تأثیر ماده ۲-فنوکسی‌اتانول (2-phenoxyethanol) به عنوان ماده بیهوش کننده بر شاخص‌های خونی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)

عبدالرضا جهانبخشی*، سید علی‌اکبر هدایتی و مهسا جوادی موسوی

گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده شیلات و محیط زیست، گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۵

چکیده

در این تحقیق اثر دوزهای مختلف ۲-فنوکسی اتانول به عنوان بیهوش کننده، بر شاخص خونی، سطح گلوگز و کورتیزول ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) مورد بررسی قرار گرفت. زمان القای بیهوشی و ریکاوری این ماهی، در غلظت‌های موثر ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌لیتر در لیتر۲-فنوکسی اتانول بررسی شد. نتایج نشان دادند که قرار گرفتن در غلظت‌های پایین این ماده بیهوشی (۰/۱ و ۰/۳) موجب می‌شود تا بیهوشی عمیق در مدت زمان بیشتری رخ دهد و زمان ریکاوری آن کمتر شود و بالعکس. هیچ اختلاف معناداری در سطح گلبول‌های سفید، در غلظت‌های مورد آزمایش مشاهده نشد (P>۰/۰۵). میزان هماتوکریت و هموگلوبین خون در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷ تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشتند (P>۰/۰۵). در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر این ماده سطح کورتیزول پلاسما به طور معناداری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و در غلظت-های بالاتر (۰/۵ و ۰/۷)، سطح کورتیزول به طور معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۵). با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر ۲-فنوکسی‌اتانول، سطح گلوکز به طور معناداری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). نتایج این آزمایش نشان می‌دهد، ماهی کلمه باید در غلظت های بالای این ماده بیهوش و خون‌گیری شود تا حداقل استرس به آن وارد شود.

واژه های کلیدی: ماهی کلمه، ۲-فنوکسی اتانول، بیهوشی، گلوکز، کورتیزول

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۳۸۳۲۲۳۲۵۷، پست الکترونیکی: abdolreza.jahanbakhshi@yahoo.com

مقدمه

ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) یکی از گونه‌های بومی دریای خزر است (۱). این گونه دارای ارزش اقتصادی است و برای مردم این منطقه، به عنوان یک منبع پروتئینی مهم محسوب می‌شود (۱۹). و از نظر اکولوژیکی، نقش مهمی در زنجیره غذایی دریای خزر دارد (۸). عوامل بیهوش کننده و آرام بخش در آبزی پروری، در طول آزمایش‌های پژوهشی، نمونه‌گیری‌خون، زیست سنجی، اعمال جراحی، تولیدمثل کنترل شده و کاهش اختلالات فیزیولوژیک و صدمات فیزیکی به کار می‌رود (۴۲). در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان، در عملیات تکثیر، علامت-گذاری، رقم بندی، حمل و نقل و غیره از مواد بیهوش کننده گوناگون مانند MS 222، بنزوکائین، ۲- فنوکسی-اتانول، کینالدین، گاز دی اکسید کربن و داروهای متنوع دیگر استفاده می‌شود (۳۳).

مواد بیهوش کننده با پایین آوردن عملکرد سیستم عصبی، پاسخ به استرس را کاهش می‌دهند، با این حال نوع، زمان و دوز آن می‌تواند بر فیزیولوژی ماهی تأثیر بگذارد (۳۵ و۲۷). عصاره میخک به دلیل دسترسی آسان و هزینه پایین به یک بیهوش کننده رایج در آبزی پروری تبدیل شده است (۵ و۳۲). علی‌رغم مزایای بر شمرده در مورد اسانس میخک، این ماده معایبی نیز دارد. یکی از معایب اسانس میخک، شاخص درمانی نسبتاً پایین یا نسبت غلظت

درمانی به غلظت سمی آن است که در مطالعه Velisek و همکاران (۳۹) روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان این نسبت ۱:۲/۷ تعیین شد در حالی که نسبت مطلوب آن باید ۱:۴ یا بیشتر باشد. علاوه بر این اسانس میخک می‌تواند بر روی حس بویایی ماهیان به خصوص آزاد ماهیان اثر منفی داشته باشد، این اثر ممکن است فرآیند مهاجرت آزاد ماهیان رود کوچ از دریا به محل تولدشان را مختل کند (۴۶).

پس از MS222 (تری‌کانین متان سولفانات)، ۲- فنوکسی اتانول رایج ترین بیهوش کننده در آبزی پروری است (۲۸ و ۲۳). ۲- فنوکسی اتانول یا اتیلن مونوفنیل اتر به دلیل تأثیرگذاری سریع و ریکاوری سریع پس از آن، در آبزی-پروری به عنوان بیهوش کننده استفاده می‌شود (۳۰). علاوه بر این، تهیه آسان و هزینه پایین استفاده از این ماده‌ی شیمیایی را مناسب کرده است (۹ و ۴۵). چندین مطالعه تأثیر این ماده را بر روی فیزیولوژی ماهیان بررسی کرده است (۴۲ و ۴۱ و ۳۷ و ۳۱ و ۳۰ و ۲۵ و ۲۰). جهانبخشی و همکاران در سال ۲۰۱۲ تاثیر ۲- فنوکسی اتانول را روی پارامترهای استرسی (گلوکز و کورتیزول خون) تاس ماهی ایرانی مورد بررسی قرار دادند در این تحقیق مشخص شد که ۲- فنوکسی اتانول بر پارامترهای استرسی تاس ماهی ایرانی تاثیر می‌گذارد و ۰/۹ میلی‌لیتر بر لیتر مناسب‌ترین دوز برای بیهوش ساختن تاس ماهی ایرانی می‌باشد و بیهوشی در این دوز کمترین تاثیر استرسی را بر ماهی دارد، در تحقیقی دیگر شالویی و همکاران ۲۰۱۲، تاثیر۲- فنوکسی اتانول روی پارامترهای خونشناسی فیل ماهی را مورد بررسی قرار دادند که در این تحقیق مشخص شد که ۲- فنوکسی اتانول بر پارامترهای خونشناسی فیل ماهی تاثیر می گذارد و می‌تواند ماده بسیار موثری برای بیهوش کردن این گونه باشد در این تحقیق مشخص شد که ۰/۹ و ۰/۷ میلی لیتر بر لیتر مناسب‌ترین دوز برای بیهوش ساختن فیل ماهی می‌باشد و بیهوشی در این دوزها می‌تواند کمترین تغییرات را در پارامترهای خونشناسی و بیو شیمیایی این گونه داشته باشد. خون شاخص مهمی برای وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن، در تشخیص سلامت یا بیماری و کنترل روند زیستی موجودات زنده از جمله ماهی می‌باشد (۲۳). برای مطالعات خون‌شناسی در ماهیان، نیاز به بیهوشی و خون‌گیری ازآن‌ها است. بدون بیهوشی، ماهیان واکنش‌های شدیدی به صید و خون‌گیری نشان می دهند که می‌تواند باعث تغییر در برخی مؤلفه‌های خونی به‌خصوص شاخص‌های استرس شود (۱۴). در گذشته، فاکتورهای خونی به عنوان شاخص پاسخ به استرس در ماهی استفاده شده است (۱۱). از آنجایی که ماهی، به راحتی طی دستکاری و حمل و نقل دچار استرس می‌شود و این استرس می‌تواند منجر به سرکوب سیستم ایمنی، آسیب‌های فیزیکی و یا حتی مرگ شود، از مواد بیهوش کنند، جهت کاهش استرس استفاده می‌شود (۱۲). با این حال ماده بیهوشی خود می‌تواند باعث بروز پاسخ استرس درماهی شود (۲۷). بنابراین استفاده از یک ماده بیهوشی مناسب، نقش بسزایی در آبزی پروری دارد. لذا با توجه به اینکه تحقیقات اندکی برای این بیهوش کننده نیست به بیهوش کننده‌های دیگر موجود است و از آنجایی که ماهی کلمه یکی از گونه‌های ارزشمند دریای خزر است و هیچ گونه اطلاعاتی در رابطه با بیهوشی و یا اثر دوزهای مختلف۲-فنوکسی اتانول برای این گونه ارزشمند موجود نیست، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت ۲- فنوکسی اتانول بر روی زمان القای بیهوشی و زمان ریکاوری ماهی کلمه و هم‌چنین بررسی اثرات غلظت‌های متفاوت آن در برخی از شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی سرم خون می‌باشد تا مناسب‌ترین غلظت این ماده که طی آن ماهی کمترین استرس را متحمل می‌شود از طریق فاکتورهای خونی مشخص گردد.

مواد و روشها

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کلمه در محدوده وزنی۲۰گرم، از مرکز تکثیر و پرورش سیجوال استان گلستان تهیه و به

مرکز تحقیقات آبزی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند، ماهی‌ها به صورت تصادفی در ۲۴ مخزن فایبرگلاس قرار گرفتند (۵ ماهی در هر مخزن ۵۰۰ لیتری). ماهیان برای سازگاری به مدت ۲ هفته در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند و با غذای فرموله شده حاوی ۴۸ درصد پروتئین خالص با انرژی قابل هضم ۴۸۰۰ کیلوکالری و روزانه به اندازه ۲ درصد وزن بدن غذادهی شدند. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذادهی قطع شد. در دوره سازگاری و آزمایش آب هوادهی و کلرزدایی شد و فاکتورهای فیزیکو شیمیایی به صورت زیر بود: دما= ۱ ± ۱۹/۵ سانتی‌گراد، اکسیژن محلول= ۰/۰۶ ± ۸/۸۰ میلی‌گرم در لیتر، پی اچ= ۰/۴۵± ۷/۵۶، سختی کل= ۲/۳۵ ± ۲۹۳ میلی‌گرم در لیتر، آب به صورت روزانه تعویض و پارامتر-های کیفی آب دوبار در هفته اندازه‌گیری شد (دستگاه اندازه‌گیری پی اچ، دما و اکسیژن، اکسیژن‌متر و فتومتر ۷۱۰۰ انگلستان). در طول دوره سازگاری و آزمایش ماهیان تحت یک رژیم نورانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. ماده بیهوشی مورد استفاده شامل ۲-فنوکسی اتانول (محصول سیگما آمریکا) با درجه خلوص ۹۹/۵ درصد و چگالی ۱/۱۰۷-۱/۱۰۸ گرم درلیتر و به نسبت ۱ به ۱۰ در اتانول ۹۵ درصد حل شد. غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌لیتر در لیتر از این ماده، بر اساس مطالعات پیشین که بر روی سایر ماهیان انجام شده بود انتخاب شد (۱۷). هر غلظت ذکر شده به یک مخزن ۱۰۰ لیتری اضافه شد و پیش از انجام آزمایش آب به مدت ۲ دقیقه به شدت هوادهی شد. ده ماهی به طور جداگانه در معرض هر غلظت و زمان تأثیرگذاری آن بودند (مرحله بیهوشی عمیق شامل از دست دادن کل فعالیت، شناور شدن در انتهای مخزن و عدم پاسخ در به برخورد دست بود (۴). زمان به وسیله کرنومتر ثبت شد، به محض این که ماهی به مرحله بیهوشی عمیق رسید به آب تازه و به شدت هوادهی شده منتقل شد، و زمان کل برای ریکاوری ثبت شد. زمان ریکاوری به عنوان مدت زمان مورد نیاز برای رسیدن به تعادل و شنای فعال ثبت شد.

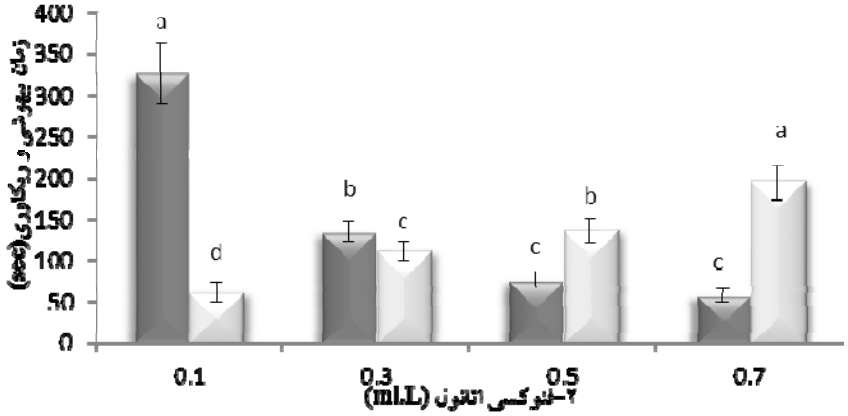
آنالیزهای بیوشیمیایی و خون شناسی : برای تست‌های بیوشیمیایی و خون‌شناسی با گروه شاهد، هشت ماهی استفاده شد که به طور جداگانه در معرض غلظت‌های موثر۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌لیتر در لیتر ۲-فنوکسی اتانول قرارگرفتند. وقتی ماهیان به مرحله بیهوشی عمیق رسیدند، سطح بدن خشک و سپس خون‌گیری با قطع ورید ساقه دمی انجام شد. نمونه خون گروه شاهد بدون مواد بیهوش کننده بود و برای تست خون‌شناسی، نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد قرارگرفتند. شاخص‌های مورد اندازه‌گیری شامل: تعداد کل گلبول‌های سفید (لوکوسیت)، تعداد کل گلبول‌های قرمز (اریتروسیت)، محتوای هموگلوبین و سطح هماتوکریت بود (۳۴). شمارش گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز به روش هموسیتومتری انجام گرفت (۲۸). مقدار هماتوکریت و غلظت هموگلوبین نیز به روش میکروهماتوکریت و سیانومت هموگلوبین سنجش گردید. به منظور شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، گسترش خونی بر روی لام تهیه و گسترش‌های تثبیت شده با استفاده از رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند. برای تست بیوشیمیایی، گلبول‌های قرمز در لوله قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) فرصت داده شد تا لخته شود. سرم از لخته جدا شد و نمونه پس از سانتریفیوژدر مدت زمان ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد منجمد شد تا زمانی که آنالیزها روی آن انجام شود. قندخون به وسیله روش اسپکتوفتومتری (WPAS2000-UV/VIS کمبریج انگلستان) و کورتیزول به طور مستقیم با استفاده از روش ELISA با استفاده از کیت تجاری (DRG، آمریکا) اندازه‌گیری شد (۴۳).

آزمون‌های آماری: اول نرمال بودن داده‌ها به وسیله آزمون Kolmogorov–Smirnov و همگنی واریانس‌ها با تست

Levene بررسی شد. به منظور بررسی اثر غلظت‌های ۲- فنوکسی اتانول بر القای بیهوشی و زمان ریکاوری و بررسی تغییرات شاخص‌های خونی به وسیله آزمون ANONAیک طرفه و تست توکی در سطح معناداری ۵ درصد (P<۰/۵) بررسی شد. همه نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شدند. آنالیز های آماری در نرم‌افزار PASW 18.0 و به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

نتایج

همه غلظت‌های مورد استفاده از ماده بیهوش کننده ۲- فنوکسی اتانول موثر بودند و بیهوشی کامل را ایجاد کردند. هیچ مرگ‌ومیری در طول آزمایش مشاهده نشد. علاوه بر این، هیچ مرگ‌ومیر و یا بروز عوارض نامطلوب در ۲۴ ساعت پس از ریکاوری مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های متفاوت ۲- فنوکسی اتانول بر زمان بیهوشی و ریکاوری

اطلاعات ارائه شده به صورت وسیله میانگین± انحراف معیار ارائه شده است. تفاوت حروف بالای میله‌ها (کم رنگ نشان دهنده ریکاوری و پررنگ نشان دهنده بیهوشی عمیق) نشان دهنده تفاوت بین غلظت‌های مختلف در مدت زمان بیهوشی عمیق و ریکاوری می‌باشد.

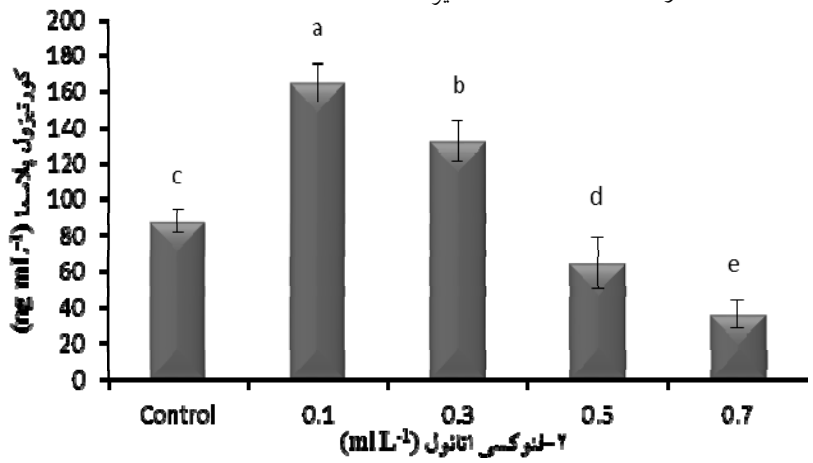
جدول ۱- غلظت‌های ۲-فنوکسی اتانول بر شاخص‌های خونی ماهی کلمه

پارامترهای اندازه‌گیری شده	گروه شاهد	غلظت‌های ۲-فنوکسی اتانول			
		۰/۱	۰/۳	۰/۵	۰/۷
*RBC (۱۰^{۶}×cells/ mL)	۰/۶۷۵۸± ۰/۰۱۶^{b}	۰/۸۳۲۸± ۰/۰۲۷^{a}	۰/۷۰۱۰± ۰/۰۳۲^{b}	۰/۶۹۰۲± ۰/۰۰۸^{b}	۰/۶۷۵۸± ۰/۰۶۲^{b}
**WBC (×۱۰^{۳}cells/mL)	۹/۶۲۰± ۰/۲۶^{a}	۹/۴۷۴± ۰/۲۲^{a}	۹/۳۹۰± ۰/۰۸^{a}	۹/۷۰۷± ۰/۱۵^{a}	۹/۴۸۱± ۰/۲۲^{a}
***Hb (g/dL)	۶/۵۸± ۰/۰۷^{c}	۸/۳۸± ۰,۳۷^{a}	۷/۶۸± ۰/۱۷^{b}	۶/۷۳± ۰/۲۰^{c}	۶/۶۰± ۰/۱۱^{c}
****Hct%	۱۸/۹۲± ۰/۷۳^{b}	۲۱/۹۴± ۰/۴۵^{a}	۱۹/۵۰± ۰/۸۰^{b}	۱۹/۱۰± ۰/۷۱^{b}	۱۹/۰۶± ۰/۵۵^{b}

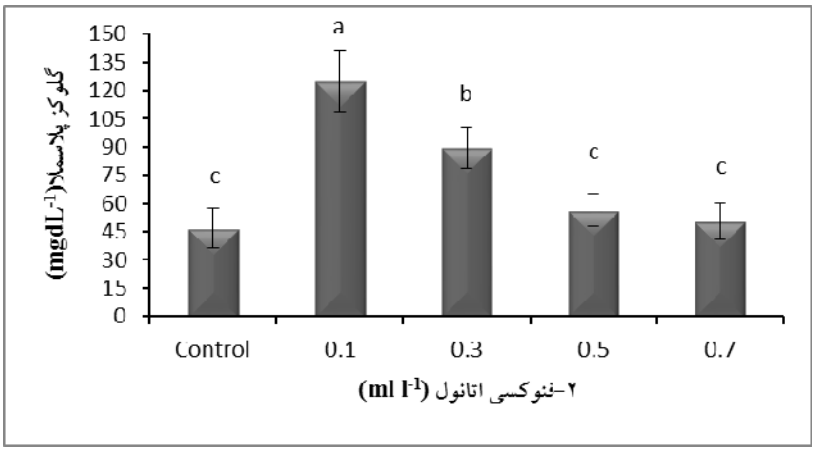
*RBC (Red Blood Cell) گلبول‌های قرمز خون، **WBC(White Blood Cell) گلبول‌های سفیدخون، ***Hb (Hemoglobin) هموگلوبین، ****Hct (Hematocrite) هماتوکریت

طبق نتایج به دست آمده، هر چه قدر غلظت ماده بیهوشی کمتر باشد، بیهوشی عمیق در مدت زمان بیشتری رخ می-دهد و زمان ریکاوری آن کمتر خواهد شد ولی هر چه قدر غلظت ماده بیهوش کننده بیشتر باشد، بیهوشی عمیق در مدت زمان کمتری رخ می‌دهد و زمان ریکاوری آن بیشتر خواهد شد. اثر غلظت‌های مختلف ۲- فنوکسی اتانول بر

شاخص‌های خونی در جدول ۱ نشان داده شده است. هیچ اختلاف معناداری در سطح گلبول‌های سفید، در غلظت-های مورد آزمایش مشاهده نشد، ولی در غلظت ۰/۱ قسمت در میلیون ۲–فنوکسی اتانول، اختلاف معناداری در تعداد گلبول‌های قرمز و درصد هماتوکریت با گروه شاهد مشاهده شد و میزان هموگلوبین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ با گروه شاهد اختلاف معنادار داشت (P<۰/۰۵). تأثیر غلظت‌های متفاوت ۲- فنوکسی اتانول بر سطح کورتیزول و گلوکز در نمودارهای ۲ و۳ نشان داده شده است. در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ قسمت در میلیون این ماده سطح کورتیزول پلاسما به طور معناداری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و در غلظت‌های بالاتر، سطح کورتیزول به طور معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۵).



نمودار۲- تأثیر غلظت‌های مختلف، ۲- فنوکسی اتانول بر میزان کورتیزول پلاسمای خون ماهی کلمه



نمودار۳- تأثیر غلظت‌های مختلف،۲- فنوکسی اتانول بر میزان گلوکز پلاسمای خون ماهی کلمه

به طور کلی با افزایش غلظت ۲–فنوکسی اتانول، سطح گلوکز به طور معناداری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (p<۰/۰۵)، ولی با افزایش از غلظت ۰/۵ به ۰/۷ تفاوت معناداری در غلظت گلوکز مشاهده نشد. در مجموع غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷ از ۲–فنوکسی اتانول مناسب‌ترین غلظت‌هایی بودند که کمترین تأثیر را بر شاخص‌های خونی و پارامترهای بیوشیمیایی خون داشتند.

بحث

بیهوشی یک عامل کلیدی در تحقیقات است که باعث تغییر در برخی از فاکتورهای خونی ماهی می‌شود (۱۵). بیهوشی معمولاً با غوطه‌وری ماهی، در محلول بیهوشی انجام می‌شود و ماده بیهوش کننده از طریق رشته‌های آبششی جذب شده و وارد خون شریانی می‌شود، سپس روی سیستم عصبی مرکزی تاثیر گذاشته و ماهی را بیهوش می‌کند (۲۹). پارامترهای خون‌شناسی بعنوان شاخص‌های فیزیولوژیکی استرس در تغییرات محیط داخلی و خارجی ماهیان استفاده می‌شوند (۲). استرس ناشی از بیهوشی می‌تواند باعث تغییرات هورمونی و متابولیکی خون شود. هم‌چنین تفاوت در شدت استرس و میزان آن در مدت زمان‌های مختلف، بر میزان کورتیزول ترشح شده اثر گذاشته که به دنبال آن بر میزان گلوگز خون نیز تأثیر می‌گذارد. کورتیزول معمول‌ترین هورمون شاخص استرس می‌باشد و اندازه‌گیری آن می‌تواند نشان دهنده بروز استرس و شدت آن باشد، افزایش قندخون یک پاسخ متداول به استرس است که در نتیجه اثر کاکتول‌آمین‌ها و کورتیزول بروز می‌کند (۷ و ۴۴). احتمالاً استفاده از ماده بیهوشی باعث بلوکه شدن اطلاعات از هیپوتالاموس می‌شود و به این صورت استفاده از ماده بیهوشی باعث جلوگیری از فعالیت محور داخلی هیپوتالاموس هیپوفیز می‌شود، به طوری که ممکن است از پاسخ هورمون کورتیزول جلوگیری کند (۱۷ و ۱۶). کاهش گلوکز خون باعث افزایش کورتیزول از ناحیه قشری غده فوق کلیه می‌شود تا با تأثیر بر سایر ذخایر بدن امکان افزایش گلوکز خون فراهم شود. این مکانیزم یک عامل مهم برای حفظ دراز مدت میزان گلوکز خون می‌باشد. وجود همبستگی منفی و معنی‌دار بین این دو عامل نیز حاکی از همین مساله است (۲۱). شاخص‌های مربوط به خون مانند گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید از جمله لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها یکی از بخش‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس مطرح باشد (۳۳).

تحت شرایط استرس‌زا گلبول‌های قرمز نابالغ از طحال آزاد شده و با افزایش متابولیک، اکسیژن رسانی به ارگان‌های مهم افزایش می‌یابد که به دنبال آن گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و سطح هماتوکریت افزایش می‌یابد. نتایج مشابه تحقیق حاضر در ماهیان دیگر گزارش شده است (۲۴ و ۳۱). استفاده از ۲–فنوکسی اتانول در ماهی (*Senegalese sole*) اثر عکس داشت و ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در معرض این بیهوش کننده هیچ تأثیری بر هماتوکریت و سطح هموگلوبین نداشت (۴۳). این اختلاف در نتایج بیانگر این است که گونه‌ها ممکن است، پاسخ‌های بسیار متفاوتی به یک ماده بیهوش کننده داشته باشند. در مطالعه حاضر غلظت گلوکز به طور قابل ملاحظه ای در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۱ قسمت در میلیون ۲–فنوکسی اتانول افزایش یافت. نتایج مشابه توسط Ortunu و همکاران (۲۷) در سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) *مشاهده* شد. هم چنین در این بررسی، سطح کورتیزول در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۱ قسمت در میلیون ۲–فنوکسی اتانول افزایش یافت، نتایج مشابه توسط شالویی و همکاران (۳۱) در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۵ قسمت در میلیون ۲–فنوکسی اتانول در بچه فیل ماهی مشاهده شد. Weber و همکاران نیز (۴۳) با بررسی تأثیر ۲–فنوکسی اتانول (غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در *Senegalese sole*، پس از۲۰ دقیقه افزایش قابل توجهی در غلظت پلاسمای کورتیزول مشاهده کردند. Molinero و Gonzalez (۲۴) نشان دادند که غلظت و موقعیت ۲–فنوکسی اتانول موجب القای پاسخ کورتیزول در ماهی سیم سر طلایی می‌شود. در مقابل King و همکاران (۲۰) دریافتند که پاسخ اولیه کورتیزول در لارو ماهی باس سیاه بستگی به تور و صید دارد و هیچ تغییر قابل توجهی در سطح کورتیزول در غططت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۲– فنوکسی اتانول در مدت زمان ۳۰–۱۰ دقیقه مشاهده نشد. Casillas و همکاران (۱۰) در تحقیقی اثرات استرس بر ماهی قزل آلای رنگین کمان مطالعه کرده و بیان

نمودند که استرس به هر دلیلی سبب افزایش هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول های قرمز می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ۲-فنوکسی اتانول یک ماده بیهوش کننده قوی است که در ماهی کلمه سریع تأثیر می‌گذارد و پس از آن ماهی به سرعت ریکاوری پیدا می-کند. طبق نظریه Marking و Meyer (۲۲)، بیهوش کننده مناسب باید بیهوشی را در زمان ۳ دقیقه و کمتر از آن ایجاد کند و زمان ریکاوری پس از بیهوشی ۵ دقیقه و کمتر باشد. از این رو با توجه به نتایج حاضر کمترین غلظت مناسب ۲-فنوکسی اتانول ۴۰/۳ قسمت در میلیون و غلظت ۰/۷- ۰/۵ قسمت در میلیون برای بیهوشی عمیق و سریع تعیین شد. اثر بخشی بسیاری از بیهوش کننده‌ها به گونه، اندازه بدن، کیفیت آب (دما، سختی، شوری و ...) و تراکم ماهی بستگی دارد (۴۵، ۳۷، ۳۰). به طور کلی میزان حساسیت به مواد بیهوش کننده بر سلامت و شرایط فیزیکی ماهی تأثیر می‌گذارد، غلظت اکسیژن هم می‌تواند موثر باشد، به طوری که با کاهش میزان اکسیژن تأثیرگذاری ماده بیهوش کننده افزایش می‌یابد (۳۳). اما یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر که بر اثرگذاری ۲-فنوکسی اتانول اثر می‌گذارد، دمای آب است، هر چه قدر دمای آب بالاتر باشد موجب کارایی بیشتر ماده بیهوشی در ماهیان می‌شود. استفاده مجدد از ۲-فنوکسی اتانول آستانه تحمل ماهی به ماده بیهوش کننده را افزایش می‌دهد (۴۵). ماهیان جوان نسبت به ماهیان مسن حساسیت بیشتری دارند. بنابراین باید غلظت بیهوش کننده برای این ماهیان کمتر باشد و موارد ایمنی بیشتری برای استفاده از بیهوش کننده‌ها به کار گرفته شود (۶). Velisek و Svobodova (۳۸) با بررسی ۲-فنوکسی اتانول بر کپور معمولی به این نتیجه رسیدند که تعداد دفعات بیهوشی و به هوش آمدن به غلظت این بیهوش کننده مربوط است و در مدت زمان ۱۰ دقیقه قرارگیری در غلظت ۰/۵ قسمت در میلیون این ماده، ماهی وارد مرحله ۴ بیهوشی و نهایتاً مرگ می‌شود. اثر مشابه این غلظت از بیهوشی بر روی لای‌ماهی *(Tinca tinca)* توسط Myszkowski و همکاران (۲۶) و Weyl و همکاران (۴۵) توضیح داده شده است. پروفایل بیوشیمی خون می‌تواند یک منبع مهم اطلاعات از ارگانیسم‌های مهم داخلی باشد (۲۳).

Hseu و همکاران (۱۳) با بررسی تأثیر بیهوش کننده ۲-فنوکسی اتانول بر کپور به این نتیجه رسید که غلظت ۰/۳ میلیون در لیتر هیچ تأثیری بر فاکتورهای استرس خون (کورتیزول و گلوکز) ندارد. با این حال او افزایش کورتیزول را در طول بیهوشی با ۲-فنوکسی اتانول در غلظت ۴۰۰ppm در باس دریایی (*Latest calcarifer*) شرح داده است. در پاسخ به استرس‌های موجود در محیط آبی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند بیانگر سرکوب ایمنی موجود و افزایش میزان آن‌ها نشان دهنده پاسخ به استرس یا عفونت باشد (۲). مقدار استفاده از دوزهای مختلف بیهوش کننده‌ها در آبزی پروی اهمیت بسیاری دارد. Velisekو Svobodova (۴۰) با بررسی ۲-فنوکسی اتانول بر شاخص‌های خونی کپور معمولی به این نتیجه رسیدند که در مقادیر هماتوکریت، مقادیر خونی وابسته و مقادیر واقعی مونوسیت‌ها پس از ۱۰ دقیقه قرارگیری در معرض این بیهوش کننده، افزایش معناداری مشاهده شد، و ۲۴ ساعت ($p<0/01$). پس از بیهوشی مقادیر خونی و مونوسیت‌ها به حالت نرمال خود بازگشتند ولی Admek و همکاران (۳) نشان دادند که بیهوشی در غلظت ۰/۳ میلیون در لیتر ۲- فنوکسی اتانول در کپور معمولی موجب افزایش مقادیر گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین می‌شود.

Velisekو Svobodova (۴۰) با بررسی ۲-فنوکسی اتانول بر شاخص‌های خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان به این نتیجه رسیدند که غلظت ۰/۳ میلیون در لیتر ۲- فنوکسی اتانول هیچ تأثیری بر پروفیل خونی نداشت که این نتیجه با یافته‌های Tort و همکاران (۳۶) مغایرتی نداشت.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان داشت، ماده ۲-فنوکسی اتانول یک بیهوش کننده قوی است که در ماهی کلمه سریع تأثیر می‌گذارد و پس از آن ماهی به سرعت

ریکاوری پیدا می‌کند، هم‌چنین این ماهی باید در غلظت-های بالای این ماده بیهوش و سپس خون‌گیری شود تا حداقل استرس به آن وارد شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم آزمایشگاه آبزی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و کلیه عزیزانی که در فراهم ساختن شرایط لازم جهت انجام این تحقیق همکاری نمودند صمیمانه قدردانی می گردد.

منابع

۱. عبدلی، ا.، ۱۳۸۷. ماهیان آب‌های داخلی ایران، انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران، ۳۷۸ صفحه.

۲. عنایت غلامپور، ط.، ایمانپور، م.، حسینی، ع.، و شعبانپور، ب.، ۱۳۹۰. تاثیر سطوح مختلف شوری بر شاخص‌های رشد، میزان بازماندگی، غذاگیری و پارامترهای خونی در بچه ماهیان سفید، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۴، شماره ۴.

3. Adams, S. M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress: Bethesda, MD. American Fisheries Society

4. Adamek, Z., Fasaic, K., Paul, A., and Lamesic, M., 1993. The effect of 2-phenoxyethanol narcosis on blood parameters of young carp (*Cyprinus carpio* L.). Veterinary Archive, 63. PP: 245-250.

5. Anderson, W. G., Mckinley, R. S., and Colavecchia, M., 1997. The use of clove oil as an aesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. North Journal of Fisheries Management, 17. PP: 301-307.

6. Barton, B. A., and Helfrich, H., 1981. Time-dose responses of juvenile common carp to 2-phenoxyethanol. Progress Fish Culture, 43. PP:223-231.

7. Barton, B. C., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and comparative biology, 42. PP:517–525.

8. Berg, S. L., 1964. Fresh water fishes of USSR and adjacent countries. Izdatelstvo Academic Nauk USSR, Moscow, PP: 1510.

9. Bernatzeder, A. K., Cowley, P. D., and Hecht, T., 2008. Effect of short term exposure to the anesthetic 2-phenoxyethanol on plasma osmolality of juvenile dusky kob, Argyrosomus japonicus (*Sciaenidae*). Journal of Applied Ichthyology, 24, PP: 303–305.

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

11. Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A., and Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. Comparative Biochemistry Physiology,121. PP: 351–354.

12. Shawn, D., and Robert, M. and James, H., 2004. Anesthetics in aquaculture. No. 3900. Southern Regional Aquaculture Center.

13. Heseu, J. R., Chu, Y. T., Yeh, S. l., and Ting, Y. Y., 2002. Application of 2-phenoxyethanol in live transportation of sea bass, Latest calcarifer. Journal Fish Society Taiwan, 27. PP: 23-48.

14. Hoseini, S. M., Hosseini, S. A., and Jafar Nodeh, A., 2010. Serum biochemical characteristics of Beluga, *Huso huso* (L.), in response to blood sampling after clove powder solution exposure. Fish physiology and biochemistry, 45. PP: 28-44.

15. Hoseini, S. M., and Jafar Nodeh, A., 2011. Changes in blood biochemistry of concentrations of clove solution. Comparative clinical pathology, 46. PP: 76-82.

16. Iversen, M., Finstad, B., and McKinley, E. R., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, aqui-s and benzoak anestheticsin Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity, Aquaculture, 221. PP: 549-566.

17. Jahanbakhshi, A., Jahanbakhshi, A., Baghfalaki, M., Imanpour, M.R., Nodeh, A.J and Shaluei, F. 2012, "Effects of different concentrations of 2-phenoxyethanol on primary and secondary stress responses in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*." Journal of Applied Ichthyology, PP: 1-4.

18. Kayabali, K., and Kiser, H., 1998. Testing the ability of bentonite amended natural zeolite (clinoptilolite) to remove heavy metals from liquid waste. Journal of Environmental Geology, 34. PP: 95-100.

19. Keyvanshokooh, S., and Kalbassi, M. R., 2006. Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus*(Jakowlew 1870) populations in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers: apreliminary study. Aquaculture Research, 37. PP: 1437-1440.

20. King, W. V., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C., and Berlinsky, D., 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine, methanaeulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaethesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). Aquaculture Research, 36 PP: 1442–1449.

21. Lehninger, A., 1975. Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function: Albert L. Lehninger. Second Edition, Worth Publishers, Inc., New York. Pp. 1104.

22. Marking, L. L., and Meyer, F. P., 1985. Are better anaethetics needed in fisheries? Fisheries,10. PP: 2–5.

23. Mojabi, A., 2000. Veterinary clinical biochemistry. (in farsi), 2th ed. Noorbakhsh Press, Tehran, Iran, pp: 429-432.

24. Molinero, A., and Gonzalez, J., 1995. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. Comprative Biochemistry Physiology, Part3A, 3. PP:405–414.

25. Mylonas, C. C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., and Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anaethetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture, 246. PP: 467–481

26. Myszkowski, L., Kaminski, R., and Wolnicki, J., 2002. Respose of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to2-phenoxyethanol. Journal Fish Biology. 23: 400-430.

27. Ortun, o.J., Esteban, M.A., and Meseguer, J., 2002: Effects of four anaethetics on the innate immune response of gilthead seabream(*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology, 12. PP:49–59.

28. Rabitto, I. S., Costa, J. R. M. A., Silva de Assis, H. C., Randi, M. A. F., Akaishi, F. M., Pelletier, E., and Oliveira Ribeiro, C. A., 2005. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish Hoplias malabaricus: Histopathological and biochemical findings. Ecotoxicology Environmental Safety, 60. PP: 147–156.

29. Ross, L. G., and Ross, B., 1999. Anesthetic and sedative techniques for Aquatic Animals. 2 nd ed. Blackwell Science ltd., oxford .

30. Serezli, R., Basaran, F., Gungor Muhtaroglu, C., and Kaymakci Basaran, A., 2012. Effects of 2-phenoxyethanol anaethesia on juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). Journal of Applied Ichthyology, 28. PP: 87–90.

31. 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 anaethetic. Fish Physiology and Biochemistry. Dec;38(6) PP:1627-1634

32. Stoskopf, M. A., 1993. Fish medicine. Sounders Company, U.S.A, PP: 882.

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

34. Topic popovic, N., Strunjak-perovic, I., Coz-rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Persin berakovic, A., and sauerborn klobucar, R., 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaethesia. Journal of Applied Ichthyology, 28. PP: 553–564.

35. Tort, L., Piugcerved, M., Crespo, S., and Padros, P., 2002. Cortisol and hematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. Aquaculture Research, 33. PP: 907-910.

36. Tsantilas, H., Galatos, A. D., Athanassopoulou, F., Prassinos, N. N., and Kousoulaki, K., 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anesthetic for two size classes of white sea bream, Diplodus sargus L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. Aquaculture, 253. PP: 64–70.

37. Velisek, J., and Svobodova, Z., 2004a. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. Acta Veterinary, 73. PP: 247-252.

38. Velisek, J., Svobodova, Z., and Piackova, V., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Veterinary BRNO, 74. PP: 139-146.

39. Velisek, J., Svobodova, Z., and Piackova., V., 2007. Effects of 2-Phenoxyethanol Anaesthesia on Hematological Profile on Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Veterinary, 76. PP: 487-492.

40. Velisek, J., Stara, A., Li, Z-H., Silovska, S., and Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaethetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. Aquaculture, 310. PP: 369–375.

41. Weber, R. A., Peleteiro, J. B., Garcı a-Martı n, L. O., and Aldegunde, M., 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaethetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture, 288. PP: 147–150.

42. Weber, R. A., Perez-Maceira, J. J., Peleteiro, J. B., Garcı a-Martı n, L., and Aldegunde, M., 2011. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (Solea senegalensis Kaup 1858). Aquaculture, 321. PP: 108–112.

43. Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. Physiological review, 77. PP: 591–625.

44. Weyl, O., Kaiser, H., and Hecht, T., 1996. On the efficacy and mode of action of 2-phenoxyethanol as an anaethetic for goldfish, *Carassius auratus* L., at different temperatures and concentrations. Aquaculture Research, 27. PP: 757–764.

45. Woody, C. A., Nelson, J., and Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. Journal of Fish Biology, 60: 340-347.

46. Yoshikawa, H., Ishida, Y., Ueno, S., and Mitsuda, H., 1988. Changes in depth of anaethesia of the carp anaethetized with a constant level of carbon dioxide. Japonica Society Science Fish, 54.PP: 457–462

Effect of 2-phenoxyethanol as an anesthetic substance on Hematological indices of Roach *(Rutilus rutilus caspicus)*

Jahanbakhshi A., Hedayati A. and Javadimoosavi M.

Fisheries Dept., Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

In the present research, the effect of different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic on the hematological indices, glucose and cortisol levels in (*Rutilus rutilus caspicus*) were studied. the fish anesthesia inducing time and recovery were measured, in effective concentrations at (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mL/L) of 2-phenoxyethanol. Results showed that exposure to low concentrations of this anesthetic substance (0.1 and 0.3) caused deep anesthesia in the longer time and the recovery time is shortens and vice versa. There was no significant differences in WBC level in aforementioned concentrations ($P>0.05$). Hematocrit and hemoglobin value in 0/5 and 0/7 concentrations respectively did not differed significantly with controls ($P> 0.05$). In 0.1and 0.3 ml L-1 concentrations of this substance, the level of plasma cortisol was significantly increased ($p<0.05$). In higher concentrations, cortisol levels significantly was decreased ($p<0.05$). Results of this study show that Roach should be anesthetized at the higher doses of 2-phenoxyethanol to induce lower stress on blood parameters.

Key words: *Rutilus rutilus caspicus***,** 2-phenoxyethanol**,** anesthesia, glucose, cortisol