به مطالعه Mitjana و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کرد که اثرهای بیهوشی MS-222 را بر روی ماهیان *Pterophyllum scalare* بررسی کردند. Gholipour و همکاران (۲۰۱۳) و Velisek و همکاران (۲۰۱۱) بر روی بیهوشی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت‌تأثیر MS-222 مطالعاتی انجام دادند. Feng و همکاران (۲۰۱۱) اثرهای بیهوش‌کنندگی اسانس گل میخک و MS-222 را بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی خون تاس‌ماهی سیبری *Acipenserbaerii* بررسی کردند. همچنین Alishahi و همکاران (۱۳۹۳) نیز تأثیر داروی MS-222 را بر روی بیهوشی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* بررسی کردند.

توتون گیاهی است با نام علمی *Nicotiana tobacum* و به خانواده بادنجانیان (Solanaceae) تعلق دارد. به برگ‌های خشک و بریده شده این گیاه تنباکو می‌گویند. گیاهی یک‌ساله به ارتفاع یک تا ۲ متر (گاهی بیشتر) و پوشیده از تارهای چسبنده بسیار کوتاه است که از تمام اندام‌های آن بوی قوی و ناپسند استنشام می‌شود. ماده مؤثر موجود در

امروزه استفاده از مواد آرامش‌بخش نظیر مواد بیهوشی امری معمول در آبی‌پروری نوین است (Velisek et al., 2011). چنین موادی در خلال دستکاری، رقم‌بندی، علامت‌گذاری، روند تکثیر مصنوعی و جراحی استفاده می‌شوند تا از مشکلات ناشی از استرس مثل کاهش در تغذیه و عملکرد ایمنی بکاهند (Ross and Ross, 2008). تغییرات مرتبط با استرس در شیمی خون در طی چند ثانیه، زمانی‌که ماهی تحت شرایط استرس‌زا است (Barton and Iwama, 1991) شامل تغییر در هورمون‌های پلازما، تعادل الکترولیت و سوخت‌وساز انرژی است. ماهی دارای سیستم عصبی پایه‌ای برای تحریک درد است (Danlup and Laming, 2005). بنابراین، برای اطمینان از سلامت ماهی در خلال دستکاری که ممکن است سبب ایجاد درد شود، استفاده از مواد بیهوشی که توانایی مسدود کردن مسیرهای ایجاد کننده درد را دارند، ضروری است (Zahl et al., 2012). در واقع مواد بیهوشی استرس را از طریق ایجاد یک توقف در عملکرد عصبی کاهش می‌دهند (Iwama and Ackerman, 1994). با این وجود، نوع ماده، غلظت استفاده و زمان در معرض‌گذاری می‌تواند بر روی فیزیولوژی ماهی اثرگذار باشد (Gholipour et al., 2013). عوامل مختلفی برای ارزیابی یک ماده بیهوشی مطلوب در آبی‌پروری بیان شده است که از آن جمله می‌توان به اثرگذاری و بازگشت سریع، سمیت پایین (Soto and Burhanuddin, 1995)، حاشیه ایمنی وسیع، دسترسی آسان و قیمت پایین اشاره کرد (Pirhonen et al., 2002)، بنابراین استفاده از موادی که کمترین مضرات را داشته باشد، ضروری است.

انواع مختلفی از مواد بیهوشی با ویژگی‌های متفاوت وجود دارد. یکی از معمول‌ترین مواد بیهوشی ترکیبات متان سولفانات (MS-222) است که یک ماده بیهوشی محلول

تاس ماهیان است که شرایط زیستی و رسیدگی جنسی کوتاه‌تر نسبت به سایر ماهیان خاویاری، این ماهی را به‌عنوان الگویی مناسب برای مطالعات بیولوژیک، تغذیه‌ای و دستکاری‌های کروموزومی در بین سایر ماهیان خاویاری معرفی کرده است (Williot et al., 2005). با توجه به اهمیت و ارزش ذکر شده این گونه باید در عملیاتی که بر روی آنها انجام می‌شود نهایت دقت را داشت و در حفظ سلامت و کاهش آسیب‌های ناشی از هرگونه دستکاری، استفاده از داروی بیهوشی مناسب با غلظت بهینه اهمیت و ضرورت پیدا می‌کند. از طرفی غلظت بهینه یک ماده بیهوشی برای گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت است و همچنین گونه‌های مختلف ماهی پاسخ متفاوتی را به یک ماده بیهوشی نشان می‌دهند. این امر ضرورت تعیین غلظت بهینه مواد بیهوشی را برای ماهی استرلیاد نشان می‌دهد. بنابراین مطالعه حاضر ابتدا با هدف تعیین غلظت بهینه MS-222 و عصاره توتون انجام شد و سپس اثر غلظت بهینه این مواد بر روی شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی بررسی گردید و با بچه‌ماهیان استرلیاد قرار گرفته در معرض استرس بدون استفاده از ماده بیهوشی مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط نگهداری

تعداد ۳۲۵ قطعه بچه ماهی استرلیاد، با میانگین (\pm خطای استاندارد) وزنی 0.7 ± 0.54 گرم و طول کل 0.3 ± 0.25 سانتی‌متر حاصل تکثیر اسفند ۱۳۹۰ در مجتمع تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی پس از طی عملیات رقم‌بندی، تهیه شدند. بچه‌ماهیان به‌منظور سازگاری به مدت ۲ هفته پیش از شروع آزمایش به تانک‌های فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری با ابعاد $2 \times 2 \times 0.5$ متر (حجم

توتون، نیکوتین است که به میزان ۲ تا ۵ درصد در برگ خشک آن یافت می‌شود (Hassal, 1982). به‌طور کلی، توتون به‌علت داشتن نیکوتین و آلکالوئیدهای وابسته به‌عنوان مواد مخدر شناخته شده‌است و این ویژگی باعث شده تا در برخی تحقیقات به‌عنوان ماده بیهوشی مطالعه شود. با توجه به ارزانی تنباکو نسبت به گل میخک و همچنین کشت وسیع آن در کشور، اثر بیهوشی این ماده بر روی بیهوشی بچه‌ماهیان استرلیاد بررسی شد. معیارهایی که برای ارزیابی عصاره توتون به‌عنوان ماده بیهوشی مطلوب در آبی‌پروری و تحقیق به‌کار گرفته شده شامل کاربرد آسان، ارزان بودن، غیرسمی بودن، عدم مشاهده اثر پایدار بر فیزیولوژی و رفتار ماهی است که از سوی Marking و Meyer (۱۹۸۵) پذیرفته شده است. تحقیقات اندکی دربارهٔ اثر بیهوشی عصاره توتون بر روی ماهیان انجام شده است. Zargham و همکاران (۲۰۱۳) اثرهای بیهوش‌کنندگی عصاره آبی و الکلی تنباکو را بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطالعه کردند. Agokei و Adebisi در سال ۲۰۱۰ از شیرابه توتون به‌عنوان ماده بیهوشی بر روی ماهی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* استفاده کردند که نتیجه آن رضایت‌بخش بود. از دیگر تحقیقات انجام شده بر روی عصاره توتون در آبی‌پروری بررسی اثر غلظت‌های کشنده این گیاه در گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* است که وزن گربه ماهیان به‌همراه افزایش سمیت کاهش یافت (Kori-siakpere and Oviroh, 2011).

تاکنون مطالعات مختلفی بر روی بیهوشی تاس‌ماهیان انجام شده‌است (Abtahi et al., 2002; Imanpour et al., 2010; Feng et al., 2011; Hoseini and Ghelichpour, 2012; Shalvei et al., 2012)، درحالی‌که دربارهٔ اثر بیهوش‌کنندگی عصاره توتون در این ماهیان هیچ بررسی‌ای انجام نشده است. از طرفی ماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* یکی از گونه‌های با ارزش

ماهی‌ها به‌طور تصادفی از تانک‌های فایبرگلاس به‌وسیله تور دستی کوچکی گرفته شدند و به تعداد لازم به ظروف بیهوشی محتوای ۱۰ لیتر آب منتقل شدند. پیش از انتقال، برای مشاهده دقیق اثر ماده بیهوشی بر ماهی، هوادهی به ظرف بیهوشی قطع شد. تمام آزمایش‌ها با روش غوطه‌ورسازی ماهی در محلول بیهوشی انجام شد. برای اندازه‌گیری زمان‌های بیهوشی و بازگشت از طبقه‌بندی ۵ مرحله‌ای Stoskopf (۱۹۹۳) استفاده گردید. غلظت بهینه براساس مشاهدات رفتار ماهی و زمان رفت و برگشت از بیهوشی تعیین گردید.

زمانی که ماهی به مرحله ۳ بیهوشی، یعنی زمان از دست دادن تعادل، و مرحله ۴ بیهوشی، یعنی زمان از دست دادن کامل حرکات اختیاری و فعالیت‌رئید، زمان با استفاده از یک زمان‌سنج ثبت شد و به‌ترتیب‌عنوان زمان از دست دادن تعادل و زمان بروز بیهوشی در نظر گرفته شد. پس از بروز بیهوشی، ماهی‌ها به مخازن بازگشت (ریکاوری) محتوای ۲۰ لیتر آب که با استفاده از سنگ هوا هوادهی می‌شدند، منتقل گشتند. زمانی که ماهی به مرحله ۳ بازگشت یعنی زمان بازگشت کامل تعادل و مرحله ۴ بازگشت یعنی زمان بازگشت واکنش ماهی به محرک خارجی، به‌صورت ضرب‌بزدن به دیواره مخازن رسید، زمان ثبت شد و به‌ترتیب‌عنوان زمان بازگشت تعادل و زمان بازگشت به محرک خارجی در نظر گرفته شد. پس از انجام هر یک از آزمایش‌ها، ماهیان از مخازن بازگشت و به تانک‌های فایبرگلاس منتقل شدند و به‌مدت یک هفته برای مشاهده تلفات احتمالی در نظر قرار گرفتند.

آزمایش دوم

اندازه‌گیری شاخص‌های خون‌شناسی

بچه ماهیان استرلیاد پس از آزمایش اول به‌مدت یک هفته در تانک‌های فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری با ابعاد $2 \times 2 \times 0.5$

آبگیری (۱۰۵۰ لیتر) که به‌خوبی هوادهی می‌شدند، منتقل شدند. به‌منظور تأمین آب ورودی سیستم، تانک‌ها با جریان مداوم آب سفیدرود و آب چاه به‌صورت توأم (برای حفظ ثبات دمایی در آب تانک‌ها) با دبی $0.21 \pm 1/min$ (۱۴/۴۲) آب‌رسانی شدند. دمای آب تانک‌ها در طول دوره سازگاری و انجام آزمایش 23 ± 15 °C بود. میزان اکسیژن محلول 7.1 ± 0.2 mg/l، pH، 7.7 ± 0.1 و میزان سختی آب 4.5 ± 1.91 mg/l بود. غذادهی به‌صورت روزانه به اندازه ۱-۲ درصد وزن بدن با استفاده از جیره تجاری بیومار (France, Nersac)، پروتئین خام ۵۳ درصد و چربی خام ۱۰ درصد) انجام شد. گفتنی است که ۲۴ ساعت پیش از شروع آزمایش و نیز در مدت انجام آزمایش‌ها برای تعیین اثرهای ماده بیهوشی بر روند بیهوشی و بازگشت از آن، ماهی‌ها تغذیه نمی‌شدند (Sharifpour et al., 2002).

آزمایش اول

تعیین غلظت بهینه

به‌منظور تعیین غلظت بهینه MS-222 و عصاره توتون از ۱۸۰ قطعه ماهی استفاده شد. هریک از مواد بیهوشی شامل ۶ غلظت مختلف بودند که برای هر کدام از غلظت‌ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد و هر تکرار بر روی ۵ قطعه بچه‌ماهی انجام گردید. به‌منظور به‌دست آوردن عصاره آبی توتون، پودر توتون ویرجینیا حاوی ۲/۳۵ درصد نیکوتین (شرکت دخانیات، رشت، ایران) با آب مقطر مخلوط شد. پس از عبور از صافی، عصاره به‌دست آمده در ظرفی در بسته نگهداری شد (Agokei and Adebisi, 2010). در نهایت غلظت‌های ۳۷۵، ۴۵۰، ۵۲۵، ۶۰۰، ۶۷۵ و ۷۵۰ میلی‌گرم درلیتر از آن به‌دست آمد. MS-222 (شرکت Sigma-Aldrich، سنت لوئیس، آمریکا) در غلظت‌های ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ میلی‌گرم درلیتر آب تهیه شد.

شاخص‌های هماتولوژیک تنها بلافاصله پس از بیهوشی اندازه‌گیری شدند، درحالی‌که شاخص‌های بیوشیمیایی سرم در فواصل زمانی (بلافاصله پس از بیهوشی و ۱، ۳ و ۶ ساعت پس از بیهوشی) اندازه‌گیری شدند تا روند تغییرات غلظت کورتیزول، گلوکز و لاکتات خون مشاهده شود. شاخص‌های هماتولوژیک 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.

برای شمارش WBC، از روش Daisley و Blaxhall (۱۹۷۳) استفاده شد و تعداد آن در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید. شمارش RBC نیز با استفاده از همین روش انجام شد و تعداد آن در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری میزان Hct از روش میکروهماتوکریت استفاده شد، به‌طوری‌که لوله‌های هماتوکریت درون دستگاه سانتی‌یفوژ میکروهماتوکریت قرار داده شد و پس از سپری شدن ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰g مقدار Hct به‌وسیله صفحه مدرج مخصوص قرائت شد. اندازه‌گیری Hb با واحد گرم در دسی‌لیتر با روش اتوماسیون Lysing sysmex با استفاده از دستگاه خودکار (Sysmex, Kobe, Japan) سنجیده شد (Dacie and Lewis, 1995). برای محاسبه شاخص‌های خونی شامل MCV، MCH و MCHC از روابط زیر استفاده گردید (Dacie and Lewis, 1995):

$$10 \times \text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در متر مکعب)} / \text{مقدار هماتوکریت (MCHC)} = \text{MCH (pg/cell)}$$

$$10 \times \text{تعداد گلبول‌های قرمز} / \text{مقدار هموگلوبین (میلیون در متر مکعب)} = \text{Hb (g/dl)}$$

متر با حجم آبیگری ۱۰۵۰ لیتر (سیستم نگهداری) نگهداری شدند. برای تعیین اثر بیهوشی MS-222 و عصاره توتون بر روی شاخص‌های خونی، ۳ تیمار هر یک با ۳ تکرار در نظر گرفته شد و تعداد ۲۴ قطعه بچه ماهی برای هر تیمار استفاده گردید. فقط دو تیمار در معرض غلظت بهینه مواد بیهوشی قرار گرفتند و یک تیمار شاهد (بدون قرارگیری در معرض ماده بیهوشی) هم برای تعیین چگونگی تغییر شاخص‌های خون‌شناسی در ماهیان بیهوش شده با ماده بیهوشی در مقایسه با تیمار شاهد در عملیات خونگیری در نظر گرفته شد. بچه ماهیان استرلیاد به‌صورت تصادفی از تانک‌های فایبرگلاس گرفته شدند و به ظروف پلاستیکی محتوای ۱۰ لیتر آب منتقل شدند. ماهیان دو تیمار با غلظت‌های بهینه به‌دست آمده از مرحله اول (MS-222 ۶۰mg/l، عصاره توتون ۶۷۵mg/l) با روش غوطه‌ورسازی بیهوش شدند. بلافاصله پس از القای بیهوشی کامل (مرحله ۴ بیهوشی)، به سرعت دو قطعه ماهی از هر تکرار گرفته و خونگیری انجام شد. هم‌زمان دو قطعه ماهی از هر تکرار تیمار شاهد گرفته شد و خونگیری از آنها بدون استفاده از مواد بیهوشی انجام گردید. خونگیری ظرف مدت یک دقیقه برای هر ماهی با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۲ میلی‌لیتری هپارینه و از سیاهرگ دمی انجام شد. ماهیان خونگیری شده به تانک‌های فایبرگلاس سیستم نگهداری منتقل شدند. ماهیان هر تکرار که خونگیری از آنها صورت نگرفت، به تانک‌های ریکاوری پلاستیکی محتوای ۲۰ لیتر آب (آبرسانی با جریان یک طرفه) منتقل شدند. در فواصل زمانی ۱، ۳، و ۶ ساعت پس از بیهوشی، خونگیری از ماهیان باقی‌مانده از هر تکرار صورت گرفت، بدین صورت که در هر فاصله زمانی دو قطعه ماهی از هر تکرار خونگیری شدند و سپس به تانک‌های فایبرگلاس سیستم نگهداری منتقل شدند.

$100 \times (\text{مقدار هماتوکریت}) / (\text{مقدار هموگلوبین}) = \text{MCHC (g/dl)}$
 تعیین درصد هر یک از گلبول‌های سفید خونی (لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و نوتروفیل) با روش Houston (۱۹۹۰) انجام شد و سپس سلول‌ها با عدسی $100 \times$ میکروسکوپ نوری (Model Boeco Binocular, Germany) مشاهده و درصد هر کدام به‌طور جداگانه محاسبه شد (Rehulka, 2000).

نمونه‌های خونی در نظر گرفته شده برای بررسی‌های بیوشیمیایی با سرعت 1600 g برای 10 دقیقه سانتریفوژ شدند. پلاسما پس از جداسازی، در دمای 80°C - نگهداری شد. اندازه‌گیری هورمون کورتیزول با واحد نانوگرم در میلی‌لیتر با روش رادیوایمنواسی (Redding et al., 1984) براساس واکنش رقابتی با استفاده از کیت تجاری (Immunotech, Marseille, France) انجام شد. اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از کیت تجاری (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) با روش آنزیمی رنگ‌سنجی با دستگاه اتوآنالایزر (Technicon RA-1000, USA) با طول موج 500 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 (شرکت زیست‌شیمی، تهران، ایران) و با دستگاه اتوآنالایزر (Technicon RA-1000, USA) با طول موج 520 nm انجام شد (Barton et al., 2005).

آنالیز آماری داده‌ها

ارزیابی طبیعی بودن داده‌ها و بررسی همگنی واریانس‌ها به‌ترتیب با استفاده از آزمون One Sample Kolmogorov-Smirnov Test و آزمون Levene انجام شد. سپس برای تعیین اثر غلظت‌های مختلف بر روی زمان‌های القا و بازگشت و همچنین مقایسه شاخص‌های هماتولوژیک از

آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-Way ANOVA) برای تعیین تفاوت‌های شاخص‌های بیوشیمیایی بین تیمارها و در طول زمان استفاده شد. در صورت مشاهده تفاوت، اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای Tukey بررسی گردید. سطح معنادار در نظر گرفته شده در این بررسی، $p < 0.05$ می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (version 16, Chicago, USA) انجام شد.

نتایج

آزمایش اول

تفاوت معناداری بین میانگین زمان از دست دادن تعادل و زمان ایجاد بیهوشی کامل در بچه‌ماهیان استرلیاد تحت تأثیر غلظت‌های مختلف MS-222 و عصاره توتون وجود داشت (جدول ۱؛ $p < 0.05$). از طرفی بین میانگین زمان بازگشت تعادل و بازگشت کامل از بیهوشی تنها در بچه‌ماهیان قرار گرفته در معرض MS-222 تفاوت معنادار وجود داشت ($p < 0.05$) و برای عصاره توتون اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p > 0.05$). کوتاه‌ترین زمان بروز بیهوشی کامل متعلق به تیمار MS-222 بود که با میانگین زمان $34/9 \pm 211/6$ ثانیه با غلظت 70 mg/l بود. همچنین کوتاه‌ترین زمان واکنش به محرک خارجی $2/6 \pm 155/3$ ثانیه با غلظت 60 mg/l در تیمار MS-222 مشاهده شد. طولانی‌ترین زمان بروز بیهوشی کامل $3/4 \pm 674/0$ ثانیه با غلظت 45 mg/l نیز متعلق به تیمار MS-222 بود. در حالی که، طولانی‌ترین زمان واکنش به محرک خارجی $1/0 \pm 749/0$ ثانیه با غلظت 375 mg/l در بچه‌ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون مشاهده شد. در بین غلظت‌های آزمایش شده، عصاره توتون با غلظت 675 mg/l و MS-222 با غلظت 60 mg/l به‌عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شدند.

جدول ۱ میانگین (± خطای استاندارد) زمان‌های رسیدن به مراحل مختلف بیهوشی و بازگشت از آن در بچه‌ماهیان استرلیاد تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف MS-222 و عصاره توتون.

نوع ماده بیهوشی	غلظت (گرم/میلی‌لیتر)	زمان از دست رفتن تعادل (ثانیه)	زمان بروز بیهوشی (ثانیه)	زمان بازگشت تعادل (ثانیه)	زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی (ثانیه)
MS-222	۴۵	۵۴۴ ± ۴۳/۵ ^a	۶۷۴ ± ۳/۴ ^a	-	۴۳۴/۶ ± ۵۲/۹ ^a
	۵۰	۳۶۴ ± ۴/۵ ^b	۵۳۹/۶ ± ۸/۳ ^b	۱۶۴ ± ۴ ^{ab}	۲۰۰/۶ ± ۲۰/۱ ^{bc}
	۵۵	۳۲۱ ± ۱۶/۲۵ ^{bc}	۳۵۹/۶ ± ۲۳/۳ ^c	۱۱۹/۳ ± ۴/۹ ^{abc}	۱۵۹/۳ ± ۱۳/۱ ^c
	۶۰	۲۴۰/۶ ± ۱/۲ ^{cd}	۲۹۸/۶ ± ۶/۹ ^c	۹۳/۳ ± ۸/۸ ^{bc}	۱۵۵/۳ ± ۲/۶ ^c
	۶۵	۲۲۳/۳ ± ۱۳/۶ ^{cd}	۲۸۰/۳ ± ۷/۰۵ ^{cd}	۸۷ ± ۱۴/۲ ^c	۱۵۶/۳ ± ۲۰/۲ ^c
	۷۰	۱۹۰ ± ۱۵/۲ ^d	۲۱۱/۶ ± ۳۴/۹ ^d	۱۹۰ ± ۳۲/۱ ^a	۳۱۳/۳ ± ۲۰/۰۳ ^{ab}
عصاره توتون	۳۷۵	۴۷۴ ± ۸ ^a	۵۴۷/۵ ± ۷/۵ ^a	۳۵۶/۵ ± ۱۱/۵	۷۴۹ ± ۱
	۴۵۰	۴۵۰ ± ۵/۸ ^a	۵۳۲/۳ ± ۱۸/۰۲ ^a	۴۲۷ ± ۹۰/۵	۶۵۸/۶ ± ۱۲/۲
	۵۲۵	۴۲۴ ± ۱۴/۴ ^{ab}	۴۷۳/۳ ± ۳/۳ ^{ab}	۴۲۴/۳ ± ۵۵/۶	۶۲۰/۳ ± ۲۰/۸
	۶۰۰	۳۷۶/۶ ± ۱۳/۳ ^{bc}	۳۹۶/۶ ± ۳۲/۱ ^{bc}	۳۵۷ ± ۹۰/۰۱	۵۶۸ ± ۷۵/۴
	۶۷۵	۳۳۰/۳ ± ۱۷/۳ ^c	۳۷۶/۶ ± ۲۱/۸ ^{bc}	۲۳۶ ± ۱۵/۵	۵۷۰ ± ۱۷/۳
	۷۰۰	۲۵۱ ± ۹/۵ ^d	۳۳۶/۶ ± ۱۸/۵ ^c	۳۲۸/۶ ± ۳۹/۰۷	۶۰۵/۳ ± ۴۲/۸

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین‌غلظت‌های مختلف هر گروه است (p < ۰/۰۵) (n = ۱۵ برای هر تیمار).

آزمایش دوم

شاخص‌های خون‌شناسی

تفاوت معناداری در میزان WBC، RBC، Hb و Hct بین تیمارهای آزمایش مشاهده شد (جدول ۲)، به‌طوری‌که میزان RBC، Hb و Hct در ماهیان قرار گرفته در معرض MS222، نسبت به گروه شاهد و توتون به‌صورت معناداری پایین‌تر بود (p < ۰/۰۵)، و بین گروه شاهد و ماهیان بیهوش شده با توتون در شاخص‌های فوق تفاوت معناداری مشاهده نشد. میزان WBC در تیمار توتون نسبت به دیگر تیمارها به‌صورت معناداری بالاتر بود. میزان MCHC بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معناداری را نشان

نداد (جدول ۲؛ p > ۰/۰۵)، درحالی‌که کاهش معناداری در میزان MCV و MCH در گروه MS222 نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد (p < ۰/۰۵). اختلاف معناداری در میزان لنفوسیت، ائوزینوفیل و نوتروفیل در بین تیمارهای آزمایش مشاهده شد (p < ۰/۰۵)، درحالی‌که مونوسیت تفاوت معناداری را نشان نداد (جدول ۲؛ p > ۰/۰۵). پایین‌ترین میزان لنفوسیت در ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون مشاهده شد (p > ۰/۰۵). از طرفی دیگر، تیمار MS222 بالاترین میزان ائوزینوفیل را نشان داد (p > ۰/۰۵). بالاترین میزان نوتروفیل در تیمار عصاره توتون مشاهده گردید.

جدول ۲ میانگین (\pm خطای استاندارد) شاخص‌های خون شناسی بچه‌ماهی استرلیاد، بلافاصله پس از قرارگیری در معرض استرس و بیهوشی با MS-222 و عصاره توتون.

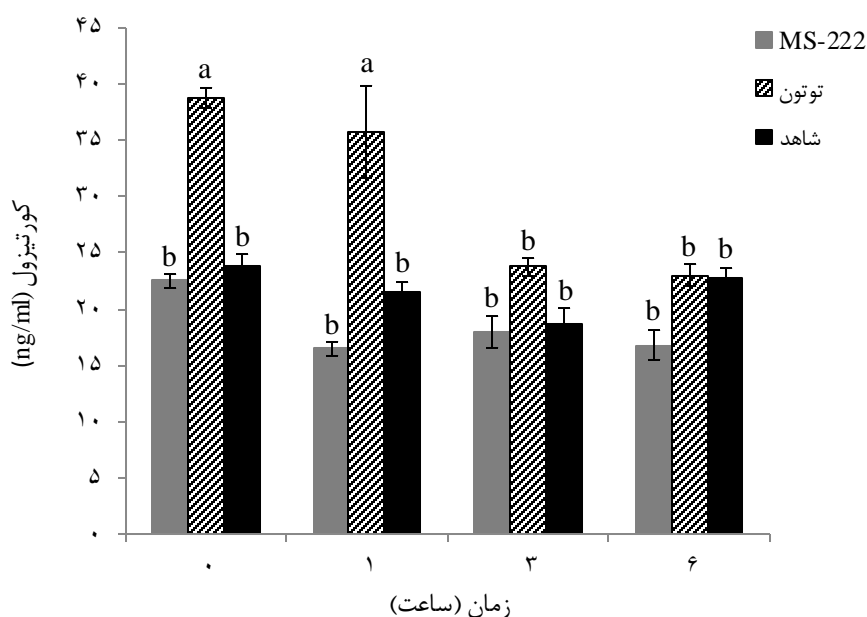
شاخص‌های هماتولوژیک	MS-222 (۶۰)	عصاره توتون (۶۵)	شاهد
WBC ($\times 10^3$ cell/mm ³)	۵/۵۳ \pm ۰/۶۹ ^b	۸/۳۳ \pm ۰/۲۲ ^a	۵/۶ \pm ۰/۱۸ ^b
RBC ($\times 10^3$ cell/mm ³)	۷۵۰/۰ \pm ۶/۴ ^b	۸۷۸/۸ \pm ۱۲/۳ ^a	۸۸۲/۵ \pm ۱۳/۲ ^a
Hb (g/dL)	۵/۸۸ \pm ۰/۰۳ ^b	۷/۴۸ \pm ۰/۰۷ ^a	۷/۴ \pm ۰/۱ ^a
Hct (%)	۲۲/۶۶ \pm ۰/۲۱ ^b	۲۹/۰ \pm ۰/۴۴ ^a	۲۸/۶ \pm ۰/۳ ^a
MCV (fl)	۳۰۲/۰ \pm ۰/۶۳ ^b	۳۲۹/۸۳ \pm ۵/۴۴ ^a	۳۲۴/۵ \pm ۱/۸ ^a
MCH (pg/cell)	۷۸ \pm ۰/۳۶ ^{ab}	۸۴/۸۳ \pm ۰/۷۴ ^a	۸۴/۱ \pm ۰/۳ ^a
MCHC (g/dl)	۲۵/۹۱ \pm ۰/۱۵	۲۵/۷۸ \pm ۰/۲۲	۲۵/۹ \pm ۰/۱
لنفوسیت (درصد)	۶۹/۰ \pm ۰/۵۱ ^a	۶۴/۶۶ \pm ۱/۱۵ ^{ab}	۶۷/۸ \pm ۰/۶ ^a
نوتروفیل (درصد)	۲۵/۸۳ \pm ۰/۶۰ ^b	۳۱/۳۳ \pm ۰/۷۱ ^a	۲۷/۶ \pm ۰/۳ ^b
مونوسیت (درصد)	۲/۶۶ \pm ۰/۳۳	۳/۳۳ \pm ۰/۳۳	۳/۱ \pm ۰/۱
ائوزینوفیل (درصد)	۲/۱۶ \pm ۰/۱۶ ^a	۰/۶۶ \pm ۰/۳۳ ^b	۰/۶ \pm ۰/۳ ^b

حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌ها است ($p < 0.05$) ($n = 24$ برای هر تیمار).

شاخص‌های بیوشیمیایی

زمان صفر و یک مشاهده شد، درحالی‌که بین سایر گروه‌های آزمایشی اختلاف معناداری در غلظت کورتیزول در زمان‌های مختلف وجود نداشت.

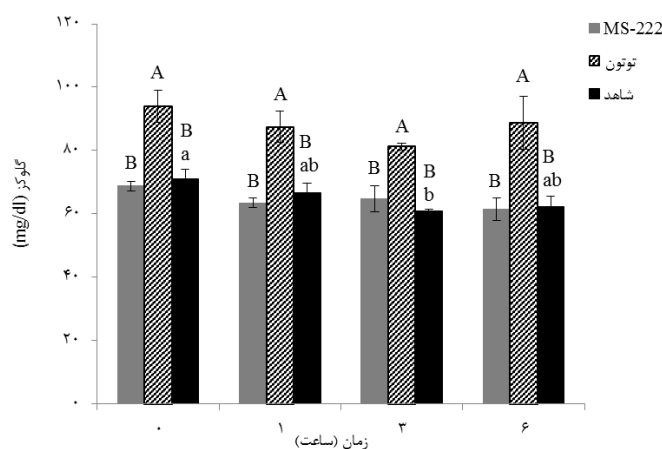
تغییرات غلظت کورتیزول تحت تأثیر برهمکنش زمان و تیمار بود (شکل ۱؛ $p < 0.05$). بیشترین میزان کورتیزول به طور معناداری در ماهیان بیهوش‌شده با عصاره توتون در



شکل ۱ روند تغییرات کورتیزول پس از بیهوشی با عصاره توتون و MS-222 و تیمار شاهد در بجهماهی استرلیاد در زمان‌های متفاوت نمونه برداریدر طول دوره آزمایش. حروف کوچک بیانگر اختلاف معنادار بین میانگین تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف صفر، ۱، ۳ و ۶ ساعت است ($p < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند ($n = 24$ برای هر تیمار).

گلوکز در تیمار عصاره توتون MS-222 در طول دوره آزمایش معنادار نبود ($p > 0.05$). تنها گروه شاهد اختلاف معناداری را در میزان گلوکز در طول زمان نشان دادند، به طوری که حداقل آن در ۳ ساعت بعد مشاهده شد ($p < 0.05$) و در سایر زمان‌ها تفاوت معناداری نداشت.

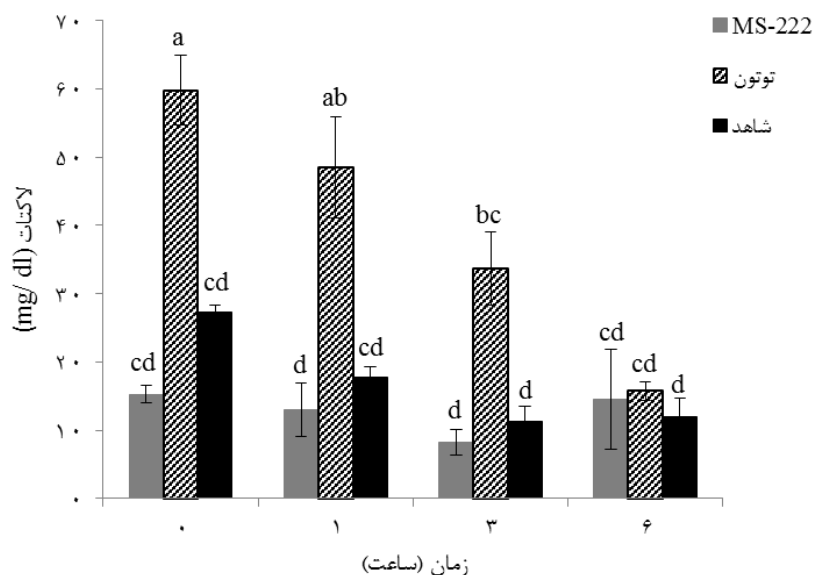
برهمکنش زمان و تیمار تأثیر معناداری بر روی غلظت گلوکز نداشت (شکل ۲؛ $p > 0.05$). در تمام زمان‌ها شامل زمان صفر، ۱، ۳ و ۶ ساعت بالاترین میزان گلوکز متعلق به تیمار عصاره توتون بود ($p < 0.05$)؛ در حالی که اختلاف معناداری بین ماهیان بیهوش شده با MS-222 و تیمار شاهد در تمام زمان‌های نمونه برداری مشاهده نشد. تغییرات دوره‌ای غلظت



شکل ۲ روند تغییرات گلوکز پس از بیهوشی با عصاره توتون و MS-222 و تیمار شاهد در بجهمایی استرلیاد در زمان‌های متفاوت نمونه‌برداری در طول دوره آزمایش. حروف بزرگ بیانگر اختلاف معنادار در یک زمان نمونه‌گیری بین تیمارهای مختلف ($p < 0.05$) و حروف کوچک بیانگر اختلاف معنادار بین میانگین‌های یک تیمار در طول آزمایش است ($p < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند ($n = 24$ برای هر تیمار).

زمان صفر مشاهده شد و کمترین میزان آن در ماهیان بیهوش شده با MS-222 در زمان ۱ و ۳، و تیمار شاهد در زمان‌های ۳ و ۶ مشاهده شد.

تغییرات غلظت لاکتات تحت تأثیر برهمکنش زمان و تیمار بود (شکل ۳؛ $p < 0.05$). بیشترین میزان لاکتات به طور معناداری در ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون در



شکل ۳ روند تغییرات لاکتات پس از بیهوشی با عصاره توتون و MS-222 و تیمار شاهد در بجهمایی استرلیاد در زمان‌های متفاوت نمونه‌برداری در طول دوره آزمایش. حروف کوچک بیانگر اختلاف معنادار بین میانگین تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف صفر، ۱، ۳ و ۶ ساعت است ($p < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند ($n = 24$ برای هر تیمار).

غلظت Hct، RBC، و Hb پس از قرارگیری در معرض 2-phenoxxyethanol مشاهده شد. درحالی که تغییری در میزان Hct در ماهی آزاد اطلس (*Salmosalar*) بیهوش شده با MS-222، بنزوکایین و اسانس گل میخک از شروع تا پایان آزمایش و همچنین بین تیمارها مشاهده نشد (Keissling et al., 2009). اختلاف در شاخص های هماتولوژیکین مطالعات مختلف ممکن است به دلایلاستفاده از مواد بیهوشی مختلف، گونه های مختلف و شرایط آزمایش باشد. کاهش فعالیت های تنفسی ناشی از بیهوشی نیز ممکن است دلیلی بر نوسان شاخص های هماتولوژیک باشد (Iwama et al., 1989; Thomas and Robertson, 1991; Holloway et al., 2004) و تفاوت های میان گروه ها ممکن است با سطوح متغیر کاهش نرخ تنفس مرتبط باشد؛ اگرچه تحقیقات بیشتری برای درک سازوکار اساسی پاسخ های مشاهده شده لازم است. تغییر در میزان شاخص های هماتولوژیک می تواند در پاسخ به آزاد شدن هورمون های استرسی باشد که سبب تورم و یا تغییر در تعداد اریتروسیت ها می شود (Wendelaar Bonga, 1997; Tort et al., 2002). در بررسی حاضر، میزان WBC در دو تیمار شاهد و MS-222 نسبت به تیمار توتون کاهش معناداری یافت. کاهش در میزان WBC، عمدتاً لوکوسیت، پاسخ معمول به استرس در ماهی است (Wedemeyer et al., 1990) که با آزاد شدن اپی نفرین در شرایط استرس همراه است و ضعف سیستم ایمنی را نشان می دهد (Adeyemo, 2007).

باوجود گزارش مطالعات مختلف درخصوص تأثیر استفاده از مواد بیهوشی در کاهش استرس ناشی از اسارت و دستکاری (Davis and Griffin, 2004; Iversen et al., 2003; Small, 2004)، بعضی مطالعات دیگر نشان داده اند که قرارگیری در معرض مواد بیهوشی از طریق اثرگذاری بر روی غدد درون ریز (Oyama and Wakayama, 1998)، سبب القای استرس به ماهی می شوند (Davidson et al.,

رنگین کمان با استفاده از MS-222، ۱۰۰ mg/l پیشنهاد شد (Kolanczyk et al., 2003). این تغییرات ممکن است به دلیل تفاوت در عوامل محیطی مثل شوری، pH، دمای آب و سطح اکسیژن باشد؛ همچنین غلظت بهینه ممکن است در بین و درون گونه ها تغییر کند (Sylvester and Holland, 1982).

مواد بیهوشی می توانند موجب آزاد شدن هورمون های استرسی شوند که این موضوع سبب تورم اریتروسیت ها می شود و به دنبال آن طحال اریتروسیت های جدید را به خون آزاد کند (Wendelaar Bonga, 1997; Tort et al., 2002). تغییر در تعداد اریتروسیت ها می تواند سبب تغییر در میزان RBC، Hct و Hb در ماهیان قرار گرفته در معرض استرس باشد (Wedemeyer et al., 1990; Iwama et al., 1995) که به دنبال آن تغییر در میزان شاخص های هماتولوژیک شامل MCV، MCHC، و MCH را موجب خواهد شد. این تغییرات به عنوان راهبرد احتمالی محسوب می شود تا اکسیژن لازم را در پاسخ به شرایط استرسی مهیا کند (Caruso et al., 2005). در مطالعه حاضر، انتظار می رود که تیمار شاهد بیشترین پاسخ استرسی را نسبت به سایر تیمارها ایجاد کند، از آنجایی که عملیات خونگیری بدون استفاده از مواد بیهوشی انجام شد و ماهی در معرض استرس قرار گرفت. تیمار MS-222 کاهش معناداری را در میزان RBC، Hb و Hct نسبت به تیمار شاهد و توتون نشان دادند و به دنبال آن تغییر در میزان شاخص های خونی MCV و MCH بین تیمارها مشاهده شد. در مطالعه انجام شده در فیل ماهی (*Husohuso*) غلظت Hb و میزان RBC به میزان اندکی پس از قرارگیری در معرض استرس دستکاری و شرایط اسارت افزایش یافت، اما معنادار نبود و همچنین تغییری در میزان Hct مشاهده نشد (Falathkar et al., 2009). از طرفی در مطالعه دیگر از سوی Shalvei و Hedayati (۲۰۱۲) بر روی فیل ماهی، افزایش اندکی در

Barton and Iwama,) گزارش شده است (۲۰۰ ng/ml (1991)، درحالی که در بررسی حاضر، حداکثر میزان کورتیزول آزاد شده ۳۸/۷۵ng/ml در ماهیان بیهوش شده با توتون مشاهده شد. در مطالعه انجام شده از سوی Falahatkar و Barton (۲۰۰۷) سطح کورتیزول پلاسما در فیل ماهی در معرض عوامل استرس‌زای متعدد از ۱۱ تا ۱۵ng/ml افزایش یافت. مطالعات پیشین (Barton et al., 2000; Falahatkar and Barton, 2007; Falahatkar et al, 2009; Falahatkar and Poursaeid, 2012) نشان داده‌اند که تاس ماهیان به نسبت در برابر استرس مقاوم هستند. عوامل مختلفی شامل تفاوت در ظرفیت پاسخ‌های فیزیولوژیک و میزان حساسیت درونی، تفاوت‌های آناتومی در بافت بینکلیوی، مسئول پاسخ‌های کورتیکوستروئیدی پایین در بعضی گونه‌های تاس ماهیان در مقایسه با ماهیان استخوانی سبب این موضوع می‌شود (Barton et al., 2000). تغییر معناداری در سطح گلوکز پلاسما تنها در تیمار شاهد در زمان صفر مشاهده شد، درحالی که تیمارهای دیگر تفاوتی را در غلظت گلوکز در طول دوره آزمایش نشان ندادند. افزایش سریع در غلظت گلوکز پلاسما ماهیان بیهوش شده، به واسطه آزاد شدن کاتکول آمین‌ها به عنوان پاسخ استرسی ثانویه در پاسخ به کاهش اکسیژن‌رسانی و قطع تنفس رخ می‌دهد (Gingerich and Drottar, 1989; Iwama et al., 1989). در مطالعه Sattari و همکاران (۲۰۰۹) تغییری در غلظت گلوکز پلاسما در قزل‌آلای رنگین کمان قرار گرفته در معرض MS-222 مشاهده نشد که در توافق با یافته‌های مطالعه حاضر بود. از آنجا که عملکرد اصلی سیستم عصبی مرکزی حفظ تعادل است، دلایل عدم مشاهده تغییر در سطوح گلوکز می‌تواند به این دلیل باشد که ماهی به سرعت ذخایر انرژی را تحت شرایط استرس مصرف می‌کند (Martinez-Porchas et al., 2009).

2000; Davis and Griffin, 2004; Kiessling et al., 2009). این امر از طریق سطوح افزایش یافته کورتیزول پلاسما ارزیابی می‌گردد (Zahl et al., 2010)، به طوری که تحت شرایط استرس، Adrenocorticotrophic hormone ترشح شده از هیپوتالاموس به قسمت قدامی کلیه وارد شده و با تحریک سلول‌های بین کلیوی سبب ترشح کورتیزول می‌شود (Kubilay and Ulukay, 2002) و در ماهی اغلب به عنوان پاسخ اولیه به استرس در نظر گرفته می‌شود (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002). در مطالعه حاضر بالاترین میزان کورتیزول آزاد شده در ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد که در زمان صفر و یک ساعت بعد اتفاق افتاد. غلظت کورتیزول اگرچه در ماهیان بیهوش شده با MS-222 و در تیمار شاهد، در طول زمان‌های مختلف معنادار نبود، اما برای هر دو تیمار در زمان صفر در بالاترین حد خود قرار داشت. افزایش در سطح کورتیزول در بسیاری از گونه‌های ماهیان شامل قزل‌آلای رنگین کمان، کاد اطلس (*Gadus murhua*)، قنات سرچرب (*Pimephales promelas*)، گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) و هالیبوت اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) (Pirhonen and Schreck, 2002; Wagner et al., 2003; Small, 2004; Palić et al., 2006; Zahl et al., 2010) مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. در واقع افزایش در سطح کورتیزول در مطالعه حاضر نوعی پاسخ اولیه به استرس محسوب می‌شود و از آنجایی که در تیمار عصاره توتون این پاسخ استرسی بیشتر بود، بیهوشی با عصاره توتون سبب بروز استرس در ماهیان می‌شود. میزان کورتیزول آزاد شده در پاسخ به استرس در بین گونه‌ها و درون گونه‌ها به میزان زیادی تغییر می‌کند (Barton and Iwama, 1991; Barton, 2000). غلظت کورتیزول در آزاد ماهیان تحت استرس حاد بین ۱۰۰ تا

ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون مشاهده نشد. به طور کلی تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تأثیر فیزیولوژیک با بیهوشی عصاره توتون نسبت به MS-222 بیشتر بود، بنابراین MS-222 کارایی بهتری را در بیهوشی کامل و برگشت از آن نسبت به عصاره توتون داشت و برای استفاده در فعالیت‌های مختلف که همراه با استرس می‌باشند اثر کمتری بر روی ماهی می‌گذارد و می‌تواند در ماهیان خاویاری بدون آثار و جنبه‌های منفی به کار رود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولان و کارکنان محترم مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر، به ویژه از آقای مهندس عباس علیزاده و همچنین از تمامی همکارانی که ما را در اجرای این پروژه یاری رساندند، کمال تشکر را داریم.

منابع

Abtahi, B., Sharifpour, A., Aghajanpour, M., Rasouli, A., Faghihzadeh, S., Omibbeigi, R. and Nazari, R.M. 2002. Comparison of LC50 of clove oil and MS222 in Persian sturgeon, rainbow trout and common carp. *Iranian Journal of Fishery Science*, 3: 8-10.

Adeyemo O.K. 2007. Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7: 163-169.

Agokei, O.E. and Adebisi, A.A. 2010. Tobacco as an anesthetic for fish handling procedures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 1396-1399.

Alishahi, M., Akbari, N., Jalali, M.R. and Naddaf, H. 2014. Comparison on the effects of clove oil, MS222, and 2-phenoxy ethanol on the haematological parameters of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Exploitation and Culture*, 1: 105-120.

Barton, B.A., Rahn, A.B., Feist, G., Bollig, H. and Schreck, C.B. 1998. Physiological stress responses of the freshwater chondrostean paddlefish

بالاترین سطح لاکتات پلازما در ماهیان بیهوش شده با توتون در زمان صفر مشاهده شد و کمترین میزان آن در ماهیان بیهوش شده با MS-222 در زمان ۱ و ۳ و تیمار شاهد در زمان‌های ۳ و ۶ مشاهده شد که نشان می‌دهد عصاره توتون پاسخ استرسی بیشتر را در ماهی ایجاد می‌کند. لاکتات به عنوان زیرمجموعه‌ای از فرایندهای گلوکونئوزنیز در بعضی از ماهیان است (Renaud and Moon, 1980) و معمولاً به عنوان شاخصی از متابولیسم غیرهوازی محسوب می‌شود (Virani and Rees, 2000). افزایش در غلظت لاکتات در ماهی آزاد اطلس (نام علمی) به دنبال بیهوشی با روغن گل میخک (Iverzen et al., 2003) و در فیل ماهی پس از قرارگیری در معرض استرس دستکاری و شرایط اسارت (Falahatkar et al., 2009) مشاهده شد. افزایش سطح لاکتات خون در نتیجه فعالیت تنفسی تحت شرایط بی‌هوازی اتفاق می‌افتد، به طوری که تحت چنین شرایطی منابع گلیکوژن تخلیه شده و لاکتات در بافت ماهیچه انباشته می‌شود (Milligan and Girard, 1993). بنابراین، زمانی که ماهی در معرض سایر مزاحمت‌های فیزیکی قرار می‌گیرد، مقدار لاکتات ممکن است افزایش یابد (Barton et al., 1998).

زمان القای بیهوشی و بازگشت از آن در ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون از زمان ایده‌آل بیشتر بوده و این ماده نتوانست بیهوشی و ریکاوری را در محدوده مجاز ایجاد کند. پاسخ استرسی ناشی از استفاده از مواد بیهوشی مختلف به میزان زیادی متفاوت است (Kiessling et al., 2009). به طوری که، براساس نتایج به دست آمده از شاخص‌های بیوشیمیایی، مقدار کورتیزول آزاد شده در ماهیان بیهوش شده با عصاره توتون در مقایسه با تیمار شاهد و MS-222 بیشتر بود که نشان می‌دهد عصاره توتون پاسخ استرسی بیشتری را القا می‌کند، اگرچه مرگومیری در

sedation by several anesthetics. *Aquaculture*, 233: 531-548.

Falahatkar, B. and 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.

Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M. and Barton, B. 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. *Journal of Fish Biology*, 75: 784-796.

Falahatkar, B. and Poursaeid, S. 2012. Stress responses of great sturgeon *Husohuso* subjected to husbandry stressors. *Aquaculture International*, 38: 1786-1789.

Feng, G., Zhuang, P., Zhang, L., Kynard, B., Shi, X., Liu, J. and 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.

Gholipour, H., Soltani, M. and Mirzargar, S.S. 2013. Effect of tricaine methanesulfonate (MS222), clove oil and electro-anaesthesia on respiratory burst activity in whole blood and serum alternative complement response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), during the narcosis stage. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 692-696.

Gingerich, W. H. and Drottar K. R. 1989. Plasma catechol-amine concentrations in rainbow trout (*Saimo quirdneri*) at rest and after anesthesia and surgery. *General and Comparative Endocrinology*, 73: 390-397.

Gullian, M. and Villanueva, J. 2009. Efficacy of tricaine methanesulphonate and clove oil as anaesthetics for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Research*, 40: 852-860.

Harper, C. 2003. Status of clove oil and eugenol for anesthesia of fish. *Aquaculture Magazine*, 29: 41-42.

Hassal, K.A. 1982. The chemistry of pesticides. Macmillan Press, London, UK, 372 p.

Holloway, A.C., Keene, J.L., Noakes, D.G. and Moccia, R.D. 2004. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquaculture Research*, 35: 1025-1030.

Hoseini, S.M. and 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.

Houston, A.H. 1990. Blood and circulation. pp. 273-334. In C. B. Schreck and P. B. Moyle (ed.),

(*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120A: 355-363.

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.

Barton, B.A. and 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.

Barton, B.A., Bollig, H., Hauskins, B.L. and Jansen, C.R. 2000. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid shovelnose (*S. albus* × *platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126A: 125-134.

Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L. and 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.

Bayunova, L., Barannikova, I. and Semenkov, T. 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 397-404.

Caruso, G., Genovese, L. and Marciolo, G. 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.

Dacie, J.K. and Lewis, S.M. 1995. Practical Haematology. 8th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, London, UK. 609p.

Daisley, K.W. and Blaxhall, P.C. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5: 771-781.

Danlop, R. and Laming, P. 2005. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carrasius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Pain*, 6: 561-568.

Davidson, G.W., Davie, P.S., Young, G. and Fowler, R.T. 2000. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUI-STM. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31: 105-114.

Davis, K.B. and Griffin, B.R. 2004. Physiological responses of hybrid striped bass under

- Milligan, C.L. and Girard, S.G. 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 180: 175-193.
- Mitjana, O., Bonastre, C., Insua, D., Flaceto, M.V., Esteban, J., Josa, A. and Espinosa, E. 2014. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetics agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllumsalare*). *Aquaculture*, 433: 491-495.
- Mylonas, C.C., Cardinaletti, G. and Sigelaki, I. 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: 467-481.
- Neumeke, B., Schwartz, W. and Stämpfli, R. 1981. Block of Na channels in the membrane of myelinated nerve by benzocaine. *European Journal of Physiology*, 390: 230-236.
- Oyama, T. and Wakayama, S. 1988. The endocrine responses to general anesthesia. *International Anesthesiology Clinics*, 26: 176-181.
- Palić, D., Herolt, D.M., Andreasen, C.B., Menzel, B.W. and 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.
- Pirhonen, J. and 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.
- Redding, J.M., Schreck, C.B., Birks, E.K. and 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.
- Řehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout. *Aquaculture*, 190: 27-47.
- Renaud, J.M. and Moon, T.W. 1980. Characterisation of gluconeogenesis in hepatocytes reptiles. *American Zoologist*, 13: 67-69.
- Ross, G.L. and Ross, B. 2008. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, UK, 222 p.
- Sattari, A., Mirzargar, S.S., Abrishamifar, A., Lourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H.E. Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.
- Imanpour, M.R., Bagheri, T. and Hedayati, A.A. 2010. The Anesthetic Effects of Clove Essence in Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*. *World Journal of Fishery and Marine Science*, 2: 29-36.
- Iverzen, M., Finstad, B., McKinley, R.S. and 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.
- Iwama, G.K. and Ackerman, P.A. 1994. Anaesthesia. pp. 1-17. In P. W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds), *Biochemistry and Molecular Biology, Analytical techniques*. Amsterdam, Netherlands, Elsevier.
- Iwama, G.K., McGeer, J.C. and 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.
- Iwama, G.K., Morgan, J.D. and Barton, B.A. 1995. Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. *Aquaculture Research*, 26: 273-282.
- Kiessling, A., Johansson, D., Zahl, L.H. and Samuelsen, O.B. 2009. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture*, 286: 301-308.
- Kolanczyk, R.C., Fitzsimmons, P.N., McKim, J.M., Erickson, R.J. and Schmieder, P.K. 2003. Effects of anesthesia (tricaine methanesulfonate, MS222) on liver biotransformation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 64: 177-184.
- Kori-siakpere, O. and Oviroh, E. O. 2011. Acute toxicity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on the African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Archives of Applied Science Research*, 3(2): 1-7.
- Kubilay, A. and Ulukay, G. 2002. The effect of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology*, 26: 249-254.
- Marking, L.L. and Meyer, F.P. 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10: 2-5.
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R. and Ramos-Enriquez, R. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Science*, 4: 158-178.

oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture*, 310: 369-375.

Virani, N. and Rees, B.B. 2000. Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126A: 397-405.

Wagner, T. and Congleton, J.L. 2003. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61: 1066-1107.

Weber, R.A., Peleterio, J.B., Garcia Martin, L.O. and 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.

Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. and McLeay, D.J. 1990. Stress and acclimation. pp. 451-489. In C. B. Schreck and P.B. Moyle (ed), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.

Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.

Williot, P., Brun, R., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D. and Ludwig, A. 2005. Artificial spawning in cultured Sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus* L., with special emphasis on hermaphrodites. *Aquaculture*, 246: 263-273.

Zahl, LH, Kiessling, A., Samuelsen, O.B. and Olsen, R.E. 2010. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 719-730.

Zahl, LH, Samuelsen, O. and Kiessling, A. 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 201-218.

Zargham, D., Sharif-Rouhani, M., Falahat-Naserabadi, A. and Bashti, T. 2013. Investigation of anesthetizing effect of tobacco (*Nicotiana tabacum*) aqueous and alcoholic extract on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Science*, 4: 33-40. (In Persian)

and Niasari, A. 2009. Comparison of electroanesthesia with chemical anesthesia (MS222 and clove oil) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using plasma cortisol and glucose responses physiological stress indicators. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4: 306-313.

Shaluei, F. and 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.

Sharifpour, A., Soltani, M., Abdolhay, H. and 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.

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.

Soto, C.G. and Burhanuddin, G. 1995. Clove oil as a fish anesthetic for measuring length and squid axon membranes. *European Journal of Pharmacology*, 33: 313-317.

Stoskopf, M. 1993. Anaesthesia. pp. 161-167. In L. Brown (ed), *Aquaculture for Veterinarians*. Fish Husbandary and Medicine, New York, Pergamon Press.

Sylvester, J.R. and Holland, L.E. 1982. Influence of temperature, water hardness, and stocking density on MS-222 response in three species of fish. *The Progressive Fish-Culturist*, 44: 138-141.

Thomas, P. and 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.

Tort, L., Puigcerver, M., Crespo, S. and Padrós, 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.

Velisek, J., Stara, A., Li, Z.H., Silowska, S. and Turek, J. 2011. Comparison of effects of four anaesthetics on blood chemical profiles and



Efficacy of MS-222 and tobacco extract and their effect on physiological changes in juvenile Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*)

Khayyam Delafkar¹, Masoud Sattari², Hossein Khara³, Bahram Falahatkar^{*2}

1-M.Sc. Graduated student, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran

2- Associate Prof., Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran

3- Assistant Prof., Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, Islamic Azad University of Lahijan, Lahijan

Received :13.08.2015

Accepted: 30.10.2017

*Corresponding author: falahatkar@guilan.ac.ir

Abstract

The efficacy of tobacco extract at concentrations of 375, 450, 525, 600, 675, and 750 mg/l and MS-222 at concentrations of 45, 50, 55, 60, 65 and 70 mg/l was experimented in triplicates on juvenile sterlet, *Acipenser ruthenus* (54 ± 0.7 g). In addition, the effect of these agents on hematological parameters and biochemical indices were compared. Results showed that the time of equilibrium loss or induced time of anesthesia was reduced by increasing the concentrations of these two agents, whereas time of recovery increased. Regarding the times of anesthesia and recovery, the optimal concentrations were selected as 675 mg/l and 60 mg/l for tobacco extract and MS-222, respectively. There was a significant decrease in hematocrit, hemoglobin and number of red blood cells for all treatments compared to control group ($p < 0.05$); then, significant changes were observed in the mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin ($p < 0.05$). Also, white blood cells, neutrophil, lymphocyte, and eosinophil changed significantly among the treatments ($p < 0.05$). A significant increase in plasma cortisol was observed immediately after induction for all treatments, then decreased from start to the end ($p < 0.05$). Only fish exposed to handling stress indicated significant change in glucose concentration. On the other hand, lactate concentration indicated a significant decreasing trend for both tobacco extract and handling stress, the maximum level of which occurred immediately after induction ($p < 0.05$). Overall, considering the lower changes in biochemical indices for fish anesthetized with MS-222 compared to tobacco extract, it appears MS-222 had lower physiological responses in juvenile sterlet, and therefore would be recommended.

Keywords: Anesthesia, Sterlet, Tobacco extract, MS-222, Stress