مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

صفحات ۴۷- ۳۰

Online ISSN: ۲٤۷٦-٤٤۹۳

Print ISSN: ۲۵۳۸-۲۰۲۰

www.irijournals.com

تفاوت تاثیر ضد انعقاد های سدیم سیترات و EDTA بر روی فاکتور خونی گوسفند نژاد سنگسری

روح الله قاسمی [۱]، صادق ابراهیمی باد آشتیان [۲]

[۱] کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش میکرو بیولوژی دانشگاه تهران شمال.

[۲] کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش میکرو بیولوژی دانشگاه تهران شمال.

چکیده

خون مهمترین مایع خارج سلولی بدن است که در رگ ها جریان دارد و در تمام فعالیت های بیوشیمیایی بدن به طور مستقیم و غیر مستقیم دخالت میکند. خون از دو قسمت تشکیل شده است. یک قسمت شامل سلول های خون است که گلبولهای سفید، گلبول های قرمز وپلاکت ها را در بر می گیرد. قسمت دیگر شامل مایع خون یا پلاسما است که ۹۰٪ آن آب و ۱۰ ٪ دیگر آن رامواد جامد محلول در پلاسما تشکیل می دهد. خون ۶ تا ۷ درصد وزن بدن نشخوارکنندگان را تشکیل می دهد. در حیوانات جوان در حال رشد مقدار خون گاهی از ۱۰ درصد وزن بدن نیز تجاوز می کند. استفاده از غلظت واحدضد انعقاد های موجود، شمارش ومحاسبه ی کلی پلاکت ها و گلبول های سرخ و سفید و همچنین میزان هماتوکریت وفیبرینوژن و هموگلوبین با توجه به دستور العمل وصرف زمان کافی برای گرفتن نمونه خون ونگهداری ورعایت نکات ضروری در نمونه گیری وانتقال آن به آزمایشگاه وکمتر کردن خطا در نحوه شمارش توصیه میگردد. تاکید بر اهمیت غلظت صحیح سیترات به دلیل مشاهده اختلاف نتایج بین دو غلظت ۳.۲٪ و ۳.۸٪ اسکولاریته ۳.۲ به اسمولاریته پلاسما نزدیک تر است. چون سیترات سدیم دارای غلظت کمتری است در مقادیر مختلف هماتوکریت نتایج آزمایش های انعقادی تغیرات کمتری نشان خواهد داد. سازندگان کیتهای PT میزان ISI را بر اساس ۳.۲ ارائه میدهند. بر اساس پیشنهاد NCCLS و ISTH غلظت مناسب ۱۰۵-۱۰۹ یا به عبارتی ۳.۳۱-۳.۲ (۳.۲٪) می‌باشد. افزایش میزان EDTA موجب افزایش کاذب واکنش های انعقادی شود. این ماده روی فاکتور ۵ و ۸ اثرات تخریبی داشته و از این رو ضد انعقاد سفارش شده برای آزمونهای انعقادی سیترات سدیم می باشد؛ بنابراین میزان مواد ضدانعقاد و همچنین میزان خون در نتیجه آزمون های انعقادی نقش بسزایی دارد.

واژه‌های کلیدی: خون، ضد انعقاد های سدیم سیترات، EDTA، فاکتور خونی گوسفند نژاد سنگسری.

مقدمه:

از آنجا که خون در تمام روند های بیوشیمیایی بدن به طور مستقیم وغیر مستقیم دخالت دارد طبیعتا " در بیماری ها تغییراتی در ماهیت آن پدید خواهد آمد.(والنسیک جی، ۲۰۰۷)[1] برای پی بردن به تغییرات پارامتر های خون، معمولا" مقدار این پارامتر ها را که شامل عناصر خونی، آنزیمها، پروتئین ها، الکترولیت ها و غیر الکترولیت ها می باشند اندازه گیری و با مقدار طبیعی ان مقایسه می کنند. خوشبختانه مقادیر طبیعی پارامتر های خونی در بیشتر حیوانات اندازه گیری شده و به صورت مراجع موثق در دسترس اند. عواملی از قبیل سن حیوان، نوع حیوان، جایگاه زندگی از نظر جغرافیایی، نحوه پرورش حیوان، تولید مثل، استرس و حتی روش های آزمایشگاهی میتوانند بر اندازه گیری فاکتورهای خونی اثر بگذارند که یکی از این عوامل مواد ضد انعقاد می باشد. مواد ضد انعقاد اگر به پارامترهای قابل اندازه گیری سرم خون متصل شوند مقدار آنها را در خون کاهش می دهند و چنانچه موجب فعال شدن آنزیمها شوند مقدار آنها را در خون افزایش خواهند داد.(وان ولایت، ۱۹۸۵)[2] مواد ضد انعقاد خون برای جلوگیری از لخته شدن نمونه های آزمایشگاهی بسیار ضروری هستند. نمک های EDTA و سدیم سیترات که از طریق ترکیب یون های کلسیم عمل می کنند برای جلوگیری از انعقاد خون و همچنین فعل و انفعالات سلول به سلول ضروری هستند. هپارین موجب افزایش سرعت فعالیت آنتی ترومبین ۳ می شود. آنتی ترومبین موجب جلوگیری از ترومبین (که علت اصلی انعقاد خون است) می شود. (توارث دیاس و همکاران، ۱۹۹۸)[3]بر اساس مطالعاتی که لومیچ انجام داده، هپارین یک ماده ضد انعقاد موثر در نمونه گلبول های قرمز هسته دار است. اگرچه فودجی و کمپبل به ترتیب سدیم سیترات و k3-EDTA را پیشنهاد می کنند. هنگامی که k3-EDTA بر بروی نمونه خون لاکپشت استفاده شد، این نمونه خون ها به تدریج پس از ۶ ساعت شروع به فاسد شدن کرد؛ اما در مورد استفاده از لیتیوم هپارین چنین اتفاقی نیافتاد. هرچند با آزمایشاتی که پوفادر انجام داده است نشان داده شد که این فاسد شدن مسئله چندان مهمی نیست. به نمونه های خون این لاکپشت ها پروتئین آلبومین به عنوان پایدار کننده سلولی برای جلوگیری از فاسد شدن توسط آقای تونیا اضافه شد. اگرچه کاربرد آلبومین برای خون پرندگان و خزندگان به اثبات نرسیده است. از طرفی هپارین خصوصیات رنگی سلول های خون را تغییر میدهد و در نتیجه موجب افزایش فشردگی سلولی و کاهش دقت در شمارش گلبول های سفید می شود. استفاده از سیترات و ETDA برای آزمایش هایی که به طور اتوماتیک انجام می شود، توصیه شده است؛ زیرا در زمان کمتری انجام شده و سریعتر به نتیجه می رسند؛ و از طرفی هزینه کمی داشته و کیفیت بالایی ارائه می دهند(اس وبودویاز و پراودا، ۱۹۹۱)[4]. در هر حال در تجربه های مختلف عامل فاسد شدن خون EDTA تشخیص داده شده و بنابراین هپارین هنوز یکی از پر کاربردترین مواد برای استفاده در نمونه های پرندگان و خزندگان است. در سال های اخیر تلاش های زیادی توسط سازمان های بین المللی برای بهبود کیفیت تحقیقات در مورد مصرف درست داروهای ضد انعقاد برای نمونه خون های گرفته شده در آزمایشگاه، انجام شده است. این داروها از موادی تشکیل شده اند که از لخته شدن خون یا پلاسما جلوگیری می کند و در نتیجه تضمین می کنند که نمونه خون گرفته شده حداقل تغییرات را قبل از انجام آزمایش داشته باشد. تعدادی از این داروها در آزمایشات پزشکی و دامپزشکی مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته است. چند نمونه از این داروها به شرح زیر است: اتیل آمین تترا اسید (EDTA) که برای تحقیقات خون شناسی معمولی مناسب است. هپارین که برای مقاصد بیوشیمی بالینی استفاده می شود. سدیم سیترات که برای مطالعه لخته خون و بررسی گلبول خون استفاده می شود. این داروها از دو طریق عمل می کنند. یکی از طریق پیوند یون های کلسیم (سیترات و فلوراید و EDTA) و دیگری از طریق جلوگیری از عملکرد ترومبین (هپارین). استفاده از هپارین متداول تر است زیرا این ماده اختلال بسیار کمی در نتایج آزمایش ایجاد می

1- Walencik, J., 2007; 146 C: 331-335.
2 - Van Vliet, K, 1985; 2: 87-92.
3- Tavares-Dias,., 1998; 20: 151-155.
4 -Svobodova, Z., Pravda, D. 1991.

کند. اگرچه در برخی موارد از انواع دیگر آن نظیر EDTA و سدیم فلوراید یا سدیم سیترات در آزمایشگاه های دامپزشکی و به منظور تحقیقات بیوشیمی استفاده می شود. هدف این مقاله مطالعه و مقایسه دو ماده ضد انعقاد متداول EDTA و سیترات سدیم بر روی خصوصیات مختلف نمونه خون گوسفند است. نتایج این پژوهش کمک شایانی برای یافتن بهترین ماده ضد انعقاد با توجه به زمان مورد نیاز برای نگهداری نمونه آزمایشگاهی، می کند.(اسمیت و همکاران، ۱۹۷۷)[1]

۲- ضد انعقاد:

انعقاد خون یا دَلَمه شدن خون (به انگلیسی: Coagulation) فرایندی است که موجب لخته‌شدن خون می‌شود. این فرایند از دو مسیر داخلی وخارجی موجب تبدیل فیبرینوژن به فیبرین، فعال شدن فاکتورهای انعقادی و تجمع پلاکت‌ها می‌شود. انعقاد خون هر چند با لخته شدن خون موجب توقف خونریزی می‌شود و نقص این فرایند در بیماری‌هایی مانند هموفیلی کشنده است ولی انعقاد نابجای خون در ایجاد انفارکتوس قلبی (سکته قلبی) و ایسکمی مغزی و آمبولی نیز دخیل است.

۲- ۱ مهار کننده‌های طبیعی انعقاد:

آنتی ترومبین III: با ترومبین به صورت یک به یک جمع شده و آن را از فعالیت باز می‌دارد. [[کو فاکتور II هپارین]]: این نیز به عنوان مهار کننده ترومبین می‌باشد، کمبود ارثی این مولکول می‌تواند موجب ترومبوز شود.

آلفا ماکروگلوبین: از جنس گلیکوپروتئین است و ترومبین را از فعالیت باز می‌دارد.

پروتئین C: وجودش نیاز به ویتامین K دارد که بوسیله ترومبین فعال شده و موجب انعقاد می‌شود.

پروتئین S: به عنوان کوفاکتور همراه پروتئین C عمل می‌کند و برای وجودش، نیاز به ویتامین K است.

پروتئین Z و پروتئاز مربوط به پروتئین Z نیز وجود دارند. پلاسمین و فعال کننده بافتی پلاژسمینوژن (tPA) موجب حل شدن لخته تشکیل شده میشوند.(رامپلینگ و همکاران، ۱۹۷۷)[2]

۲-۲ فیبرینولیز طبیعی

تشکیل لخته باعث قطع خونریزی از عروق صدمه دیده و مجروح می‌شود اما نهایتاً باید برای برقراری مجدد جریان خون، لخته ایجاد شده از سر راه برداشته شود. این عمل با حل شدن لخته بوسیله سیستم فیبرینولیتیک انجام می‌شود. آنزیمی پروتئولیتیک به نام پلاسمین بطور متوالی برخی پیوندها را در مولکول فیبرین شکسته و باعث آزاد شدن محصولات پپتیدی و د ر نتیجه حل شدن لخته می‌شود.

مکانیسمهای متعددی می‌توانند در ایجاد پلاسمین فعال دخیل باشند که در همه آنها فاکتورهای خاص انعقاد موجب تبدیل این پروتئین از شکل غیر فعال یعنی پلاسمینوژن به فعال یعنی پلاسمین می‌شود. اینکار توسط مولکولهایی مانند فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (tPA)، استرپتوکیناز، اوروکیناز و فاکتور XII انعقاد خون انجام میشود. برای انجام پاره ای از آزمایش ها، به خون کامل یا پلاسما احتیاج است، پس به محض خارج شدن خون از بدن به منظور جلوگیری از انعقاد آن باید آن را با مواد ضد انعقاد مخلوط کرد. از ضد انعقاد ها برای نگه داری و همچنین جلوگیری از انعقاد خون استفاده می شود و با توجه به تست درخواستی و همچنین نوع نمونه ها دارای انواع گوناگونی است و هر یک ویژگی های خاصی دارند و نمیتوان یکی را برای انجام دادن همه تست ها استفاده کرد. متداول ترین مواد ضد انعقادی که به طور روزمره مورد استفاده قرار می گیرند شامل موارد زیر می باشد.

۲-۳ ضد انعقادهای اصلی و پرکاربرد:

سه ضد انعقاد اصلی که در ازمایشگاه مورد استفاده قرار میگرد عبارت است از:

EDTA
Tri sodium Citrate

1 - Smit, 1977; 57C: 35-38.
2 - Rampling., 1977; 36: 845-846.

Heparin

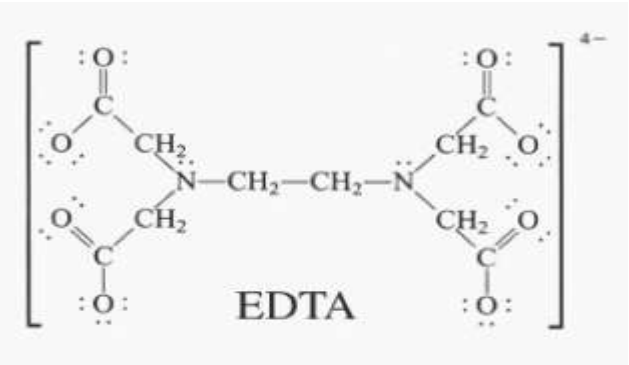
ضد انعقادی که در هماتولوژی استفاده می شود باید دارای ویژگی های زیر باشد:

باید حداقل تغییر را در اندازه سلول ها ایجاد کند. نباید همولیز ایجاد کند. تجمع پلاکت ها را به حداقل برساند. حداقل اختلال را در مرفولوژی لوکوسیت ها و رنگ آمیزی سلول ها داشته باشد. باید ان را به اسانی در خون حل کرد.

۲-۴ ضدانعقاد EDTA:

نمکهای Ethylenediaminetetra-acetic.Acid (EDTA) به علت حفظ سلولهای خونی بعنوان ماده ضد انعقاد مناسب در آزمایشگاههای هماتولوژی بکار می رود. این ماده توانایی پیوند با تعدادی از عناصر را داشته و با اتصال به کلسیم می تواند آنرا از محیط خارج نماید. کلسیم و دیگر یونهای دوظرفیتی می توانند بعنوان کوفاکتورهای آنزیم عمل نمایند و بهمین دلیل نمکهای EDTA جهت تعیین مقدار کلسیم، آهن، آلکالن فسفاتاز، کراتین کیناز و لوسین آمینو پپتید از مناسب نیستند.(اورلاو و همکاران، ۲۰۰۵)[1]

۲-۴ -۱ ساختمان EDTA:



شکل ۱: ساختمان EDTA

از EDTA در روش اصلاح شده وسترگرن استفاده می کنیم و همان طور که می دونید در حالت معمولی از ضد انعقاد سیترات برای ESR استفاده می کنیم بنابراین یکی از علتاش این است که روش اصلاح شده وسترگرن نیازمند EDTA است نه سیترات. بعد اینکه EDTA باعث چروکیده شدن گلبول ها ی قرمز می شود و این خودش بر روی میزان ESR اثر خواهد گذاشت.(اولسن و همکاران، ۲۰۰۱)[2]

۲-۴- ۲ تاثیر EDTA بر روی پلاکت ها:

EDTA فعال سازی پلاکت ها را کاهش می دهد. در بعضی شرایط مانند زمانی که انتی بادی های خاصی بر روی پلاکت ها نشسته باشد، در این صورت با اضافه شدن EDTA بر روی خون، پلاکت ها فعال شده و باعث لخته شدن کاذب خون می شود در حالی که اگر از ضد انعقاد دیگری استفاده کنیم چنین حالتی دیده نمی شود.

EDTA به صورت اسید آزاد به تنهایی بعنوان ضد انعقاد مصرف نمیگردد و بیشتر نمکهای آن مورد استفاده است. اسید آزاد آن دارای وزن ملکولی ۲۹۲/۲ و به صورت پودر سفید بدون بو می باشد. محلول اشباع آن (در ۲۰ درجه سانتیگراد) ۲۰۰۰ تا ۳۰۰ میلی گرم در لیتر است.

۲ -۴-۳ انواع EDTA:

۲-۴-۳-۱ دی سدیک به همراه دو ملکول آب EDTA | EDTA-NA2, 2H2O

دارای وزن مولکولی ۳۷۲/۲ و به صورت پودر کریستال بدون بو میباشد. حلالیت آن در حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد میباشد.

1 - Orlov, 2005; 38: 53-57.
2 - Olsen., 2001; 35: 147-152.

۲-۴-۳-۲ دی پتاسیک با دو مولکول آب EDTA-K2,2H2O | EDTA

دارای وزن ملکولی 4/404می باشد. این نوع بیشتر در اروپاو ژاپن استفاده می شود و به تازگی در آمریکا مورد توجه قرار گرفته است. این نمک نسبت به نمکهای دی سدیک حلالیت بیشتری داشته و به توصیه ICSH بهترین نوع EDTA است.

۲-۴-۳-۳ تری پتاسیک EDTA-K3 | EDTA

دارای وزن ملکولی ۴۰۶ و بصورت مایعی شفاف، بدون بو می باشد، نوع خشک شده آن به صورت پودر سفید بدون بو است. به راحتی در آب حل میشود وغلظت ۱۵ گرم درصد تهیه کرده به هر لوله حدود ۰/۰۵۴ سی سی که معادل ۷ میلی گرم پودر است برای ۵ سی سی خون اضافه می کنیم.(مورو و همکاران ، ۱۹۹۸)[1]

۲-۴-۴ PH نمکها:

PHنمکهای تری پتاسیک نزدیک به PH خون (۸-۷) می باشد، این مقدار بالاتر از PHنمکهای دی سدیک (3/5–5/4) است، در تستهای خاصی که بستگی به شرایط اسیدی یا قلیائی دارند می توان با توجه به PH مورد لزوم EDTA مناسب را بکار برد. در PH کمتر از چهار، کمپلکس متصل به کلسیم پایدار نبوده و ممکن است تجزیه و جدا گردد. نمک های دی سدیم و دی پتاس معمولا به صورت خشک استفاده می شوند ولی تری پتاس به صورت مایع استفاده می شود. دی پتاس بر اساس استاندارد های بین المللی مانند ICSH و CLSI نسبت به سایرین ترجیح داده شده است.

۲-۴-۵ مقادیرلازم:

میزان مصرفEDTA-K3 ، 2/1میلی گرم برای هر میلی لیتر خون است ولی EDTA دی پتاسیک و دی سدیک همراه با دو ملکول آب ۰/۲۵ ± ۱/۵ میلی گرم برای هر میلی لیتر خون مورد استفاده قرار می گیرد.

۲-۴-۶ پایداری نمونه:

در حرارت آزمایشگاه بیشتر از ۶ ساعت از زمان گرفتن خون در لوله حاوی EDTA نباید بگذرد ولی در حرارت ۴ درجه سانتیگراد (یخچال) تا ۲۴ ساعت P.C.V, Hb, W.B.C, R.B.C, MCV, Platelet پایدار است. مقدار EDTA مصرفی باید متناسب با مقدار خون باشد و اگر EDTA بیشتر از اندازه مصرف گردد گلبولهای سرخ و سفید چروکیده و منهدم می گردند که این به علت افزایش غلظت یونی می باشد. افزایش EDTA بیش از ۲ میلی گرم در میلی لیتر سبب کاهش قابل توجهی در P.C.V و در نتیجه افزایش MCHC می شود و نیز همین افزایش بر روی پلاکتها اثر گذاشته و سبب تورم و پاشیدگی آنها می شود، شمارش مجدد این ذرات پلاکنی سبب افزایش غیرواقعی تعداد پلاکتها می گردد. کاهش میزان EDTA باعث ایجاد لخته های ریز گردیده که تاثیر قابل توجهی در اندازه گیری پلاکتها می گذارند.(مورگان و همکاران، ۲۰۰۶)[2]

۲-۴-۷ تشخیصEDTA :

روشهای متفاوتی جهت تشخیص انواع EDTA وجود دارد که ساده ترین آن عبارتست از:

دو قطره از محلول تیوسیانات آلومینیوم (۸ گرم درصد میلی لیتر آب مقطر) و دو قطره از محلول کلرور فریک (۹ گرم درصد میلی لیتر آب مقطر) را به ۵ میلی لیتر آب مقطر بدون یون در لوله آزمایش اضافه می کنیم محلول قرمز رنگی حاصل می شود. تقریباً در حدود ۵۰ میلی گرم نمک مورد نظر را به محلول فوق اضافه کرده در صورت وجودEDTA ، رنگ قرمز تبدیل به زرد خواهد شد(موریس و همکاران، ۲۰۰۲).[3] پدیده اقماری شدن پلاکت ها منحصرا با ضد انعقاد EDTA گزارش شده. دراین پدیده پلاکت ها دور نوتروفیل ها و منو سیت ها بصورت اقماری ظاهر می شوند. این پدیده باعث میشود که شمارش پلاکت های بیمار بطور چشمگیری کاهش یابد. طور کلی EDTA بعنوان یک ماده ضد انعقاد در تستهای انعقادی بکار نمی رود مگر هنگامیکه بررسی و آزمایش پلاکت مورد نظر باشد. باید توجه نمود که در بعضی بیماران بعلت وجود آنتی بادیهای

1- Muro, J., 1998; 29: 40-44.
2 - Morgan, L.W.2006
3 - Morris, J.D, 2002; 43: 157-166.

پلاکتی، با وجود EDTA پلاکتها به صورت چسبیده به یکدیگر مشاهده می شوند، لذا در این موارد نباید EDTA مصرف گردد .در ضمن قابل ذکر است که فاکتور V در مقابل EDTA ناپایدار است.

۲-۵ ضد انعقاد سیترات سدیم:

تری سدیم سیترات با حذف کلسیم از ترکیب پروترومبیناز واکنش تبدیل پروترومبین به ترومبین رامتوقف میکند. در نتیجه تبدیل فیبرینوژن به فیبرین مهار خواهد شد. این واکنش با افزودن کلسیم به خون برگشت پذیر است. رایج ترین شکل مصرف آن نمک تری سدیم با وزن مولکولی ۲۹۴ (با دو مولکول آب) است. ترکیب سدیم سیترات و اسید سیتریک راسیترات سدیم بافری می گویند. این نوع از نوع غیر بافری ارجح تر است.(موهری ام ، ۲۰۰۷)[1]

۲-۵-۱ طرز تهیه سیترات:

۳۲ گرم پودرتری سدیم سیترات با دو مولکول آب را در یک لیتر آب حل کرده به حجمهای ۱۰ میلی لیتری تقسیم کنید سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه اتو کلاو شود. این محلول در یخچال ۴ درجه به مدت چندین ماه پایدار است و در صورت مشاهده کدورت و یا رشد کپک باید دور ریخته شود.(مارتینز سوبلا، ۲۰۰۵)[2]

۲-۵-۲ مکانیسم عمل:

سیترات سدیم عمدتا جهت انجام آزمونهای انعقادی مورد استفاده است و علت اینکه اثرات ضد انعقادی آنرا به سادگی می توان با اضافه کردن کلسیم به نمونه بر طرف نمود. لازم به ذکر است که سیترات سدیم و مشتقات آن به عنوان ماده ضد انعقاد ارجح برای انتقال خون به کار می رود زیرا سیترات به سرعت در کبد متابولیزه شده و از جریان خون پاک می شودجهت جلوگیری از انعقاد خون ۰/۱ میلی لیتر از محلول ۱۰ درصد EDTA از منعقد شدن ۵ میلی لیتر خون کفایت می کند. لازم به ذکر است که نمک پتاسیم EDTA از سایر انواع آن به دلیل حلالیت بیشتر بهتر است. از سیترات سدیم به صورت محلول با غلظت ۲/۳ تا ۸/۳ درصد استفاده می شود. یک قسمت از این محلول برای ممانعت از انعقاد نه قسمت خون کافی است. رقیق شدن خون به دنبال استفاده از سیترات سدیم باعث ایجاد خطا در اندازه گیریها می گردد. این ضد انعقادرا برای آزمایش های انعقادی باید به کار برد برای اندازه گیری سرعت رسوب گلبول های قرمزٍ ESR از تری سدیم سیترات ۰/۲ باید استفاده کرد.()[3]

بیماری‌های مختلف می‌توانند بر شکل، تعداد و عملکرد سلول‌های خونی اثر بگذارند.

جدول ۱: وزن مولکولی و مقدار مصرف تری سدیم سیترات

تری سدیم سیترات	وزن مولکولی	مقدار مصرف
Na3C6H5O7	258.1	28 gr
Na3C6H5O7 H2O	276.1	30 gr
Na3C6H5O7 2H2O	294.1	32 gr
Na3C6H5O7 5.5 H2O	357.16	39 gr
Na3C6H5O7 11 H2O	456.1	49.6 gr

LAB-SCIENCES.BLOGFA.COM

۶- ۲ -۱ دلایل کاهش تعداد سلول‌های قرمز خون

1 Mohri, M.,., 2007; 16: 207-209.
2 Martinez-Subiela, S2005; 46: 625-629.
3 Mafuvadze, B., Erlwanger, 2007; 77: 427-434.

- از دست دادن خون
- کم‌خونی
- خونریزی
- اختلالات مغز استخوان (برای مثال، آسیب حین پرتودرمانی، سموم، فیبروز، تومور)
- کاهش هورمون اریتروپوئیتین به علت مشکلات کلیوی
- همولیز (تخریب گلبول‌های قرمز)
- لوکمی (نوعی سرطان خون)
- مولتیپل میلوما (نوعی سرطان خون)
- بالا بودن میزان آب بدن(لوییان و همکاران، ۲۰۰۲)[1]

۲-۶-۲ دلایل افزایش سلول‌های قرمز خون

- کاهش فشار اکسیژن در خون
- بیماری‌های مادرزادی قلب
- فیبروز ریوی
- پلی‌سیتمیِ وِرا
- کاهش آب بدن
- بیماری‌های کلیوی همراه با افزایش هورمون اریتروپوئیتین
- کورپولمونل (بیماری‌های قلبی ـ ریوی)

۲-۶-۳ دلایل کاهش تعداد سلول‌های سفید خون

- اختلالات مغز استخوان (مثلاً بر اثر وجود تومور و بدخیمی یا فیبروز)
- وجود موادی که اثر سمی بر سلول‌ها دارند (سایتوتوکسیک‌ها)
- بیماری‌های کلاژن ـ عروقی (مانند لوپوس)
- بیماری‌های کبد یا طحال
- قرار گرفتن در معرض پرتوها

۲-۶-۴ دلایل افزایش سلول‌های سفید خون

- بیماری‌های عفونی
- بیماری‌های التهابی
- لوکمی (نوعی سرطان خون)
- فشارهای شدید روحی ـ روانی
- تخریب بافتی (مثلاً در سوختگی‌ها)

۲-۶-۵ دلایل کاهش میزان هماتوکریت (HCT)

- انواع کم‌خونی
- از دست دادن خون
- آسیب و اختلال در مغز استخوان

1- Lui YYN, 2002;48:421–7.

- لوکمی
- همولیز (تخریب سلول‌های قرمز خون)
- تغذیه‌ی نامناسب یا کمبد برخی مواد غذایی مشخص
- مولتیپل میلوما
- افزایش آب بدن
- رماتیسم مفصلی(لووی تین، ۱۹۹۸)[1]

۲-۶-۶ دلایل افزایش هماتوکریت (HCT)

- کم آبی بدن
- سوختگی‌ها
- اسهال
- اکلامپسی
- پلی‌سیتمی‌ورا
- شوک

۲-۷ پلاکت‌ها (Platelets):

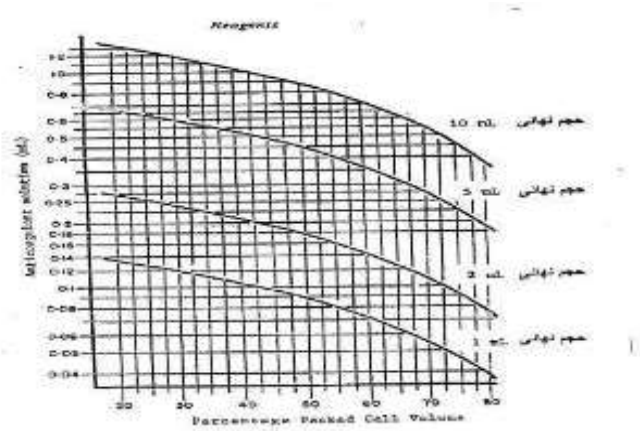
دراثر پاره شدن دیواره سیتوپلاسمی مگاکاریوسیت، پلاکت ها آزاد شده و به صورت گرانول هایی به اندازه ۳-۲ میکرون به رنگ ابی کمرنگ که در مرکز آن موادآزوروفیلی وجود دارد دیده می شود. پلاکت ها در واقع قطعات سیتوپلاسمی مگاکاریوسیت ها هستند. در انعقاد و لخته شدن خون نقش دارند. کاهش تعداد پلاکت‌ها (ترومبوسیتوپنی) می‌تواند علل مختلفی داشته باشد. از علل ترومبوسیتوپنی می‌توان به موار زیر اشاره نمود(لوی اویرام، ۱۹۸۴)[2]

کاهش تولید پلاکت در برخی بیماری‌ها و بدخیمی‌ها (معمولاً در این موارد تعداد RBC و WBC نیز غیرطبیعی است)، عفونت‌های ویروسی مانند اوریون، سرخک، آبله‌مرغان،هپاتیت C، ایدز و ...، آنمی آپلاستیک، شیمی‌درمانی، مصرف برخی داروها، سرطان مغز استخوان مانند لوکمی یا لنفوما، مصرف زیاد و طولانی‌مدت الکل، کمبود ویتامین B12 و اسیدفولیک، افزایش تخریب پلاکت‌ها مثلاً در بیماری ITP و TTP، ...(لی مونتالوو، ۲۰۰۱)[3]

۲-۸ محاسبه میزان ضد انعقاد:

برای محاسبه میزان ضد انعقاد دو روش وجود دارد. ابتدا هماتوکریت بیمار را بر روی محور افقی یافته وسپس بر اساس حجم نهایی مورد نظر (حجم خون +حجم ضد انعقاد) منحنی ۱ یا ۲ یا ۵ یا ۱۰ را انتخاب کرده و خطی عمودی از از مقدار هماتوکریت بیمار تا منحنی فوق رسم کردیم. واز روی منحنی عمودی مقدار ضد انعقاد را بدست آوردیم.(لگونس، ۱۹۹۹)[4]

1-Lo YMD, Tein MSC, 1998;62:768–75.
2- Levy Y, Aviram M, J 1984;60:449–53.
3 - Lee TH, Montalvo L, 2001;41:276–82.
4 - Lagunes, R., Ruiz, L.,1999; 20: 761-770.



شکل ۲: منحنی عمودی مقدار ضد انعقاد

روش دوم استفاده از فرمول است:

(X=(100-PCV)/(595-PCV

یعنی برای یک میلی لیتر خون ضد انعقاد باید ۰.۰۸ میلی لیتر ضدانعقاد را به ۰.۹۲ میلی لیتر خون اضافه نمود.

۳ -۱ مقادیر تقریبی خون جهت انجام آزمایشات:

۱) جهت انجام آزمایش CBC مقدار ۱/۵ تا ۲ سی سی.

۲) جهت انجام آزمایش ESR مقدار ۱/۶ سی سی.

۳) جهت انجام آزمایشات BUN،Cho،T.G،FBS و Cr حدود ۴ تا ۵ سی سی.

۴) جهت انجام آزمایشات سرولوژی مثل رایت، کومبس رایت، ME۲ مقدار ۳ سی سی.

۵) مقادیر بالا تقریبی می باشند وبا توجه به آزمایشاتی که در این پژوهش انجام شد مقدار ۳ سی سی از هرحیوان خون گرفته شد.(کراک دی، ۱۹۹۸)[1]

۳-۲ آزمایش‌های انعقادی خون:

CT: دو تا سه دقیقه، مقادیر آن بطور ساده زمان لخته شدن خون را نشان می‌دهد.

PT: (زمان پروترومبین)، ۱۱ تا ۱۶ ثانیه، از علل افزایش PT به تنهایی، می‌توان به کمبود فاکتور VII و XIII اشاره کرد. سایر علل افزایش PT کمبود فاکتورهای I، II، V و X است.

APTT :حدود ۲۹ تا ۲۶ ثانیه، از علل افزایش PTT به تنهایی می‌توان به کمبود فاکتورهای VIII، IX، XI و XII اشاره کرد.

ESR، آنالیز گاز ها و PH خون، الکترولیت های خون، تست های انعقادی و در کل آزمایشات خون شناسی مانند هماتوکریت و سدیمانتاسیون وازت اوره خون را شامل می شود.

۳-۳ آزمایش شمارش سلول‌های خون یا همانCBC :

CBC حروف اول سه کلمه انگلیسی زیر است.

کاملC =COMPLETE، خون B =BLOOD، شمارش C =COUNT

درنتیجه: CBC به معنای شمارش کامل گویچه های خون است

این آزمایش شامل موارد فوق می باشد:

۱- شمارش تعداد گویچه های سفید خون در میلی متر مکعب ازخون(کفک و همکاران، ۱۹۹۸)[1]

1 - Korcock, D., 1988; 33: 319-330.

It measures White blood cells (WBC)-۱

۲- شمارش تعداد گویچه های قرمز خون در میلی متر مکعب ازخون

It measures Red blood cell count (RBC) -۲

۳- شمارش تعداد پلاکت های خون در میلی مترمکعب ازخون

platelet count-۳

۴- شمارش افتراقی گویچه های سفید خو ن (تعیین Diff)

Count white blood cell differential-۴

۵ - اندازه گیری مقدارهماتوکریت خون

هماتوکریت (HCT): هماتوکریت بیان کننده‌ی درصد سلول‌های قرمز خون نسبت به کل حجم خون است.

Hematocrit (HCT) measure-۵

۶- تعیین مقدارهموگلوبین خون: هموگلوبولین (HBG): هموگلوبولین همان ماده‌ای است که به گلبول‌های قرمز رنگ می‌دهد. هموگلوبولین اکسیژن را از ریه‌ها به بافت‌های بدن حمل می‌کند و دی‌اکسیدکربن را از بافت‌های بدن می گیرد و به ریه‌ها می‌آورد.

Hemoglobin (HGB) measure - ۶

۷- تعیین اندیکس های (index) گویچه های قرمز خون

Reticulocyte production index

اندکس تولید رتیکولوسیت بیان می کند که مغز استخوان بیمار به چه نسبتی درمقایسه با یک شخص سالم دارای فعالیت است. (چند برابر بیشتر از حد نرمال)

RBC Index -۷

چهار اندیس گلبول قرمز وجود دارد که برای توصیف گلبول های قرمز در خون محیطی بکار می روند. اندیس های گلبول قرمز اساس طبقه بندی مورفولوژی آنمی (کمخونی) را تشکیل می دهند.

الف: تعیین میانگین حجم یک گویچه قرمز

MCV : بیان کننده‌ی اندازه‌ی متوسط (میانگین) سلول‌های قرمز است. وقتی MCV بیش از حد طبیعی باشد، یعنی سلول‌های قرمز خون از حدطبیعی بزرگتر هستند (مثلاً در کم‌خونی ناشی از کمبود ویتامین B12 یا اسیدفولیک) و وقتی MCV کمتر از حد طبیعی است یعنی به سلول‌های قرمز خون کوچک‌تر از حد طبیعی هستند (مثلاً در کم‌خونی ناشی از فقر آهن). در تالاسمی نیز MCV کاهش می‌یابد.

A-The size of the red cells (MCV)

ب: تعیین میانگین مقدار هموگلوبین در یک گویچه قرمز و غیره.

MCH: نشان‌دهنده‌ی میزان هموگلوبین‌های حمل کننده‌ی اکسیژن در خون است.

MCHC: نشان‌دهنده‌ی غلظت هموگلوبولین در درون سلول‌های قرمز خون است. وقتی میزان MCHC پایین است، یعنی غلظت هموگلوبولین در گلبوبول قرمز کاهش یافته است، برای مثال این مورد در کم خونی فقر آهن دیده می‌شود.

etc.)،B -As well as the mean cell hemoglobin (MCH

ج: گزارش مرفولوژی گویچه های قرمزخون

C -Red Blood Cell morphology report

د: گزارش سلولهای نارس:

---

1 -Kafk a, M.,., 1998; 20: 213-216.

اگر خون در EDTA بیش از ۶ ساعت بماند گلبولهای قرمز حالت کروی پیدا می کنند. هسته لنفوسیتها و منوسیتها منشعب شده بصورت برگ شبدری در آمده وبا واکوئلهای سیتوپلاسمی همراه می شوند. نوتروفیلها بصورت یک لوب ظاهر می شوند. نا کافی بودن EDTA باعث تجمع پلاکتی گشته و ایجاد لخته های ریز را در نمونه می نماید.

D -Immature cells report

ه: گزارش انگل خونی از جمله انگل مالاریا در صورت مشاهده

چنانچه خون دارای EDTA آلوده به انگل مالاریا باشدو به مدت طولانی بماند جهت تشخیص رنگدانه های آن مناسب نیستند.

E - Malaria Parasite report

MPV بیش از یک ساعت نباید از زمان نمونه گیری گذشته باشد.

RDW: (Red cell distribution width) توزیع پراکندگی گلبول های قرمز است.

تخمین میزان آنیزوسیتوز در نمونه های خون است. RDW زیاد می تواند ناشی از وجود ماکروسیتوز زیاد، میکروسیتوز زیاد یا افزایش هر دو باشد.

۳-۴ مواد و وسایل لازم:

پودرتری سدیم سیترات، از شرکت مرک آلمان خریداری شد.(کدری ان، ۲۰۰۲) [1]

ضد انعقاد EDTA: نمک سفارش شدهEDTA از طرف کمیته بین المللی استاندارد سازی در ۵ میلی گرم به ازای /۱ -۲/ است که در غلظت نهایی ۲ K2EDTA هماتولوژی هر سی سی خون بکار می رود.

لام مخصوص شمارش سلول های خونی (هموسیتومتر نئوبار) لامل، لوله آزمایش مخصوص نگهداری نمونه خون، لام نئوبار، ملانژور مخصوص شمارش گلبولهای قرمزوملانژور مخصوص شمارش گلبولهای سفید: برای رقیق کردن خون به منظور شمارش گلبول های سفید وقرمز، از پی پت های مخصوص شمارش گلبول سفید و قرمز به نام ملانژور استفاده می کنند.

۱- ملانژور گلبول قرمز

این پی پت با درجات ۰/۵، ۱ و ۱۰۱ مشخص شده که بین درجه ۱ و ۱۰۱ آن حباب نسبتاً بزرگی تعبیه شده است و گلوله قرمز رنگی در داخل آن قرار دارد. برای استفاده از این پی پت، آن را تا درجه ۰/۵ از خون و بقیه آن را تا درجه ۱۰۱ با محلول رقیق کننده پر می کنند. در نتیجه، محلولی از خون با رقت ۱/۲۰۰ به دست می آید. در کم خونی می توان آن را تا درجه ۱ از خون پر کرد که در این صورت رقت به دست آمده ۱/۱۰۰ خواهد شد.(جانگ آر لوبک، ۱۹۹۷)[2]

۲- ملانژور گلبول سفید

این پی پت با درجات ۰/۵، ۱ و ۱۱ مشخص شده که بین شماره ی ۱ و ۱۱ حبابی تعبیه شده است و گلوله ی سفیدرنگی در داخل آن قرار دارد. برای استفاده از این پی پت آن را تا درجه ۰/۵ از خون و بقیه را تا درجه ی ۱۱ با محلول رقیق کننده پر می کنند و بدین ترتیب، محلولی از خون به رقت ۱/۲۰ به دست می آید. در شرایط لکوپنی شدید می توان ملانژور را تا درجه ۱ از خون پر نمود که در این صورت رقت به دست آمده ۱/۱۰ است. این پی پت علاوه بر شمارش تام لکوسیتها در شمارش ائوزینوفیل ها و سلول های مایع مغزی- نخاعی نیز به کار می رود. ملانژور گلبول سفید را با آب گرمی که با فشار از داخل آن رد می کنند، می شویند. برای خشک کردن آنها نیز می توان از محلول استون و هوا استفاده کرد یا آنها را در اتوکلاو قرار داد.(اطیابی، ۱۳۸۴: ۶۵)

لوله پلاستیکی مخصوص پی پت

لامل مخصوص لام شمارش

محلول های رقیق کننده شمارش گلبولهای خونی:

1 - Kadri N, 2002;48:964.

2 - Jung R, Lubcke C, 1997;23:24–8.

برای شمارش سلول های خونی به وسیله هموسیتو متر یا دستگاه های اتوماتیک از محلولی استفاده می شود که در عین رقیق کردن خون، ایزوتونیک بوده و بر مورفولوژی سلول ها تأثیر نا مطلوب نداشته باشد و در حالی که سلول های مورد شمارش را حفظ می کند سایر سلول های خونی را لیز کند. (گریگ ال. وویگت، ترجمه دکتر راضی جلالی. م و دکتر خواجه. غ و همکاران ۱۳۸۳)

رایج ترین محلول هایی که برای رقیق کردن سلول های خونی به کار می روند عبارتند از:

مارکانو: این محلول باعث همولیز گلبول های قرمز می شود. طرز تهیه آن به این صورت است که اسید استیک گلاسیال (۲ میلی لیتر) و محلول ویوله دوژانسین یک درصد (۱ میلی لیتر) را با آب مقطر (۱۰۰ ملی لیتر) مخلوط میکنیم. همچنین برای شمارش گلبول های سفید از محلول دو درصد اسید استیک یا محلول یک درصد اسید کلریدریک میتوان استفاده کرد.

هایم: طرز تهیه آن به این صورت است که سولفات سدیم (۵ گرم) و کلرید سدیم (۱ گرم) وکلرید جیوه (۰.۵ گرم) را با آب مقطر (۲۰۰ میلی لیتر) مخلوط می کنیم. این محلول ممکن است به علت اثر جیوه بر پروتئین های پلاسما باعث آگلوتیناسیون گلبول ها شود.(هاتینگ، جی، ۱۹۷۶)[1]

شیکر یا هم زن

میکروسکوپ نوری: شمارش گلبول های قرمز و سفید با عدسی شیئی و چشمی با بزرگ نمایی ۱۰ صورت می گیرد. برای شمارش پلاکتها از عدسی شیئی خشک با درشت نمایی ۴۰ استفاده می کنیم.

۳-۵ روش کار:

از ۶ گوسفند نژاد سنگسر ی استان سمنان به میزان هر کدام ۳ سی سی خون از ناحیه گردن ورید وداج گرفته شد و در لوله های حاوی ۳/۲ میلی گرم ضد انعقاد سدیم سیترات و ۴ میلی گرم ضد انعقاد EDTA آرام ریخته شدوبه آزمایشگاه منتقل شد تا آزمایشات هماتوکریت (روش میکروهماکریت) – شمارش پلاکت – شمارش گلبولهای سرخ و سفید -اندازه گیری هموگلوبین – شمارش رتیکولوسیت انجام گرفت.(عامری مهابادی، ۱۳۷۸)

۳-۵-۱ هماتوکریت:

برای اندازه گیری حجم فشرده گلبول های قرمز خون، هماتوکریت بکار می رود. خون دارای ماده ضد انعقاد را سانتریفوژ کردیم، (فضای اشغال شده به وسیله گلبول های قرمز فشرده شده راهماتوکریت می نامند.) هماتوکریت به صورت درصد گلبول های قرمز خون نسبت به خون کامل بیان می شود.(هرر ، ۲۰۰۵)[2]

برای انجام آزمایش در حدود ۳/۲ لوله ی میکروهماتوکریت را با خون کامل دارای ماده ضد انعقاد پر کرده (ماده ی ضدانعقاد مصرفی برای تعیین هماتوکریت EDTA می باشد) و با قرار دادن انگشت اشاره ی خود در انتهای خالی لوله، انتهای دیگر آن را با خمیرمسدود کردیم. لوله ی آماده شده را به نحوی که انتهای مسدود لوله به سمت خارج از مرکز قرار گیرد، در داخل شیار میکروسانتریفوژ قرار دادیم. پس از قرار دادن سرپوش محفظه، لوله ها را به مدت ۵ دقیقه باسرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کردیم.

طبقاتی که پس ازسانتریفوژ به ترتیب از پائین به بالا مشاهده می شوند عبارت اند از:

لایه ی حاوی گلبولهای قرمز، لایه ی بافی کوت که لایه ای خاکستری مایل به قرمز است و پلاکتها و لکوسیتها را شامل می شود. اگر گلبول های قرمز هسته دار وجود داشته باشد، در لایه ی بافی کوت ایجاد رنگ قرمز می کنند، پلاسما که لایه ی زرد رنگی است.(هاچم، اچ، ۲۰۰۸)[3]

هموگلوبین:

هموگلوبین به دو روش اندازه گیری می شود

1- Hattingh, J,1976; 363: 267-269.

2 - Harr, K.E., 2005: 34: 383-388.

3 - Hachem H-2008

۱- دستگاه خودکار شمارش گلبولی مقدار هموگلوبین را بر اساس دانسیته اپتیک اکسی هموگلوبین به طور مستقیم اندازه گیری می کند.

۲- روش دستی که بیشتر مورد استفاده قرار می گیردروش سیانومتهموگلوبین است. دقت این آزمایش ± 50 درصد است و دستگاه اسپکترفتومتر مورد نیاز است.

- در روش سیانومتهموگلوبین مقدار هموگلوبین را به روش زیر اندازه می گیرند:

در یک لوله ۵ میلی لیتر از معرف سیانومتهموگلوبین می ریزیم، مقدار ۰/۰۲ میلی لیتر یا ۲۰ میکرولیتر خون به آن اضافه می کنیم، مقدار خون باید به دقت اندازه گیری شود؛ بنابراین پس ازکشیدن خون در پیپت را باید تمیز کرد تا خون اضافی وارد لوله نشود. پس از اینکه خون را در لوله ریختیم، چندین بار پیپت را با محلول داخل لوله شست و شو می دهیم، در لوله را می بندیم و خون و معرف را خوب مخلوط می کنیم. لوله را به مدت ۱۰ دقیقه به حال خود می گزاریم تا حداکثر هموگلوبین به سیانومتهموگلوبین تبدیل شود. سپس آنرا در دستگاه اسپکترفتومتر با طول موج ۵۴۰ نانومتر می خوانیم و با جدول و منحنی استاندارد آن مقایسه می کنیم. مقدار هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر خون به دست می اید.

- کیت معرف سیانومتهموگلوبین و استاندارد سیانومتهموگلوبین به طور تجارتی موجود است.

معرف سیانومت هموگلوبین، محلول درابکین نیز نامیده می شود.(گارسیا آگیولار، ۲۰۰۷)[1]

فیبرینوژن:

برای اندازه گیری فیبرینوژن پلاسما از روش رفراکتومتری و رسوبی استفاده کردیم به این صورت که برای هر نمونه خون، دولوله میکروهماتوکریت را با خون پر کرده و سانتریفوژ کردیم. یک لوله را برای اندازه گیری پروتئین توتال به روش فوق در نظر گرفتیم و لوله دوم را در لوله آزمایش در داری گذاشته و به طور عمودی در بن ماری ۵۸-۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه قرار دادیم تا فیبرینوژن موجود در پلاسما منعقد شود. در این حالت پلاسما کدر شده بود. سپس این لوله را سانتریفوژ کردیم تا فیبرینوژن آن رسوب کند و با رفراکتومتر مقدار پروتئین آن را خواندیم. اختلاف مقدار در صد پروتئین توتال پلاسما و پروتئین پلاسمای بدون فیبرینوژن، مقدار فیبرینوژن را برحسب گرم در صد میلی لیتر بدست آوردیم.(فارنرت و همکاران، ۱۹۹۹)[2]

۳-۵-۲ شمارش گلبولهای خونی:

متداول ترین لام شیشه ای بسیار ضخیم که برای شمارش گلبول های قرمز، سفید یا پلاکت ها بکار می رود و حاوی دو حجره ی مخصوص شمارش است، هموسیتومتر نئوبار می گویند. محوطه ی شمارش گلبولی در لام نئوبار، سطح مربع شکلی به ضلع ۳ میلی متر و مساحت ۹ میلی متر مربع است. از آنجا که این سطح به ۹ مربع مساوی تقسیم شده، سطح هر یک از ۹ مربع کوچک اصلی یک میلی متر مربع می شود. برای سهولت شمارش نیز، هر مربع کوچک یک میلی متری به ۱۶ مربع کوچک تر تقسیم شده است.

شمارش گلبول های قرمز و سفید با عدسی شیئی و چشمی با بزرگ نمایی ۱۰ صورت می گیرد. برای شمارش پلاکتها از عدسی شیئی خشک با درشت نمایی ۴۰ استفاده می کنیم.

پی پت های مخصوص شمارش سلول های خونی (ملانژور)

رایج ترین محلول های رقیق کننده سلول های خونی عبارتند از:

۱- محلول رقیق کننده گلبول های قرمز: محلول هایم

۲- محلول رقیق کننده گلبول های سفید: محلول مارکانو

---

[1] - Garcia Aguilar, G.D, 2007; 26: 196-201.

[2] - Farnert A, Arez AP, 1999;93:50–3.

۳-۵-۲-۱ شمارش گلبول های قرمز:

با پی پت مخصوص رقیق کننده گلبول قرمز تا درجه ۰/۵ به دقت از نمونه ی مورد آزمایش خون کشیدیم وانتهای پی پت را باپنبه یا پارچه تمیز پاک کرده پی پت را تا درجه ۱۰۱ از محلول رقیق کننده (هایم) پر کرده (خون ۲۰۰ برابر رقیق می شود). پی پت را ۳۰ ثانیه بین انگشت شست و سبابه به آرامی تکان داده تا خوب مخلوط گردد. هنگام کشیدن محلول دقت می کنیم که هیچگونه حبابی در پی پت ایجاد نشود. سپس پی پت تهیه شده را ۲ تا ۳ دقیقه به صورت افقی روی هم زن قرار دادیم. ۴ قطره ی اول را دور ریخته و قطره کوچکی را بین لام و لامل قرار داده و منتظرماندیم تا در سطح مدرج منتشر گردد. ۱ تا ۲ دقیقه صبر کرده تا گلبولها روی سطح لام ته نشین و جایگزین شدند. لام آماده را در زیر میکروسکوپ قرار داده و با عدسی خشک با درشت نمایی کم، مربع مرکزی را میزان کردیم سپس با درشت نمایی بیشتر، گلبول های قرمز راشمارش کردیم.

۳-۵-۲-۲ شمارش گلبولهای سفید:

با پی پت مخصوص رقیق کننده گلبول سفید تا درجه ۰/۵ به دقت از نمونه ی مورد آزمایش خون کشیدیم وانتهای پی پت را باپنبه یا پارچه تمیز پاک کرده پی پت را تا درجه ۱۱ از محلول رقیق کننده (مارکانو) پر کرده (خون ۲۰ برابر رقیق می شود). پی پت را ۳۰ ثانیه بین انگشت شست و سبابه به آرامی تکان داده تا خوب مخلوط گردد. هنگام کشیدن محلول دقت می کنیم که هیچگونه حبابی در پی پت ایجاد نشود. سپس پی پت تهیه شده را ۲ تا ۳ دقیقه به صورت افقی روی هم زن قرار دادیم. ۴ قطره ی اول را دور ریخته و قطره کوچکی را بین لام و لامل قرار داده و منتظرماندیم تا در سطح مدرج منتشر گردد. ۱ تا ۲ دقیقه صبر کرده تا گلبولها روی سطح لام ته نشین و جایگزین شدند. در برخی بیماری ها مانند لکوسیتوز یا لوسمی، اگر تعداد گلبولها ی سفید به بیشتر از ۳۰۰۰۰ در میلی متر مکعب خون برسد، بهتر است خون را تا درجه ۱ پی پت گلبول قرمزکشیده و آن را تا درجه ۱۰۱ با محلول رقیق کننده گلبول های سفید رقیق کنیم. در این صورت رقت ۱/۱۰۰ به دست می آید. اگر تعداد گلبول های سفید مثلاً در برخی لوسمی ها به ۱۰۰ تا ۳۰۰ هزار در میلی متر مکعب برسد، باید خون را به نسبت ۱/۲۰۰ رقیق کنیم. برای این کار، خون را تا درجه ی ۰/۵ پی پت مخصوص شمارش گلبول قرمز میکشیم و تا علامت ۱۰۱ محلول رقیق کننده گلبولهای سفید پر میکنیم. هرگاه تعداد گلبول های سفید کمتر از ۳ هزار در هر میلی متر مکعب خون باشد (لکوپنی)، خون را تا درجه ی ۱ پی پت شمارش گلبول سفیدمیکشیم و تا درجه ۱۱ با محلول رقیق کننده گلبول های سفید رقیق میکنیم تا رقت ۱/۱۰ به دست آید. در روش شمارش دستی گلبول سفید تقریباً ۱۰ تا ۱۵٪ خطا وجود دارد.

۳-۵-۲-۳ شمارش پلاکتها:

شمارش پلاکتها به دو روش مستقیم با ملانژور گلبولهای قرمز و یا شمارش تفریقی به طور غیر مستقیم از روی گسترش لام خونی انجام می گیرد. دستگاه شمارنده خودکار هم برای شمارش پلاکت های بیشتر حیوانات مناسب است به استثنای گربه، زیرا در گربه به علت اینکه پلاکت ها اندازه ای بزرگتر از پلاکت های سایر حیوانات دارند هنگام شمارش با گلبول قرمز اشتباه می شوند. در هنگام بررسی گسترش خون محیطی باید پلاکت ها را از نظر تعداد، مورفولوژی و نحوه انتشار بررسی می کنیم. برای بررسی پلاکت ها شان هایمیکروسکوپی مختلفی را انتخاب و تعداد پلاکت ها را تخمین می زنیم. روش غیر مستقیم به این صورت است که پس از تهیه گسترش خونی مناسب و رنگ آمیزی آن به روش گیمسا یا رایت با عدسی ۱۰۰ روغنی میکروسکوپ، شمارش پلاکت ها را انجام میدهیم. به این ترتیب که پلاکت ها را در ۱۰ شان میکروسکوپی می شماریم، سپس میانگین آن را به دست می آوریم و در عدد ۲۰۰۰۰ ضرب می کنیم تا تعداد پلاکت ها در میلی متر مکعب به دست آید. در زمینه های شمارش پلاکت ها، گلبولهای قرمز باید به طور یکنواخت پخش شده باشند. به طور طبیعی در هر شان میکروسکوپی باید ۲۰-۸ پلاکت وجود داشته باشد.

نتایج:

آنالیز آماری

اطلاعات خون شناسی بدست آمده، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۹ آنالیز شد. میانگین اطلاعات حاصل از تأثیر دو ضد انعقاد EDTA و سدیم سیترات بر پارامترهای خون شناسی با روش Independent Sample T-test مورد آنالیز قرار گرفت و میانگین مقادیر P (P<0/05) بعنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۲- مقایسه میانگین ± SEM پارامترهای خون شناسی بدست آمده از گوسفندان نژاد سنگسری با استفاده از دو ضد انعقاد EDTA و سدیم سیترات نشاندهنده معنادار بودن این پارامتر به لحاظ آماری (P<0/05) می باشد

جدول ۲: مقایسه میانگین ± SEM پارامترهای خون شناسی

پارامترها	HCT(%)	Hgb(g/dl)	RBC ($\times 10^6$)	WBC ($\times 10^3$)	Fib (mg/dl)
نمونه خون EDTA دار	۳۴/۸۳±۱/۶۰	۱۱/۵۸±۰/۵۴	۷/۵۲±۰/۸۱	۳/۹۴±۰/۴۱	۰/۲۱±۰/۰۴
نمونه خون سیتراته	۳۵/۸۳±۱/۷۲	۱۱/۹۱±۰/۵۷	۸/۴۵±۰/۳۵	۳/۹۸±۰/۳۷	۰/۳۶±۰/۱۴
P value	۰/۷۸	۰/۸۲	۰/۳۶	۰/۹۱	۰/۰۱*

بحث:

استفاده از غلظت واحدضد انعقاد های موجود، شمارش ومحاسبه ی کلی پلاکت ها و گلبول های سرخ و سفید و همچنین میزان هماتوکریت وفیبرینوژن و هموگلوبین با توجه به دستور العمل وصرف زمان کافی برای گرفتن نمونه خون ونگهداری ورعایت نکات ضروری در نمونه گیری وانتقال آن به آزمایشگاه وکمتر کردن خطا در نحوه شمارش توصیه میگردد. تاکید بر اهمیت غلظت صحیح سیترات به دلیل مشاهده اختلاف نتایج بین دو غلظت ۳.۲٪ و ۳.۸٪ اسکولاریته ۳.۲ به اسمولاریته پلاسما نزدیک تر است. چون سیترات سدیم دارای غلظت کمتری است در مقادیر مختلف هماتوکریت نتایج آزمایش های انعقادی تغیرات کمتری نشان خواهد داد. سازندگان کیتهای PT میزان ISI را بر اساس ۳.۲ ارائه میدهند. بر اساس پیشنهاد NCCLS و ISTH غلظت مناسب ۱۰۵-۱۰۹ یا به عبارتی ۳.۳۱-۳.۲ (۳.۲٪) میباشد. افزایش میزان EDTA موجب افزایش کاذب واکنش های انعقادی شود. این ماده روی فاکتور ۵ و ۸ اثرات تخریبی داشته و از این رو ضد انعقاد سفارش شده برای آزمونهای انعقادی سیترات سدیم می باشد؛ بنابراین میزان مواد ضدانعقاد و همچنین میزان خون در نتیجه آزمون های انعقادی نقش بسزایی دارد.

منابع و مآخذ:

۱. اطیابی. ن (۱۳۸۴) کلینیکال پاتولوژی دامپزشکی روش های آزمایشگاهی، موسسه انتشارات دانشگاه تهران شماره ۲۷۰۴ چاپ دوم، تهران، ایران.
۲. عامری مهابادی، م (۱۳۷۸) روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۴۴۷، تهران، ایران.

۳. گریگ ال. وویگت، ترجمه دکتر راضی جلالی. م و دکتر خواجه. غ و همکاران (۱۳۸۳)، روش ها و مفاهیم خون شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز ۲۹۳، اهواز، ایران.

4. Farnert A, Arez AP, Correia AT,Bjorkman A,Snounou G, do Rosario V. Sampling and storage Of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction.Trans R Soc Trop Med Hyg 1999;93:50–3.
5. Garcia Aguilar, G.D., Pico Picos, M.A., Quintana Hidalgo, L., Cabrera Argany, A., Medina, L.M., Aguilar Doreste, J.A.: Usefulness of serum indices to evaluate the interferences caused by hemolysis and bilirubin in the measurement of diff erent biochemical constituents. Quimica Clinica, 2007; 26: 196-201.
6. Hachem H, Favre G, Ghalim N, Puchois P, Fruchart JC, Soula G. Quantitative abnormalities of lipoprotein particles in multiple myeloma. J Clin
7. Harr, K.E., Raskin, R.E., Heard, D.J.: Temporal eff ects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. Vet. Clin. Pathol., 2005: 34: 383-388.
8. Hattingh, J., Smith, E.M.: Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. Pfl ugers Arch., 1976; 363: 267-269.
9. Hattingh, J.: Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fi sh blood. Pfl ugers Arch., 1975; 355: 347- 352.
10. Hesser, E.F.: Methods for routine fi sh hematology. Progve. Fish Cult., 1960; 22: 164-171.
11. Jung M, LKlotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. Clin Chem 2003;49:1028–9.
12. Jung R, Lubcke C, Wagener C, Neumaier M.Reversal of RT-PCR inhibition observed in heparinized Clinical specimens. Biotechniques 1997;23:24–8.
13. Kadri N, Douville P, Lachance P. Monoclonalparaprotein may interfere with the Roche Direct HDL-C Plus Assay. Clin Chem 2002;48:964.
14. Kafk a, M., Yermiahu, T.: Th e eff ect of EDTA as anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes. Clin. Lab. Haem., 1998; 20: 213-216.
15. Korcock, D.E., Houston, A.H., Gray, J.D.: Eff ects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Biol., 1988; 33: 319-330.
16. 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: 761-770.
17. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP.Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma.Transfusion 2001;41:276–82.
18. Levy Y, Aviram M, Spira G, Tatarsky I, Brook GJ, Carter A. Plasma cholesterol concentration and extra lipid band in monoclonal gammopathies. Postgrad Med J 1984;60:449–53.
19. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications For noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998;62:768–75.
20. Lui YYN, Chik KW, Chiu RWK, Ho CY, Lam CWK,Lo YMD. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sexmismatched bone marrow transplantation. Clin Chem 2002;48:421–7.

21. Mafuvadze, B., Erlwanger, K.H.: Th e eff ect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (Struthio camelus). Veterinarski Archiv, 2007; 77: 427-434.
22. Martinez-Subiela, S., Ceron, J.J.: Eff ects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. Can Vet. J., 2005; 46: 625-629.
23. Mohri, M., Shakeri, H., Lotfollah, Z.S.: Eff ects of common anticoagulants (heparin, citrate and EDTA) on routine plasma biochemistry of cattle. Comp. Clin. Pathol., 2007; 16: 207-209.
24. Morgan, L.W., Van Bonn, W., Jensen, E.D., Ridgway, S.H.: Eff ects of in vitro hemolysis on serum biochemistry values of the bottlenose dolphin (Tursiops truncatus). J. Zoo Wildl.
25. Morris, J.D., Fernandez, J.M., Chapa, A.M., Gentry, L.R., Th orn, K.E., Weick, T.M.: Eff ects of sample handling, processing, storage, and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. Small Ruminant Research, 2002; 43: 157-166.
26. Muro, J., Cuenca, R., Pastor, J., Vinas, L., Lavin S.: Eff ects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's tortoises (Testudo hermanni). J. Zoo Wildl. Med., 1998; 29: 40-44.
27. Olsen, A.K., Bladbjerg, E.M., Jansen, A.L., Hansen, A.K.: Eff ect of pre-analytical handling on haematological variables in minipigs. Lab. Anim., 2001; 35: 147-152.
28. Orlov, S.N., Aksentse v, S.L., Kotelevtsev, S.V.: Extracellular calcium is required for the maintenance of plasma membrane integrity in nucleated cells. Cell Calcium, 2005; 38: 53-57.
29. Rampling, M.W., Sirs, J.A.: Observations on some factors aff ecting the fl exibility of erythrocyte membranes. Acta Biol. Med. Germ., 1977; 36: 845-846.
30. Sarkar, M., Barari, S.K., Mandal, D.B., Nandankar, U.A., Basu, A., Mohanty, T.K., Ray, S:. Th e eff ects of anti-coagulants on the osmotic fragility of erythrocytes in the Yak (Poephagus grunniens). Vet. J., 1999; 157: 91-93.
31. Smit, G.L., Hattingh, J., Schoonbee, H.B.: Observations on some eff ects of disodiumethylenediamine tetra-acetate and heparin on fi sh blood. Comp. Biochem. Physiol., 1977; 57C: 35-38.
32. Svobodova, Z., Pravda, D., Palackova, J.: Unifi ed methods of haematological examination of fi sh. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany. 1991.
33. Tavares-Dias, M., Silva Sandrim, E.F.: Infl uence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, Colossoma macropomum. Acta Sci., 1998; 20: 151-155.
34. Van Vliet, K.J., Smit, G.L., Pieterse, J.J., Schoonbee, H.J., van Vuren, J.H.J.: Th e eff ects of generally used anticoagulants on The haemolysis of fi sh erythrocytes. Water SA, 1985; 2: 87-92.
35. Walencik, J., Witeska, M.: Th e eff ects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (Cyprinus carpio L.). Comp. Biochem. Physiol., 2007; 146 C: 331-335.

مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، صفحات ۴۷- ۳۰

The Difference in the Effect of the Sodium Citrate Anticoagulants and EDTA on the Blood Factor of Sangsari Sheep Breed

Rohollah Ghasemi[1], Sadegh Ebrahim Abad Ashtian[2]

1. *M.A in Microbiology, North Tehran University.*
2. *M.A in Microbiology, North Tehran University.*

Abstract

Blood is the most important extracellular fluid which flows in veins and is directly or indirectly involved in all biochemical functions of the body. It is composed of two parts. One part is the blood cells containing the white blood cells, red blood cells and platelets. The other part contains the liquid blood or plasma composed of 90% water and 10% dissolved solids in the plasma. The blood composes 6 to 7 percent of the ruminants' body weight. In the young growing animals, the amount of blood sometimes exceeds 10 percent of their body weight. It is recommended to use concentration of the existing anticoagulants, to count and calculate the platelets and red and white cells, as well as the hematocrit, fibrinogen and hemoglobin based on the instructions, and to spend sufficient time taking blood samples and to store the blood samples and observe the essential tips for blood sample storage and transfer them to laboratory with the minimum number of errors in the counting. We should emphasize the importance of the correct concentration of citrate due to observing the different results between 3.2% and 3.8% concentrations. The 3.2% concentration of Osmolarity is closer to plasma osmolarity. Since sodium citrate has less concentration in different levels of hematocrit, the results of coagulation tests will indicate fewer changes. The PT kit manufacturers present the ISI level on the basis of 3.2. As proposed by NCCLS and ISTH, the appropriate concentration is 105-109, or 3.2 to 3.31 (3.2%). An increase in the amount of EDTA will lead to a false increase in the coagulation reactions. This matter has damaging effects on Factors 5 and 8 and is thus the anticoagulant proposed for sodium citrate coagulation tests. Therefore, the amount of anticoagulants, as well as the amount of blood play an important role in the results of blood coagulation tests.

Keywords: blood, the sodium citrate anticoagulants, EDTA, the blood factor of Sangsari sheep breed