اثر ضد انعقادی هپارین و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید(EDTA) بر پارامترهای خونی ماهی ماکرو(*Labidochromis caeruleus*)

غفاری نافچی، زهرا*[1]. ابراهیمی درچه، عیسی[2]. درافشان، سالار[3].

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

(Email:z.ghafari1991@gmail.com) *

چکیده

در این مطالعه اثر دو ماده‌ی ضد انعقادی هپارین (۱۰IU/ml) و نمک سدیم دار EDTA (۰/۰۵ mgr/ml) بر پارامترهای خونی ماهی ماکرو بررسی شد. برای انجام این مطالعه، از ماهیان ماکرو با میانگین وزنی ۰/۴۸±۵/۱۹ گرم استفاده شد. بدون بیهوشی با سرنگ آغشته به غلظت مشخص از مواد ضد انعقادی مورد آزمایش از محل ساقه دمی خون‌گیری بعمل آمد و برای بررسی پارامترهای خونی مورد استفاده قرار گرفت. بررسی پارامترهای مختلف خونشناسی نشان داد که استفاده از دو ماده ضد انعقاد هپارین و EDTA منجر به بروز اختلاف معنی دار درهیچ یک از پارامترها نمی‌شود (P<۰/۰۵). با این وجود مقادیر هموگلوبین، گلبول قرمز، گلبول سفید و MCHC(میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای) در تیمارEDTA بالاتر از تیمار هپارین بود (P<۰/۰۵). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در مقادیر لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها بود (P<۰/۰۵). همچنین با مطالعه‌ی گسترش‌های خونی اندکی بد شکلی در گلبول‌های قرمز مشخص شد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان داشت که EDTA در غلظت کمتر از ۲ میلی گرم در میلی‌لیتر می‌تواند برای ارزیابی سلول‌های خونی به کار رود، اما برای شمارش افتراقی هپارین ماده مناسب‌تری است.

کلیدواژه‌ها: ماکرو، ضد انعقاد، پارامترهای خونی، گلبول سفید، گلبول قرمز

مقدمه

مطالعه خصوصیات فیزیولوژیکی و خون شناسی ماهی‌ها به ویژه در ارتباط به استفاده از آن‌ها در تشخیص و بهبود شرایط بیمارگونه (از جمله اثرات مخرب عفونت‌ها) از ابزارهای مهم برای توسعه‌ی سیستم آبزی‌پروری موفق می‌باشد. پارامترهای خونی یک ابزار مهم در نظارت بر کیفیت محیط زیست، آلودگی آب، وضعیت فیزیولوژیکی و شرایط سلامت موجودات آبزی می‌باشد (Maqbool et al., 2014). نتایج به دست آمده از تعیین پارامترهای خونی تحت تاثیر تکنیک‌های آزمایشگاهی، ذخیره سازی و حمل نمونه‌های خونی بین زمان جمع آوری و زمان ارزیابی در آزمایشگاه می‌باشد (Clark et al., 2011). علاوه بر این، چون خون ماهی به سرعت لخته می‌شود و یا ماهی تحت شرایط استرس مربوط به روش‌های تجربی است انعقاد سریع‌تر اتفاق می‌افتد، استفاده از مواد ضدانعقاد برای بدست آوردن نتایج قابل اعتماد از تجزیه و تحلیل خون لازم است (Korcock et al., 1988). ضدانعقادهای معمول در خون انسان شامل

نمک‌های سدیم و پتاسیم ترا استیک اتیلن (ETDA)، هپارین و سدیم سیترات است. نتایج حاصل مطالعات خون شناسی از چندین گونه ماهی، منتشر شده بین سال‌های ۲۰۰۳-۱۹۶۰ نشان داد که هپارین یکی از شایع‌ترین ضد انعقادهای مصرفی (۸۰٪) است. پس از هپارین EDTA (۱۲٪) و در نهایت سدیم سیترات (۴٪) استفاده می‌شود (Walencik and Witeska, 2007). هپارین به طور طبیعی در یاخته‌های ماستوسیت[1]، بافت همبند و سایر بافت‌ها وجود دارد و به عنوان یک ضد ترومبین (نوعی آنزیم پروتئاز) و ترمبوپلاستین (نوعی پروتئین پلاسمائی) عمل می‌کند و تمایل جذبی خاصی با پروتئین‌های خون دارد، در نتیجه مانع انعقاد خون می‌شود. این ماده به دلیل تجمع و رنگ پذیری یاخته‌های سفید برای تهیه گسترش خونی و ریخت شناسی یاخته‌ها و نیز آزمایش‌های سرولوژی مناسب نمی‌باشد. خاصیت ضد انعقادی هپارین به مدت ۸ ساعت پایداری دارد.

اتیلن دی آمین ترا استات ماده ضد انعقادی است که عمل انعقاد خون را از طریق ترکیب یون‌های کلسیم مورد نیاز با ترمبوپلاستین جهت تبدیل پروترومبین به ترومبین انجام می‌دهد. در واقع این آنزیم است که سبب انعقاد خون می‌شود. اتیلن دی آمین ترا استات به دلیل تاثیر و تخریب جزئی ساختار یاخته‌ای خون و عدم ایجاد تغییرات مهم در اشکال یاخته‌ای و ترومبوسیت‌ها به عنوان یک ضد انعقاد انتخابی مورد استفاده قرار می‌گیرد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

مواد و روش ها

پس از سازگاری دو هفته‌ای ماهیان ماکرو(*Labidochromis caeruleus*) با شرایط آزمایشگاهی، ماهی‌ها به میزان دو درصد وزن بدن و دوبار در روز غذادهی شدند. ۲۴ ساعت قبل از خونگیری غذادهی ماهیان قطع شد و بدون استفاده از ماده بیهوشی با استفاده از سرنگ‌های آغشته شده به ماده‌های ضد انعقادی هپارین و EDTA به صورت جداگانه از محل ساقه دمی خونگیری شدند. زمان دستکاری ماهیان بیش از ۳ دقیقه طول نکشید. میزان هماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و نیز سانتریفوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور 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 رقیق‌سازی با محلول هایم و لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری انجام شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید شامل مونوسیت و لنفوسیت 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 تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ مجهز به دوربین عکاسی با بزرگ‌نمایی ۴۰X عکس‌برداری شدند. برای تعیین میزان پارامترهایMCH، MCV و MCHC از روابط زیر استفاده شد:

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

۱- نوعی گلبول سفید

تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 22، برای مقایسه گروه های از آزمون t، ANOVA یک طرفه و برای گروه‌بندی تیمارها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

بر طبق نتایج جدول۱، در هیچ یک از پارامترهای خونی بین تیمارهای هپارین و EDTA تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P<۰/۰۵). اما باین وجود بیشترین مقادیر هموگلوبین، گلبول‌های قرمز و MCHC در تیمار EDTA مشاهده شد.

جدول ۱. پارامترها خونی ماهی ماکرو تحت تاثیر مواد ضد انعقادی مختلف(خطای استاندارد±میانگین)

مواد ضدانعقاد	هموگلوبین (g/dl)	هماتوکریت(٪)	گلبول‌های قرمز ($۱۰^{۶}/mm^3$)	گلبول‌های سفید (mm^3)	MCV (فمتولیتر)	MCH (پیکوگرم)	MCHC (٪)
هپارین(۱۰IU/ml)	۴/۴۴±۰/۲۳	۲۴/۳۳±۱/۷۴	۱/۵۳±۰/۲۷	۴۵۱۳/۷±۹۱۸/۷	۱۶۹/۵۶±۳۱/۷۴	۳۱/۹۱±۷/۹۳	۱۸/۵۱±۱/۸۹
EDTA(۰/۰۵mgr/ml)	۵/۱۷±۰/۶۱	۲۰/۱۷±۰/۴۴	۲/۵۴±۰/۲۶	۴۶۸۷/۳±۹۰۲/۱۱	۸۱/۲۲±۹/۸۱	۲۰/۵۵±۲/۴۳	۲۵/۶۱±۲/۹۱

مطابق نتایج ارایه شده در جدول۲، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید اختلاف معنی داری در میزان لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها نشان نداد (P<۰/۰۵). مقایسه اشکال گلبولی در گسترش خونی ناشی از ضدانعقاد هپارین و EDTA بیانگر تخریب دیواره سلولی گلبول ها و تغییر شکل آنها پس از مجاورت با EDTA بود.

جدول۲. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید ماهیان ماکرو تحت تاثیر مواد ضد انعقادی مختلف(خطای استاندارد±میانگین)

مواد ضد انعقاد	لنفوسیت٪	مونوسیت٪
هپارین	۸۱±۳/۰۶	۱۴±۳/۰۶
EDTA	۶۶/۶۷±۱,۷۶	۳۱±۴/۱۶

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از هموگلوبین، گلبول‌های قرمز و گلبول سفید نشان دهنده‌ی بالاتر بودن تعداد آن‌ها در تیمار EDTA بود.یافته-های حاصله با نتایج Faggio و همکاران (۲۰۱۴) در توافق کلی است. ایشان گزارش کردند بالاتر بودن میزان هموگلوبین در تیمارهایی که ماده‌ی ضد انعقاد آن‌ها EDTA بوده است ناشی از تعداد گلبول‌های قرمز بیشتر می‌باشد که نشان دهنده‌ی یک حفظ بهتر از سلول‌های خونی در این تیمار است. مقادیر مختلف گلبول سفید در تیمارهای مختلف ماده‌ی ضدانعقاد ممکن است به این دلیل باشد که گلبول‌های سفید، حضور ماده‌ی ضد انعقاد را به عنوان جسم بیگانه تلقی کرده و سلول‌ها را تحریک می‌کند و در نتیجه سلول‌ها، گلبول سفید بیشتری جهت مبارزه علیه آن‌ها و نیز به عنوان دفاع از خود تولید می‌کند. اطلاعات مربوط به اثرات ضد انعقادی در سلول‌های سفید خون بسیار اندک می‌باشد. واکنش سلول‌های خونی از گونه‌های مختلف حیوانات به مواد ضد انعقاد ممکن است متفاوت باشد (Faggio et al., 2014). مطالعات انجام شده در چند ماهی نشان داده است که سلول‌های خونی توسط EDTA، هپارین و سیترات سدیم تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد اما EDTA و سیترات زیست پذیری سلول‌های سفید خونی را

کاهش می‌دهد (Walencik and Witeska, 2007; Adeyemo *et al.*, 2009). هر چند توضیح دادن این تفاوت‌ها مشکل است، اما ممکن است در نتیجه‌ی ظرفیت بافری مختلف از خون یا حساسیت‌های مختلف غشاهای سلولی به کاهش مواد آهکی (کلسیم گیری) خارج سلولی به علت کی لیت شدن Ca^{2+} توسط ضدانعقادها باشد.

افزایش هماتوکریت در تیمارهای EDTA در مطالعات Maqbool وهمکاران(۲۰۱۴) بر روی *Mugil cephalus*، Faggio و همکاران (۲۰۱۴) بر روی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)و ایمانپور و همکاران (۱۳۹۲) بر روی فیل ماهی جوان (*Huso huso*) مشاهده شد که علت آن تورم گلبول‌های قرمز، anisocytosis (اندازه سلول نابرابر) و anisonucleosis (اندازه هسته نابرابر) بود این وضعیت که باعث همولیز گلبول‌های قرمز نیز می‌شود در حالی که هیچ تغییر قابل توجهی در تیمارهای هپارین مشاهده نگردید. در نتایج Ishikawa و همکاران (۲۰۱۰) نیز افزایش هماتوکریت در EDTA مشاهده شد که بیان داشتند نمک EDTA می‌تواند باعث اسیدی شدن و افزایش فشار CO_2 شود، که می‌تواند باعث افزایش ارتفاع در سطح هماتوکریت شود (Smit et al., 1997). کاهش هماتوکریت در نمونه‌های خون پستانداران توسط Morris و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش شده است. Hanley و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که EDTA میزان هماتوکریت را در خون ایگونای سبز (نوعی خزنده) تحت تاثیر قرار نمی‌دهد که در توافق با نتایج این بررسی است. در تحقیق حاضر بیشترین مقدار هماتوکریت در ضدانعقاد هپارین مشاهده شد. به طور کلی نتایج نشان می‌دهداستفاده از غلظت‌های بالاتر از ۲ میلی گرم در میلی لیتر اتیلن دی آمین تترا استات در نمونه خون، سبب اختلال در محاسبه هماتوکریت می‌شود. این میزان باعث کاهش pH و افزایش اندک دی اکسید کربن (PCO_2)، همولیز یاخته‌های خون، تغییر در تعادل بین اکسیژن و خون(اثر القایی روت) و تغییر معنی‌دار در فشار اکسیژن خون می‌گردد. بنابراین در مصرف EDTA باید به میزان غلظت ماده مصرفی توجه خاصی شود. مقادیر MCV، MCH و MCHC نیز با نتایج Faggio و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد.

شمارش افتراقی تعداد سلول‌های لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها در بین تیمارهای هپارین و EDTA تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند($P<۰/۰۵$). این نتایج در توافق با نتایج حاصل از تحقیقات Walencik and Witeska (2007) بر روی کپور معمولی (*Cyprinus carpio L.*) است.

در کل می‌توان گفت برای بررسی فاکتورهای خونی ماهی ماکرو می‌توان از EDTA (با توجه به دردسترس بودن آن، سهولت آماده سازی، استفاده گسترده و هزینه نسبتا پایین)، در دوزهای پایین استفاده کرد (Perrotta et al,. 1998).

منابع

۱- ایمانپور، محمدرضا.، صفری، رقیه.، اسعدی، رضا. ۱۳۹۲. تأثیر مواد مختلف ضدانعقاد بر برخی فاکتورهای خون-شناسی فیل ماهیان جوان (*Huso huso* Linnaeus, 1758). مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۶(۴): ۴۱۳-۴۰۶.

۲- کاظمی، رضوان اله.، پوردهقانی، محمد.، یوسفی جوردهی، ایوب.، یارمحمدی، مهتاب.، و نصری تج ، مهرداد.۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات رشت : بازرگان. ۱۹۳صفحه.

3- Adeyemo, O.K., Okwilagwe, O.O., and Ajani, F. 2009. Comparative assessment of sodium EDTA and heparin as anticoagulants for the evaluation of haematological parameters in cultured and feral african catfish (*Clarias gariepinus*). Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, 13: 19-24.
4- Clark, T.D., Donaldson, M.R., Drenner, S.M., Hinch, S.G.,Patterson, D.A., Hills, J., Ives, V., Carter, J.J., Cooke, S.J. and Farrell, A.P. 2011. The efficacy of field techniques for obtaining and storing blood samples from fishes, Journal of Fish Biology, 79: 1322-1333.
5- Faggio, C., Arfuso, F., Piccione, G., Zumbo, A., and Fazio, F. 2014. Effect of Three Different Anticoagulants and Storage Time on Haematological Parameters of *Mugil cephalus* (Linneaus, 1758), Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 14: 615-621.
6- Hanley, C., Hernandez-Divers, S.J., Bush, S. and Latimer, K.S. 2004. Comparison of the effects of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 35: 328-332.
7- Ishikawa, M.M., Pádua, S.B.D., Satake, F., Hisano, H., Jerônimo, G.T., and Martins, M.L. 2010. Heparin and Na2EDTA as anticoagulants for hybrid surubim catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): efficacy and hematological changes. Ciência Rural, 40(7):1557-1561.
8- 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. Journal of Fish Biology, 33: 319-330.
9- Maqbool, A., Ahmed, I., and 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.
10- Morris, J.D., Fernandez, J.M., Chapa, A.M., Gentry, L.R., Thorn, K.E. and Weick, T.M. 2002. Effects of sample handling, processing, storage, and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. Small Ruminant Research, 43: 157-166.
11- Perrotta, G., Roberts, L., Glazier, J., and Schumacher, HR. 1998. Use of sodium citrate anticoagulant for routine hematology analysis on the CELL-DYN [R] 4000: An opportunity to enhance efficiency in the clinical laboratory. Laboratory Hematology, 4:156-162.
12- Smit, G.L., Hattingh, J., and Schoonbee, H.J. 1977. Observations on some effects of disodium ethylenediamine tetra-acetate and heparin on fish blood. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Comparative Pharmacology, 57(1):35-38.
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 and Pharmacology, 146(3), 331-335.