تعیین دوز مؤثر بیهوشی دو ماده MS-222 و ۲- فنوکسی اتانول و مقایسه اثر آن‌ها بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی شیربت (*Barbus grypus*)

محسن عباسی دوبندار[۱و۲]، حدیده معبودی[۱*]، نرگس جواد زاده[۱]

۱- گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲- پردیس علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: mikhak1311@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۲

چکیده

با توجه به عوارض اجتناب ناپذیر داروهای بیهوش کننده در آبزی پروری، بررسی های خونی و بیوشیمیایی یکی از راه های بسیار مناسب برای شناسایی اثرات جانبی آنها است. هدف از این مطالعه مقایسه اثر غلظت و زمان دو ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول و MS-222 بر شاخص‌های استرس (گلوکز و کورتیزول) خون ماهی شیربت (*Barbus grypus*) بود. برای این منظور تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی شیربت با میانگین وزن ۵۰±۵ گرم برای بیهوشی با ماده ۲-فنوکسی اتانول با غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میکرو لیتر در لیتر و برای ماده بیهوشی MS222 با غلظت‌های ٤۰، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر و یک گروه نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای هر ماده پس از رسیدن ماهیان به مرحله ٤ و ۵ بیهوشی، زمان بیهوشی ثبت و سپس در غلظت مؤثر خون‌گیری در فواصل زمانی ۳ دقیقه، ٦ ساعت، ۱۲ ساعت و ۲٤ ساعت انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده دوز مؤثر بیهوشی برای ۲-فنوکسی اتانول ۳۰۰ میکرو لیتر/لیتر و برای MS222 ۵۰ میلی‌گرم/لیتر محاسبه شد. همچنین نشان داده شد ماده بیهوشی MS222 و ۲-فنوکسی اتانول از دقایق اولیه پس از بیهوشی ماهی با افزایش هورمون کورتیزول سبب افزایش میزان گلوکز خون می‌شوند این اثرات افزایشی تا ۲٤ ساعت پس از بیهوشی نیز در خون ماهی دیده می‌شود. مقایسه دو ماده بیهوشی بر فاکتورهای استرس نشان داد تأثیر هر دو ماده سبب افزایش فاکتورهای استرس شده اما اثرات افزایشی ۲-فنوکسی اتانول بیشتر است و بین کورتیزول و گلوکز همبستگی مستقیمی وجود دارد. لذا دو ماده بیهوشی بکار رفته سبب القاء استرس در گونه موردمطالعه شده است.

کلمات کلیدی: ۲-فنوکسی اتانول، MS222، کورتیزول، گلوکز، ماهی شیربت.

مقدمه

یکی از روش‌های ارزیابی وضعیت فیزیولوژیکی در ماهیان بررسی تغییرات شاخص‌های خونی هست و برای مطالعات خون‌شناسی در ماهیان، نیاز به بیهوشی و خون‌گیری از ماهیان است.

استفاده از داروهای بی‌هوش کننده در آبزی‌پروری در بسیاری موارد اجتناب‌ناپذیر است به عنوان مثال در شرایطی هم چون معاینات دوره‌ای، بیومتری‌ها، حمل و نقل ماهیان بزرگ، خون‌گیری، تکثیر مصنوعی و جراحی‌ها بدون کمک گرفتن از داروهای آرام‌بخش با مشکلات فراوانی روبرو خواهیم شد (۹). بدون بیهوشی، ماهیان واکنش‌های شدیدی به صید و خون‌گیری نشان می‌دهند که می‌تواند باعث تغییر در

برخی مؤلفه‌های خونی به‌خصوص شاص‌های استرس شود. این امر باعث ایجاد تفاوت‌هایی در نتایج آزمایش‌های مختلف می‌گردد (۵) و در تمامی این موارد هدف از به‌کارگیری این ترکیبات کاهش آسیب و استرس به ماهیان و نیز سهولت کار هست (۹). روش‌های متفاوت بیهوشی باعث تفاوت در سطوح شاخص‌های استرس می‌شود (٦). زمان بیهوشی و غلظت ماده بی‌هوش کننده دو عامل مهم در تعیین سطوح شاخص‌های استرس می‌باشند. درحالی‌که برخی محققین استفاده از دوزهای بالای بی‌هوش کننده در زمان‌های کوتاه یا برعکس را برای کاهش استرس پیشنهاد نمودند (۷، ١٦). امروزه از داروهای متعددی برای بیهوشی ماهیان استفاده می‌شود که در این راستا می‌توان به داروهایی هم چون متومیدات، فنوکسی اتانول، یوجنیول، MS-222، تری کایین متان سولفات و عصاره میخک اشاره نمود (۱، ۱۱). علاوه بر دوز و زمان، عامل اثرگذار دیگر در عملیات بیهوشی، مراحل بیهوشی هست. مراحل بیهوشی خود متأثر از غلظت ماده بیهوشی و مدت‌زمان قرارگیری در معرض آن است که بر اساس رفتارهای ماهی در خلال بیهوشی تعریف می‌شوند و تابع زمان بیهوشی و غلظت ماده بی‌هوش کننده است (۳).

در واقع تغییرات رفتاری می‌توانند مبنای قضاوت برای شروع خون‌گیری باشند؛ زیرا عملاً تا زمانی که ماهی بی‌حرکت نشده باشد، خون‌گیری ساده نخواهد بود و بیهوشی فایده‌ای نخواهد داشت (٤). مراحل مختلف بیهوشی در ماهی از تحریک اولیه تا از دست رفتن تعادل مطالعه و توصیف‌شده‌اند که بر این اساس می‌توان ماهی را پس از رسیدن به مرحله ٤ (از دست دادن واکنش عضلات و تعادل) و ٥ (از دست دادن کامل واکنش) بیهوشی، خون‌گیری نمود (۱۷).

از آنجا که در هر دو مرحله ماهیان بی‌حرکت هستند، بنابراین تفاوتی در سهولت خون‌گیری بین این دو مرحله وجود ندارد. ولی اثر این مراحل بر پارامترهای خونی مانند شاخص‌های استرس باید مشخص گردد (۱). ماهی شیربت *Barbus grypus* از ماهیان بومی باارزش و اقتصادی استان خوزستان و متعلق به باربوس ماهیان از خانواده کپور ماهیان هست. در سال‌های اخیر بر روی تکثیر و پرورش این ماهی ارزشمند تلاش‌های بسیار زیادی شده است (۸).

کورتیزول عمده‌ترین کورتیکوستروئیدی است که در اثر تحریکات محیطی–مغزی از بافت بین کلیوی ماهی به داخل جریان خون ماهیان استخوانی آب شیرین و دریا ترشح می‌شود. گزارش‌شده است که کورتیزول هیپرگلیسمیک (بالابرنده‌ی قند خون) است و گلیکولیز (تجزیه گلیکوژن) و گلیکوژنز از پروتئین‌ها و چربی‌ها و تنظیم اسمزی و رشد را تحریک می‌کند (۲، ۳).

مطالعات متعددی درزمینه غلظت بی‌هوش کننده و کشنده مواد بیهوشی مختلف و اثر دما و غلظت برخی از آن‌ها بر شاخص‌های خونی و بافتی گونه‌های مختلف انجام‌شده است که می‌توان به بررسی روی گونه ماهی گوپی *Poecilia reticulate* (۲۲)، ماهی قرمز *Carassius auratus* (٦)، بافت کبد ماهی شیربت *Barbus grypus* (۲۳)، ماهی کپور علف خوار (۱) و ماهی کلمه خزری *Rytulus caspicus* (۹) اشاره نمود. در بررسی که حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۲ بر غلظت‌های مختلف یوجنول بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی قرمز انجام دادند نتایج نشان داد زمان بیهوشی عامل کلیدی تعیین‌کننده سطوح گلوکز و کورتیزول است و تأثیر بیشتری نسبت به غلظت ماده بیهوشی دارد. در ادامه این مطالعات در پژوهشی که در سال ۱۳۹۵ تجار و همکاران براثر سه ماده بیهوشی بر میزان گلوکز و کورتیزول خون ماهی کپور نقره‌ای انجام داند و نتایج حاکی از اثر استرس‌زای ۲–فنوکسی اتانول بود. اما مطالعه‌ای در جهت تعیین دوز مؤثر بیهوشی۲–فنوکسی اتانول و MS-222 و تعیین اثر این

غلظت در زمان‌های بعد از بیهوشی از دیدگاه فاکتورهای استرس خون بر ماهی شیربت صورت نگرفته است.

ازاین‌رو این تحقیق باهدف بررسی و مقایسه دو ماده بیهوشی مذکور که عمدتاً در تکثیر و پرورش ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند به اجرا درآمد.

نتایج این تحقیق می‌تواند در انتخاب ماده بیهوشی مناسب و حداقل غلظت موردنیاز با بالاترین حاشیه امنیت در عملیات تکثیر و انتقال ماهی کمک نماید و با تشخیص میزان تأثیر استرس فیزیولوژیک آن‌ها ماده بیهوشی مناسب توصیه گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و آداپتاسیون: به‌منظور انجام این بررسی تعداد ٤٠٠ قطعه ماهی شیربت *Barbus grypus* جهت دو مرحله آزمایش با میانگین وزنی ۵۰±۵ گرم از کارگاه پرورش ماهیان گرمابی شوشتر تهیه، آماده و مورد آزمایش قرار گرفتند. ماهیان پس از هم‌دما سازی به تانک فایبرگلاس با حجم ۵۰۰ لیتر آب منتقل شدند. ماهیان به مدت ۲ هفته آداپتاسیون شدند و در طول این مدت میزان اکسیژن آب ٦/٥ppm، اسیدیته ۷/۵ و دمای آب ۲۸°c بوده و ماهی‌ها روزانه به میزان ۳٪ وزن بدن با غذای تجاری شرکت بیضاء شیراز غذادهی شدند. هرروز ۷۵ درصد آب تانک‌ها تعویض گردید.

آماده‌سازی مواد بی‌هوش کننده MS-222 و ۲-فنوکسی اتانول و آزمایش پایلوت: پودر MS-222 یا ترکائین متان سولفات بانام تجاری فینکوئل (ساخت شرکت آرژنت آمریکا) (۲۱) و داروی بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول با فرمول شیمیایی $C_8H_{10}O_2$ (ساخت شرکت مرک آلمان) خریداری شد. پس از اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب، در یک آزمایش اولیه (پایلوت) تعدادی ماهی در غلظت‌های مختلف دو ماده بیهوشی مذکور قرار گرفتند تا وضعیت بی‌هوش کنندگی این ترکیبات دارویی در گونه موردنظر به دست آید سپس تیمار بندی انجام شد.

تعیین بهترین غلظت بیهوشی داروهای بیهوشی مورد استفاده و تیماربندی: به‌منظور محاسبه غلظت مؤثر مواد بیهوشی بر اساس منابع و سوابق قبلی (۱، ۸ و ۲۱) و مطالعات اولیه حدود غلظت بیهوشی هر ماده مشخص گردید و سپس غلظت‌های کمتر و بیشتر که دربرگیرنده غلظت‌های مؤثر باشد در مورد هر داروی بیهوشی تعیین شد (۱۱). بر این اساس جهت هر ماده بیهوشی چهار تیمار با سه تکرار در نظر گرفته شد. به‌منظور مقایسه دقیق‌تر برای هر ماده بیهوشی یک گروه شاهد حاوی حلال در نظر گرفته شد تا اثرات حلال نیز مدنظر قرار گیرد. جهت تیمارها از تانک‌های ۲۰ لیتری فایبرگلاس و در هر مخزن از ۱۰ قطعه ماهی استفاده شد. تیمار بندی در جدول ۱ آورده شده است. تانک‌های بیهوشی برای هرکدام از تیمارها حاوی ۱۰ لیتر آب بوده و ماهیان که از ٢٤ ساعت قبل غذادهی نشده بودند، جداگانه به‌منظور ثبت مراحل مختلف بیهوشی با روش غوطه‌وری در این ظروف قرار داده‌شده و واکنش‌های رفتاری آن‌ها موردبررسی قرارگرفته شد؛ پس از رسیدن به مرحله ٤ و ۵ بیهوشی زمان بیهوشی ثبت شد. به‌منظور ریکاوری، ماهیان پس از بیهوشی، به یک تانک ۲۵۰ لیتری حاوی آب تازه (همراه با هوادهی) منتقل‌شده و واکنش‌های رفتاری آن‌ها موردبررسی قرار گرفت. زمان بازگشت از بیهوشی نیز بعد از تثبیت کامل تعادل و واکنش به تحریک خارجی ثبت گردید. با توجه به نتایج غلظت القای بیهوشی در ۳ دقیقه و ریکاوری در ۵ دقیقه، به‌عنوان غلظت مناسب و مؤثر بیهوشی (۱، ۸) دارو مورد استفاده در نظر گرفته شد.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری کورتیزول و گلوکز خون: نمونه‌گیری از ماهیان در غلظت مؤثر (محاسبه‌شده در مرحله قبل)، در فواصل زمانی ۳ دقیقه – ٦ ساعت –

۱۲ ساعت و ۲٤ ساعت پس از بیهوشی به روش قطع ساقه دمی در لوله‌های غیر هپارینه انجام شد. در هر فاصله زمانی از تعداد ٤ قطعه ماهی خون‌گیری به عمل آمد در مورد تیمار شاهد هم در هر فاصله زمانی از چهار قطعه ماهی خون‌گیری شد. اگرچه این ماهی‌ها بی‌هوش نشده بودند و فقط در آب فاقد داروی بیهوشی غوطه‌ور شدند. سرم نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه تهیه شد و تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هورمون کورتیزول به روش ELISA توسط کیت تجاری (HBL آلمان) و برحسب نانوگرم/میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. گلوکز به روش GOD/PAP با کیت شرکت زیست‌شیمی (تهران، ایران) و برحسب میلی‌گرم/دسی لیتر اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: ترسیم نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel و مقایسات آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. به این منظور از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت مقایسات بین تیمارها و آزمودن تکمیلی Duncan جهت مشخص نمودن گروه‌های متفاوت استفاده شد. به‌منظور بررسی ارتباط میان کورتیزول و گلوکز سرم از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. سطح اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

جدول ۱- غلظت‌های به‌کاررفته برای تعیین غلظت مؤثر بیهوشی

ماده بیهوشی	غلظت‌های استفاده‌شده برای بیهوشی
MS-222	شاهد و٤۰ و ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم/لیتر
۲-فنوکسی اتانول	شاهد و ۲۰۰ و ۳۰۰ و ٤۰۰ میکرو لیتر/لیتر

نتایج

غلظت بی‌هوش کنندگی مواد بیهوشی مورداستفاده: زمان بی‌هوش کنندگی و ریکاوری دو ماده بیهوشی MS 222 و ۲-فنوکسی اتانول در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج دوز مؤثر بیهوشی با MS 222 ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد. بر اساس نتایج جدول ۳ دوز مؤثر بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول ۳۰۰ میکرو لیتر بر لیتر محاسبه گردید.

شاخص‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده: نتایج مربوط به‌اندازه گیری هورمون کورتیزول و گلوکز در هر ماده بیهوشی در زمان‌های مختلف در جداول ٤ و ۵ آورده شده است. بررسی‌های آماری نشان می‌دهد میزان کورتیزول سرم در تیمار ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از بیهوشی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارها نشان داد ($p< ۰/۰۵$) و در سایر تیمارها اگرچه باگذشت زمان میزان کورتیزول افزایش نشان می‌دهد اما این افزایش معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$). میزان گلوکز سرم خون در تیمار ۳ دقیقه و ٦ ساعت پس از بیهوشی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان داده و تیمارهای ۱۲ و ۲٤ ساعته نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد ($p< ۰/۰۵$). بیشترین مقدار کورتیزول و گلوکز در تیمار ۲٤ ساعت پس از بیهوشی به دست آمد. بررسی آماری نتایج نشان می‌دهد در تیمار با ماده بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول، میزان کورتیزول و گلوکز سرم در تیمار ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از بیهوشی افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p< ۰/۰۵$) و در تیمار ۳ دقیقه

پس از بیهوشی اگرچه باگذشت زمان میزان کورتیزول و گلوکز خون افزایش نشان می‌دهد اما این افزایش معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). بیشترین مقدار کورتیزول و گلوکز در تیمار ٢٤ ساعت پس از بیهوشی به دست آمد.

نتایج مطالعه همبستگی پیرسون میان میزان کورتیزول با گلوکز نشان داد بین این دو فاکتور همبستگی معنی‌داری وجود دارد (p< ۰/۰۵) و رابطه مستقیمی میان کورتیزول سرم و گلوکز سرم مشاهده می‌شود به‌طوری‌که افزایش کورتیزول سبب افزایش گلوکز سرم شده است. مقایسه آماری بین میزان کورتیزول و گلوکز در هر یک از مواد بیهوشی مورداستفاده نشان می‌دهد که اگرچه افزایش مختصری در میزان کورتیزول نسبت به گلوکز در هر یک از زمان‌های پس از بیهوشی مشاهده می‌شود اما این تفاوت معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). مقایسات در شکل ۱ و ۲ آورده شده است.

مقایسه آماری میزان کورتیزول و گلوکز بین دو ماده بیهوشی مورد استفاده نشان می‌دهد که اگرچه افزایش مختصری در میزان دو فاکتور مورداندازه‌گیری در ۲- فنوکسی اتانول نسبت به MS-222 دیده می‌شود اما معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). مقایسات در شکل ۳ و ٤ آورده شده است.

جدول ۲- نتایج زمان بیهوشی و ریکاوری در MS-222

غلظت (میلی‌گرم / لیتر)	زمان بیهوشی (ثانیه)	زمان ریکاوری (ثانیه)
٤٠	٤٠٠ ± ٥٢	٢٤٠ ± ٣٥
٥٠	١٧٠ ± ٢٠	٣٠٢ ± ٣٤
٨٠	١٠١ ± ١٨	٣٥٠ ± ٥٦

جدول ۳- نتایج زمان بیهوشی و ریکاوری در ۲- فنوکسی اتانول

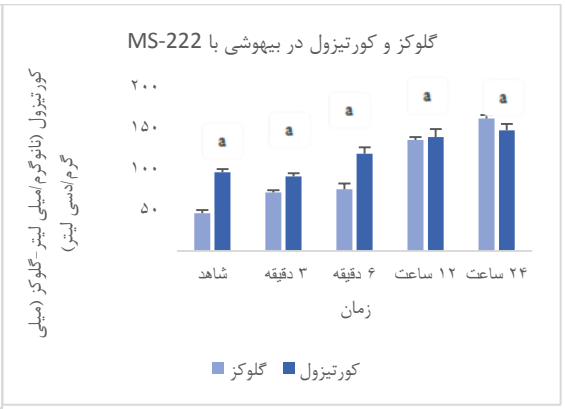
غلظت (میکرو لیتر/ لیتر)	زمان بیهوشی (ثانیه)	زمان ریکاوری (ثانیه)
٢٠٠	٢١٤±٢٥	٣٠٠±٣٢
٣٠٠	١٤٠ ±١٥	٢٤٥±٢٨
٤٠٠	٥٠±٨	١٨٠±١٩

جدول ٤- میزان گلوکز و کورتیزول سرم خون در زمان‌های مختلف خون‌گیری در دوز مؤثر بیهوشی با MS-222

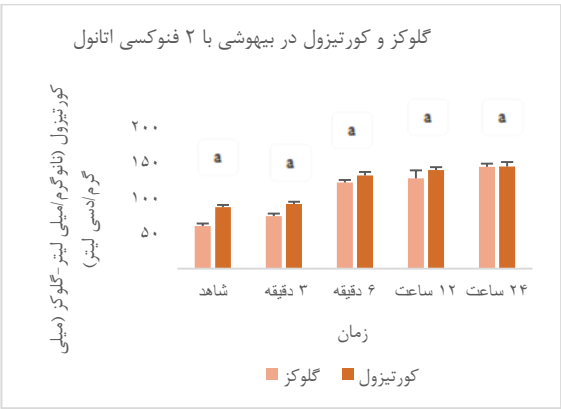
زمان خون‌گیری	گلوکز (میلی‌گرم/ دسی لیتر)	کورتیزول (نانوگرم / میلی‌لیتر)
٣ دقیقه	٧١ ^{b} ± ٣/٧	٩٠/٨ ^{a}± ٢/٩
٦ ساعت	٧٥ ^{b} ± ٨	١١٨/٢ ^{a}± ٧/١
١٢ ساعت	١٣٥ ^{c} ± ٩/٥	١٣٨/٥ ^{b}± ٣/٦
٢٤ ساعت	١٦١ ^{c} ± ٨	١٤٦/٥ ^{b}± ٤/٢
شاهد	٤٦ ^{a} ± ٤	٩٥/٥ ^{a}± ٣/٨

جدول ۵- میزان گلوکز و کورتیزول در زمان‌های مختلف خون‌گیری در دوز مؤثر بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول

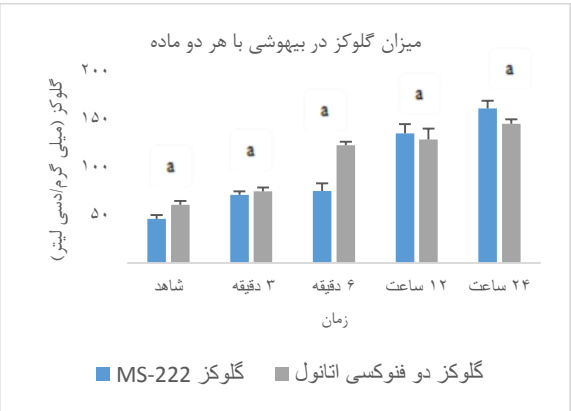
زمان خون‌گیری	گلوکز (میلی‌گرم/ دسی لیتر)	کورتیزول (نانوگرم / میلی‌لیتر)
۳ دقیقه	۷٤/۷ ^{a} ± ٤	۹۲/۱ ^{a}± ۳/۱
٦ ساعت	۱۲۲/۷ ^{b}± ۳/٦	۱۳۲/۵ ^{b}± ۵/۱
۱۲ ساعت	۱۲۸/۵ ^{b} ± ۱۱/۵	۱٤۰/٦ ^{b}± ۳/۹
۲٤ ساعت	۱٤۵ ^{b}± ٤/۷	۱٤۵/۵ ^{b}± ٦/٤
شاهد	٦۰/٦ ^{a}± ٤	۸۷/۸ ^{a}± ۳/۲



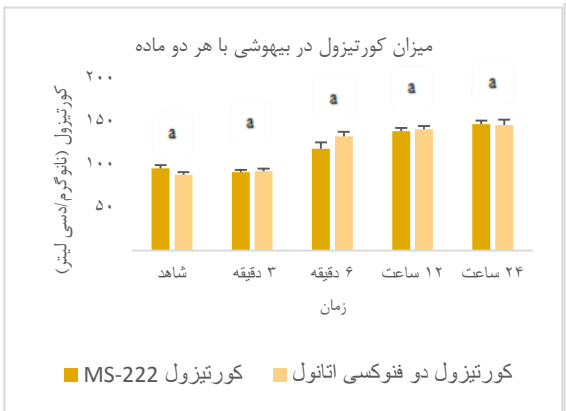
شکل ۱- مقایسه کورتیزول و گلوکز در اثرMS-222



شکل ۲- مقایسه کورتیزول و گلوکز در اثر ۲-فنوکسی اتانول



شکل ۳- مقایسه میزان کورتیزول سرم در دو ماده بیهوشی



شکل ٤- مقایسه میزان گلوکز در دو ماده بیهوشی

بحث

با توجه به اینکه استفاده از داروهای بی‌هوش کننده در آبزیان اجتناب‌ناپذیر است (۵، ۸)، لذا انتخاب یک داروی بیهوشی مناسب ز اهمیت بالایی برخوردار است (۷، ١٤). با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر هر دو ماده بیهوشی مورد استفاده می‌توانند به‌عنوان ماده بی‌هوش کننده مؤثر در ماهی شیربت استفاده شوند و هر دو ماده در کلیه دوزهای مؤثر بیهوشی برای ماهی شیربت ایمن بوده و هیچ‌گونه

تلفاتی مشاهده نشد. نتایج نشان داد ۲-فنوکسی اتانول کارایی بیشتری نسبت به MS-222 داشته زیرا در زمان کمتری توانست سبب بیهوشی ماهی گردد که عکس این نتیجه در مطالعه علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۹۵ به دست آمد و علت تفاوت نتایج می‌تواند سن و گونه ماهی مورد آزمایش باشد (٦).

نظر به اینکه منطقه اصلی ورود و خروج مواد بی‌هوش کننده در ماهیان، آبشش ها هستند و میزان عبور این مواد از آبشش ها و جذب آن‌ها در مغز بستگی زیادی به قابلیت انحلال آن‌ها در چربی دارد، شروع نسبتاً سریع مراحل ۲ و ۳ بیهوشی حاصل از ۲-فنوکسی اتانول نسبت به MS-222 ممکن است به دلیل قابلیت انحلال بیشتر آن در چربی این بافت باشد (۲).

زمان القای بیهوشی و زمان بهبودی در مواد بیهوشی مورداستفاده با افزایش غلظت ماده کاهش می‌یابد و رابطه معکوس دارد که با نتایج حسینی و همکاران (۱۳۹۲)، جواد زاده و همکاران (۱۳۹٤)، علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) و مازندرانی و همکاران (۱۳۹۷) مطابقت دارد. در تحقیقات مشابه دوز مؤثر برای ۲-فنوکسی اتانول ٤۰۰-۳۰۰ میکرو لیتر/لیتر و برای ماده MS-222 حدود ٦۰-۵۰ میلی‌گرم/لیتر در گونه‌های مختلف ذکر شده است. از جمله ماهی سیم خط طلایی توسط هسو و همکاران (۱۹۹۸)، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط ولیسک و همکاران (۲۰۱۱) و در ماهی کپور معمولی توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۹۵) این نتایج ذکرشده است و با نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر مطابقت دارد.

بررسی نتایج زمان بازگشت از بیهوشی در دو ماده موردبررسی نشان می‌دهد زمان در بیهوشی با غلظت‌های بالای MS-222 طولانی‌تر از ۵ دقیقه بود که دلیل آن را می‌توان تأثیر بازدارندگی ماده بیهوشی بر سیستم تنفسی ماهی (۱۵) و کاهش میزان تنفس و به‌تبع آن کاهش توانایی دفع ماده بیهوشی از سیستم آبششی ماهی مربوطه دانست (۱۷).

نتایج بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد بیشترین میزان کورتیزول و گلوکز در دوز مؤثر بیهوشی هر دو ماده بیهوشی در زمان ٢٤ ساعت پس از بیهوشی بوده است و کمترین میزان آنها مربوط به تیمار شاهد هست. بررسی‌ها نشان می‌دهد در ٦ تا ٤٨ ساعت اول استرس، موجود زنده تغییرات شیمیایی را در خون تجربه می‌کند مانند افزایش هورمون کورتیزول و قند خون و غیره که به آن واکنش اخطار عمومی بدن GAR گفته می‌شود (۱۸).

در این مطالعه نیز مطابق موارد گفته‌شده واکنش اخطار عمومی رخ‌داده است و به‌تدریج از دقایق اولیه پس از ریکاوری هورمون کورتیزول و گلوکز روند افزایشی داشته است و در ٢٤ ساعت پس از بیهوشی به بالاترین سطح خود رسیده است. بالا رفتن غلظت کورتیزول و گلوکز پلاسما به‌عنوان شاخص استرس در ماهیان استفاده می‌شود و برخی از روش‌های بیهوشی می‌تواند باعث افزایش این شاخص ها شود که نشان‌دهنده استرس است و این نتیجه با یافته‌های با آبرو و همکاران در سال ۱۳۹۵ در تاس ماهی شیپ مطابقت دارد. با توجه به تأثیر هورمون کورتیزول بر گلوکوژنز و گلوکونئوژنز همان‌گونه که انتظار می‌رود در دقایق اولیه بیهوشی قند خون ماهی افزایش معنی‌دار نداشته است اما در ساعات بعدی به علت نیاز به گلوکز در اثر استرس ایجادشده (مانند دست‌کاری، دما و تغییرات محیطی) افزایش‌یافته است (۱۹).

نتایج مشابه سیر صعودی کورتیزول و گلوکز با افزایش زمان پس از بیهوشی ماهی با همبستگی مستقیمی که در تحلیل داده‌های آن‌ها به دست آمد مطابقت دارد. به‌طوری‌که مطالعه همبستگی پیرسون میان کورتیزول و گلوکز سرم خون ماهی شیربت نشان می‌دهد که بین این دو شاخص در هر دو ماده بیهوشی موردبررسی

رابطه مستقیم وجود دارد به این معنی که با افزایش میزان کورتیزول، گلوکز سرم افزایش‌یافته است که اگرچه مشابه این نتیجه در بررسی حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۲ در خون ماهی قرمز به دست آمد اما در برخی گونه‌های ماهی عکس این رابطه به‌دست‌آمده است (۱۳) و نشان می‌دهد که احتمالاً اثرات استرس‌زای مواد بیهوشی وابسته به گونه ماهی موردبررسی است. لازم به ذکر است تغییر شاخص‌های بیوشیمیایی کورتیزول و گلوکز در اثر مواد بیهوشی عمومیت نداشته و در برخی مطالعات مانند نتایج تجار و همکاران که بررسی در سال ۱۳۹۵ بر روی ماهی کپور تقره ای انجام دادند عدم‌تغییر معنی‌دار بر این شاخص‌ها گزارش‌شده است (۲۰) و این امر می‌تواند به علت تفاوت‌های گونه‌ای ماهیان و یا سایر عوامل محیطی مانند دوز و نوع ماده بیهوشی و سایر عوامل محیطی باشد که در مطالعه مصباح و همکاران در سال ۱۳۹٤ بر تأثیر متغیرهای محیطی اشاره می‌شود که شاخص‌های خونی و هورمون کورنیزول تحت تأثیر شوری محیط در ماهی بنی قرارگرفته است و می‌تواند در ماهی شیربت در مطالعه حاضر نیز تطابق داشته باشد. مقایسه میزان کورتیزول و گلوکز بین دو ماده بیهوشی مورداستفاده نشان می‌دهد که هیچ‌گونه افزایش یا کاهش معنی‌داری در میزان دو فاکتور مورد اندازه‌گیری در ۲–فنوکسی اتانول نسبت به MS-222 دیده نمی‌شود و مواد بیهوشی به‌کاررفته تأثیرات مشابهی بر میزان کورتیزول و گلوکز سرم داشته است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قضاوت روی رفتار ماهی می‌تواند مبنای مناسبی برای بیهوشی و شروع خون‌گیری باشد، هر دو ماده بیهوشی تأثیر یکسانی بر فاکتورهای استرس دارند و زمان بیهوشی عامل کلیدی تعیین‌کننده سطوح گلوکز و کورتیزول در ماهی است و تأثیر بیشتری نسبت به غلظت ماده بیهوشی دارد. لذا پیشنهاد می‌شود که ماهیان در زمان یکسان خون‌گیری شوند تا داده‌های به‌دست‌آمده متأثر از زمان نمونه‌برداری نباشند برای کاهش استرس ناشی از بیهوشی بهتر است که زمان بیهوشی کوتاه (زیر ۱ دقیقه) باشد، همچنین افزایش مدت زمان مجاورت با ماده بیهوشی و افزایش غلظت ماده بیهوشی نسبت به غلظت مؤثر در این‌گونه توصیه نمی‌گردد.

منابع

1. Alishahi M., Tulabi Dezfuli Z., Mesbah M., 2016. Comparison the effect of Ms-222, clove oil and 2-phenoxyethanol on some blood and immunological parameters in *Cyprinus carpio*. *Journal of Aquatic Usage and Breeding*, 5(3): 31-48. [In Persian]

2. Baabru J., Khara H., Yusefi Jurdehi A., 2016. Impact of anesthesia on some of physiological parameters in *Acipencer nudiventris*. *Journal of Sciences and Technology*, 15(3): 46-53. [In Persian]

3. Beikzadeh Takeri A., Imanpur M.R., Taghizadeh V., 2014. Effect of salinity stress on chloride cells and gill histopathology in *Cyprinus carpio* fingerlings fed with edible cortisol. *Journal of Animal Biology*, 7(2): 13-24. [In Persian]

4. Boijink C.L., Maciel P.O., Tavares-Dias M., Iwashitab M.K.M., Morias M.S., Hidee D.M.V., 2017. Anesthesia by sprinkling method in the gills of tambaqui *Colossoma macropomum* does not influence intensity and morphology of monogeneans. *Brazilian Journal of Biology*, 77(2): 367-371.

5. Diemer O., Hertes N.D., Bittencourt F., Signor A., Rogerio Boscolo W., Feiden A., 2012. Eugenol as anesthetic for silver catfish with different weight. *Journal of semina ciencias agrarias*, 33(4): 1495-1500.

6. Faheem M., Jahan N., Lone K.P., 2016. Histopathological effects of biofenol-A on liver, kidney, and gills Indian major carp,

Biodiversity and Environmental Sciences, 10(4): 27-37.

15. Pawer H.B., Sanaye S.V., Sreepada R.A., Harish V., Surgavanshi U., Ansari, T.Z.A., 2011. Comparative efficacy of four anesthetic agent in the Yellow sea horse (*Hippocampus kuda*). *Aquaculture*, 311: 155-161.

16. Ross G.L., Ross B., 2008. Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3rded. Blackwell Science, Oxford, UK. 222p.

17. Sneddon L.U., 2012. Clinical anesthesia and analgesia in fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1): 32-43.

18. Summerfelt R.C., Smith L.S., 1990. Anesthesia, surgery, and related techniques. In: Schreck RC, and Moyle PB (eds) Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA, 213–272.

19. Tagari M., Azimi A., Kolangi Myandareh H., Izi R., Sharifzadeh E., 2012. Effect of clove oil on anesthesia of *Poecilia reticulate*. *Journal of Animal Biology*, 4(4): 21-26. [In Persian]

20. Tojar S., Khodadadi M., Javaheri M., 2017. Comparison the effects of 2-phenoxyethanol, clove oil and PI-222 as anesthesia substances on glucose and cortisol of *Hypophthalmichthys molitrix*, *Journal of Aquaculture Development*, 10(1): 11-23. [In Persian]

21. Velisek J., Srobodova Z., Plackova V., 2005. Effects of Clove oil anesthesia on Rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). *Acta Veterinarian Brno*, 74: 139-146.

22. Weber R.A., Peleteiro J.B., Garcia M.L.O., Aldegunde M., 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222as anesthetic agents in the Senegalese sole (*Soleasenegalensis kaup* 1858). *Aquaculture*, 288: 147-150.

23. Yarmand A., Mabudi H., Javadzadeh N., 2015. Determination of MS-222 *Catla catla. The journal of animal and plant sciences*, 26(2): 514-522.

7. Hoseini S.M., Jafar Nodeh A., 2011. Changes in blood biochemistry of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus), following exposure to different concentrations of clove solution. *Comparative Clinical Pathology*, [In Persian]

8. Hoseini M., Ghelichpur M., 2013. The effect of different concentrations of eugenol and anesthesia time on some biochemical parameters in *Carassius auratus. Journal of* Research *Applied Ichthyology*, 1(1): 29-40. [In Persian]

9. Hudson J.M., Johnson J.R., Kynard B., 2011. A portable electronarcosis system for anesthezing salmonids and other fish. *Northern American JFM*, 31: 335-339.

10. Javadzadeh N., Teimuri M., Mabudi H., 2015. Survey effect of 2-phenoxyethanol on liver tissue of *Barbus grypus*. *Journal of Animal Biology*, 8(2): 1-9. [In Persian]

11. Mazandarani M., Marzi I., Hedayati A.A., Imanpoor M.R., Jafari V., 2018. Survey on anesthetic effects in different concentrations of Eugenol on fingerlings and broodstocks Caspian Roach (*Rutilus caspicus*). *Animal Physiology and Development Journal*, 43(11): 37-48. [In Persian]

12. Mesbah M., Mohamadian T., Karami A., Molayam Raftar T., Nazari M., 2015. Survey the effect of salinity on some blood parameters and cortisol hormone in *Barbus sharpeyi. Journal of Aquatic Ecology*, 2(5): 68-72. [In Persian]

13. Ogrentmen F., Golbasi S., Kutluyer F., 2016. Efficacy of clove oil, benzocaine, eugenol, 2-phenoxyethanol as anesthetics on *Barbus grypus. Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(1): 470-478.

14. Padiyoor B.A., Benno F., Pereira Jayaprakas V., 2017. Assessment of clove oil and benzocaine anesthesia on hematological and histopathological profile of *Haludaria fasciata. Journal of*

anesthetic dose and its effects on liver and kidney tissues of *Barbus grypus*. 2nd international conference on advances in environment, agriculture and medical sciences, Antalya, Turkey, 40-43.