



Effect of Heparin and Na₂EDTA as Two Common Anticoagulants on Some Haematological Parameters of Sterlet Sturgeon (*Acipenser ruthenus*)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Zarei S.¹ MSc,
Karimi S.¹ MSc,
Dorafshan S.^{*1} PhD,
Paykan Heyrati F.¹ PhD

How to cite this article

Zarei S, Karimi S, Dorafshan S, Paykan Heyrati F. Effect of Heparin and Na₂EDTA as Two Common Anticoagulants on Some Haematological Parameters of Sterlet Sturgeon (*Acipenser ruthenus*). Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(3):199-204.

¹Fisheries Department, Natural Resources Faculty, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

*Correspondence

Address: Fisheries Department, Natural Resources Faculty, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
Postal Code: 8415683111
Phone: +98 (31) 33913580
Fax: +98 (31) 33912840
sdorafshan@cc.iut.ac.ir

Article History

Received: March 14, 2017
Accepted: August 11, 2018
ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims Heparin and EDTA salts are commonly used as anticoagulants for haematological studies in fish. This study aimed at investigating the effect of heparin and Ethylenediaminetetraacetic dihydrate (Na₂EDTA) on some haematological parameters of Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*).

Materials & Methods In the current experimental study, the effect of heparin (10ml) and Na₂EDTA (1mg/ml) was investigated on haematological parameters in *Acipenser ruthenus*. The blood samples were collected from 10 healthy fish with the average weight of 600.0±63.0g. The data were analyzed by SPSS 22 software, using one-way analysis of variance, independent t test, and Duncan's new multiple range test.

Findings The number of red blood cells in samples containing Na₂EDTA (845000±123532cell/mm³) was significantly lower than those of heparinized ones (1205000±86270; p<0.05). Mean haematocrit value for Na₂EDTA samples (27.05%±0.46) was significantly higher than bloods preserved in heparin (23.62%±0.89%; p<0.05). In sample containing Na₂EDTA, mean corpuscular volume (MCV) and lymphocyte (149.11±30.00ft and 93.25±1.55%, respectively) was significantly higher than the heparin sample (108.59±18.41ft and 87.25±1.72%, respectively; p<0.05). In sample containing Na₂EDTA, the increase in size and haemolysis of red blood cells were observed, but the changes in the sample containing heparin did not differ significantly from that of the control group.

Conclusion Na₂EDTA has a negative effect on haematological parameters of *Acipenser ruthenus*, especially in morphological terms; so, it is not a suitable anticoagulant combination for blood analysis of this species. Heparin due to the smallest changes in shape and size of cell, as well as less effect on hematocrit, is an anticoagulant in sterilized fish haematological studies.

Keywords Haematology; Anticoagulant; Sterlet

CITATION LINKS

[1] Effects of triploidy on the Caspian ... [2] Haematological characteristics of ... [3] Interacting effects of water temperature and dietary ... [4] Sublethal haematological effects of zinc on the freshwater ... [5] Effect of silver nanoparticles on some hematological ... [6] Refrigerated storage improves the stability of the ... [7] The quality of diagnostic ... [8] Preanalytic error tracking in a laboratory medicine department ... [9] The effects of anticoagulants on hematological indices ... [10] Heparin and Na₂EDTA as anticoagulants for ... [11] The efficacy of field techniques for obtaining and storing ... [12] The haematological assessment of the ... [13] Error in haematocrit value produced by inadequate ... [14] Effects of low temperatures and fasting on hematology and ... [15] Anticoagulants for avian and reptilian blood ... [16] Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on ... [17] The effects of different anticoagulants ... [18] Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on ... [19] Calcium in red blood cells-a perilous ... [20] Blood and ... [21] Review: Are the classical hematological variables ... [22] Hematological parameters of Iranian cichlid *Iranocichla hormuzensis*: Coad ... [23] Cadmium sub-lethal concentration effects on the haematological ... [24] Physiology of aquatic circulatory system and ... [25] Use of erythrocyte measurements to identify ... [26] Polyploidy induced in brook trout by cold ... [27] Size of erythrocytes in the diploid ... [28] Disodium EDTA used as anticoagulant causes hemolysis ... [29] Comparative study of the effect of different anticoagulants on ... [30] Prolong storage of blood in EDTA has an effect on the ... [31] Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants ... [32] Contraction of epithelial ... [33] Alterations in hematological parameters of ... [34] Observations on some effects of disodium ... [35] Effects of sample handling, processing ... [36] Blood cells of Murray cod *Maccullochella peelii* ... [37] Comparative investigation of blood factors in ... [38] Morphological studies of peripheral blood cells of the ... [39] A study on cytochemical properties of white blood cells from *Acipenseridae* of Southern ...

تاثیر هپارین و Na_2EDTA به عنوان مواد متداول ضد انعقاد خون بر شاخص های خون شناسی ماهی استرلیاد

ژناله زارعی MSc

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

سجاد کریمی MSc

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

سالار درافشان PhD*

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

فاطمه پیکان حیرتی PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

اهداف: هپارین و نمک های EDTA دو ماده ضد انعقاد مرسوم در مطالعات خون شناسی ماهیان هستند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات دو ماده ضد انعقاد هپارین و دی سدیم-آتیلن دی آمین تترا استات-دی هیدرات (Na_2EDTA) روی ماهی استرلیاد بود.

مواد و روش ها: در مطالعه تجربی حاضر، تاثیر هپارین و Na_2EDTA به ترتیب با غلظت های ۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر و یک میلی گرم بر میلی لیتر بر پارامترهای خونی ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) بررسی شد. نمونه های خون از ۱۰ قطعه ماهی سالم با وزن متوسط 600 ± 63 گرم تهیه شدند. آزمون های تحلیل واریانس یک طرفه، T مستقل، دانکن و نرم افزار SPSS 22 نیز به کار رفتند.

یافته ها: تعداد گلبول های قرمز خون در نمونه حاوی Na_2EDTA (845000 ± 123532) سلول در میلی متر مکعب) به طور معنی داری از نمونه حاوی هپارین (1205000 ± 86270) سلول در میلی متر مکعب) کمتر بود ($p < 0.05$). میزان هماتوکریت در نمونه حاوی Na_2EDTA (27.05 ± 0.46 %) به طور معنی داری بیشتر از نمونه حاوی هپارین (33.62 ± 0.89 %) به دست آمد ($p < 0.05$). در نمونه حاوی Na_2EDTA ، به ترتیب میانگین حجم گلبول های قرمز (MCV) و لنفوسیت (به ترتیب 149.11 ± 30 فمتولیت و 93.25 ± 1.55 %)، از نمونه حاوی هپارین (به ترتیب 108.59 ± 18.41 فمتولیت و 87.25 ± 1.72 %) به طور معنی داری بیشتر بود ($p < 0.05$). در نمونه حاوی Na_2EDTA افزایش اندازه و همولیز گلبول های قرمز مشاهده شد، اما این تغییرات در نمونه حاوی هپارین تفاوت چندانی نسبت به گروه شاهد نداشت.

نتیجه گیری: ماده ضد انعقاد Na_2EDTA بر پارامترهای خون شناسی ماهی استرلیاد، به ویژه از منظر ریختی، تاثیر منفی دارد. بنابراین ترکیب ضد انعقاد مناسبی برای آنالیز خون این گونه نیست. هپارین به دلیل ایجاد کمترین تغییرات در شکل، اندازه سلول و نیز اثرگذاری کمتر روی هماتوکریت، ماده ضد انعقادی مناسب در مطالعات خون شناسی ماهی استرلیاد است.

کلیدواژه ها: خون شناسی، ضد انعقاد، استرلیاد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۰

*نویسنده مسئول: sdrorafshan@cc.iut.ac.ir

مقدمه

مطالعه خصوصیات خون شناسی ماهیان پرورشی یکی از ابزارهای مهم همسو با پیشرفت صنعت آبی پروری است و کاربرد زیادی در این صنعت دارد [1]. با توجه به افزایش آلودگی آب های طبیعی پرورش ماهی و ارتباط تنگاتنگ موجود آبی با محیط آبی اطراف خود، به نظر می رسد تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب تاثیر فراوانی روی پارامترهای خون ماهی دارد و باعث تغییرات سریع در ترکیبات خون ماهی می شود [2, 3]. از سویی دیگر بررسی های پارامترهای خون اطلاعات مناسبی در تشخیص و شناسایی بیماری های آبی فراهم می کند. درواقع خون شناسی، روشی موثر و مناسب برای نظارت بر کیفیت محیط زیست، سطح سلامت و

شرایط فیزیولوژیک موجود آبی است [4, 3].

در مطالعات خون شناسی تهیه نمونه خون مناسبی که شرایط حقیقی موجود آبی را نشان دهد، بسیار حیاتی است، تا بتوان براساس داده های به دست آمده، نتایج را به صورت صحیح تفسیر کرد. نتایج خون شناسی غالباً تحت تاثیر تعدادی از عوامل مانند مواد ضد انعقاد، روش آنالیز، دمای نگهداری نمونه خون و فاصله زمانی ایجاد شده بین نمونه برداری تا زمان آنالیز است [5]. خون ماهی به دلیل میزان بالای ترومبوسیت ها، میل زیادی به لخته شدن دارد و توصیه می شود که بررسی های خون شناسی روی نمونه های خون به سرعت پس از جمع آوری نمونه خون انجام شود، اما عموماً امکان بررسی خون ماهی در محل نمونه برداری فراهم نیست و آنالیزهای خون مدتی پس از نمونه برداری صورت می گیرند. استفاده از مواد ضد انعقاد برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد و معقول، ضروری است [6].

مواد ضد انعقاد افزودنی هایی هستند که از لخته شدن خون جلوگیری می کنند و موجب می شوند داده های حاصل از آنالیز خون تا حد امکان عاری از خطا باشند [7]. بنابراین خنثی بودن مواد ضد انعقادی بسیار مهم است تا هیچ گونه تغییری در خون ایجاد نشود و به دنبال آن نتایج فاقد ایراد باشند [8].

از جمله مواد ضد انعقاد متداول در مطالعات آبیان می توان به هپارین و دی سدیم-آتیلن دی آمین تترا استات-دی هیدرات (Na_2EDTA) اشاره کرد [9]. برخی از منابع، هپارین را به عنوان ماده ضد انعقادی مطلوب معرفی می کنند [10, 11]، اما برخی از مطالعات دیگر Na_2EDTA را برای آنالیز خون ماهی پیشنهاد می دهند [12-14]. در مطالعات خون شناسی مرغ و ماکیان نمک های هپارین و Na_2EDTA کاربرد مشابهی دارند [15]، در حالی که در خزندگان استفاده از هپارین توصیه می شود [16]. هپارین با اتصال به آنتی ترومبین III فعالیت آن را افزایش می دهد. آنتی ترومبین از فعالیت ترومبین و دیگر پروتئازهای مورد نیاز برای لخته سازی جلوگیری می کند [17, 18]، در حالی که Na_2EDTA با اتصال به یون های کلسیم مورد نیاز برای فرایند لخته شدن از عملکرد آنها جلوگیری می نماید. هر کدام از این مواد به عنوان ماده ضد انعقاد معایبی دارند؛ هپارین به دلیل ایجاد رنگ برای تعیین شمارش گلبول های سفید (WBC) مشکل زا است و Na_2EDTA به دلیل مشکل زابودن در تعیین میزان هماتوکریت (احتمالاً به دلیل اختلال در تبادلات یونی گلبول های قرمز)، اثر روی غشای سلول، ایجاد همولیز و بدشکلی گلبول های قرمز نامطلوب است [19].

سلول های خون حیوانات مختلف واکنش های متفاوتی را در برابر مواد ضد انعقاد نشان می دهند. مواد ضد انعقاد مختلفی به منظور جلوگیری از انعقاد خود در مطالعات خون شناسی بهره داران استفاده می شوند که از جمله آنها می توان به هپارین، Na_2EDTA ، هیرودین، سیترا سدیم و کومادین اشاره کرد. چون مکانیزم اثر هر یک از این ترکیبات در جلوگیری از انعقاد خون متفاوت است، بنابراین ممکن است نتایج متفاوتی با استفاده از آنها روی یک نمونه حاصل شود. به عنوان مثال در حالی که Na_2EDTA و سیترا سدیم با عمل بر یون کلسیم مانع انعقاد خون می شوند، هپارین با فعال کردن آنزیم آنتی ترومبین III، مانع فعال شدن ترومبین و در نتیجه جلوگیری از انعقاد خون می شود. در صورتی که مکانیزم عمل هیرودین متفاوت است و به طور مستقیم از فعالیت ترومبین جلوگیری می کند. کومادین، از دیگر ترکیبات ضد انعقادی است که با اثر بر ویتامین K، از عملکرد این ویتامین برای

لخته شدن خون ممانعت می‌کند، بنابراین می‌تواند به عنوان ضدانعقاد استفاده شود [20, 21].

ماهیان خاویاری در مقایسه با بسیاری از ماهیان استخوانی به دلیل تفاوت در سیر تکاملی، ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژیک متفاوتی دارند، بنابراین عموماً روش کار متفاوت و به تبع آن نتایج متفاوتی از ارزیابی روی آنها در مقایسه با ماهیان استخوانی وجود دارد. ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) از جمله ماهیان خاویاری وارداتی در ایران است که با اهداف مختلفی مانند تولید گوشت، آمیخته‌گری و حتی به عنوان ماهی زینتی در سامانه‌های متفاوت پرورش داده می‌شود. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثرات دو ماده ضدانعقاد هیپارین و Na₂EDTA روی ماهی استرلیاد بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۱۰ قطعه ماهی استرلیاد با وزن ۶۳/۰±۶۰/۰ گرم، با سلامت ظاهری، از مرکز تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه و به مدت دو هفته در استخرهای جریان‌دار بتونی در حجم کلی ۵۰ مترمکعب با سیستم گردش آب جریان‌دار، حدود یک لیتر در ثانیه با شرایط آزمایشی سازگار شدند. در مدت سازگارسازی و نگهداری، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب به طور مداوم چک شد و در آب با دمای ۱۱/۵±۱/۱°C، اکسیژن محلول ۵/۵±۹/۱ میلی‌گرم در لیتر و pH برابر با ۷/۸±۰/۱ نگهداری شدند. غذاهای با غذای پلت معمولی ماهی خاویاری (حاوی آردهای؛ کیمیاگران؛ ایران)، با آنالیز تقریبی، ۴۴٪ پروتئین و ۱۳٪ چربی به صورت روزانه در دو نوبت و در هر نوبت در حد سیری انجام شد. به مدت ۲۴ ساعت قبل از خونگیری، تغذیه ماهیان قطع و ماهی‌های مورد نظر با استفاده از تور صید شدند. تلاش بر این بود که در طول صید، کمترین استرس به ماهیان وارد شود. در ادامه بدون استفاده از مواد بی‌هوشی (به دلیل احتمال تأثیر منفی مواد بی‌هوشی بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی) از محل ساقه دم با استفاده از سرنگ استریل یک بار مصرف ۵ سی‌سی خون گرفته شد [9].

در طول نمونه‌گیری، ناحیه سر ماهی با استفاده از یک حوله پوشانده شد تا از حرکات خشن جلوگیری شود. مدت زمان دست‌کاری در تمام ماهیان بیش از ۳ دقیقه طول نکشید. نمونه خون گرفته شده از هر ماهی به سه قسمت تقسیم شد؛ یک نمونه خون به عنوان شاهد (بدون ماده ضدانعقاد)، یک نمونه حاوی هیپارین با غلظت ۱۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر (IU/ml) و یک نمونه حاوی Na₂EDTA با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و ارزیابی تأثیر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های خون‌شناسی مانند شکل و ابعاد گلبولی، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و سایر پارامترهای مرتبط صورت گرفت.

در دو گروه آغشته با مواد ضدانعقاد، علاوه بر شاخص‌های گروه شاهد، پارامترهایی مانند تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، درصد هماتوکریت، هموگلوبین و شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. غلظت‌های هیپارین و Na₂EDTA، براساس مطالعه پیشین انتخاب شدند [9]. لوله‌های حاوی نمونه خون به آرامی هم زده شدند تا نمونه خون با مواد ضدانعقاد مخلوط و از ایجاد لخته خون جلوگیری شود، سپس نمونه‌ها در یخ نگهداری و در نهایت پس از گذشت ۲ ساعت از نمونه‌برداری، به منظور اندازه‌گیری فاکتورهای مختلف به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور تعیین تعداد گلبول قرمز (RBC) و سفید (WBC)، نمونه

با محلول حاوی ۱/۰ گرم کریستال بلو، ۳/۸ گرم سیترات سدیم و ۲/۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ۳۷٪، در حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و به وسیله لام هموسیستمتر زیر میکروسکوپ نوری، شمارش گلبول‌های خونی صورت گرفت [22]. سنجش درصد هماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت انجام شد. لوله‌های میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۹۶۶۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ، سپس میزان هماتوکریت با استفاده از خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد [23]. غلظت هموگلوبین با روش اسپکتروفتومتری سیانومت هموگلوبین توصیف شده توسط بلکس‌هال در سال ۱۹۷۳ [13] محاسبه شد. پارامترهایی مانند میانگین هموگلوبین در سلول (MCH)، میانگین حجم گلبول‌های قرمز (MCV) و میانگین غلظت هموگلوبین در سلول (MCHC) نیز براساس روابط مربوطه به دست آمدند [1, 20].

به منظور تعیین تعداد افتراقی گلبول‌های سفید شامل هتروفیل (نوتروفیل)، لنفوسیت، ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل، ابتدا گسترش خونی تهیه شد و سپس در معرض هوا خشک شدند. تثبیت گسترش‌های خونی در الکل متانول مطلق به مدت ۸-۵ دقیقه و رنگ‌آمیزی آنها با استفاده از رنگ گیمسا (۱۰٪) در بافر سورنسن در pH برابر ۶/۸ صورت گرفت و در نهایت، شمارش زیر میکروسکوپ نوری انجام شد [22, 24].

برای بررسی وجود بدشکلی در سلول‌های خونی، از نمونه‌ها لام گسترش خونی تهیه شد و با استفاده از میکروسکوپ مجهز به دوربین عکاسی با بزرگ‌نمایی ۴۰X عکس‌برداری صورت گرفت. به منظور اندازه‌گیری ابعاد گلبول قرمز، گسترش خونی به کار رفت. محوره‌های کوچک و بزرگ ۵۰ سلول گلبول قرمز و هسته آنها با استفاده از میکرومتر و میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شدند [25]. مساحت (S) و حجم (V) هسته یا سلول از طریق معادله زیر محاسبه شد [26, 27]:

$$\text{مساحت هسته یا سلول} = a \times b \times \pi/4$$

$$\text{حجم هسته یا سلول} = \left[\frac{a}{2}\right] \times \left[\frac{b}{2}\right]^2 \times \pi \times 4/3$$

در این معادلات a و b به ترتیب محوره‌های بزرگ و کوچک هسته یا سلول را نشان می‌دهند.

ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. پس از انجام آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، آزمون T مستقل برای مواردی که تنها شاخص‌های دو گروه هیپارین و Na₂EDTA مورد مقایسه قرار گرفتند، به کار رفت. در سایر موارد مانند ابعاد گلبولی که مقایسه‌ها برای سه گروه شاهد، هیپارین و Na₂EDTA بود، از آزمون دانکن استفاده شد. تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 صورت گرفت.

یافته‌ها

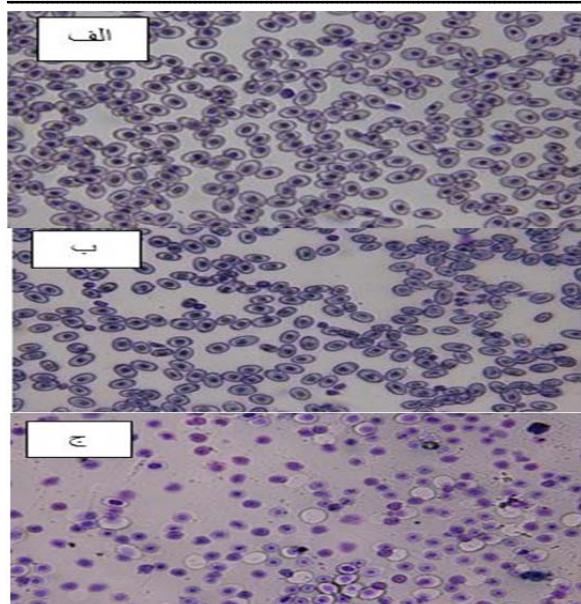
تعداد گلبول‌های قرمز در نمونه حاوی Na₂EDTA به صورت معنی‌داری نسبت به گروه حاوی هیپارین کاهش یافت (p<۰/۰۵). درصد هماتوکریت در تیمار Na₂EDTA به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار هیپارین بود (p<۰/۰۵). تعداد گلبول‌های سفید در دو تیمار هیپارین و Na₂EDTA، تحت تأثیر مواد ضدانعقاد، اختلاف معنی‌داری نشان نداد (p>۰/۰۵). میزان MCV در تیمار Na₂EDTA به صورت معنی‌داری بالاتر از نمونه حاوی هیپارین بود (p<۰/۰۵)، در حالی که MCH و MCHC تفاوت معنی‌داری بین دو

تیمار نشان ندادند ($p > 0.05$; جدول ۱).

در نمونه حاوی هیپارین، اغلب گلبول‌های قرمز طبیعی بودند و خیلی دچار تغییر نشدند، در حالی که گلبول‌های قرمز در نمونه‌های حاوی Na_2EDTA دچار انقباض سلولی شدند. انقباض گلبول‌های قرمز در نمونه‌های خون حاوی Na_2EDTA هم در مساحت و هم در حجم مشهود بود (جدول ۲).

پارگی غشای هسته در نمونه‌های حاوی Na_2EDTA مشاهده شد. در نمونه‌های حاوی هیپارین و گروه شاهد پراکنش سلول‌ها به صورت طبیعی مشاهده شد. در حالی که پراکنش سلول‌ها در نمونه‌های حاوی Na_2EDTA تغییر کرد و سلول‌های متورم و تجزیه شده مشاهده شدند (شکل ۱).

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید اختلاف معنی‌داری در میزان مونوسیت و لنفوسیت بین تیمارها نشان داد ($p < 0.05$). میزان لنفوسیت و مونوسیت در تیمار حاوی Na_2EDTA نسبت به گروه شاهد و نیز تیمار حاوی ماده ضد انعقاد هیپارین به ترتیب بیشتر و کمتر بود. درصد لنفوسیت و مونوسیت بین تیمار هیپارین و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$). در میزان نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) و اختلاف آنها بین تیمارها و گروه شاهد نیز معنی‌دار نبود ($p > 0.05$; جدول ۳).



شکل ۱) الف) تیمار شاهد بدون استفاده از ماده ضد انعقاد، ب) تیمار هیپارین، ج) تیمار Na_2EDTA

جدول ۳) میانگین آماری شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون ماهی استرلیاد تحت تاثیر مواد ضد انعقادی مختلف در مقایسه با گروه شاهد (نمونه خون بدون ماده ضد انعقاد)

گلبول‌های سفید خون	گروه شاهد	گروه هیپارین	گروه Na_2EDTA
لنفوسیت (%)	87.0 ± 0.95^b	87.25 ± 1.72^b	93.25 ± 1.05^a
مونوسیت (%)	6.0 ± 0.5^a	6.25 ± 0.79^a	3.0 ± 0.5^b
نوتروفیل (%)	4.0 ± 0.5^a	4.0 ± 0.9^a	2.0 ± 0.6^b
بازوفیل (%)	0.5 ± 0.12	1.25 ± 0.52	1.0 ± 0.37
ائوزینوفیل (%)	1.0 ± 0.57	0.75 ± 0.36	0.50 ± 0.25

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند، در هر ردیف، وجود حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است ($p > 0.05$)

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات دو ماده ضد انعقاد هیپارین و Na_2EDTA روی ماهی استرلیاد انجام شد. استفاده از مواد ضد انعقاد برای مطالعات خون‌شناسی ماهیان، مرسوم است. هیپارین و Na_2EDTA از رایج‌ترین و پرکاربردترین مواد ضد انعقاد در ماهیان هستند. استفاده از این دو ماده برای مطالعات خون‌شناسی در ماهیان مختلف نتایج متفاوتی را در پی داشته است. در مطالعه حاضر Na_2EDTA باعث کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و بالارفتن میزان هماتوکریت شد. همچنین کاهش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز تیمار حاوی Na_2EDTA مشاهده شد که می‌تواند در نتیجه اثر همولیتیک Na_2EDTA و تخریب تدریجی گلبول‌های قرمز در نمونه‌های حاوی Na_2EDTA باشد. تخریب تدریجی گلبول‌های قرمز در نمونه‌های حاوی Na_2EDTA در مطالعات مختلف در آبزیان [28, 29] و نیز در سایر مهره‌داران [16, 30] گزارش شده است. ماده ضد انعقاد Na_2EDTA باعث تورم سلول، پس از آن تجزیه غشای خارجی گلبول‌های قرمز و در نهایت رها شدن هسته شد. فعالیت همولیتیک Na_2EDTA می‌تواند اثر نامطلوب روی ساختار غشا داشته باشد و نفوذپذیری و استحکام گلبول قرمز را تحت تاثیر قرار دهد [12, 31].

ماده ضد انعقاد Na_2EDTA یون‌های کلسیم (Ca^{2+}) که مسئول فعال کردن پمپ یونی سدیم و پتاسیم غشای سلول هستند را از دسترس خارج می‌کند (رسوب می‌دهد) و این موضوع باعث

جدول ۱) میانگین آماری پارامترهای خون‌شناسی ماهی استرلیاد تحت تاثیر مواد ضد انعقادی مختلف

پارامترهای خون‌شناسی	گروه حاوی هیپارین	گروه حاوی Na_2EDTA
گلبول‌های قرمز (سلول بر متر مکعب)	120.000 ± 8.727^a	84.500 ± 12.353^b
گلبول‌های سفید (سلول بر متر مکعب)	6308.8 ± 911.92	5410.2 ± 103.28
هماتوکریت (%)	23.62 ± 0.89^b	27.05 ± 0.46^a
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)	12.92 ± 1.89	12.20 ± 2.10
MCV (فمتولیتر)	108.09 ± 18.41^b	149.11 ± 30.18^a
MCH (پیکوگرم)	94.81 ± 14.7	111.97 ± 25.22
MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)	17.14 ± 3.39	15.43 ± 1.67

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند، در هر ستون، وجود حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است ($p > 0.05$)

جدول ۲) میانگین آماری ابعاد گلبول قرمز در نمونه‌های خون مختلف حاوی هیپارین، Na_2EDTA و شاهد (نمونه خون بدون ماده ضد انعقاد)

ابعاد گلبول قرمز	گروه شاهد	گروه هیپارین	گروه Na_2EDTA
قطر بزرگ سلول (میکرومتر)	12.06 ± 0.15^b	12.06 ± 0.12^b	14.62 ± 0.13^a
قطر کوچک سلول (میکرومتر)	8.78 ± 0.19^b	8.34 ± 0.14^b	10.7 ± 0.15^a
حجم سلول (میکرومتر مکعب)	475.37 ± 0.13^b	438.76 ± 0.7^b	875.90 ± 0.1^a
مساحت سلول (میکرومتر مربع)	82.17 ± 0.19^b	78.95 ± 0.11^b	122.80 ± 0.3^a
قطر بزرگ هسته (میکرومتر)	5.00 ± 0.08^b	5.06 ± 0.06^b	7.05 ± 0.1^a
قطر کوچک هسته (میکرومتر)	4.25 ± 0.18^b	4.05 ± 0.12^b	5.75 ± 0.12^a
حجم هسته (میکرومتر مکعب)	47.26 ± 0.11^b	67.79 ± 0.12^b	121.59 ± 0.15^a
مساحت هسته (میکرومتر مربع)	16.78 ± 0.13^b	17.87 ± 0.15^b	31.82 ± 0.6^a

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند، در هر ردیف، وجود حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است ($p > 0.05$)

بیوشیمیایی پلاسما، تحت تاثیر مواد ضد انعقاد مختلف با ویژگی‌های ریختی و شمارشی سلول‌های خونی (مورد بررسی در تحقیق حاضر) بتوان با دقت بیشتری ماده ضد انعقاد مناسب‌تر را پیشنهاد کرد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به محدود بودن تعداد نمونه در هر تیمار و نیز دشواری شمارش دقیق تعداد گلبول قرمز، به سبب هسته‌دار بودن گلبول‌های قرمز در ماهیان اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

ماده ضد انعقاد Na₂EDTA بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی استرلیاد، به‌ویژه از منظر ریختی، تاثیر منفی دارد، بنابراین ترکیب ضد انعقاد مناسبی برای آنالیز خون این گونه نیست. هپارین به دلیل ایجاد کمترین تغییرات در شکل، اندازه سلول و نیز اثرگذاری کمتر روی هماتوکریت، ماده ضد انعقادی مناسبی در مطالعات خون‌شناسی ماهی استرلیاد است.

تشکر و قدردانی: از پرسنل محترم آزمایشگاه الزهرا خمینی اصفهان، به سبب راهنمایی‌های ارزنده در زمینه شمارش گلبول‌ها و سنجش برخی پارامترهای خون‌شناسی قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: با آبریان، ماهیان خاویاری در مطالعه حاضر بر مبنای دستورالعمل انجمن شیلاتی ایالات متحده آمریکا و دستورالعمل گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان رفتار شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی میان آنها وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ثاراله زارعی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۵٪)؛ سجاد کریمی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ سالار درافشان (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ فاطمه پیکان‌حیرتی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)

منابع مالی: بخشی از هزینه پژوهش حاضر از محل پژوهانه شماره ۶۳۲/۴۸۲/۵۳ متعلق به سالار درافشان، دانشگاه صنعتی اصفهان تامین شده است.

منابع

- 1- Dorafshan S, Kalbassi MR, Pourkazemi M, Amir BM, Karimi SS. Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. *Fish Physiol Biochem*. 2008;34(3):195-200.
- 2- Olufayo MO. Haematological characteristics of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) juveniles exposed to *Derri elliptica* root powder. *Afr J Food Agric Nutr Dev*. 2009;9(3):920-33.
- 3- Qiang J, Yang H, Wang H, Kpundeh MD, Xu P. Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L.) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;34(1):8-16.
- 4- Kori-Siakpere O, Ubogu EO. Sublethal haematological effects of zinc on the freshwater fish, *Heteroclinus* sp. (*Osteichthyes: Clariidae*). *Afr J Biotechnol*. 2008;7(12):2068-73.
- 5- Razmara P, Paykan Heyrati F, Dorafshan S. Effect of silver nanoparticles on some hematological indices of

می‌شود که غشا اجازه ورود آب به داخل سلول را داده، سپس تورم و متعاقب آن تجزیه سلول رخ دهد^[32]. در حالی که هپارین تغییرات اندکی را در حجم گلبول‌های قرمز و میزان هماتوکریت ایجاد می‌کند. میزان متفاوت هماتوکریت هم به تفاوت در تعداد و هم حجم گلبول‌های قرمز خون مربوط است که به دلیل تغییرات اسمزی رخ می‌دهد^[33]. ماده ضد انعقاد Na₂EDTA می‌تواند باعث اسیدی شدن خون شود که این اتفاق می‌تواند میزان هماتوکریت خون را افزایش دهد^[34]. چنین پدیده‌ای در ماهی کپور معمولی^[9] و^[28] نیز مشاهده شده است. در مطالعه موریس و همکاران^[35] کاهش میزان هماتوکریت در نمونه‌های خون حاوی Na₂EDTA در پستانداران در مقایسه با هپارین گزارش شده است.

طبق نتایج به دست آمده، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید اختلاف معنی‌داری در میزان مونوسیت و لنفوسیت بین تیمارها نشان داد. میزان لنفوسیت بالاتر و مونوسیت پایین‌تر در نمونه Na₂EDTA احتمالاً به دلیل اثرات تخریبی و اختلال‌آمیز Na₂EDTA در تنظیم اسمزی گلبول‌های سفید خون است. مانند آنچه که در مورد گلبول‌های قرمز مشاهده شد، اختلال در تنظیم اسمزی این سلول‌ها می‌تواند موجب تغییر ظاهر و حتی تخریب گلبول‌های سفید شده و با ایجاد اختلال در شناسایی انواع گلبول‌های سفید باعث اشتباه در شمارش و تفکیک افتراقی گلبول‌های سفید شود. در مطالعه حاضر، درصد ناچیزی (حدود ۱٪) از گلبول‌های سفید خون از نوع بازوفیل بودند. یاخته بازوفیل از یاخته‌های متغیر در خون ماهیان است. در برخی گزارش‌ها، فقط این نوع گلبول‌ها در خون ماهیان دریایی گزارش شده است، با این وجود شبگرد و همکاران^[36] بیان کردند که منحصراً بازوفیل‌ها به ماهیان دریایی صحیح نیست و این نوع گلبول‌ها در ماهیان آب شیرین مانند کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز قابل مشاهده هستند، در حالی که در برخی از انواع ماهیان دریایی مانند سوف دریایی (*Dicentrarchus labrax*) مشاهده نمی‌شوند. از طرف دیگر، در خصوص حضور بازوفیل‌ها در گروه‌های مختلف ماهیان خاویاری گزارش‌های متناقضی وجود دارد، به طوری که کاظمی و همکاران^[37] و رکیسیا و همکاران^[38] به ترتیب عدم حضور بازوفیل‌ها را در خون ماهی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاسماهی چینی (*Acipenser sinensis*) مورد تاکید قرار دادند. مدیری^[39] حضور بازوفیل‌ها را در مقادیر بسیار اندک با فراوانی حداکثر تا ۱٪ در خون تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) گزارش کرد. بنابراین به نظر می‌رسد تفاوت بین انواع گونه‌های ماهیان منجر به بروز تفاوت گسترده در محدوده خون‌شناسی ماهیان شود، اگرچه نمی‌توان به اشتباهات مرسوم در تشخیص انواع گلبول‌های سفید از یکدیگر، بی‌توجه بود. چنین اشتباهاتی منجر به بروز تفاوت‌های غیرواقعی در درصد افتراقی گلبول‌ها به‌ویژه در رنگ‌آمیزی عمومی نظیر گیمسا می‌شود و لزوم تبحر و تجربه در شناسایی و نیز رنگ‌آمیزی اختصاصی نظیر پرئودیک‌اسیدشیف (PAS) را الزامی می‌کند^[38, 39].

به نظر می‌رسد انتخاب ماده ضد انعقاد و مدت‌زمان نگهداری، اهمیت فراوانی در آنالیزهای آزمایشگاهی نمونه‌های خون دارد، زیرا پارامترهای خونی تحت تاثیر مستقیم ماده ضد انعقادی هستند^[11]. هر دو ماده ضد انعقاد انتخاب شده در مطالعه حاضر برای بررسی‌های خون‌شناسی متداول هستند، اما نمونه خون حاوی هپارین نسبت به نمونه حاوی Na₂EDTA، به نمونه‌های گروه شاهد بدون مواد ضد انعقادی، نزدیک‌تر بود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی با تلفیق ارزیابی‌های مرتبط با پارامترهای

- 23- Orojoli M, Paykan Heyrati F, Mahboobi Soofiani N, Dorafshan S. Cadmium sub-lethal concentration effects on the haematological parameters of sterlet (*Acipenser ruthenus*). J Fish Sci Technol. 2013;2(2):11-22. [Persian]
- 24- Kazemi R, Pourdehghani M, Yousefi Jourdehi A, Yarmohammadi M, Nasri Tajan M. Physiology of aquatic circulatory system and applied techniques of fish hematology. Rasht: Bazargan; 2010. [Persian]
- 25- Benfey TJ, Sutterlin AM, Thompson RJ. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. Can J Fish Aquat Sci. 1984;41(6):980-4.
- 26- Lemoine Jr HL, Smith LT. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Trans Am Fish Soc. 1980;109(6):626-31.
- 27- Sezaki K, Kobayasi H, Nakamura M. Size of erythrocytes in the diploid and triploid specimens of *Carassius auratus langsdorfi*. Jpn J Ichthyol. 1977;24(2):135-40. [Japanese]
- 28- Witeska M, Wargocka W. Disodium EDTA used as anticoagulant causes hemolysis in common carp blood. Turk J Vet Anim Sci. 2011;35(2):99-104.
- 29- Lătarelu A, Teusdea V, Furnaris F, Bunea R, Mitănescu E. Comparative study of the effect of different anticoagulants on blood cell morphology in common carp (*C. carpio*) and rainbow trout (*O. mykiss*). Bull UASVM Anim Sci Biotechnol. 2013;70(2):284-8.
- 30- Antwi-Baffour S, Quao E, Kyeremeh R, Mahmood SA. Prolong storage of blood in EDTA has an effect on the morphology and osmotic fragility of erythrocytes. Int J Biomed Sci Eng. 2013;1(2):20-3.
- 31- Hattingh J. Heparin and ethylenediamine tetraacetate as anticoagulants for fish blood. Pflügers Archiv. 1975;355(4):347-52.
- 32- Lagunes R, Ruiz L, Frixione E. Contraction of epithelial (MDCK) cells in response to low extracellular calcium is dependent on extracellular sodium. J Muscle Res Cell Motil. 1999;20(8):761-70.
- 33- Alwan SF, Hadi AA, Shokr AE. Alterations in hematological parameters of fresh water fish, *Tilapia zillii* exposed to aluminum. J Sci Its Appl. 2009;3(1):12-9.
- 34- Smit GL, Hattingh J, Schoonbee HJ. Observations on some effects of disodium ethylenediamine tetraacetate and heparin on fish blood. Comp Biochem Physiol C. 1977;57(1):35-8.
- 35- Morris JD, Fernandez JM, Chapa AM, Gentry LR, Thorn KE, Weick TM. Effects of sample handling, processing, storage, and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. Small Rumin Res. 2002;43(2):157-66.
- 36- Shigdar S, Cook D, Jones P, Harford A, Ward AC. Blood cells of Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). J Fish Biol. 2007;70(3):973-80.
- 37- Kazemi R, Yousefi Jourdehi A, Pourdehghani M, Hallajian A, Shenavar Masouleh A, Jalilpour J, et al. Comparative investigation of blood factors in wild Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. J Util Cultiv Aquat. 2012;1(3):29-44. [Persian]
- 38- Zexia G, Weimin W, Yi Y, Abbas Kh, Dapeng L, Guiwei Z, et al. Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. Fish Physiol Biochem. 2007;33(3):213-22.
- 39- Modiri L. A study on cytochemical properties of white blood cells from *Acipenseridae* of Southern Caspian sea [Dissertation]. Tehran: MD Veterinary Science, Islamic Azad University; 2009. [Persian]
- rainbow catfish (*Pangasius hypophthalmus*). Cell Tissue. 2014;5(3):263-72. [Persian]
- 6- Wood BL, Andrews J, Miller S, Sabath DE. Refrigerated storage improves the stability of the complete blood cell count and automated differential. Am J Clin Pathol. 1999;112(5):687-95.
- 7- Guder WG. The quality of diagnostic samples. Blood Gas News. 2001;10:18-24.
- 8- Lippi G, Bassi A, Brocco G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Preanalytic error tracking in a laboratory medicine department: Results of a 1-year experience. Clin Chem. 2006;52(7):1442-3.
- 9- Walencik J, Witeska M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2007;146(3):331-5.
- 10- Ishikawa MM, De Pádua SB, Satake F, Hisano H, Jerônimo GT, Martins ML. Heparin and Na₂EDTA as anticoagulants for hybrid surubim catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): Efficacy and hematological changes. Ciência Rural Santa Maria. 2010;40(7):1557-61. [Portuguese]
- 11- Clark TD, Donaldson MR, Drenner SM, Hinch SG, Patterson DA, Hills J, et al. The efficacy of field techniques for obtaining and storing blood samples from fishes. J Fish Biol. 2011;79(5):1322-33.
- 12- Blaxhall PC. The haematological assessment of the health of freshwater fish. J Fish Biol. 1972;4(4):593-604.
- 13- Blaxhall PC. Error in haematocrit value produced by inadequate concentration of ethylenediamine tetraacetate. J Fish Biol. 1973;5(6):767-9.
- 14- Sala-Rabanal M, Sánchez J, Ibarz A, Fernández-Borràs J, Blasco J, Gallardo MA. Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Fish Physiol Biochem. 2003;29(2):105-15.
- 15- Hattingh J, Smith EM. Anticoagulants for avian and reptilian blood: Heparin and EDTA. Pflügers Archiv. 1976;363(3):267-9.
- 16- Muro J, Cuenca R, Pastor J, Vinas L, Lavin S. Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). J Zoo Wildl Med. 1998;29(1):40-4.
- 17- Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Hennemann C, Tecles F. The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. Vet J. 2004;167(3):294-301.
- 18- Harr KE, Raskin RE, Heard DJ. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. Vet Clin Pathol. 2005;34(4):383-8.
- 19- Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L. Calcium in red blood cells-a perilous balance. Int J Mol Sci. 2013;14(5):9848-72.
- 20- Houston AH. Blood and circulation. In: Schreck CB, Moyle PB, American Fisheries Society (Education Section). Methods for fish biology. Schreck CB, Moyle PB, editors. Bethesda MD: American Fisheries Society; 1990. pp. 273-335.
- 21- Houston AH. Review: Are the classical hematological variables acceptable indicators for fish health?. Trans Am Fish Soc. 1997;126(6):879-94.
- 22- Daneshvar E, Ardestani MY, Dorafshan S, Martins ML. Hematological parameters of Iranian cichlid *Iranocichla hormuzensis*: Coad, 1982 (Perciformes) in Mehran river. An Acad Bras Cienc. 2012;84(4):943-9.