Archive of SID

تأثیر مواد ضد انعقاد بر برخی از شاخص‌های خون‌شناسی و مورفولوژی سلول‌های خونی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

زارعی، ث.[1*]؛ درافشان، س.[1]؛ پیکان حیرتی، ف.[1]

[1] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
Email: sarallah.zarei@na.iut.ac.ir

پارامترهای خونی در ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) تحت تأثیر دو ماده ضد انعقاد هپارین (۱۰ *IU/ml*)، *Na_2EDTA* (۱ *mg/ml*) بررسی شد. برای انجام این مطالعه، از ماهیان استرلیاد با میانگین وزن ۱۰±۵۰۰ گرم بدون استفاده از مواد بیهوشی از محل باله دمی خون‌گیری صورت گرفت. مطابق نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین تعداد کل گلبول‌های سفید در تیمار هپارین به دست آمد ولی تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p>0/05$). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نیز اختلاف معنی‌داری در میزان منوسیت و لنفوسیت بین تیمار هپارین و *Na_2EDTA* نشان داد ($p<0/05$). میزان هموگلوبین در خون در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$). تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار هپارین به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار *Na_2EDTA* بود. میزان *MCH*، *MCV* در تیمار *Na_2EDTA* و *MCHC* در تیمار هپارین بالاتر بود. همچنین در تصاویر تهیه‌شده از گسترش خونی، تیمار *Na_2EDTA* موجب بروز بدشکلی، افزایش حجم و اندازه در گلبول‌های قرمز شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده هپارین به‌عنوان ماده ضد انعقاد خون مناسب‌تری نسبت به *Na_2EDTA* در ماهی استرلیاد دریای خزر می‌باشد که بهتر است در مطالعات خون‌شناسی موردتوجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: استرلیاد، ضد انعقاد، پارامترهای خونی، گلبول سفید، گلبول قرمز.

مقدمه:

بافت خون ماهی اطلاعات کلیدی و دقیقی درزمینه فیزیولوژی و شـرایط محیطی موجود، در اختیار محققین قرار می‌دهد. تعیین فاکتورهای خونی و توجه به تغییرات گلبول‌های قرمز و سفید همواره به‌عنوان یک شاخص مهم در تشخیص بسیاری از بیماری‌های حیوانات و انسـان بوده اسـت. تاکنون تحقیقات فراوانی درزمینه اثرات سـن، جنس، تغذیه، گونه ماهی، حرارت، بیماری‌ها و عوامل محیطی بر فاکتورهای خونی صـورت گرفته اسـت *[2]*، *[3]* و *[4]*. دمای محیط و شـرایط اسـترس‌زا به‌خصـوص اسـترس زمان خون‌گیری، سـرعت لخته شـدن خون را افزایش می‌دهند، اما نگهداری بافت خون به‌منظور انجام آزمایش‌های برای زمان طولانی به علت سرعت‌بالای لخته شدن خون مشکل است. بنابراین جهت کسب نتایج دقیق آنالیزهای خونی، اسـتفاده از مواد ضد انعقاد ضروری است. نمک سدیم و پتاسیم اتیلن ترا استیک اسید (*EDTA*)، نمک اسیدسیتریک، هپارین و اکسالات از مواد ضد انعقاد مهم در خون‌شناسی پزشکی می‌باشند. هنوز ماده ضد انعقاد کاملی که تأثیرات چندانی بر بافت خون نداشـته باشـد، کشـف نشـده اسـت و بحث‌هایی در مورد تأثیر نوع مواد ضد انعقاد بر آنالیز عناصر خونی وجود دارد *[12]*. در ماهیان اسـتخوانی آب شـیرین و ماهیان مبتلابه انگل، هپارین فراوان‌ترین ماده ضـد انعقاد به‌کاربرده شـده می‌باشـد *[9]*، *[11]*، *[14]* و *[15]*. محققین اندکی از *EDTA* به‌عنوان ماده ضـد انعقاد استفاده کرده‌اند *[6]*. در بعضی از مطالعات از مواد ضـد انعقاد استفاده‌نشده است *[10]*. مطالعات ابتدایی بانمک‌های هپارین، *EDTA*، اکسالات و سیترات نشان داده که

www.SID.ir

Archive of SID

هپارین در غلظت مناسب کمترین تأثیر را بر *pH*، هماتوکریت و غلظت کاتیون‌ها دارد. این در حالی است که *EDTA* موجب اسیدی شدن *pH* خون می‌شود؛ درحالی‌که اکسالات و سیترات *pH* خون را اندکی قلیایی می‌نماید. خاصیت شلاتی خون میزان کلسیم و دیگر یون‌های دو ظرفیتی را کاهش می‌دهد، درحالی‌که بر یون‌های تک‌ظرفیتی تأثیری ندارد. به‌کارگیری غلظت و حجم مناسب مواد ضد انعقاد این تغییرات را کاهش می‌دهد. در خون‌شناسی انسانی، هپارین به جهت نوع رنگ‌آمیزی، برای تهیه گسترش‌های خونی و به جهت لخته کردن لوکوسیت‌ها برای شمارش *WBC* به‌کاربرده نمی‌شود درحالی‌که *EDTA* برای ارزیابی شکنندگی اسمزی نامناسب است و مقدار زیاد آن موجب آسیب به سلول‌ها می‌گردد *[13]*. *EDTA* میزان هماتوکریت در ماهی را افزایش داده و به جهت تأثیر نامطلوب بر لایه‌های سلولی موجب القا همولیز در بعضی گونه‌ها *[5]* و ب شکلی در اریتروسیت‌ها و کاهش تنوع لوکوسیت‌ها در ماهی می‌گردد *[8]*.

ازآنجاکه بررسی فاکتورهای خو شناسی از ارکان اساسی بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی، بیماری‌ها در آبزیان می‌باشد و مطالعات نیز درزمینهٔ تأثیر مواد ضد انعقاد در ماهیان خاویاری صورت نگرفته است، بنابراین مطالعه حاضر باهدف یافتن بهترین و کم اثرترین ماده ضد انعقاد بر فاکتورهای خونی استرلیاد به مقایسه متداول‌ترین مواد مصرفی در آزمایش‌های پرداخته تا از نتایج حاصله بتوان در سایر مطالعات آینده مبتنی بر خون‌شناسی این ماهیان استفاده کرد.

مواد و روش‌ها:

ماهیان استرلیاد از مرکز تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه شدند. پس از دو هفته سازگاری با شرایط آزمایشی، با غذای پلت به میزان ۲ درصد وزن بدن و دو بار در روز غذادهی شدند. ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری تغذیه ماهیان قطع شد و بدون استفاده از مواد بی‌هوشی از محل باله دمی با استفاده از سرنگ خون‌گیری انجام شد. زمان دست‌کاری ماهیان بیش از ۳ دقیقه طول نکشید. نمونه‌های خون تهیه‌شده در لوله‌های حاوی هپارین و *Na_2EDTA* قرار داده شد. میزان هماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و نیز سانتریفوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه و با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد. شمارش تعداد گلبول سفید با استفاده از محلول رقیق‌کننده نات-هریک (*Natt- Herrick*) و لام نئوبار توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت. شمارش گلبول قرمز توسط رقت سازی با محلول هایم و لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری انجام شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید شامل هتروفیل (نوتروفیل)، لنفوسیت، ائوزینوفیل، منوسیت و بازوفیل به روش تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی با گیمسا و شمارش زیر میکروسکوپ انجام شد. برای بررسی وجود بدشکلی در سلول‌های خونی، نمونه‌های لام گسترش خونی تهیه‌شده با استفاده از میکروسکوپ مجهز به دوربین عکاسی با دقت X۴۰ عکس‌برداری شدند. برای تعیین میزان پارامترهای *MCV*، *MCH* و *MCHC* از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون}} \qquad MCHC = \frac{\text{هموگلوبین} \times ۱۰}{\text{هماتوکریت}} \qquad MCH = \frac{\text{هموگلوبین} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون}}$$

تجزیه‌وتحلیل داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار *SPSS 22*، برای مقایسه گروه‌های از آزمون *t*، *ANOVA* یک‌طرفه و برای گروه‌بندی تیمارها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث:

مطابق نتایج ارائه‌شده در جدول ، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید اختلاف معنی‌داری در میزان منوسیت و لنفوسیت بین تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$) اما در بررسی بین تیمارها با گروه شاهد باید عنوان کرد که در میزان لنفوسیت و منوسیت، تیمار هپارین با گروه شاهد اختلافی نشان نداد ($p>۰/۰۵$) ولی تیمار *Na_2EDTA* اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$)؛ اما در

www.SID.ir

Archive of SID

میزان نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$) همچنین اختلاف تیمارها با گروه شاهد نیز معنی‌دار نبودند ($p>0/05$).

جدول ۱- پارامترهای خونی (ائوزینوفیل، بازوفیل، منوسیت، هتروفیل، لنفوسیت ومونوسیت (*Mean±SE*)) استرلیاد تحت تأثیر هپارین (۱۰*IU/ml*) و *Na2EDTA* (۱*mg/ml*).

مواد ضد انعقاد	لنفوسیت (٪)	منوسیت (٪)	نوتروفیل (٪)	بازوفیل (٪)	ائوزینوفیل (٪)
هپارین	۸۷/۲۵±۱/۷۲^a	۶/۲۵±۰/۷۹^a	۴/۵۰±۰/۹۰	۱/۲۵±۰/۵۲	۰/۷۵±۰/۳۶
Na2EDTA	۹۳/۲۵±۱/۵۵^b	۳/۵۰±۰/۵۰^b	۲/۰۰±۰/۶۵	۱/۰۰±۰/۳۷	۰/۲۵±۰/۲۵
کنترل	۸۷/۵۰±۰/۹۵^a	۶/۵۰±۰/۵۰^a	۴/۵۰±۰/۵۰	۰/۵۰±۰/۵۰	۱/۰۰±۰/۵۷

در مورد شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، تعداد سلول‌های منوسیت و لنفوسیت در بین تیمارهای دارای هپارین و *Na2EDTA* تفاوت‌های معنی‌داری را نشان دادند ($p<0/05$) و در بررسی هر یک از تیمارها با نمونه‌های شاهد دیده شد که در مورد میزان لنفوسیت و منوسیت، تیمار هپارین با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است ($p>0/05$) اما تیمار *Na2EDTA* تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان داد ($p<0/05$). همچنین در بررسی میزان نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p>0/05$) همچنین اختلاف تیمارها با گروه شاهد نیز معنی‌دار نبودند ($p>0/05$). در مطالعه *Walencik* و *Witeska* (۲۰۰۷) میزان لنفوسیت در تیمار *Na2EDTA* نسبت به تیمار هپارین و شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داده ($p<0/05$) و بیشتر می‌باشد، همچنین میزان منوسیت، ائوزینوفیل و نوتروفیل در بین تیمارها و نیز در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$).

بر طبق نتایج جدول ، در تعداد گلبول‌های سفید در دو تیمار هپارین و *Na2EDTA*، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p>0/05$). درصد هماتوکریت به‌دست‌آمده در تیمار *Na2EDTA* به‌طور معنی‌داری بالاتر از هپارین می‌باشد ($p<0/05$). همچنین تعداد گلبول‌های قرمز در دو تیمار هپارین و *Na2EDTA*، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان دادند ($p<0/05$). در میزان هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین بین دو تیمار هپارین و *Na2EDTA* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

جدول ۲- پارامترهای خونی:گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین (*Mean±SD*)) استرلیاد تحت تأثیر (۱۰*IU/ml*) و *Na2EDTA* (۱*mg/ml*).

مواد ضد انعقاد	هموگلوبین (*g/dl*)	هماتوکریت (٪)*	گلبول‌های قرمز (*/µl*)*	گلبول‌های سفید (*/µl*)	غلظت متوسط هموگلوبین (فمتولیتر)	حجم متوسط گلبولی (پیکوگرم)	هموگلوبین متوسط گلبولی (*g/dl*)
هپارین	۱۲/۹۲±۱/۸۹	۲۳/۶۲±۰/۸۹	۱۲۰۵۰۰۰±۱۸۶۲۷۰	۶۳۰۸/۶±۹۱۱/۹۲	۶۴/۸۱±۱۴/۷	۱۰۸/۵۹±۱۸/۴۱	۱۷/۱۴±۳/۳۹
Na2EDTA	۱۲/۲۰±۲/۱۰	۲۷/۰۵±۰/۴۶	۸۴۵۰۰۰±۲۲۳۵۳۲	۵۴۱۰/۲±۱۰۰۳/۲۸	۱۱۱/۹۷±۲۵/۲۲	۱۴۹/۱۱±۳۰/۱۸	۱۳/۴۳±۱/۶۷

* تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

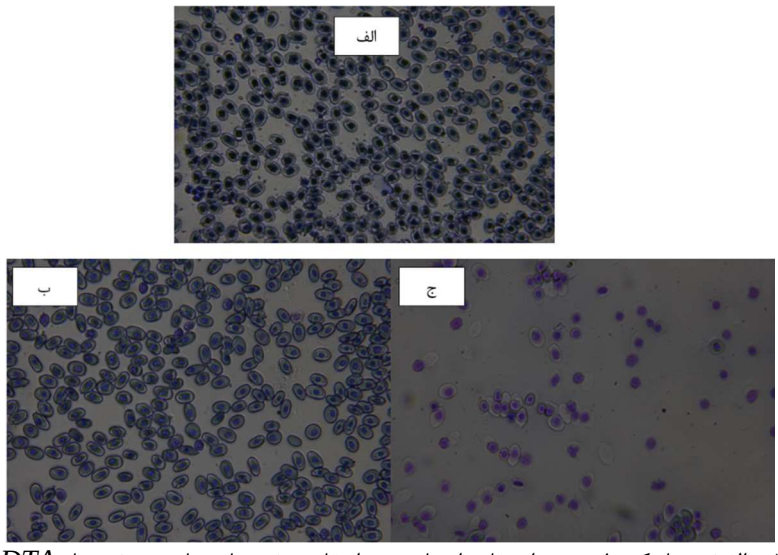
با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر مواد ضد انعقاد بر فاکتورهای خونی در تاس ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) می‌توان بیان کرد که شاخص‌های خونی ازجمله میزان گلبول‌های قرمز و هماتوکریت، به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) تحت تأثیر نوع ماده ضد انعقاد مصرفی قرار دارد. ایمان پور و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی تأثیر مواد مختلف ضد انعقاد بر تعدادی از

www.SID.ir

Archive of SID

شاخص‌های خونی در گونه فیل‌ماهی (*Huso huso Linnaeus, 1758*) نیز به نتایج مشابهی رسیدند اما در مطالعه آن‌ها نوع ماده ضد انعقاد بر میزان هموگلوبین نیز اثر معنی‌داری را نشان داده بود ولی در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری دیده نشده است ($p>0/05$). باید در نظر داشت که به دلیل کمتر بودن حجم متوسط گلبولی در تیمار هپارین باعث شده است که علی‌رغم بالاتر بودن تعداد گلبول‌های قرمز ولی هماتوکریت تیمار هپارین کمتر از تیمار Na_2EDTA باشد. در این مطالعه فاکتورهای غلظت متوسط هموگلوبین و حجم متوسط گلبولی در تیمار $EDTA$ نسبت به تیمار هپارین مقادیر بیشتری را نشان داد و تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار بود ($p<0/05$)؛ درحالی‌که فاکتور هموگلوبین متوسط گلبولی در تیمار هپارین بیشتر بود هرچند که در هیچ‌یک از تیمارها تفاوت معنی‌دار نبود ($p>0/05$). با مقایسه نتایج مطالعه ایمان پور و همکاران (۱۳۹۲)، دیده می‌شود که مواد ضد انعقاد مصرفی در هر دو گونه ماهیان خاویاری استرلیاد و فیل‌ماهی دارای اثرات مشابهی می‌باشد. در مطالعه *Walencik* و *Witeska* (۲۰۰۷) گزارش داده‌اند که در نمونه‌های خون مربوط به گونه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در تیمارهای Na_2EDTA نسبت به تیمارهای هپارین دارای تغییرات بیشتری هستند. همچنین در مطالعه حاضر میزان تخریب گلبول‌های قرمز در نمونه‌های تیمار Na_2EDTA بسیار بیشتر از نمونه‌های تیمار هپارین هستند و تفاوت معنی‌داری در این مقادیر دیده می‌شود ($p<0/05$)؛ اما میزان تخریب گلبول‌های سفید در نمونه‌های تیمار Na_2EDTA بیشتر از نمونه‌های تیمار هپارین هستند و تفاوت معنی‌داری در این مقادیر دیده نمی‌شود ($p>0/05$). با توجه به شکل ، مشخص است Na_2EDTA (تصویر ج) موجب بدشکلی و بزرگ شدن اریتروسیت‌ها نسبت به گروه شاهد (تصویر الف) شده است درحالی‌که هپارین (تصویر ب) روی شکل و اندازه گلبول‌ها تأثیری نداشته است.

با بررسی تصاویر تهیه‌شده از تیمارهای مختلف دیده شد که تیمارهای مربوط به Na_2EDTA به‌طور واضحی دارای بدشکلی و افزایش اندازه نسبت به گروه شاهد هستند ولی تیمارهای دارای هپارین فاقد این ویژگی‌های نامطلوب می‌باشند و نسبت به گروه شاهد تفاوت را نشان نمی‌دهند که این نتایج مشابه مطالعه *Maqbool* و همکاران (۲۰۱۴) می‌باشد که در مورد اثرات مواد ضد انعقاد بر روی خون‌شناسی و مورفولوژی گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می‌باشد.



شکل ۱- الف) تیمار کنترل بدون استفاده از ماده ضد انعقاد، ب) تیمار هپارین، ج) تیمار Na_2EDTA

نتیجه‌گیری کلی:

www.SID.ir

Archive of SID

با بررسی نتایج به‌دست‌آمده حاصل از مقایسه تیمارهای هپارین و Na_2EDTA می‌توان بیان کرد که به دلیل اینکه ماده ضد انعقاد Na_2EDTA باعث تخریب گلبول‌های سفید و قرمز، بدشکلی گلبول‌های قرمز، افزایش اندازه گلبول‌های قرمز، تغییر در مقادیر فاکتورهای خونی و همچنین شلات کردن یون‌های Ca^{2+} باعث افزایش حساسیت سلول‌ها به لیز شدن و کاهش انعطاف‌پذیری لایه‌های سلولی می‌شود، بنابراین استفاده از ماده Na_2EDTA در مطالعات خون‌شناسی گونه استرلیاد توصیه نمی‌گردد ولی از سوی دیگر ماده ضد انعقاد هپارین به دلیل نداشتن معایب عنوان‌شده برای Na_2EDTA می‌تواند با اطمینان رد مطالعات خون‌شناسی در گونه استرلیاد برای جلوگیری از انعقاد خون مورداستفاده قرار گیرد.

منابع:

۱. ایمان پور، م. ر.، صفری، ر.، اسعدی، ر. ۱۳۹۲. تأثیر مواد مختلف ضد انعقاد بر برخی فاکتورهای خون‌شناسی فیل‌ماهیان جوان (*Huso huso Linnaeus, 1758*). مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۶(۴): ۴۱۳-۴۰۶.

۲. جوهری ،س .ع.، و کلباسی، م .ر.، ۱۳۸۵ . بررسی برخی تغییرات سلول‌های خونی در ماهیان تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhyncus mykis*). مجله علمی زیست‌شناسی ایران، ۱۹(۴): ۴۹۵-۴۹۲.

۳. شاهسونی، د.، ثوقی، غ.، و خضرایی نیا، پ.، ۱۳۷۸ . تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در سواحل جنوب شرقی دریای خزر. مجله پژوهش سازندگی.۳ (۴۴): ۱۲۶-۱۳۰.

۴. کردجزی، م.، و ایمان پور، م .ر.، ۱۳۸۹ . ارتباط میان برخی پارامترهای بیوشیمیایی آب و سرم خون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). ۲۳ (۴): ۶۰۴-۶۱۵.

5. *Hattingh, J., 1975. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. Pflugers Arch.. 355: 347–352.*

6. *Lea Master, B. R., Brock, J. A., Fujioka, R. S., & Nakamura, R. M. 1990. Hematologic and blood chemistry values for Sarotherodon melanotheron and a red hybrid tilapia in freshwater and sea water. Comparative Biochemistry and Physiology. 97: 525-529.*

7. *Maqbool, A., Ahmed, I., & Sheikh, Z. A. 2014. Effects of two commonly used anticoagulants on haematology and erythrocyte morphology of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). International journal of fisheries and aquatic studies. 2(1): 239:243.*

8. *Mainwaring, G., and Rowley, A. F., 1985. The effect of anticoagulants on Blennius pholis L. leucocytes. Comparative Biochemistry and Physiology. 80: 85–91.*

9. *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. Comparative Biochemistry and Physiology. 107: 95-100.*

10. *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. 2: 179- 183.*

11. *Shiau, S. Y., and Lung, C. Q., 1993. No dietary vitamin B12 required for juvenile tilapia Oreochromis niloticus x O. aureus. Comp. Biochem. Physiol. 105:147-150.*

12. *Stoskopf, M. K., 1993. Fish medicine. Saunders Compony, P: 882.*

13. *Walencik, J., & Witeska, M. (2007). The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (Cyprinus carpio L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146(3), 331-335.*

14. *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). Comparative Biochemistry and Physiology. 101(2): 375- 381.*

15. *Wilhem-Filho, D., Eble, G. J., Kassner, G., Caprario, F. X., Dafre, A. L., and Ohira, M., 1992. Comparative hematology in marine fish. Comparative Biochemistry and Physiology. 102(2): 311-321.*

www.SID.ir