شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۲۲۱-۲۰۹

مقایسهٔ کارایی بیهوشی با گل میخک، پروپوفول و روش الکتریکی بر مدت زمان و بازگشت از بیهوشی و تأثیر آن بر برخی پاسخ‌های ایمنی و فیزیولوژیک فیل ماهی (*Huso huso*)

امین آوازه[۱]، امیر رضا عابد علم‌دوست[۲*]، علیرضا میرواقفی[۳]، مهدی سلطانی[۴]

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۴. استاد گروه آموزشی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۱

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی و مقایسهٔ اثر گل میخک، مادهٔ شیمیایی پروپوفول و روش الکتریکی بر مدت زمان و بازگشت از بیهوشی و تأثیر آن بر برخی پاسخ‌های ایمنی و فیزیولوژیک فیل ماهی (*Huso huso*) انجام گرفت. بدین‌منظور، ۲۷۰ قطعه فیل ماهی در ۱۲ عدد ونیرو به‌صورت کاملاً تصادفی ذخیره‌سازی شدند. به‌منظور القای بیهوشی در ماهیان، حمام ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک، ۵ میلی‌گرم در لیتر پروپوفول و دستگاه الکتروشوکر در نظر گرفته شد. در هر تیمار بلافاصله پس از رسیدن ماهیان به مرحلهٔ بیهوشی، مدت زمان بیهوشی و زمان بازگشت از آن به‌طور جداگانه ثبت و با هم مقایسه شدند. همچنین برای بررسی اثرات بیهوشی بر ماهی، شاخص‌های خونی (شمارش گلبول قرمز، شمارش گلبول سفید، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت)، شاخص‌های ایمنی (لیزوزیم و فعالیت همولیتیک کمپلمان) و شاخص استرس (گلوگز و کورتیزول) در تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی شاخص های هماتولوژی، بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار الکتروشوکر مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها داشت و کمترین آن مربوط به تیمار پودر گل میخک بود ($P<۰/۰۵$). بیشترین مقدار هماتوکریت در تیمار الکتروشوکر و کمترین آن در تیمارهای پروپوفول و پودر گل میخک مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). نتایج شاخص‌های ایمنی نشان داد بیشترین میزان لیزوزیم و فعالیت کمپلمان ACH50 در تیمار الکتروشوکر و کمترین آن مربوط به تیمار پروپوفول و پودر گل میخک بود ($P<۰/۰۵$). همچنین نتایج شاخص‌های استرس حاکی از آن بود که بیشترین مقدار گلوگز و کورتیزول در تیمار گل میخک و کمترین آن نیز در تیمار الکتروشوکر اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق با توجه به شاخص‌های ایمنی و استرس وارد شده به ماهی نشان داد که بیهوشی فیل ماهی با روش الکتریکی بهتر از روش گل میخک و پروپوفول بود. از این رو بیهوشی الکتریکی که روشی سریع، ارزان و سازگار با محیط زیست است می‌تواند جایگزین مناسبی برای بیهوشی با مواد شیمیایی باشد.

واژگان کلیدی: بیهوشی الکتریکی، پروپوفول، گل میخک، کورتیزول، لیزوزیم

* نویسنده مسئول: امیر رضا عابد علم‌دوست
Email: amirabed@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 2, Summer 2023
pp. 209-221

Comparing the efficiency of anesthesia with clove, propofol and electric method on the duration and return from anesthesia and its effect on some immune and physiological responses in the beluga (*Huso huso*)

Amin Avazeh[1], Amireza Abed Elmdust[2*], Alireza Mirvaghefi[3], Mehdi Soltani[4]

1. Ph.D student, Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Professor, Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
4. Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

Received: 12-Sept-2022 **Accepted: 02-Dec-2022**

Abstract

This study was conducted in order to investigate and compare the effect of cloves, propofol and electrical methods on the duration and recovery from anesthesia and their effects on some immune and physiological responses in beluga (*Huso huso*). The 270 beluga fish were randomly stored in 12 tanks. To induce anesthesia, a bath of 300 mg/L of clove powder, 5mg/L of propofol and an electroshock device were used as experimental treatments. In each treatment, immediately after the fish reached the stage of anesthesia, the duration of anesthesia and the recovery time were recorded separately and compared. The treatments were also evaluated for the anesthetic effects on the blood indices (red blood cell count, white blood cell count, hemoglobin concentration and hematocrit percentage), immune parameters (lysozyme and ACH50) and stress parameters (glucose and cortisol). In the examination of hematological indices, the highest level of hemoglobin was obtained in the electroshock treatment, which was significantly different from other treatments, and the lowest was related to clove powder treatment (P<0.05). The highest content of hematocrit was observed in the electroshock treatment and the lowest value was measured in the propofol and clove powder treatments (P<0.05). The results of immune parameters showed that the highest levels of lysozyme and ACH50 were in the electroshock treatment and the lowest values were in the clove powder treatment (P<0.05). Also, the results of stress indicators showed that the highest levels of glucose and cortisol were detected in the clove treatment and the lowest values were in the electroshock treatment. The results of this study revealed that the immune and stress indicators of the fish that underwent electrical anesthesia were better than the clove and propofol methods. Therefore, electrical anesthesia is a fast, cheap, eco-friendly method that can be a potential alternative to chemical anesthesia agents.

Key words: Electric Anesthesia, Propofol, Clove, Cortisol, Lysozyme

* Corresponding author: Amireza Abed Elmdust Email: amirabed@ut.ac.ir

۱. مقدمه

پیشرفت‌های اخیر صنعت آبزی‌پروری در اکثر نقاط جهان منجر به استفادهٔ بیشتر از مواد دارویی جدید شده است (Hoseini and Taheri Mirghaed, 2019; Zhu, 2020). به‌طوری‌که در سال‌های اخیر روغن‌ها یا عصاره‌های گیاهی (آبی، الکلی و هیدروالکلی) به‌عنوان منبع مهمی جهت استفاده از بیهوشی در آبزیان بکار گرفته می شوند (Tondolo *et al.*, 2013). بیهوشی یک ابزار مهم و ارزشمند در آبزی‌پروری مدرن و مدیریت شیلاتی است (Coyle *et al.*, 2004; Botrel *et al.*, 2017). داروهای بیهوش‌کننده با اهداف گوناگون در آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Tondolo *et al.*, 2013). استفاده از مواد بیهوش‌کننده، کارکردن با ماهی در طی تحقیقات را تسهیل می‌نماید همچنین کاربرد بیهوشی و تسکین در عملیات هایی مثل حمل و جابجایی، علامت گذاری، رقم‌بندی، تخم‌کشی از مولدین، وزن‌گیری، خونگیری، تزریقات هورمونی و دارویی، واکسینه نمودن، لقاح مصنوعی، طرح‌های پژوهشی و آزمایشات بالینی و به‌طور کلی هرگونه عملیات آبزی‌پروری ضروری است (Hamackova *et al.*, 2004; Palic *et al.*, 2006). در معرض قرار گرفتن استرس برای ماهی منجر به آثار مخربی در آبزیان نظیر بیماری و درنهایت مرگ می‌شود (Iwama *et al.*, 2004). استفاده از شیوه‌های گوناگون بیهوشی و تسکین در آبزی‌پروری وسیلهٔ مهمی است که باعث کاهش استرس در آبزیان شده و از ایجاد صدمات ناشی از حرکت آبزی در زمان بیهوشی جلوگیری می‌کند (Matin *et al.*, 2009; Maricchiolo and Genovese, 2011). با توجه به تنوع بالای استفاده از مواد بیهوشی در آبزیان و اهمیت آن در مراکز تکثیر و پرورش ماهی و امور تحقیقاتی، اطمینان از سلامت و تأثیرگذار بودن شیوه‌های مختلف از طریق ارزیابی عکس‌العمل ماهیان و بررسی اثرات پس از آن می‌تواند در کاهش خطرات احتمالی حاصل از این روش‌ها، مانند مرگ و میر و بهبود کاربرد آن تأثیرگذار باشد. پژوهشگران هنوز هم به‌دنبال دست یافتن به بیهوش‌کننده‌هایی اند که علاوه بر تأثیرگذار بودن، دارای کمترین اثرات جانبی روی میزبان بوده و همچنین ارزان و به‌راحتی در دسترس و قابل تهیه باشند و از همه مهم‌تر، دوستدار محیط زیست نیز باشند. بیهوشی عمومی با تأثیر بر گیرنده‌های عصبی، آزادسازی میانجی‌ها و یا تغییر قدرت تحریک‌پذیری غشاء سلولی موجبات اختلال همه جانبه را در سیستم اعصاب مرکزی فراهم می‌کند (Ross and Ross, 2008). درحقیقت، بیهوشی باید سریع انجام گردد و همراه حداقل افزایش فعالیت یا استرس‌های دیگر باشد. بنابراین، دارو یا روشی که مورد استفاده قرار می‌گیرد نباید طولانی باشد. باید استفاده آن سخت نبوده و شایستهٔ موضوع انتخاب شده باشد، عدم تحرک ایده‌آل را تأمین کند، تاثیرگذار، تند و قابل اطمینان باشد و به عدم تعادل بلندمدت و سایر معضلات منجر نشود. همچنین مادهٔ تسکین‌کننده باید به میزانی که استفاده می شود برای فرد بیهوش‌کننده بدون خطر باشد و نباید تحریک‌کننده و زیان‌آور باشد. همچنین بهتر است مواد شیمیایی در هنگام استفاده، فعالیت بیش از حد ماهی را سبب نشوند. مادهٔ مؤثر باید به آسانی در آب یا محلول آبی حل شود. دارو و حلال آن در میزان عمده به آسانی باید در دسترس و ارزان قیمت باشد (Adel *et al.*, 2016).

استرس ناشی از تغییر در شاخص های محیطی نیاز به تنظیم هموستاتیک بدن دارد که باعث تغییرات رفتاری و فیزیولوژیکی در آبزیان می‌شود (Barton, 2002; Souza *et al.*, 2019). بیهوشی به‌عنوان یک روش قابل استفاده برای جلوگیری از استرس در حیوانات آبزی برای مدت طولانی معرفی شده است (Taheri Mirghaed *et al.*, 2016; Mazandarani *et al.*, 2017). درکل، برای بیهوش کردن آبزیان از دو شیوه شیمیایی و فیزیکی استفاده می‌گردد (Ross and Ross, 2008). از روش الکتریکی معمولاً برای بیهوش کردن ماهیان به‌عنوان جایگزین روش های شیمیایی استفاده می‌شود (Ross and Ross, 2008). کاربرد روش الکتریکی برای بیهوشی و تسکین دادن ماهیان، نسبت به روش‌های شیمیایی می‌تواند دارای نقاط قوت از جمله عدم تولید

مواد آلاینده حاصل از مواد شیمیایی بیهوش کننده، کاربرد راحت، کاهش هزینه‌ها و مدت زمان بازگشت کوتاه باشد (Hudson *et al.*, 2011; Bowzer *et al.*, 2012). در بین داروهای شیمیایی بیهوشی، پودر گل میخک یکی از مواد گیاهی متداول در آبزی‌پروری است. میخک با نام علمی *Eugenia caryophyllata* به خانوادهٔ Myrtaceae تعلق دارد. عمده ترکیب فعال بیهوش‌کننده گل میخک، اوژنول با فرمول شیمیایی ($C_{10}H_{12}O_{12}$) است. اوژنول اثر بیهوشی شدیدی روی ماهی دارد (Hoskoen and Pirhonen, 2004). همچنین مادهٔ مؤثر اوژنول حلالیت خوبی در آب شیرین و آب دریا نیز دارد (Palic *et al.*, 2006). پروپوفول[2] نیز یک داروی شناخته شده برای بیهوشی در انسان و دامپزشکی است (Yamaky and Perriera, 2001). پروپوفول همچنین برای القای بیهوشی در خزندگان نیز استفاده شده است (Knotkova *et al.*, 2005). Yousefi و همکاران (۲۰۱۹)، میزان تغییر در استرس خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بیهوش شده با سیترونلال و لینالول[3] مقایسه با اوژنول را بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که اوژنول باعث افزایش سطح کورتیزول و گلوکز در ماهیان شده است. Zahran و همکاران (۲۰۲۰)، اثرات ماده‌های بیهوشی پروپوفول و اوژنول بر سلامت عمومی در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) را با هم مقایسه کردند. نتایج القاء بیهوشی همراه با بازگشت سریع را در گروه پروپوفول در مقایسه با گروه اوژنول نشان داد. گروه پروپوفول نسبت به گروه اوژنول افزایش قابل توجهی از شاخص های خون‌شناسی را نشان داد. افزایش قابل توجهی از گلوکز وکورتیزول، نسبت به سطح پایهٔ آن‌ها در حین بیهوشی در هر دو گروه مادهٔ بیهوش‌کننده با برگشت کامل در حین بهبودی مشاهده شد. Sattari و همکاران در (۲۰۰۹) به مقایسهٔ اثرات بیهوشی روش الکتریکی با بیهوشی ناشی از MS_{222}[4] و اسانس میخک بر سطوح کورتیزول و گلوکز پلاسما به‌عنوان نشانگرهای استرس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند. در نهایت استفاده از جریان الکتریسیته به‌عنوان روشی سریع، ارزان، سازگار با محیط زیست و در عین حال کم‌خطر برای کاربری معرفی گردید. Renault و همکاران (۲۰۱۱)، با مطالعهٔ اثر اوژنول و روش الکتریکی بر مارماهی (*Anguilla anguilla*) دریافتند که استفاده از بیهوشی الکتریکی به‌دلیل نداشتن اثرات منفی، مناسب‌تر است. بررسی بیومارکرهای استرس از لحاظ هورمونی (کورتیزول) و بیوشیمیایی (هموگلوبین، هماتوکریت و گلوکز) می‌تواند در یافتن یک داروی مناسب و بی‌خطر بسیار مؤثر باشد که در این تحقیق نیز جهت بررسی پاسخ‌های استرس مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین با توجه به اینکه گونهٔ فیل ماهی (*Huso huso*) یکی از مهمترین گونه های ماهیان خاویاری پرورشی در ایران است و تاکنون تحقیقات اندکی در خصوص مقایسهٔ استفاده از روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی و عصاره‌های گیاهی در فرآیند بیهوشی، تغییرات ایمنی و فیزیولوژیکی این ماهی با ارزش صورت نگرفته است. این بررسی با دستیابی به موارد ذکر شده می‌تواند احتمالاً اطلاعات کاربردی در خصوص تأثیر روش های مختلف بیهوشی و تأثیر آن بر برخی پارامترهای ایمنی و فیزیولوژیک این ماهی را در اختیار محققان شیلاتی و آبزی‌پروران قرار دهد.

۲. مواد و روش‌ها

این بررسی در زمستان سال ۱۴۰۰ در یکی از مزارع حومهٔ استان تهران انجام شد. تعداد ۲۷۰ قطعه فیل ماهی خاویاری با میانگین وزن ۹±۴۰۰ گرم، در ۳ تیمار و سه تکرار در ۹ عدد ونیرو (۳۰ ماهی در هر ونیرو ۲۰۰۰

[1] Eugenol
[2] Propofol
[3] Citronella and linalool
[4] Tricaine Methanesulfonate

لیتری) به صورت کاملاً تصادفی ذخیره سازی شدند. طی دورهٔ سازگاری، ماهی‌ها به‌مدت هفت روز با غذای اکسترود پایه ماهیان خاویاری ساخت کارخانهٔ کیمیاگران، غذادهی شدند. مواد شیمیایی و گیاهی استفاده شده جهت فرآیند بیهوشی، خون‌گیری و نمونه‌برداری شامل گل میخک، پروپوفول و الکتروشوکر با دستورالعمل مشخص بود. انتخاب دوزها و روش القای بیهوشی براساس نتایج تحقیقات قبلی روی برخی دیگر از گونه های ماهیان خاویاری انتخاب شد (Adel *et al.*, 2016).

۲.۱. القای بیهوشی و بازگشت از بیهوشی

ابتدا مخازن کوچک ۱۰۰ لیتری را با حجم مشخص از آب مزرعه آبگیری کرده و سپس برای القای بیهوشی از روش‌های زیر استفاده شد:

ماهیان با غلظت‌های بیهوشی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر گل میخک، ۵ میلی‌گرم در لیتر پروپوفول، استفاده از دستگاه الکتروشوکر مدل SAMUS 725 MS USER MANUAL (مطابق دفترچهٔ راهنما با فرکانس ۴۰ هرتز و توان ۱۲۰ وات) مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از بیهوش شدن کامل ماهیان مدت زمان آن‌ها ثبت و سپس به داخل مخازن حاوی آب تازه که هوادهی می‌گردید، انتقال یافتند و مدت زمان بازگشت کامل از بیهوشی توسط کرنومتر ثبت گردید.

۲.۲. نمونه برداری

به منظور بررسی شاخص های ایمنی و فیزیولوژیک از هر تکرار بطور تصادفی ۳ قطعه ماهی برای خون‌گیری و سایر پارامترهای مورد نیاز نمونه‌گیری شد. در حین بیهوشی، خون‌گیری با سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتر و با سوزن شمارهٔ ۲۰ از سیاهرگ دمی با زاویهٔ ۴۵ درجه صورت گرفت (Noori *et al.*,2010). نمونه‌های خون در لوله‌های فاقد مادهٔ ضدانعقاد و دارای مادهٔ ضد انعقاد خون (هپارین با غلظت ۵۰ واحد در میلی لیتر) قرار گرفت و در کنار یخ تا انتقال به آزمایشگاه نگهداری شدند.

۲.۳. اندازه‌گیری فاکتورهای خونی

گلبول‌های سفید و قرمز با محلول Lewis رقیق‌شده و توسط لام نئوبار شمارش شدند. اندازه‌گیری هموگلوبین بر حسب واحد گرم در دسی‌لیتر با استفاده از محلول درابکلین به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد. برای اندازه‌گیری هماتوکریت (درصد) از روش میکرو هماتوکریت به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه استفاده شد (V´azquez and Guerrero, 2007).

۲.۴. اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط Ellis در (۱۹۹۰) و Mohammadian و همکاران (۲۰۱۶) ، استفاده شد. برای این کار، ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزوداکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH=۵/۸) در گودهای میکروپلیت تخت دستگاه الایزا مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان ACH50 طبق روش Kumari و همکاران (۲۰۰۶) صورت گرفت. براساس این روش، گلبول های قرمز خرگوش سه بار با محلول بافر (حاوی ۱۰ میلی‌مولار EGTA، ۱۰ میلی‌مولار منیزیم کلرید و ۰/۱ درصد ژلاتین) شستشو شد و در غلظت ۲×۱۰^{۸} سلول/میلی‌لیتر از همان بافر دوباره غوطه‌ور شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول آماده شده به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰ درجه انکوبه شد. واکنش با افزودن ۱/۵۷ میلی‌لیتر بافر EDTA-GVB (۱۰ میلی‌مولار EDTA و ۰/۱ درصد ژلاتین) متوقف گردید و با دور ۱۶۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت در طول موج ۴۱۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد.

۲.۵. اندازه‌گیری شاخص‌های استرس

سنجش گلوکز به روش آنزیمی-کالریمتری (GOD-PAP) و با کیت تشخیصی پارس آزمون در طول موج ۵۴۶ نانومتر و اندازه‌گیری کورتیزول به روش رادیو ایمونواسی (RIA) و به‌وسیلهٔ دستگاه گاماکانتر اندازه‌گیری شد (Avella, 1990).

۲.۶. تجزیه و تحلیل آماری

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخهٔ ۲۱ صورت گرفت و برای مقایسهٔ میانگین ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با خطای ۵ درصد استفاده گردید. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۳ استفاده شد.

۳. نتایج

۳.۱. زمان القاء بیهوشی و بازگشت از آن

نتایج مقایسه مدت زمان القای بیهوشی و برگشت از آن در تیمارهای آزمایشی در جدول ۱ ارائه شده است. طولانی‌ترین مدت زمان بروز بیهوشی و از دست دادن تعادل در تیمار پودر گل میخک با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۲/۲۰±۰/۱۳ دقیقه) بود و کوتاه‌ترین آن نیز در تیمار الکتروشوکر (۰/۴۸±۰/۰۲ دقیقه) به‌دست آمد. همچنین طولانی‌ترین مدت زمان بازگشت از بیهوشی در تیمار الکتروشوکر (۱۴/۳۵±۱/۹۱ دقیقه) بود و کوتاه‌ترین آن نیز در تیمار پروپوفول با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد.

۳.۲. تغییرات شاخص های خونی

نتایج مربوط به ارزیابی تغییرات شاخص های خونی در جدول ۲ ارائه شده است. تعداد گلبول‌های قرمز دارای تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. بیشترین تعداد گلبول قرمز در تیمار الکتروشوکر و کمترین میزان آن در تیمار پودر گل میخک و پروپوفول مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). همچنین نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار الکتروشوکر مشاهده شد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها داشت و کمترین آن مربوط به تیمار پودر گل میخک بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- مقایسهٔ مدت زمان القای بیهوشی و برگشت از آن در تیمارهای آزمایشی.

	پروپوفول	گل میخک	الکتروشوکر
مدت زمان القای بیهوشی (دقیقه)	۱/۸۰±۰/۳۵^{b}	۲/۲۰±۰/۱۳^{a}	۰/۴۸±۰/۰۲^{c}
مدت زمان بازگشت از بیهوشی (دقیقه)	۸/۹۲±۰/۲۷^{c}	۱۱/۰۷±۰/۹۱^{b}	۱۴/۳۵±۱/۹۱^{a}

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

بیشترین مقدار هماتوکریت در تیمار الکتروشوکر و کم‌ترین آن در تیمارهای پروپوفول و پودر گل میخک مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین میانگین حجم گلبول قرمز (MCV) در تیمارهای پروپوفول و الکتوشوکر و کمترین در تیمار گل میخک، بیشترین میانگین هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) در تیمار الکتروشوکر کمترین آن در تیمار پودر گل میخک و بیشترین میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در تیمار الکتروشوکر و کمترین آن در تیمار پروپوفول مشاهده گردید. همچنین تفاوت معنی‌دار در تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف وجود داشت که بیشترین میزان آن در تیمار پودر گل میخک و پروپوفول و کمترین آن در تیمار الکتروشوکر مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). نتایج نشان داد بیشترین میزان لنفوسیت در تیمار الکتروشوکر و پروپوفول و کمترین آن در تیمار گل

میخک، بیشترین میزان مونوسیت در گل میخک و کمترین آن در تیمار الکتروشوکر، بیشترین میزان نوتروفیل در تیمار گل میخک و پروپوفول و کمترین آن در تیمار الکتروشوکر بود. همچنین در میزان ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P>0/05$).

جدول ۲- بررسی فاکتورهای خونی فیل ماهیان در تیمارهای آزمایشی.

	پروپوفول	گل میخک	الکتروشوکر
گلبول قرمز ($10^4 \times mm^3$)	۷۴/۱۰±۰/۱۴^{b}	۷۲/۵۵±۰/۷۸^{b}	۸۲/۶±۰/۱۴^{a}
هموگلوبین (g/dL)	۵/۸۵±۰/۰۶^{b}	۵/۷۰±۰/۱۰^{c}	۶/۸۰±۰/۰۷^{a}
هماتوکریت (٪)	۲۷±۱/۴۱^{b}	۲۶±۱^{b}	۳۱/۵۰±۰/۷۱^{a}
(FL) MCV	۳۷۸±۱^{a}	۳۶۵±۵/۶۶^{b}	۳۸۰/۵±۰/۷۱^{a}
(Pg) MCH	۷۸/۸۰±۰/۷۱^{ab}	۷۶/۲۰±۳/۸۲^{b}	۸۱/۰۵±۱/۰۶^{a}
(g/dl) MCHC	۲۰/۸۰±۰/۰۴۲^{b}	۲۱/۸۵±۰/۷۸^{ab}	۲۲/۶۰±۱/۲۷^{a}
گلبول سفید ($10^3 \times mm^3$)	۵/۳۳±۰/۰۲^{a}	۵/۴۵±۰/۰۷^{a}	۴/۱۳±۰/۰۴^{b}
لنفوسیت (٪)	۸۱±۱/۴۱^{a}	۷۸±۱^{b}	۸۲/۶۷±۱/۵۳^{a}
مونوسیت (٪)	۵±۰^{b}	۸±۱/۴۱^{a}	۳/۵±۰/۵۰^{c}
ائوزینوفیل (٪)	۰/۵۰±۰/۷۱^{a}	۱±۰^{a}	۰/۵۰±۰/۷۱^{a}
نوتروفیل (٪)	۱۴/۵±۰/۵۰^{a}	۱۴/۳۳±۰/۵۸^{a}	۱۲/۵±۰/۷۱^{b}

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P<0/05$).

۳.۳. پاسخ ایمنی

نتایج برخی شاخص‌های ایمنی در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین مقدار فعالیت لیزوزیم در ماهیان بیهوش‌شده با روش الکتریکی و کمترین سطح آن در تیمار پروپوفول اندازه‌گیری شد که دارای تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف بود ($P<0/05$). همچنین ماهیان بیهوش‌شده با روش الکتریکی به‌طور معنی‌داری فعالیت همولیتیک کمپلمان بالاتری نسبت به ماهیان سایر تیمارها داشتند ($P<0/05$). کمترین مقدار فعالیت همولیتیک کمپلمان در تیمارهای گل میخک و پروپوفول مشاهده گردید که بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$).

جدول ۳- مقایسهٔ شاخص‌های ایمنی در تیمارهای آزمایشی.

	پروپوفول	گل میخک	الکتروشوکر
لیزوزیم (U/ml/min)	۳۲/۳۳±۱/۱۵^{c}	۳۶±۱/۴۱^{b}	۴۵/۵۰±۱^{a}
فعالیت همولیتیک کمپلمان (mg/dl)	۱۲۳/۵۰±۲/۱۲^{b}	۱۲۱/۳۳±۲/۸۳^{b}	۱۳۳±۲/۸۳^{a}

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P<0/05$).

۳.۴. شاخص‌های استرس

نتایج شاخص‌های استرس در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج شاخص‌ها نشان داد بیشترین مقدار گلوگز و کورتیزول در تیمار گل میخک و کمترین آن در تیمار الکتروشوکر مورد سنجش قرار گرفته است.

جدول ۴- مقایسهٔ شاخص های استرس در تیمارهای آزمایشی

	پروپوفول	گل میخک	الکتروشوکر
گلوگز (mg/dl)	۵۶/۵۰±۲/۱۲^{b}	۶۴±۴/۲۴^{a}	۴۰/۵۰±۳/۵۴^{c}
کورتیزول (ng/ml)	۱۷۲±۱^{b}	۱۷۸/۳۳±۱/۵۳^{a}	۷۱±۲/۸۳^{c}

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد (P<۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

بیهوشی ابزار ارزشمندی است که سبب کاهش استرس در ماهیان شده و از ایجاد آسیب‌های فیزیکی ناشی از حرکت ماهی در طول دست‌کاری در حین زیست‌سنجی، رقم‌بندی و علامت‌گذاری، حمل و نقل، خونگیری، تعیین جنسیت، نمونه‌گیری بافتی و جمع‌آوری گامت‌ها جلوگیری می‌کند (Maricchiolo and Genovese, 2011). به‌طور کلی استفاده از روش های مختلف برای بیهوشی ماهیان به عوامل از جمله مرحلهٔ بیهوشی، گونه، اندازهٔ بدن، سلامتی، سن، مرحله زندگی و کیفیت آب بستگی دارد (Summerfelt and Smith, 1990). مطالعهٔ حاضر نشان داد بیهوشی با استفاده از سه روش گل میخک، پروپوفول و روش الکتریکی در فیل ماهیان خاویاری مؤثر بوده است. نتایج مقایسهٔ مدت زمان القای بیهوشی و برگشت از آن در روش‌های ذکر شده نشان داد استفاده از روش الکتریکی می‌تواند در مدت زمان القای بیهوشی ماهیان بسیار مفید و مؤثر واقع گردد. همچنین یکی دیگر از مزایای استفاده از الکتروشوکر در تکنیک‌های جدید در تولید تخم چشم‌زده تمام ماده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند حائز اهمیت باشد زیرا برای استحصال اسپرم، ماهیان نر XX در این روش باید کشته شوند و بیضه آن‌ها خارج گردد و این مدت زمان کوتاه در بیهوشی آن‌ها روی کیفیت اسپرم و سایر شاخص‌های دخیل نظیر استرس تأثیرگذار است. امروزه با توجه به کیفیت پایین بسیاری از برندهای پودر گل میخک در بازار و افزایش قیمت سه برابری این محصول و همچنین افزایش قیمت سایر بیهوش‌کننده‌های شیمیایی، در اکثر کار گاه های تکثیر و پرورش آبزیان استفاده از این محصولات جهت فرآیندهای یاد شده مقرون به صرفه نمی‌باشد. استفاده از دستگاه الکتروشوکر مدل SAMUS 725 MS USER MANUAL (مطابق دفترچه راهنما با فرکانس ۴۰ هرتز و توان ۱۲۰ وات) موجب القاء بیهوشی سریع ماهی و همچنین مدت زمان طولانی بازگشت از بیهوشی شد که این نتایج با یافته‌های Sattari و همکاران (۲۰۰۹)، مقایسهٔ اثرات بیهوشی روش الکتریکی و اسانس میخک، Renault و همکاران (۲۰۱۱)، با مطالعهٔ اثر اوژنول و روش الکتریکی بر مارماهی (*Anguilla anguilla*)، Trushenski و همکاران (۲۰۱۲) روی ماهی باس دهان بزرگ (*Micropterus salmoides*)، Henyey و همکاران (۲۰۰۲) روی ماهیان خاویاری مطابقت دارد. در تیمار پروپوفول مدت زمان القاء بعد از تیمار الکتریکی زودتر اتفاق افتاد و بازگشت از بیهوشی سریع‌تر از بقیه تیمارها بود. پروپوفول یک مادهٔ بیهوشی با اثر فوق العاده کوتاه است که روی گیرنده‌های GABA[1] در سیستم عصبی مرکزی اثر می‌گذارد (Neiffer, 2021). مطالعهٔ حاضر با تحقیقات Zahran و همکاران (۲۰۲۰) (اثر ماده های بیهوشی پروپوفول و اوژنول بر ماهی تیلاپیا نیل)، Adel و همکاران (۲۰۲۰) (مقایسهٔ بین آرام‌بخشی با استفاده از پروپوفول و روغن میخک در سیاه ماهی) و Adel و همکاران (۲۰۱۶)، (اثر بیهوشی روغن میخک، پروپوفول، ۲-فنوکسی اتانول وکتامین هیدروکلراید روی تاس ماهی ایرانی) مطابقت دارد.

[1] Gamma-aminobutyric acid

یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامت و فیزیولوژی ماهیان، سنجش شاخص‌های خونی آن است که تحت تأثیر تغذیه، عوامل محیطی، سن و سایر موارد فیزیولوژ یک است (Quillfeldt and Masello, 2004). گرچه اکثر مطالعات به بررسی آرام‌بخشی روش الکتریکی در ماهیان پرداخته‌اند ولی مطالعات کمی در این زمینه صورت گرفته است (Henyey *et al*., 2002; Gao *et al*., 2014). شاخص‌های خون‌شناسی به‌عنوان شاخص‌های فیزیولوژیک استرس در تغییرات محیط داخلی و خارجی ماهیان استفاده می‌شوند (Masopust, 2000). شاخص‌های مربوط به خون مانند گلبول‌های سفید از جمله لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل و مونوسیت‌ها یکی از بخش‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می تواند به‌عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس طرح باشد (Svobodova *et al*., 1991). تغییرات تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند به‌دلیل وجود عوامل عفونی و واکنش‌های ازدیاد حساسیت، استرس ناشی از دستکاری باشد (Payghan *et al*., 2009). گرچه این پاسخ می‌تواند با توجه به گونهٔ ماهی، شرایط نگهداری، دما و عوامل استرس‌زا متفاوت باشد (Matsche and Gibbons, 2012). می‌توان اینگونه بیان کرد که دما و روش‌های بیهوشی باعث ایجاد تحریک سیستم ایمنی و بروز پاسخ‌های متفاوت شده است. گلبول های قرمز نابالغ تحت شرایط استرس‌زا از طحال آزاد می شوند و با افزایش متابولیسم، اکسیژن‌رسانی به اندام‌های مهم افزایش می یابد که به‌دنبال آن گلبول های قرمز، غلظت هموگلوبین و سطح هماتوکریت افزایش می‌یابد (Casillas *et al*., 1974). در پژوهش حاضر، مشخص شد که بلافاصله پس از بیهوشی، نوع مادهٔ بیهوشی تأثیر معنی داری بر مقدار هماتوکریت، گلبول قرمز، MCV، MCH، MCHC دارد و بیشترین میزان آن‌ها در روش بیهوشی به‌صورت الکتریکی بود.

یکی از این روش‌های متداول جهت کاهش دادن خطر استرس‌های دستکاری استفاده از بیهوشی است، هرچند بکارگیری مواد بیهوشی در این راه به‌خودی خود استرس‌زا تلقی می‌گردد (Kiessling *et al*., 2009). بکارگیری روشی که با زمان القا و بیهوشی کوتاه اثرات ناشی از استرس را به کمترین حد برساند، بسیار مفید و ضروری به‌نظر می‌رسد. که در این تحقیق استفاده از الکترو شوکر باعث کاهش شاخص‌های استرس و پایداری شاخص‌های ایمنی گردید. نتایج شاخص‌های مرتبط با ایمنی نظیر لیزوزیم و فعالیت همولیتیک کمپلمان نشان داد که بیش‌ترین مقادیر در روش الکتریکی و کمترین میزان لیزوزیم در تیمار پروپوفول و فعالیت همولیتیک کمپلمان در تیمار گل میخک بود که با تحقیقات Hoseini و همکاران (۲۰۲۲) و Yousefi و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد. پاسخ‌های استرس در سه دسته ناشی از غدد درون‌ریز، متابولیک و پاسخ همه جانبه حیوان تقسیم‌بندی می‌شوند. بنابراین در مرحلهٔ اول شناسایی نشانگرهای استرس بسیار حائز اهمیت می‌باشد. کورتیزول و گلوکز پلاسما به‌عنوان مهم‌ترین نشانگرهای استرس در ماهیان شناخته شده است (Small., 2003). نوسان شاخص های بیوشیمیایی سرم خون از جمله گلوکز همواره جزء آن دسته از تغییرات زیستی محسوب می‌شوند که تحت تأثیر عوامل محیطی نظیر صید، دستکاری، حمل و نقل، نگهداری در تراکم بالا و تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی آب و غیره به‌وجود می‌آید (Bahmani, 2000). نتایج شاخص‌های مرتبط با استرس نظیر کورتیزول و گلوگز نشان داد که کمترین مقادیر در روش الکتریکی و بیشترین آن در تیمار گل میخک بود. افزایش شاخص‌های استرس نظیر گلوگز و کورتیزول در روش بیهوشی با استفاده از گل میخک به‌دلیل طولانی بودن زمان اثرگذاری مادهٔ زیست‌فعال آن و همچنین تأخیر در فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بافت اینتررنال (HPI) می باشد. نتایج این پژوهش با تحقیقات Zahran و همکاران (۲۰۲۰) (اثرماده‌های بیهوشی پروپوفول و اوژنول و اثرات آن بر سلامت عمومی در ماهی تیلاپیا نیل)، Yousefi و همکاران (۲۰۱۹) (میزان تغییر در استرس خون ماهی کپور معمولی بیهوش شده با سیترونلال و

لینالول و مقایسه با اوژنول) و Sattari و همکاران (۲۰۰۹) (مقایسهٔ اثرات بیهوشی روش الکتریکی با بیهوشی ناشی از MS_{222} و اسانس میخک بر سطوح کورتیزول و گلوکز پلاسما به‌عنوان نشانگرهای استرس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان) مطابقت دارد. بالا رفتن سطوح کورتیزول، از علایم پاسخ اولیه به استرس است و بالا رفتن غلظت گلوکز خون، از کار افتادن سطوح هورمون تیروئید، تغییرات الکترولیت‌ها و تغییرات رفتاری از پاسخ‌های ثانویه و ثالث استرس هستند که در صورت ادامه، حضور عامل استرس‌زا و افزایش کورتیزول بروز خواهند یافت (Morales *et al*., 2005). همچنین سطوح گلوکز پلاسما در جریان استرس در ماهی در اثر بالا رفتن سطوح کاتکول آمین‌ها افزایش می‌یابد (Wendelaar Bong, 1993) که منجر به پدیدهٔ هایپرکلیسمی می‌شود و از مهمترین پاسخ‌های ثانویه در ارتباط با بالا رفتن کورتیزول است. ترشح کورتیزول آرام‌تر از کاتکولامین‌ها ست، اما تأثیرات آن پایدارتر می‌باشد و سبب ترکیب مواد معدنی و فعالیت گلوکوکورتیکوئیدها جهت حفظ هوموستازی می‌شود. کورتیزول سبب فعال شدن فرآیندهای گلیکوژنولیز و گلیکونئوژنزیز در ماهیان می‌شود، همچنین منجر به آزاد شدن کاتکولامین‌ها از سلول‌های کرومافین می شود که در نهایت سبب افزایش گلیکوژنولزیز، بهبود عملکرد گردش خون و تنفس می‌گردد. مجموعهٔ این فرآیندها سطح گلوکز را جهت تولید انرژی کافی با توجه به نیاز افزایش می‌دهد (Martínez-Porchas *et al*., 2009). به‌طور معمول انتظار می‌رود بیهوشی اثرات منفی استرس مانند افزایش گلوکز یا سایر ترکیبات خونی را کاهش دهد. با این حال برخی از مواد بیهوش‌کننده این اثر را ندارند. در بعضی از موارد نیز ممکن است تغییرات معنی‌داری در مقدار گلوکز مشاهده نشود؛ زیرا تحت شرایط استرس، ماهیان به‌سرعت انرژی تولید شده (گلوکز) را مصرف می‌نمایند تا عملکرد اصلی سیستم عصبی مرکزی، همئوستازی را ایجاد نماید (Martínez-Porchas *et al*., 2009). گلوکز کربوهیدراتی است که نقش مهمی در تأمین انرژی زیستی حیوانات دارد. در شرایط استرس‌زا، سلول‌های کرومافین هورمون‌های کاتکولامین، آدرنالین و نورآدرنالین را به جریان خون ترشح می‌کنند. این هورمون‌ها موجب تولید کورتیزول و افزایش گلوکز از طریق مسیرهای گلیکوژنزیز و گلیکوژنولیز می‌شوند (Martínez-Porchas *et al*., 2009).

نتیجه گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد شاخص‌های ایمنی و استرس وارد شده به ماهیانی که تحت بیهوشی الکتریکی قرار گرفتند، بهتر از روش گل میخک و پروپوفول بود. از این‌رو بیهوشی الکتریکی روشی سریع، ارزان، سازگار با محیط زیست می‌تواند جایگزین مناسبی برای بیهوشی با مواد شیمیایی باشد زیرا هیچ‌گونه باقیماندهٔ شیمیایی در بافت‌های ماهی و آلودگی در طبیعت بر جای نمی‌گذارد.

۵. منابع

References

Adel, M., Riyahi Cholicheh, H., Gholamhosasoosiseini, A., Bigham Sadegh, A., Zorriehzahra, M. J., 2020. A comparison between sedation using propofol and clove oil in Levantine scraper (*Capoeta damascina*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 19(6), 2893-2900.

Adel, M., Sadegh, A. B., Yeganeh, S., Movafagh, A. N., Saoud, I.P., 2016. Anesthetic efficacy of clove oil, propofol, 2- phenoxyethanol, and ketamine hydrochloride on Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society* 47(6), 812-819.

Avella, M., Young, G., Prunet, P., Schreck, C.B., 1990. Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. *Aquaculture* 91, 359-372.

Bahmani, M., 2000. Study of the ecophysiological stress effects on HPG and HPI axes, immunity system and reproduction processes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Ph.D. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch. Tehran, Marine Biology. 302 p.

Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with par-ticular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42(3), 517–525.

Botrel, B.M.C., Abreu, D.C.P., Saczk, A.A., Bazana, M.J.F., Coelho, S.M., e Rosa, P.V., de Lima, R.M.F., 2017. Residual determination of anesthetic menthol in fishes by SDME/GC–MS. *Food Chemistry* 229, 674-679.

Bowzer, J.C., Trushenski, J.T., Gause, B.R., Bowker, J.D., 2012. Efficacy and physiological responses of grass carp to different sedation techniques: II. Effect of pulsed DC electricity voltage and exposure time on sedation and blood chemistry. *North American Journal of Aquaculture* 74(4): 567-574.

Casillas, E., Smith, L.S., 1974. Effects of stress on blood coagulation and haematology in rianbow trout exposed to hypoxia. *Journal Fish Biology* 6, 379 -380.

Coyle, S.D., Durborow, R.M., Tidwell, J.H., 2004. Anesthetics in aquaculture (No. 3900). Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center.

Ellis A.E., 1990. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Robertson BS, VanMuisvinkel WR, editors. Lysozyme assay in techniques in fish immunology. Fair Haven, NJ, USA: *SOS Publications*, pp: 101-103.

Gao, Y., Li, D., Peng, X., Tang, R., 2014. Effects of low-voltage constant direct current on plasma biochemical profiles and gene expression levels in crucian carp (*Carassius Carassius)*. *Fisheries Science* 80, 993-1000.

Hamackova, J., Lepicova, A., Kozak, P., Stupka, Z., Kouril, J., Lepic, P., 2004. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca L.*) related to water temperature. *Veterinarni Medicina* 49(12), 467.

Henyey, E., Kynard, B., Zhuang, P., 2002. Use of electronarcosis to immobilize juvenile lake and shortnose sturgeons for handling and the effects on their behavior. *Journal of Applied Ichthyology* 18(46), 502-504.

Hoseini, S.M., Taheri Mirghaed, A., Pagheh, E., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H., 2022. Anesthesia of rainbow trout with citronellal: Efficacy and biochemical effects. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 337(3), 227-237.

Hoseini, S. M., Taheri Mirghaed, A., Yousefi, M., 2019. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 11(3), 550-564.

Hoskoen, P., Pirhonen, J., 2004. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. *Journal of Fish Biology* 64, 1136-1142.

Hudson, J.M., Johnson, J.R., Kynard, B., 2011. A portable electronarcosis system for anesthetizing salmonids and other fish. *North American Journal of Fisheries Management* 31(2), 335-339.

Iwama, G., Afonso, L., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K., 2004. Are Hsps Suitable For Indicating Stressed States in Fish. *The Journal of Experimental Biology* 204: 15-19.

Kiessling A., Johansson, D., Zahl, I.H., Samuelsen, O.B., 2009. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocain, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta- cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture* 286, 301-308.

Knotkova, Z., Pejřilová, S., Trnková, Š., Matoušková, O., Knotek, Z., 2005. Influence of reproductive season upon plasma biochemistry values in green iguanas. *Acta Veterinaria Brno* 74(4), 515-520

Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S. K., Sahu, A. K., Mohanty, B. R., 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish (*Clarias batrachus)*. *Aquaculture* 252(2-4), 121-127.

Maricchiolo, G., Genovese, L., 2011. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anesthetics. *The Open Marine Biology Journal* 5, 24- 33.

Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L.R., Ramos-Enriquez, R., 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4(2), 158-178.

Masopust, J., 2000. Clinical biochemistry. Karolinum Praha. 832 p. (In Czech).

Matsche, M.A. and Gibbons, J., 2012. Annual variation of hematology and plasma chemistry in shortnose sturgeon, Acipenser brevirostrum during a dam -impeded spawning run. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1679 -1696.

Matin, S.M.A., Hossain, M.A., Hashim, MA., 2009. Clove oil anaesthesia in singhi (*Heteropneuses fossilis*) and lata (*Channa punctatus*) fish. *Bangladesh Vet*erinary 26(2), 68-73.

Mazandarani, M., Hoseini, S.M., 2017. Menthol and 1,8-cineole as new anaesthetics in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research* 48(6), 3041-3051.

Mirghaed, A.T., Ghelichpour, M., Hoseini, S.M., 2016. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* Comparison with eugenol. *Aquaculture* 464, 165-170.

Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M., Rohanizade, S., 2016. Probiotic effects of Lactobacillus plantarum and L. delbrueckii ssp. bulguricus on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. *Aquaculture International* 24(1), 225-242.

Morales A.E., Cardenete G., Abellan E., Garcia-Rejon L., 2005. Stressrelated physiological responses to handling in common dentex (*Dentexdentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research* 36, 33-40.

Neiffer, D.L., 2021. Anesthesia and Analgesia. Clinical Guide to Fish Medicine, 198-212.

Noori, A., Amiri, B.M., Mirvaghefi, A., Baker, D.W., 2010. Parameters of the red blood cell count in three species of carp fish. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 16(3), 307-310.

Palic, D., Herolt, D.M., Andreasen, C.B., Menzel, B.W., Roth, J.A., 2006. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, meto-midate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales prome-las Rafinesque*, 1820. *Aquaculture* 254, 675-685.

Payghan, R., Lorkey, S., Khajeh, G.H., Nadaf, H., 2009. Investigating the effect of anesthesia with cloves on some biochemical factors in blood serum of *tenopharyngodon idella Journal of Animal Health and Diseases* 3(2), 35-47.

Quillfeldt, P., Masello, J.F., Möstl, E., 2004. Blood chemistry in relation to nutrition and ectoparasite load in Wilson's storm-petrels *Oceanites oceanicus*. *Polar Biology* 27(3), 168-176.

Renault, S., Daverat, F., Pierron, F., Gonzalez, P., Dufour, S., Lanceleur, L., Schafer, J., Baudrimont, M., 2011. The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(6), 1573-1577.

Ross, L.G., Ross, B., 2008. Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Blackwell, Oxford. 228p.

Summerfelt, R.C., Smith, L.S., 1990. Anesthesia, surgery, and related techniques. Methods for fish biology. *American Fisheries Society, Bethesda, Maryland* 8(9.6), 2.

Sattari, A., Mirzargar, S.S., Abrishamifar, A., Lourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H.E., Niasari, A., 2009. Comparison of Electroanesthesia with Chemical Anesthesia (MS222 and Clove Oil) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) using Plasma Cortisol and Glucose Responses as Physiological Stress Indicators. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6, 306-313.

Small, B.C., 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218, 177-185.

Souza, C.D.F., Baldissera, M.D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J. M., 2019. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. *Frontiers in Physiology* 10, 785.

Svobodova, Z., Pravda, D., Palackova, J., 1991. Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany, Edition Methods No, 20, 31.

Tondolo, J.S.M., Amaral, L.D.P., Simões, L.N., Garlet, Q.I., Schindler, B., Oliveira, T.M., Heinzmann, B. M., 2013. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology* 11, 667-674.

Vázquez, G.R., Guerrero, G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in Cichlasoma dimerus (*Teleostei*, *Perciformes*). *Tissue and Cell* 39(3), 151-160.

Wendelaar Bong, S.E., 1993. Endocrinology. In: Evans, D.H. (E d.), the physiology of fishes. CRC Press, FL. pp: 469-305.

Yamaky, F., Perriera, G., 2001. Effects of propofol on the electrocardiogram and blood pressure of clinically healthy cats. *World Small Anim Anesthesia* 22, 35-42.

Yousefi, M., Hoseini, S.M., Aydın, B., Mirghaed, A.T., Kulikov, E.V., Drukovsky, S.G., Van Doan, H., 2022. Anesthetic efficacy and hemato-biochemical effects of thymol on juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 547, 737540.

Yousefi, M., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Ghelichpour, M., 2019. Change in blood stress and antioxidant markers and hydromineral balance of common carp (*Cyprinus carpio*) anaesthetized with citronellal and linalool: Comparison with eugenol. *Aquaculture Research* 50(4), 1313-1320.

Zahran, E., Risha, E., Rizk, A., 2020. Comparison propofol and eugenol anesthetics efficacy and effects on general health in Nile Tilapia. Aquaculture,

Zhu, F., 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture* 526, 735422.