تاثیر 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 تاثیر سه ماده ضد انعقاد مختلف هپارین ۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر، سیترات ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر و Na_2EDTA در غلظتهای ۰/۱، ۰/۵، ۱ میلی گرم بر لیتر بررسی شد. بدین منظور خونگیری از فیل ماهیان پرورشی با میانگین وزنی ۱۰±۱۷۰ گرم بدون استفاده از مواد بیهوشی از طریق قطع باله دمی صورت گرفت. طبق نتایج بدست آمده بیشترین تعداد کل گلبولهای سفید در تیمار Na_2EDTA با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد. شمارش افتراقی گلبولهای سفید نیز اختلاف معنی داری در میزان مونوسیت، لنفوسیت و ائوزوفیل نشان داد ($P\leq$۰/۰۵). میزان هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر) در خون در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P\geq$۰/۰۵). تعداد گلبولهای قرمز(10^6 بر میکرولیتر) در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیترNa_2EDTA به صورت معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) بالاتر از بقیه تیمارها بود. میزان MCH (پیکوگرم) ، MCV (فمتولیتر) و MCHC (٪) در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیترNa_2EDTA بالاتر از تیمارهای هپارین و سیترات بود. هم چنین 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 وNa_2EDTA در فیل ماهی دریای خزر می‌باشد که بهتر است در مطالعات خون شناسی مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: فیل ماهی، مواد ضد انعقاد، پارامترهای خونی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۱-۴۴۲۷۰۴۰، پست الکترونیکی: rsafari@gau.ac.ir

مقدمه

بافت خون ماهی اطلاعات کلیدی و دقیقی در زمینه فیزیولوژی و شرایط محیطی موجود، در اختیار محققین قرار می دهد. 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 است. دمای محیط و شرایط استرس زا به خصوص استرس زمان خون گیری، سرعت لخته شدن خون را افزایش می دهند. بنابراین جهت کسب نتایج دقیق آنالیزهای خونی، استفاده از مواد ضد انعقاد ضروری است. نمک سدیم و پتاسیم اتیلن ترا استیک 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 می باشند. هنوز ماده ضد انعقاد کاملی که تاثیرات چندانی بر بافت خون

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 حالی‌که اکسالات و سیترات pH خون را اندکی قلیایی می‌نماید. خاصیت شلاتی خون میزان کلسیم و دیگر یونهای دو ظرفیتی را کاهش می‌دهد، در حالی‌که بر یونهای تک ظرفیتی تاثیری ندارد. به کارگیری غلظت و حجم مناسب مواد ضد انعقاد این تغییرات را کاهش می‌دهد. درخون شناسی انسانی، هپارین به جهت نوع رنگ آمیزی، برای تهیه گسترشهای خونی و به جهت لخته کردن لوکوسیتها برای شمارش WBC به کاربرده نمی‌شود درحالی‌که 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 لایه-های سلولی موجب القا همولیز در بعضی گونه‌ها (۱۰) و موجب بد شکلی در اریتروسیتها و کاهش تنوع لوکوسیتها در ماهی می گردد (۱۹). از آنجا که بررسی فاکتورهای خون شناسی از ارکان اساسی بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی، بیماریها و .... آبزیان می باشد 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 خون شناسی 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 آبزی پروری دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با تغذیه از غذای بیومار بر مبنای ۲درصد وزن بدن به وزن ۱۰±۱۴۸/۵ 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 دمی (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 میلی‌گرم در لیتر Na_2EDTA (غلظت نهایی در خون) قرارداده 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 میکروهماتوکریت و نیز سانتریفوژ میکروهماتوکریت 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 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 گلبول های سفید شامل هتروفیل (نوتروفیل)، لنفوسیت، ائوزینوفیل، مونوسیت و بازوفیل به

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

$$MCV = \frac{\text{حجم گلبول قرمز} \times 10}{\text{تعداد گلبولهای قرمز بر حسب میلیون}}$$

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

$$MCHC = \frac{\text{هموگلوبین} \times 10}{\text{حجم گلبول قرمز}}$$

شکنندگی 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.

تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملا 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 اندازه گیری شده آب در تیر ماه (۲۶درجه سانتیگراد) بدست آمد. همچنین pH آب ۷/۸۵±۰/۱۳ اندازه گیری شد. بالاترین میزان اکسیژن محلول در ابتدای دوره ، برابر۵/۹ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان اکسیژن محلول در پایان دوره آزمایش، برابر ۴ میلی گرم در لیتر ثبت گردید میانگین درجه حرارت، pH و اکسیژن آب طی دوره های زمانی نمونه برداری در جدول ۱ خلاصه شده است.

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

زمان(هفته) / متغیر	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
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

جدول۲ - پارامترهای خونی (گلبول سفید، ائوزینوفیل، بازوفیل، مونوسیت، هتروفیل، لنفوسیت ومونوسیت) فیل ماهی تحت تاثیر هپارین (۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر)، سیترات (۰/۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر) و Na_2EDTA (غلظتهای۰/۱، ۰/۵ و۱ میلی گرم 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_2EDTA (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_2EDTA (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_2EDTA (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$۰/۰۵).

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 و۱ میلی گرم بر میلی لیتر)

مواد ضد انعقاد	گلبولهای قرمز ($10^6/\mu L$)	هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	هماتوکریت(%)
هپارین	۱/۷±۰/۱^a	۸/۶۵±۰/۲۵^b	۲۳/۴±۰/۹۶^b
سیترات	۱/۵۲±۰/۱^a	۸/۱۱±۰/۱۱^a	۱۹/۷±۰/۲۵^a
Na_2EDTA (غلظت ۰/۱)	۲/۰۴±۰/۱۳^b	۱۰/۶۸±۰/۱۳^c	۲۶/۷±۰/۶۴^c
Na_2EDTA (غلظت ۰/۵)	۱/۷±۰/۱ ^{a}	۱۰/۵۳±۰/۱^c	۲۸/۴±۰/۴۶^d
Na_2EDTA (غلظت ۱)	۱/۵۷±۰/۱ ^{a}	۱۰/۸۳±۰/۱۵^c	۲۷/۲۳±۰/۲۵^c

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

بر طبق نتایج بدست آمده از شمارش گلبولهای سفید در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ($P\leq$۰/۰۵) و بیشترین تعداد کل گلبولهای سفید در تیمار Na_2EDTA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر اندازه-گیری شد. شمارش افتراقی گلبولهای سفید نیز اختلاف معنی‌داری در میزان مونوسیت، لنفوسیت و ائوزوفیل نشان داد ($P\leq$۰/۰۵). درصد هتروفیل و بازوفیل بین گروههای مختلف تیمار شده با مواد ضد انعقاد متفاوت اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P\geq$۰/۰۵) . اما میزان هتروفیل (۰/۲±۲۰/۲۳) و بازوفیل (۰/۰±۱/۳) به ترتیب در تیمارهای ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سیترات و۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر Na_2EDTA بالاتر از تیمارهای دیگر بود. درصد لنفوسیت در تیمار ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA بالاتر از غلظتهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA، هپارین و سیترات با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول۲).

درصد هماتوکریت بدست آمده در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA به طور معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) بالاتر از ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA، هپارین و سیترات با غلظت ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول۲).

میزان هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر) در خون در تیمار ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA بالاتر از تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTA بود، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود ($P\geq$۰/۰۵). تعداد گلبولهای قرمز (10^6 بر میکرولیتر) در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Na_2EDTAبه صورت معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) بالاتر از بقیه تیمارها بود. هم چنین میزان MCH ، MCV و MCHC غلظت متوسط هموگلوبین در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۱و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیترNa_2EDTA بالاتر از تیمارهای هپارین و سیترات بود (جدول۳).

بحث

با توجه به تاثیر خصوصیات فیزیکوشیمیایی 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 معنی‌داری بر میزان گلبولهای قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در این گونه موثر است. Tavares-Dias و Sandrim (۱۹۹۸) نتایج مشابهی دربررسی تاثیرهپارین وEDTA بر فاکتورهای خونی *Colossoma macropomum* مشاهده نمودند (۲۸).

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 Na_2EDTA میزان هماتوکریت، هموگلوبین، هموگلوبین متوسط گلبولی، حجم متوسط گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین بالاتری را نسبت به تیمارهای هپارین وسیترات نشان دادند. در بین گروههایی که تحت تیمارهای Na_2EDTA قرار داشتند، به ترتیب گروه با تیمار۰/۰،۱/۱،۵ 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 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 می دهد 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 *Oreochronis aureus* نسبت به نمونه های بدون تیمارآن را مشاهده کرد (۴).

جدول۴- پارامترهای خونی (هموگلوبین متوسط گلبولی(%) ، حجم متوسط گلبولی (پیکوگرم) و غلظت متوسط هموگلوبین (فمتولیتر) فیل ماهی تحت تاثیر هپارین (۱۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر)، سیترات (۰/۳ میلی گرم برمیلی لیتر) و Na2EDTA در غلظتهای۱/۰،۵/۰،۱/۰ میلی گرم بر میلی لیتر)

مواد ضد انعقاد	هموگلوبین متوسط گلبولی (%)	حجم متوسط گلبولی (پیکوگرم)	غلظت متوسط هموگلوبین (فمتولیتر)
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_2EDTA (غلظت ۰/۱)	۳۰±۰/۸^{ab}	۵۲/۳۶±۳/۸^{a}	۱۳۹/۱±۱۱/۳۷^{a}
Na_2EDTA (غلظت ۰/۵)	۳۷±۰/۳^{bc}	۶۰/۹۳±۵/۳^{b}	۱۶۴/۲۶±۰/۳^{b}
Na_2EDTA (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\leq$۰/۰۵).

Walencikو Witeska (۲۰۰۷) همچنین، نتایج مشابهی را در پارامترهای خون شناسی تحت تاثیر تیمارهای مختلف در ماهی کپورمشاهده کردند و اعلام نمودند، میزان تغییرات در تیمارهای Na_2EDTA بالاتر از سیترات و هپارین می‌باشد (۳۰). اما مطالعات در پستانداران نشان می‌دهد که بین 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 مولکولی۱۲کیلودالتون مشاهده شود. هپارین با وزن مولکولی زیر۵کیلو دالتون فعالیت ضد انعقادی قابل اغماضی (۵۰ واحد بین المللی) را نشان می دهد (۲۰). هپارین همچنین به عنوان بازدارنده بعضی آنزیمها از جمله

میوزین ATPase (۷و 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 و۱۵) 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 هیرودین، 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 برتعداد گلبولهای سفید و تعداد انواع مختلف آنها به جز بازوفیلها و هتروفیلها را نشان داد. پارامترهای اندازه گیری شده با استفاده از تیمار Na_2EDTA در همه غلظتها (۰/۱، ۰،۱/۵) 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 نشانه های همولیز (تغییر رنگ پلاسما) بعد از ۳-۲ ساعت ابتدا در تیمارهای Na_2EDTA مشاهده شد. حتی کمترین غلظت Na_2EDTA (۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شکنندگی اسمزی اریتروسیتهای 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 Na_2EDTA حساسیت بالایی را به همولیز نشان دادند. شدت تغییر رنگ در تیمارهای Na_2EDTA 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 Ca^{2+} باعث افزایش حساسیت سلولها به لیز شدن و کاهش انعطاف پذیری لایه‌های سلولی می‌گردد (۱۲).

Na_2EDTA 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 (۱۰واحد بین المللی) نسبت به سایر مواد ضد انعقاد به کار رفته جهت جلوگیری از انعقاد خون فیل ماهی مناسب تر است.

منابع

۱. جوهری, س. ع.، و کلباسی، م. ر.، ۱۳۸۵. بررسی برخی تغییرات سلولهای خونی در ماهیان تریپلویید قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhyncus mykis*)، مجله علمی زیست شناسی ایران، جلد ۱۹، شماره ۴. صفحات ۴۹۲-۴۹۵.

۲. شاهسونی، د.، ثوقی، غ.، و خضرایی‌نیا، پ.، ۱۳۷۸. تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی اوزون برون (Acipenser stellatus)در سواحل جنوب شرقی دریای خزر. مجله پژوهش سازندگی. سال۱۲. جلد۳، شماره ۴۴. صفحات۱۳۰-۱۲۶.

۳. کردجزی، م.، و ایمان پور، م. ر.، ۱۳۸۹. ارتباط میان برخی پارامترهای بیوشیمیایی آب و سرم خون در ماهی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)*.جلد ۲۳، شماره ۴. صفحه ۶۰۴-۵۹۶ .

4. 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

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. Considerations of blood parameters of largemouth bass, *Micropterus salmonides*. J. Fish. Res. Bd. Can., Vol. 14. PP: 47-158.

7. Cruz, W. O., and Dietrich, C. P., 1967. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. Proc. Soc. Exp. Biol.

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. Cinncia 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 B_{12} 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, 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 Resourses, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

Hematological parameters and osmotic fragility in *Huso huso* blood collected on three anticoagulants, heparin (10 IU/mL), Na_2EDTA (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 Na_2EDTA (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 Na_2EDTA ($p \geq 0.05$). RBC in Na_2EDTA (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 Na_2EDTA 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