

پاسخ‌های استرسی و خونی پس از بیهوشی بچه فیل‌ماهیان جوان (*Huso huso* L.)

نگهداری شده در تراکم‌های کم و زیاد در شرایط زمستانه

بهرام فلاحتکار^{۱*}، سپیده کهن‌سال^۱، رامین محمدعلی‌ها^۱

^{*}falahatkar@gilan.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

تاریخ دریافت دی ۱۳۹۴

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر استرس‌های مزمن (تراکم) و حاد (دستکاری) موجود در محیط‌های پرورشی بر شاخص‌های استرسی و خونی فیل‌ماهی (*Huso huso*) در شرایط زمستانه (دماهی زیر ۱۰ درجه سانتیگراد) پس از اعمال بیهوشی انجام گردید. ماهی‌هایی با میانگین (\pm خطای استاندارد) وزن $1/4 \pm 399$ گرم در دو تراکم کم (1 kg/m^2) و زیاد (8 kg/m^2) هر کدام در ۳ تکرار به مدت یک هفته نگهداری شدند. سپس ماهیان تحت شرایط استرس حاد قرار گرفتند به گونه‌ای که سریعاً از آب خارج شده و به مدت ۲ دقیقه در مخزن آبی (50°C) که حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک بود بیهوش شده و سپس به مخزن اصلی پرورش برگردانده شدند. قبل از استرس (زمان صفر)، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال استرس از ماهیان خون‌گیری گردید و شاخص‌های استرسی (کورتیزول، گلوکز و لاکتات) و خونی (هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول قرمز، MCH، MCHC، MCV) تعداد گلبول سفید، لنفوцит، نوتروفیل و مونوцит) سنجش شد. نتایج نشان داد پس از یک هفته نگهداری ماهیان در تراکم‌های کم و زیاد اختلافی در پارامترهای اندازه‌گیری شده فوق مشاهده نشد. نتایج بررسی میزان پارامترهای استرسی یک ساعت پس از اعمال استرس حاد و بیهوشی اختلاف معنی‌داری را با زمان صفر (قبل از استرس) نشان داد ($p < 0.001$)، همچنین در میزان لاکتات اندازه‌گیری شده در ساعت ۳ پس از اعمال استرس حاد و بیهوشی اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار کم تراکم و پر تراکم مشاهده شد ($p = 0.032$). تعداد گلبول سفید در ساعت ۱ و ۶ پس از اعمال استرس حاد و بیهوشی در تیمار پر تراکم با ساعت شروع اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد ($p < 0.001$). میزان MCV نیز در ساعت ۴۸ پس از اعمال استرس و بیهوشی اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مورد آزمایش نشان داد ($p = 0.016$). در بررسی سایر پارامترها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در ساعت‌های مختلف نمونه‌گیری مشاهده نگردید ($p > 0.05$). نتایج حاصله نشان از مقاومت بالای فیل‌ماهیان در شرایط استرس مزمن، اعمال بیهوشی و استرس حاد دارد. با این حال به نظر می‌رسد بیهوشی نتوانسته است اثرات منفی اندک ناشی از استرس را حتی در شرایط دماهی پایین کنترل نماید.

کلمات کلیدی: استرس، فیل‌ماهی، تراکم، بیهوشی، دماهی پایین

*نویسنده مسئول

۴ مقدمه

فیل‌ماهی، بزرگ‌ترین ماهی زنده آب شیرین و ارزشمندترین نوع ماهی خاویاری جهان محسوب می‌شود. جنس ماده این ماهی بهترین نوع خاویار را دارد و ممکن است یک ماهی ماده بزرگ حاوی بیش از ۷ میلیون تخم باشد (Bond, 1996). فیل‌ماهی از ماهیان سریع الرشد بوده و در اولين سال زندگی خود رشد سریعی نسبت به گونه‌های دیگر دارد (Kazemi et al., 2005). در حال حاضر برخی از کشورها با هدف بازسازی ذخایر طبیعی و یا تأمین نیازهای مزارع پرورشی به دلیل نرخ رشد بالا، از این گونه و دورگه‌های آن استفاده می‌کنند (Falahatkar & Barton, 2007).

پرورش ماهیان در سیستم‌های متراکم و محیط‌های مصنوعی منجر به قرار گرفتن آن‌ها در معرض عوامل استرس‌زای مختلفی گردیده است که در شرایط طبیعی مشابه این Fevolden et al., 2001 حالت برای آن‌ها ایجاد نمی‌گردد (Weil et al., 2002). این عوامل می‌توانند تحت تأثیر شرایط محیطی، تغذیه‌ای و عوامل درونی ماهی باشد یا ضعف، سبب بروز برخی پاسخ‌ها در جانور شوند، به طوری که عمدتاً شاخص‌های خونی نظیر کورتیکوستروئیدها و برخی متابولیت‌های خون تحت تأثیر قرار می‌گیرند. هرگونه فاکتور استرس‌زای محیطی یا بیولوژیک که قادر به ایجاد استرس باشد، عاملی است که سبب بروز یک پاسخ فیزیولوژیک در افراد، جمعیت یا اکوسیستم جهت سازگاری و مقابله با آن خواهد بود (McCarty et al., 1996). استرس اثرات بسیار متنوع و گوناگونی بر رشد، سیستم فیزیولوژی و ایمنی بدن می‌گذارد، به همین دلیل یکی از موارد مهم در امر پرورش مصنوعی ماهیان، توجه به آسایش، سلامت و عدم استرس در محیط پرورش است (Barton et al., 1998).

معروف‌ترین طبقه‌بندی در رابطه با استرس، تقسیم‌بندی Saroglia et al., 2012 آن به دو گروه مزمن و حاد است (Cordeiro et al., 2012). استرس‌های مزمن عموماً ناشی از مجاورت مکرر با عامل استرس‌زای ضعیف به وجود می‌آید (Segner et al., 2012)، در حالی که استرس‌های حاد یا کشنده به استرس‌هایی اطلاق می‌گردد که عامل استرس‌زا در مدت کوتاهی ظهرور می‌یابد (Trenzado et al., 2006; Barton, et al., 1998) و

استرس‌های دستکاری به‌طور معمول جزء گروه استرس‌های حاد طبقه‌بندی می‌شوند (Gennotte et al., 2012). مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر تراکم (به عنوان استرس مزمن) و همچنین اثر دستکاری‌ها (استرس حاد) بر روی ماهیان گوناگون انجام شده است (Krasnov et al., 2005; Ramsay et al., 2006; Hosoya et al., 2007; Santos et al., 2010). در این بین، نتایج برخی مطالعات نشان داده است در صورتی که ماهی در یک سیستم پرورشی تحت یک استرس مزمن قرار گیرد پاسخ‌های فیزیولوژیک متفاوتی را در بروز یک استرس حاد از خود نشان خواهد داد (Iversen et al., 2005; Biswas et al., 2006; Di Marco et al., 2008). با این وجود، استفاده از برخی مواد و شرایط نگهداری که به نظر می‌رسند پاسخ‌های استرس‌ماهی را تحت تأثیر قرار دهنده شرایط را کمی پیچیده‌تر می‌کند، چراکه سیستم فیزیولوژیک بدن از چند جنبه تحت تأثیر عوامل گوناگون قرار خواهد گرفت.

دستکاری و حمل و نقل ماهی یک عمل ظریف و حساس است. ماهی‌ها قبل از اقدام به جابجایی باید آرام گرددند که این آرام کردن روش‌های مختلفی دارد. ارزان‌ترین این روش‌ها استفاده از آب سرد (۵ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد) است (Piper et al., 1982). اگر استفاده از آب سرد مناسب و عملی نباشد، باید از بیهوش کننده‌ها (بی‌حس کننده‌ها) و داروهای مخدر (خواب آور) استفاده نمود که می‌توانند در بهبود میزان بقای ماهیان در حال حمل و یا در معرض دستکاری مفید باشند. هدف اصلی از کاربرد افزودنی‌های دارویی، کند کردن سرعت سوخت‌وساز ماهی‌ها و در نتیجه کاهش مصرف اکسیژن، تولید آمونیاک و دی‌اکسید کربن است (Wedemeyer, 1996).

اکثر ماهیان خونسرد هستند و عکس‌العمل‌های ایمنی ضعیفی در طول مدت زمستان در مقایسه با تابستان دارند؛ لذا دما شدیداً بر روی سوخت‌وساز آن‌ها، از جمله ایمنی بدن تأثیر می‌گذارد؛ به عبارت دیگر کاهش دمای آب، پاسخ ایمنی را تضعیف می‌کند (Boshra et al., 2006; Collazos et al., 1994). این احتمال نیز می‌رود که شرایط دمای پایین سبب بروز پاسخ‌های ضعیف‌تر ماهی به عوامل استرس‌زا گردد. نظر به پاسخ‌های متفاوت ماهیان به استرس‌های مزمن و حاد تحت شرایط متفاوت نظری استفاده از مواد بیهوش کننده یا

استرس حاد

پس از یک هفته نگهداری در تراکم‌های ذکر شده، ماهیان تحت شرایط استرس قرار گرفتند، به‌گونه‌ای که به‌وسیله تور سریعاً و ظرف کمتر از ۳۰ ثانیه از هر حوضچه صید شده و به مدت ۲ دقیقه در یک مخزن پلاستیکی (۵۰ لیتر) که حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره پودر گل میخک بود بطور همزمان بی‌هوش شده (تا زمان برگشت ماهی به شکم و افت تعداد حرکات سرپوش آبشنی) و سپس به مخزن اصلی پرورش برگردانده شدند. ماهی‌ها در هر دو تراکم کم و زیاد بدون اختلاف معنی‌داری نهایتاً پس از ۵ دقیقه به هوش آمده و پس از ۱۰ دقیقه به حالت کاملاً طبیعی شنا می‌کردند.

نمونه‌گیری و آنالیز نمونه‌ها

به‌منظور سنجش پارامترهای خونی در هر مرحله زمانی، ۲ عدد ماهی در ساعتهاي صفر (قبل از استرس)، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ از هر حوضچه پرترکم و یک عدد ماهی از هر حوضچه کم تراکم (از هر تکرار) به‌طور تصادفی صید گردید. تقریباً ۲ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ وریدی در قسمت انتهای باله مخرجی هر ماهی با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتر هپارینه در هر مرحله زمانی و بدون بیهودی گرفته شد. ماهیان خونگیری شده به مخازن دیگری برای عدم ایجاد استرس به سایر ماهی‌ها انتقال داده شدند. از یک قطره خون، برای تهیه گسترش خونی به‌منظور تعیین درصد افتراقی گلبول‌های سفید استفاده شد. مابقی خون گرفته شده در دو لوله پلاستیکی درب‌دار مجزا ریخته و شماره‌گذاری شدند. یکی از دو نمونه برای تعیین پارامترهای هماتولوژیک شامل تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، غلظت هموگلوبین (Hb)، درصد هماتوکریت (Hct)، حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) استفاده شد و دیگری برای تهیه پلاسمای به‌منظور تعیین پارامترهای کورتیزول، گلوکز و لاکتان در سانتریفیوز (یونیورسال، پارس آزمایشگاه، تهران، ایران) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری هماتوکریت، لوله‌های موئینه تا حدود دو سوم بانمونه‌های خون پر شد و یک طرف آن با خمیر مخصوص بسته شد و به‌وسیله سانتریفیوز میکروهماتوکریت (Nüve, Ankara, Turkey) با سرعت

دمای پایین، این مطالعه با هدف بررسی اثر نگهداری فیل‌ماهیان جوان در تراکم‌های مختلف و سپس اعمال استرس حاد دستکاری و پاسخ‌های فیزیولوژیک و هماتولوژیک صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش

تعداد ۱۷۱ عدد بچه فیل‌ماهی جوان با وزن متوسط $44/8 \pm 0/1$ (میانگین \pm ۱/۴) سانتی‌متر که حاصل تکثیر مولدین وحشی در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان بودند، پس از انتقال به مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر (استان گیلان) در استخرهای خاکی ۲ هکتاری مورد پرورش قرار گرفتند و سپس به مرکز تکثیر و بازاری ذخایر ماهیان دریایی شادردان دکتر یوسف پور سیاهکل (استان گیلان) منتقل شده و در حوضچه‌های بتونی با حجم آبگیری 81 m^3 نگهداری شدند. در طی نگهداری در دوره آزمایش، میانگین اکسیژن محلول $10/2 \pm 1/6 \text{ ppm}$ میانگین دمای آب $0/8^\circ\text{C} \pm 8/2$ و طول دوره روشنایی به صورت ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی بود. میزان جریان ورودی به هر حوضچه پرورش 18 l/min بوده و هواهدهی پیوسته در طول دوره آزمایش انجام گردید. بچه فیل‌ماهیان جوان به مدت یک هفته دردو تراکم کم ۷ ماهی به ازای هر حوضچه (1 kg/m^2) و تراکم بالا، ۵۰ ماهی به ازای هر حوضچه (8 kg/m^2 ، هر کدام در سه تکرار نگهداری شدند Rafatnezhad *et al.*, 2008; Falahatkar *et al.*, 2009). در مجموع ۶ مخزن برای این آزمایش در نظر گرفته شد. غذادهی در این زمان طی ۴ مرحله در شب‌نه روز (ساعت‌های ۱۶، ۱۲، ۸ و ۲۰) به روش دستی با پلت‌های تجاری Skretting (۳ میلی‌متر قطر، ورونا، ایتالیا، پروتئین٪ ۴۲، چربی٪ ۲۰، خاکستر٪ ۱۰، رطوبت٪ ۱۰، فیبر خام٪ ۰.۸) به میزان اشتهاي ماهیان انجام می‌شد. غذادهی تا زمان رجوع و پذیرش ماهی‌ها به پلت‌ها ادامه و پس از آن قطع می‌گردید. پلت‌های احتمالی خورده نشده و فضولات ماهی با سیفون کردن آب در هر صبح از سیستم پرورشی خارج می‌شد.

برای فیکس کردن آن‌ها استفاده شد. از رنگ گیمسا طبق روش ذکر شده جهت رنگ‌آمیزی لام‌ها استفاده شد. پس از ۲۰ دقیقه لام‌ها شسته و در دمای اتاق خشک شد، سپس با میکروسکوپ نوری و با عدسی $\times 100$ و روغن امرسیون مورد مشاهده قرار گرفت. با توجه به این نکته که تراکم سلول‌ها در لام نباید خیلی زیاد یا خیلی کم باشد، روی لام به صورت مارپیچی حرکت کرده و با مشاهده هر نوع از گلbul‌های سفید (شامل لنفوسيت، مونوسیت، اوزینوفیل، نوتروفیل) شاسي مربوطه دستگاه شمارنده (مدل LC-10، شرکت بهداد، تهران، ایران) زده شد تا شمارش کل به ۲۰۰ عدد برسد. سپس درصد هر نوع سلول به طور جداگانه محاسبه گردید (Rehulka, 2000).

شاخص‌های مهم سلول‌های قرمز خون نیز مطابق فرمول‌های زیر تعیین گردید (Köprücü *et al.*, 2006):

$$\text{MCV} = \frac{\text{حجم متوسط گلbul‌های قرمز}}{\text{عداد گلbul‌های قرمز}} \times 10^6$$

$$\text{MCH} = \frac{\text{مقدار متوسط هموگلوبین گلbul قرمز}}{\text{عداد گلbul‌های قرمز}} \times 10^{-12}$$

$$\text{MCHC} = \frac{\text{غلظت متوسط هموگلوبین گلbul قرمز}}{\text{هماتوکریت / هموگلوبین}} \times 10^{-6}$$

آماری از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. داده‌های ارائه شده در متن به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) است.

نتایج

شاخص‌های استرسی

پس از یک هفته نگهداری فیل‌ماهیان جوان در دو تراکم پایین و بالا، اختلاف معنی‌داری در میزان کورتیزول مشاهده نشد. نتایج اندازه‌گیری کورتیزول نشان داد که اختلاف معنی‌داری در طول زمان در تیمارهای مختلف وجود دارد به‌گونه‌ای که بیشترین میزان کورتیزول در ۱ ساعت پس از اعمال استرس حاد دست‌کاری در تیمار پرترکم $(27.5 \pm 3.0) \text{ ng/ml}$ دیده شد. در خصوص تیمار کم تراکم نیز افزایش مشاهده شده در ساعت ۱ پس از استرس نسبت به اولین ساعت نمونه‌گیری معنی‌دار بود. در هر دو تیمار کم تراکم و پرترکم سطح کورتیزول ۳ ساعت پس از اعمال استرس کاهش و تقریباً به حالت اولیه خود بازگشت (شکل ۱ الف).

۳۵۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مقدار حجم سلولی یا هماتوکریت هر نمونه خون محاسبه شد (Rehulka, 2000).

هموگلوبین با روش سیان مت هموگلوبین و کیت تجاری Sigma-Aldrich اندازه‌گیری شد. مقدار جذب نوری و غلظت هموگلوبین با طول موج ۵۴۰ nm در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Technicon, USA)، ثبت و محاسبه شد (Drabkin, 1945).

تعداد گلbul‌های سفید و قرمز با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق‌سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱:۵۰) برای گلbul‌های سفید و رقت ۱:۲۰۰ برای گلbul‌های قرمز شمارش شد (Barros *et al.*, 2002).

برای شمارش افتراقی گلbul‌های سفید، ابتدا گسترش خونی تهیه گردید. پس از خشک شدن لام‌ها، از متابول خالص

(تعداد گلbul‌های قرمز / هماتوکریت)

(تعداد گلbul‌های قرمز / هموگلوبین)

(هماتوکریت / هموگلوبین)

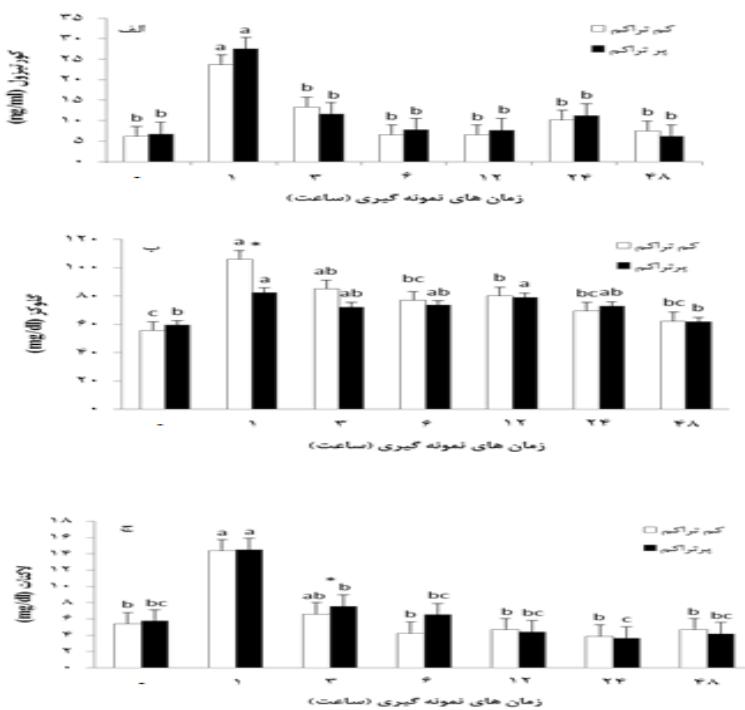
اندازه‌گیری کورتیزول پلاسمای سنجی آنزیمی یا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ELISA انجام گردید (Barry *et al.*, 1993). مقدار گلوكز موجود در پلاسمای پس از آماده‌سازی نمونه‌ها توسط Sigma Aldrich, St. hexokinase (Bayunova *et al.*, Louis, USA 2002) اندازه‌گیری شد (Louis, USA 2002). اندازه‌گیری لاکتات با استفاده از روش رنگ سنجی (Barton و همکاران ۲۰۰۵) انجام شد. شرح داده شده توسط Barton و همکاران (2005) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov-Smirnov و واریانس میانگین‌ها از طریق Levene مقایسه گروه‌ها از طریق 3-way ANOVA انجام پذیرفت. سپس مقایسه میانگین‌ها در یک تیمار و ساعت متفاوت تیمارها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون Tukey صورت پذیرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها در دو تیمار تراکم کم و زیاد در یک ساعت مشخص از آزمون t غیرمستقل استفاده شد. کلیه عملیات

بیشتر از تیمار پرتراکم بود اما اختلافی بین دو تراکم در ساعتهای مختلف دیگر مشاهده نشد (شکل ۱ ب). در ساعت صفر (شروع آزمایش)، غلظت لاکتات در تیمار کم تراکم $0.4 \pm 0.6 \text{ mg/dl}$ و در تیمار پرتراکم $0.7 \pm 0.5 \text{ mg/dl}$ بود، اما اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نشد. در طی دومین مرحله نمونه‌گیری (ساعت ۱) غلظت لاکتات به طور معنی‌داری در هر دو تیمار افزایش یافت (کم تراکم $1.3 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ و پرتراکم $1.5 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$). در هر دو تیمار پس از ۳ ساعت، لاکتات به حالت اولیه خود بازگشت. در بین دو تیمار موجود (کم تراکم و پرتراکم) در ساعت ۳ پس از اعمال استرس حد دستکاری، اختلاف معنی‌داری دیده شد (شکل ۱ ج).

در خصوص مقدار گلوکز پلاسمای نیز، پس از یک هفته نگهداری در دو تراکم پایین و بالا، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، در حالی که در طول روند زمان اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده شد؛ به گونه‌ای که در رابطه با تیمار کم تراکم بیشترین میزان گلوکز در ساعت ۱ پس از استرس ملاحظه گردید ($10.6 \pm 3.6 \text{ mg/dl}$) و ۶ ساعت پس از آن کاهش و تقریباً به حالت اولیه خود بازگشت. در رابطه با تیمار پرتراکم نیز بیشترین میزان گلوکز در ساعت ۱ پس از استرس مشاهده شد (۸.۲ \pm ۳.۳ mg/dl) ولی ۳ ساعت پس از آن تقریباً به حالت اولیه خود بازگشت. در ساعت ۱ پس از استرس مقدار گلوکز در تیمار کم تراکم به طور معنی‌داری



شکل ۱: روند تغییرات کورتیزول (الف)، گلوکز (ب) و لاکتات پلاسمای (ج) در فیل‌ماهیان نگهداری شده در تراکم بالا (8 kg/m^2) و پایین (1 kg/m^2) در ساعت‌های قبیل و پس از بیهوشی در شرایط زمستانه. حروف a, b, c و بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های یک تیمار در طول آزمایش است ($p < 0.05$). علامت * اختلاف معنی‌دار بین دو تراکم را در ساعت مربوطه نشان می‌دهد ($p < 0.05$). ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر تیمار فاقد اختلاف معنی‌دار هستند ($p > 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند. (n=۳ برای تیمار تراکم بالا و n=6 برای تیمار تراکم پایین).

Figure 1: Changes of plasma cortisol (A), glucose (B) and lactate (C) levels in juvenile beluga sturgeon *Huso huso* held under high (8 kg/m^2) or low (1 kg/m^2) densities before and after stress in winter condition. Different letters of a, b, and c show significant difference in a treatment throughout the experiment ($p < 0.05$). Asterisk show significant difference between two densities at the same time ($p < 0.05$). Columns with at least one similar letter in each treatment show no significant difference ($p > 0.05$). Data are presented as mean \pm standard error (n=6 for high and n=3 for low densities).

زمان در خصوص تیمار پرتراکم وجود داشته به‌گونه‌ای که تعداد گلبول‌های سفید در ساعت ۱ ($1969/1 \text{ mm}^3$) و 6 ($15933/3 \pm 2190/9 \text{ mm}^3$) پس از اعمال استرس حاد دستکاری تفاوت معنی‌داری با ساعت شروع نمونه‌گیری (قبل از استرس) ($15083/3 \pm 7483/3 \text{ mm}^3$) داشت. اختلاف معنی‌داری در ارتباط با گلبول‌های سفید در تیمار کم تراکم و همچنین بین دو تراکم در ساعت‌های مختلف مشاهده نشد. در مورد درصد افتراقی گلبول‌های سفید خون نیز، پس از یک هفته نگهداری در دو تراکم، اختلاف معنی‌داری در درصد لنفوسیت، نوتروفیل، اوزینوفیل و مونوسیت مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل‌ها، اختلاف معنی‌داری را در طول زمان و بین تیمارهای مختلف نیز نشان نداد (جدول ۲).

شاخصهای هماتولوژی
پس از یک هفته نگهداری در دو تراکم پایین و بالا، اختلاف معنی‌داری در درصد هماتوکریت، غلظت هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز، MCH، MCV و MCHC مشاهده نشد. همچنین اختلاف معنی‌داری در ارتباط با این شاخص‌ها در روند زمان و همچنین بین دو تیمار کم تراکم و پرتراکم در ساعت‌های مختلف مشاهده نشد. تنها در مورد شاخص MCV در ساعت ۴۸ پس از اعمال استرس حاد دستکاری تفاوت مشاهده شده بین دو تیمار کم تراکم ($489/5 \pm 32/9 \text{ fl}$) و پرتراکم ($448/1 \pm 5/1 \text{ fl}$) معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین پس از یک هفته نگهداری در دو تراکم پایین و بالا، اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید مشاهده نشد. نتایج اندازه‌گیری‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری در طول

جدول ۱: روند تغییرات هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز، MCH، MCV و MCHC (میانگین \pm خطای استاندارد) در فیل‌ماهیان نگهداری شده در تراکم بالا (8 kg/m^2) (تعداد ۳ نمونه) و پایین (1 kg/m^2) (تعداد ۶ نمونه) در ساعت‌های قبل و پس از بیهوشی در شرایط زمستانه

Table 1: Changes of hematocrit, hemoglobin, number of red blood cells, MCV, MCH, and MCHC (mean \pm standard error) in juvenile beluga sturgeon *Huso huso* held under high (8 kg/m^2 ; n=6) or low (1 kg/m^2 ; n=3) densities before and after stress in winter condition.

زمان‌های پس از استرس (ساعت)

| ۴۸ | ۲۴ | ۱۲ | ۶ | ۳ | ۱ | صفر (شروع آزمایش) | |
|--------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|--|
| $19 \pm 1/7$ | $18/6 \pm 0/8$ | $18/3 \pm 1/6$ | $16/0 \pm 2/0$ | $18/6 \pm 0/3$ | $19/3 \pm 0/8$ | $17/6 \pm 2/1$ | هماتوکریت (%) |
| $18/3 \pm 1/2$ | $17/3 \pm 0/9$ | $18/5 \pm 1/4$ | $19/5 \pm 0/8$ | $17/1 \pm 1/0$ | $17/6 \pm 0/8$ | $18/8 \pm 1/3$ | پر تراکم |
| $3/7 \pm 0/3$ | $3/5 \pm 0/1$ | $3/5 \pm 0/2$ | $3/2 \pm 0/3$ | $3/7 \pm 0/0$ | $3/8 \pm 0/1$ | $3/5 \pm 0/4$ | کم تراکم |
| $3/7 \pm 0/2$ | $3/4 \pm 0/1$ | $3/6 \pm 0/2$ | $3/8 \pm 0/1$ | $3/5 \pm 0/1$ | $3/5 \pm 0/1$ | $3/7 \pm 0/2$ | پر تراکم |
| $391/3 \pm 44/9$ | $386/0 \pm 11/7$ | $389/6 \pm 24/6$ | $354/0 \pm 39/5$ | $40/9/0 \pm 4/1$ | $421/6 \pm 15/2$ | $387/6 \pm 48/5$ | گلبول قرمز ($\times 10^3/\text{mm}^3$) |
| $40/9/1 \pm 26/5$ | $371/5 \pm 16/1$ | $40/3/8 \pm 30/5$ | $428/8 \pm 12/6$ | $386/0 \pm 19/2$ | $392/0 \pm 12/7$ | $40/7/1 \pm 25/0$ | پر تراکم |
| $489/9 \pm 32/9^*$ | $483/1 \pm 10/8$ | $468/7 \pm 15/1$ | $450/0 \pm 15/5$ | $456/4 \pm 8/4$ | $458/2 \pm 6/2$ | $457/5 \pm 22/3$ | MCV (fl) |
| $448/1 \pm 5/1$ | $465/0 \pm 8/7$ | $457/5 \pm 5/3$ | $453/8 \pm 8/8$ | $443/7 \pm 4/7$ | $449/4 \pm 8/2$ | $461/5 \pm 8/3$ | پر تراکم |
| $97/2 \pm 6/9$ | $92/3 \pm 0/4$ | $90/6 \pm 0/2$ | $90/4 \pm 0/5$ | $90/4 \pm 0/9$ | $90/9 \pm 0/3$ | $91/2 \pm 0/2$ | MCH (pg/cell) |
| $90/9 \pm 0/4$ | $91/9 \pm 0/2$ | $91/4 \pm 0/7$ | $90/5 \pm 0/2$ | $91/0 \pm 0/2$ | $90/9 \pm 0/2$ | $91/2 \pm 0/3$ | پر تراکم |
| $19/8 \pm 0/1$ | $19/1 \pm 0/4$ | $19/3 \pm 0/6$ | $20/1 \pm 0/8$ | $19/8 \pm 0/3$ | $19/8 \pm 0/3$ | $20/0 \pm 0/9$ | MCHC (g/dl) |
| $20/2 \pm 0/2$ | $19/8 \pm 0/3$ | $20/0 \pm 0/3$ | $19/9 \pm 0/3$ | $20/5 \pm 0/2$ | $20/2 \pm 0/3$ | $19/7 \pm 0/3$ | پر تراکم |

علامت * اختلاف معنی‌دار بین دو تراکم را در ساعت مربوطه نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

جدول ۲: روند تغییرات تعداد گلbulوں hای سفید، لنفوسيت، نوتروفيل، اوزينوفيل و مونوسيل (ميانگين ± خطای استاندارد) در فيل ماهاي نگهداری شده در تراكم بالا (8 kg/m^3) (تعداد ۶ نمونه) و پايین (1 kg/m^3) (تعداد ۳ نمونه) در ساعات قبل و پس از بيهوشی در شرایط زمستانه

Table 2: Changes of number of white blood cells, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, and monocytes (mean ± standard error) in juvenile beluga sturgeon *Huso huso* held under high (8 kg/m^3 ; n=6) or low (1 kg/m^3 ; n=3) densities before and after stress in winter condition.

| زمان‌های پس از استرس (ساعت) | | | | | | | | صفر (شروع آزمایش) |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|----------|--|
| ۴۸ | ۲۴ | ۱۲ | ۶ | ۳ | ۱ | | | |
| ۱۱/۸ ± ۱/۲ | ۱۱/۷ ± ۱/۲ | ۱۰/۵ ± ۰/۸ | ۱۵/۵ ± ۳/۵ | ۹/۵ ± ۰/۲ | ۱۲/۰ ± ۰/۹ | ۷/۱ ± ۰/۸ | کم تراكم | گلbulوں سفید ($\times 10^3/\text{mm}^3$) |
| ۱۱/۳ ± ۰/۸ ^{ab} | ۱۱/۹ ± ۰/۸ ^{ab} | ۱۱/۸ ± ۰/۷ ^{ab} | ۱۵/۹ ± ۲/۱ ^a | ۱۰/۳ ± ۱/۰ ^{ab} | ۱۵/۰ ± ۱/۹ ^a | ۷/۴ ± ۱/۰ ^b | پر تراكم | لنفوسيت (%) |
| ۶۲/۶ ± ۱/۸ | ۶۲/۶ ± ۴/۴ | ۵۴/۳ ± ۶/۴ | ۵۷/۳ ± ۶/۶ | ۶۵/۶ ± ۰/۳ | ۵۵/۳ ± ۱/۶ | ۶۲/۳ ± ۲/۶ | کم تراكم | نوتروفيل (%) |
| ۶۰/۱ ± ۲/۰ | ۵۶/۵ ± ۱/۰ | ۵۸/۰ ± ۰/۸ | ۵۴/۶ ± ۴/۵ | ۶۲/۵ ± ۲/۳ | ۵۷/۵ ± ۲/۹ | ۵۷/۵ ± ۳/۶ | پر تراكم | اوزينوفيل (%) |
| ۳۴/۰ ± ۱/۱ | ۳۵/۰ ± ۴/۰ | ۳۵/۰ ± ۲/۵ | ۴۰/۰ ± ۶/۵ | ۳۱/۰ ± ۰/۵ | ۴۰/۶ ± ۱/۲ | ۳۴/۶ ± ۲/۱ | کم تراكم | مونوسيل (%) |
| ۳۶/۶ ± ۲/۰ | ۴۰/۶ ± ۱/۰ | ۳۸/۸ ± ۰/۷ | ۴۲/۰ ± ۴/۵ | ۳۴/۱ ± ۲/۲ | ۴۱/۱ ± ۳/۴ | ۳۹/۰ ± ۳/۴ | پر تراكم | معنی دار هستند (P<0.05). |
| ۱/۶ ± ۰/۳ | ۱/۰ ± ۰/۰ | ۱/۶ ± ۰/۳ | ۱/۰ ± ۰/۰ | ۱/۳ ± ۰/۳ | ۱/۶ ± ۰/۳ | ۱/۳ ± ۰/۳ | کم تراكم | معنی دار هستند (P<0.05). |
| ۰/۶ ± ۰/۲ | ۱/۳ ± ۰/۳ | ۱/۱ ± ۰/۳ | ۱/۰ ± ۰/۲ | ۱/۱ ± ۰/۳ | ۱/۳ ± ۰/۲۱ | ۱/۸ ± ۰/۶ | پر تراكم | معنی دار هستند (P<0.05). |
| ۱/۶ ± ۰/۸ | ۱/۶ ± ۰/۸ | ۲/۰ ± ۰/۵ | ۱/۶ ± ۰/۳ | ۲/۰ ± ۰/۵ | ۲/۳ ± ۰/۳ | ۱/۶ ± ۰/۳ | کم تراكم | معنی دار هستند (P<0.05). |
| ۲/۵ ± ۰/۲ | ۲/۰ ± ۰/۰ | ۲/۱ ± ۰/۱ | ۲/۳ ± ۰/۲ | ۲/۱ ± ۰/۱ | ۲/۵ ± ۰/۳ | ۱/۶ ± ۰/۲ | پر تراكم | |

حروف a و b بیانگر اختلاف معنی دار بین میانگین های یک تیمار در طول آزمایش است ($P<0.05$). ردیفهای دارای حداقل یک حرف مشترک در هر تیمار فاقد اختلاف معنی دار هستند ($P>0.05$).

بحث

شاخص‌های استرسی

بيهوشی بهمنظور کاهش درد و سطح آگاهی جاندار استفاده می‌شود، بنابراین باعث جلوگیری از افزایش سوخت و ساز بدن و متعاقب آن جلوگیری از افزایش کورتیزول و سایر پارامترهای مرتبه در ماهی می‌شود (Martínez-Porcha et al., 2009). در این رابطه، Small (۲۰۰۳) نشان داد که بی‌حس کننده‌ها با کاهش و یا جلوگیری از فعل شدن محور HPI، باعث عدم تغییر در پارامترهای شیمیایی خون می‌شوند. بیهوشی، گرچه با مکانیسم فوق می‌تواند باعث کاهش پاسخ کورتیزول شود، اما هیجان ایجاد شده برای ماهی در مواجهه با ماده بیهوشی قبل از فاز بیهوشی ممکن است باعث ناجیز کردن و یا از بین این اثر کاهشی شود. در نتیجه با استناد به مطالعات پیشین (Ortuño et al., 2002 a,b; Hoseini et al., 2011) که نشان داده‌اند بیهوشی خود می‌تواند استرس جداگانه‌ای ایجاد کند، می‌توان این طور نتیجه گرفت که در مطالعه حاضر، ناموفق بودن عصاره پودر گل میخک در جلوگیری از افزایش کورتیزول، به استرس ایجاد شده توسط آن قبل از فاز بیهوشی (مواجهه با ماده بیهوش کننده) و همچنین استرس صید و دستکاری ماهی مربوط می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان کورتیزول، یک ساعت پس از اعمال بیهوشی و استرس حد اختلف معنی داری نسبت به ساعت صفر (قبل از شروع آزمایش)، در تیمارهای مختلف داشت. افزایش کورتیزول خون بعد از استرس حد به عنوان یک قاعده کلی معرفی شده است. تحت شرایط استرس، در راستای فعل شدن محور هیپوفیز-هیپوتالاموس-هیپوفیز-بافت (CRH)، هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (ACTH) در هیپوفیز قدامی می‌گردد که آن نیز موجب تحريك قشر فوق کلیوی و تولید کورتیزول می‌شود (Kubilay & Ulukay, 2002). با این حال در این مطالعه، دلیل عدم افزایش زیاد کورتیزول و همچنین بازگشت آن به میزان اولیه قبل از استرس، نسبت به مطالعات گذشته را می‌توان به شرایط زمستانه نسبت داد؛ به عبارت دیگر در دمای پایین اعمال تراكم بیشتر بدون ایجاد استرس امکان‌پذیر است، چرا که دمای پایین باعث کاهش متابولیسم و متعاقب آن محدود شدن تغذیه و پاسخ‌های استرس می‌شود.

Falahatkar *et al.*, 2009; Hoseiniet *et al.*, 2011) افزایش معنی دار غلظت لاكتات پلاسمای در چندین گونه پس از فعالیت شدید و یا به عنوان یک نتیجه از هیپوکسی ثبت شده است (Carragher & Rees, 1994). افزایش لاكتات پلاسمای در هر دو گروه کم تراکم و پرتراکم در ساعت اول پس از اعمال استرس یکسان بود که مطابق نتایج به دست آمده توسط Falahatkar و همکاران (2009) بود. همچنین در ساعت ۳ پس از اعمال استرس میزان لاكتات در تیمار پرتراکم با اختلاف معنی داری بیشتر از تیمار کم تراکم بود که دلیل آن ناشناخته است، گرچه ممکن است که ماهیان در گروه پرتراکم پس از استرس مزمن (تراکم بالا) فعالیت بیشتری را در هنگام اعمال استرس حاد دستکاری و بیهوشی متتحمل شده باشند (Falahatkar *et al.*, 2009؛ اما با این حال نیاز به مطالعات کامل تری در این خصوص است.

شاخص‌های هماتولوژی

در مطالعه حاضر تعداد گلوبول‌های سفید خون در ساعت ۱ پس از استرس افزایش معنی داری با ساعت قبل از شروع آزمایش (زمان صفر) نشان داد. این نتیجه در تقابل با اکثر منابع ارائه شده است، اگرچه این پاسخ می‌تواند با توجه به گونه ماهی، شرایط نگهداری، دمای آب و عوامل استرس‌زا متفاوت باشد (Matsche & Gibbons, 2012). با این وجود در این مطالعه هیچ تغییر معنی داری در شمارش افتراقی گلوبول‌های سفید خون (تعداد لنفوسيت‌ها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و مونوسیت‌ها) مشاهده نشد که گرچه دلیل آن نامشخص است ولی می‌توان قرار گرفتن در معرض ماده بیهوشی و دمای پایین آب را از عوامل اصلی این موضوع دانست. می‌توان این گونه بیان داشت که بیهوشی و دمای پایین توانسته است باعث تحریک سیستم ایمنی شود. همچنین مطالعات قبلی روی بیهوشی هیچ تغییر معنی داری در WBC و شمارش افتراقی گلوبول‌های سفید خون پس از قرار گرفتن در معرض پودر میخک و یا روغن میخک (Velisek *et al.*, 2005a,b) نشان ندادند. در مورد شاخص‌های MCHC، MCH و MCV نیز هیچ تغییر معنی داری در روند زمان دیده نشد، فقط در مورد MCV در ساعت ۴۸ پس از اعمال استرس حاد، بین دو تیمار کم تراکم و پرتراکم اختلاف معنی دار وجود داشت که با توجه به ثابت

نتایج به دست آمده در این مطالعه نیز نشان داد که استرس حاد دستکاری در فیل‌ماهیان جوان همراه با اعمال بیهوشی در شرایط زمستانه، منجر به افزایش میزان کورتیزول خون تنها در اولین ساعت پس از استرس می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد دمای پایین با کاهش دادن متابولیسم ماهی، تنها سبب پاسخ اندک و محدود به شرایط استرس‌زا می‌گردد. سایر مطالعات مشابه نیز این موضوع را تأیید می‌کنند (Martínez-Porchas *et al.*, 2009).

افزایش گلوکز پلاسمای نیز در ساعت ۱ پس از اعمال استرس مشاهده شد که در تیمار کم تراکم تا ۶ ساعت و در تیمار پرتراکم تا ۳ ساعت پس از اعمال استرس، این افزایش قابل رویت بود. تحت شرایط استرس‌زا، هورمون‌های استرسی در رابطه با کورتیزول تحریک شده و کاتکولامین‌ها با تأثیر بر کبد سبب القا گلیکوژن‌زیس می‌شوند که این امر منجر به متابولیزه شدن گلیکوژن گشته و در نتیجه میزان گلوکز خون افزایش می‌یابد. به عبارتی تغییر در سطوح گلوکز پلاسمای بخشی از پاسخ متابولیک ثانویه به استرس است (Carey *et al.*, 1998). در ساعت ۱ پس از اعمال استرس حاد، مقدار گلوکز در تیمار کم تراکم با اختلاف معنی داری بیشتر از تیمار پرتراکم بود. در توضیح این نتیجه می‌توان چنین بیان کرد که هنگام مواجهه ماهیان با استرس مزمن (تراکم بالا)، بدن به منظور حفظ تعادل، به سرعت، سوبسترها را پر انرژی (گلوکز) را در سیستم عصبی مرکزی مصرف می‌کند. از طرف دیگر ممکن است ماهیانی که در معرض استرس مزمن (تراکم بالا) قرار داشته‌اند، با کاهش سوبسترها مواجه شوند که این امر به کاهش گلوکز خون منجر خواهد شد (Pierson *et al.*, 2004). با توجه به نتایج ذکر شده می‌توان این گونه بیان کرد که بعد از اعمال استرس حاد، افزایش سطح گلوکز در خون ماهیانی که پیش از آن در معرض استرس مزمن قرار گرفته بودند، نسبت به ماهیانی که در معرض هیچ استرس مزمنی بوده‌اند کمتر است.

سطح لاكتات در ساعت ۱ پس از اعمال استرس در هر دو تیمار کم تراکم و پرتراکم افزایش معنی داری نسبت به شروع آزمایش داشت که مشابه گزارش ارائه شده توسط Barton (2000) در ماهی *Scaphirhynchus albus* است. سطح لاكتات به عنوان واکنش متابولیک فعالیت عضلانی در طی استرس افزایش می‌یابد (Caruso *et al.*, 2005).

- meal diets on growth performance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 207: 65-86. doi: 10.1300/J028v10n01_07
- Barry, T.P., Lapp, A.F., Kayes T.B. and Malison, J.A, 1993.** Validation of an ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout and lake trout. Aquaculture, 117: 351-363. doi: 10.1016/0044-8486(93)90331-R
- Barton, B.A., Rahn, A.B., Feist, G., Bollig, H. and Schreck, C.B., 1998.** Physiological stress responses of the freshwater chondrostean paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. Comparative Biochemistry and Physiology, 120: 355-363. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10036-3
- Barton, B.A., 2000.** Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid × shovelnose (*S. albus* × *platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. Comparative Biochemistry and Physiology, 126A: 125-134. doi: 10.1016/S1095-6433(00)00192-6
- Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L. and Tort, L., 2005.** Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. Aquaculture Research, 36: 172-179. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01202.x
- Bayanova, L. and Barannikova, I., 2002.** Sturgeon stress reactions in aquaculture. Journal of Applied Ichthyology, 18: 397-404. Doi: 10.1046/j.1439-0426.2002.00410.x
- Biswas, A.K., Seoka, M., Takii, K., Maita, M. and Kumai, H., 2006.** Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling

بودن شاخص‌های هماتوکریت، تعداد گلوبول قرمز و مقدار هموگلوبین، دلیل این اختلاف چندان واضح نیست. نتایج مطالعه حاضر نشان از مقاومت بالای فیل‌ماهیان به استرس مزمن (تراکم بالا) در شرایط زمستانه داشت. همچنین بعد از اعمال استرس حاد در تیمارهای مختلف و اعمال بیهوشی، با وجود تغییر در شاخص‌های استرسی و خونی می‌توان این طور بیان کرد که فیل‌ماهیان با وجود پاسخ به استرس، به سرعت می‌توانند شاخص‌های استرسی و خونی خود را به حالت عادی بازگردانند و باوجود این که حساسیت آن‌ها به استرس حاد در شرایط پرترکم اندکی بیشتر است، این نتایج بیانگر مقاومت بالای آن‌ها به انواع استرس (مزمن و حاد) است. با در نظر گرفتن کلیه پارامترها، بازگشت به حالت اولیه در مورد شاخص‌های استرسی پس از حدود ۳ ساعت و در مورد شاخص‌های هماتولوژیک پس از حدود ۶ ساعت مشاهده شد. همچنین می‌توان این گونه بیان کرد که بیهوشی و شرایط زمستانه تأثیر زیادی بر روی پاسخ فیل‌ماهیان به استرس مزمن و حاد ندارند. لذا در شرایط زمستانه، امکان نگهداری فیل‌ماهیان در تراکم‌های اندکی بالاتر وجود دارد، بدون آنکه این امر بر سلامت ماهیان تأثیر منفی داشته باشد. با این حال، بهبود مدیریت و کاهش عوامل استرس‌زا می‌تواند در بهبود شرایط زیست این گونه در محیط‌های پرورشی مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از کلیه مسئولین و کارکنان مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور سیاهکل (استان گیلان)، به خصوص جناب آقای مهندس ایرج عفت پناه رئیس مرکز و جناب آقای مهندس بهمن مکنت خواه مسئول آزمایشگاه مرکز و سایر عزیزانی که مساعدتی در این پروژه داشتند ابزار می‌داریم.

منابع

- Barros, M.M., Lim, C. and Klesius, P.H., 2002.** Effect of iron supplementation to Cottonseed and chronic photoperiod manipulation. Aquaculture, 252: 566-572. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.06.043

- Bond, C.E., 1996.** Biology of Fishes. Saunders College Publishing, Philadelphia, Pennsylvania. 750 P.
- Boshra, H., Li, J. and Sunyer, J.O., 2006.** Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 239-262. doi: 10.1016/j.fsi.2005.04.004
- Carey, J.B. and McCormick, S.D., 1998.** Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*, 168: 237-253. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00352-4
- Carragher, J.F. and Rees, C.M., 1994.** Primary and secondary stress responses in golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107A: 49-56. doi: 10.1016/0300-9629(94)90272-0
- Caruso, G., Genovese, L., Marcchiolo, G. and Mopica, A., 2005.** Hematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquaculture International*, 13: 67-73. doi: 10.1007/s10499-004-9031-5
- Collazos, M.E., Barriga, C. and Ortega, E., 1994.** Optimum conditions for the activation of the alternative complement pathway of a cyprinid fish (*Tinca tinca*, L.). Seasonal variations in the titres. *Fish and Shellfish Immunology*, 4: 499-506. doi: 10.1006/fsim.1994.1044
- Cordeiro, O.D., Silva, T.S., Alves, R.N., Costas, B., Wulff, T., Richard, N., Vareilles, M., Conceição, L.E.C. and Rodrigues, P.M., 2012.** Changes in liver proteome expression of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) in response to repeated handling stress. *Marine Biotechnology*, 14: 714-729. doi: 10.1007/s10126-012-9437-4
- Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M.G., Massari, A., Mandich, A. and Marino, G., 2008.** Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture*, 275: 319-328. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.012
- Drabkin, D.R., 1945.** Crystallographic and optical properties of human hemoglobin. A proposal for the standardization of hemoglobin. *American Journal of the Medical Sciences*, 209: 268-270.
- Falahatkar, B. and Barton, B.A., 2007.** Preliminary observations of physiological responses to acute handling and confinement in juvenile beluga *Huso huso* L. *Aquaculture Research*, 38: 1786-1789. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01855.x
- Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M. and Barton, B., 2009.** Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. *Journal of Fish Biology*, 75: 784-796. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02334.x
- Fevolden, S., Roed, K.H. and Fjalestad, K.T., 2002.** Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture*, 205: 61-75. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00660-3
- Gennotte, V., Sawadogo, P., Milla, S., Kestemont, P., Mélard, C. and Rougeot, C., 2012.** Cortisol is responsible for positive and negative effects in the ovarian maturation induced by the exposure to acute stressors in

- Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Physiology and Biochemistry, 38: 1619-1626. doi: 10.1007/s10695-012-9656-7
- Hoseini, S.M., Hosseini, S.A. and Nodeh, A.J., 2011.** Serum biochemical characteristics of Beluga, *Huso huso* (L.), in response to blood sampling after clove powder solution exposure. Fish Physiology and Biochemistry, 37: 567-572. doi: 10.1007/s10695-010-9458-8
- Hosoya, S., Johnson, S.C., Iwama, G.K., Gamperl, A.K. and Afonso, L.O.B., 2007.** Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 146: 78-86. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.09.003
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., Carlsen, K.T. and Evjen, T., 2005.** Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts during commercial well boat transports and effects on survival after transfer to sea. Aquaculture Research, 243: 373-382. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.10.019
- Kazemi, R., Bahmani, M., Hallajian, A., Pourkazemi, M. and Dejadian, S., 2005.** Investigation of blood serum osmo-ion regulation in blood and reared juvenile *Acipenser persicus*. Proceeding of the 5th International Symposium on Sturgeon, Ramsar, Iran, 9-13 May 2005.
- Köprücü, S.Ş.K., Köprücü, M.Ş., Ural, U. and Pala, M., 2006.** Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish, *Silurus glanis* L. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86: 99-105. doi: 10.1016/j.pestbp.2006.02.001
- Krasnov, A., Koskinen, H., Pehkonen, P., Rexroad, C.E., Afanasyev, S. and Mölsä, H., 2005.** Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. BMC Genomics, 6: 3. doi: 10.1186/1471-2164-6-3
- Kubilay, A. and Ulukay, G., 2002.** The effect of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology, 26: 249-254.
- Martínez-Porcha, M., Martínez-Córdova, L.R. and Ramos-Enriquez, R., 2009.** Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 4: 158-178.
- Matsche, M.A. and Gibbons, J., 2012.** Annual variation of hematology and plasma chemistry in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* during a dam-impeded spawning run. Fish Physiology and Biochemistry, 38: 1679-1696. doi: 10.1007/s10695-012-9664-7
- McCarty, R., Sabban, E.L. and Kvaternansky, R., 1996.** Stress: Molecular Genetic and Neurobiological advances. Harward Academic, Amsterdam, Netherlands. 1002 P.
- Ortuño, J., Esteban, M.A. and Meseguer, J., 2002a.** Effects of four anesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology, 12: 49-59. doi: 10.1006/fsim.2001.0353

- Ortuño, J., Esteban, M.A. and Meseguer, J., 2002b.** Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream exposed to crowding stress (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89: 29-36. doi: 10.1016/S0165-2427(02)00183-6
- Pierson, P.M., Lamers, A., Flik, G. and Mayer-Gostan, N., 2004.** The stress axis, stanniocalcin, and ion balance in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 137: 263-271. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.03.010
- Piper, R.G., McElwain, L.B., Orme, L.E., McCraren, J.P., Fowler, L.G. and Leonard, J.R., 1982.** Fish Hatchery Management. US Fish Wildlife Service, Washington, DC, United States. 517 P.
- Rafatnezhad, S., Falahatkar, B. and Tolouei Gilani, M.H., 2008.** Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Research*, 39: 1513-1506. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02020.x
- Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M.L. and Schreck, C.B., 2006.** Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 258:565-574. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.020
- Řehulká, J., 2000.** Influence of astaxanthin on growth rate condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 190: 27-47. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00383-5
- Santos, G.A., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J.H.W.M. and Verreth, J.A.J., 2010.** Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): the combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture*, 299: 73-80. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.018
- Saroglia, M. and Liu, Z., 2012.** Functional Genomics in Aquaculture. Wiley Online Library, Hoboken, New Jersey, United States. 419 P.
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K.S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F., Toftsen, H. and Vaughan, L., 2012.** Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 85-105. doi: 10.1007/s10695-011-9517-9
- Small, B.C., 2003.** Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 218: 177-185. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00302-2
- Trenzado, C.E., Carrick, T.R. and Pottinger, T.G., 2006.** Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *General and Comparative Endocrinology*, 133:332-340. doi: 10.1016/S0016-6480(03)00191-6
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L. and Nepejchalova, L., 2005a.** Effects of clove oil anaesthesia on common carp

- (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Veterinary Medicine, 50: 269-275.
- Velisek, J., Svobodova, Z. and Piackova, V., 2005b.** Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Veterinaria Brno, 74: 139-146.
- Wedemeyer, G.A., 1996.** Physiology of Fish in Intensive Culture Systems. International Thompson Publishing, Toronto, Canada. 232 P.
- Weil, L.S., Barry, T.P. and Malison, J.A., 2001.** Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentration. Aquaculture, 193: 373-380. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00482-8

Stress and hematological responses of juveniles beluga sturgeon (*Huso huso* L.) held in low or high densities in winter condition after applying anesthesiaFalahatkar B.^{1*}; Kohansal S.¹; Mohammadaliha R.¹

* bfalahatkar@yahoo.com

1-Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran

Abstract

This study was performed in order to evaluate the effects of chronic stress (density) and acute stress (handling) existed in culture environments on stress and hematological parameters of beluga sturgeon (*Huso huso*) under winter condition (below 10°C) after application of anesthesia. Fish with mean (\pm SE) weight of 399 ± 1.4 g were kept in the low (1 kg/m^2) and high densities (8 kg/m^2) in three replicates for a week. Then, fish were held under stress condition so that they were quickly removed from the rearing tank and then anesthetized for 2 minutes in container (50 l) includes 400 mg/l clove powder extract. They were then returned to the original tanks. Blood samples were taken before the stress (0 time), 1, 3, 6, 12, 24 and 48 hours after application of the stress; the stress indicators (cortisol, glucose and lactate) and hematological parameters (hematocrit, hemoglobin, number of red blood cells, MCV, MCH, MCHC, number of white blood cells, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and monocytes) were measured. No differences in measured parameters were observed after one week of holding fish at low and high densities. The results of stress indicators, one hour after acute stress and anesthesia showed a significant difference with resting time ($p<0.001$). Also significant difference was observed on lactate levels between the low and high densities at 3 h after acute stress and anesthesia ($p=0.032$). Number of white blood cells at 1 and 6 h after acute stress and anesthesia in high density showed significant difference with resting time ($p<0.001$). MCV showed significant difference between two treatments at 48 h after the stress and anesthesia ($p=0.016$). The other parameters did not show any significant difference between treatments ($p>0.05$). The results revealed that beluga sturgeon has high resistance against chronic and acute stressors and anesthesia. However, it seems that anesthesia could not control the low negative effects of stress even in this condition of low temperature.

Keywords: Stress, Beluga, Density, Anesthesia, Low temperature

*Corresponding author