بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۳
http://japu.gau.ac.ir

مقایسه تاثیر داورهای بیهوشی ام– اس ۲۲۲، اسانس گل میخک و ۲– فنوکسی اتانول بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های سرم کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

* مجتبی علیشاهی[۱]، نسیم اکبری[۲]، محمد راضی جلالی[۱] و هادی نداف[۱]

[۱] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز،

[۲] دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشگاه شهید چمران اهواز،

[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/٤/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۱

چکیده

در این پژوهش اثر سه داروی پرکاربرد بیهوشی اماس ۲۲۲، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول، بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های سرم ماهی کپور معمولی ارزیابی گردید. ابتدا با تجویز غلظت‌های افزایشی هر یک از داروهای بیهوشی، بهترین غلظت القای بیهوشی و نیز غلظت کشنده در مورد هر یک از داروهای بیهوشی مشخص گردید. سپس ماهی‌ها با غلظت‌های موثر بدست آمده، بیهوش شدند و در زمان‌های ۰، ۱، ۱۲، ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی از ماهی‌ها خونگیری شده و پارامترهای خون شناسی شامل هماتوکریت، میزان هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز MCV، MCH، MCHC، شمارش تام و تفریقی گلبول‌های سفید، بین تیمارها مقایسه گردید. سطح فعالیت آنزیم‌های سرمی شامل ALP، AST، ALT و LDH نیز اندازه‌گیری و بین تیمارها مقایسه شد. این سه ماده‌ی بیهوشی در زمان‌های مورد بررسی تاثیر معنی‌داری بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی نداشت (P>۰/۰۵)، همچنین بیهوشی با این مواد تاثیر معنی‌داری بر

*مسئول مکاتبه: alishahim@scu.ac.ir

آنزیم‌های سرمی ALP[1]، AST[2]، ALT[3]، LDH[4] در هیچ یک از مراحل نمونه‌گیری در ماهی کپور معمولی نشان ندادند (P>۰/۰۵). هر چند اماس ۲۲۲ کارایی و حاشیه سلامت بیشتری از سایر داروهای بیهوشی دارد، ولی هر سه داروی بیهوشی مورد مطالعه تاثیر مخربی بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های سرمی نداشته و می‌توانند در پژوهش‌های مربوط به بررسی فاکتورهای خونی و سرمی ماهی کپور معمولی استفاده گردند.

واژه‌های کلیدی: داروهای بیهوشی، اماس ۲۲۲، اسانس گل میخک، فنوکسی اتانول، کپور معمولی، فاکتورهای خونی

مقدمه

توسعه روز افزون آبزی پروری در دنیا منجر به افزایش درخواست بکارگیری و استفاده از مواد شیمیایی جدید شده است، به طوری که در سال‌های اخیر بسیاری از مواد شیمیایی و ترکیبات صنعتی تحت مطالعات دقیق قرار گرفته تا از نظر جنبه‌های اقتصادی و دامنه سلامتی طبقه‌بندی و در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند (سلطانی و همکاران، ۲۰۰۲). در حال حاضر متداول‌ترین داروی بیهوشی در صنعت تکثیر و پرورش ماهی، تریکائین متان سولفانات با نام تجاری ام اس ۲۲۲ است (پاپهن و همکاران، ۲۰۰۵)، این ماده نسبتاً گران قیمت و زمان منع مصرف مورد نیاز اعلام شده توسط اداره نظارت بر دارو و غذای آمریکا، ۲۱ روز می‌باشد (هارپر، ۲۰۰۳). این امر باعث پژوهش روی سایر مواد بیهوشی شده که قیمت و اثرات سوء کمتری نسبت به ام اس ۲۲۲ دارند (میرزرگر و فاطمی، ۲۰۰٤). اسانس گل میخک به عنوان یک جایگزین مناسب در ایران بیشترین کاربرد را دارد (ستاری و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعه اثرات این ماده نشان داده که اسانس میخک بیشتر معیارها و خواص یک بیهوش کننده خوب آبزیان را دارا است (کین و همکاران، ۱۹۹۸). در خصوص مکانیزم اثر بیهوشی اسانس گل میخک اطلاعات دقیقی در دست نمی‌باشد. اما احتمال داده می‌شود که این ماده دارای اثراتی مشابه استامینوفن بر سیستم اعصاب مرکزی بوده و بدون مهار کردن محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- بافت بینابینی کلیه موجب ایجاد بیهوشی در ماهی می‌شود (سلطانی و

1- Alkaline Phosphatase
2- Aspartate aminotransferase
3- Alanine aminotransferase
4- Lactate Dehydrogenase

همکاران، ۲۰۰۲). داروی بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول در سطح گسترده‌ای در آبزیان استفاده می‌شود، این در حالی است که فاصله‌ی بین دوز القای بیهوشی و کشندگی در این ماده نسبتاً کم است، همچنین گزارش عوارض جانبی و اثراتی که بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیک ماهی می‌گذارد، آن را به ماده‌ای که کمتر برای بیهوشی ماهی ایده‌آل است تبدیل کرده است (اورتونو و همکاران، ۲۰۰۲). در برخی موارد، مانند بیهوشی شدید، ۲- فنوکسی اتانول به خودی خود استرس را در ماهی القا می‌کند (ایواما و همکاران، ۱۹۸۹؛ سامرفلت و اسمیت، ۱۹۹۰؛ توماس و روبرتسون، ۱۹۹۱). بر اساس نتایج بررسی این داروی بیهوشی در انسان، گزارشاتی از آسیب کبدی و کلیوی بعد از بیهوشی با این ماده وجود دارد (سامرفلت و اسمیت، ۱۹۹۰). این ماده بیهوشی بدلیل داشتن خاصیت آنتی باکتریال و ضد قارچی علاوه بر بیهوشی در ضد عفونی و آرام بخشی ماهیان قبل از تکثیر مصنوعی کاربرد دارد، بنابراین در هنگام تکثیر مصنوعی این خصوصیت موثر واقع می‌شود (کویل و همکاران، ۲۰۰٤). با توجه به وجود گزارشاتی از تاثیر برخی داروهای بیهوشی بر فاکتورهای خونی و آنزیمی ماهی (مولینرو و گونزالز، ۱۹۹۵)، هدف از انجام این مطالعه مقایسه تاثیر سه داروی بیهوشی اماس ۲۲۲، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های سرم ماهی کپور معمولی می‌باشد، تا داروی بیهوشی که کمترین اثر را بر فاکتورهای فوق دارد معرفی و در پژوهش‌های مربوط به بررسی فاکتورهای خونی و آنزیمی ماهی به عنوان داروی بیهوشی مناسب پیشنهاد گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط نگهداری: تعداد ٦۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی ۵۰ تا ۱۰۰ گرمی برای انجام دو مرحله پژوهش از مجتمع پرورش ماهی آزادگان در حومه اهواز تهیه و با استفاده از تانکرهای مخصوص حمل بچه ماهی مجهز به کپسول اکسیژن خالص به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل گردیدند. جهت سازش یافتن با شرایط آزمایشگاه، ماهی‌ها به مدت دو هفته پیش از شروع کار در محیط آزمایشگاه در مخازن ۵۰۰ لیتری پلاستیکی نگهداری شدند. شرایط آب مورد استفاده در طول دوره شامل دما: ۲٤±۱°C اکسیژن محلول: ۱۰-۹ پی‌پی‌ام، pH برابر ۰/۲±۸/۱۵، آمونیاک و نیتریت (NO_2 و NH_3) کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و نیترات (NO_3) کمتر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود. سختی آب نیز بین ۵۵۰-٦۰۰ میکروزیمنس بر سانتیمتر مربع در طول پژوهش ثبت گردید.

داروهای بیهوشی: پودر ام اس ۲۲۲ با نام تجاری فینکوئل (ساخت شرکت آرژنت ایالات متحده آمریکا) و داروی بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول با فرمول شیمیایی C-8 H-10 0-2 (شماره کاتالوگ S6048191018 ساخت شرکت مرک، آلمان) خریداری گردید.

اسانس گل میخک به روش تقطیر آب و بخار با دستگاه کلونجر و با استفاده از ترکیبات هگزان، پنتان و همچنین آب و مخلوط آب- الکل به عنوان 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 (زرگری، ۱۹۹٦).

محاسبه بهترین غلظت بیهوشی و غلظت کشنده داروهای بیهوشی: به این منظور بر اساس اطلاعات موجود در منابع و مطالعات اولیه حدود غلظت القای بیهوشی و کشنده هر ماده مشخص گردید و سپس غلظت‌های افزایشی که در بر گیرنده این غلظت‌ها باشند در مورد هر داروی بیهوشی تهیه شد (اندرسون و همکاران، ۱۹۹۷؛ پالیک و همکاران، ۲۰۰٦؛ گومولک و همکاران، ۲۰۰۸؛ سوداگران و همکاران، ۲۰۰۹).

غلظت‌های نهایی مورد استفاده در مورد هر داروی بیهوشی برای القای بیهوشی و تعیین غلظت کشنده، در جدول ۱ آورده شده است (اورتونو و همکاران، ۲۰۰۲؛ گومولک و همکاران، ۲۰۰۸).

برای هر غلظت ماده بیهوشی سه تکرار در نظر گرفته شده و از مخازن ۲۰ لیتری و در هر مخزن از ۱۰ ماهی استفاده گردید.

جدول ۱- غلظت‌های بکار رفته از هر داروی بیهوشی برای تعیین غلظت مناسب القای بیهوشی و نیز غلظت کشنده LC_{50} ۵ دقیقه‌ای

ماده بیهوشی	غلظت‌های استفاده شده برای بیهوشی (پی‌پی‌ام)	غلظت‌های تعیین (LC_{50} ۹٦ ساعته)
ام‌اس ۲۲۲	۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵	۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ و ۵۰۰
۲-فنوکسی اتانول	۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و ۵۰۰	۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰
اسانس گل میخک	۲۵ ، ۵۰ ، ۷۵ ، ۱۰۰ ،۱۲۵ ، ۱۵۰	۳۰۰، ٤۰۰، ۵۰۰ ، ٦۰۰، ۷۰۰

تعیین بهترین غلظت بیهوشی و LC_{50}: برای القای بیهوشی، مرحله‌ی بیهوشی سبک[1] مبنا قرار گرفت. بعد از تعیین غلظت‌ها به ترتیب ماهی‌ها در مورد هر داروی بیهوشی به مخازن حاوی غلظت‌های تعیین شده ماده بیهوشی اضافه شده و بعد از مشاهده علایم بیهوشی سبک شامل: عدم پاسخ به تغییر وضعیت، کاهش در سطح تنفس، فقدان کامل تعادل، عدم واکنش به تحریک خارجی (راس و راس، ۱۹۹۹) بیهوشی سبک تلقی شده و بعد از ثبت زمان القای بیهوشی به آکواریوم‌های بازگشت از بیهوشی[2] حاوی آب تازه دارای سیستم هوادهی منتقل شدند، زمان بازگشت از بیهوشی نیز بعد از تثبیت کامل تعادل و واکنش به تحریک خارجی ثبت گردید.

برای بدست آوردن غلظت کشنده داروهای بیهوشی به همین طریق اقدام شد، فقط غلظت مورد استفاده بیشتر (جدول ۱) بود. در مورد هر غلظت مشخص شده از سه داروی بیهوشی، ۱۰ قطعه ماهی به مدت ۵ دقیقه در مخزن حاوی غلظت مورد نظر نگهداری شده و سپس به مخزن ریکاوری منتقل می‌شدند، ماهی‌هایی که بعد از دو ساعت نگهداری در مخزن ریکاوری، فاقد عکس العمل و حرکت سرپوش آبششی بودند، مرده قلمداد شده (ابطحی و همکاران، ۲۰۰۰) و نتایج تلفات توسط نرم‌افزار Probit version 1.5 آنالیز و LC_{50} هر دارو محاسبه گردید.

القای بیهوشی و تیماربندی ماهی‌ها: بعد از مشخص شدن دوز بیهوشی هر ماده بیهوشی، تعداد ۳۰ قطعه ماهی ۱۰۰ گرمی تحت بیهوشی تا مرحله بیهوشی سبک با هر یک از مواد فوق قرار داده شد، یک تیمار هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از بیهوش شدن ماهی‌ها، در زمان‌های ۰(بلافاصله بعد از بیهوشی)، ۱، ۱۲، ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی اقدام به خونگیری از ۵ قطعه ماهی در هر تیمار گردید. در مورد تیمار شاهد نیز ۵ عدد ماهی در هر مرحله خونگیری به عمل آمد، هرچند ماهی‌ها بیهوش نشده و فقط در آب فاقد داروی بیهوشی غوطه‌ور گردید.

نمونه‌ها به منظور آزمایش‌های خون‌شناسی، بلافاصله به آزمایشگاه خون‌شناسی دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز منتقل گردید. آزمایش‌های خون‌شناسی در همان روز انجام گرفت. قسمتی از خون برای جداسازی سرم در نظر گفته شد و سرم جداسازی شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای آزمایش‌های آنزیمی نگهداری شد.

1- Light anesthesia
2- Recovery

بررسی فاکتورهای خون‌شناسی: فاکتورهای خونی مورد مطالعه به روش‌های توصیه شده توسط نظیفی (۱۹۹۵) و فلدمن و همکاران (۲۰۰۰) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. پارامترهای خونی شامل هماتوکریت (PCV)، هموگلوبین (Hb)، تعداد گلبول‌های قرمز خونی (RBC)، حجم متوسط گلبولی MCV، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی MCH و غلظت هموگلوبین گلبولی MCHC، شمارش تام و تفریقی گلبول‌های سفید (WBC) بود.

بررسی آنزیم‌های سرمی ALP[1]، AST[2]، ALT[3]، LDH[4]: پس از خارج نمودن نمونه‌های سرمی از انجماد، دستگاه اتوانالایزر با استفاده از کالیبراتور Trucal-u تنظیم و پس از آماده شدن کلیه محلول‌های لازم جهت اندازه‌گیری، آزمایش‌ها به‌طور اتوماتیک و بدون دخالت انسانی توسط دستگاه انجام شد. از آنجا که از کیت‌های انسانی برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها استفاده گردید، فعالیت آنزیم‌های AST و ALT به روش ریت من- فرانکل (Reitman-frankel)، ALP به روش بسی- لوری بورک (Bessey-Lowry Bork) و LDH به روش واکر (Wacker) اندازه‌گیری گردید. تغییراتی در برنامه اندازه‌گیری دستگاه انجام شده، به عنوان مثال دمای انکوباسیون نمونه‌ها به جای ۳۷ درجه، ۲٤ درجه تعریف شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای بررسی غلظت کشنده هر داروی بیهوشی از نرم‌افزار Probit نسخه ۱/۵ استفاده گردید. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین فاکتورهای خون‌شناسی در تیمارهای مورد بررسی از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱٦ و آنالیز واریانس یکطرفه (One way ANOVA) و آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج

غلظت مناسب القای بیهوشی و نیز غلظت کشنده LC_{50} سه داروی بیهوشی اماس ۲۲۲، فنوکسی اتانول و اسانس گل میخک در جدول ۲ آورده شده است: کمترین غلظت القای بیهوشی مناسب را اماس ۲۲۲ داشت، همچنین بیشترین نسبت بین غلظت بیهوش کننده و LC_{50} ۵ دقیقه‌ای را نیز همین

1- Alkaline Phosphatase
2- Aspartate aminotransferase
3- Alanine aminotransferase
4- Lactate Dehydrogenase

ماده بیهوشی داشته است. غلظت القای بیهوشی توسط فنوکسی اتانول نسبت به دو داروی دیگر بسیار بالاتر بوده و نسبت غلظت کشنده به غلظت القای بیهوشی نیز کمتر از دو داروی دیگر بود.

جدول ۲- غلظت مناسب القای بیهوشی، LC_{50} ۵دقیقه‌ای و نسبت این دو غلظت، در سه داروی بیهوشی اماس ۲۲۲، فنوکسی اتانول و اسانس گل میخک در ماهی کپور معمولی

ماده بیهوشی	غلظت مناسب بیهوشی (پی‌پی‌ام)	غلظت کشنده (LC_{50} ۵ دقیقه‌ای)	نسبت غلظت کشنده و غلظت بیهوشی مناسب
ام اس ۲۲۲	۱۰۰	۷۸۷	۷/۸۷
۲- فنوکسی اتانول	٤۰۰	۱۲۱۵	۳/۳۷
اسانس گل میخک	۱۲۵	۵۸۹	٤/۷۳

نتایج مربوط به اندازه‌گیری پارامترهای خونی RBC، WBC، Hb، PCV، MCV، MCH، MCHC در تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری بعد از بیهوشی در جدول ۳ نشان داده شده است. در بین 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 از نظر آماری نسبت به گروه شاهد مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$).

نتایج مقایسه تعداد کل و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خونی بعد از بیهوشی با سه داروی بیهوشی در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری نیز در جدول ٤ آورده شده است. همان‌طور که از این جدول مشخص است، بیهوشی با سه داروی اماس ۲۲۲، فنوکسی اتانول و اسانس گل میخک، در هیچ‌کدام از مراحل نمونه‌گیری تاثیری در تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی و نسبت آنها نداشته است ($P>۰/۰۵$).

جدول ۳- اثر سه داوری بیهوشی اماس ۲۲۲، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر فاکتورهای خونی (میانگین± انحراف معیار) در ماهی کپور معمولی در فواصل زمانی ۰، ۱، ۱۲، ۲٤ و ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی (آزمون ANOVA در سطح اطمینان ۹۵٪، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در مراحل نمونه‌گیری بین شاخص‌های مختلف اندازه‌گیری شده نشان نداد)

زمان	تیمارها	PCV(٪)	HB(g/dl)	RBC(m/µl)	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(٪)
	MS_{222}	۲۸/۳۳±۲/ ۱	۵/۹۵±۱/۰۸	۱/۱۷±۰/۰۶	۲۴۳±۲۴/۱۶	۵۰/۸۹±۷/۸۶	۲۰/۹۶±۶/۲۹
ساعت	گل میخک	۳۲/۳۳±۸/۹۶	۶/۱۷±۱/۱۳	۱/۶۸±۰/۵۰	۲۰۰±۷۴/۰۷	۴۲/۱۸±۱۴/۱۰	۱۹/۶۰±۳/۰۰
صفر	فنوکسی اتانول	۲۷/۲۰±۸/۹۶	۶/۲۱±۲/۵۷	۱/۲۲±۰/۲۹	۲۳۱±۹۵/۷۱	۵۴/۱۲±۳۰/۱۳	۲۴/۷۶±۳/۱۹
	شاهد	۲۹/۷۵±۲/۵۰	۶/۵۷±۱/۹۰	۱/۳۸±۰/۵۷۷	۲۴۹±۴۷/۵۷	۵۲/۹۰±۱۶/۲۲	۲۰/۳۷±۱۰/۵۷
	MS_{222}	۲۹/۲۰± ۸/۴۷	۶/۵۵±۱/۴۳	۱/۳۰±۰/۲۹	۲۲۹±۵۶/۴۳	۵۳/۵۶±۱۹/۸۹	۲۳/۴۹±۷/۱۵
ساعت	گل میخک	۲۹/۶۰±۵/۳۲	۵/۸۷±۰/۷۸	۱/۲۸±۰/۴۳	۲۶۵±۱۲۶/۲	۴۹/۵۶±۱۵/۰۴	۲۰/۳۴±۴/۴۸
۱	فنوکسی اتانول	۲۹/۸۰±۸/۷۵	۵/۸۶±۰/۵۹	۱/۲۶±۰/۴۸	۲۶۴±۱۲۳/۲	۵۰/۵۶±۱۴/۰۳	۲۰/۹۴±۵/۷۰
	شاهد	۲۹/۷۵±۲/۵۰	۵/۵۷±۱/۹۰	۱/۳۸±۰/۵۷۷	۲۴۹±۴۷/۵۷	۵۲/۹۰±۱۶/۲۲	۲۰/۳۷±۶/۲۸
	MS_{222}	۲۸/۷۵±۷/۱۴	۶/۱۵±۱/۷۸	۱/۴۳±۰/۳۳	۲۰۶±۵۴/۳۹	۴۶/۹۳±۲۵/۵۷	۲۱/۹۸±۶/۹۰
ساعت	گل میخک	۳۳/۶۰±۳/۲۱	۶/۴۹±۳/۰۶	۱/۵۸±۰/۵۰	۲۳۴±۹۰/۷۹	۴۱/۲۰±۱۳/۶۵	۱۹/۵۵±۹/۳۰
۱۲	فنوکسی اتانول	۳۰/۴۰±۲/۹۷	۵/۸۴±۰/۸۵	۱/۶۶±۰/۲۷	۲۲۶±۸۲/۱۹	۴۲/۷۶±۱۴/۴۶	۱۹/۳۹±۳/۴۰
	شاهد	۲۹/۷۵±۲/۵۰	۶/۵۷±۱/۹۰	۱/۳۸±۰/۵۷۷	۲۴۹±۴۷/۵۷	۵۲/۹۰±۱۶/۲۲	۲۰/۳۷±۶/۲۸
	MS_{222}	۳۰/۰۰±۴/۷۶	۶/۵۲±۱/۸۸	۱/۴۶±۰/۲۷	۲۱۸±۶۰/۴۱	۴۳/۸۶±۱۹/۳۳	۲۰/۹±۶/۰۶
ساعت	گل میخک	۳۰/۶۰±۵/۸۶	۶/۷۷±۳/۰۸	۱/۴۲±۰/۳۳	۲۲۹±۸۳/۸۴	۵۲/۰۷±۳۲/۱۲	۲۱/۹۵±۷/۷۳
۲٤	فنوکسی اتانول	۳۲/۰۰±۹/۸۳	۶/۵۸±۱/۷۴	۱/۵۶±۰/۶۵	۲۴۱±۱۱۴/۷	۴۷/۱۷±۱۱/۰۰	۲۲/۸۹±۱۰/۹۰
	شاهد	۲۹/۷۵±۲/۵۰	۶/۵۷±۱/۹۰	۱/۳۸±۰/۵۷۷	۲۴۹±۴۷/۵۷	۵۲/۹۰±۱۶/۲۲	۲۰/۳۷±۶/۲۸
	MS_{222}	۲۹/۰۰±۳/۹۴	۶/۴۴±۲/۳۰	۱/۳۶±۰/۲۵	۲۲۲±۶۹/۰۱	۵۰/۹۴±۲۵/۸۵	۲۲/۰۱±۶/۷۶
ساعت	گل میخک	۳۲/۷۵±۸/۴۲	۶/۵۹±۰/۲۳	۱/۵۴±۰/۳۴	۲۲۲±۹۴/۹۴	۴۳/۶۷±۱۰/۴۸	۲۱/۵۶±۷/۶۵
۷۲	فنوکسی اتانول	۳۲/۴۰±۷/۲۷	۶/۶۹±۲/۹۹	۱/۵۱±۰/۵۹	۲۳۷±۱۰۶/۸	۵۱/۹۹±۳۰/۳۲	۲۳/۰۵±۱۵/۵۸
	شاهد	۲۹/۷۵±۲/۵۰	۶/۵۷±۱/۹۰	۱/۳۸±۰/۵۷۷	۲۴۹±۴۷/۵۷	۵۲/۹۰±۱۶/۲۲	۲۰/۳۷±۶/۲۸

جدول ٤- اثرسه داوری بیهوشی ام اس ۲۲۲، اسانس گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر WBC و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خونی ماهی کپور معمولی در فواصل زمانی ۰، ۱، ۱۲، ٢٤ و ۷۲ ساعت بعد از بیهوشی (میانگین ± انحراف معیار)

زمان	داروی بیهوشی	WBC(k/µl)	لنفوسیت (٪)	مونوسیت (٪)	نوتروفیل (٪)
ساعت صفر	MS_{222}	۷۰۰۰±۲۳۰۲	۶۲/۶۷±۲/۰۸	۱۱/۰۰±۲/۰۰	۲۶/۳۳±۱/۵۳
	گل میخک	۸۳۳۳±۲۶۴۶	۶۱/۶۷±۱/۱۵	۱۰/۶۷±۲/۵۲	۲۷/۶۷±۱/۵۳
	فنوکسی اتانول	۸۲۵۰±۴۱۶۳	۶۳/۰۰±۴/۳۰	۹/۲۰±۱/۳۰	۲۵/۸۰±۲/۱۷
	شاهد	۸۴۰۰±۲۳۶۳	۶۳/۰۰±۸/۷۲	۱۰/۲۵±۱/۲۶	۲۴/۲۵±۴/۳۵
ساعت۱	MS_{222}	۷۸۰۰±۳۸۹۹	۶۳/۲۰±۷/۰۵	۹/۶۰±۱/۳۴	۲۴/۲۰±۶/۲۶
	گل میخک	۸۸۰۰±۴۳۸۲	۵۸/۵۰±۱۰/۵۴	۱۰/۰۰±۰/۸۲	۳۱/۵۰±۱۰/۶۶
	فنوکسی اتانول	۷۶۰۰±۳۳۶۲	۵۹/۲۰±۱۱/۸۰	۹/۲۰±۱/۳۰	۳۷/۶۰±۵/۵۳
	شاهد	۸۴۰۰±۲۳۰۲	۶۳/۰۰±۸/۷۲	۱۰/۲۵±۱/۲۶	۲۴/۲۵±۴/۳۵
ساعت۱۲	MS_{222}	۷۸۰۰±۱۴۸۳	۵۹/۰۰±۱۱/۶۰	۹/۴۰±۱/۱۴	۳۵/۶۰±۳/۳۶
	گل میخک	۸۰۰۰±۴۸۴۸	۵۹/۸۰±۸/۶۱	۱۱/۰۰±۱/۲۲	۳۱/۲۰±۸/۱۱
	فنوکسی اتانول	۷۲۰۰±۱۷۸۹	۶۱/۰۰±۱۱/۴۰	۹/۸۰±۱/۹۲	۲۵/۸۰±۹/۸۳
	شاهد	۸۴۰۰±۲۳۰۲	۶۳/۰۰±۸/۷۲	۱۰/۲۵±۱/۲۶	۲۴/۲۵±۴/۳۵
ساعت ٢٤	MS_{222}	۸۶۰۰±۱۳۴۲	۵۷/۰۰±۴/۵۵	۱۰/۵۰±۰/۵۸	۳۱/۰۰±۷/۷۹
	گل میخک	۸۷۵۰±۲۹۸۶	۵۸/۸۰±۸/۸۷	۹/۸۰±۱/۳۰	۳۱/۴۰±۸/۶۲
	فنوکسی اتانول	۷۰۰۰±۱۵۸۱	۵۹/۰۰±۳/۰۰	۱۰/۰۰±۱/۰۰	۳۰/۳۳±۲/۵۲
	شاهد	۸۴۰۰±۲۳۰۲	۶۳/۰۰±۸/۷۲	۱۰/۲۵±۱/۲۶	۲۴/۲۵±۴/۳۵
ساعت ۷۲	MS_{222}	۷۲۰۰±۱۷۸۹	۶۰/۰۰±۲/۰۰	۱۱/۰۰±۲/۶۵	۲۸/۳۳±۱/۳۵
	گل میخک	۸۶۰۰±۲۸۸۱	۶۰/۳۳±۲/۵۲	۱۰/۰۰±۱/۰۰	۲۹/۶۷±۱/۳۵
	فنوکسی اتانول	۸۰۰۰±۱۸۲۶	۶۰/۵۰±۲/۰۸	۱۱/۰۰±۲/۱۶	۲۸/۷۵±۱/۲۶
	شاهد	۸۴۰۰±۲۳۰۲	۶۳/۰۰±۸/۷۲	۱۰۲۵±۱/۲۶	۲۴/۲۵±۴/۳۵

(آزمون ANOVA در سطح اطمینان ۹۵٪، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در مراحل نمونه‌گیری بین شاخص‌های مختلف اندازه‌گیری شده نشان نداد).

نتایج مربوط به تاثیر سه ماده بیهوشی مورد مطالعه بر فعالیت آنزیم‌های سرمی ماهی کپور در مراحل مختلف نمونه‌گیری در جدول ۵ آورده شده است. فعالیت آنزیم‌های سرمی تیمارهای سه

داروی بیهوشی در مراحل مختلف نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشـان ندادنـد و غلظت سرمی این آنزیم‌ها تحت تاثیر بیهوشی با هیچکدام از سه داروی بیهوشـی مـورد مطالعـه قـرار نگرفت (P>۰/۰۵).

جدول ۵- مقایسه‌ی فعالیت برخی آنزیم‌های سرمی (میانگین ± انحراف معیار) بین تیمارهای بیهوش شده با داروهای بیهوشی در مراحل مختلف

زمان نمونه‌گیری	داروی بیهوشی	ALP(Iu/l)	AST(Iu/l)	ALT(Iu/l)	LDH(Iu/l)
ساعت صفر	MS_{222}	۱۵/۶۳± ۲۰۰	۱۴۷±۲۷/۴۷	۶۶/۶۷±۵/۸۶	۳۰۶±۲۰/۸۲
	گل میخک	۱۷/۳۵±۲۰۳	۱۵۵±۲۴/۹۹	۶۳/۰۰±۱/۰۰	۲۹۶±۵/۷۷
	فنوکسی اتانول	۱۴/۳۵±۲۰۰	۱۵۰±۲۰/۱۰	۶۱/۶۰±۴/۳۹	۳۰۰±۵۵/۶۸
	شاهد	۱۱/۲۰±۱۹۹	۱۵۴±۱۶/۰۱	۶۱/۸۳±۹/۲۴	۳۰۰±۵۱/۳۸
ساعت۱	MS_{222}	۲۰۴±۱۰/۲۰	۱۵۳±۱۴/۲۶	۶۷/۰۰±۱۴/۱۱	۳۱۸±۷۳/۲۸
	گل میخک	۱۹/۰۷±۲۰۳	۱۴۸±۶/۶۱	۶۸/۶۰±۱۴/۸۶	۲۹۲±۳۱/۱۴
	فنوکسی اتانول	۲۵/۸۶±۲۰۱	۱۴۷±۲۲/۹۴	۶۷/۴۰±۹/۹۱	۳۱۶±۶۱/۰۷
	شاهد	۱۱/۲۰±۱۹۹	۱۵۴±۱۶/۰۱	۶۱/۸۳±۹/۲۴	۳۰۰±۵۱/۳۸
ساعت۱۲	MS_{222}	۱۳/۴۸±۲۰۴	۱۵۵±۲۳/۶۶	۶۹/۴۰±۱۰/۰۹	۳۱۷±۳۷/۰۱
	گل میخک	۲۶/۳۳±۱۹۴	۱۵۱±۵/۱۳	۶۰/۰۰±۷/۰۰	۳۰۹±۲۰/۱۲
	فنوکسی اتانول	۵/۸۹±۲۰۳	۱۴۷±۳/۵۴	۶۹/۰۰±۱۰/۲۷	۳۰۸±۳۱/۱۴
	شاهد	۱۱/۲۰±۱۹۹	۱۵۴±۱۶/۰۱	۶۱/۸۳±۹/۲۴	۳۰۰±۵۱/۳۸
ساعت ۲٤	MS_{222}	۲۱/۸۴±۲۰۱	۱۵۷±۵/۷۰	۶۵/۴۰±۹/۲۹	۲۹۸±۳۴/۲۱
	گل میخک	۱۴/۸۶±۲۰۵	۱۴۵±۷/۱۶	۶۹/۴۰±۷/۲۰	۳۱۳±۶۳/۸۰
	فنوکسی اتانول	۲۰/۲۸±۲۰۳	۱۵۱±۵/۱۳	۶۰/۰۰±۷/۰۰	۲۹۴±۳۸/۳۱
	شاهد	۱۱/۲۰±۱۹۹	۱۵۴±۱۶/۰۱	۶۱/۸۳±۹/۲۴	۳۰۰±۵۱/۳۸
ساعت ۷۲	MS_{222}	۱۴/۳۱±۱۹۶	۱۴۴±۶/۱۱	۶۹/۶۰±۳/۷۸	۳۰۹±۲۹/۰۳
	گل میخک	۱۹/۵۳±۲۰۱	۱۴۵±۲۳/۹۵	۶۸/۶۰±۱۵/۰۸	۲۹۰±۵۹/۶۹
	فنوکسی اتانول	۱۳/۸۱±۲۰۴	۱۴۷±۱۳/۵۵	۶۴/۲۰±۶/۹۸	۲۹۹±۷۲/۲۳
	شاهد	۱۱/۲۰±۱۹۹	۱۵۴±۱۶/۰۱	۶۱/۸۳±۹/۲۴	۳۰۰±۵۱/۳۸

(آزمون ANOVA در سطح اطمینان ۹۵٪، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در مراحل نمونه‌گیری بین شاخص‌های مختلف اندازه‌گیری شده نشان نداد).

بحث

استفاده از داروهای بیهوشی در ماهی اهمیت ویژه و کاربردهای فراوانی دارد. همچنین استفاده از این مواد بیهوشی به خودی خود ممکن است تاثیرات سوء بر فیزیولوژی و ایمنی ماهی داشته باشند (ایواما و آکرمن، ۱۹۹٤؛ مولینرو و گونزالز، ۱۹۹۵). نتایج مرحله اول این پژوهش نشان داد که کارایی بیهوشی داروی ام اس ۲۲۲ بیشتر از دو داروی دیگر بوده (با غلظت پایین‌تر بیهوشی استاندارد ایجاد نمود) و غلظت کشنده ۲- فنوکسی اتانول بالاتر از سایر داروهای بیهوشی مورد بررسی بود و این به آن معنی است که ام اس ۲۲۲ دارای بیشترین حاشیه ایمنی می‌باشد چرا که نسبت غلظت کشنده به غلظت موثر آن بیشتر از ۷/۸۷ بود، در صورتی‌که این نسبت در مورد اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول به ترتیب برابر ٤/۳۷ و ۳/۷۳ بود. غلظت‌های القای بیهوشی هر سه داروی مورد استفاده در محدوده گزارش شده در ماهیان مختلف در منابع بود (میرزرگر و صیدگر، ۲۰۰۳). شریف‌پور و همکاران (۲۰۰۱) و موسوی و همکاران (۲۰۱۱) طی مطالعه‌ای که به ترتیب روی ماهی کپور و بنی انجام دادند غلظت‌های مشابه این پژوهش را در مورد اسانس گل میخک و ام اس ۲۲۲ گزارش نمودند. حاشیه امنیت بالای ام اس ۲۲۲ در ماهیان مختلف گزارش شده است (میرزرگر و فاطمی، ۲۰۰٤). ابطحی و همکاران (۲۰۰۰) نیز در گزارشی مشابه این پژوهش، حاشیه ایمنی بالای داروی بیهوشی ام اس۲۲۲ در ماهی خاویاری، قزل‌آلا و کپور را گزارش نمودند.

با توجه به نتایج فاکتورهای خونی مورد بررسی در این پژوهش، مشخص می‌گردد که بیهوشی با مواد بیهوشی مورد استفاده در این پژوهش، بر فاکتورهای خونی و اندیس‌های گلبولی ماهی در مراحل مختلف نمونه‌گیری تاثیر معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). سلطانی و همکاران (۲۰۰۲) اثر اسانس گل میخک هندی را بر پارامترهای هماتولوژیک، برخی آنزیم‌های خون و آسیب‌شناسی بافت‌های کپورمعمولی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که اسانس گل میخک هیچ اثر سویی بر روی این ماهی نداشته و تا غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام به عنوان ماده بیهوشی در آبزی پروری بی‌خطر است (سلطانی و همکاران، ۲۰۰۲). همچنین برخی گزارش‌ها بیانگر تاثیر برخی داروهای بیهوشی بر فاکتورهای خونی است، محمدی زارع و همکاران (۲۰۱۰) در ماهیان خاویاری جوان تحت بیهوشی با پودر گل میخک (با غلظت‌های ۱۷۵، ۲۲۵، ۲۷۵ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر) را موجب تاثیر معنی‌داری بر برخی فاکتورهای خونی این ماهی دانستند، همچنین فرهادی (۲۰۱۱) نیز تاثیر بیهوشی با فنوکسی اتانول بر برخی فاکتورهای خونی ماهی کپور علفخوار را گزارش نمود. تفاوت گزارشات می‌تواند به دلیل تفاوت فیزیولوژی گونه‌های مورد بررسی باشد (موسوی و همکارن، ۲۰۱۱).

تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی در تیمارهای مختلف و در مراحل مختلف نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). بنابراین این سه دارو تفاوتی از نظر تاثیر بر فاکتورهای خونی وابسته به گلبول‌های سفید خونی در ماهی کپور ندارد. تاثیر مواد بیهوشی بر افزایش فعالیت محور هیپوفیز- آدرنال و تعدیل استرس را در پستانداران نشان داده شده است (روبرتسون و همکاران، ۱۹۸۷؛ مولینرو و گونزالز، ۱۹۹۵). ولی در ماهی چنین مکانیسمی به اثبات نرسیده است (ستاری، ۱۹۹۵). در مطالعه‌ای روی کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان، بیهوشی با اسانس گل میخک، بعد از ۱۰ و ٦۰ دقیقه بیهوشی تفاوتی در نسبت گلبول‌های سفید خونی در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد (ولیسک و همکاران، ۲۰۰۵).

سوداگران و همکاران (۲۰۰۹) عدم تاثیر تجویز داروی بیهوشی پودر گل میخک بر تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی ماهی کلمه را گزارش نمودند. در پژوهشی دیگر برخلاف یافته‌های فوق فرهادی (۲۰۱۱) و قلی‌پور کنعانی (۲۰۱۰) به ترتیب در آمور و قزل‌آلا، تغییر تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی به‌دنبال بیهوشی با اسانس گل میخک، فنوکسی اتانول و بیهوشی الکتریکی را گزارش نمودند، این محققین افزایش نوتروفیل و کاهش لنفوسیت در گروه‌های بیهوش شده را ناشی از تاثیرات استرس تاخیری و احتمالا کورتیکوستروئید تولید شده متعاقب آن دانستند. بلای و همکاران (۱۹۹۰) و وجتازک و همکاران (۲۰۰۲)، افزایش نسبت نوتروفیل به لنفوسیت در ماهیانی که تحت تاثیر کورتیزول و یا هیدروکورتیزون قرار گرفته‌اند را گزارش نمودند. البته پژوهش‌ها روی ماهی کپور معمولی عدم تاثیر بیهوشی بر فاکتورهای خونی نشان می‌دهند (سلطانی و همکاران، ۲۰۰۲؛ ولیسک و همکاران، ۲۰۰۵).

آنزیم‌های سرم به‌ویژه ALP، AST، ALT و LDH در بسیاری از اندام‌های حیاتی ماهی به‌ویژه کبد، قلب و عضلات یافت می‌شوند. آسیب‌های بافتی و بیماری‌های این اندام‌ها می‌تواند باعث آسیب غشای سلولی این اندام‌ها و تخلیه این آنزیم‌ها در افزایش سطح سرمی آنها گردد (ولیسک و اسووبودووا، a,b ۲۰۰٤). در این پژوهش فعالیت هر چهار آنزیم ALP، AST،ALT و LDH در سرم ماهیان بیهوش شده با سه داروی بیهوشی ام اس ۲۲۲، اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول در مراحل مختلف نمونه‌گیری تحت تاثیر قرار نگرفته و تفاوت معنی‌داری بین فعالیت آنزیم‌ها بین تیمارها و تیمار شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، هر چند تفاوت نسبی بین برخی تیمارها مشاهده گردید.گزارشات مربوط به تاثیر بیهوشی با داروهای مختلف بیهوشی در ماهی بسیار متفاوت و گاهی

متضاد است. سلطانی و همکاران (۲۰۰۲) تاثیر بیهوشی با گل میخک بر آنزیم‌های سرمی و بافت‌های حیاتی ماهی کپور معمولی را بررسی نموده و عدم تاثیر بیهوشی با گل میخک بر آنزیم‌های سرمی را گزارش نمودند، هر چند تاثیر اندک آنها بر برخی بافت‌ها، به‌ویژه بافت مغز را گزارش کردند، در صورتی که شالوئی و همکاران (۲۰۱۲) بیهوشی با فنوکسی اتانول (با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در فیل ماهی را باعث افزایش AST گزارش نمودند، هر چند بیهوشی را بر سطح ALT و ALP سرمی بی‌تاثیر دانستند. همچنین ولیسک و اسووبودووا (۲۰۰٤a) اثر بیهوشی با فنوکسی اتانول را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را باعث کاهش سطح AST سرم بلافاصله بعد از بیهوشی در ماهیان بیهوش شده با این دارو با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام گزارش نمودند و بیهوشی با این ماده را بر سطح ALT، ALP و LDH سرم فاقد تاثیر معنی‌دار گزارش نمودند. فرهادی (۲۰۱۱) نیز عدم تاثیر بیهوشی با اسانس گل میخک و اماس ۲۲۲ را بر آنزیم‌های ALT، ALP و LDH گزارش نمود. البته باید توجه داشت که عوامل محیطی و فیزیولوژیک متعددی از قبیل سن، شوری آب، فصل سال، وضعیت بلوغ، جنس، دمای محیط و ... بر آنزیم‌های سرمی و فعالیت آن‌ها موثر است و کلا فعالیت آنزیم‌های سرمی گزینه مناسبی برای بررسی وضعیت سلامت ماهی نیست (وو و همکاران، ۱۹۹۸). گزارشات متفاوت و گاه متناقض تاثیر بیهوشی بر آنزیم‌های سرمی ماهی، علاوه بر تفاوت مکانیسم‌های عملکردی و ترشحی آنزیم‌های فوق در ماهیان مختلف و غلظت و نوع داروی بیهوشی، می‌تواند به دلیل شرایط محیطی انجام ازمایش، سن و وضعیت سلامت ماهی باشد. در این پژوهش با توجه به عدم تاثیر داروهای بیهوشی مورد استفاده بر آنزیم‌های سرمی، می‌توان نتیجه گرفت که هیچکدام از داروهای مورد بررسی در غلظت بیهوشی باعث آسیب بافتی که افزایش آنزیم‌های سرمی را باعث شوند، نگردید.

از آنجا که در بسیاری از پژوهش‌ها، بیم احتمال اثر داروهای بیهوشی بکار رفته در زمان پژوهش به منظور مقید نمودن، خونگیری و تزریقات بر پارامترهای خونی ماهی وجود دارد، این پژوهش نشان داد سه دارویی که بیشترین کاربرد را در بیهوشی ماهیان در جهان دارند، در صورت مراعات زمان و غلظت القای بیهوشی توصیه شده، فاقد تداخل در فاکتورهای خونی و آنزیم‌های سرمی می‌باشند، بنابراین می‌توان از هر سه ماده در این گونه پژوهش‌ها استفاده نمود. در مقایسه کارایی و LC_{50} این داروهای بیهوشی نیز به ترتیب اماس ۲۲۲ و اسانس گل میخک کارایی و حاشیه امنیت مناسبی در ماهی کپور دارند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل پژوهانه نگارندگان انجام پذیرفت.

منابع

1. Abtahi, B., Chitsaz, H., Soltani, M., and Omidbeygi, R. 2000. A comparison between *Eugenia caryophyllata* extract and MS222 LC_{50} in jouvenile Asipencer, Rainbow trout and common carp. Iranian Scientific Magazine of Aquaculture. 3: 1-13.
2. Anderson, W.G., Mckinley, R.S., and Colavecchia, M. 1997. The use of clove oil as ananaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. Journal of Fisheries Management. 17: 301-307.
3. 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.
4. Coyle, S.D., Durborow, R.M., and Tidwell, J.H. 2004. Anesthetics in Aquaculture. SRAC Publication No.3900. 6p.
5. Farhadi, R. 2011. Effects of MS222, *Eugenia caryophyllata* extract and phenoxy ethanol on some hematological factors of grass carp, Master Thesis, Science and Reasearch branch of Azad University of Ahwaz, 89p.
6. Feldman, B.F., Zinkl, J.G., and Jain, N.C. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Pp: 1120-1124.
7. Gholipour Kanani, H. 2010. Effect of anesthesia induction with electricity, *Eugenia caryophyllata* extract and MS222 on someimmun responses of *Oncorhynchus mykiss*. Phd Thesis, Veterinary medicine faculty of Tehran University, 77p.
8. Gomulka, P., Wlasow, T., Velíšek, J., Svobodová, Z., and chmielinska, E. 2008. Effects of Eugenol and MS-222 Anaesthesia on Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii Brandt*). ACTA Veterinaria BRNO. 77: 447-453.
9. Harper, C. 2003. Status of clove oil and eugenol for anesthesia of fish. Aquaculture. 29(6): 41-42.
10. Iwama, G.K., and Ackerman, P. A. 1994. Anesthesia. In: Biochemistry and molecular Biology of Fishes, Vol.3. (eds. P.W.H ochachka & T.P. Mommsen), Amsterdam: Elsevier Science B.V. Pp: 1-15.
11. Iwama, G.K., McGeer, J.C. and Pawluk, M.P. 1989. The efects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. Canadian Journal of Zoology. 67: 2065-2073.

12. Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., and SOTO, C.G. 1998. The efficacy of Clove oil as anaesthetic for rainbow trout, *Oncerhynchus mykiss* (walbaum). Aquaculture Research. 29(2): 89-101.
13. Mirzargar, S., and Fatemi, A. 2004. Applied Pharmacology In Aquaculture. Tehran University press. Pp: 112-117.
14. Mirzargar, S., and Seydgar, M. 2003. Anesthesia and Sedation methods in Aquaculture. Tehran University press. Pp: 7-25.
15. Mohammadizare, A., Bastami, K.D., Sudagar, M., and Motlagh, S.P. 2010. Haematology of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile exposed to clove powder as an anaesthetic. Comparative clinical pathology. 19:5.465-468.
16. 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.
17. Nazifi, S. 1995. Hematology and Clinical Biochemistry Of Birds. Shiraz University press. 90p.
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 red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. Aquaculture. 68: 115-130.
21. Ross, L.G., and B.Ross. 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, Black well science, oxford, UK. Pp: 90-102.
22. Sattari, A., Mirzargar, S.S., Abrishamifar, A., Lourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H.A., and Niasari, A. 2009. Comparison of electroanesthesia with chemical anesthesia (MS222 and Clove Oil) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using plasma cortisol and glucose responses as physiological stress indicators. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 4: 306-313.
23. Shaluei, F., Hedayati, A., Jahanbakhshi, A., and Baghfalaki, M. 2012. Physiological responses of great sturgeon (*Huso huso*) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. Fish Physiology and Biochemistry. 38(6): 1-8.
24. Sharifpour. M., Soltani, M., Abdolhai, H., and Ghaiumi, R. 2002. Anaesthetic effects of Eugenia caryophyllata in different pH and temperature in juvenile *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Fisheries. 4: 59-75.
25. Soltani, M., Ghaffari, M., Khazraeinia, P., and Bokaei, S. 2002. Effects of clove oil anaesthesia on haematological parameters, certain serum enzymes, some tissues in common carp. Journal of Veterinary Research. 59(3): 295-300.

26. Sudagran, M., Mohammadizarejabada, A., Mazandarania, R., and Pooralimotlagh, A. 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.
27. Summerfelt, R.C., and Smith, L.S. 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Methods for fish Biology. (eds. C.B. Schreck & P.B. Moyle) Bethesda MD:American Fisheries Society. Pp: 213-272.
28. 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.
29. Velisek, J., and Svobodová, Z. 2004a. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: Acute toxicity and effects on biochemical blood profile. Acta Veterinaria Brno. 73(2): 247-252.
30. Velisek, J., and Svobodová, Z. 2004b. Anaesthesia of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 2-phenoxyethanol: Acute toxicity and biochemical blood profile. ActaVeterinaria Brno. 73(3): 379-384.
31. Velisek, J., Svoboda, Z., Plackova, V., Groch, L., and Nepejchalova, L. 2005. Effects of clove oil anaesthesia on commoncarp (*Cyprinus carpio* L.) .Veterinary Medicine of Czech republic. 6: 269-275.
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 (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. General Comparative Endocrinology. 1; 125(2): 176-83.
33. Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. 1998. Fish disease and disorders. BYCABI. 3:427-429.
34. Zargari, A. 1991a, Medicinal plants, Volume 4, Sixth edition, Tehran University Publication, Pp: 97-110.