بررسی برخی فاکتورهای خونی آزاد ماهی دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

حمید رضا جمالزاده[۱] ـ امین کیوان[۲] ـ شهلا جمیلی[۳] ـ شهربانو عریان[۴] و علی اصغر سعیدی[۵]

jamalzadeh569@yahoo.com

۱ ـ دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن کد پستی: ۴۶۸۱۷
۲ و ۴ ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران صندوق پستی: ۱۸۱-۱۹۵۸۵
۳ ـ موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵
۵ ـ مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

تاریخ دریافت : مرداد ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش : بهمن ۱۳۸۰

چکیده

برای مقایسه فاکتورهای خونی بین ماهیان نابالغ و مولد ماهی آزاد دریای خزر از ۵۵ عدد ماهی نابالغ و ۲۱ عدد ماهی مولد خونگیری بعمل آمد. متوسط میزان هموگلوبین در نابالغین ۷/۲ گرم در دسی‌لیتر و در مولدین ۹/۷۸ گرم در دسی‌لیتر و متوسط میزان هماتوکریت در نابالغین ۳۴/۱ درصد و در مولدین ۳۹/۲ درصد محاسبه شد. تعداد متوسط گلبولهای قرمز در ماهیان نابالغ ۹۳۴۳۰۰ عدد در میلیمترمکعب خون و در مولدین ۱۳۰۶۲۰۰ عدد در میلیمترمکعب خون شمارش شد. متوسط گلبولهای سفید در ماهیان نابالغ ۸۳۸۰ عدد در میلیمترمکعب و در ماهیان مولد ۶۲۱۹ عدد در میلیمترمکعب خون و متوسط پلاکتها نیز در ماهیان نابالغ ۲۱۲۸۰ عدد در میلیمترمکعب خون و در مولدین ۱۳۱۵۹ عدد در میلیمترمکعب خون تعیین شد. تعداد گلبولهای سفید و پلاکتها در ماهیان نابالغ بیشتر از ماهیان مولد بوده است. نتایج محاسبه اندیسهای خونی نیز به این ترتیب بود که مقدار میانگین MCV[۱] در

1 - Mean Carpuscular Volume

ماهیان نابالغ ۳۸۵/۴ فمتولیتر و در ماهیان مولد ۳۰۲/۹ فمتولیتر، میانگین MCH[1] در ماهیان نابالغ ۸۲/۰ و در ماهیان مولد ۷۵/۵ پیکوگرم و متوسط MCHC[2] در نابالغین ۲۱/۶ درصد و در مولدین ۲۵/۶ درصد بوده است. درشمارش افتراقی گلبولهای سفید، لنفوسیت‌ها بترتیب در نابالغین ۹۶/۱ درصد و در مولدین با ۶۹/۹ درصد اولین گروه و نوتروفیل‌ها در نابالغین با ۳/۴ درصد و در مولدین با ۲۹/۴ درصد دومین گروه را تشکیل می‌دادند. متوسط مونوسیت در نابالغین کم و حدود ۰/۵۲ و در مولدین ۱/۱۴ درصد بوده است. ائوزینوفیل و بازوفیل دیده نشد. متوسط زمان انعقاد در ماهیان مولد ۱۹۱/۴ ثانیه بوده است. در ماهیان نابالغ از ۲۱ عدد و در ماهیان مولد از ۹ عدد برای تعیین ESR[3] خونگیری بعمل آمد، که مقدار آن بین ۱ و ۲ میلیمتر در ساعت متغیر بوده است.

لغات کلیدی: آزاد ماهی دریای خزر، *Salmo trutta caspius*، فاکتورهای خونی

مقدمه

علم هماتولوژی در زمینه ماهیان حدوداً از دهه ۸۰ میلادی کار خود را آغاز کرده و روند روبه پیشرفت سریعی داشته است و از آنجایی که هر گونه ماهی دارای الگوی خونی خاصی است این امر به مشکلات کار خون‌شناسی آنها افزوده است. بطور کلی کاربرد این علم علاوه بر مشخص کردن وضعیت فیزیولوژیک سلولهای خونی، بیشتر در امر تشخیص بیماریهاست که در آن با خون‌گیری از ماهی و تعیین پارامترهای خونی و مقایسه با شرایط طبیعی، می‌توان تاحدی از آن بعنوان یک ابزار پارا کلینیکی در تشخیص بیماری استفاده کرد و در امر درمان آن کوشید. برای اولین بار در روسیه در سال ۱۹۸۳، ایوانوا اطلس خون‌شناسی ماهیان خاویاری را ارائه نمود. در ایران نیز کارهای خون‌شناسی روی ماهیان، بخصوص ماهیان خاویاری انجام شده است که از میان آنها می‌توان به بررسی و مقایسه سلول‌های خونی سفید و شمارش افتراقی آنها در ماهیان قره‌برون و دراکول (سعیدی و همکاران، ۱۳۷۸) و تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی

1 - Mean Carpuscular Hemoglobin

2 - Mean Carpuscular Hemoglobin Concentration

3 - Erythrocyte Sedimentation Rate

ازون‌برون در سواحل جنوب شرقی دریای خزر (شاهسونی و همکاران، ۱۳۷۷) اشاره نمود. در کشورهای دیگر مانند کانادا، نروژ و آلمان نیز کارهایی روی فاکتورهای خونی آزاد ماهیان انجام گرفته و تغییرات فیزیولوژیک در آنها با تغییر فصل، درجه حرارت و اثر مواد شیمیایی مورد بررسی قرار گرفته است (سعیدی و همکاران، ۱۳۷۸).

ماهی آزاد دریای خزر از خانواده آزاد ماهیان (Salmonidae) است. از آنجا که این ماهی، از نظر اقتصادی باارزش بوده و ذخایر آن می‌رفت که در سالهای اخیر از آمار شیلات حذف شود. در این راستا برای احیاء و بازسازی ذخایر این ماهی، نقش کارگاه شهید باهنر کلاردشت و رهاسازی بچه ماهیان آزاد در رودخانه‌های حوزه جنوبی، غیرقابل انکار است. در این پروژه مقدار طبیعی فاکتورهای خونی این ماهی در دو رده سنی نابالغین و مولدین شناسایی شد و با هم مقایسه گردید تا در هنگام بروز بیماری بتوان با خون‌گیری از ماهیان بیمار و مقایسه با این مقدار نرمال، در امر تشخیص بیماری و ارائه روشهای کنترل آن برنامه‌ریزی کرد.

مواد و روشها

از ۵۵ عدد ماهی نابالغ با سن ۳ تابستانه (نگهداری شده در مرکز شهید باهنر کلاردشت) در مهر ماه و آبان ماه ۱۳۷۹ و ۲۱ عدد ماهی مولد ۹ عدد نر و ۱۲ عدد ماده پس از تکثیر در دی ماه ۱۳۷۹، خون‌گیری شد و آنالیز آن انجام گرفت. برای این منظور ماهی‌ها را در محلول MS222 قرار داده و پس از بیهوشی، ابتدا بیومتری شدند و سپس خون‌گیری از ناحیه ساقه دمی انجام گرفت. یک میلی‌لیتر خون به ویالی که در آن یک قطره هپارین وجود داشت ریخته شد و برای انجام آزمایش E.S.R، ۱/۶ میلیمترمکعب خون نیز به یک لوله آزمایش که در آن ۰/۴ میلیمترمکعب سیترات سدیم قرار داشت، اضافه گردید. یک قطره خون را روی لام قرار داده و گسترش خونی تهیه گردید. برای تعیین زمان انعقاد نیز قطره‌ای خون روی لام ریخته شد و با نوک سوزن بررسی و به محض مشاهده رشته‌های فیبرین زمان انعقاد ثبت گردید. البته شروع ثبت زمان انعقاد از وقتی است که خون وارد سرنگ می‌شود (سعیدی و همکاران، ۱۳۷۹). برای اندازه‌گیری هموگلوبین از روش سیان مت هموگلوبین استفاده شد که با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر OD

محلول اندازه‌گیری و با مقایسه با منحنی استاندارد مقدار هموگلوبین تعیین گردید. تعیین هماتوکریت نیز با روش میکروهماتوکریت و با سانتریفوژ هماتوکریت و خط کش مخصوص هماتوکریت سنجیده شد.

شمارش سلولهای قرمز، سفید و پلاکتها توسط لام نئوبار انجام گرفت. برای شمارش گلبولهای قرمز از پیپت ملانژور قرمز، برای شمارش گلبولهای سفید از پیپت ملانژور سفید و برای شمارش پلاکتها از پیپت ملانژور سفید یا قرمز استفاده شد. محلول بکار برده شده برای رقیق کردن خون محلول ریس بود که از مواد زیر تشکیل شده است:

۱ ـ رنگ Brilliant Cresyl/Blue ۰/۱ گرم

۲ ـ سیترات سدیم ۳/۸ گرم

۳ ـ فرمالین ۴۰ درصد ۰/۲ میلیمترمکعب

۴ ـ آب مقطر تا ۱۰۰ میلیمترمکعب

برای رنگ‌آمیزی از محلول گیمسا با رقت ۰/۱ استفاده شد و تشخیص گلبولهای سفید نیز از روی لام رنگ شده انجام گرفت.

برای بدست آورن اندیسهای خونی از روابط زیر استفاده شد،

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبولهای قرمز برحسب میلیون}}$$

$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبولهای قرمز برحسب میلیون}}$$

$$MCHC = \frac{\text{هموگلوبین} \times ۱۰}{\text{هماتوکریت}}$$

برای محاسبات آماری از برنامه‌های Excel و SPSS استفاده شد و مقدار میانگین، انحراف معیار و خطای استاندارد و... هر یک از فاکتورها مشخص گردید.

نتایج

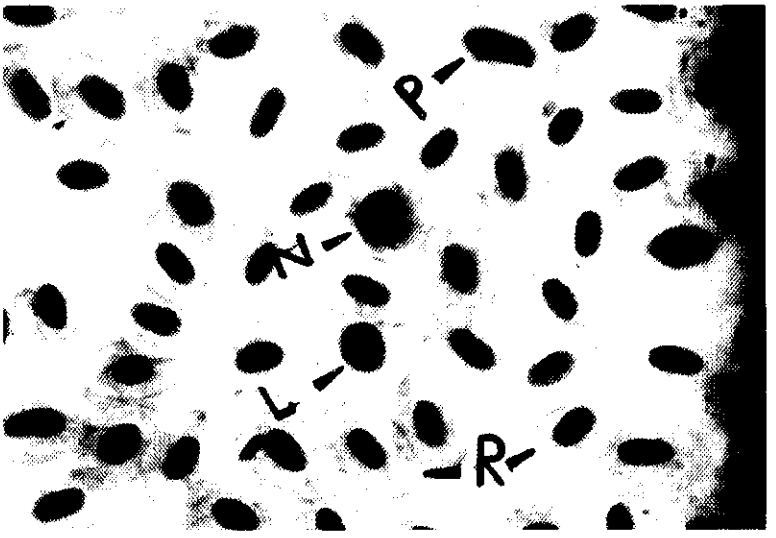
نتایج مربوط به میزان هموگلوبین، هماتوکریت، گلبولهای قرمز و سفید و پلاکتها در ماهیهای مورد آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. در شمارش افتراقی، ائوزینوفیل دیده نشده و مانند

اغلب ماهیان، سلولهای بازوفیل نیز دیده نمی‌شود. مونوسیت‌ها سلولهایی با هسته‌های بزرگ و بی‌شکل هستند که درصدشان نیز کم است. بیشترین میزان را لنفوسیتها تشکیل می‌دهند که سلولهایی کروی تا بیضوی شکل با هسته‌های مشخص و تقریباً کروی هستند که قسمت اعظم سیتوپلاسم را دربر گرفته‌اند و درصدشان در نابالغین بیشتر از مولدین است. درصد نوتروفیل‌ها در مولدین از نابالغین بیشتر بوده و شکل سلول نوتروفیل نیز در آنها مشخص‌تر و واضح‌تر است و تنوع شکلی نیز دارند. علاوه بر این در مولدین، نوتروفیل نابالغ نیز دیده می‌شود. شکلهای ۱ تا ۴ انواع سلولها را در ماهیان نابالغ و مولد نشان می‌دهند.

آزمایش ESR بر روی ۲۱ عدد ماهی نابالغ و ۹ عدد ماهی مولد انجام شد. در این دو، تغییرات بین ۱ و ۲ میلیمتر در ساعت بوده است.

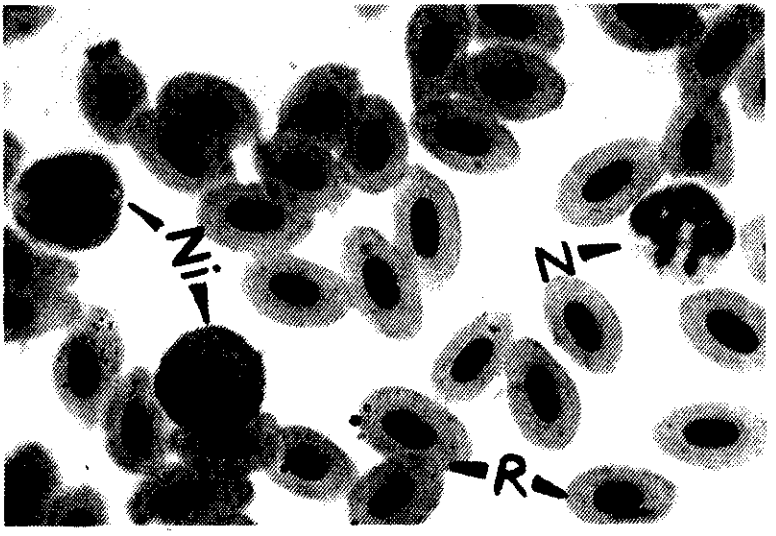
جدول ۱: مقایسه نتایج فاکتورهای خونی در ماهیان نابالغ و مولد و ماهیان نر و ماده مولد ماهی آزاد دریای خزر

فاکتور	میانگین در ماهیان نابالغ	میانگین در ماهیان مولد	میانگین در ماهیان مولد نر	میانگین در ماهیان مولد ماده
طول کل (میلیمتر)	۲۲۳/۵	۶۰۰/۸	۵۷۷	۶۳/۰۸
وزن (گرم)	۱۲۸/۱۲	۲۵۶۰	۲۵۷۰	۲/۵۶
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	۷/۲	۹/۸۷	۹/۶۸	۱۰
هماتوکریت (درصد)	۳۴/۱	۳۹/۲	۳۶	۴۱/۶
گلبول قرمز (میلیمترمکعب)	۹۳۴۳۰۰	۱۳۰۶۲۰۰	۱۲۶۱۰۰۰	۱۳۴۰۰۰۰
گلبول سفید (میلیمترمکعب)	۸۳۸۰	۶۲۱۹	۵۹۱۱/۱	۷۲۸۳/۳
پلاکت (میلیمترمکعب)	۲۱۱۸۰	۱۳۱۵۹/۵	۱۱۶۴۴/۴	۱۴۲۹۵/۸
لنفوسیت (درصد)	۹۶/۱	۶۹/۹	۷۲/۸	۶۷/۶
نوتروفیل (درصد)	۳/۴	۲۹/۴	۲۶/۲	۳۱/۸
مونوسیت (درصد)	۰/۵۲۷	۱/۱۴	۰/۸۸	۱/۳۳
ائوزینوفیل (درصد)	—	—	—	—
نوتروفیل (نابالغ) (درصد)	—	۱۲	۱۰/۴	۱۳/۲۵
زمان انعقاد (ثانیه)	۱۶۷/۳	۱۹۱/۴	۱۹۸/۸	۱۸۵/۷
MCV (فمتولیتر)	۳۵۸/۴	۳۰۲/۹	۲۸۶/۷	۳۱۵
MCH (پیکوگرم)	۸۲	۷۵/۵	۷۵/۲	۷۵/۸
MCHC (درصد)	۲۱/۶	۲۵/۶	۳۷/۵	۲۴/۳



شکل ۱: سلولهای خونی ماهی آزاد نابالغ (بزرگنمایی ۱۰۰×)

R: گلبولهای قرمز P: پلاکت N: نوتروفیل L: لنفوسیت



شکل ۲: سلولهای خونی ماهی آزاد مولد (بزرگنمایی ۱۰۰×)

R: گلبولهای قرمز N: نوتروفیل بالغ Ni: نوتروفیل نابالغ

بحث

فاکتورهای خونی در دو رده سنی نابالغین و بالغین (مولدین) تغییر کرده و کم و زیاد می‌شود. یکی از این فاکتورها، تغییر در درصد لنفوسیت‌ها است، بطوریکه با بلوغ افراد درصد لنفوسیت‌ها کاهش می‌یابد. این موضوع در مورد سایر آزاد ماهیان به اثبات رسیده است (Pottinger & Pickering, 1987). علت بیشتر بودن لنفوسیتها در نابالغین در مقایسه با مولدین، بحث توسعه بافت هماتوپرکنتر لنفوئیدی است که در تولید لنفوسیت نقش دارد و به موازات افزایش سن، توسعه بافت لنفوئیدی متوقف می‌شود.

میانگین تعداد گلبولهای قرمز در ماهی آزاد دریای خزر ۱۳۰۶۲۰۰ عدد بدست آمد. در آزاد ماهی اقیانوس اطلس این میانگین ۸۵×۱۰^{۴} تا ۱۱۰×۱۰^{۴} عدد در میلیمترمکعب خون (Sandnes *et al.*, 1998) و در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان $۱/۵\pm۰/۱۶\times۱۰^{۶}$ در میلیمترمکعب خون گزارش شده است (Haley & Weiser, 1985). تغییرات فاکتورهای خونی همراه با تغییر فاکتورهای محیط امری است غیرقابل انکار و در ماهیان بدلیل خونسرد بودن آنها، این امر بوضوح دیده می‌شود. در کار تحقیقاتی که روی ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* انجام گرفت این تغییرات در طول ۷ ماه مختلف سال بررسی گردیده و مشخص شده است که در طول ماههای مختلف بدلیل تغییرات محیطی، فاکتورهای خونی نیز دچار تغییر می‌شوند، بطوریکه مقدار هماتوکریت بین ۴۴ تا ۴۹ درصد، هموگلوبین ۸/۹ تا ۱۰/۴ گرم در دسی‌لیتر، تعداد گلبولهای قرمز ۸۵×۱۰^{۴} تا ۱۱۰×۱۰^{۴} در میلیمترمکعب خون، MCV بین ۴۴۱ تا ۵۵۳ فمتولیتر، MCH ۹۴ تا ۱۰۶ پیکوگرم و MCHC بین ۱۹/۴ تا ۲۱/۷ درصد بدست آمد (Sandnes *et al.*, 1998).

در کار دیگری که روی قزل‌آلای رنگین کمان انجام شد تغییرات فاکتورهای خونی را در طول ۳ فصل زمستان، بهار و تابستان بررسی کردند و مشاهده شد که در طول این فصول تمام این فاکتورها تغییر می‌کنند. برای مثال میزان هموگلوبین در زمستان نسبت به بهار و بهار نسبت به تابستان بیشتر می‌شود و تعداد گلبولهای قرمز در زمستان نسبت به بهار و بهار نسبت به تابستان

کمتر خواهد شد (Houston *et al.*, 1996).

عوامل بیماریزا نیز می‌توانند باعث تغییر فاکتورهای خونی شوند، بطوریکه در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مبتلا به کرم *Proteocephalus neglectus*، تغییرات زیادی در تعداد گلبولهای قرمز و سفید، میزان هماتوکریت و هموگلوبین دیده شد (Engelhardt *et al.*, 1989).

در تحقیقی در لیتوانی، اثرات مس روی سلولهای خونی قزل‌آلای رنگین کمان را بررسی کردند و ماهی‌ها را در غلظتهای ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم مس در لیتر در زمانهای ۱، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت قرار داده و تغییرات هماتولوژیک را در آن‌ها اندازه گرفتند. این آزمایش افزایش گلبولهای قرمز و تغییر شکل سلولها و تغییرات هماتوکریت و گلوکز را نشان داد (Vosyliene, 1996).

همانطور که قبلاً بیان شد تغییرات فاکتورهای خونی در دو رده سنی بالغین و مولدین دیده می‌شود. در مورد ماهیان مولد در طول ماههای مختلف نیز این تغییرات مشاهده می‌شود. کاری که روی قزل‌آلای قهوه‌ای *Salmo trutta* در فصل تخمریزی انجام گرفت، ثابت کرد که در ماههای اکتبر تا دسامبر کاهش لنفوسیت‌ها دیده می‌شود (Pickering, 1986).

اکولوژی ماهی نیز روی فاکتورهای خونی تاثیر می‌گذارد. بطور مثال در ماهیان خاویاری، در شمارش افتراقی سلولهای سفید، سلول ائوزینوفیل مشاهده می‌شود (سعیدی و همکاران، ۱۳۷۷)، در حالیکه در آزاد ماهیان، این سلولها در حالت طبیعی دیده نشده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارکنان مرکز تحقیقات خیرود نوشهر (وابسته به تحقیقات شیلات مازندران) بخصوص خانم مریم کامکار و کارکنان مرکز تکثیر و پرورش شهید باهنر کلاردشت کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

سعیدی، ع.؛ کامکار، م.؛ پورغلام، ر.؛ حبیبی، ف.؛ لطفی‌نژاد، ح. و یوسفیان، م.، ۱۳۷۸. مقایسه تعداد گلبولهای سفید خون و شمارش افتراقی آنها در ماهیان خاویاری قره‌برون و دراکول. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۴۴، صفحات ۱۳۱ تا ۱۳۳.

سعیدی، ع.؛ کامکار، م. و پورغلام، ر.، ۱۳۷۹. پاسخهای هماتولوژی در ماهیان خاویاری در شرایط محیطی مختلف. مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران. (چاپ نشده)

شاهسونی، د.؛ وثوقی، غ. و خضرائی‌نیا، پ.، ۱۳۷۷. تعیین برخی فاکتورهای خونی ماهی ازون‌برون در سواحل جنوب شرقی دریای خزر. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۴۴، صفحات ۱۲۶ تا ۱۳۰.

Engelhardt, A. ; Mirle, C. ; Petermann, H. , 1989. Haematological studies in rainbow trout affected by *Proteocephalus neglectus*. Monatsh, Veterinaermid. Vol. 44, No. 1, pp.390-393.

Haley, P.J. and Weiser, M.G. , 1985. Erythrocyte volume distribution in rainbow trout. Vet. Res. Vol. 46, No. 10, pp.2210-2212.

Houston, A.H. ; Dobric, N. and Kahurananga, R. , 1996. The nature of haematological response in fish, studies on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to simulated winter, spring and summer conditions. J. Fish Phisiol. Vol. 15, No. 4, pp.339-347.

Ivanova, N.T. , 1983. Atlas of fish blood cell. Moskva, Izd. Legkajai Piscevaja Promyselennost. 75 P. (in Russian).

Pickering, A.D. , 1986. Changes in blood cell composition of the brown trout (*Salmo trutta*), during the spawning season. J. Fish Biol. Vol. 29, No. 3, pp.335-347.

Pickering, A.D. and Pottinger, T.G. , 1987. Lymphocytopenia and interrenal activity during sexual maturation in the brown trout. J. Fish Biol. Vol. 30, pp.41-50.

Sandnes, K. ; Lie, O. and Waagboe, R. , 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult formed Atlantic Salmon, *Salmo salar*, J. Fish Biol. Vol. 32, No. 1, pp.129-130

Vosyliene, M.Z. , 1996. Haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during short-term exposure to copper. J. Ekologija (Vilnius). Vol. 3, pp.12-18.