

Karaca Mersin Balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) Juvenil Bireylerinde Alternatif Bir Doğal Anestezik Ajan: Muskat Esansiyel Yağı (*Myristica fragrans*)

Mert MİNAZ^{1*}, Akif ER¹

¹ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Rize, Türkiye

Sorumlu Yazar/Corresponding Author
E-mail: mert.minaz@erdogan.edu.tr

Araştırma Makalesi/Research Article
Geliş Tarihi/Received: 15.10.2024
Kabul Tarihi/Accepted: 23.12.2024

Öz

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, sentetik anestezik maddelere olan ilginin yanı sıra doğal esansiyel yağlara olan ilgi de artmaktadır. Bu bağlamda, daha önce test edilmemiş olan muskat esansiyel yağının anestezik etkinliği, Karaca mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) juvenil bireylerinde araştırılmıştır. Ön denemeler sonucunda üç farklı anestezik konsantrasyon (düşük konsantrasyon "LC: 500 µL/L", orta konsantrasyon "MC: 750 µL/L" ve yüksek konsantrasyon "HC: 1000 µL/L") belirlenmiştir. Anesteziye giriş ve iyileşme süreleri dikkate alındığında mersinlerde LC'nin anesteziye giriş süreleri kabul edilebilir seviyelerde (≥ 5 dk) gözlenmiştir. Diğer konsantrasyonlar için hem anesteziye giriş hem de iyileşme süreleri kabul edilebilir seviyelerdedir. Kan parametreleri özellikle lökosit (WBC) ve hemoglobin (HGB) için 8. saatte dahi bir artış gözlenmiştir. Anestezi konsantrasyonlarının artması balıklarda bir takım histolojik değişikliklere neden olmuştur. LC grubuna ait mersin balığı bireylerinin solungaç dokularında hipertrofi gözlenirken konsantrasyonun artmasıyla hiperplazi de gözlenmiştir. Sonuç olarak mevcut çalışma Karaca Mersin balığı juvenil bireyleri için yeni bir doğal anestezik alternatifini olan muskat yağının uygulanma potansiyelini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Anestezi, hematoloji, histoloji, mersin balığı, muskat

An Alternative Natural Anesthetic Agent in Juvenile Danube Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*): Nutmeg Essential Oil (*Myristica fragrans*)

Abstract

In aquaculture, interest in natural essential oils has increased alongside the interest in synthetic anesthetic agents. In this context, the anesthetic efficacy of nutmeg essential oil, which had not been tested before, was investigated in juvenile Danube sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). Based on preliminary trials, three different anesthetic concentrations were determined: low concentration "LC: 500 µL/L", medium concentration "MC: 750 µL/L", and high concentration "HC: 1000 µL/L". Considering induction and recovery times, the induction times of LC in sturgeon were observed to be at acceptable levels (≥ 5 minutes). Both induction and recovery times for the other concentrations were found to be within acceptable ranges. Blood parameters, particularly leukocytes (WBC) and hemoglobin (HGB), showed an increase even at the 8th hour. Increasing anesthetic concentrations caused some histological changes in the fish. While hypertrophy was observed in the gill tissues of sturgeon individuals in the LC group, hyperplasia was also noted with the increase in concentration. In conclusion, the present study demonstrated the potential application of nutmeg oil as a new natural anesthetic alternative for juvenile Danube sturgeon.

Keywords: Anesthesia, hematology, histology, sturgeon, nutmeg

Cite as;

Minaz, M., Er, A. (2024). Karaca Mersin Balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) Juvenil Bireylerinde Alternatif Bir Doğal Anestezik Ajan: Muskat Esansiyel Yağı (*Myristica fragrans*). *Recep Tayyip Erdogan University Journal of Science and Engineering*, 5(2), 190-203. DOI: 10.53501/rteufemud.1567937

1. Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliğinde balıklar, taşıma, aşılama, etiketleme ve cerrahi müdahale gibi rutin prosedürlere tabi tutulur. Bu aktiviteler balıklardaki stres seviyelerini yükselterek fizyolojilerini ve hayatta kalmalarını önemli ölçüde etkiler (Harmon, 2009; Husen ve Sharma, 2014). Stres balık fizyolojisini olumsuz yönde etkileyerek daha yavaş büyümeye, bağışıklık fonksiyonunun baskılanmasına neden olurken diğer taraftan üremeye de engel olur (Schreck ve Tort, 2016; Ciji ve Akhtar, 2021). Balık refahının olumsuz etkilenmesi balık sağlığını ve büyümesini doğrudan etkileyerek su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe ekonomik kayıplara yol açar (Ashley, 2007). Bu nedenle anestezi maddeleri, stresi azaltmak ve ağrı hissiyatını ortadan kaldırmak için su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılır. Etkili bir şekilde yapılan sedasyon veya anestezi işlemi fizyolojik stres tepkilerinin merkezinde yer alan hipotalamus-hipofiz-böbrek arası (HPI) eksenine ilişkili olumsuz etkilerin hafifletilmesine yardımcı olabilir (Brønstad, 2022). Balık refahını korumanın ötesinde anestezi, kan örnekleme ve büyük anaçların yumurtlaması gibi zorlu prosedürler sırasında balıkları hareketsiz bırakmak için kullanılır. Bu uygulama yalnızca iş yükünü hafifletmekle kalmaz, aynı zamanda olası yaralanma riskini de en aza indirir. Ek olarak, anestezi genellikle balık nakli sırasında metabolik aktiviteyi azaltmak ve mekanik hasarı önlemek için de kullanılır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde en sık kullanılan anestezi maddeleri arasında Tricaine metansülfonat (MS-222), Benzokain, Kinaldin, 2-Fenoksietanol (2-PE), Metomidat, Aqui-S ve karanfil yağı bulunur (Aydın ve Barbas, 2020; Ak, 2022). Sentetik anestezi maddelerinin balıklar üzerindeki olumsuz etkileri ve insanları etkileyebilecek potansiyel kalıntıları nedeniyle, araştırmacılar son yıllarda bitki bazlı uçucu yağların anestezi özelliklerini araştırmaktadır (Can ve Sümer, 2019; Ak vd., 2022; Yigit vd., 2022; Yigit ve Kocaayan, 2023; Minaz, 2024). Doğal uçucu yağların balıklar için anestezi maddesi olarak

kullanımı, sentetik alternatiflere göre potansiyel faydaları nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir (Haihambo vd., 2023). Sentetik anestezi maddeleri etkili olsa da, hem su ortamlarını hem de insan sağlığını etkileyen zararlı kalıntılar bırakabilir. Bunun aksine, karanfil veya lavanta gibi doğal kaynaklardan elde edilen uçucu yağlar daha çevre dostu ve sürdürülebilir bir seçenek sunar (Ak vd., 2022; Minaz vd., 2024; Yigit vd., 2022). Bu doğal anestezi maddeleri genellikle daha az toksiktir, suda daha hızlı parçalanır ve zararlı kalıntı riskini azaltır (Martins vd., 2019). Ek olarak, uçucu yağlar balıklardaki stresi ve yaralanmayı en aza indirirken etkili bir şekilde anesteziye neden olabilir. Uygulamaları yalnızca elleçleme ve taşıma gibi prosedürler sırasında balık refahını artırmakla kalmaz, aynı zamanda su ürünleri yetiştiriciliği uygulamalarında çevresel sürdürülebilirliğe ve kimyasal kirleticilerin azaltılmasına verilen artan vurgu ile de uyumludur.

Doğal bir anestezi maddesi olarak, Endonezya'nın Maluku Adaları'na özgü olan muskat, Hindistan, Sri Lanka, Güney Afrika ve Amerika Birleşik Devletleri'nde de dağılım göstermektedir (Francis vd., 2019; Ashokkumar vd., 2022). Muskata, öncelikle baharat olarak kullanılsa da (Abourashed ve El-Alfy, 2016), antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, antikanser ve afrodisyak özelliklere sahip uçucu yağ da sahiptir (Purkait vd., 2018; Hiranrat ve Hiranrat, 2019; Das vd., 2020; Nikolic vd., 2021). Muskata tozunun anestezi maddesi olarak potansiyeli üzerine sadece bir çalışma olmasına rağmen (Al-Niaem vd., 2017), uçucu yağ üzerinde hiçbir çalışma yapılmamıştır. Muskata'nın narkotik kullanımına ilişkin raporlar (Grover vd., 2002), bu maddenin uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında anestezi etkisi yaratabileceği fikrine yol açmıştır. Muskata'nın önemli bir bileşeni olan miristisin, halüsinasyonlar, taşikardi, uyuşukluk ve bulanık görme gibi olumsuz etkiler gösterebilir (Sangalli ve Chiang, 2000). Bu nedenle, ilk adım olarak, büyük miktarda muskata'nın yutulmasının anestezi alanında hastaları nasıl etkileyebileceğini anlamak için miristisinin potansiyel etkilerini araştırmak gerekir (Leiter

vd., 2011).

Anesteziklere verilen yanıtlar farklı balık türleri arasında değişiklik gösterebilir, bu nedenle bir anestezinin etkinliği bir türden diğerine farklılık gösterebilir. Karaca Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*), çevresel mekanizmalara karşı yüksek dayanıklılığı ve yüksek ekonomik katma değeri (eti ve havyarının ticari değeri) nedeniyle dünya su ürünleri yetiştiriciliği için yüksek potansiyele sahip önemli bir balık türüdür (Bronzi vd., 2011). Karaca Mersini, Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (IUCN)'nin Tehlike Altındaki Türler Kırmızı Listesi'nde yer alan nesli tükenme tehlikesi altında balık türlerinden biridir (Friedrich vd., 2019). Bu nedenle, tüm yetiştiricilik işlemlerinde balık için en uygun anestezik maddenin kullanılması önemlidir. Bu kapsamda mevcut çalışma ekonomik ve ekolojik değere sahip Karaca Mersin balığı üzerinde yeni bir anestezik madde olan muskat esansiyel yağının anestezik etkisine odaklanmıştır. Anestezik maddenin uygulanabilirliği, geçerli anestezik madde konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşı balıkların göstermiş olduğu fizyolojik tepkiler araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Anestezik Madde

Muskat (*Myristica fragrans*) esansiyel yağı ticari bir şirketten (Doalinn, Türkiye) satın alınmıştır. Suda çözünmediği için %96'lık etanol kullanılarak 1:10 oranında çözündürülerek uygulanmıştır. Muskat yağının içeriği Tablo 1'de sunulmaktadır. Analizler 30 m 5-Ms kolonlu bir GC-MS (Shimadzu QP2010 Ultra) cihazında gerçekleştirildi. Buna göre, α -pinen, β -pinen ve sabinen muskat esansiyel yağının ana bileşenleridir (> %10).

2.2. Deney Tasarımı

Mevcut çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2024/05). Denemeler Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yürütülmüştür. Çalışmada balıklar sırasıyla düşük (LC: 500 μ L/L), orta

(MC: 750 μ L/L) ve yüksek (HC: 1000 μ L/L) olmak üzere üç farklı anestezik konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Muskat yağı konsantrasyonları ön çalışma sonucunda indüksiyon ve iyileşme sürelerine göre belirlenmiştir. Her konsantrasyon grubu üç tekrar ve tekrar başına on balıktan oluşacak şekilde toplam 90 balık (ortalama balık ağırlığı 68,3 \pm 9,7 gr) kullanılmıştır. Hematolojik ve histolojik çalışmaların sağlıklı bireylerle karşılaştırılması amacıyla ön stoklama tankından (anestezik öncesi) ek olarak bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Adaptasyon için balıklar çalışmadan 7 gün önce deneme tanklarına (50 L hacimli 9 farklı tank) yerleştirilmiş ve son 48 saat boyunca beslenmemiştir.

Tablo 1. Muskat yağının kompozisyonu

Table 1. Composition of nutmeg oil.

Pik sırası	İçerik	Ağırlık (%)
1	α -pinen	17,175
2	β -pinen	10,648
3	Sabinen	20,745
4	Δ -3-karen	2,018
5	Mirsen	2,171
6	α -felandren	1,216
7	α -terpinen	4,312
8	Limonen	5,102
9	β -felandren	3,071
10	γ -terpinen	6,689
11	Simen	2,437
12	α -terpinolen	2,141
13	4-Terpineol	8,085
14	Safrol	1,479
15	Metileugenol	1,034
16	Elemiçin	3,537
17	Miristisin	3,410
18	Diğerleri <1.000%	4,730
		100

Adaptasyon sürecinde pH:7,2 ve çözünmüş oksijen (DO):>8 mg/L'dir. Çalışmanın su kaynağı sabit sıcaklığa (18 °C) sahip yeraltı suyudur. İndüksiyon süresi, uyarılara karşı tam tepkisizlik, anormal operkulum hareketleri ve denge kaybı gibi reaksiyonların gözlenmesiyle belirlenmiştir (Iwama, 1998). Balıkların anesteziklere karşı davranışsal tepkileri 7 dakikalık bir süre boyunca izlenmiştir. İyileşme, balığın

düzenli bir şekilde yüzmeye başladığı ve uyarılara yanıt verdiği an olarak tanımlanmıştır. İndüksiyondan sonra, anestezi altındaki balıklar iyileşmeleri için bir hava pompası (DO ~10 mg/L) kullanılarak kuvvetli havalandırmaya sahip 500 L'lik tanklara hızlıca yerleştirilmiştir. Gözlemci yanlılığını ortadan kaldırmak için hem iyileşme hem de indüksiyon süreleri tek bir gözlemci tarafından kronometre ile kaydedilmiştir.

2.3. Hematolojik Çalışmalar

Hematolojik değerlendirme için öncelikle her gruptan beşer adet balığın kaudal venasından 2,5 ml'lik şırınga ile kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri bozulmaması ve pıhtılaşmaması için analiz öncesindeki süreçte EDTA K3 tüplerinde saklanmıştır. Her numune için eritrosit (RBC), lökosit (WBC), hematokrit (HCT) ve hemoglobin (HGB) değerleri bir otomatik hematolojik ölçüm cihazı (Prokan-6800VET) ile ölçülmüştür. Kan sayım cihazı, daha öncesinde sağlıklı balıklardan alınan kanla kalibre edilmiştir. Cihazın çalışma prensibine göre kan hücreleri elektriksel empedans yöntemiyle sayılır ve boyutlandırılır (Minaz vd., 2022).

2.4. Histolojik Değerlendirme

Muskat yağının Karaca mersin balığı juvenil bireylerinin solungaç dokularında nasıl bir etki oluşturacağını tespit etmek için bir dizi histolojik inceleme gerçekleştirilmiştir. Histolojik değerlendirme için öncelikle her gruptan anesteziye uğramış üçer balık ötenazi edilmiştir. Kontrol grubundan alınan balıklar (anesteziye uğramamış) da dahil olmaz üzere tüm balıklar için ötenazi yöntemi mekanik sersemletmedir. Daha sonrasında juvenil bireylerin solungaç dokuları yanlış değerlendirmeye sebebiyet vermemesi için en dıştan bir öndeki lamella dikkate alınarak alınmıştır. Bir-iki gün aralığında nötral buffer formalinde tutulan dokular devamında %50'lik etanole alınmıştır. Dokular devamında bir gün boyunca akan suya bırakılmışlardır. Ardından ise %80'lik alkolden başlayarak %100 alkole kadar bir dizi etanol serisinden geçirilmiştir. Bunu takiben ksilen serilerine tabi tutulan dokular devamında ise 65 °C'ye ayarlı bir etüvde bir gece

sıvı parafine maruz bırakılmıştır. Ertesi gün dokular sıvı parafin kullanılarak bloklanmıştır. Bloklanmış dokular bir mikrotom kullanılarak 0,5 µm kalınlığında kesilmiş ve lam üzerine yapıştırılmıştır. Preperatlar üzerindeki parafinin uzaklaştırılması için 65 °C'de bir gece bekletilmiştir. Parafini uzaklaştırılan lam üzerindeki dokular tekrardan ksilen ve alkol serilerinden geçerek boyama aşamasına geçilmiştir. Boyama için sırasıyla hematoksilin ve eozin kullanılmıştır. Boyama işleminin ardından tekrar ksilen serisine alınan dokular mikroskopla inceleme sırasında tahribatı önlemek için sentetik bir reçine yapısına sahip entellan ile kaplanarak üzeri cover slip lamel ile kapatılmıştır. Histolojik değerlendirme için hazır hale gelen preperatlar bir kameralı mikroskop (Leica ICC 50) ile görüntülenerek bulgular kaydedilmiştir (Minaz ve Kurtoğlu, 2024).

2.6. İstatistiksel Analizler

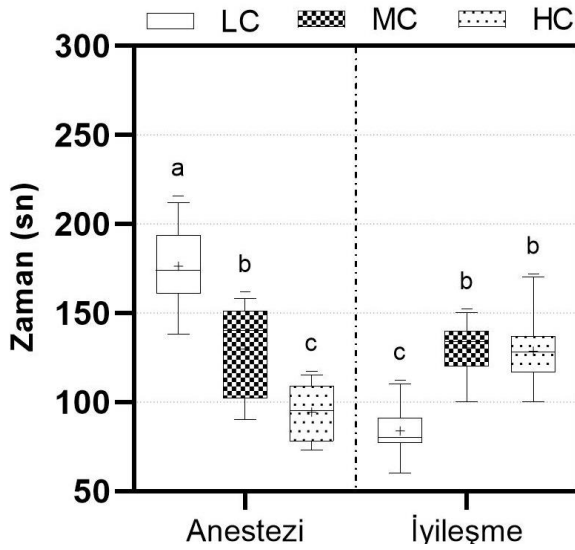
Muskat yağının Karaca mersin balığı juvenil bireylerindeki etkilerini istatistiksel olarak karşılaştırmak için IBM SPSS Statistics Software (Versiyon 25, IBM Corp., Armonk, New York, ABD) programı kullanılmıştır. Bu kapsamda tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Tüm grafiklendirmeler GraphPAD ve OriginPRO 2023 (Learning Edition) programı ile çizilmiştir. Data setlerinin gruplardaki normal dağılımını kontrol edebilmek için Kolmogrov-Smirnov testi uygulanmıştır. Buna bağlı olarak gruplarda parametrik dağılımı tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkların belirlenmesinde sırasıyla One-way ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların hangi gruplar arasında gerçekleştiğini belirlemek için ise Tukey HSD testi kullanılmıştır. Anlamlı P değeri, istatistiksel olarak maksimum 0,05 olarak tercih edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Anesteziye Giriş ve İyileşme Süreleri

Mersin balıklarında muskat esansiyel yağının konsantrasyonu, anestezi ve iyileşme süreleri için gruplar arasında anlamlı fark göstermiştir

($p<0,01$). Anesteziye giriş sürelerine göre LC, MC ve HC grupları artan konsantrasyon ve azalan anestezi süreleri ile birbirlerinden anlamlı olarak farklıdır (Şekil 1). Diğer taraftan, LC grubundaki balıklar, diğer gruplara göre anlamlı şekilde daha hızlı (<100 sn) iyileşmiştir ($p<0,01$). LC grubundaki iyileşme sürelerinin her balık için ne denli hızlı olduğu Şekil 2'de net bir şekilde görülmektedir. İyileşme süresi konsantrasyonun artmasıyla kademeli olarak artmış, anesteziye giriş süreleri ise azalmıştır.



Şekil 1. Farklı muskat yağı konsantrasyonuna göre sazanlardaki anestezi ve iyileşme süreleri. LC: 500 µL/L, MC: 750 µL/L, and HC: 1000 µL/L.

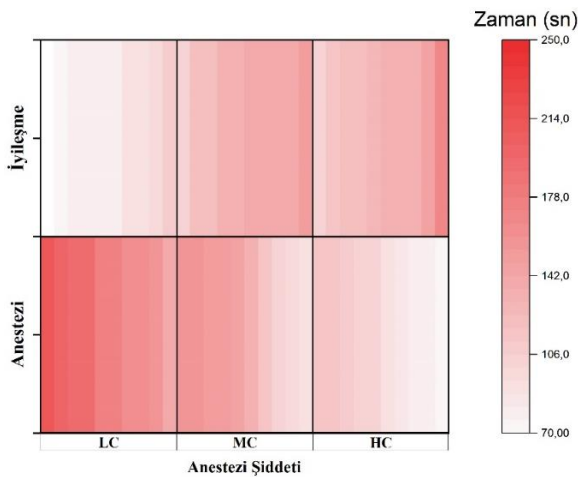
Figure 1. Anesthesia and recovery times in carp at different concentrations of nutmeg oil. LC: 500 µL/L, MC: 750 µL/L, and HC: 1000 µL/L.

Bir anestezi ajanının kullanımının uygun kabul edilmesi için, hayvanlar üzerinde toksik etkiler göstermemesi, işlem sırasında insan sağlığını olumsuz etkilememesi ve anestezi-iyileşme sürelerinin uygun aralıkta olması gibi temel kriterlerin karşılanması gereklidir (Can vd., 2018). Bu nedenle, her esansiyel yağın kimyasal yapısının detaylı bir şekilde incelenmesi ve bileşenlerinin hem anestezi etkilerinin hem de toksisitesinin belirlenmesi önem taşır. Mevcut araştırmada, en büyük oranı sabinen oluşturmaktadır. Sabinen, farmasötik alanda yaygın olarak kullanılır ve antifungal (Yamasaki vd., 2007) ile anti-enflamatuvar özellikler göstermektedir (Valente vd., 2013). Ayrıca, muskat esansiyel yağında bulunan α -Pinen ve β -Pinen gibi bileşenlerin, farklı bitkilerin esansiyel yağlarında da yer aldığı ve çeşitli çalışmalarda anestezi etkiler sağladığı tespit edilmiştir (Kasanen vd., 1998; Mercier vd., 2009; da Cunha vd., 2010; Bodur, León-Bernabeu, vd., 2018;

göstermektedir (Valente vd., 2013). Ayrıca, muskat esansiyel yağında bulunan α -Pinen ve β -Pinen gibi bileşenlerin, farklı bitkilerin esansiyel yağlarında da yer aldığı ve çeşitli çalışmalarda anestezi etkiler sağladığı tespit edilmiştir (Kasanen vd., 1998; Mercier vd., 2009; da Cunha vd., 2010; Bodur, León-Bernabeu, vd., 2018; Raknak vd., 2022). Bu bileşenlerin merkezi sinir sistemindeki postsinaptik nöronlarda bulunan GABAA reseptör komplekslerinin benzodiazepin bölgesine bağlanarak, inhibitör postsinaptik potansiyel (IPSP) üzerinden balıklarda anesteziyi başlatabileceği öne sürülmüştür (Kessler vd., 2014; Khumpirapang vd., 2018). Anestezi ajanının uygulanma süresi ve konsantrasyonu, balıklarda strese neden olabileceği gibi yüksek operasyon maliyetlerine de yol açabilir. Anestezi ve iyileşme sürelerinin, balıkların strese maruz kalmasını minimuma indirmek ve süreci hızlandırmak açısından hayati önemi vardır. Önceki çalışmalar, anestezi süresinin 3 dakikadan kısa, iyileşme süresinin ise 5 dakikanın altında olması gerektiğini ortaya koymuştur (Ross ve Ross, 2008). Mevcut çalışmada LC grubuna ait bireyler üst sınırdan anesteziye giriş göstermiş olmakla beraber bazı balıkların 3 dakikadan daha uzun anestezi süresi gösterdiği de gözlenmiştir.

Bir anestezi ajanının kullanımının uygun kabul edilmesi için, hayvanlar üzerinde toksik etkiler göstermemesi, işlem sırasında insan sağlığını olumsuz etkilememesi ve anestezi-iyileşme sürelerinin uygun aralıkta olması gibi temel kriterlerin karşılanması gereklidir (Can vd., 2018). Bu nedenle, her esansiyel yağın kimyasal yapısının detaylı bir şekilde incelenmesi ve bileşenlerinin hem anestezi etkilerinin hem de toksisitesinin belirlenmesi önem taşır. Mevcut araştırmada, en büyük oranı sabinen oluşturmaktadır. Sabinen, farmasötik alanda yaygın olarak kullanılır ve antifungal (Yamasaki vd., 2007) ile anti-enflamatuvar özellikler göstermektedir (Valente vd., 2013). Ayrıca, muskat esansiyel yağında bulunan α -Pinen ve β -Pinen gibi bileşenlerin, farklı bitkilerin esansiyel yağlarında da yer aldığı ve çeşitli çalışmalarda anestezi etkiler sağladığı tespit edilmiştir (Kasanen vd., 1998; Mercier vd., 2009; da Cunha vd., 2010; Bodur, León-Bernabeu, vd., 2018;

Raknak vd., 2022). Bu bileşenlerin merkezi sinir sistemindeki postsinaptik nöronlarda bulunan GABAA reseptör komplekslerinin benzodiazepin bölgesine bağlanarak, inhibitör postsinaptik potansiyel (IPSP) üzerinden balıklarda anesteziyi başlatabileceği öne sürülmüştür (Kessler vd., 2014; Khumpirapang vd., 2018). Anestezi ajanının uygulanma süresi ve konsantrasyonu, balıklarda strese neden olabileceği gibi yüksek operasyon maliyetlerine de yol açabilir. Anestezi ve iyileşme sürelerinin, balıkların strese maruz kalmasını minimuma indirmek ve süreci hızlandırmak açısından hayati önemi vardır. Önceki çalışmalar, anestezi süresinin 3 dakikadan kısa, iyileşme süresinin ise 5 dakikadan altında olması gerektiğini ortaya koymuştur (Ross ve Ross, 2008). Mevcut çalışmada LC grubuna ait bireyler üst sınırdaki anesteziye giriş göstermiş olmakla beraber bazı balıkların 3 dakikadan daha uzun anestezi süresi gösterdiği de gözlenmiştir. Diğer taraftan MC ve HC grubundaki balıklar 3 dakikadan daha hızlı anesteziye girmiştir. İyileşme süreçleri tüm gruplar için kabul edilebilir sınırlar içerisinde.



Şekil 2. Mersin balıklarındaki her konsantrasyon grubu için anestezi ve iyileşme sürelerinin ısı haritası. LC: 500 µL/L, MC: 750 µL/L, and HC: 1000 µL/L.

Figure 2. Heatmap of anesthesia and recovery times for each concentration group in sturgeon. LC: 500 µL/L, MC: 750 µL/L, and HC: 1000 µL/L.

Anestezik maddenin etkinliği açısından MC, gruptaki balıkların hem uygun anestezi ve

iyileşme süresi göstermesi hem de HC grubuna göre daha düşük maliyetli olmasından ötürü dikkate değer konsantrasyondur. Bununla birlikte sedatif etki oluşturmak için LC'nin derin anestezi için ise HC'nin daha uygun konsantrasyon olduğu gözlenmiştir. Anestezi ve iyileşme süreleri balık türüne ve trofik seviyeye bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Mirghaed vd., 2018; Yousefi vd., 2022). Danube mersin balığı ile yaptığımız önceki çalışmada, papatya yağının düşük konsantrasyonlarda balıkları benzer sürelerde indükleyip iyileştirdiği gösterilmiştir (Ak vd., 2022).

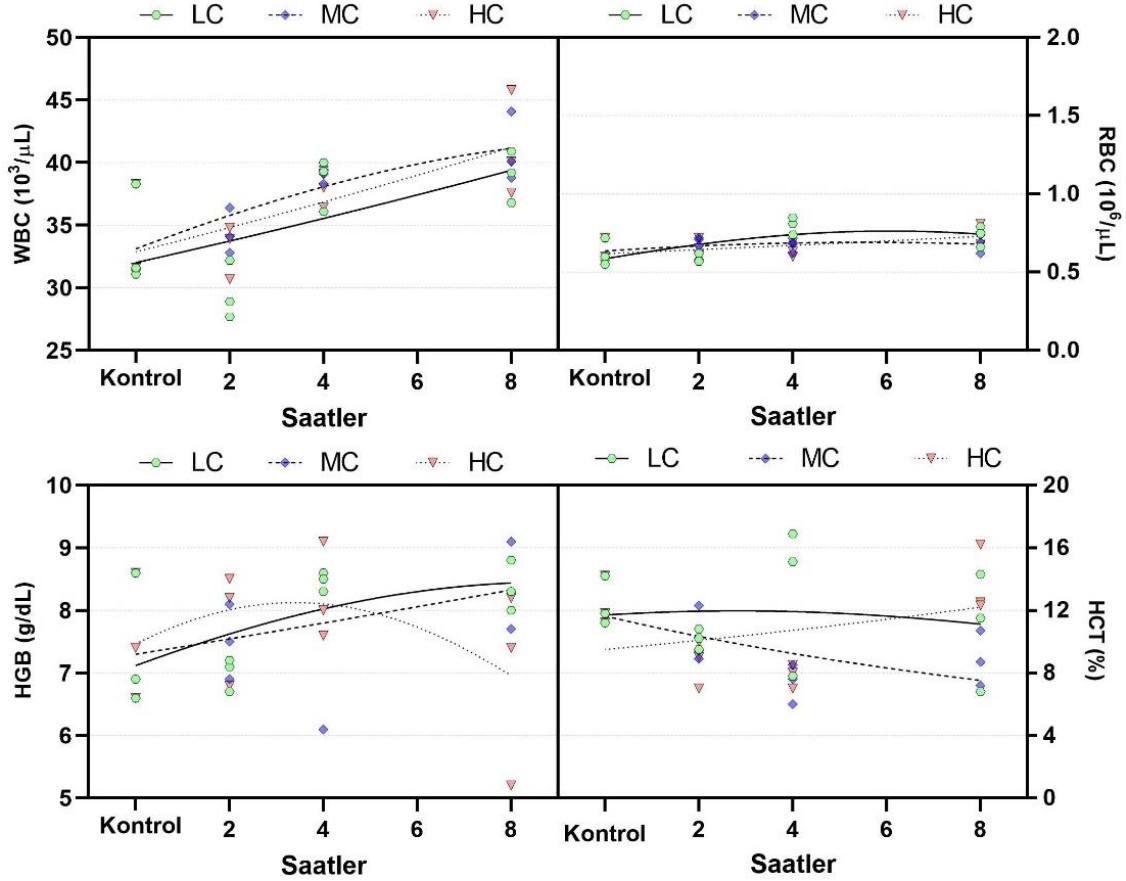
3.2. Kan Parametreleri

Anestezi altındaki mersin balıklarından 2., 4. ve 8. saatlerde alınan kan örnekleri, balıkların kan parametrelerinin zamana bağlı tepkisini göstermektedir (Şekil 3). Diğer iki balık türüne göre WBC ve HGB kan parametreleri 8. saatte dahi artmaya devam etmiştir. Dolayısıyla WBC ve HGB için ulaşacağı maksimum seviye ön görülememektedir. RBC ve HCT parametreleri ise zamana bağlı anlamlı bir artış göstermemiştir. Konsantrasyon grupları arasında herhangi bir zaman diliminde kan parametreleri açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Hematolojik parametreler, balıkların toksik maddelere karşı verdikleri en hızlı tepkilerden biridir (Akram vd., 2021). Eğer anestezi madde uygun bir konsantrasyonda ayarlanmazsa, toksik etkiler oluşturabilir (Sinha vd., 2014). Bu nedenle, anestezi uygulanan balıklarda kan parametrelerinde değişimler gözlemlenebilir. Yapılan gözlemlerde, kan parametreleri zaman içinde incelenmiş ve mersin balıklarında WBC ve HGB değerlerinin 8. saate kadar artmaya devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle WBC ve HGB'nin maksimum seviyeye ulaşacağı süre kesin olarak belirlenmemiştir. Diğer parametrelerde ise zamanla önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir. Anestezi altındaki balıklarda operkulum hareketlerinin yavaşlaması, hipoksiye neden olabilir (Cooke vd., 2004). Bu durum ise katekolamin düzeylerinin artmasına ve dalaktan daha fazla HGB salınmasına yol açar (Clauss vd., 2008). Bulgular, tüm gruplarda HGB

seviyelerinde benzer bir artış olduğunu göstermekte ve bu durumun strese ya da solungaçlarda tahrişe (epitel şişmesi) bağlı hipoksi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. WBC, balıkların savunma mekanizmasını gösteren önemli bir kan parametresidir. Bu nedenle, balıkların anesteziye karşı bir savunma tepkisi geliştirmiş olabileceği değerlendirilebilir. Su ürünlerinde yaygın olarak kullanılan doğal anesteziklerden

biri olan karanfil yağının da benzer şekilde balıklarda akut fazda kan parametrelerini artırdığı ve ilerleyen dönemlerde bu değerlerin normale döndüğü rapor edilmiştir (Uçar ve Atamanalp, 2010; Gholipour Kanani vd., 2011; Mohammadi ve Khara, 2015; Ak vd., 2022). Sonuç olarak, mevcut çalışmada WBC ve HGB seviyelerinin normal seviyelere dönmesinin 8 saatten daha uzun sürdüğü belirlenmiştir.



Şekil 3. Zamana bağlı mersin balıklarının kan parametrelerindeki değişiklikler. LC: 500 $\mu\text{L/L}$, MC: 750 $\mu\text{L/L}$, and HC: 1000 $\mu\text{L/L}$. WBC: beyaz kan hücreleri sayısı, RBC: kırmızı kan hücreleri sayısı, HGB: hemoglobin konsantrasyonu ve HCT: hematokrit oranı.

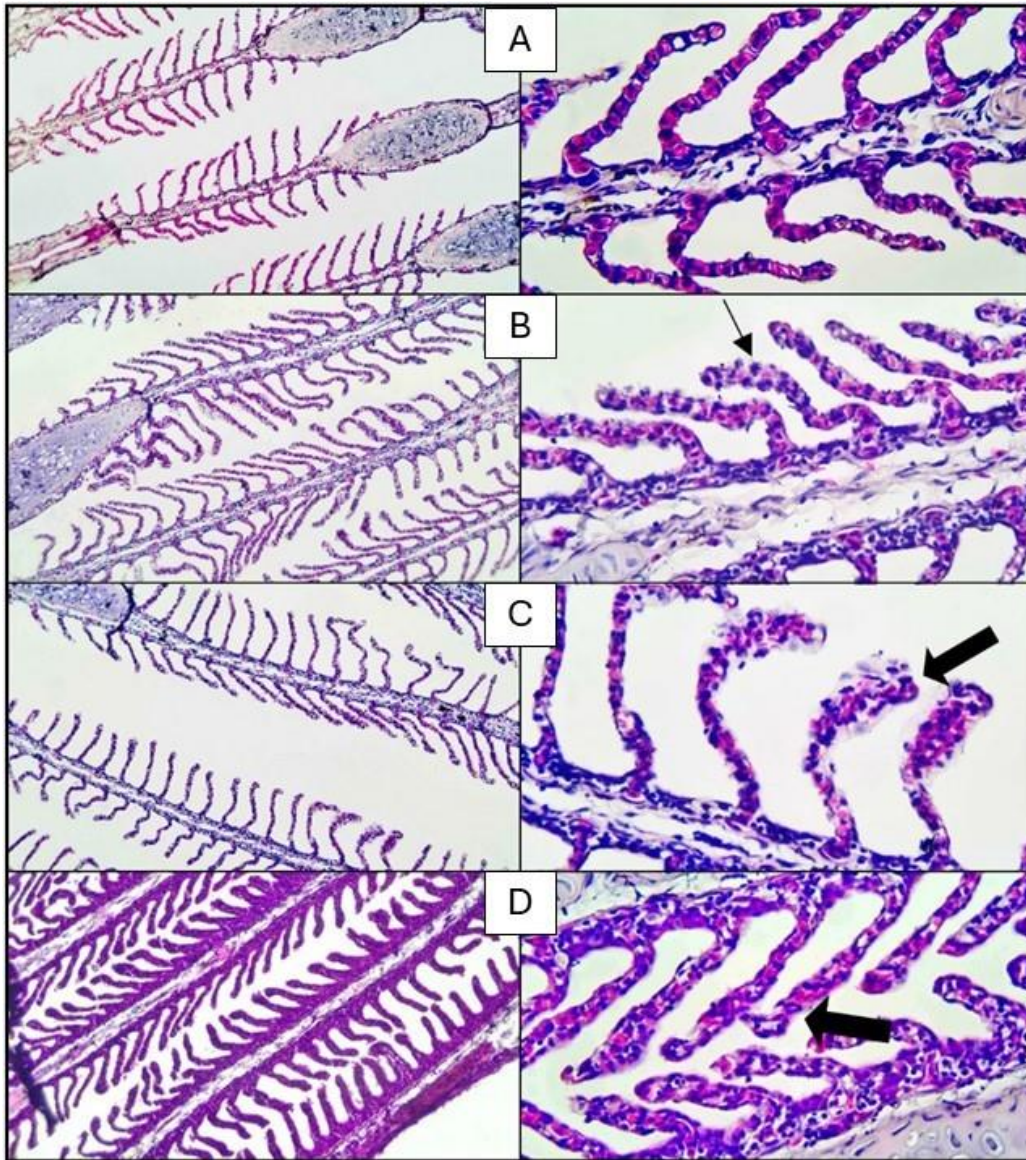
Figure 3. Changes in blood parameters of sturgeon over time. LC: 500 $\mu\text{L/L}$, MC: 750 $\mu\text{L/L}$, and HC: 1000 $\mu\text{L/L}$. WBC: white blood cell, RBC: red blood cell, HGB: hemoglobin, and HCT: hematocrit.

Hematolojik parametreler, balıkların toksik maddelere karşı verdikleri en hızlı tepkilerden biridir (Akram vd., 2021). Eğer anesteziye uygun bir konsantrasyonda ayarlanmazsa, toksik etkiler oluşturabilir (Sinha vd., 2014). Bu nedenle, anestezi uygulanan balıklarda kan parametrelerinde değişimler gözlemlenebilir. Yapılan gözlemlerde, kan parametreleri zaman içinde incelenmiş ve mersin balıklarında WBC ve

HGB değerlerinin 8. saate kadar artmaya devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle WBC ve HGB'nin maksimum seviyeye ulaşacağı süre kesin olarak belirlenmemiştir. Diğer parametrelerde ise zamanla önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir. Anestezi altındaki balıklarda operkulum hareketlerinin yavaşlaması, hipoksiye neden olabilir (Cooke vd., 2004). Bu durum ise katekolamin düzeylerinin artmasına ve dalaktan

daha fazla HGB salınmasına yol açar (Clauss vd., 2008). Bulgular, tüm gruplarda HGB seviyelerinde benzer bir artış olduğunu göstermekte ve bu durumun strese ya da solungaçlarda tahrişe (epitel şişmesi) bağlı hipoksi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. WBC, balıkların savunma mekanizmasını gösteren önemli bir kan parametresidir. Bu nedenle, balıkların anestetik maddeye karşı bir savunma tepkisi geliştirmiş olabileceği değerlendirilebilir. Su ürünlerinde

yaygın olarak kullanılan doğal anestetiklerden biri olan karanfil yağının da benzer şekilde balıklarda akut fazda kan parametrelerini artırdığı ve ilerleyen dönemlerde bu değerlerin normale döndüğü rapor edilmiştir (Uçar ve Atamanalp, 2010; Gholipour Kanani vd., 2011; Mohammadi ve Khara, 2015; Ak vd., 2022). Sonuç olarak, mevcut çalışmada WBC ve HGB seviyelerinin normal seviyelere dönmesinin 8 saatten daha uzun sürdüğü belirlenmiştir.



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlardaki muskat esansiyel yağına maruz kalan mersinlerin solungaç dokularının histolojik incelemesi. A: kontrol, B: 500 µL/L, C: 750 µL/L ve D: 1000 µL/L. Kalın ok: hiperplazi ve ok: hipertrofi. Şekildeki sol taraf 10X, sağ taraf 40X büyütme temsil etmektedir.

Figure 4. Histological examination of the gill tissues of sturgeon exposed to different concentrations of nutmeg essential oil. A: control, B: 500 µL/L, C: 750 µL/L, and D: 1000 µL/L. Thick arrow: hyperplasia, and arrow: hypertrophy. The left side and right side represent 10X and 40X, respectively.

3.3. Histolojik Çıktılar

Farklı konsantrasyonlardaki muskat esansiyel yağı ile anestezi altına alınan mersin balıklarının solungaç dokuları histolojik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4). Kontrol balıklarının solungaçlarında histolojik bir bulgu gözlenmemiştir. Ancak, LC gruplarında hipertropi tespit edilmiştir. HC grubunda ise belirgin olarak hiperplazi gözlenmiştir.

Solungaçlar, balıklarda su ile ilk temas eden organlardır (Nilsson, 2007). Bu nedenle, solungaçların histolojik incelemesi anestezi çalışmalarında balıkların stres tepkisini tam olarak değerlendirmese de önemli bir stres göstergesi olarak kabul edilebilir (Bodur, Afonso, vd., 2018). Mevcut çalışmada, LC grubundaki balıklarda daha yoğun hipertrofik hücreler gözlemlenmiştir. MC ve HC gruplarındaki balıklarda ise hiperplazi, dikkat çeken ortak bir dejenerasyon olarak ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, anestezi maddenin konsantrasyonu arttıkça, balıklardaki histolojik değişiklikler daha belirgin hale gelmiştir. Solungaç dokularında gözlemlenen hiperplazi ve hipertrofi, balıkların akut ve kronik hasarlara karşı verdiği spesifik olmayan savunma tepkileridir (de Oliveira vd., 2019). Bu reaksiyonlar genellikle ilk savunma mekanizması olarak kabul edilir ve hafif düzeyde onarıcı olarak sınıflandırılır (Raskovic vd., 2010). Aslında, bu savunma tepkileri, karanfil yağı ile anestezi uygulanan balıklarda, sentetik anestezi ajan MS222 ile tedavi edilen balıklara göre daha belirgin hale gelebilir (Jia vd., 2022). Ayrıca, doğal anesteziklerin kullanımının balıklarda hiperplazi ve epitel dokusunda kalkmaya yol açtığı daha önce rapor edilmiştir (Brandão vd., 2021; Yigit vd., 2022). Bununla birlikte kısa vadede histolojik olarak değişim göstermeyen düşük konsantrasyonlu anestezi maddelere maruz kalan balıklarda ilerleyen süreçte histolojik değişikliklerin olma ihtimali göz ardı edilmemelidir.

4. Sonuçlar

Mevcut çalışma, muskat esansiyel yağının Karaca Mersin balığı üzerinde anestezi etkilerini incelemektedir. Muskat esansiyel yağının anestezi etkileri, α -Pinen ve β -Pinen bileşenlerine bağlanmıştır. LC grubundaki balıkların anesteziye giriş süreleri, mersin balıkları için kabul edilebilir seviyelere yakın bulunmuş, diğer iki konsantrasyon ise anesteziye giriş ve iyileşme süreleri açısından kabul edilebilir düzeydedir. Hematolojik ve histolojik bulgulara göre, muskat esansiyel yağı, diğer birçok sentetik ve doğal anestezi maddelere göre umut vadeden bir alternatif olabilir. Ancak, çalışmanın dikkat çeken bir noktası, muskat yağının yaygın olduğu bölgeler göz önünde bulundurulduğunda, Türkiye’de dahil olmak üzere Orta Doğu ve Batı ülkeleri gibi bölgelerde maliyetinin yüksek olmasıdır. Muskat bitkisi çoğunlukla Uzak Doğu ülkelerinde yetiştiği için, bu anestezi maddenin Hindistan, Pakistan ve Endonezya gibi ülkelerdeki kullanım ve erişilebilirliği daha kolaydır. Dolayısıyla bu bölgelerde diğer doğal ve sentetik anestezi ajanlar için ekonomik ve uygulanabilir bir anestezi olması muhtemeldir. Gelecek araştırmalar, bulguları daha da güçlendirmek adına plazma kortizol ve glukoz seviyeleri gibi stres göstergelerinin incelenmesini de içermelidir.

Teşekkür

Yazarlar, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Rize, Türkiye Su Ürünleri Araştırma Merkezi’ndeki akademik ve idari personele değerli yardımları için teşekkür eder. Ayrıca, bu fikrin arkasındaki vizyon sahibi olan Perihan MİNAZ’a teşekkürlerimizi sunarız. Laboratuvar çalışmalarında özverili desteklerinden dolayı Doç. Dr. Kübra AK’a teşekkürlerimizi sunarız.

Mali Destek

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Araştırma Fonu (FBA-2024-1645) tarafından desteklenmiştir.

Yazar Katkısı

Görselleştirme, orjinal metin yazarlığı, kavramsallaştırma vd. tüm makale oluşturma işlemleri sorumlu yazar Mert Minaz tarafından gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar çalışmaları Mert Minaz ve Akif Er tarafından gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik Beyan

Mevcut çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2024/05).

Kaynaklar

Abourashed, E.A., El-Alfy, A.T. (2016). Chemical diversity and pharmacological significance of the secondary metabolites of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *Phytochemistry Reviews*, 15(6), 1035–1056. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9469-x>

Ak, K. (2022). Anesthetic efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as hematological, histopathological and echocardiographic on broodstock Danube sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Applied Ichthyology*, 38(6), 586–595. <https://doi.org/10.1111/JAI.14361>

Ak, K., Minaz, M., Er, A., Aslankoç, R. (2022). The using potential of a new natural anesthetic agent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Chamomile oil (*Matricaria chamomilla*). *Aquaculture*, 561, 738742. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738742>

Akram, R., Iqbal, R., Hussain, R., Ali, M. (2021). Effects of bisphenol a on hematological, serum biochemical, and histopathological biomarkers in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) under long-term exposure. *Environmental Science and Pollution Research* 2021, 1, 1–16. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-17329-1>

Al-Niaem, K.S., Mohammed, F.A., Al-Hamadany, Q.H. (2017). The Anaesthetic

Effect of Nutmeg Powder, Myristica fragrans on Young Common Carp, *Cyprinus carpio*. *Biological and Applied Environmental Research*, 1(2), 279–286.

Ashley, P.J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3–4), 199–235. <https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2006.09.001>

Ashokkumar, K., Simal-Gandara, J., Murugan, M., Dhanya, M. K., Pandian, A. (2022). Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) essential oil: A review on its composition, biological, and pharmacological activities. *Phytotherapy Research*, 36(7), 2839–2851. <https://doi.org/10.1002/ptr.7491>

Aydın, B., Barbas, L.A.L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture*, 520, 734999. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.734999>

Bodur, T., Afonso, J. M., Montero, D., Navarro, A. (2018). Assessment of effective dose of new herbal anesthetics in two marine aquaculture species: *Dicentrarchus labrax* and *Argyrosomus regius*. *Aquaculture*, 482, 78–82. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.09.029>

Bodur, T., León-Bernabeu, S., Navarro, A., Tort, L., Afonso, J. M., Montero, D. (2018). Effects of new plant based anesthetics *Origanum* sp. and *Eucalyptus* sp. oils on stress and welfare parameters in *Dicentrarchus labrax* and their comparison with clove oil. *Aquaculture*, 495, 402–408. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.06.021>

Brandão, F.R., Farias, C.F.S., de Melo Souza, D.C., de Oliveira, M.I.B., de Matos, L.V., Majolo, C., de Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., de Almeida O'Sullivan, F.L., Chagas, E.C. (2021). Anesthetic potential of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* for *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 534, 736275. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736275>

Brønstad, A. (2022). Good anesthesia practice for fish and other aquatics. *Biology*, 11(9), 1355. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY1109135>

- 5
2010.06.014
- Bronzi, P., Rosenthal, H., Gessner, J. (2011). Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 169–175. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0426.2011.01757.X>
- Can, E., Kizak, V., Seyhaneyildiz Can, Ş., Özçiçek, E. (2018). Anesthetic potential of geranium (*Pelargonium graveolens*) oil for two cichlid species, *Sciaenochromis fryeri* and *Labidochromis caeruleus*. *Aquaculture*, 491, 59–64. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.03.013>
- Can, E., Sümer, E. (2019). Anesthetic and sedative efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils in blue dolphin cichlid (*Cyrtocara moorii*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(3), 334–341. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tbtkveterinary/issue/45718/577059>
- Ciji, A., Akhtar, M.S. (2021). Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2190–2247. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12565>
- Clauss, T.M., Dove, A.D.M., Arnold, J.E. (2008). Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 445–462. <https://doi.org/10.1016/J.CVEX.2008.03.007>
- Cooke, S.J., Suski, C.D., Ostrand, K.G., Tufts, B.L., Wahl, D.H. (2004). Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 239(1–4), 509–529. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.06.028>
- da Cunha, M.A., de Barros, F.M.C., de Oliveira Garcia, L., de Lima Veeck, A.P., Heinzmann, B. M., Loro, V.L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306(1–4), 403–406. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.06.014>
- Das, S., Kumar Singh, V., Kumar Dwivedy, A., Kumar Chaudhari, A., Upadhyay, N., Singh, A., Krishna Saha, A., Ray Chaudhury, S., Prakash, B., Dubey, N.K. (2020). Assessment of chemically characterised *Myristica fragrans* essential oil against fungi contaminating stored scented rice and its mode of action as novel aflatoxin inhibitor. *Natural Product Research*, 34(11), 1611–1615. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1519826>
- de Oliveira, C.P.B., Lemos, C.H. da P., Felix e Silva, A., de Souza, S.A., Albinati, A.C.L., Lima, A.O., Copatti, C.E. (2019). Use of eugenol for the anaesthesia and transportation of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture*, 513, 734409. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734409>
- Francis, S.K., James, B., Varughese, S., Nair, M.S. (2019). Phytochemical investigation on *Myristica fragrans* stem bark. *Natural Product Research*, 33(8), 1204–1208. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1457670>
- Friedrich, T., Reinartz, R., Gessner, J. (2019). Sturgeon re-introduction in the upper and middle Danube river basin. *Journal of Applied Ichthyology*, 35(5), 1059–1068. <https://doi.org/10.1111/JAI.13966>
- Gholipour Kanani, H., Mirzargar, S.S., Soltani, M., Ahmadi, M., Abrishamifar, A., Bahonar, A., Yousefi, P. (2011). Anesthetic effect of tricaine methanesulfonate, clove oil and electroanesthesia on lysozyme activity of *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(3), 393–402.
- Grover, J.K., Khandkar, S., Vats, V., Dhunnoo, Y., Das, D. (2002). Pharmacological studies on *Myristica fragrans* - Antidiarrheal, hypnotic, analgesic and hemodynamic (blood pressure) parameters. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 24(10), 675–680. <https://doi.org/10.1358/mf.2002.24.10.802317>
- Haihambo, W., Gabriel, N.N., Abasubong, K.P., Gabriel, N.G. (2023). Alternative Fish Anaesthetics: Perspective on their

- Application in African Aquaculture and Fisheries Research. In: Gabriel, N.N., Omoregie, E., Abasubong, K. P. (Eds.), *Emerging Sustainable Aquaculture Innovations in Africa* (pp. 543–552). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-19-7451-9_26
- Harmon, T. S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: A review of the basics. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 58–66. <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2008.01003.X>
- Hiranrat, A., Hiranrat, W. (2019). Myristigranol, a new diarylpropane derivative from the wood of *Myristica fragrans*. *Natural Product Research*, 33(20), 2958–2963. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1512988>
- Husen, M.A., Sharma, S. (2014). Efficacy of anesthetics for reducing stress in fish during aquaculture practices - A review. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 10(1), 104–123. <https://doi.org/10.3126/kuset.v10i1.63691>
- Jia, Y., Xie, T., Gao, Y., Qin, H., Guan, C. (2022). Anesthetics efficacy and physiological response of MS222 and clove oil in spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. *Aquaculture Reports*, 25, 101201. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2022.101201>
- Kasanen, J.P., Pasanen, A.L., Pasanen, P., Liesivuori, J., Kosma, V.M., Alarie, Y. (1998). Stereospecificity of the sensory irritation receptor for nonreactive chemicals illustrated by pinene enantiomers. *Archives of Toxicology*, 72(8), 514–523. <https://doi.org/10.1007/S002040050536>
- Kessler, A., Sahin-Nadeem, H., Lummis, S.C.R., Weigel, I., Pischetsrieder, M., Buettner, A., Villmann, C. (2014). GABAA receptor modulation by terpenoids from *Sideritis* extracts. *Molecular Nutrition Food Research*, 58(4), 851–862. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201300420>
- Khumpirapang, N., Chaichit, S., Jiranusornkul, S., Pikulkaew, S., Müllertz, A., Okonogi, S. (2018). In vivo anesthetic effect and mechanism of action of active compounds from *Alpinia galanga* oil on *Cyprinus carpio* (koi carp). *Aquaculture*, 496, 176–184. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.07.017>
- Leiter, E., Hitchcock, G., Godwin, S., Johnson, M., Sedgwick, W., McCall, S., Ceremuga, T.E. (2011). Evaluation of the anxiolytic properties of Tetrahydropalmatine, a *Corydalis yanhusuo* compound, in the male Sprague-Dawley rat. *AANA Journal*, 79(2), 109–115.
- Martins, T., Valentim, A., Pereira, N., Antunes, L.M. (2019). Anaesthetics and analgesics used in adult fish for research: A review. *Laboratory Animals*, 53(4), 325–341. <https://doi.org/10.1177/0023677218815199>
- Mercier, B., Prost, J., Prost, M. (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (alpha- and beta-pinenes): A review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4), 331–342. <https://doi.org/10.2478/V10001-009-0032-5>
- Minaz, M. (2024). A new herbal anesthetic agent for common carp (*Cyprinus carpio*) sedation and anesthesia: Nutmeg (*Myristica fragrans*) essential oil. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1477357. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2024.1477357>
- Minaz, M., Er, A., Ak, K., Nane, İ.D., İpek, Z.Z., Kurtoğlu, İ.Z., Kayış, Ş. (2022). Short-term exposure to bisphenol a (BPA) as a plastic precursor: Hematological and behavioral effects on *Oncorhynchus mykiss* and *Vimba vimba*. *Water, Air, Soil Pollution*, 233(122), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S11270-022-05585-X>
- Minaz, M., Er, A., Ak, K., Zeki, İ., Kayış, Ş. (2024) Determining the appropriate concentration of an anesthetic mixture in three different fish species with the PROMETHEE decision model. *Frontiers in Veterinary Science*, 11(1492769). <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1492769>
- Minaz, M., Kurtoğlu, İ. Z. (2024). Long-term exposure of endangered Danube sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) to bisphenol A (BPA): Growth, behavioral, histological, genotoxic, and hematological evaluation. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(21), 30836–30848. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33168-2>

- Mirghaed, A.T., Yasari, M., Mirzargar, S.S., Hoseini, S.M. (2018). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) anesthesia with myrcene: Efficacy and physiological responses in comparison with eugenol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(3), 919–926. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0481-5>
- Mohammadi, M., Khara, H. (2015). Effect of different anesthetic agents (clove oil, tricaine methanesulfonate, ketamine, tobacco) on hematological parameters and stress indicators of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792. *Comparative Clinical Pathology*, 24(5), 1039–1044. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2027-2>
- Nikolic, V., Nikolic, L., Dinic, A., Gajic, I., Urosevic, M., Stanojevic, L., Stanojevic, J., Danilovic, B. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) seed essential oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(2), 218–227. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1907230>
- Nilsson, G.E. (2007). Gill remodeling in fish – a new fashion or an ancient secret? *Journal of Experimental Biology*, 210(14), 2403–2409. <https://doi.org/10.1242/JEB.000281>
- Purkait, S., Bhattacharya, A., Bag, A., Chattopadhyay, R. R. (2018). Antibacterial and antioxidant potential of essential oils of five spices. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 5(2), 61–71. <https://doi.org/10.29252/jfqhc.5.2.6>
- Raknak, K., Rattanarom, P., Praphairaksit, N. (2022). Transformation of mugwort (*Artemisia vulgaris*) oil into nanoemulsion as an ethanol-free herbal anesthetic for surgery on koi carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture International*, 30(1), 409–418. <https://doi.org/10.1007/S10499-021-00808-0/TABLES/3>
- Raskovic, B., Poleksic, V., Zivic, I., Spasic, M. (2010). Histology of carp (*Cyprinus carpio*, l.) gills and pond water quality in semiintensive production. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 16(3), 253–262.
- Ross, L. G., & Ross, B. (2009). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. John Wiley & Sons.
- Sangalli, B.C., Chiang, W. (2000). Toxicology of nutmeg abuse. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 38(6), 671–678. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102020>
- Schreck, C.B., Tort, L. (2016). The concept of stress in fish. *Fish Physiology*, 35, 1–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>
- Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., Mukherjee, A. (2014). Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 71–77. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2014.02.036>
- Uçar, A., Atamanalp, M. (2010). The effects of natural (clove oil) and synthetical (2-phenoxyethanol) anesthesia substances on hematology parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta fario*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(14), 1925–1933. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103288802>
- Valente, J., Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Lopes, M.C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Cruz, M.T. (2013). Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 349–354. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.08.083>
- Yamasaki, Y., Kunoh, H., Yamamoto, H., Akimitsu, K. (2007). Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *Journal of General Plant Pathology*, 73(3), 168–179. <https://doi.org/10.1007/S10327-007-0013-0/FIGURES/9>
- Yigit, N.O., Kocaayan, H. (2023). Efficiency of thyme (*Origanum onites*) and coriander (*Coriandrum sativum*) essential oils on anesthesia and histopathology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 562, 738813. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738813>
- Yigit, N.O., Metin, S., Didinen, B.I., Didinen, H., Ozmen, O. (2022). Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and laurel (*Laurus nobilis*) essential oils as anesthetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

- Aquaculture*, 557, 738328.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738328>
- Yousefi, M., Hoseini, S.M., Aydın, B., Taheri Mirghaed, A., Kulikov, E.V., Drukovsky, S.G., Seleznev, S.B., Rudenko, P.A., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H. (2022). Anesthetic efficacy and hemato-biochemical effects of thymol on juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 547, 737540.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737540>