

تأثیر مواد مختلف ضد انعقاد بر برخی فاکتورهای خون شناسی فیل ماهیان جوان (*Huso huso* Linnaeus, 1758)

محمدرضا ایمان پور، رقیه صفری* و رضا اسعدی

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

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

چکیده

پارامترهای خونی و شکنندگی اسمزی در فیل ماهی تحت تأثیر سه ماده ضد انعقاد مختلف هپارین ۱۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر، سیترات ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و Na_2EDTA در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بررسی شد. بدین منظور خونگیری از فیل ماهیان پرورشی با میانگین وزنی 170 ± 10 گرم بدون استفاده از مواد بی‌هوشی از طریق قطع باله دم صورت گرفت. طبق نتایج بدست آمده بیشترین تعداد کل گلبولهای سفید در تیمار Na_2EDTA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. شمارش افتراقی گلبولهای سفید نیز اختلاف معنی‌داری در میزان مونوسیت، لنفوسیت و ائوزوفیل نشان داد ($P \leq 0/05$). میزان هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر) در خون در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P \geq 0/05$). تعداد گلبولهای قرمز (10^6 بر میکرولیتر) در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA به صورت معنی‌داری ($P \leq 0/05$) بالاتر از بقیه تیمارها بود. میزان MCH (پیکوگرم)، MCV (فمتولیتزر) و MCHC (%) در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA بالاتر از تیمارهای هپارین و سیترات بود. هم‌چنین مقاومت سلولها نسبت به همولیز در تیمارهای هپارینه بالاتر از سایر تیمارها بود. با توجه به نتایج به دست آمده هپارین به عنوان ماده ضد انعقاد خون مناسبتری نسبت به سیترات و Na_2EDTA در فیل ماهی دریای خزر می‌باشد که بهتر است در مطالعات خون شناسی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فیل ماهی، مواد ضد انعقاد، پارامترهای خونی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۲۷۰۴۰-۰۱۷۱، پست الکترونیکی: rsafari@gau.ac.ir

مقدمه

است. دمای محیط و شرایط استرس‌زا به خصوص استرس زمان خون‌گیری، سرعت لخته شدن خون را افزایش می‌دهند. بنابراین جهت کسب نتایج دقیق آنالیزهای خونی، استفاده از مواد ضد انعقاد ضروری است. نمک سدیم و پتاسیم اتیلن تترآستیک اسید (Ethylen Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)، نمک اسید سیتریک (Citric Acid)، هپارین (Heparin) و اکسالات (Oxalate) از مواد ضد انعقاد مهم در خون شناسی پزشکی می‌باشند. هنوز ماده ضد انعقاد کاملی که تأثیرات چندانی بر بافت خون

بافت خون ماهی اطلاعات کلیدی و دقیقی در زمینه فیزیولوژی و شرایط محیطی موجود، در اختیار محققین قرار می‌دهد. تعیین فاکتورهای خونی و توجه به تغییرات گلبولهای قرمز و سفید همواره به عنوان یک شاخص مهم در تشخیص بسیاری از بیماریهای حیوانات و انسان بوده است. تاکنون تحقیقات فراوانی در زمینه اثرات سن، جنس، تغذیه، گونه ماهی، حرارت، بیماریها و عوامل محیطی بر فاکتورهای خونی صورت گرفته است (۱، ۲ و ۳). اما نگهداری بافت خون به منظور انجام آزمایشات برای زمان طولانی به علت سرعت بالای لخته شدن خون مشکل

نداشته باشد، کشف نشده است و بحثهایی در مورد تاثیر نوع مواد ضد انعقاد بر آنالیز عناصر خونی وجود دارد (۲۴).

در ماهیان استخوانی آب شیرین و ماهیان مبتلا به انگل، هپارین فراوانترین ماده ضد انعقاد به کار برده شده می‌باشد (۱۸، ۲۵، ۳۲ و ۳۳). محققین اندکی از EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد استفاده کرده‌اند (۱۴، ۱۶ و ۲۷). در بعضی از مطالعات از مواد ضد انعقاد استفاده نشده است (۲۲). مطالعات ابتدایی با نمکهای هپارین، EDTA، اکسالات و سیترات نشان داده که هپارین در غلظت مناسب کمترین تاثیر را بر pH، هماتوکریت و غلظت کاتیونها دارد. EDTA، pH خون را اسیدی می‌کند در حالی که اکسالات و سیترات pH خون را اندکی قلیایی می‌نماید. خاصیت شلاتی خون میزان کلسیم و دیگر یونهای دو ظرفیتی را کاهش می‌دهد، در حالی که بر یونهای تک ظرفیتی تاثیری ندارد. به کارگیری غلظت و حجم مناسب مواد ضد انعقاد این تغییرات را کاهش می‌دهد. درخون‌شناسی انسانی، هپارین به جهت نوع رنگ آمیزی، برای تهیه گسترشهای خونی و به جهت لخته کردن لوکوسیتها برای شمارش WBC به کار برده نمی‌شود در حالی که EDTA برای ارزیابی شکنندگی اسمزی نامناسب است و مقدار زیاد آن موجب آسیب به سلولها می‌گردد (۳۰). EDTA میزان هماتوکریت در ماهی را افزایش داده و به جهت تاثیر نامطلوب بر لایه‌های سلولی موجب القا همولیز در بعضی گونه‌ها (۱۰) و موجب بد شکلی در اریتروسیتها و کاهش تنوع لوکوسیتها در ماهی می‌گردد (۱۹). از آنجا که بررسی فاکتورهای خون‌شناسی از ارکان اساسی بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی، بیماریها و ... آبیان می‌باشد و مطالعه‌ای نیز در زمینه تاثیر مواد ضد انعقاد در ماهیان خاویاری صورت نگرفته است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف یافتن بهترین و کم اثر ترین ماده ضد انعقاد بر فاکتورهای خونی فیل ماهی (*Huso huso*) به مقایسه متداولترین مواد مصرفی در آزمایشات پرداخته تا از نتایج حاصله بتوان در سایر

مطالعات آتی مبتنی بر خون‌شناسی این ماهیان استفاده کرد.

مواد و روشها

بچه ماهیان از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان شهید مرجانی تهیه و پس از ۸ هفته پرورش در شرایط یکسان در مرکز تحقیقات آبی پروری دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با تغذیه از غذای بیومار بر مبنای ۲ درصد وزن بدن به وزن $10 \pm 148/5$ گرم رسیدند. طی دوره پرورش اکسیژن و pH آب به طور هفتگی و دمای آب روزانه ثبت شد. نمونه گیری از فیل ماهیان پرورشی جهت آزمایش های خونی در انتهای دوره پرورش صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از خونگیری تغذیه ماهیان قطع شد و بدون استفاده از مواد بی هوشی از طریق قطع باله دم (۱۳) از آنها خونگیری بعمل آمد، زمان دستکاری ماهیان بیش از ۳ دقیقه طول نکشید. خون در داخل لوله های ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد. خون ۱۰ ماهی در لوله های حاوی مواد ضد انعقاد ۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر هپارین، ۰/۳ میلی گرم بر لیتر سیترات و غلظتهای ۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی گرم در لیتر Na_2EDTA (غلظت نهایی در خون) قرار داده شد. میزان هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین و با استفاده از محلول درابکین با فوتومتر آوارنس در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان هماتوکریت با روش لوله های میکروهیاتوکریت و نیز سانتریفوژ میکروهیاتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه و با خط کش مخصوص اندازه گیری شد. شمارش تعداد گلبول سفید با استفاده از محلول رقیق کننده نات-هریک (Natt-Herrick) و لام ثوبار توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت. شمارش گلبول قرمز توسط رقت سازی با محلول هایم و لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری انجام شد. شمارش افتراقی گلبول های سفید شامل هتروفیل (نوتروفیل)، لنفوسیت، ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل به

تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS توسط آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

نتایج

در طول دوره آزمایش کمترین دمای اندازه‌گیری شده در خرداد ماه (۲۴ درجه سانتیگراد) و بیشترین دمای اندازه‌گیری شده آب در تیر ماه (۲۶ درجه سانتیگراد) بدست آمد. همچنین pH آب $7/85 \pm 0/13$ اندازه‌گیری شد. بالاترین میزان اکسیژن محلول در ابتدای دوره، برابر ۵/۹ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان اکسیژن محلول در پایان دوره آزمایش، برابر ۴ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید میانگین درجه حرارت، pH و اکسیژن آب طی دوره‌های زمانی نمونه برداری در جدول ۱ خلاصه شده است.

طریق تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی با گیمسا و شمارش زیر میکروسکوپ انجام شد (۵). برای تعیین میزان پارامترهای MCV، MCH و MCHC از فرمولهای زیر استفاده شد:

$$MCV = \frac{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون} \times 10^6}{\text{حجم خون}} \times 100$$

$$MCH = \frac{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون} \times 10^6}{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون}} \times 100$$

$$MCHC = \frac{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون} \times 10^6}{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون}} \times 100$$

شکندگی اسمزی، درصد همولیز و اولین زمان همولیز در معرض محلولهای نمکی ۰/۲٪، ۰/۳٪، ۰/۴٪، ۰/۵٪، ۰/۶٪ تحت تاثیر مواد ضد انعقاد مختلف به دست آمد.

جدول ۱- میانگین درجه حرارت (سانتی گراد)، pH و اکسیژن آب طی دوره پرورش

زمان (هفته)	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
متغیر								
دما	۲۴	۲۴/۲	۲۴/۵	۲۴/۶	۲۴/۷	۲۵	۲۵/۵	۲۶
pH	۷/۹	۷/۸	۷/۷۴	۷/۹۹	۷/۸	۷/۷۶	۷/۹۸	۷/۹
اکسیژن	۵/۹	۵/۷	۵/۵	۵/۵	۵/۵	۴/۷	۵	۴/۸

جدول ۲ - پارامترهای خونی (گلبول سفید، ائوزینوفیل، بازوفیل، مونوسیت، هتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت) فیل ماهی تحت تاثیر هپارین (۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر)، سیترات (۰/۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر) و Na₂EDTA (غلظتهای ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر)

مواد ضد انعقاد	ائوزینوفیل (%)	بازوفیل (%)	مونوسیت (%)	هتروفیل (%)	لنفوسیت (%)	WBC (10 ⁶ /μL)
هپارین	۴±۰/۱ ^c	۱/۲۳±۰/۱	۸/۱±۰/۱۵۲۸ ^d	۱۹/۷±۰/۲۵	۶۷/۵±۰/۵ ^a	۳۴۶۱۰±۷۹/۳۷ ^b
سیترات	۳/۱±۰/۱ ^b	۱/۱۶±۰/۱۵	۶/۳۶±۰/۱۵۲۸ ^b	۲۰/۲۳±۰/۲	۷۰/۳±۱/۵ ^b	۳۱۲۹۰±۳۰/۴۹ ^a
Na ₂ EDTA (غلظت ۰/۱)	۳±۰/۱ ^b	۱/۳±۰/۰۰	۷/۲۳±۰/۵۲۸ ^c	۱۴/۷۶±۰/۴۲	۷۰/۳±۱/۵ ^b	۳۴۴۸۱/۳۳±۱۰۵/۰۹ ^b
Na ₂ EDTA (غلظت ۰/۵)	۱/۹۳±۰/۱۵ ^a	۱/۱۶±۰/۱۵۲۸	۷/۰۶±۰/۱۱۵ ^c	۱۷/۵۶±۰/۲	۷۳/۸۳±۰/۷۲ ^c	۳۶۳۱۶/۶۷±۱۶۰/۷۲ ^d
Na ₂ EDTA (غلظت ۱)	۱/۹۳±۰/۱۱ ^a	۱/۲±۰/۱	۶±۰/۰ ^a	۱۶±۰/۵	۷۴/۸۳±۰/۷۶ ^c	۳۵۶۵۱/۶۷±۱۳۰/۴۱ ^c

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار می باشد ($P \leq 0.05$).

جدول ۳- پارامترهای خونی (گلبولهای قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت) فیل ماهی تحت تاثیر هپارین (۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر)، سیترات

(۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و Na_2EDTA (غلظتهای ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر)

مواد ضد انعقاد	گلبولهای قرمز ($10^6/\mu\text{L}$)	هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	هماتوکریت (%)
هپارین	1.7 ± 0.1^a	8.65 ± 0.25^b	23.4 ± 0.96^b
سیترات	1.52 ± 0.1^a	8.11 ± 0.11^a	19.7 ± 0.25^a
Na_2EDTA (غلظت ۰/۱)	2.04 ± 0.13^b	10.68 ± 0.13^c	26.7 ± 0.64^c
Na_2EDTA (غلظت ۰/۵)	1.7 ± 0.1^a	10.53 ± 0.1^c	28.4 ± 0.46^d
Na_2EDTA (غلظت ۱)	1.57 ± 0.1^a	10.83 ± 0.15^c	27.23 ± 0.25^c

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار می باشد ($P \leq 0.05$).

میزان هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر) در خون در تیمار ۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA بالاتر از تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA بود، ولی این اختلاف معنی دار نبود ($P \geq 0.05$). تعداد گلبولهای قرمز (10^6 بر میکرولیتر) در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA به صورت معنی داری ($P \leq 0.05$) بالاتر از بقیه تیمارها بود. هم چنین میزان MCH، MCV و MCHC غلظت متوسط هموگلوبین در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA بالاتر از تیمارهای هپارین و سیترات بود (جدول ۳).

بحث

با توجه به تاثیر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بر فیزیولوژی خون آبزیان، سعی شد خصوصیات آب در زمان پرورش مطابق با استاندارد پرورش فیل ماهی باشد. نتایج به دست آمده از تاثیر مواد ضد انعقاد بر فاکتورهای خونی نشان داد که انتخاب نوع ماده ضد انعقاد، به طور معنی داری بر میزان گلبولهای قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در این گونه موثر است. Tavares-Dias و Sandrim (۱۹۹۸) نتایج مشابهی در بررسی تاثیر هپارین و EDTA بر فاکتورهای خونی *Colossoma macropomum* مشاهده نمودند (۲۸).

بر طبق نتایج بدست آمده از شمارش گلبولهای سفید در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی دار بین تیمارها مشاهده شد ($P \leq 0.05$) و بیشترین تعداد کل گلبولهای سفید در تیمار Na_2EDTA با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. شمارش افتراقی گلبولهای سفید نیز اختلاف معنی داری در میزان مونوسیت، لنفوسیت و ائوزوفیل نشان داد ($P \leq 0.05$). درصد هتروفیل و بازوفیل بین گروههای مختلف تیمار شده با مواد ضد انعقاد متفاوت اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P \geq 0.05$). اما میزان هتروفیل (20.23 ± 0.2) و بازوفیل (1.3 ± 0.0) به ترتیب در تیمارهای ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر سیترات و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA بالاتر از تیمارهای دیگر بود. درصد لنفوسیت در تیمار ۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA بالاتر از غلظتهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA ، هپارین و سیترات با غلظت ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول ۲).

درصد هماتوکریت بدست آمده در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA به طور معنی داری ($P \leq 0.05$) بالاتر از ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA ، هپارین و سیترات با غلظت ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول ۲).

۵ گونه ماهی از جمله ماهی کپور مطالعه نمودند به دست آمد که EDTA تمایل به افزایش هماتوکریت در ماهیان داشت و در بعضی گونه‌ها موجب افزایش همولیز شد، درحالی که هپارین تغییرات کمی در اندازه اریتروسیتها و میزان هماتوکریت ایجاد نمود (۱۱). مطالعه Hattingh و smit (۱۹۸۰) نشان داد که هپارین با دقت و ثبات بیشتری فاکتورهای خون شناسی را نشان می‌دهد در حالی که Clarke و همکاران (۱۹۷۹) گزارش کردند که کارایی هپارین در انعقاد خون باس دریایی دهان بزرگ *Micropterus salmonides* به اندازه EDTA نمی‌باشد (۶). Allen (۱۹۹۳) افزایش درصد هماتوکریت در نمونه های تحت تیمار هپارین *Oreochromis aureus* نسبت به نمونه های بدون تیمار آن را مشاهده کرد (۴).

نتایج حاصله از این مطالعه همچنین تاثیر انواع مواد ضد انعقاد بر میزان MCH، MCV و MCHC را نشان داد که البته با نتایج به دست آمده از مطالعه Tavares-Dias و Sandrim (۱۹۹۸) مغایرت داشت. در بین گروههای مواد ضد انعقاد به کار برده شده، تیمارهای Na₂EDTA میزان هماتوکریت، هموگلوبین، هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین بالاتری را نسبت به تیمارهای هپارین و سیترات نشان دادند. در بین گروههایی که تحت تیمارهای Na₂EDTA قرار داشتند، به ترتیب گروه با تیمار ۰/۰۱/۱، میزان هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین بالاتری را نشان دادند. نتایج مشابهی به وسیله Hattingh (۱۹۷۵) که تاثیر هپارین و EDTA را بر میزان هماتوکریت

جدول ۴- پارامترهای خونی (هموگلوبین متوسط گلبولی (%))، حجم متوسط گلبولی (پیکوگرم) و غلظت متوسط هموگلوبین (فمتولیت) فیل ماهی تحت تاثیر هپارین (۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر)، سیترات (۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و Na₂EDTA در غلظتهای ۰/۰۱/۰، ۰/۰۱/۰، ۰/۰۱/۰، ۰/۰۱/۰، ۰/۰۱/۰ (میلی لیتر)

مواد ضد انعقاد	هموگلوبین متوسط گلبولی (%)	حجم متوسط گلبولی (پیکوگرم)	غلظت متوسط هموگلوبین (فمتولیت)
هپارین	۲۷±۰/۲۶ ^a	۵۰/۲±۲/۵ ^a	۱۳۸/۸۶±۰/۲۶ ^a
سیترات	۲۴±۰/۳۰۵ ^a	۵۰/۰۳±۳/۵ ^a	۱۲۹/۸۶±۴/۲ ^a
Na ₂ EDTA (غلظت ۰/۱)	۳۰±۰/۸ ^{ab}	۵۲/۳۶±۳/۸ ^a	۱۳۹/۱±۱۱/۳۷ ^a
Na ₂ EDTA (غلظت ۰/۵)	۳۷±۰/۳ ^{bc}	۶۰/۹۳±۵/۳ ^b	۱۶۴/۲۶±۰/۳ ^b
Na ₂ EDTA (غلظت ۱)	۴۰±۰/۰ ^c	۶۹/۲±۳/۴ ^c	۱۷۳/۲±۱۰/۴۶ ^b

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار می باشد (P≤۰/۰۵).

هپارین همبستگی وجود دارد. فعالیت ضد انعقادی معنی دار (۱۴۰ واحد بین المللی) می‌تواند در مولکول هپارین با حداقل وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون مشاهده شود. هپارین با وزن مولکولی زیر ۵ کیلو دالتون فعالیت ضد انعقادی قابل اغماضی (۵۰ واحد بین المللی) را نشان می‌دهد (۲۰). هپارین همچنین به عنوان بازدارنده بعضی آنزیمها از جمله

Witeska و Walencik (۲۰۰۷) همچنین، نتایج مشابهی را در پارامترهای خون شناسی تحت تاثیر تیمارهای مختلف در ماهی کپور مشاهده کردند و اعلام نمودند، میزان تغییرات در تیمارهای Na₂EDTA بالاتر از سیترات و هپارین می‌باشد (۳۰). اما مطالعات در پستانداران نشان می‌دهد که بین فعالیت ضد انعقادی و وزن مولکولی

Na₂EDTA مشاهده شد. حتی کمترین غلظت Na₂EDTA (۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شکنندگی اسمزی اریتروسیته‌های فیل ماهی را به شدت افزایش داد. سلولها در تیمار هپارینه شده خون به محلول هیپواسمتیک، مقاومت نشان دادند، در حالی که تیمارهای سیترات و Na₂EDTA حساسیت بالایی را به همولیز نشان دادند. شدت تغییر رنگ در تیمارهای Na₂EDTA در مقایسه با سیترات قویتر بود. Walencik و Witeska (۲۰۰۷) نیز در بررسی همولیز گلبولهای خونی کپور ماهیان کاهش درصد همولیز را با افزایش غلظت محلول نمکی مشاهده نمودند که این کاهش در تیمارهای هپارینه و سیترات بسیار بیشتر از تیمارهای EDTA بود (۳۰). احتمالاً EDTA با شلات کردن یونهای Ca²⁺ باعث افزایش حساسیت سلولها به لیز شدن و کاهش انعطاف پذیری لایه‌های سلولی می‌گردد (۱۲).

Na₂EDTA برای ارزیابی پارامترهای سلولهای قرمز خون فیل ماهی به دلیل آنیزوسیتوزیس و همولیز و همچنین برای ارزیابی سلولهای سفید خون توصیه نمی‌گردد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هپارین (۱۰ واحد بین‌المللی) نسبت به سایر مواد ضد انعقاد به کار رفته جهت جلوگیری از انعقاد خون فیل ماهی مناسب تر است.

میوزین ATPase (۷ و ۲۹)، هیالورونیداز، الستاز و رنین (۲۳) عمل می‌کند. به علاوه مطالعات اخیر نشان داده، هپارین خود را به فاکتورهای رشد همچون فاکتور رشد فیبروبلاست (۹ و ۱۵) و فاکتور رشد اندوتلیال سلول (۱۷)، به چندین پروتئین اتصالی از جمله لامینین (۲۱)، فیبرونکتین (۳۴) و ویترونکتین (۱۱) متصل می‌نماید. طبق گزارش Wan و همکاران (۱۹۹۲)، در خون انسان، هپارین موجب از بین رفتن سلولها می‌گردد (۳۱). Engstad و همکاران (۱۹۹۷) تاثیر هیرویدین، هپارین و سیترات و EDTA بر مونوسیت و نوتروفیل را مطالعه و دریافتند که EDTA و سیترات ترشح پروتئین را کاهش می‌دهند (۸).

نتایج این بررسی تاثیر معنی‌دار مواد ضد انعقاد بر تعداد گلبولهای سفید و تعداد انواع مختلف آنها به جز بازوفیلها و هتروفیلها را نشان داد. پارامترهای اندازه‌گیری شده با استفاده از تیمار Na₂EDTA در همه غلظتها (۰/۱، ۰/۱۵، ۰) به جز در مورد مونوسیتها و ائوزوفیلها بالاتر از تیمارهای هپارین و سیترات بود.

در بررسی تاثیر همولیز در غلظتهای نمکی متفاوت و تحت تاثیر مواد ضد انعقاد مختلف، اولین نشانه‌های همولیز (تغییر رنگ پلاسما) بعد از ۲-۳ ساعت ابتدا در تیمارهای

منابع

- جوهری، س. ع.، و کلباسی، م. ر.، ۱۳۸۵. بررسی برخی تغییرات سلولهای خونی در ماهیان تریپلوبیید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*)، مجله علمی زیست‌شناسی ایران، جلد ۱۹، شماره ۴. صفحات ۴۹۲-۴۹۵.
- شاهسونی، د.، ثوقی، غ.، و خضرای‌نیا، پ.، ۱۳۷۸. تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی اوزون برون (*Acipenser jundia (Rhamdia quelen)*). *Fish Physiology and Biochemistry*., Vol. 30, PP: 21-25
- Clarke, S., Whitmore, D. H., and McMahon, R. F., 1979. Considerations of blood parameters of largemouth bass, *Micropterus salmonides*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Vol. 14. PP: 47-158.
- Cruz, W. O., and Dietrich, C. P., 1967. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. *Proc. Soc. Exp. Biol.*
- Allen, P., 1993. Determination of hematological parameters of *Oreochromis aureus* Steindachner and the effects of heparin on these. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 106A, PP: 355-358
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D. R., Jurinitz, D. F., and Wassermann, G. F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for

- Med., Vol.126 PP: 420-426.
8. Engetad, C. S., Gutteberg, T. J., and Osterud, B., 1997. Modulation of blood cell activity by four commonly used anticoagulants. *Thromb. Haemost.* Vol. 77. PP: 690-695.
 9. Gambarini, A. G., Miyamoto, C. A., Lima, G. A., Nader, H. B., and Dietrich, C. P., 1993. Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Mol. Cell. Biochem.*, Vol. 124. PP: 21-129.
 10. Hattingh, J., 1975. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. *Pflugers Arch.* Vol. 355. PP: 347-352.
 11. Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D., Ohgren, Y., and Ruoslahti, E., 1983. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 80. PP: 4003-4007.
 12. Kafka, M., Yermiahu, T., 1998. The effect of EDTA as anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes. *Clin. Lab. Haematol.*, Vol. 20. PP: 213-216
 13. Korcock, D. E., Houston, A. H., and Gray, J. D., 1988. Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* Vol. 33. PP: 319-330.
 14. Lea Master, B. R., Brock, J. A., Fujioka, R. S., and Nakamura, R. M., 1990. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and sea water. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 97A. PP: 525-529
 15. Lobb, R. R., and Fett, J. W., 1984. Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry.*, Vol. 23. PP: 6295-6299
 16. Lochmiller, R. L., Weichman, J. D., and Zale, A. V., 1989. Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of strip bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 93 A. PP: 535-541.
 17. Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R., and Schreiber, A., 1984. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science.*, Vol. 225. PP: 932-935
 18. Martinez, F. J., Garcia-Riera, M. P., Canteras, M., De Cossta, J., and Zamora, S., 1994. Blood parameters in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*): simultaneous influence of various factors. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 107A, PP: 95-100
 19. Mainwaring, G., and Rowley, A. F., 1985. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 80 A, PP: 85-91.
 20. Nader, H. B., and Dietrich, C. P., 1994. Anticoagulant, antirombotic and anti hemostatic activities of heparin: clinical applications. *Cinnia Culture.*, Vol. 46. PP: 297-302
 21. Sakashita, S., Engvall, E., and Rouslahti, E., 1980. Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. *FEBS Lett.*, Vol. 116. PP: 243-246
 22. Satake, T., Nutti-Sobrinho, A., Lopes, O.V. P., Lopes, R. A., and Santos, H. S. L., 1986. Haematological study of Brazilian fish. III. Blood parameters in armored catfish *Hypostomus paulinus* Ihering 1905 (Pisces, Loricariidae) *Ars Veterinaria.*, Vol. 2. PP: 179-183.
 23. Sealey, V. E., Gerten, J. M., and Ladinghan, J. G., 1967. Inhibition of renin by heparin. *J. Clin. Endocrinol.*, Vol. 27. PP: 699-703
 24. Stoskopf, M. K., 1993. Fish medicine. Saunders Compony, P: 882
 25. Shiau, S. Y., and Lung, C. Q., 1993. No dietary vitamin B₁₂ required for juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol, 105A. PP: 147-150.
 26. Smit, G. L., and Hattingh, J., 1980. Haematological assessment of generally used freshwater fish blood anticoagulants. *J. Fish Biol.*, Vol. 17. PP: 337-341.
 27. Sun, L. T., Chen, G. R., and Chang, C. F., 1994. Characteristics of blood parameters and gill Na- K-ATP ase in chilled comatose tilapia cultured in various salinities. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 107 A. PP: 641-646.
 28. Tavares-Dias, M., and Sandrim, E., 1998. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Acta Scientiarum.* Vol. 20(2). PP: 151-155.
 29. Tersariol, I. L. S., Dietrich, C. P., and Nader, H. B., 1992. Interaction of heparin with myosin ATPase: possible involvement with the hemorrhagic activity and a correlation with antithrombin III high affinity-heparin

- molecules. *Thromb. Res.*, Vol.68. PP: 247-258.
30. Walencik, J., and Witeska, M., 2007. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp.Biochem.Physiol.*, Vol.101A(2). PP: 375-381.
31. Wan, T. S., Tam, A. Y., and Yeung, C. Y., 1992. Effects of anticoagulants and incubation time on neutrophil nitroblue tetrazolium score. *Biol. Signals*. Vol. 1. PP: 167-172.
32. Wepner, V., Van-Vuren, J. H. J., and Du-Preez, H. H., 1992. The effect of hexavalent chromium at different PH values on hematology of *Tilapia sparramanii*(Cichlidae). *Comp.Biochem.Physiol.*, Vol.101C(2). PP: 375-381.
33. Wilhem-Filho, D., Eble, G. J., Kassner, G., Caprario, F. X., Dafre, A. L., and Ohira, M., 1992. Comparative hematology in marine fish. *Comp.Biochem.Physiol.*, Vol. 102A(2). PP: 311-321
34. Yamada, K. M., 1983. Cell surface interaction with extracellular materials. *Ann. Rev. Biochem.*, Vol.52. PP:761-779.

The effects of anticoagulants on hematological indices of (*Huso huso* Linnaeus 1758)

Imanpour M.R., Safari R. and Asadi R.

Faculty of Fisheries, University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

Hematological parameters and osmotic fragility in *Huso huso* blood collected on three anticoagulants, heparin (10 IU/mL), Na₂EDTA (0.1, 0.5, and 1 mg/mL), and sodium citrate (0.3 mg/mL), were compared. For this purpose, blood sampling were done by cutting tail fin of fish, without using anesthesia. The highest numbers of WBC were found in Na₂EDTA (1 mg/ml). WBC differential count revealed significant difference in monocytes, lymphocytes and eosinophiles ($p \leq 0.05$). The differences in hemoglobin blood levels weren't significant in treatments of Na₂EDTA ($p \geq 0.05$). RBC in Na₂EDTA (0.1, 0.5 mg/mL) was significantly higher than others ($p \leq 0.05$). MCH (pg), MCV (fl) and MCHC (%) in all concentration of Na₂EDTA were higher than heparin and citrate. Resistance to hemolysis in heparin- treated was higher than the other. The obtained data suggested heparin as the most appropriate anticoagulant for this species that should be considered in hematological studies.

Keywords: *Huso huso*, anticoagulant, blood parameters