Archive of SID

بررسی مواد ضد انعقاد مختلف مورد استفاده در تحقیقات خون‌شناسی ماهیان در ایران

نژادمقدم، ش[۱،*]؛ صفری، ر.[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ، گرگان، ایران
[۲] هیئت علمی، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ، گرگان، ایران
*Email:sh.moghadam@mailfa.com

سرم تهیه شده از خون ماهی به دلیل حذف عناصر سیستم انعقادی، برای اندازه‌گیری ترکیب یاخته‌ای مناسب نمی‌باشد. بنابراین جهت محاسبه دقیق یاخته‌های پلاسمای خون باید مواد ضد انعقاد به خون اضافه گرددکه انتخاب آنها دارای اهمیت بسزایی می‌باشد. زیرا ماده ضد انعقاد باید واجد شرایط بهینه‌ای باشد تا کمترین اثر سوء را روی شکل و ساختار یاخته‌های خون بگذارد. مطالعه حاضر در بررسی مواد ضد انعقاد مختلف مورد استفاده در ۵۰ مطالعه خون‌شناسی ماهیان در ایران نشان داد که هپارین بیشترین ماده ضد انعقاد مورد استفاده در داخل کشور می‌باشد.

کلمات کلیدی: ماده ضد انعقاد، خون شناسی، ماهی، ایران.

مقدمه:

بافت خون ماهی اطلاعات کلیدی و دقیقی در زمینه فیزیولوژی و شرایط محیطی موجود در اختیار محققین قرار می‌دهد. بررسی شاخص‌های خونی همواره به عنوان یکی از پارامترهای مهم در مطالعات اثرات تغذیه‌ای، عوامل محیطی و بیماریهای آبزیان می‌باشد *[1]*. نگهداری خون بعد از خون‌گیری به مدت طولانی، به جهت لخته شدن نتایج آزمایشات را با خطاهای زیادی مواجه می‌سازد، بنابراین جهت کسب نتایج دقیق آنالیزهای خونی، استفاده از ماده ضد انعقاد ضروری است. نمک سدیم و پتاسیم اتیلن ترا ایتیک اسید (*EDTA*)، سیترات سدیم و اسید سیترات دکستروز، هپارین و اکسالات سدیم، پتاسیم و آمونیوم، فلوئور سدیم از مواد ضد انعقاد مهم و کاربردی در خون‌شناسی پزشکی می‌باشند. هنوز ماده ضد انعقاد کاملی که تأثیرات چندانی بر بافت خون نداشته باشدکشف نشده است و بحثهایی در رابطه با تأثیر نوع ماده ضد انعقاد بر آنالیز عناصر خونی وجود دارد *[2]*.

اتیلن دی‌آمین‌ترا استات ماده ضد انعقادی است که از طریق ترکیب یون‌های کلسیم مورد نیاز با ترومبوبلاستین (جهت تبدیل آنزیم) سبب عمل انعقاد خون می‌شود. اتیلن دی‌آمین‌ترا استات به دلیل تأثیر و تخریب جزئی ساختار یاخته‌ای خون و عدم ایجاد تغییرات مهم در شکل یاخته‌ای و ترومبوسیتها به عنوان یک ماده ضد انعقاد انتخابی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از غلظتهای بالای اتیلن دی‌آمین‌ترا استات در نمونه خون، میزان هماتوکریت در ماهی را افزایش داده و به جهت تأثیر نامطلوب بر لایه‌های سلولی موجب القای همولیز یاخته‌های خونی، بدشکلی در اریتروسیتها و کاهش تنوع لوکوسیتها در ماهی می‌گردد *[12]*.

هپارین مولکول پلی‌ساکاریدی سولفاته شده به میزان زیادی از نوع دی‌گلوکز آمین و اسید دی‌گلوکورونیک می‌باشد و معمولاً به صورت نمکهای آمونیوم، کلسیم، سدیم و لیتیم قابل دسترسی می‌باشد. مطالعات نشان داده که هپارین در غلظت مناسب کمترین تأثیر را بر *pH*، هماتوکریت و غلظت یونها دارد. هپارین به عنوان یک ماده ضد ترومبین و ترومبوپلاسین عمل می‌کند و تمایل جذبی خاص با پروتئین‌های خون دارد در نتیجه مانع انعقاد خون می‌شود *[8]*. سیترات سدیم، با غیر فعال کردن یون کلسیم و ایجاد املاح نامحلول سیترات کلسیم به انعقاد خون کمک می‌نماید، این ماده انعقاد خون را فقط برای چند ساعت مهار می‌کند

www.SID.ir

Archive of SID

بنابراین از محلول اسید سیترات دکستروز به دلیل حفظ بهتر گلبولهای قرمز، برای انتقال خون و مطالعه روی آنزیم‌ها و مراحل همولیز استفاده می‌نمایند. اکسالاتها نیز از مواد ضد انعقاد خون هستند که با کلسیم ترکیب شده، ایجاد املاح نامحلول اکسالات کلسیم می‌کند *[3]*.

بنابراین محققین مختلف بسته به دسترسی به ماده ضد انعقاد و در نظر گرفتن مزایا و معایب هر یک از این مواد ضد انعقاد یکی از آنها را در مطالعات خود به کار می‌گیرند، لکن اطلاعاتی در رابطه با بیشترین ماده ضد انعقاد در مطالعات وجود ندارد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی بیشترین ماده ضد انعقاد مورد استفاده در مطالعات آبزی‌پروری در طی ۱۰ سال گذشته در ایران صورت گرفت.

مواد و روش ها:

جهت انجام مطالعه به صورت تصادفی حدود ۵۰ مقاله مرتبط با مطالعات خون‌شناسی ماهیان که در نشریات علمی پژوهشی معتبر داخل کشور با مجوز وزارت علوم دریافت شد. مشخصاتی از جمله نویسندگان، نوع گونه ، ماده ضد انعقاد مصرفی ثبت شد.

نتایج و بحث:

اطلاعات ثبت شده از مقالات در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که در ۸۴٪ مطالعات مورد بررسی در این تحقیق از ماده ضد انعقاد هپارین، ۱۴٪ اتیلن دی آمین ترا استات، ۲٪ نمک سیترات استفاده شده است (جدول ۱).

نام گونه	مبانگین وزن/سن	مطالعه	ماده ضدانعقاد	نویسنده
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۱۰۰±۲۵	عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش *Origanum vulgare L.*	هپارین	(بهمنی و همکاران، ۱۳۹۳)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۵۰±۱۰	عصاره الکلی بره موم زنبورعسل	هپارین	(ولی‌پور و همکاران، ۱۳۹۲)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۵۰±۲	عصاره آلوئه‌ورا *(Aloe vera)*	هپارین	(عطائی‌مهر و همکاران، ۱۳۹۳)
برخی از گونه‌های خاویاری *Acipenseridae*	۲ تا ۳ سال	بررسی فاکتورهای هماتولوژیک	هپارین	(گازرانی فراهانی، ۱۳۸۸)
تاس‌ماهی شیپ *Acipenser nudiventris*	۳۱/۶±۵/۲	شوینده آنیونی (شامپو)	هپارین	(آرین‌فر و همکاران، ۱۳۹۲)
Oncorhynchus mykiss	۹۷	علف‌کش	هپارین	(علی و همکاران، ۱۳۹۲)

www.SID.ir

Archive of SID

کلمه *Rutilus rutilus caspicus*	۲۰	۲-فنوکسی‌اتانول	*EDTA*	(جهانبخشی و همکاران، ۱۳۹۳)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۱۰/۳±۲/۹	تغییرات *pH*	*EDTA*	(قنبری و همکاران، ۱۳۸۸)
کفال طلایی *Liza auratus*	۱۹۳/۱±۱۰/۲	بیماری نو پدید	هپارین	(ذریه زهرا و همکاران، ۱۳۹۲)
گربه‌ماهی پنگوسی *Pangasianodon hypophthalmus*	۱/۲۷±۰/۲۴	عصاره مریم گلی *Salvia macrosiphon*	هپارین	(رضایی و همکاران، ۱۳۹۱)
اردک ماهی *Esox lucius*	سنین مختلف	آلودگیهای انگلی	هپارین	(جمال‌زاده فلاح و همکاران، ۱۳۹۳)
فیتوفاگ *Hypophthalmichthys molitrix*	۸۰±۵	شوینده‌های آنیونی	*EDTA*	(حیدری و همکاران، ۱۳۹۲)
بنی *Barbus sharpey*	۱±۵	سولفات مس و فرمالین	هپارین	(یادگار و همکاران، ۱۳۹۰)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۱۵/۱۳±۳/۴۰	طعم‌دهنده کارواکرول، آنتول و لیمونن	هپارین	(طاعتی و نوعی تعادلی، ۱۳۹۴)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۲ ساله	اتیدیوم بروماید	*EDTA*	(حاتمی و سیه‌چهره، ۱۳۱۳۹۱)
ازون برون *Acipenser Stellatus*	۳۰/۱۶±۰/۱۴	پری بیوتیک الیگوفروکتوز	هپارین	(ایری و همکاران، ۱۳۹۴)
پاکوی قرمز *Piaractus brachypomus*	۲/۳۱±۰/۱۴	اینولین	*EDTA*	(حسینی و همکاران، ۱۳۹۳)
بلوگا *Huso huso*	۲۵/۱۵±۱/۹	جایگزینی پودر ماهی با سویا	هپارین	(حسینی و همکاران، ۲۰۱۱)

www.SID.ir

Archive of SID

Huso huso	۱۶	اینولین	هپارین	(اکرمی و همکاران، ۱۳۸۹)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۳	ویتامین *D*	هپارین	(دهقان‌زاده و همکاران، ۱۳۹۲)
بنی *Barbus sharpey*	۲۱/۶±۲/۲۶	ویتامین *C*	هپارین	(جواهرزاده‌دزقول و همکاران، ۱۳۹۱)
فیل ماهی *Huso huso*	۸/۷۱±۰/۰۲	پروبیوتیک ایمنوژن	هپارین	(مهاجراسترآبادی و همکاران، ۱۳۹۰)
ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii kutum*	۱/۱۵±۰/۰۶	گلوکان	هپارین	(روفچائی و همکاران، ۱۳۹۱)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۴/۳±۰/۱	سین‌بیوتیک	هپارین	(یاراحمدی و همکاران، ۲۰۱۴)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۹۷/۲±۱/۶	علف چای *Hypericum perforatum*	هپارین	(قیاسی و همکاران، ۱۳۹۴)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۱۸±۳	فلز مس *Cu so₄*	هپارین	(خبازی و همکاران، ۱۳۹۴)
گرین ترور *Andinocara rivulatus*	۳۸±۱/۰۳	پودر دارچین *Cinnamomum zeylanicm*	هپارین	(روزی و همکاران، ۱۳۹۳)
سوف سفید *Sander lusiopersa*	تصادفی و مختلف	آلودگی انگلی	هپارین	(موحد و همکاران، ۱۳۹۲)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۴۹/۶±۶/۳۵	مواجهه با آئروموناس هیدروفیلا	هپارین	(توکلی و اخلاقی، ۱۳۸۷)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۴۰±/۳۵	لیدوکائین	هپارین	(قلیچی و همکاران، ۱۳۹۲)

www.SID.ir

Archive of SID

کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۱۱/۵±۰/۵	گلوتن ذرت	*EDTA*	(قادری رمازی و همکاران، ۱۳۹۱)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۱۲۷/۹۱±۱۵/۵۷	آرد سویا همراه با مکمل آنزیمی آویزایم	*EDTA*	(حسینی‌فرد و همکاران، ۱۳۹۲)
Rutilus frisii kutum	۰/۲۲±۰/۰۲	تأثیر سطوح مختف شوری	هپارین	(عنایت غلامپور و همکاران، ۱۳۹۰)
فیل ماهی *Huso huso*	سنین مختلف (بچه‌ماهی، جوان و مولد)	تشخیص افتراقی گلبول سفید	هپارین	(تکلو و همکاران، ۱۳۹۰)
تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus*	۵/۶۹-۶/۰۵	سین‌بیوتیک *Bacillus Licheniformis* و عصاره مخمر	*EDTA*	(حسن و همکاران، ۲۰۱۴)
گربه‌ماهی پنگوسی *Pangasianodon hypophthalmus*	۱/۲۷±۰/۲۴	عصاره گیاه مورخوش *Zhumeria majdae*	هپارین	(رضایی و همکاران، ۱۳۹۲)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۵۰-۱۰۰	عصاره گیاه ختمی *Althaea officinalis*	هپارین	(آقابابایی امیر و همکاران، ۱۳۹۳)
ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii kutum*	مولد	مقایسه پارامترهای خونی	هپارین	(شفیعی ثابت، ۱۳۸۸)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۳۴±۲/۵	پروبیوتیک اینولین	هپارین	(شیخ‌الاسلامی امیری و همکاران، ۱۳۸۸)
اسکار *Astronotus ocellatus*	۲۳/۲۵±۴/۳۵	بتاگلوکان (ماکروگارد)	سیترات سدیم	(انتظار یزدی و همکاران، ۱۳۹۳)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۱۰۰	مقایسه اثر بیهوشی با گل میخک و فنوکسی اتانول	هپارین	(علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۲)
فیل ماهی *Huso huso*	۲۶/۱±۱/۸	ایزوفلاوان جینستین	هپارین	

www.SID.ir

Archive of SID

				(بهمنی و همکاران، ۱۳۹۲)
استرلیاد *Acipenser ruthenus*	۲۵۰±۱۰	اسانس برخی گیاهان (پونه کوهی، مرزه معمولی و آویشن شیرازی)	هپارین	(رئیسی و همکاران، ۱۳۹۳)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۴۶±۱	پودر زنجبیل *Zingiber officinale*	پودر هپارین لیتیوم	(حقیقی و شریف روحانی، ۲۰۱۳)
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	۱۰/۹±۸۸/۱	پودر گیاه غازیاقی *vulgaris Falcaria*	هپارین	(چوبکار، ۱۳۹۴)
تاسماهی سیبری *Acipenser baeri*	۳۲/۹±۰/۳	لسیتین	هپارین	(نجفی پور مقدم و همکاران، ۱۳۹۰)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۶۰	پروبوتیک *Bacillus subtilis*	هپارین	(کامگار و همکاران، ۱۳۹۱)
Iranocichla hormuzensis	۷/۵۱±۱/۹۱	مطالعه خونشناسی	هپارین	(دانشور و همکاران، ۲۰۱۲)
شیربت *Barbus grypus*	۲۷/۵±۲/۵	ویتامین *C*	هپارین	(چله‌ماله دزفول‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۳)
فیل ماهی *Huso huso*	۴۰/۸۲±۵/۸	پریبیوتیک گروبیوتیک	هپارین	(عادل و همکاران، ۱۳۹۴)
قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*	۲/۱±۰/۱۵	ویتامین *E*	هپارین	(اورجی و همکاران، ۱۳۹۲)

مطالعات متنوعی در رابطه با مقایسه مواد ضد انعقاد مختلف در گونه‌های مختلف آبزیان صورت گرفته است. مطالعه ایمانپور و همکاران (۱۳۹۲) در مقایسه ماده ضد انعقاد هپارین، اتیلن دی آمین ترا اتیک اسید و تری سیترات بر فاکتورهای خون‌شناسی فیل ماهیان جوان پرورشی نشان داد که اتیلن دی‌آمین ترا اتیک اسید میزان هماتوکریت، هموگلوبین، هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین بالاتر از تیمارهای هپارین و سیترات بود *[1]*.

مطالعه *Hatting* و همکاران (۱۹۷۵) در گونه‌های ماهی کپور نشان داده که اتیلن دی‌آمین‌ترا اتیک اسید تمایل به افزایش هماتوکریت داشته و در برخی گونه‌ها موجب افزایش همولیز شده، در حالیکه هپارین تغییرات کمی در اندازه اریتروسیتها و میزان هماتوکریت ایجاد نمود *[7]*. مطالعه *Hatting* و *Smith* (۱۹۸۰) نشان داد که هپارین با دقت و ثبات بیشتری فاکتورهای خون‌شناسی را نشان می‌دهد *[10]*، در حالی که *Clarke* وهمکاران (۱۹۷۹) گزارش کردند که کارایی هپارین در انعقاد خون باس دریای دهان بزرگ *Micropterus salmonides* به اندازه *EDTA* نمی باشد *[6]*. *Allen* (۱۹۹۳) افزایش درصد هماتوکریت در نمونه‌های تحت تیمار هپارین *Oreochromis auratus* را مشاهده نمودند *[4]*. *Witeska* و *Walenick* (۲۰۰۷)

نتایج مشابهی را در پارامترهای خون‌شناسی تحت تأثیر تیمارهای مختلف در ماهی کپور مشاهده کردند و اعلام نمودند میزان تغییرات در تیمارهای *Na2EDTA* بالاتر از سیترات و هپارین می‌باشد *[13]*. اما مطالعات در پستانداران نشان می‌دهد که بین

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت ضد انعقادی و وزن مولکولی هپارین همبستگی وجود دارد. فعالیت ضد انعقادی معنی‌دار (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 ضدانعقادی قابل اغماضی (۵۰ واحد بین المللی) را نشان می‌دهد. هپارین همچنین به عنوان بازدارنده برخی از آنزیم‌ها از جمله *ATPase*، هیلونیداز، الستاز و رنین عمل می‌کند *[5]*.

به علاوه مطالعات اخیر نشان داده هپارین خود را به فاکتورهای رشد همچون فاکتور رشد فیبروبلست، فاکتور رشد اندوتیال سلول، به چندین پروتئین اتصالی از جمله لامینین، فیبرونکتین و ویترونکتین متصل می‌نماید *[5]*. *Engstad* و همکاران (۱۹۹۷) تأثیر هیرودین، هپارین و سیترات و *EDTA* بر مونوسیت و نوتروفیل را مطالعه و دریافتند که *EDTA* و سیترات ترشح پروتئین را کاهش می‌دهند. نتایج مطالعه ایمانپور و همکاران (۱۳۹۲) نیز تاثیر معنی‌دار مواد ضد انعقاد بر تعداد گلبولهای سفید و تعداد انواع مختلف آنها به جز بازوفیلها و هتروفیلها را نشان داد .

همچنین نتایج مطالعه ایشان در بررسی تأثیر این مواد بر همولیز خون نشان داد که حتی کمترین غلظت *Na2EDTA* شکنندگی اسمزی اریتروسیتهای فیل ماهی *Huso huso* را به شدت افزایش می‌دهد. سلولها در تیمار هپارینه شده به محلول هیپواسمتیک مقاومت نشان دادند و شدت تغییر رنگ در تیمارهای *Na2EDTA* بیشتر از سیترات بود *[1]*. *Witeska* و *Walenick* (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 تیمار *EDTA* بود. احتمالاً *EDTA* با شلات کردن یونهای $Ca2+$ باعث افزایش حساسیت سلولها به لیز شدن و کاهش انعطاف پذیری لایه‌های سلولی می‌گردد *[13]*.

نتیجه گیری کلی:

با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی و مطالعات مقایسه‌ای صورت گرفته در زمینه مزایا و معایب استفاده از هپارین به نظر می‌رسد ماده هپارین بیشترین استفاده را دربین مواد ضد انعقاد در مطالعات آبزیان در کشور دارد.

منابع

۱. *ایمانپور، م. ر.، صفری، ر و اسعدی، ر. ۱۳۹۲. تاثیر مواد مختلف ضد انعقاد بر برخی فاکتورهای خون شناسی فیل ماهیان جوانمجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۶. شماره ۴. صفحات ۴۰۶-۴۱۳.*

۲. *جوهری ،س .ع.، و کلباسی، م .ر. ۱۳۸۵ . بررسی برخی تغییرات سلولهای خونی در ماهیان تریپلوییید قزل آلای رنگین کمان. مجله علمی زیست شناسی ایران، (Onchorhyncus mykis). جلد ۱۹ ، شماره ۴ .صفحات۴۹۲-۴۹۵ .*

۳. *کاظمی، ر. ا.، پور دهقانی، م.، یوسفی جوهردهی، ا. ، یار محمدی، م و نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴ صفحه.*

4. *Allen, P., 1993. Determination of hematological parameters of Oreochromis aureus Steindachner and the effects of heparin on these. Comp. Biochem. Physiol. Vol.106. PP: 355-358.*
5. *Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D. R., Jurinitz, D. F., and Wassermann, G. F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia (Rhamdia quelen). Fish Physiology and Biochemistry. Vol.30. PP: 21–25.*
6. *Clarke, S., Whitmore, D.H., and Mcmahon, R. F. 1979. Consideation of blood parameters of largemouth bass, Micropterus salmonides. J. Fish. Res. Bd. Can. Vol. 14. PP: 147-158.*
7. *Engetad, C.S. Gutterberg, T.J., and Osterud, B., 1997. Modulation of blood cell activity by four commonly used anticouagulants. Thromb. Haemost. Vol. 77. PP:690-695*

www.SID.ir