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]*

* bfalahatkar@yahoo.com

۱-دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت دی ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر استرس‌های مزمن (تراکم) و حاد (دستکاری) موجود در محیط‌های پرورشی بر شاخص‌های استرسی و خونی فیل‌ماهی (*Huso huso*) در شرایط زمستانه (دمای زیر ۱۰ درجه سانتیگراد) پس از اعمال بیهوشی انجام گردید. ماهی‌هایی با میانگین (± خطای استاندارد) وزن ۱/۴ ± ۳۹۹ گرم در دو تراکم کم (۱ kg/m^2)و زیاد (۸ kg/m^2) هرکدام در ۳ تکرار به مدت یک هفته نگهداری شدند. سپس ماهیان تحت شرایط استرس حاد قرار گرفتند به‌گونه‌ای که سریعاً از آب خارج شده و به مدت ۲ دقیقه در مخزن آبی (۵۰l) 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، MCV، MCH، MCHC، تعداد گلبول سفید، لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و مونوسیت) 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 ($p<۰/۰۰۱$)، همچنین در میزان لاکتات اندازه-گیری شده در ساعت ۳ پس از اعمال استرس حاد و بیهوشی اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار کم تراکم و پرتراکم مشاهده شد ($p=۰/۰۳۲$). تعداد گلبول سفید در ساعت ۱ و ۶ پس از اعمال استرس حاد و بیهوشی در تیمار پرتراکم با ساعت شروع اختلاف معنی-داری از خود نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). میزان MCV نیز در ساعت ۴۸ پس از اعمال استرس و بیهوشی اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مورد آزمایش نشان داد ($p=۰/۰۱۶$). در بررسی سایر پارامترها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در ساعت‌های مختلف نمونه‌گیری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$). 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 دمای پایین کنترل نماید.

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

* نویسنده مسئول

مقدمه

فیل‌ماهی، بزرگ‌ترین ماهی زنده آب شیرین و ارزشمندترین نوع ماهی خاویاری جهان محسوب می شود. 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 اولین 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 حالت برای آن‌ها ایجاد نمی‌گردد (Fevolden *et al.*, 2002;Weil *et al.*, 2001). این عوامل می‌توانند تحت تأثیر شرایط محیطی، تغذیه‌ای و عوامل درونی ماهی با شدت 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 آن به دو گروه مزمن و حاد است (Saroglia *et al.*, 2012). استرس‌های مزمن معمولاً ناشی از مجاورت مکرر با عامل استرس‌زای ضعیف به وجود می‌آید(Cordeiro *et al.*, 2012)، در حالی که استرس‌های حاد یا کشنده به استرس‌هایی اطلاق می‌گردند که عامل استرس‌زا در مدت کوتاهی ظهور می‌یابد (Segner *et al.*, 2012). تراکم به‌عنوان عامل استرس‌زای مزمن شناخته شده است(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 استرس ماهی را تحت تأثیر قرار دهند 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 گردند 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، ازجمله 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 نظیر استفاده از مواد بیهوش کننده یا دمای پایین، این مطالعه با هدف بررسی اثر نگهداری فیل-ماهیان 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 ۱/۴± ۳۹۹ (میانگین± SE) گرم و طول کل ۰/۱±۴۴/۸ 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 بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل (استان گیلان) منتقل شده و در حوضچه‌های بتونی با حجم آبگیری ۰/۸۱ m^3 نگهداری شدند. درطی نگهداری در دوره آزمایش، میانگین اکسیژن محلول ppm ۱/۶ ± ۱۰/۲، میانگین دمای آب ^oC ۸/۲±۰/۸ و طول دوره روشنایی به‌صورت ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی بود. میزان جریان ورودی به هر حوضچه پرورش l/min ۱۸ بوده و هوادهی پیوسته در طول دوره آزمایش انجام گردید. برای این آزمایش از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. بچه فیل‌ماهیان جوان به مدت یک هفته دردو تراکم کم ۷ ماهی به ازای هر حوضچه (۱ kg/m^2)و تراکم بالا، ۵۰ ماهی به ازای هر حوضچه (۸ kg/m^2)، هرکدام در سه تکرار نگهداری شدند (Rafatnezhad *et al*., 2008; Falahatkar *et al*., 2009). در مجموع ۶ مخزن برای این آزمایش درنظر گرفته شد. غذادهی در این زمان طی ۴ مرحله در شبانه‌روز (ساعت-های ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰) به روش دستی با پلت‌های تجاری Skretting (۳ میلی‌متر قطر، ورونا، ایتالیا، پروتئین ۴۲٪، چربی ۲۰٪، خاکستر ۱۰٪، رطوبت ۱۰٪، فیبر خام ۸٪) به میزان اشتهای 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.

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 (۵۰l) 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 آبششی) 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 ساعت‌های صفر (قبل از استرس)، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ از هر حوضچه‌پرتراکم 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 سرنگ۵ میلی‌لیتر هپارینه در هر مرحله زمانی و بدون بیهوشی 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 پلاسما به‌منظور تعیین پارامترهای کورتیزول، گلوکز و لاکتات در سانتریفیوژ (یونیورسال، پارس آزما، تهران، ایران) ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری هماتوکریت، لوله‌های موئینه تا حدود دوسوم بانمونه‌های خون پر شد و یک

طرف آن با خمیر مخصوص بسته شد و به‌وسیله سانتریفیوژ میکروهماتوکریت (Nüve, Ankara, Turkey) با سرعت g ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مقدار حجم سلولی یا هماتوکریت هر نمونه خون محاسبه شد(Řehulka, 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 اسپکتوفتومتر (Technicon, USA)، ثبت و محاسبه شد (Drabkin, 1945).

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

برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، ابتدا گسترش خونی تهیه گردید. پس از خشک شدن لام‌ها، از متانول خالص 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 ۱۰۰× 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 به‌صورت مارپیچی حرکت کرده و با مشاهده هر نوع از گلبول‌های سفید (شامل لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، نوتروفیل) شاسی مربوطه دستگاه شمارنده (مدل LC-10، شرکت بهداد، تهران، ایران) زده شد تا شمارش کل به ۲۰۰ عدد برسد. سپس درصد هر نوع سلول به‌طور جداگانه محاسبه گردید (Řehulka, 2000).

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

MCV (حجم متوسط گلبول‌های قرمز) (fl)=۱۰× (تعداد گلبول های قرمز/ هماتوکریت)

MCH (مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز) (pg/cell) = ۱۰ × (تعداد گلبول های قرمز/ هموگلوبین)

MCHC (غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز) (g/dl) =۱۰۰ × (هماتوکریت/ هموگلوبین)

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

تجزیه و تحلیل آماری

پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov-Smirnov و واریانس میانگین‌ها از طریق آزمون Levene، مقایسه گروه‌ها از طریق 3-way ANOVA انجام پذیرفت. سپس مقایسه میانگین‌ها در یک تیمار و ساعات 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 آماری از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. داده‌های ارائه شده در متن به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) است.

نتایج

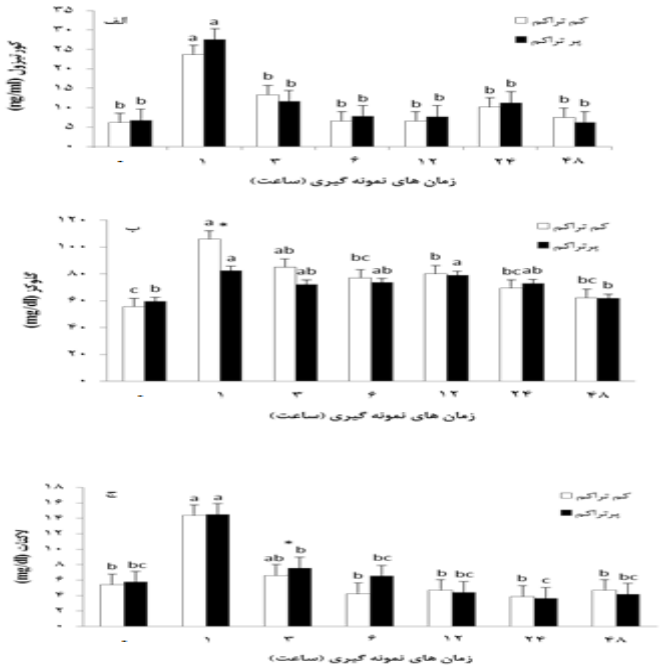
شاخص‌های استرسی

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 پرتراکم (۳/۰۳ ± ۲۷/۵ 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 پرتراکم سطح کورتیزول ۳ ساعت پس از اعمال استرس کاهش و تقریباً به حالت اولیه خود بازگشت (شکل ۱ الف).

در خصوص مقدار گلوکز پلاسما 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؛ به‌گونه‌ای که در رابطه با تیمار کم تراکم بیشترین میزان گلوکز در ساعت ۱ پس از استرس ملاحظه گردید (۳/۶ ± ۱۰۶ 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 (۳/۳ ± ۸۲/۵ 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 به‌طور معنی‌داری 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 ۰/۶ ± ۵/۴ mg/dl و در تیمار پرتراکم ۰/۴ ± ۵/۷ mg/dl بود، اما اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نشد. در طی دومین مرحله نمونه‌گیری (ساعت ۱) غلظت لاکتات به‌طور معنی‌داری در هر دو تیمار افزایش یافت (کم تراکم ۱/۳ ± ۱۴/۳ mg/dl و پرتراکم ۲/۰ ± ۱۴/۵ 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 حاد دستکاری، اختلاف معنی-داری دیده شد (شکل ۱ ج).



شکل ۱: روند تغییرات کورتیزول (الف)، گلوکز (ب) و لاکتات پلاسما (ج) در فیل‌ماهیان نگهداری شده در تراکم بالا (۸kg/m^2) و پایین (۱kg/m^2) در ساعات قبل و پس از بیهوشی در شرایط زمستانه. حروف a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های یک تیمار در طول آزمایش است (pP<۰/۰۵). علامت * اختلاف معنی‌دار بین دو تراکم را در ساعت مربوطه نشان می‌دهد (p<۰/۰۵). ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر تیمار فاقد اختلاف معنی‌دار هستند (p>۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند. (۶ =n برای تیمار تراکم بالا و ۳ =n 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 ± standard error (n=6 for high and n=3 for low densities).

شاخص‌های هماتولوژی

پس از یک هفته نگهداری در دو تراکم پایین و بالا، اختلاف معنی‌داری در درصد هماتوکریت، غلظت هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز، MCV، MCH 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 (۳۲/۹± ۴۸۹/۵ fl) و پرتراکم (۵/۱ ± ۴۴۸/۱ 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 زمان در خصوص تیمار پرتراکم وجود داشته به‌گونه‌ای که تعداد گلبول‌های سفید در ساعت ۱ (۱۹۶۹/۱ ± ۱۵۰۸۳/۳ /mm^3) و ۶ (۲۱۹۰/۹ ± ۱۵۹۳۳/۳ /mm^3) پس از اعمال استرس حاد دستکاری تفاوت معنی‌داری با ساعت شروع نمونه‌گیری (قبل از استرس) (۱۰۰۷/۱ ± ۷۴۸۳/۳ 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، ائوزینوفیل و مونوسیت مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل‌ها، اختلاف معنی‌داری را در طول زمان و بین تیمارهای مختلف نیز نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۱: روند تغییرات هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز، MCV، MCH و MCHC (میانگین ± خطای استاندارد) در فیل‌ماهیان نگهداری شده در تراکم بالا (۸kg/m^2) (تعداد ۶ نمونه) و پایین (۱kg/m^2) (تعداد ۳ نمونه) در ساعات قبل و پس از بیهوشی در شرایط زمستانه

Table 1: Changes of hematocrit, hemoglobin, number of red blood cells, MCV, MCH, and MCHC (mean ± 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)						
		صفر (شروع آزمایش)	۱	۳	۶	۱۲	۲۴	۴۸
هماتوکریت (٪)	کم تراکم	۱۷/۶ ± ۲/۱	۱۹/۳ ± ۰/۸	۱۸/۶ ± ۰/۳	۱۶/۰ ± ۲/۰	۱۸/۳ ± ۱/۶	۱۸/۶ ± ۰/۸	۱۹ ± ۱/۷
	پر تراکم	۱۸/۸ ± ۱/۳	۱۷/۶ ±۰ /۸	۱۷/۱ ±۱ /۰	۱۹/۵ ± ۰/۸	۱۸/۵ ± ۱/۴	۱۷/۳ ± ۰/۹	۱۸/۳ ± ۱/۲
هموگلوبین (g/dl)	کم تراکم	۳/۵ ± ۰/۴	۳/۸ ± ۰/۱	۳/۷ ± ۰/۰	۳/۲ ± ۰/۳	۳/۵ ± ۰/۲	۳/۵ ± ۰/۱	۳/۷ ± ۰/۳
	پر تراکم	۳/۷ ± ۰/۲	۳/۵ ± ۰/۱	۳/۵ ± ۰/۱	۳/۸ ± ۰/۱	۳/۶ ± ۰/۲	۳/۴ ± ۰/۱	۳/۷ ± ۰/۲
گلبول قرمز (×۱۰^3/mm^3)	کم تراکم	۳۸۷/۶ ± ۴۸/۵	۴۲۱/۶ ± ۱۵/۲	۴۰۹/۰ ± ۴/۱	۳۵۴/۰ ± ۳۹/۵	۳۸۹/۶ ± ۲۴/۶	۳۸۶/۰ ± ۱۱/۷	۳۹۱/۳ ± ۴۴/۹
	پر تراکم	۴۰۷/۱ ± ۲۵/۰	۳۹۲/۰ ± ۱۲/۷	۳۸۶/۰ ± ۱۹/۲	۴۲۸/۸ ± ۱۲/۶	۴۰۳/۸ ± ۳۰/۵	۳۷۱/۵ ± ۱۶/۱	۴۰۹/۱ ± ۲۶/۵
MCV (fl)	کم تراکم	۴۵۷/۵ ± ۲۲/۳	۴۵۸/۲ ± ۶/۳	۴۵۶/۴ ± ۸/۴	۴۵۰/۰ ± ۱۵/۵	۴۶۸/۷ ± ۱۵/۱	۴۸۳/۱ ± ۱۰/۸	۴۸۹/۹ ± ۳۲/۹*
	پر تراکم	۴۶۱/۵ ± ۸/۳	۴۴۹/۴ ± ۸/۲	۴۴۳/۷ ± ۴/۷	۴۵۳/۸ ± ۸/۸	۴۵۷/۵ ± ۵/۳	۴۶۵/۰ ± ۸/۷	۴۴۸/۱ ± ۵/۱
MCH(pg/cell)	کم تراکم	۹۱/۲ ± ۰/۲	۹۰/۹ ± ۰/۳	۹۰/۴ ± ۰/۹	۹۰/۴ ± ۰/۵	۹۰/۶ ± ۰/۲	۹۲/۳ ± ۰/۴	۹۷/۲ ± ۶/۹
	پر تراکم	۹۱/۲ ± ۰/۳	۹۰/۹ ± ۰/۲	۹۱/۰ ± ۰/۲	۹۰/۵ ± ۰/۲	۹۱/۴ ± ۰/۷	۹۱/۹ ± ۰/۲	۹۰/۹ ± ۰/۴
MCHC (g/dl)	کم تراکم	۲۰/۰ ± ۰/۹	۱۹/۸ ± ۰/۳	۱۹/۸ ± ۰/۳	۲۰/۱ ± ۰/۸	۱۹/۳ ± ۰/۶	۱۹/۱ ± ۰/۴	۱۹/۸ ± ۰/۱
	پر تراکم	۱۹/۷ ± ۰/۳	۲۰/۲ ± ۰/۳	۲۰/۵ ± ۰/۲	۱۹/۹ ± ۰/۳	۲۰/۰ ± ۰/۳	۱۹/۸ ± ۰/۳	۲۰/۳ ± ۰/۲

علامت * اختلاف معنی‌دار بین دو تراکم را در ساعت مربوطه نشان می‌دهد ($p<0/05$).

جدول ۲: روند تغییرات تعداد گلبول‌های سفید، لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و مونوسیت (میانگین ± خطای استاندارد) در فیل ماهیان نگهداری شده در تراکم بالا (۸ kg/m^2) (تعداد ۶ نمونه)و پایین (۱ kg/m^2) (تعداد ۳ نمونه) در ساعات قبل و پس از بیهوشی 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^2; n=6) or low (1 kg/m^2; n=3) densities before and after stress in winter condition.

		زمان‌های پس از استرس (ساعت)						
		صفر (شروع آزمایش)	۱	۳	۶	۱۲	۲۴	۴۸
گلبول سفید (×۱۰^3/mm^3)	کم تراکم	۷/۱ ± ۰/۸	۱۲/۰ ± ۰/۹	۹/۵ ± ۰/۲	۱۵/۵ ± ۳/۵	۱۰/۵ ± ۰/۸	۱۱/۷ ± ۱/۲	۱۱/۸ ± ۱/۲
	پر تراکم	۷/۴ ± ۱/۰^b	۱۵/۰ ± ۱/۹^a	۱۰/۳ ± ۱/۰^{ab}	۱۵/۹ ± ۲/۱^a	۱۱/۸ ± ۰/۷^{ab}	۱۱/۹ ± ۰/۸^{ab}	۱۱/۳ ± ۰/۸^{ab}
لنفوسیت (٪)	کم تراکم	۶۲/۳ ± ۲/۶	۵۵/۳ ± ۱/۶	۶۵/۶ ± ۰/۳	۵۷/۳ ± ۶/۶	۵۴/۳ ± ۶/۴	۶۲/۶ ± ۴/۴	۶۲/۶ ± ۱/۸
	پر تراکم	۵۷/۵ ± ۳/۶	۵۷/۵ ± ۲/۹	۶۲/۵ ± ۲/۳	۵۴/۶ ± ۴/۵	۵۸/۰ ± ۰/۸	۵۶/۵ ± ۱/۰	۶۰/۱ ± ۲/۰
نوتروفیل (٪)	کم تراکم	۳۴/۶ ± ۲/۱	۴۰/۶ ± ۱/۲	۳۱/۰ ± ۰/۵	۴۰/۰ ± ۶/۵	۳۵/۰ ± ۲/۵	۳۵/۰ ± ۴/۰	۳۴/۰ ± ۱/۱
	پر تراکم	۳۹/۰ ± ۳/۴	۴۱/۱ ± ۳/۴	۳۴/۱ ± ۲/۲	۴۲/۰ ± ۴/۵	۳۸/۸ ± ۰/۷	۴۰/۶ ± ۱/۰	۳۶/۶ ± ۲/۰
ائوزینوفیل (٪)	کم تراکم	۱/۳ ± ۰/۳	۱/۶ ± ۰/۳	۱/۳ ± ۰/۳	۱/۰ ± ۰/۰	۱/۶ ± ۰/۳	۱/۰ ± ۰/۰	۱/۶ ± ۰/۳
	پر تراکم	۱/۸ ± ۰/۶	۱/۳ ± ۰/۲۱	۱/۱ ± ۰/۳	۱/۰ ± ۰/۲	۱/۱ ± ۰/۳	۱/۳ ± ۰/۳	۰/۶ ± ۰/۲
مونوسیت (٪)	کم تراکم	۱/۶ ± ۰/۳	۲/۳ ± ۰/۳	۲/۰ ± ۰/۵	۱/۶ ± ۰/۳	۲/۰ ± ۰/۵	۱/۶ ± ۰/۸	۱/۶ ± ۰/۸
	پر تراکم	۱/۶ ± ۰/۲	۲/۵ ± ۰/۳	۲/۱ ± ۰/۱	۲/۳ ± ۰/۲	۲/۱ ± ۰/۱	۲/۰ ± ۰/۰	۲/۵ ± ۰/۲

حروف a و b بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های یک تیمار در طول آزمایش است ($p<0/05$). ردیف‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر تیمار فاقد اختلاف معنی‌دار هستند ($p>0/05$).

بحث

شاخص‌های استرسی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان کورتیزول، یک ساعت پس از اعمال بیهوشی و استرس حاد اختلاف معنی‌داری نسبت به ساعت صفر (قبل از شروع آزمایش)، در تیمارهای مختلف داشت. افزایش کورتیزول خون بعد از استرس حاد به‌عنوان یک قاعده کلی معرفی شده است. تحت شرایط استرس، در راستای فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بافت اینتررنال (HPI)، هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH) که در هیپوتالاموس تولید می‌شود، سبب تولید ACTH در هیپوفیز قدامی می‌گردد که آن نیز موجب تحریک 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 تراکم بیش‌تر بدون ایجاد استرس امکان‌پذیر است، چرا که دمای پایین باعث کاهش متابولیسم و متعاقب آن محدود شدن تغذیه و پاسخ‌های استرس می‌شود.

بیهوشی 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 مرتبط در ماهی می‌شود (Martínez-Porchas *et al.*, 2009). در این رابطه، Small (۲۰۰۳) نشان داد که بی‌حس کننده‌ها با کاهش و یا جلوگیری از فعال 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 ناچیز کردن و یا از بین بردن 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 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 پلاسما 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 پلاسما 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 معنی‌داری بیش‌تر از تیمار پرتراکم بود. در توضیح این نتیجه می‌توان چنین بیان کرد که هنگام مواجهه ماهیان با استرس مزمن (تراکم بالا)، بدن به‌منظور حفظ تعادل، به‌سرعت، سوبستراهای پرانرژی (گلوکز) را در سیستم عصبی مرکزی مصرف می‌کند. از طرف دیگر ممکن است ماهیانی که درمعرض استرس مزمن (تراکم بالا) قرار داشته‌اند، با کاهش سوبسترا 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 نبوده‌اند کمتر است.

سطح لاکتات در ساعت ۱ پس از اعمال استرس در هر دو تیمار کم تراکم و پرتراکم افزایش معنی‌داری نسبت به شروع آزمایش داشت که مشابه گزارش ارائه شده توسط Barton (۲۰۰۰)در ماهی *Scaphirhynchus albus* است. سطح لاکتات به‌عنوان واکنش متابولیک فعالیت عضلانی در طی استرس افزایش می‌یابد (Caruso *et al.*, 2005; Falahatkar *et al.*, 2009; Hoseini*et al.*, 2011). افزایش معنی‌دار غلظت لاکتات پلاسما در چندین گونه پس از فعالیت شدید و یا به‌عنوان یک نتیجه از هیپوکسی ثبت شده است (Carragher & Rees, 1994). افزایش لاکتات پلاسما 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 (۲۰۰۹) بود. همچنین در ساعت ۳ پس از اعمال استرس میزان لاکتات در تیمار پرتراکم با اختلاف معنی‌داری 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 متحمل شده باشند (Falahatkar *et al.*, 2009)؛ اما با این حال نیاز به مطالعات کامل‌تری در این خصوص است.

شاخص‌های هماتولوژی

در مطالعه حاضر تعداد گلبول‌های سفید خون در ساعت ۱ پس از استرس افزایش معنی‌داری 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 معنی‌داری در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون (تعداد لنفوسیت‌ها، 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 معنی‌داری در WBC و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون پس از

قرار گرفتن در معرض پودرمیخک و یا روغن میخک (Velisek *et al*., 2005a,b)نشان ندادند. در مورد شاخص‌های MCV، MCH و MCHC نیز هیچ تغییر معنی‌داری 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 معنی‌دار وجود داشت که با توجه به ثابت بودن شاخص‌های هماتوکریت، تعداد گلبول 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 این‌طور بیان کرد که فیل‌ماهیان با وجود پاسخ به استرس، به‌سرعت می‌توانند شاخص‌های استرسی و خونی خود را به حالت عادی بازگردانند و باوجود این‌که حساسیت آن‌ها به استرس حاد در شرایط پرتراکم 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)، به‌خصوص 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 ابراز می‌داریم.

منابع

Barros, M.M., Lim, C. and Klesius, P.H., 2002. Effect of iron supplementation to Cottonseed 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* × *platorynchus*) 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

Bayunova, 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 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 Fjalested, 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 Dejandian, 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-Porchas, 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 Kvetnansky, 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

Řehulka, 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., Toften, 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

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

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

Stress and hematological responses of beluga sturgeon (*Huso huso* L.) juveniles held in low or high densities in winter condition after applying anesthesia

Falahatkar B.[1*]

[*] bfalahatkar@yahoo.com

1-Department of Natural Resources, University of Guilan

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 (± 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