

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی

مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها

اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

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

زارعی، ث.^{۱*}؛ درافشان، س.^۱؛ پیکان حیرتی، ف.^۱

^۱ 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 (10 IU/ml)، Na_2EDTA (1 mg/ml) بررسی شد. برای انجام این مطالعه، از ماهیان استرلیاد با میانگین وزن 500 ± 10 گرم بدون استفاده از مواد بی‌هوشی از محل باله دمی خون‌گیری صورت گرفت. مطابق نتایج به دست آمده، 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 به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار Na_2EDTA بود. میزان MCV ، MCH 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 به دست آمده هپارین به عنوان ماده ضد انعقاد خون مناسب‌تری نسبت به Na_2EDTA در ماهی استرلیاد دریای خزر می‌باشد که بهتر است در مطالعات خون‌شناسی مورد توجه قرار گیرد.

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

مقدمه:

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 [2]، [3] و [4]. دمای محیط و شرایط استرس‌زا به خصوص استرس زمان خون‌گیری، سرعت لخته شدن خون را افزایش می‌دهند، اما نگهداری بافت خون به منظور انجام آزمایش‌های برای زمان طولانی به علت سرعت بالای لخته شدن خون مشکل است. بنابراین جهت کسب نتایج دقیق آنالیزهای خونی، استفاده از مواد ضد انعقاد ضروری است. نمک سدیم و پتاسیم اتیلن تترا 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 نداشته باشد، کشف نشده است و بحث‌هایی در مورد تأثیر نوع مواد ضد انعقاد بر آنالیز عناصر خونی وجود دارد [12]. در ماهیان استخوانی آب شیرین و ماهیان مبتلابه انگل، هپارین فراوان‌ترین ماده ضد انعقاد به کار برده شده می‌باشد [9]، [11]، [14] و [15]. محققین اندکی از EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد استفاده کرده‌اند [6]. در بعضی از مطالعات از مواد ضد انعقاد استفاده نشده است [10]. مطالعات ابتدایی بانمک‌های هپارین، EDTA ، اکسالات و سیترات نشان داده که

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 سترات pH خون را اندکی قلبایی 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 ب‌شکلی در اریتروسیت‌ها و کاهش تنوع لوکوسیت‌ها در ماهی می‌گردد [8].

از آنجاکه بررسی فاکتورهای خو شناسی از ارکان اساسی بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی، بیماری‌ها در آبزیان می‌باشد و مطالعات نیز در زمینه 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 میکروهیاتوکریت و نیز سانتریفوژ میکروهیاتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در 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 رقت‌سازی 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 $40\times$ عکس‌برداری شدند. برای تعیین میزان پارامترهای MCH ، MCV و $MCHC$ از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$MCH = \frac{\text{هماتوگلوبین} \times 10}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون}} \quad MCHC = \frac{\text{هماتوگلوبین} \times 10}{\text{هماتوکریت}} \quad MCV = \frac{\text{هماتوکریت} \times 10}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون}}$$

تجزیه و تحلیل 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 0.05 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 ($p < 0.05$) 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 ($p > 0.05$) ولی تیمار Na_2EDTA اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$)؛ اما در

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 و مونوسیت ($Mean \pm SE$)) استرلیاد تحت تأثیر هیپارین ($1.0 IU/ml$) و Na_2EDTA ($1 mg/ml$).

مواد ضد انعقاد	لنفوسیت (%)	منوسیت (%)	نوتروفیل (%)	بازوفیل (%)	ائوزینوفیل (%)
هیپارین	$87/25 \pm 1/72^a$	$6/25 \pm 0/79^a$	$4/50 \pm 0/90$	$1/25 \pm 0/52$	$0/75 \pm 0/36$
Na_2EDTA	$93/25 \pm 1/55^b$	$3/50 \pm 0/50^b$	$2/00 \pm 0/65$	$1/00 \pm 0/37$	$0/25 \pm 0/25$
کنترل	$87/50 \pm 0/95^a$	$6/50 \pm 0/50^a$	$4/50 \pm 0/50$	$0/50 \pm 0/50$	$1/00 \pm 0/57$

در مورد شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، تعداد سلول‌های منوسیت و لنفوسیت در بین تیمارهای دارای هیپارین و Na_2EDTA 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 هیپارین با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است ($p > 0.05$) اما تیمار Na_2EDTA 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 Na_2EDTA نسبت به تیمار هیپارین 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 هیپارین و Na_2EDTA اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p > 0.05$). درصد هماتوکریت به‌دست‌آمده در تیمار Na_2EDTA به‌طور معنی‌داری بالاتر از هیپارین می‌باشد ($p < 0.05$). همچنین تعداد گلبول‌های قرمز در دو تیمار هیپارین و Na_2EDTA اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان دادند ($p < 0.05$). در میزان هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین بین دو تیمار هیپارین و Na_2EDTA تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$).

جدول ۲- پارامترهای خونی: گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین ($Mean \pm SD$) استرلیاد تحت تأثیر Na_2EDTA ($1.0 IU/ml$) و Na_2EDTA ($1 mg/ml$).

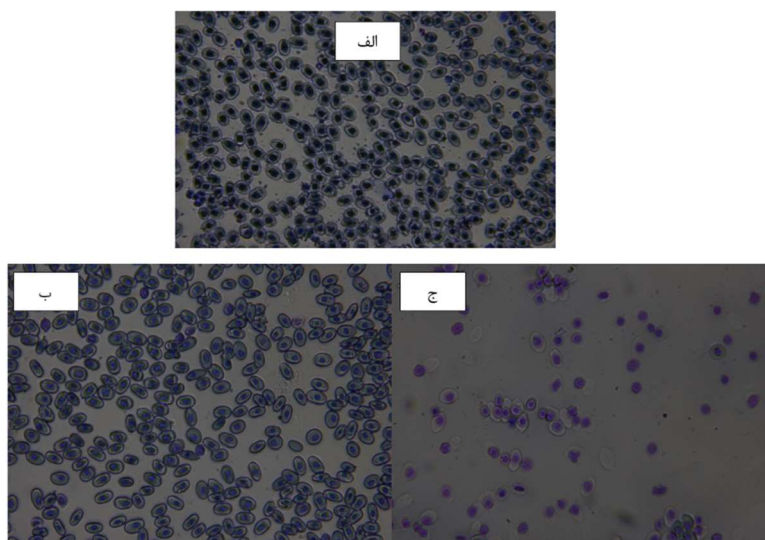
مواد ضد انعقاد	هموگلوبین (g/dl)	هماتوکریت (%)	گلبول‌های قرمز (μl)	گلبول‌های سفید (μl)	غلظت متوسط هموگلوبین (فمتولیترا)	حجم متوسط گلبولی (پیکوگرم)	هموگلوبین متوسط گلبولی (g/dl)
هیپارین	$12/92 \pm 1/89$	$23/62 \pm 0/89$	1205000 ± 186270	$63086 \pm 911/92$	$64/81 \pm 14/7$	$108/59 \pm 18/41$	$17/14 \pm 3/39$
Na_2EDTA	$12/20 \pm 2/10$	$27/05 \pm 0/46$	845000 ± 223532	$54102 \pm 1003/28$	$111/97 \pm 25/22$	$149/11 \pm 30/18$	$13/43 \pm 1/67$

* 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 از جمله 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

شاخص‌های خونی در گونه فیلم ماهی (*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 هیپارین باعث شده است که علی‌رغم بالاتر بودن تعداد گلبول‌های قرمز ولی هماتوکریت تیمار هیپارین کمتر از تیمار Na_2EDTA باشد. در این مطالعه فاکتورهای غلظت متوسط هموگلوبین و حجم متوسط گلبولی در تیمار $EDTA$ نسبت به تیمار هیپارین مقادیر بیشتری را نشان داد و تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.05$); در حالی که فاکتور هموگلوبین متوسط گلبولی در تیمار هیپارین 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 فیلم ماهی 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 هیپارین دارای تغییرات بیشتری هستند. همچنین در مطالعه حاضر میزان تخریب گلبول‌های قرمز در نمونه‌های تیمار Na_2EDTA بسیار بیشتر از نمونه‌های تیمار هیپارین 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 هیپارین 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 در حالی که هیپارین (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 هیپارین 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 هیپارین، ج) تیمار Na_2EDTA

نتیجه‌گیری کلی:

با بررسی نتایج به دست آمده 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 عنوان شده برای Na_2EDTA می‌تواند با اطمینان رد مطالعات خون‌شناسی در گونه استرلیاد برای جلوگیری از انعقاد خون مورد استفاده قرار گیرد.

منابع:

۱. ایمان پور، م. ر.، صفری، ر.، اسعدی، ر. ۱۳۹۲. تأثیر مواد مختلف ضد انعقاد بر برخی فاکتورهای خون‌شناسی فیله ماهیان 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 (مجله علمی زیست‌شناسی ایران)، (*Onchorhynchus mykiss*)، ۱۹(۴): ۴۹۵-۴۹۲.
۳. شاهسونی، د.، ثوقی، غ. و خضرای نی، پ. ۱۳۷۸. تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در سواحل جنوب شرقی دریای خزر. مجله پژوهش‌های 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 Costa, 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.

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله