بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

مقایسه اثر سه داوری بیهوشی MS222، اسانس گل میخک و ۲– فنوکسی اتانول بر برخی شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*)

*مجتبی علیشاهی[۱]، زهرا طولابی دزفولی[۲] و مهرزاد مصباح[۱]
[۱]دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران،
[۲]دانشجوی دکتری بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۲۶

چکیده

در مطالعه حاضر اثر بیهوشی سه ماده ام اس ۲۲۲ (تریکائین متان سولفونات)، اسانس میخک و ۲– فنوکسی اتانول بر برخی فاکتورهای خونی و پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور علف‌خوار ارزیابی گردید. ابتدا غلظت مناسب ایجاد بیهوشی با هر یک از مواد مورد بررسی مشخص گردید. سپس ماهی‌ها با غلظت‌های به‌دست آمده بیهوش گردیدند و در زمان‌های ۱، ۱۲، ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی از ماهی‌ها خونگیری شده و پارامترهای خون‌شناسی شامل: هماتوکریت، میزان هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و اندیس‌های گلبولی شامل: MCV, MCH, MCHC تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان ندادند (P>۰/۰۵) تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی، فاکتورهای ایمنی شامل: میزان فعالیت لایزوزیم سرم، قدرت باکتری کشی سرم، میزان پروتئین تام و گلوبولین در ماهی کپور علف‌خوار بین تیمارها مقایسه گردید. نتایج نشان داد که بیهوشی با ام اس ۲۲۲، اسانس میخک و ۲– فنوکسی اتانول تأثیری بر فاکتورهای خون‌شناسی ماهی کپور علف‌خوار در مراحل مختلف نمونه‌گیری ندارند. ولی نسبت گلبول‌های سفید خونی تغییر نموده به‌طوری که نسبت نوتروفیل‌ها در تیمار اسانس گل میخک و ۲– فنوکسی اتانول در زمان ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی افزایش و نسبت لنفوسیت‌ها کاهش

*مسئول مکاتبه: alishahim@scu.ac.ir

نشان داد (P<۰/۰۵). در بین فاکتورهای ایمنی فعالیت لایزوزیم نیز در دو تیمار گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول در ۱۲ ساعت بعد از بیهوشی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵) در بین سه داروی بیهوشی مورد بررسی اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی کپور علف‌خوار تأثیر داشته و ام اس ۲۲۲ کمترین اثر را بر فاکتورهای فوق داشت، لذا توصیه می‌گردد در تحقیقات از ام اس ۲۲۲ استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ماهی آمور، ام اس ۲۲۲، اسانس گل میخک، ۲- فنوکسی اتانول، شاخص‌های خونی و فاکتورهای ایمنی

مقدمه

بیهوشی (Anesthesia) کلمه‌ای یونانی است و به معنای از دست دادن احساس است و از بی‌حسی مشتق شده و حالتی قابل برگشت از عدم احساس برای سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌های بدن می‌باشد. در این حالت فعالیت قشر مخ برای مدتی مختل می‌شود. این واژه اشکال متفاوتی را در بر می‌گیرد که هر یک دارای تعریف متفاوتی هستند (راس و راس، ۱۹۹۹). روش‌های بیهوشی عمومی معمولاً با اختلال همه جانبه سیستم اعصاب مرکزی تولید شده در اثر عمل روی آکسون‌های عصبی، رهاسازی میانجی‌ها یا قدرت تحریک‌پذیری غشاها عمل می‌کنند. تنها قاعده کلی در مورد بیهوشی عمومی این است که داروهای بیهوشی با اجزا غشاها وارد عمل شده و هیچ ساز و کار سلولی واحدی به‌نظر نمی‌رسد که قادر به توصیف تأثیر گسترده آن‌ها در سیستم اعصاب مرکزی باشد (وینلو و همکاران، ۱۹۹۲). شایان ذکر است که در مورد نوع عمل دقیق داروهای بیهوشی در مهره‌داران و ماهی اطلاعات کمی موجود است. هرچند در مورد برخی داروها به‌نظر می‌رسد ارتباط معکوس بین میزان دوز موردنیاز برای القا و ایجاد بیهوشی و وضعیت رفتاری حیوان وجود داشته باشد. در نتیجه ماهی به دوز بیشتری از دارو نیاز خواهد داشت. اظهار شده که این پدیده احتمالاً مربوط به افزایش جایگاه‌های فعال موجود در مهره‌داران کامل‌تر برای هر شکل از اجزای مولکولی است.

مطالعه سیستم ایمنی ماهیان نسبت به پستانداران هنوز نوپاست و سیستم ایمنی ماهیان نسبت به پستانداران تکامل کمتری یافته است (اورتونو و همکاران، ۲۰۰۲). سیستم ایمنی ذاتی ماهیان اولین خط دفاعی آن‌ها در برابر پاتوژن‌ها می‌باشد و در مقایسه با پستانداران از اهمیت بیشتری برخوردار است.

ایمنی ذاتی از لحاظ فیلوژنیک بسیار قدیمی‌تر است و در اشکال مختلف در همه ارگانیسم‌های چند سلولی یافت می‌شود (وایت، ۲۰۰۷). در حالی‌که ایمنی اختصاصی در حدود ٤٥٠ میلیون سال پیش به وجود آمده و در همه مهره‌داران به غیر از ماهیان بدون فک وجود دارد (زارکاردیس و همکاران، ۲۰۰۱). ماهیان به خاطر تکامل اولیه شان به مقدار زیادی وابسته به ایمنی غیر اختصاصی/ ذاتی می‌باشند (ساهو، ۲۰۰٤). سیستم ایمنی ذاتی نقش سازنده‌ای در پاسخ سیستم ایمنی اختصاصی و حفظ هموستاز دارد و به‌عنوان اولین خط دفاعی در میزبان، تا افزایش پاسخ سیستم ایمنی اختصاصی عوامل پاتوژن را محدود می‌کند. مولکول‌های مهمی مثل لایزوزیم، میلوپروکسیداز، سوپراکسیداز، پروتئین‌های فاز حاد، اینترفرون، کمپلمان و ... تعدادی از شاخص‌های سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند و اغلب به‌عنوان شاخصی از پاسخ به عوامل استرس‌زا و مقاومت در برابر بیماری شناخته می‌شوند. سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان از اهمیت کلیدی در حفظ هموستاز برخوردار است، چرا که ماهی در محیطی سرشار از پاتوژن‌ها غوطه‌ور است (ایکانو، ۱۹۸۰).

از جمله اندام‌ها و بافت‌های مهم درگیر شناخته شده در واکنش‌های ایمونولوژیک ماهیان می‌توان به کلیه، تیموس، طحال، کبد، پوست و موکوس اشاره کرد. در این بین با توجه به نقش خون‌سازی بافت‌های کلیه و طحال و نیز منشاء لنفوسیتی، این بافت‌ها از اهمیت خاصی در پاسخ‌های ایمنی این جانوران برخوردار هستند (سلطانی، ۲۰۰۸).

یکی از شاخص‌های مهم در ایمنی ذاتی ماهی لایزوزیم می‌باشد. در واقع لایزوزیمک پلی پپتید ۱۲۰ اسیدآمینه‌ای در ماهیان است که دارای فعالیت لیزکنندگی بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی بوده و قادر به شکستن پیوندهای گلیکوزیدی لایه پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت است. این آنزیم در موکوس، بافت‌های لنفوئیدی، پلاسما و دیگر مایعات بدن ماهیان آب شیرین و دریایی وجود دارد. لایزوزیم توسط نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها و به مقدار کمتری توسط ماکروفاژها تولید می‌شوند. در ماهیان، لایزوزیم فعالیت بیشتری از پستانداران دارد و اغلب به‌عنوان شاخص مهمی از سیستم ایمنی ذاتی شناخته می‌شود (دمرس و بای، ۱۹۹۷). لایزوزیم در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال، دستگاه گوارش و سرم خون ماهیان یافت می‌شود (جولس و جولس، ۱۹۸٤). در کنار اعمال ضد باکتری، این آنزیم بیگانه‌خواری را با تأثیر مستقیم بر لوکوسیت‌های چند هسته‌ای و ماکروفاژها و یا به‌طور غیرمستقیم از طریق تأثیرات تسهیل کننده بیگانه‌خواری فعال می‌کند. بر اساس مطالعات به عمل آمده عوامل متعددی بر میزان تولید و اثر بخشی لایزوزیم مؤثر است که از

آن جمله می‌توان به مرحله بلوغ جنسی، جنس و گونه ماهی، درجه حرارت محیط و فصل، تحریک آنتی‌ژنی، استرس و عفونت، تغذیه، شوری و پی اچ نام برد (سواین و همکاران، ۲۰۰۷). هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه تأثیر بیهوشی در مرحله نارکوزیس سه داروی MS 222، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر برخی پاسخ‌های ایمونولوژیک در ماهی کپور علفخوار می‌باشد. تا علاوه‌بر بررسی اثرات احتمالی این داروهای بیهوشی در واکنش‌های ایمنی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، مقایسه میزان تأثیر این داروها بر فاکتورهای ایمنی را به‌منظور انتخاب بهترین دارو (کمترین تداخل در واکنش‌های ایمنی) انجام داد.

مواد و روش کار

تیماربندی: تعداد ٤٥٠ قطعه ماهی کپور علفخوار ۱۰±۳۰ گرمی برای تعیین بهترین دوز بیهوشی برای داروهای بیهوشی مورد بررسی استفاده گردید و پس از تعیین بهترین و مناسبترین دوز، تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی کپور علفخوار با میانگین وزنی ۲۰±۱۲۰ گرمی استفاده شد. ماهی‌های طرح از کارگاه پرورش ماهیان گرمابی مهرگان ماهی جنوب واقع در مجتمع پرورش ماهی آزادگان حومه اهواز تهیه و به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل و ذخیره‌سازی گردیدند. تعویض آب به میزان ۲۰ درصد بوده و میزان اکسیژن آب را در حد ppm ۱۰-۸ نگه داشته و دمای آب در این مدت $^{\circ}$c ۲۸ بوده و ماهی‌ها با غذای مخصوص ماهی کپور معمولی تغذیه شدند.

داروهای بیهوشی مورد استفاده: پودر ام اس ۲۲۲ از شرکت اصلی تولید کننده آن یعنی شرکت آرژنت ایالات متحده آمریکا با نام تجاری فینکوئل (Finquel) با درصد خلوص ۹۸ درصد خریداری گردید. اسانس گل میخک ساخت داخل و تهیه شده به روش تقطیر آب و بخار با دستگاه کلونجر و با استفاده از ترکیبات هگزان، پنتان و همچنین آب و مخلوط آب- الکل به‌عنوان حلال و به نسبت‌های توصیه شده توسط فارماکوپه‌های معتبر در آزمایشگاه شرکت تولید و فراوری گیاهان دارویی شرکت پارس ایمن دارو تهیه و در تحقیق استفاده شد. ۲- فنوکسی اتانول (Ethylene glycol monophenyl ether) از شرکت مرک آلمان تهیه و به‌کار برده شد.

کیفیت آب: شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در تحقیق به قرار زیر بود. دما: $^{\circ}$c ۱±۲۵، اکسیژن محلول: ppm ۱۰-۸، PH:۷/۹±۰/۳؛ NO_2<۰/۰۱ppm؛ NH_3<۰/۱ppm.

طراحی تحقیق و روش نمونه‌گیری: اسانس گل میخک با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (سوداگران و همکاران، ۲۰۰۹؛ آندرسون و همکاران، ۱۹۹۷) برای القای بیهوشی و غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای تعیین غلظت کشنده استفاده گردید. ام اس ۲۲۲ دوزهای ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم در (پالیک و همکاران، ۲۰۰٦؛ گومولکا و همکاران، ۲۰۰۸؛ اورتونو و همکاران، ۲۰۰۲) برای بیهوشی و غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰، ٦۰۰، ۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای تعیین غلظت کشنده استفاده گردید.

۲- فنوکسی اتانول (مایلوناس و همکاران، ۲۰۰۵؛ سامرفلت و اسمیت، ۱۹۹۰) با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر قرار گرفتند (بهترین جواب ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد). ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ و ٤۰۰۰ میکرولیتر در لیتر برای غلظت کشنده استفاده شد. تلفات در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر ۵۰ درصد تلفات و در غلظت ۳۰۰۰ میکرولیتر تلفات ۷۰ درصد تلفات داشت. در غلظت ٤۰۰۰ میکرولیتر تلفات ۱۰۰ درصد بود.

برای هر غلظت ماده بیهوشی سه تکرار در نظر گرفته شده و از مخازن ۲۰ لیتری و در هر مخزن از ۱۰ ماهی استفاده شد. غلظت مناسب القای بیهوشی و غلظت کشنده داروی بیهوشی در جدول ۳ آورده شده است.

ایجاد بیهوشی با استفاده از اسانس گل میخک، ۲- فنوکسی اتانول و اماس ۲۲۲: بعد از مشخص شدن دوز بیهوشی هر ماده، تعداد ۲۵ قطعه ماهی ۲۰±۱۲۰ گرمی تحت بیهوشی تا مرحله تخدیری (نارکوزیس) با هر یک از مواد فوق قرار داده شد، یک تیمار هم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد (مجموعاً چهار تیمار)، برای بیهوش کردن ماهیان از آکواریم‌های ۵۰ لیتری استفاده شد و به محض مشاهده علایم: عدم پاسخ به تغییر وضعیت، کاهش در سطح تنفس، فقدان کامل تعادل، عدم واکنش به تحریک خارجی و کاهش تونوس عضلات (راس و همکاران، ۲۰۰۵) بیهوشی نارکوزیس تلقی شده و به آکواریوم‌های بازگشت از بیهوشی (ریکاوری) حاوی آب تازه دارای سیستم هوادهی که در آن‌جا ماهیان پس از طی زمان لازم مراحل ریکاوری را انجام می‌دهند، برای این عملیات نیز از آکواریم‌های ۱۵۰ لیتری استفاده شد.

تهیه نمونه خونی: در زمان‌های ۱، ۱۲، ۲٤، ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی اقدام به خـونگیری از ٦ قطعـه ماهی در هر تیمار گردید. قبل از اقدام به خونگیری از تعداد مساوی مـاهی (٦ عـدد در هـر سـاعت) به‌عنوان گروه شاهد که تحت هیچگونه ماده بیهوشی واقع نشده بودند صورت پذیرفت.

فاکتورهای خونی مورد بررسی

هماتوکریت (PCV): هماتوکریت یکی از آزمایشات مهم و متداول در خون‌شناسی می‌باشد. برای اندازه‌گیری از روش (Micro) که روش آدامز (Adams) نیز نامیده می‌شود استفاده گردید (فلدمن و همکاران، ۲۰۰۰).

میزان هموگلوبین: هموگلوبین به روش استاندارد سیانومت هموگلوبین محاسبه گردید. برای انجام این کار ۲۰۰ میکرولیتر خون را با ۵ سی سی محلول تجارتی درابکین (معرف سیانومت هموگلوبین) مخلوط نموده و پس از گذشت ۱۰ دقیقه از زمان مخلوط نمودن نمونه، برای انجام و تکمیل واکنش‌های شیمیایی، نمونه مخلوط شده به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور رسوب ذرات هسته با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده، جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ٥٤٠ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه می‌گردید (فلدمن و همکاران، ۲۰۰۰).

اندیس‌های گلبولی

حجم یک گلبول قرمز متوسط (Mean Cropuscular Volume) یا MCV: MCV حجم یک گلبول قرمز متوسط در خون مورد آزمایش می‌باشد که با فرمول زیر می‌توان آن را محاسبه نمود.

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت} \times 10}{\text{گلبول‌های قرمز شمارش شده (میلیون)}}$$

وزن هموگلوبین در یک گلبول قرمز متوسط (Mean Corpuscular Hemoglobin) یا MCH: MCH وزن هموگلوبین در یک گلبول قرمز متوسط در خون مورد آزمایش می‌باشد که با فرمول زیر می‌توان آن را محاسبه نمود.

$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین} \times 10}{\text{گلبول‌های قرمز شمارش شده (میلیون)}}$$

MCHC درصد هموگلوبین در هماتوکریت خون مورد آزمایش است و به‌صورت درصد گزارش می‌شود.

$$MCHC\ \% = \frac{\text{هموگلوبین} \times 100}{\text{هماتوکریت}}$$

شمارش تفریقی گلبول‌های سفید: برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید اقدام به تهیه گسترش خون گردید. گسترش‌های تهیه شده با الکل متیلیک تثبیت و سپس با استفاده از رنگ گیمسا به‌مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی می‌شد و پس از پایان رنگ‌آمیزی و شست‌و شوی لام و خشک شدن گسترش با عدسی روغنی تعداد صد سلول سفید شمارش و درصد هر یک از سلول‌ها محاسبه و ثبت می‌گردید (نظیفی، ۱۹۹۸).

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط الیس در سال ۱۹۹۰ و اباچ در سال ۱۹۹۳ توصیه شده است با مقداری تغییرات استفاده گردید.

در این روش ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سرم با ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=6.2) در گوده‌های پلیت الایزا مخلوط می‌گردد و جذب نوری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱ و ٦ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ٥٦٠ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. فعالیت لایزوزیم باعث لیز شدن باکتری و کاهش جذب نوری می‌گردد. یک واحد فعایت لایزوزیم با میزان کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه در هر میلی‌لیتر سرم مشخص می‌شود.

بررسی قدرت باکتری کشی سرم: برای اندازه‌گیری قدرت باکتری کشی سرم از روش توصیه شده توسط توسط کاجیتا و همکاران در سال ۱۹۹۰ با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به‌مدت ٤٨ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دوردر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافرفسفات سدیم استریل به آن‌ها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ٥٤٠ نانومتر برابر ۱ تنظیم گردید. تعداد باکتری در سوسپانسیون حاصل شمارش شده و با استفاده از روش تهیه رقت‌های متوالی بر مبنای ده،

سوسپانسیون 10^5 باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH= ۷/۵ و حاوی ۰/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون منیزیم) تهیه گردید. نمونه‌های سرمی با نسبت ۱:۳ با بافر فوق رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی حاصل با نسبت ۱: ۱ با سرم رقیق شده ترکیب و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرارت ملایم انکوبه گردیدند. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج به‌صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش شد.

اندازه‌گیری توتال پروتئین و گلوبولین: میزان پروتئین کل به روش توصیه شده توسط Lowry و میزان گلوبولین سرم به روش توصیه شده توسط Swain و همکاران در سال ۲۰۰۷ اندازه‌گیری گردید. برای تخمین گلوبولین ۵۰µL محلول سولفات آمونیوم اشباع به‌صورت قطره قطره به µL ۵۰ سرم اضافه می‌شود. سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه انجام می‌شود، سپس µL ۲۰ از این نمونه با µL ۸۰ بافر بیکربنات- کربنات (pH=۹/۳) حل می‌شود و میزان پروتئین با کیت تخمین پروتئین (Zistchem Diagnostics/Iran) استاندارد تعیین می‌شود. میزان کل گلوبولین سرم با کم کردن میزان پروتئین به‌دست آمده ثانویه از پروتئین کل سرم به‌دست می‌آید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی غلظت کشنده هر داروی بیهوشی از نرم‌افزار Probit ویرایش ۱/۵ استفاده گردید. برای بررسی اختلاف فاکتورهای خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی بین تیمارهای مورد بررسی در هر مرحله خون‌گیری از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱٦ و تست آنوای یک‌طرفه و تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج

در بین فاکتورهای خونی مورد مطالعه فاکتورهای خونی وابسته به گلبول‌های قرمز شامل هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز خونی و اندیس‌های گلبولی (MCV، MCH و

MCHC) در تیمارهای مختلف و در مراحل مختلف نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

جدول ۱- اثر سه داوری بیهوشی ام اس ۲۲۲، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر فاکتورهای خونی ماهی کپور علف‌خوار در فواصل زمانی ۱، ۱۲، ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی (میانگین ± انحراف معیار).

		PCV (%)	HB (g/dl)	WBC($\times10^3$)	RBC($\times10^6$)	MCV(fl)	MCH(pg)	MCHC(%)
۱ ساعت	MS_{222}	۳۳/۲±۱/۷۹	۵/۱۷±۱/۲۳	٦/٤±۱/۱٤	۱/۵۰±۰/۳۵	۲۳۳/۳۳±٦۲/٤۳	۳٦/٤۵±۱۲/۹۲	۱۵/٦۳±۳/۸۵
	فنوکسی اتانول	۲۸/۸±۵/٤۵	۵/۱۲±۱/۱۲	٦/٦±۱/۵۵	۱/۵۹±۰/۵۸	۱۹۸/۲۱±۷۱/٤۲	۳٦/۸۵±۱۷/۰۸	۱۸/۳٤±۵/٤۱
	گل میخک	۳۲/۲±٦/۹۸	۵/۲۱±۰/٦۵	٦/۸±۲/۵۹	۱/۷۵±۰/۷۳	۲۱۷/۱۳±۱۰۱/۱۸	۳٦/۲۹±۱۹/۸۱	۱٦/٦۹±۳/۲۳
	شاهد	۳۱±۱/۲۲	۵/۳۳±۱/۷۷	٦/٦±۱/۸۲	۱/۵۹±۰/۲۲	۱۸۱/۳۳±۲٦/٦۱	۳۲/۱۱±۱۰/۱۱	۱۸/۰۵±٦/۰۹
۱۲ ساعت	MS_{222}	۳۲/۸±۲/۹۵	۵/٤٤±۲/۲۷	٦/۸±۲/٤۹	۱/٦۹±۰/۵۳	۲۱۲/٤۱±۷۵/۷۰	۳٦/٤۲±۲۰/۵٤	۱٦/۸٤±۷/۵٦
	فنوکسی اتانول	۳۲/٤±۳/۲۹	۵/۲٤±۰/۸٤	٦/۷۵±۱/۲٦	۱/۳٤±۰/۷۹	۲۰۷/٤۱±٤۱/٦۸	۳۱/۸۷±۵/۸۸	۱۲/٤۹±۷/٤۳
	گل میخک	۳۱/۷۵±٤/۱۹	۵/۲٤±۱/۵۵	٦/۵±۱/۲۹	۱/۵٤±۰/۵۲	۲۲۱/۵٤±٦۱/۲۰	۳۸/۷۲±۲۰/۷٦	۱٦/۸۷±۵/۹۵
	شاهد	۳۱±۱/۲۲	۵/۳۳±۱/۷۷	٦/٦±۱/۸۲	۱/۵۹±۰/۲۲	۱۸۱/۳۳±۲٦/٦۱	۳۲/۱۱±۱۰/۱۱	۱۸/۰۵±٦/۰۹
۲٤ ساعت	MS_{222}	۲۹/۲±٤/٦٦	۵/۳۸±۲/۸۲	٦/۷۵±۱/۷۱	۱/٤۹±۰/۳۷	۱۸۹/۹۵±٤۱/۰۸	۳۸/۳٦±۲۳/۳۵	۱۵/۷۱±۱۲/٤۳
	فنوکسی اتانول	۳٤/٤±٤/۹۳	۵/٤٦±۱/۳۲	٦/۸±۱/٤۸	۱/۸۵±۰/٤۹	۲۰۱/۸۸±۷۹/۸۳	۳۰/٤۸±۸/۵۵	۱٦/٤۰±۵/٤۳
	گل میخک	۳۱±۳/۹٤	۵/٦۵±۲/۸٦	٦/٦±۱/۹۵	۱/۵۱±۰/٦٤	۲۲٦/۹۵±۷٦/۸۹	۳۸/٤۱±۱۷/۱٦	۱۷/۸۳±۷/۳۵
	شاهد	۳۱±۱/۲۲	۵/۳۳±۱/۷۷	٦/٦±۱/۸۲	۱/۵۹±۰/۲۲	۱۸۱/۳۳±۲٦/٦۱	۳۲/۱۱±۱۰/۱۱	۱۸/۰۵±٦/۰۹
۷۲ ساعت	MS_{222}	۳۱±۷/۹۷	۵/۱۵±۲/٤۳	٦/٦±۲/۳۰	۱/۵۲±۰/۲۲	۲۰۷/٦٤±۸۲/۵۵	۳۲/۱۸±۱۱/٤۱	۱٦/٦۱±۵/۵۸
	فنوکسی اتانول	۳۱/۸± ٦۱/٦	۵/۸۹±۱/۹۱	٦/۲±۱/۷۹	۱/۵۰±۰/٤۵	۲۳۱/۷٦±۹۳/۸۸	٤۲/۲۷±۱۵/۹۳	۱۹/۵۹±۱۰/۰۳
	گل میخک	۳۱/٦٦٦٦۷±۰/۵۸	۵/۳۵±۱/۲۱	٦/۷۵±۱/۲٦	۱/٦۹±۰/۷۵	۱۹۰/۳۳±۸۳/۰۰	۳۱/۵۱±۱۹/۹۷	۱٦/۰٤±٤/۳٤
	شاهد	۳۱±۱/۲۲	۵/۳۳±۱/۷۷	٦/٦±۱/۸۲	۱/۵۹±۰/۲۲	۱۸۱/۳۳±۲٦/٦۱	۳۲/۱۱±۱۰/۱۱	۱۸/۰۵±٦/۰۹

شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خونی: ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی در گروه‌های اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول، کاهش نسبت لنفوسیت‌ها و افزایش نسبت نوتروفیل‌ها مشاهده شد.

جدول ۲- نتایج شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خونی (میانگین ± انحراف معیار).

		لنفوسیت (درصد)	مونوسیت (درصد)	نوتروفیل (درصد)
ساعت ۱	MS_{222}	٦١± ٧/٤٢	١٣ ±٤/٤٧	٢٦ ±٤/١٨
	فنوکسی اتانول	٦٠ ±٧/٠٧	١٦/٢٥ ±٧/٥٠	٢٣/٧٥ ±٧/٥٠
	گل میخک	٦٠ ±٨/٩٢	١٤ ±١/٤١	٢٥/٦±٥/٦٤
	شاهد	٦١/٢٥ ±١٦/٨٥	١٣/١٢٥ ±٤/٥٨	٢٨/٧٥ ±١٢/١٧
ساعت ١٢	MS_{222}	٦٥ ±٦/١٢	١٢ ±٢/٧٤	٢٤ ±٤/١٨
	فنوکسی اتانول	٥١/٢٥ ±٤/٧٩*	١٣/٧٥±٢/٥٠	٣٥ ±٤/٠٨*
	گل میخک	٥٥ ±٧/٠٧*	١٥ ±٤/٠٨	٣٠ ±٥/٧٧*
	شاهد	٦١/٢٥±١٦/٨٥	١٣/١٢٥ ±٤/٥٨	٢٨/٧٥ ±١٢/١٧
ساعت ٢٤	MS_{222}	٦٥ ±٧/٠٧	١٢/٥ ±٢/٨٩	٢٣/٧٥ ±٧/٥٠
	فنوکسی اتانول	٥٧ ±٥/٧٠*	١١ ±٢/٢٤	٣٣±٢/٧٤*
	گل میخک	٥٦ ±٧/٤٢*	١٢ ±٢/٧٤	٣٣ ±٢/٧٤*
	شاهد	٦١/٢٥ ±١٦/٨٥	١٣/١٢٥ ±٤/٥٨	٢٨/٧٥ ±١٢/١٧
ساعت ٧٢	MS_{222}	٦٧ ±٢/٤٧	١٣ ±٢/٤٧	٢٣ ±٢/٧٤
	فنوکسی اتانول	٦٥ ±٧/٩١	١٢ ±٤/٤٧	٢٤ ±٧/٤٢
	گل میخک	٦٣/٧٥ ±١٠/٣١	١٢/٥ ±٢/٨٩	٢٣/٧٥ ±٧/٥٠
	شاهد	٦١/٢٥ ±١٦/٨٥	١٣/١٢٥ ±٤/٥٨	٢٨/٧٥ ±١٢/١٧

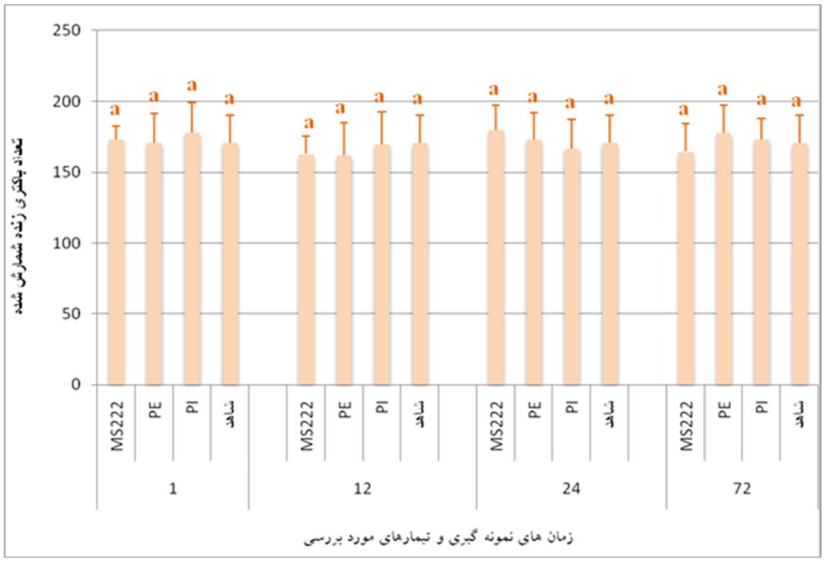
*تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دارند.

غلظت مناسب القای بیهوشی و غلظت کشنده داروی بیهوشی: غلظت بیهوشی ام اس برابر ۱۰۰ و غلظت کشنده ۷۰۰ بود در مورد اتانول ۲۰۰ و ۱۳۰۰ ولی در مورد اسانس گل میخک ۱۰۰ و کمتر از ۵۰۰، بنابراین حاشیه ایمنی گل میخک کمتر می‌باشد.

جدول ۳- غلظت مناسب القای بیهوشی و غلظت کشنده داروی بیهوشی.

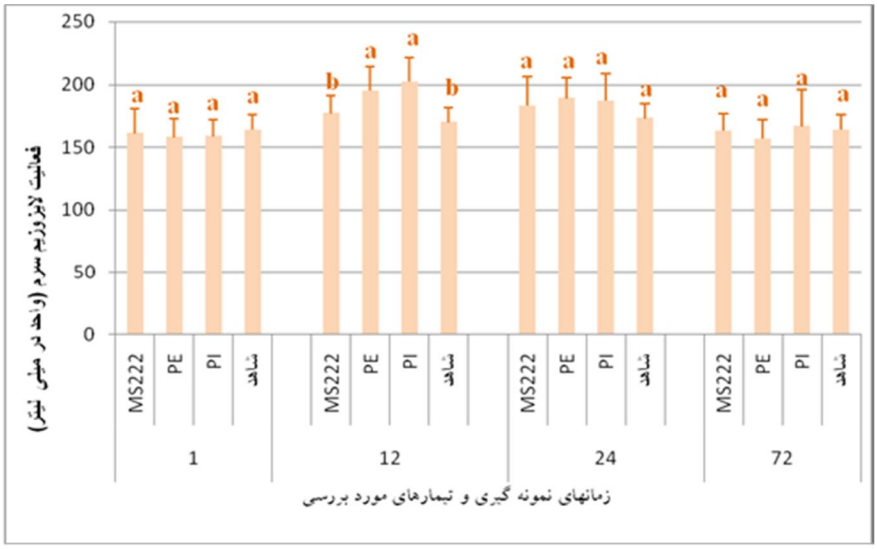
ماده بیهوشی	غلظت مناسب بیهوشی	غلظت کشنده (LC50 ٩٦ ساعته)
ام اس ۲۲۲ / میلی‌گرم در لیتر	١٠٠	٧٤٦/٤٥
۲- فنوکسی اتانول/ میکرولیتر در لیتر	٢٠٠	١٢٣٥/٢٤
اسانس گل میخک/ سی‌سی در لیتر	١٠٠	٤٩٢/٢٥

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم: فعالیت ضد باکتریایی سرم ماهی در تیمارهاییبهوش شده باسه ماده مورد بررسی در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با تیمار کنترل نشان نداد، هر چند کاهش نسبی فعالیت ضد باکتریایی سرم ماهی‌های تیمار فنوکسی اتانول و گل میخک در ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی مشاهده گردید.



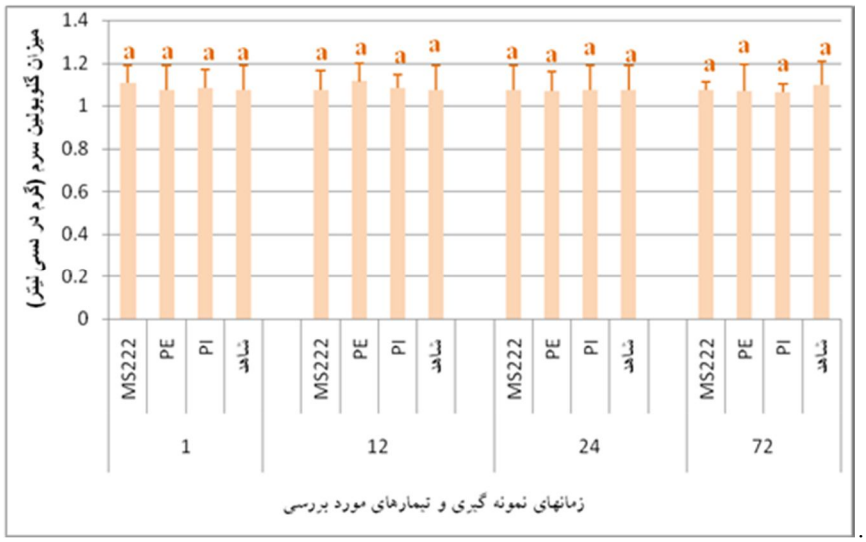
شکل ۱- نتایج مربوط به قدرت باکتری‌کشی سرم.

فعالیت لایزوزیم سرم: افزایش فعالیت لایزوزیم سرم ۱۲ ساعت بعد از بیهوشی در گروه بیهوشی با اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول دیده می‌شود در حالی‌که در گروه ام اس ۲۲۲ تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل در هیچ‌یک از زمان‌های نمونه‌گیری مشاهده نشد.



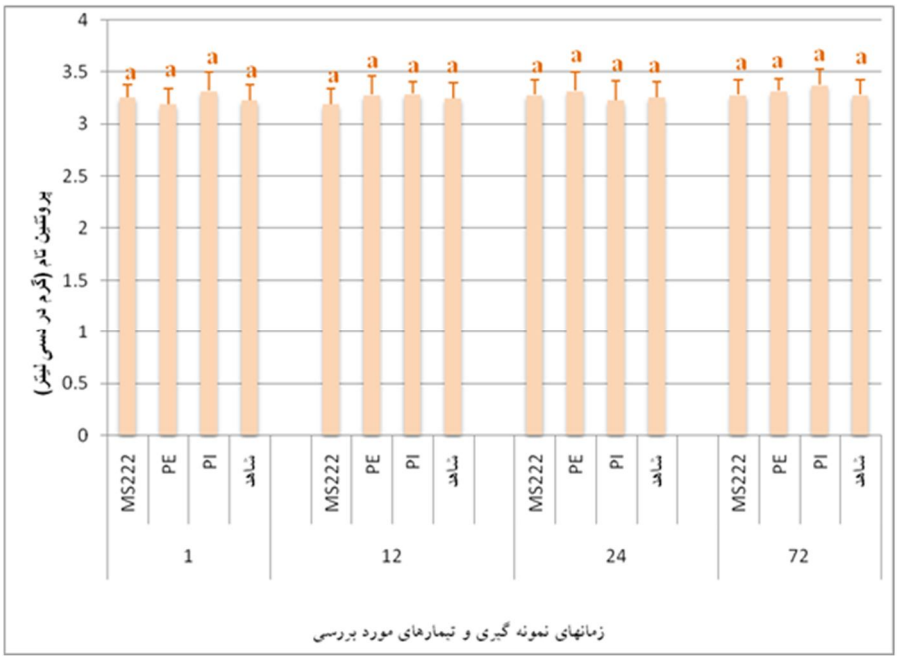
شکل ۲- نتایج مربوط به قدرت فعالیت لایزوزیم سرم.

اندازه‌گیری گلوبولین: در میزان گلوبولین سرم نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).



شکل ۳- نتایج مربوط به میزان گلوبولین سرم.

اندازه‌گیری پروتئین تام: در میزان پروتئین تام نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).



شکل ٤- نتایج مربوط به پروتئین تام سرم.

بحث

استفاده از بیهوشی برای انجام عملیات تکثیر و پرورش ماهی و اجتناب از اعمال استرس‌زا مانند رقم‌بندی، وزن‌کشی، تزریقات هورمونی و دارویی، واکسیناسیون، تخم و اسپرم‌گیری، کارهای تحقیقاتی و آزمایشات بالینی از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است. از طرف دیگر استفاده از این مواد بیهوشی به خودی خود ممکن است تأثیرات استرس‌زا و تضعیف کننده بر سیستم ایمنی داشته باشند (ایواما و آکرمن، ۱۹۹٤) که این امر در پستانداران به اثبات رسیده است ولی در ماهی کارهای چندان زیادی انجام نشده است (اورتونو و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین استفاده از ماده و روش بیهوشی مناسب با دوز مناسب همراه با کمترین تأثیر منفی، از اهمیت بالایی برخوردار است. در بین فاکتورهای خونی مورد مطالعه فاکتورهای خونی وابسته به گلبول‌های قرمز شامل هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد

گلبول‌های قرمز خونی و اندیس‌های گلبولی (MCV، MCH و MCHC) در تیمارهای مختلف و در مراحل مختلف نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). این نتایج نشان‌دهنده عدم تأثیر بیهوشی با هر یک از داروهای مورد بررسی بر فاکتورهای خونی ماهی است.

در مطالعه حاضر در ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی در ماهی کپور علف‌خوار و در گروه‌های اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول، کاهش نسبت لنفوسیت‌ها و افزایش نسبت نوتروفیل‌ها مشاهده شد. مطالعات بسیاری تأثیر مواد بیهوشی بر افزایش فعالیت محور هیپوفیز- آدرنال و تحریک استرس را در پستانداران اثبات کرده‌اند (روبرتسون و همکاران، ۱۹۸۷؛ مولینرو و گونزالز، ۱۹۹۵). برای مثال باردوسی و همکاران (۱۹۹۰) کاهش تعداد لنفوسیت‌ها را در بیماران تحت بیهوشی، پدیده‌ای عادی و در نتیجه ترشح کاتکول‌آمین‌ها و کورتیکوستروئیدها در حین بیهوشی جانوران خونگرم می‌دانند. در مطالعه‌ای روی کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوشی با اسانس گل میخک با دوز ۳۰ میلی‌گرم در لیتر بلافاصله بعد از ۱۰ دقیقه بیهوشی تفاوتی در نسبت گلبول‌های سفید خونی در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد (ولیسک و همکاران، ۲۰۰۵).

گومولکا و همکاران، ۲۰۰۸ تأثیر اوژنول و ام اس ۲۲۲ را بر ماهی خاویاری سیبری، همراه با کاهش تعداد گلبول‌های سفید ولنفوسیت‌ها گزارش کردند. در مطالعه دیگری سوداگران و همکاران، ۲۰۰۹ عدم تأثیر تجویز داروی بیهوشی پودر گل میخک بر تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی ماهی کلمه را گزارش نمودند. به‌نظر می‌رسد افزایش نوتروفیل در اثر افزایش رهاسازی نوتروفیل بالغ به خون و همچنین کاهش مهاجرت این سلول‌ها به خارج عروق می‌باشد. همچنین کاهش در لنفوسیت‌ها ناشی از مهاجرت آن‌ها به خارج عروق و استقرار آن‌ها در پوست، آبشش و روده می‌باشد (وندلار، ۱۹۹۳).

بسیاری از محققان شمارش تفریقی گلبول‌های سفید را روشی عملیاتی برای ارزیابی استرس می‌دانند چرا که استرس باعث ایجاد نوتروفیلی و لمفوپنی در ماهیان می‌شود (بلای و همکاران، ۱۹۹۰) و افزایش نسبت نوتروفیل به لنفوسیت در ماهیانی که تحت تأثیر کورتیزول و یا هیدروکورتیزون قرار گرفته‌اند مشاهده شده است (وجتازک، ۲۰۰۲). بنابراین به‌نظر می‌رسد افزایش نوتروفیل و کاهش لنفوسیت در گروه‌های اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی ناشی از تأثیرات استرس تأخیری و احتمالاً کورتیکوستروئید تولید شده متعاقب آن می‌باشد.

در مطالعه حاضر افزایش فعالیت لایزوزیم سرم ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی در گروه بیهوشی با اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول مشاهده گردید در حالی‌که در گروه ام اس ۲۲۲ تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل در هیچیک از زمان‌های نمونه‌گیری مشاهده نشد. افزایش لایزوزیم می‌تواند ناشی از افزایش تعداد نوتروفیل‌ها باشد که در مطالعه حاضر نیز این افزایش مشاهده گردید.

در مطالعه‌ای دیگر چو و هیس در سال ۲۰۰۰ در ماهی آزاد چینوک مقدار لایزوزیم در ۱ و ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی با اسانسگل میخک و ام اس ۲۲۲ افزایش معنی‌داری داشت. توماس و روبرتسون در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که مواد بیهوشی تأثیرات استرس‌زایی را در ماهی ایجاد می‌کند. مولینرو و گونزالز در سال ۱۹۹۵ در مطالعه‌ای در ماهی سیم دریایی نشان دادند مواجهه با ام اس ۲۲۲ و ۲- فنوکسی اتانول باعث ایجاد پاسخ استرسی می‌شود. مارلو و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که در روغن ماهی با شرایط استرس‌زای تراکم در ساعت‌های ۲٤ و ۷۲ بعد از استرس افزایش معنی‌داری در مقدار لایزوزیم وجود دارد، در حالی‌که مقدار لایزوزیم ۲ ساعت بعد از استرس تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

همچنین باردوسی و همکاران در سال ۱۹۹۲ در مطالعه دیگری نشان دادند که بیهوشی باعث ایجاد کاهش در گیرنده‌های قندی در سطح لوکوسیت‌ها مانند گیرنده‌های مانوزی و گیرنده‌های کربوهیدراتی لکتین می‌شود این گیرنده‌ها نقش مهمی در عملکرد بیگانه‌خواری و قدرت ایمنی سلول بازی می‌کنند. فعالیت ضد باکتریایی سرم ماهی در تیمارهای بیهوش شده با سه ماده مورد بررسی در زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با تیمار کنترل نشان نداد، هر چند کاهش نسبی فعالیت ضد باکتریایی سرم ماهی‌های تیمار فنوکسی اتانول و گل میخک در ۲٤ ساعت بعد از بیهوشی مشاهده گردید.

در مطالعه قلی‌پور در سال ۱۳۸۹ نیز افزایش فعالیت لایزوزیم و کاهش قدرت بیگانه‌خواری گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلا بعد از بیهوشی الکتریکی و بیهوشی با گل میخک گزارش گردید.

در مورد پروتئین تام و میزان گلوبولین سرم نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در مراحل مختلف نمونه‌گیری مشاهده نگردید ($P>0/05$). گزارشات مشابهی از عدم تأثیر بیهوشی در سطح پروتئین‌های سرم ماهی قزل‌آلا نیز وجود دارد (قلی‌پور، ۲۰۰۱).

در مطالعه حاضر تغییر نسبت گلبول‌های سفید خونی نشان از تأثیر تضعیف کننده این بیهوشی در ماهی کپور علف‌خوار دارد، همچنین کاهش در فعالیت باکتری‌کشی سرم در تیمار ۲- فنوکسی اتانول و اسانس گل میخک بعد از بیهوشی نشان از تأثیر این مواد بر ایمنی ماهی کپور علف‌خوار دارد. در

مجموع می‌توان نتیجه گرفت که بیهوشی ناشی از اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول اثراتی بر برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی کپورعلف‌خوار دارند به طوری‌که می‌تواند بر نتایج برخی کارهای تحقیقاتی تأثیرگذار باشند. به‌نظر می‌رسد افزایش نوتروفیل و کاهش لنفوسیت‌ها در ماهیان تحت بیهوشی با اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول، همچنین افزایش فعالیت لایزوزیم در این گروه‌ها در نتیجه استرس ایجاد شده در این روش‌هاست. در حالی‌که استفاده از ام اس ۲۲۲ در طی عملیات پرورشی باعث القای استرس کمتری می‌شود.

در نتیجه، این مطالعه نشان‌دهنده این است که بیهوشی می‌تواند پاسخ‌های استرس را در ماهی ایجاد کرده و بر کارهای تحقیقاتی تأثیرگذار باشد. پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری در گونه‌های مختلف ماهیان، همچنین تعیین روش بیهوشی و دوز مناسب این داروها با هدف کمترین اثر تداخلی بر پاسخ ایمنی صورت گیرد.

منابع

1. Anderson, W.G., Mckinley, R.S., and Colavecchia, M. 1997. The use of clove oil as ananaesthetic for rainbow trout and its effects on swimmingperformance. North Journal of Fisheries Management. 17: 301-307.
2. Bardosi, L., Bardosi, A., and Gabius, H.J. 1992. Changes of expression of endogenous sugar receptors by polymorphonuclear leukocytes after prolonged anaesthesia surgery. Canadian Journal of Anaesthesia. 39: 143–150.
3. Bardosi, L., Bardosi, A., Hendrys, M., and Gabius, H.J. 1990. Reduced expression of mannose-specific receptors on murine peripheral blood polymorphonuclear leukocytes following prolonged anaesthesia with different inhalation agents. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 34: 286–290.
4. Bly, J.E., Miller, N.W., and Clem, L.W. 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed catfish. Developmental and Comparative Immunology. 14: 211–221.
5. Cho, G.K., and Heath, D.D. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). Aquaculture Research. 31: 537–546.
6. Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assay. In: Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S., Robertson, B.S. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, Fair Haven, NJ: 101–103.
7. Feldman, B.F., Zinkl, J.G., and Jain, N.C. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins. 1120-1124.

8. Gholipour, H. 2001. Effects of anesthesia with electricity, clove oil and tricaine methanesulfonate on some immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran university, 77p. (Translated in Persian)
9. Gomulka, P., Wlasow1, T., Velíšek, J., Svobodová, Z., and Chmielinska, E. 2008. Effects of Eugenol and MS-222 Anaesthesia on Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). Acta Veterinaria Brunensis. 77: 447–453.
10. Iacono, V.J., MacKay, B.J., DiRienzo, S., and Pollock, J.J. 1980. Selective antibacterial properties of lysozyme for oralmicroorganisms. Infection Immunity. 29: 623-632.
11. Iwama, G.K., and Ackerman, P.A. 1994. Anesthesia. In: Biochemistry and molecular Biology of Fishes, Vol. 3. (eds.P.W.H ochachka and T.P.Mommsen), Amsterdam: Elsevier Science B.V.PP. 1-15.
12. Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, A.L., and Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.
13. Marlowe, C., Caipang, A., Ingvild Berg, M., Brinchmann, F., and Kiron, V. 2009. Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. Aquaculture. 295: 110–115.
14. Molinero, A., and Gonzalez, J. 1995. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead Seabream (*Suparus aurata* L.) during confinement. Comparative Biochemistry and Physiology. 111(3): 405- 414.
15. Mylonas, C., Cardilanetti, G., Sigelaki, I., and Polzonetti-Magni, A. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of european seabass (*Dicentrarchuslabrax*) and gilthead sea bream (*Sparusaurata*) at different temperatures. Aquaculture. 467-481.
16. Nazifi, S. 1998. Hematology and clinical biochemistry of birds. First edition, Shiraz University press, No. 272, 90p. (Translated in Persian)
17. Obach, A., Quentel, C., and Bandin, L.F. 1993. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchuslabrax*. Diseases of Aquatic Organisms. 15: 175–185.
18. Ortuno, J., Esteban, M.A., and meseguer, J. 2002. Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology. 12(1): 49-59.
19. 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.
20. Robertson, L., Thomas, P., and Arnold, C.R. 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured reddrum (*Sciaenopsocellatus*) to several transportation procedures. Aquaculture. 68: 115– 130.

21. Ross, L.G., and Ross., B. 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals Black well science. oxford, UK.
22. Sahoo, P.K., Meher, P.K., Mahapatra, K.D., Saha, J.N., Jana, R.K., and Reddy, P.V.G.K. 2004. Immune responses in different fullsib families of Indian major carp, *Labeorohita*, exhibiting differential resistance to Aeromonas hydrophila infection. Aquaculture. 238: 115-125.
23. Soltani, M. 2008. Effects of anesthesia with Extract and essence of clove oil in some farmed fish species. The final report of the research project of Iranian Fisheries Research. 36p. (Translated in Persian)
24. Sudagran, M., Mohammadizarejabada, A., Mazandarania, R., and Pooralimotlagh, S. 2009. The effect of clove powder as an anesthetic and its effects on hematological parameters on roach (*Rutilus rutilus*). Journal of aquaculture feed science and nutrition. 1: 1-5.
25. Summerfelt, R.C., and Smith, L.S. 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Methods for fish Biology. (eds.C.B Schreck and P.B. Moyle) Bethesda MD: American Fisheries Society. 213-272.
26. Swain, P., Dash, S., Sahoo, P.K., Routray, P., Sahoo, S.K., Gupta, S.D., Meher, P.K., and Sarangi, N. 2007. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp Labeo rohita and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology. 22: 38-43.
27. 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 sulphate and metomidate. Aquaculture. 96: 69–86.
28. Velisek, J., Suobodova, Z., and pickova, V. 2005a. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)*. Acta Veterinaria Brunensis. 74: 139-146.
29. Velisek, J., Svoboda, Z., Plackova, V., Groch, L., and Nepejchalova, L. 2005. Effects of clove oil anaesthesia on commoncarp (*Cyprinus carpioL*.). Veterinary Medicine. 6: 269–275.
30. Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish- a review of current knowledge. Fish and shellfish immunology. 23: 1127-1151.
31. Winlow, W., Rar, T., Spencer, G., GirdleStone, D., and Hancox, J. 1992. Differntial effects of general pharmacology. General pharmacology. 23(6): 985-992.
32. Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-Gabska, M., Adamowicz, A., and Dzugaj, A. 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinuscarpio* L.): cortisol effect on the carp blood. General and Comparative Endocrinology. 125: 176–183.