فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۰، دوره ۱۵، شماره ۴، پاییز۱۴۰۱، صفحه ۳۷ تا ۴۸
Qiaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

ارزیابی میزان کارایی بنزوکایین و اثرات بیهوشی با آن بر فاکتورهای خونی ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

فردین شالویی [۱]، حسین رحیمی [۲]

۱ - استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. نویسنده مسئول: Fardin.shaluei@Gmail.com

۲- کارشناس آزمایشگاه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۰۳/۲۵ **تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۷/۲۸**

چکیده

زمینه و هدف : عملیات معمول در حین تکثیر و پرورش یا در طی مطالعات تحقیقاتی اغلب موجب پاسخ‌های استرس و فیزیولوژیکی در ماهی می‌گردد که متعاقباً اثرات نامطلوبی مانند سرکوب ایمنی، تعویق رشد و مرگ را به دنبال خواهد داشت هدف از مطالعه حاضر ارزیابی کارایی بنزوکائین به عنوان ماده بیهوش کننده در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) بود. همچنین تاثیر بیهوشی با غلظت های موثر بنزوکائین و استرس ناشی از دستکاری بر شاخص های خون‌شناسی مطالعه شد.

مواد و روش ها : ۱۰ قطعه ماهی به‌صورت انفرادی در معرض هر یک از غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوکائین قرار گرفتند و زمان رسیدن به بیهوشی عمیق و برگشت از بیهوشی ثبت شد. در قسمت دوم آزمایش، ۷ قطعه ماهی به‌صورت انفرادی با یک از غلظت‌های ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوکائین بیهوش شدند. سپس ماهیان به مدت دو دقیقه بیرون از آب تحت استرس حاد ناشی از دستکاری بیومتری، وزن‌کشی و خون‌گیری شدند. برای بررسی اثر استرس حاد ایجاد شده توسط دستکاری از ۷ قطعه ماهی بدون بیهوشی خون‌گیری شد.

نتایج: غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوکائین بعد از ۱۰ دقیقه باعث القای بیهوشی عمیق نشد درحالی‌که در غلظت‌های ۱۲۵، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ماهیان کمتر از ۳ دقیقه به بیهوشی عمیق رسیدند. زمان رسیدن به بیهوشی عمیق و بازگشت از بیهوشی به‌طور معنی‌داری وابسته به غلظت بنزوکائین بود ($P< ۰/۰۵$). طبق نتایج خون‌شناسی، استرس حاد باعث افزایش تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و میزان گلوکز و کورتیزول سرم در مقایسه با ماهیان بیهوش شده و تیمار کنترل شد ($P< ۰/۰۵$).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که بیهوشی سریع ماهی قرمز با غلظت نسبتاً بالای بنزوکائین (۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث جلوگیری محور استرس ناشی از انتشار کورتیزول می‌شود و می‌توان این غلظت را به‌عنوان غلظت مطلوب برای مطالعات خون‌شناسی و دستکاری ماهی قرمز توصیه کرد.

کلمات کلیدی: بنزوکائین، بیهوشی، ماهی قرمز، کورتیزول، استرس

مقدمه

تکثیر و پرورش ماهیان زینتی یکی از بخش‌های مهم صنعت آبزی پروری است که نقش مهمی در اشتغال-زایی و تجارت دارد. ماهی قرمز، ماهی کاراس طلایی یا ماهی حوض (*Carassius auratus*) یکی از محبوب‌ترین گونه‌های ماهیان زینتی در جهان می‌باشد (۱) که به عنوان مدل جهت مطالعات سم‌شناسی، تولیدمثلی، فیزیولوژی غدد داخلی، سلولی و مولکولی و ایمنی‌شناسی استفاده می گردد، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار بوده و همچنین در محیط‌های آزمایشگاهی به‌راحتی قادر به بلوغ و تکثیر است (۲). عملیات معمول در حین تکثیر و پرورش یا در طی مطالعات تحقیقاتی اغلب موجب پاسخ‌های استرس و فیزیولوژیکی در ماهی می گردد که متعاقباً اثرات نامطلوبی مانند سرکوب ایمنی، تعویق رشد و مرگ را به دنبال خواهد داشت (۳). از این رو استفاده از مواد بیهوشی می‌تواند این اثرات نامطلوب را در ماهی کاهش دهد. دستیابی به یک داروی بی‌هوش کننده مناسب جهت بیهوشی سریع و ایمن، همواره از دغدغه‌های محققین علوم شیلاتی بوده است. یک ماده بیهوشی ایده آل باید باعث بیهوشی یا بهبود سریع ماهی با حداقل استرس شود، استفاده از آن آسان و ارزان باشد، در غلظت‌های پایین مؤثر بوده و برای ماهی بی‌خطر باشد. علاوه بر این هم برای کاربران و مصرف‌کنندگان و هم برای محیط‌زیست بی‌ضرر باشد(۱) که تمام این ویژگی‌ها را می‌توان در ماده بیهوش کننده بنزوکائین مشاهده نمود (۴). بنزوکائین (اتیل پارا آمینو بنزوات)، یک ماده‌ای سفیدرنگ، بی‌بو، بی‌مزه می‌باشد که به‌صورت حمام می‌تواند به‌عنوان یک ماده بیهوشی مؤثر جهت کاهش استرس و مرگ‌ومیر ماهیان در حین حمل‌ونقل و فعالیت‌های تخم‌کشی و ذخیره‌سازی استفاده شود (۵). این ماده از رایج‌ترین مواد بیهوشی قابل استفاده در تحقیقات ماهیان می‌باشد و دوز آن تقریباً مشابه MS-222 و حدود ۸۰ میلی گرم بر لیتر است (۶). با وجود استفاده گسترده از MS-222 استفاده از آن دارای محدودیت می‌باشد زیرا ماهیانی که در معرض این ماده بیهوشی قرار می‌گیرند تا ۲۱ روز قابل استفاده توسط انسان نیستند که این زمان حذف طولانی مدت دارو از بدن، در آبزی‌پروری یک عامل نامطلوب محسوب می‌شود درحالی‌که بنزوکائین طی ۲۴ ساعت پس از در معرض قرار گرفتن طولانی مدت ماهیان با محلول آن، از فیله خوراکی آن‌ها حذف می‌شود (۵). بنابراین بنزوکائین به علت دفع کوتاه‌مدت از بدن دارای ویژگی مطلوب‌تری نسبت به MS-222 است و در علم پزشکی به‌عنوان بی‌حس کننده موضعی استفاده می‌شود. از مزایای دیگر استفاده از بنزوکائین سمیت پایین آن برای انسان، حذف راحت آن از سیستم با استفاده از کربن فعال و همچنین عدم اختلال در توان تولیدمثل یا رشد ماهی با استفاده از دوز مناسب آن است (۷). با توجه به اینکه پاسخ هرگونه به ماده بیهوشی متفاوت می‌باشد توصیه شده است قبل از استفاده، کارایی ماده بیهوشی موردمطالعه قرار گیرد (۱،۸،۹). غلظت مؤثر یا بهینه یک ماده بیهوش کننده برای ماهی غلظتی است که باعث القای بیهوشی در کمتر از ۳ دقیقه شود و زمان برگشت از بیهوشی کمتر از ۵ دقیقه باشد (۳،۱۰). بنزوکائین به علت حلالیت زیاد آن در چربی، سریعاً از راه غشاهای زیستی جذب

می‌شود و باعث القاء بیهوشی و ریکاوری ماهی در مدت‌زمان کوتاه می‌شود (۵). به‌هرحال، بی‌خطر بودن بنزوکائین به گونه ماهی بستگی دارد و غلظت مؤثر هر ماده بیهوشی باید برای هر گونه ماهی اثبات شود (۴). همچنین کارایی و اثربخشی مواد بیهوش کننده به عوامل زنده و غیر زنده متعددی وابسته است که شامل نوع گونه، مقدار چربی بدن، اندازه و وزن بدن، نسبت سطح آبشش ها، دما، سختی و پی-اچ آب می‌باشد (۳،۹). به‌عنوان مثال دمای آب بر زمان القاء بیهوشی و غلظت مؤثر بنزوکائین تأثیر عکس دارد به‌طوری که با افزایش دمای آب، کارایی ماده بیهوشی بیشتر شده و زمان القا بیهوشی کوتاه‌تر می‌گردد. همچنین افزایش مدت‌زمان در معرض قرارگیری با بنزوکائین زمان ریکاوری را طولانی‌تر می‌کند (۱۱). لذا با توجه به تنوع قابل توجه ماهیان و متفاوت بودن غلظت داروی بیهوشی بین گونه‌های مختلف ماهی، در این تحقیق سعی شد تا غلظت مناسب بنزوکائین در القا بیهوشی و همچنین کارایی آن در ماهی قرمز تحت استرس حاد بررسی شود.

مواد و روش ها

تهیه و نگهداری ماهیان

برای انجام این تحقیق ۲۰۰ قطعه ماهی قرمز نر و ماده با میانگین وزنی ۴/۲۲± ۲۶/۷۹ گرم و میانگین طول کل ۸/۰۲۲ ±/۸۸ سانتی‌متر در بهار سال ۱۳۹۹ از پرورش‌دهندگان محلی تهیه و جهت سازگاری و انجام آزمایش‌ها به سالن آبزی‌پروری دانشگاه شهرکرد منتقل شدند. پس از هم‌دما سازی، ماهیان در ۱۲ وان ۱۵۰ لیتری تقسیم‌بندی و به مدت ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط جدید نگهداری شدند. ماهیان به میزان ۲٪ وزن بدن با غذای تجاری ماهی قرمز به‌صورت روزانه غذادهی شدند. همچنین ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش‌ها غذادهی به ماهیان قطع شد. ماهیان در زمان نگهداری و انجام آزمایش‌ها در شرایط ثابت نگهداری شدند و فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما (۲ ±۱۸ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (۷ میلی‌گرم بر لیتر) و pH (۸/۰±۲/۴) با استفاده از دستگاه پرتابل مدل HQ30d اندازه‌گیری شد. همچنین میزان سختی آب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر هک مدل DR 6000 قرائت شد. وزن و طول کل ماهیان به ترتیب با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم و خط کش با دقت ۱ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف بنزوکائین

برای بررسی تأثیر بنزوکائین، همانند مطالعات گذشته غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). محلول استوک بنزوکائین (Sigma_ Alderich Co) چند دقیقه قبل از انجام آزمایش با حل کردن غلظت‌های مختلف با اتانول ۹۶٪ به نسبت ۱ به ۹ آماده و سپس به آکواریوم‌های ۱۰ لیتری اضافه شدند (۱۳). محلول بیهوشی به مدت ۵ دقیقه برای همگن شدن محلول شدیداً مورد هوادهی قرار گرفت. در این آزمایش برای هر غلظت ۱۰ قطعه ماهی مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان

به‌صورت انفرادی در معرض غلظت‌های یاد شده بنزوکائین قرار گرفتند و زمانی که به مرحله بیهوشی عمیق (ماهیان تعادل خود را از دست داده، در کف تانک قرار گرفته و به محرک عکس‌العمل نشان نمی‌دهند) می‌رسیدند به داخل تانک‌های بهبودی یا ریکاوری منتقل شدند (۱۴). در تمام این مراحل مدت زمان شروع بیهوشی تا زمان بیهوشی کامل (بیهوشی عمیق) و زمان بازگشت از بیهوشی با استفاده از کرنومتر به دقت اندازه‌گیری و ثبت گردید.

بررسی غلظت‌های بهینه بنزوکائین و استرس حاد بر شاخص های استرس و خونی

در دومین سری آزمایش‌ها بر اساس نتایج آزمایش قبلی، غلظت‌های ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوکائین به‌عنوان غلظت بهینه انتخاب شدند. برای بررسی کارایی غلظت‌های یاد شده و توانایی آن‌ها در جلوگیری از استرس به ماهیان، ۷ قطعه ماهی برای هر غلظت سریعاً در معرض غلظت‌های بهینه بنزوکائین قرار گرفتند. بعد از رسیدن به مرحله بیهوشی عمیق، ماهیان خارج از آب وزن‌کشی، بیومتری و به روش قطع ساقه دمی از آن‌ها خون‌گیری شد. زمان القای استرس حاد و خون‌گیری دو دقیقه برای تمام ماهیان تنظیم شد. همچنین این روش خون‌گیری روی ۷ قطعه ماهی بیهوش نشده انجام شد که به عنوان تیمار ماهیان دستکاری شده نام‌گذاری شد. برای گروه شاهد خون‌گیری از ماهی‌ها بدون استفاده از ماده بیهوشی و القای استرس حاد، به روش قطع ساقه دمی در زمان کمتر از ۱۵ ثانیه انجام شد. نمونه خون‌های جمع آوری شده به مقدار ۱ سی سی درون لوله‌های هپارینه درب دار ریخته و شماره‌گذاری شدند. مقدار ۰/۵ سی سی خون نیز بدون استفاده از ماده ضد انعقاد برای جداسازی سرم در نظر گفته شد. برای تهیه سرم نمونه‌های خون با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم های جداسازی شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان تست بیوشیمیایی نگهداری شدند. برای شمارش تعداد گلبول قرمز (RBC) از پیپت های حباب‌دار (ملانژور) قرمز استفاده گردید. تعداد گلبول قرمز با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق‌سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱/۲۰۰) شمارش شد. از مربع میانی (۵ خانه وسط) لام نئوبار برای شمارش گلبول قرمز استفاده و عدد به‌دست‌آمده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد. تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید. برای شمارش تعداد گلبول سفید (WBC) از پیپت‌های حبابدار (ملانژور) سفید استفاده گردید. تعداد گلبول‌های سفید با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق‌سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱/۵۰) شمارش شد. از ۴ مربع کناری لام نئوبار برای شمارش گلبول سفید استفاده و عدد به دست آمده در عدد ۵۰ ضرب شد. تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید. برای تعیین میزان هماتوکریت (Hct) از روش میکروهماتوکریت استفاده گردید. بعد از ریختن خون در لوله موئینه هپارینه، لوله‌ها را درون دستگاه سانتریفوژ میکروهماتوکریت قرار داده و پس از سپری شدن ۳ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰(rpm) مقدار هماتوکریت به‌وسیله صفحه

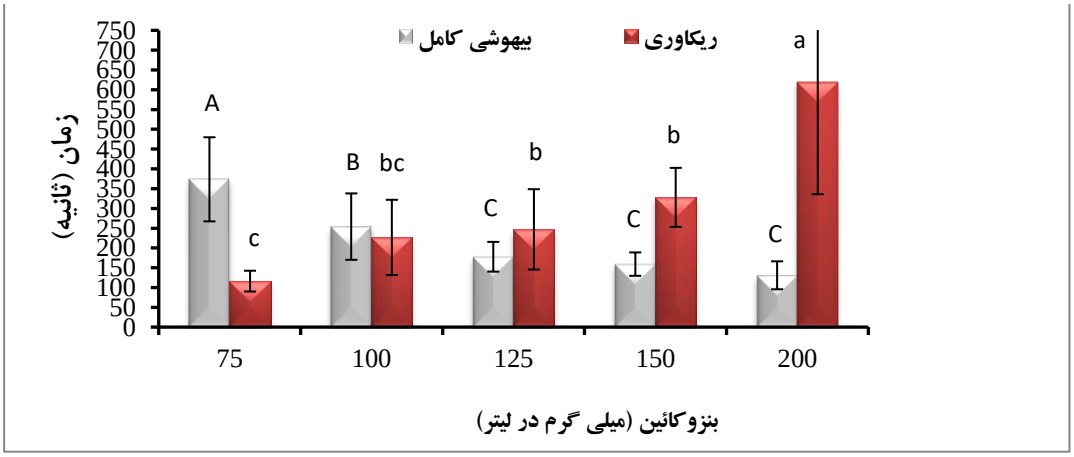
مدرج مخصوص قرائت شد. برای تعیین مقدار هموگلوبین (Hb) از روش سیانومت هموگلوبین استفاده گردید. مقدار ۲۰ میکرولیتر خون منعقد نشده با ۵۰ میلی‌لیتر محلول درابکین مخلوط شده و ۱۰-۵ دقیقه در محیط تاریک قرارداده شد. سپس به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر مقدار جذب را قرائت کرده و در ضریب ۳۶/۸ ضرب کرده تا مقدار هموگلوبین نمونه مورد نظر به دست آید (14). گلوکز خون به‌وسیله روش اسپکتوفتومتری (کیت تجاری پارس آزمون) و کورتیزول به‌طور مستقیم از روش ELISA با استفاده از کیت تجاری (HBL آلمان) اندازه‌گیری شد (۸).

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

تمام داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده‌اند. قبل از انجام آنالیز، داده‌ها از لحاظ نرمال بودن مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت نیاز داده‌ها به توزیع نرمال تبدیل شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر زمان بیهوشی و برگشت از بیهوشی همچنین تأثیر غلظت‌های بهینه بنزوکائین و استرس حاد بر شاخص‌های استرس و خونی از روش آنالیز واریانس (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS و آزمون توکی استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج

روند تغییرات رفتارشناسی بیهوشی ماهیان قرمز در معرض غلظت‌های مختلف بنزوکائین در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که تمامی غلظت‌های مورد استفاده به غیر از غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوکائین توانایی ایجاد بیهوشی عمیق در کمتر از ۱۰ دقیقه را داشتند.



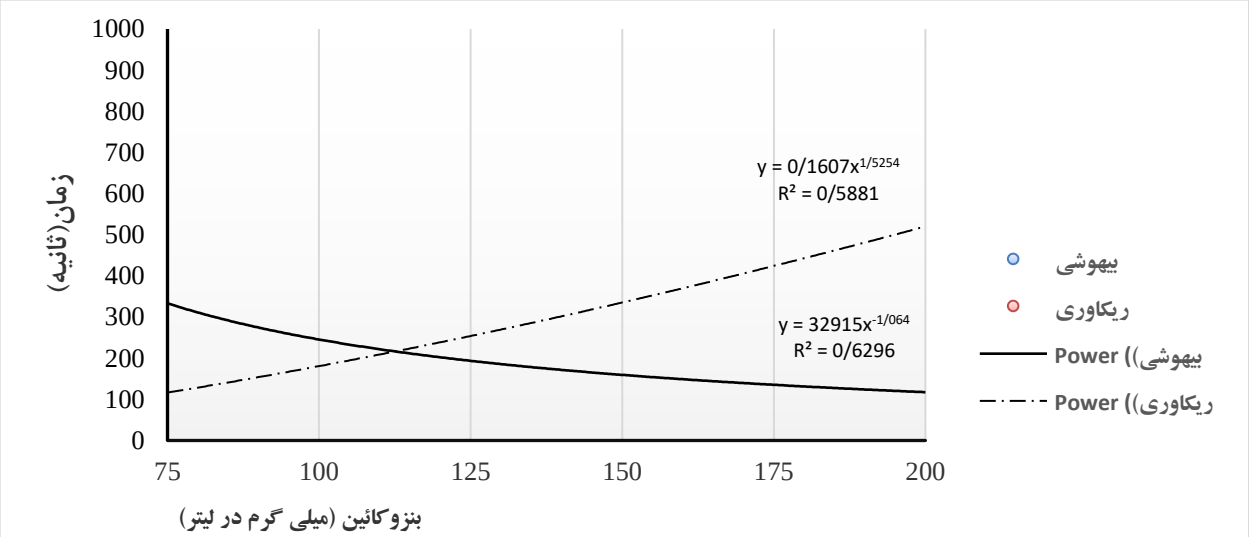
شکل ۱- مدت‌زمان رسیدن به مرحله بیهوشی عمیق و برگشت از بیهوشی ماهی قرمز در معرض غلظت‌های مختلف بنزوکائین. مقادیر با حروف متفاوت برای زمان بیهوشی (حروف بزرگ) و برگشت از بیهوشی (حروف کوچک) دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

ماهیانی که در معرض غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفته بودند در زمان ۱۲۰/۷±۸۷۵/۵۱ ثانیه به بیهوشی کامل رسیدند و زمان بازگشت از بیهوشی در این تیمار ۹۵/۰۶±۱۸۳/۸۴ ثانیه بود.

با توجه به شکل ۱ کمترین غلظت‌های بهینه بنزوکائین که توانایی ایجاد بیهوشی عمیق در کمتر از ۳ دقیقه و بازگشت از بیهوشی در کمتر از ۵ دقیقه را داشتند، غلظت‌های ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بنزوکائین بودند که از لحاظ زمان القای بیهوشی عمیق و برگشت از بیهوشی با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p\geq ۰/۰۵$).

همچنین غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر بنزوکائین با القای بیهوشی کامل در ۳۷/۶±۱۷۰/۸ و ریکاوری در ۱/۵۳±۲۴۷/۱۰۱ ثانیه به عنوان کمترین غلظت بهینه بنزوکائین در ماهی قرمز بود.

رابطه رگرسیونی بین غلظت های مختلف بنزوکاوئین با زمان رسیدن به بیهوشی عمیق و برگشت از بیهوشی در نمودار شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج افزایش غلظت ماده بیهوشی باعث کاهش زمان رسیدن ماهیان به مرحله بیهوشی عمیق و افزایش زمان برگشت از بیهوشی می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲-رابطه بین غلظت‌های مختلف بنزوکائین با زمان‌های القای بیهوشی عمیق و برگشت از بیهوشی در ماهی قرمز.

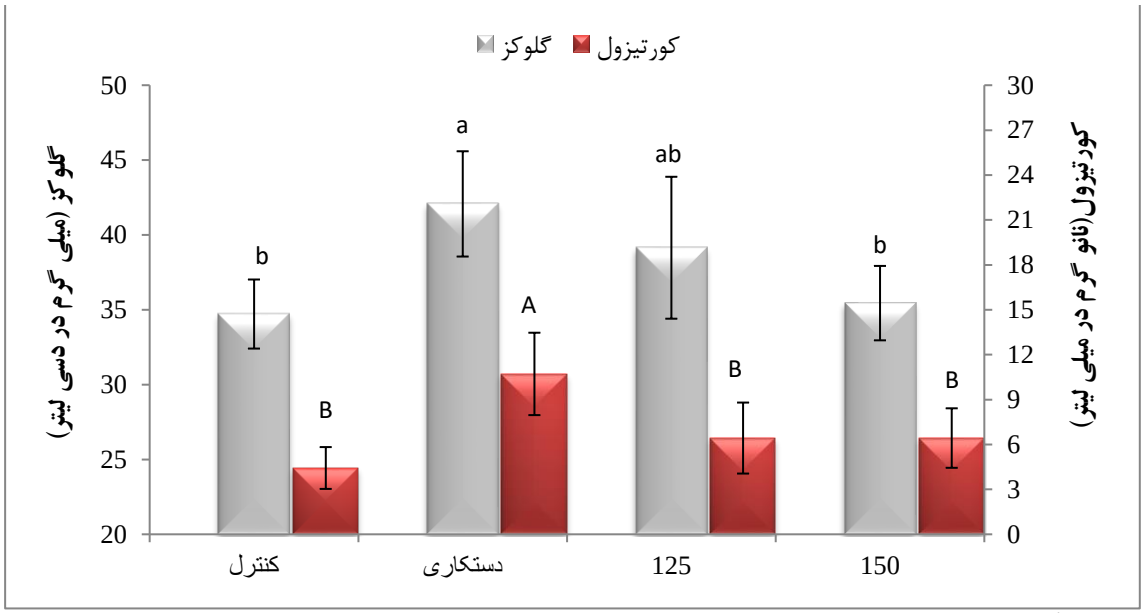
تأثیر غلظت‌های بهینه بنزوکائین و استرس حاد بر فراسنجه‌های خونی در جدول ۱ نشان داده شده است. در گروه دستکاری شده تعداد کل گلبول‌های قرمز و سطح هموگلوبین پلاسما به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌ها افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). هیچ تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید و میزان هماتوکریت بین تیمارها مشخص نشد.

تأثیر غلظت‌های بهینه بنزوکائین و استرس حاد بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قرمز در نمودار شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج این تحقیق

در تیمار دستکاری شده مقادیر گلوکز و کورتیزول نسبت به بقیه تیمارها بالاتر بود ($P< ۰/۰۵$). درحالی‌که اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و ماهیان بیهوش شده وجود نداشت ($P> ۰/۰۵$).

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های بهینه بنزوکائین و استرس حاد بر فراسنجه های خونی در ماهی قرمز (n=7).

شاخص‌های خونی		گروه شاهد	گروه دستکاری شده	غلظت‌های مختلف بنزوکائین (میلی‌گرم در لیتر)	
				۱۲۵	۱۵۰
گلبول قرمز	$۱۰^{۶}$ × سلول در میلی‌لیتر	۱/۴۹۰ ۰±/۰۷۴ b	۱/۶۵۳ ۰±/۰۵۷ a	۱/۴۴۵ ۰±/۰۶۶ b	۱/۴۱۲ ۰±/۰۷۳ b
هماتوکریت	(٪)	۲۲/۲۸ ۲±/۹۷ a	۲۳/۷۵ ۳±/۳۲ a	۲۲/۱۴ ۲±/۵۱ a	۲۱/۸۵ ۲±/۱۹ a
هموگلوبین	گرم در دسی لیتر	۷/۹۱ ۱±/۴۴ b	۱۰/۲۷ ۱±/۷۹ a	۸/۶۸ ۱±/۸۴ b	۷/۹۰ ۱±/۲۴ b
گلبول سفید	$۱۰^{۳}$ × در میلی‌لیتر	۴۶/۲۲ ۳±/۹۷ a	۴۵/۳ ۲±/۳۲ a	۴۷/۱۴ ۳±/۵۱ a	۴۶/۸۰ ۳±/۸۰ a



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های بهینه بنزوکائین و استرس حاد بر گلوکز و کورتیزول سرم در ماهی قرمز (n=7).

بحث

در این مطالعه کمترین غلظت بهینه بنزوکائین برای بیهوشی ماهی قرمز غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بود درحالی‌که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر وجود نداشت. غلظت مؤثر بنزوکائین برای بیهوشی ماهی سیم دریایی *(Sparus sarba)* مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد (۱۵). غلظت بهینه بنزوکائین برای

ماهیان دیگر مانند تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) ۱۸۰ میلی‌گرم بر لیتر (۱۶)، برای ماهی کاد ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر (۹)، برای ماهی شیربت (*Barbus grypus*) غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر(۱۰) و برای بیهوشی کامل اسبک دریایی زرد (*Hippocampus kuda*) ۱۷۵ میلی‌گرم بر لیتر (۱۷) گزارش شده است.

در این مطالعه با افزایش غلظت ماده بیهوشی زمان رسیدن ماهیان به مرحله بیهوشی عمیق کاهش و زمان برگشت از بیهوشی افزایش یافت که دلیل آن می‌تواند به علت خاصیت بنزوکائین (قابلیت انحلال چربی بالا) باشد که باعث می‌شود به سلول‌های پوششی آبشش بچسبد و در آن‌ها نفوذ کرده و جذب بافت‌ها شود. از طرف دیگر طولانی شدن زمان ریکاوری می‌تواند به علت خاصیت ماندگاری آن در سطح آبشش باشد(۱۷). زیرا مسیر اصلی جذب و دفع ماده بیهوشی، آبشش می‌باشد (۹) و خواص فیزیکوشیمیایی ماده بیهوشی، جریان خون از طریق آبشش و نفوذپذیری آبشش، بر این میزان جذب و دفع و درنتیجه مدت زمان القا و ریکاوری تأثیر خواهد گذاشت. از این رو کاهش تنفس در حین بیهوشی باعث کاهش جریان خون در آبشش‌ها شده و دفع ماده بیهوشی را کند خواهد کرد که در نتیجه آن زمان لازم برای ریکاوری ماهی افزایش خواهد یافت (۱۳). دلیل دیگر این که غلظت‌های بالاتر ماده بیهوشی منجر به ایجاد یک شیب غلظت بالاتر و درنهایت افزایش جذب دارو می‌گردد (۱۸). مطابق با نتایج این تحقیق در اکثر مطالعات انجام شده افزایش غلظت بنزوکائین باعث کاهش زمان القاء بیهوشی و افزایش زمان ریکاوری درماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) (۱۸)، ماهی کادلینگ برزیلی (*Urophycis brasiliensis*) (۱۹)، اسبک دریایی (۱۷) و ماهی کپور معمولی، تیلاپیا و قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲۰) شده است.

هر عامل استرس زا بسته به مدت زمان و شدت آن، منجر به پاسخ استرس حاد یا مزمن می‌شود که شامل تغییر در هورمون‌های پلاسما، متابولیسم انرژی و تعادل الکترولیتی، تغیر فاکتورهای خونی، مستعد شدن به بیماری و مرگ است(۳، ۸،۱۹). بنابراین ارزیابی فراسنجه های خونی، پارامترهای بیوشیمیایی سرم و هورمون‌ها ابزارهای مفیدی برای نظارت بر وضعیت فیزیولوژیکی ماهی هستند. در این مطالعه افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین در تیمار دستکاری شده نسبت به سایر تیمارها ممکن است به دلیل انتشار سلول‌های قرمز نابالغ توسط طحال باشد و می‌تواند یک واکنش سریع به استرس حاد با کاتکول آمین‌های واسطه باشد (۸،۱۹). در بیهوشی مارماهی (*Anguilla anguilla*) با روغن گل میخک نیز افزایش گلبول‌های قرمز به علت کمبود اکسیژن بافت و افزایش ظرفیت حمل اکسیژن توسط خون ذکر شد (۲۱). از طرف دیگر تغییر در تعداد گلبول‌های قرمز ماهیان دستکاری شده می‌تواند سبب تغییر در هماتوکریت و هموگلوبین ماهیان و در نتیجه موجب تغیر در میزان اندیس‌های خونی ماهیان شود. وجود این تغییرات در تیمار دستکاری شده تحت استرس حاد به‌عنوان راهبرد احتمالی محسوب می‌شود تا اکسیژن لازم را در پاسخ به

شرایط استرسی مهیا کند.

در این مطالعه افزایش غلظت کورتیزول پلاسما به‌عنوان اصلی‌ترین پاسخ هورمونی به عوامل استرس‌زا در تیمار دستکاری شده می‌باشد که از آن به‌عنوان پاسخ اولیه به استرس یاد می‌شود (۳). البته میزان کورتیزول آزاد شده در پاسخ به استرس در بین گونه‌ها و درون گونه‌ها به میزان زیادی متغیر است (۱۹). بر اساس نتایج این تحقیق ماهیان بیهوش شده با غلظت‌های بهینه بنزوکائین حتی بعد از دو دقیقه دستکاری پاسخی به استرس از خود نشان ندادند درحالی‌که در بیهوشی ماهی کپور علفخوار با بنزوکائین میزان کورتیزول خون افزایش یافت (۷). افزایش کورتیزول باعث بروز برخی پاسخ‌های ثانویه در بدن ازجمله بالا رفتن قند خون می‌شود که این افزایش در جهت تأمین انرژی مورد نیاز برای غلبه بر شرایط استرس رخ می‌دهد. افزایش قند خون یک پاسخ متداول به استرس است که در نتیجه اثر کاکتول آمین‌ها و کورتیزول بروز می‌کند. در این مطالعه نیز افزایش غلظت گلوکز پلاسمای ماهیان دستکاری شده، احتمالاً به دلیل آزاد شدن کاتکول آمینها و کورتیزول به عنوان پاسخ ثانویه به عامل استرس جهت تامین انرژی باشد.

به‌طورکلی بنزوکائین کارایی لازم جهت بیهوشی امن در ماهی قرمز را داشت. همچنین با توجه عدم تغییر در شاخص‌های استرس در ماهیان بیهوش شده با بنزوکائین به نظر می‌رسد این ماده علاوه بر بیهوشی سریع از بروز استرس در ماهیان دستکاری شده جلوگیری می‌کند. بنابراین استفاده از غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آن در عملیات تکثیر و پرورش و حتی مطالعات خون‌شناسی ماهی قرمز توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمام کسانی که در تحقق این اثر ما را یاری نمودند و همچنین از حمایت های دانشگاه شهرکرد به دلیل در اختیار گذاشتن آزمایشگاه و امکانات ابراز می‌داریم.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Kizak V, Can E, Danabaş D, Can ŞS. Evaluation of anesthetic potential of rosewood (Aniba rosaeodora) oil as a new anesthetic agent for goldfish (Carassius auratus). Aquaculture. 2018 Aug 1;493:296-301.

2. Munakata A, Kobayashi M. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. General and comparative endocrinology. 2010 Feb 1;165(3):456-68.

3. Shakeri M, Sadeghpour A, Khara H. Anesthetic effect of xylazine and benzocaine on hematological parameters and stress indicators of juvenile grass carp, Ctenopharyngodon idella (Valenciennes, 1844). Comparative Clinical Pathology. 2016

Mar;25(2):357-62.

4. Heo GJ, Shin G. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (Carassius carassius). Veterinary Anaesthesia and Analgesia. 2010 Mar 1;37(2):132-5.

5. Meinertz JR, Stehly GR, Gingerich WH. Metabolism, elimination, and pharmacokinetics of the fish anesthetic benzocaine. InXenobiotics in Fish 1999 (pp. 189-200). Springer, Boston, MA.

6. Purbosari N, Warsiki E, Syamsu K, Santoso J. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. Aquaculture and Fisheries. 2019 Jul 1;4(4):129-33.

7. Shakeri M, Sadeghpour A, Khara H. Anesthetic effect of xylazine and benzocaine on hematological parameters and stress indicators of juvenile grass carp, Ctenopharyngodon idella (Valenciennes, 1844). Comparative Clinical Pathology. 2016 Mar;25(2):357-62.

8. Shaluei F, Hedayati A, Jahanbakhshi A, Baghfalaki M. Physiological responses of great sturgeon (Huso huso) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. Fish physiology and biochemistry. 2012 Dec;38(6):1627-34.

9. Sneddon LU. Clinical anesthesia and analgesia in fish. Journal of Exotic Pet Medicine. 2012 Jan 1;21(1):32-43.

10. Öğretmen F, Gölbasi S, Kutluyer F. Efficacy of clove oil, benzocaine, eugenol, 2-phenoxyethanol as anaesthetics on shabbout fish (Barbus grypus Heckel, 1843). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2016 Jan 10;15(1):470-8.

11. Akbulut B, Çakmak E, Özel OT, Dülger N. Effect of anaesthesia with clove oil and benzocaine on feed intake in Siberian sturgeon (Acipenser baerii Brandt, 1869). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2012 Sep 1;12(3).

12. Asadi M, Nematollahi MA, Banaee M, Ahmadi K. Effects of Watercress (Nasturtium nasturtium) extract on selected immunological parameters of rainbow trout. Open Vet J. 2012; 2: 32-9.

13. Ghanawi J, Monzer S, Saoud IP. Anaesthetic efficacy of clove oil, benzocaine, 2-phenoxyethanol and tricaine methanesulfonate in juvenile marbled spinefoot (S iganus rivulatus). Aquaculture Research. 2013 Feb;44(3):359-66.

14. Yoshikawa H, Ishida Y, Ueno S, Mitsuda H. Changes in depth of anesthesia of the carp anesthetized with a constant level of CO2. Nippon Suisan Gakkaishi. 1988;54(3):457-62.

15. Hseu JR, Yeh SL, Chu YT, Ting YY. Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, Sparus sarba. Acta Zoologica Taiwanica. 1998 Jan 1;9(1):35-41.

16. Okamura D, Araújo FG, Rosa PV, Freitas RT, Murgas LD, Cesar MP. Effect of benzocaine concentration and fish size on anesthesia and recovery in Nile tilapia. Revista Brasileira de Zootecnia. 2010;39:971-6.

17. Pawar HB, Sanaye SV, Sreepada RA, Harish V, Suryavanshi U, Ansari ZA. Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, Hippocampus kuda (Bleeker, 1852). Aquaculture. 2011 Feb 3;311(1-4):155-61.

18. Leonardi F, Costa GL, Interlandi CD, Rosa J, Ghidelli A, Musicò M. Immersion anaesthesia in goldfish (Carassius auratus) with three concentrations of alfaxalone. Veterinary anaesthesia and analgesia. 2019 Jan 1;46(1):79-83.

19. Bolasina SN. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, Urophycis brasiliensis (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. Aquaculture International. 2006 Dec;14(6):569-75.

20. Ferreira JT, Schoonbee HJ, Smit GL. The anaesthetic potency of benzocaine-hydrochloride in three freshwater fish species. African Zoology. 1984;19(1):46-50.

21. Altun T, Hunt AÖ, Usta F. Effects of clove oil and eugenol on anaesthesia and some hematological parameters of European eel Anguilla anguilla, L., 1758. Journal of Applied Animal Research. 2006 Dec 1;30(2):171-6.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 15, Issue 4, Number 60, Pages 37-48
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

Evaluating the efficacy of benzocaine and the effects of anesthesia with it on the blood factors of goldfish (*Carassius auratus*)

Fardin Shalui [1], Hossein Rahimi [2]

1- Assistant Professor, Department of fishreies, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Corresponding author: Fardin.shaluei@Gmail.com

2-Laboratory expert, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received:2022.06. 15 **Accepted: 2022.10.20**

Abstract

Introduction & Objective: Common operations during reproduction and breeding or during research studies often cause stress and physiological responses in fish, which subsequently lead to adverse effects such as immunosuppression, delayed growth, and death. The objectives of this experiment were to evaluate the efficacy of benzocaine as an anesthetic in goldfish (*Carassius auratus*). Moreover, the effect of anesthesia with effective concentrations of benzocaine and stress caused by manipulation on hematological indicators was studied.

Materials & Methods: For this purpose, ten fish individually were exposed to 50, 75, 100, 125, 150 and 200 mg/L benzocaine, and time to induction (deep anesthesia) and recovery from anesthesia were measured. In the second experiment, 7 fish were deeply anaesthetized with 125 and 150 mg/L benzocaine. Subsequently, Fish were subjected to stress by acute handling, blood sampling and maintaining them out of the water for 2 min. for assessing possible stress effects caused by acute handling, blood was collected as described above without anesthesia. In control group, fish immediately after netting with their head covered with wet cloth to reduce stress, blood collection was performed by cutting caudal peduncle and lasted less than 15 s.

Results: At concentration of 50 mg/L, benzocaine failed to induce deep anesthesia in fish within the 10 min exposure period whereas at concentrations of 125, 150 and 200 mg/L, all the fish were anaesthetized within 3 min of exposure. Induction and recovery times for benzocaine were significantly dependent on concentrations ($P<0.05$). Hematological results between groups showed no significant changes in white blood cell count and hematocrit level. Acute handling caused significant increase in hemoglobin, red blood cell count, serum glucose and cortisol levels compared to control and anaesthetized group ($P<0.05$).

Conclusion: This study demonstrates that rapid induction of deep anesthesia with a relatively high concentration of benzocaine (125 mg/L) block the stress-induced cortisol response with the lowest effects on the hematological and serum biochemical indices in gold fish and therefore would be recommended as eligible dose for handling and hematological studies in this species.

Key words: Benzocaine, Anesthesia, Gold fish, Cortisol, Stress