



Original Research Paper

The toxic effects of Diclofenac on hematological parameters of blood in *Cyprinus carpio*Parastoo Mohebi Derakhsh^{*1}, Ali Mashinchian Moradi², Issa Sharifpour¹, Mahyar Yousefi Siahkalroodi³¹Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran²Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran³Department of Aquatic animal health, Faculty of Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Key Words

Blood factors
Common carp
Diclofenac
Toxicity
Bioindicator

Abstract

Introduction: Recently, residual pharmaceuticals have been generally recognized as relevant sources of aquatic environmental pollutants. However, the toxicological effects of these contaminants have not been adequately researched. In this study, the chronic toxic effect of Diclofenac (DCF) on the hematological parameters of *Cyprinus carpio* was investigated. DCF is one of the most commonly used Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), which is commonly present in surface and groundwater.

Material & Methods: In the present investigation, the most commonly used pharmaceutical drug, DCF, was exposed to *Cyprinus carpio* in different concentrations (1.25 mg/l, 2.5 mg/l, and 5 mg/l) under the statistical bioassay method to estimate its toxicological effects for a period of 21 days. Over a 21-day experimental period, the effects of diclofenac on the fish were investigated by weekly hematological observations.

Results: In sublethal treatment, a significant decrease in the concentrations of erythrocyte (RBC), leukocyte (WBC), Hemoglobin (Hb), Hematocrit (HCT), and Mean Cellular Hemoglobin (MCH) levels were observed throughout the study period when compared to the corresponding variables of the control group. The Mean Cellular Volume (MCV) and the Mean Cellular Hemoglobin (MCH) levels were constantly increased in this study. On the other hand, a mixed trend was noticed in the parameters that were effectively employed alongside other biochemical factors as biomarkers in the monitoring of DCF toxicity in aquatic organisms. More detailed studies on these specific biomarkers are needed, however, to assess the impacts of human pharmaceutical drugs in the field of pharmacotoxicology and aquatic toxicology.

Conclusion: These results suggest that hematological parameters could be used as potential biomarkers for monitoring the residual pharmaceuticals present in the aquatic environment.

* Corresponding Author's email: mdparastoo1356@yahoo.com

Received: 21 February 2023; Reviewed: 21 March 2023; Revised: 23 May 2023; Accepted: 25 June 2023

(DOI): 10.22034/AEJ.2023.395113.2966

مقاله پژوهشی

اثر سمیت حاد داروی دیکلوفناک بر فاکتورهای خونی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در زمان‌های مختلف

پرستو محبی‌درخش^{۱*}، علی ماشینیچیان‌مرادی^۲، عیسی شریف‌پور^۱، مهیار یوسفی سیاه‌کلودی^۳^۱ موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران^۲ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۳ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

فاکتورهای خونی
کپور معمولی
دیکلوفناک
سمیت
بیواندیکاتور

مقدمه: اخیراً استفاده گسترده از داروهای ضد استروئیدی و راه‌یابی باقی مانده این داروها سبب آلودگی اکوسیستم‌های آب شیرین و شور شده است. دیکلوفناک یکی از رایج‌ترین داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) است که معمولاً در آب‌های سطحی و زیرزمینی وجود دارد با این حال، اثرات سمی دیکلوفناک به اندازه کافی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، ۳۵۰ قطعه ماهی کپور معمولی با دامنه وزنی 30 ± 5 گرم در معرض متداول‌ترین داروی غیراستروئیدی مورد مصرف (دیکلوفناک)، در غلظت‌های مختلف زیرحدکشنده ($1/250$ میلی گرم در لیتر، $2/5$ میلی گرم در لیتر و 5 میلی گرم در لیتر) با سه تکرار و تحت روش زیست‌سنجی آماری قرار گرفتند، تا اثرات سم‌شناسی آن بر شاخص‌های خونی این گونه در طی یک دوره آزمایشی ۲۱ روزه، به صورت هفتگی بررسی گردد.

نتایج: نتایج این پژوهش نشان داد در مواجهه این ماهی با غلظت‌های زیرحدکشنده، کاهش قابل توجهی در میزان گلبول قرمز (RBC)، لکوسیت (WBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (HCT) و میانگین هموگلوبین سلولی (MCH) در طول دوره مطالعه در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد. در این مطالعه، متغیرهای گروه کنترل حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) و میانگین هموگلوبین گلبولی (MCH) به طور مداوم افزایش یافت. به عبارت دیگر تغییراتی در پارامترهای خونی مشاهده شد که می‌تواند به طور موثر در کنار سایر عوامل بیوشیمیایی به عنوان نشانگرهای زیستی در پایش سمیت دیکلوفناک در موجودات آبی به کار گرفته شوند. با این حال، مطالعات دقیق‌تری بر روی این نشانگرهای زیستی خاص برای ارزیابی اثرات داروهای دارویی انسانی در زمینه سم‌شناسی دارویی آبزیان مورد نیاز است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پارامترهای خونی می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای نظارت بر ورود مواد دارویی به اکوسیستم‌های آبی مورد استفاده قرار گیرند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mdparastoo1356@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۲ اسفند ۱۴۰۱؛ تاریخ داوری: ۱ فروردین ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۲ خرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۴ تیر ۱۴۰۲

(DOI): 10.22034/AEJ.2023.395113.2966

مقدمه

ترکیبات دارویی به طور گسترده در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اخیراً به دلیل تولید بیش از حد و استفاده بی‌رویه، مواد دارویی و دفع پساب‌های شهری و صنایع از طریق شیرابه‌های محل‌های دفع زباله و دفع داروهای بلااستفاده وارد محیط زیست شده‌اند (۱، ۲، ۳). علاوه بر این، استفاده از داروهای دامپزشکی در صنعت آبی‌پروری نیز به معرفی مقادیر قابل توجهی به ورود داروها به محیط زیست کمک می‌کند (۴). امروزه، حضور این مواد فعال و متابولیت‌های آن‌ها در بخش‌های مختلف محیط زیست، مانند پساب‌های فاضلاب تصفیه‌شده و تصفیه‌نشده، آب‌های زیرزمینی، آب‌های سطحی، آب آشامیدنی و مصب‌ها با غلظت‌هایی مشاهده شده است (۵، ۶، ۷). ورود مداوم داروها به محیط آبی ممکن است بر موجودات غیرهدف از جمله ماهی تأثیر بگذارد (۶، ۸، ۹). داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) به یکی از مهم‌ترین گروه‌های دارویی در سراسر جهان تعلق دارند. این داروها به دلیل حجم بالای مصرف و حذف ناقص آن‌ها در طی تصفیه فاضلاب در محیط شناسایی شده‌اند (۱۰، ۱۱). دیکلوفناک (DFC) یکی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی است که به طور گسترده به عنوان ضد درد، ضدالتهاب برای تسکین علائم آرتریت و اختلالات روماتیسمی، دردهای قاعدگی ناشی و هم چنین یک مهار کننده سیکلواکسیژناز در سراسر جهان استفاده می‌شود (۶، ۱۲). این دارو یکی از پرمصرف‌ترین داروهای انسانی و در فهرست داروهای ضروری منتشر شده توسط سازمان بهداشت جهانی گنجانده شده است (۱، ۶، ۱۳، ۱۴). دیکلوفناک، به عنوان یکی از اصلی‌ترین مواد دارویی موجود در اکوسیستم‌های آبی شناخته شده است به دلیل تولید آن در مقادیر زیاد در سراسر جهان و راهیابی پساب‌های تصفیه‌خانه‌های کارخانه‌های داروسازی در آب‌های سطحی شناسایی شده است. علاوه بر این، غلظت این دارو در منابع آبی گزارش شده از کشوری به کشور دیگر متفاوت است (۶). ارزیابی آب‌های آلوده و نشانگرهای زیستی سلامت آبزیان به طور گسترده به عنوان ابزار تشخیص اولیه استفاده می‌شود (۱۵). در میان موجودات آبی، ماهیان به طور گسترده برای ارزیابی اثرات آلودگی محیطی بر اکوسیستم آبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اخیراً استفاده از نشانگرهای زیستی حساس به طور گسترده برای ارزیابی خطر موجودات آبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند به طور کلی، تغییرات این نشانگرهای زیستی در خون برای تشخیص وضعیت ساختاری و عملکردی ماهی در معرض سموم و همچنین در نظارت بر محیط آبی مفید است (۱۶، ۱۷). فاکتورهای خونی به طور معمول به عنوان نشانگرهای زیستی ارزشمند برای ارزیابی سمیت آلاینده‌های محیطی در اکوسیستم آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند برهمکنش بین

ماده سمی و سیستم بیولوژیکی را می‌توان با استفاده از نشانگرهای زیستی هماتولوژیک اندازه‌گیری کرد (۱۸). تغییر در بیومارکرهای هماتولوژیک (تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و لکوسیت‌ها (WBC)، غلظت هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (HCT)، میانگین حجم سلولی (MCV)، میانگین هموگلوبین سلولی (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) به طور گسترده‌ای برای ارزیابی استرس سمی، یکپارچگی سیستم ایمنی و آسیب بافت استفاده می‌شود (۲۰، ۲۱، ۲۲). این نشانگرهای زیستی اغلب به تغییرات پدیده‌های محیطی یا فیزیولوژیکی حساس هستند. آن‌ها به راحتی قابل اندازه‌گیری می‌باشند و معیار یکپارچه‌ای از تغییرات فیزیولوژیکی را در موجود ارائه می‌دهند (۲۳). داروها دارای خصوصیات فیزیکوشیمیایی مشابهی با مواد شیمیایی مضر هستند و دائماً در محیط پراکنده می‌شوند و اطلاعات کمی در مورد اثرات آن‌ها بر گونه‌های غیر هدف در محیط زیست وجود دارد (۶، ۲۴، ۲۵). اطلاعات در مورد سمیت زیست محیطی دیکلوفناک برای درک اثرات مزمن آن بر برخی موجودات به جز کشندگی کافی نیست (۶). علاوه بر این، استفاده از یک رویکرد حساس‌تر مانند یک آزمون مبتنی بر نشانگرهای زیستی برای ارزیابی محیط واقعی ضروری است (۲۶). از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی سمیت مزمن زیرکشنده دیکلوفناک بر روی ماهی کپور معمولی با استفاده از نشانگرهای زیستی فاکتورهای خونی برای مشاهده اثرات سمی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق اثر داروی دیکلوفناک سدیم بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی در سه زمان ۷، ۱۴ و ۲۱ در آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت این ماهی با میانگین وزن 30 ± 5 گرم و متوسط طول بدن 16.1 ± 1.0 سانتی‌متر در یک آکواریوم (۱۴۰ لیتر) نگهداری و پس از دوره سازگاری، ماهی‌هایی با میانگین وزن مشابه جدا و آزمایش با ۳ تکرار براساس پارامترهای زیر انجام شد. ۲۰ قطعه ماهی در هر تکرار، با تراکم $3/5$ گرم در لیتر، هوادهی مداوم، دوره نوری ساعت ۱۲-۱۲، تغذیه ۱٪ وزن بدن و ۵۰٪ تعویض روزانه نگهداری شدند (۲۷).

تیمارها و طراحی آزمایش: ماهی‌ها در پنج تیمار با سه تکرار دسته‌بندی شدند سپس در معرض غلظت‌های $0.1/25$ ، $1/25$ و $2/5$ دیکلوفناک قرار گرفتند (۲۸). برای کنترل عوارض جانبی احتمالی حلال مورد استفاده، گروه دیگری از ماهی‌ها در معرض $0.1/2$ میلی‌لیتر در لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) قرار گرفتند (۲۹). پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب آکواریوم‌ها به طور منظم بررسی شد (دما: 25°C ؛ pH: ۷/۱؛ اکسیژن محلول: $5/2$ میلی‌گرم در لیتر؛ مقدار pH :

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق از نرم افزارهای اکسل و SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید و جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین نتایج گلبول های قرمز، هموگلوبین و ... با آزمون پارامتریک بررسی شد. پس از تعیین نرمال بودن داده ها از آزمون خطی، پیرسون، t تست، t دوطرفه و آنالیز واریانس، آنالیز t مستقل و به منظور همبستگی بین فاکتورهای خونی با زمان و غلظت از آزمون اسپیرمن استفاده گردید مقادیر به عنوان میانگین بیان و تفاوت های معنی دار ($p < 0.05$) بین غلظت ها، بین روزها و تفاوت بین غلظت ها و روزها در هر پارامتر تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی مواجهه شده با دیکلوفناک به مدت ۱۴،۷ و ۲۱ روز تغییراتی در مقایسه با گروه های کنترل نشان دادند. میزان Hb، RBC، WBC، HCT در تیمارهای دیکلوفناک در مدت زمان مواجهه کاهش یافت هرچند مقادیر MCV و MCH به دلیل مواجهه با دیکلوفناک افزایش یافت، در حالی که مقدار MCHC در گروه های تیمار شده با دیکلوفناک مشابه گروه های کنترل بود (شکل های ۱ تا ۵) تمام شاخص های گروه DMSO با گروه کنترل قابل مقایسه بود. تغییر معنی داری ($p < 0.05$). نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که غلظت های مختلف دیکلوفناک تأثیر بیش تری نسبت به زمان های مواجهه داشتند. کاهش میزان RBC و WBC به غلظت مواجهه بستگی داشت.

رسانایی: $633 \mu S/cm$ و سختی: $266 mg/CaCO_3$ بررسی شدند (۳۰). دیکلوفناک با خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت سبحان دارو در ایران خریداری شد. در غلظت نهایی آزمایش، دیکلوفناک در DMSO رقیق شد تا محلولی حاوی ۱۰۰ گرم دیکلوفناک در لیتر به دست آمد. در این مرحله، حجم دارویی لازم برای تهیه تیمارها با نسبت $C1V1 = C2V2$ محاسبه و از آن برای تهیه اولین محلول ذخیره و متعاقباً با توجه به غلظت ها استفاده شد (۳۱).

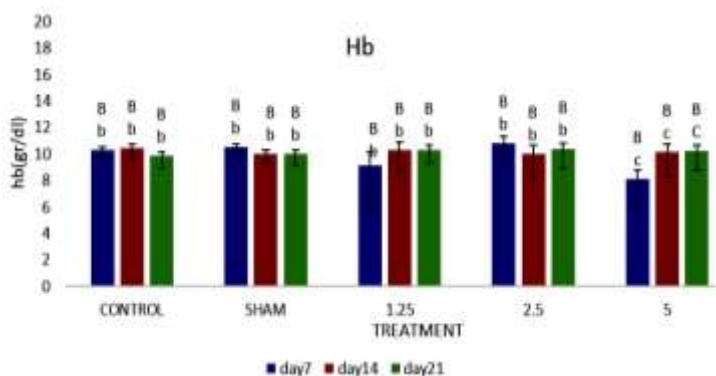
جمع آوری و تهیه نمونه خون: با قطع ساقه دمی ماهی از آن ها نمونه خون گرفته شد. نمونه خون جمع آوری شده به ویال های کوچکی که قبلاً هپارینه شده بودند، منتقل و برای تخمین پارامترهای خونی مانند شمارش Hb، RBC و WBC مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه گیری شاخص های خونی: هموگلوبین با روش سیانمت هموگلوبین برآورد شد. RBC و WBC با روش های Rusia and Sood شمارش شدند. مقدار HCT با استفاده از لوله موئینه، سانتریفیوژ و خط کش هماتوکریت براساس روش کار Nelson and Morris برآورد شد (۳۲). شاخص های گلبول قرمز مانند MCV، MCH و MCHC نیز طبق فرمول استاندارد محاسبه شدند:

$$MCV (fl) = \frac{Hct (\%)}{RBC (million \times cu \times 10)} \times 100$$

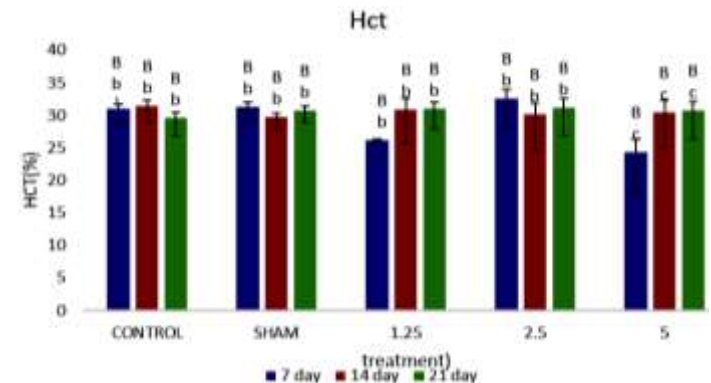
$$MCH (pg) = \frac{Hb (\frac{g}{dl})}{RBC (million \times cu \times 106)} \times 100$$

$$MCHC (g/dl) = \frac{Hb (\frac{g}{dl})}{HCT (\%)} \times 100$$

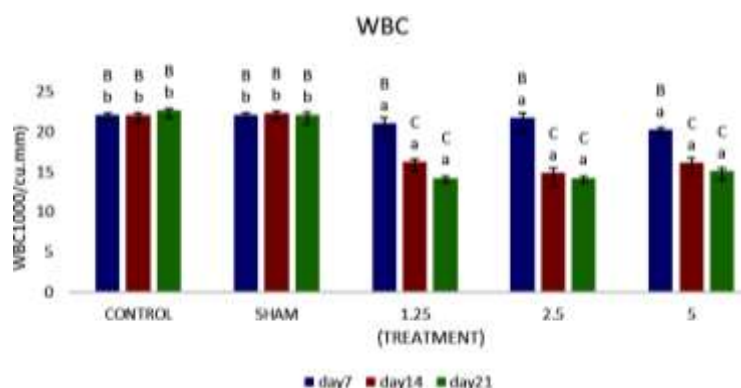


شکل ۲: نمودار تغییرات میزان هموگلوبین در ماهی آب شیرین *C. Carpio* با غلظت های زیر حد کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD هستند. براساس تحلیل واریانس چندمتغیره هیچ تغییر قابل توجهی در زمان مواجهه مشاهده نشد، اما کاهش قابل توجهی از مقدار Hb در بالاترین غلظت مشاهده شد ($p < 0.05$).

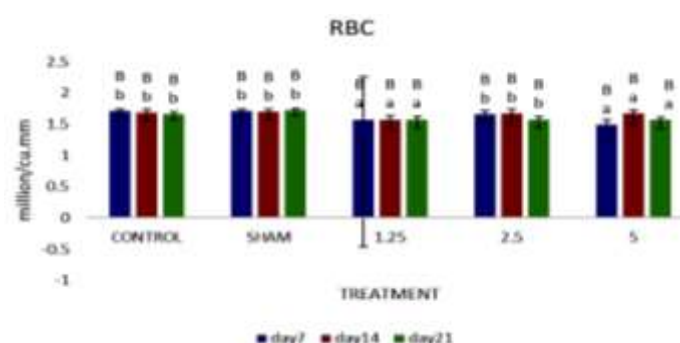
حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت معنی دار در زمان مواجهه است. حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار بین غلظت ها هستند.



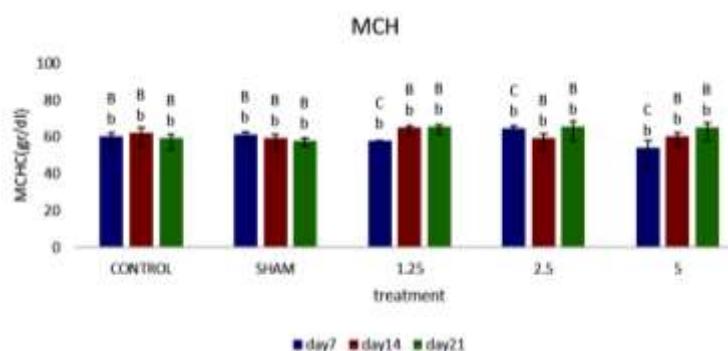
شکل ۱: نمودار تغییرات مقادیر HCT در ماهی آب شیرین *C. carpio* تیمار شده با غلظت های زیر حد کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD هستند. براساس آزمون تحلیل واریانس چندمتغیره تغییر معنی داری در زمان مواجهه در مشاهده نشد، اما در بالاترین غلظت ها کاهش معنی داری مشاهده شد ($p < 0.05$).



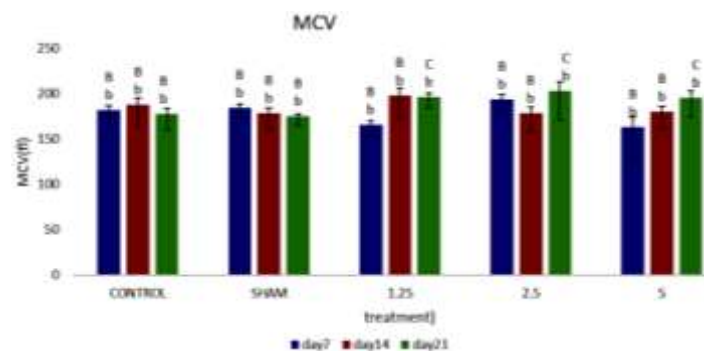
شکل ۴: نمودار تغییرات تعداد WBC در ماهی آب شیرین *C. Carpio* با غلظت های زیر کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD خطای استاندارد هستند براساس آزمون تحلیل واریانس چندمتغیره. تغییرات قابل توجهی در زمان و غلظت مواجهه مشاهده شد ($p < 0.05$).



شکل ۳: نمودار تغییرات تعداد گلبول های قرمز در ماهی *C. Carpio* با غلظت های زیر کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD (خطای استاندارد) هستند (براساس تحلیل واریانس چندمتغیره). تفاوت معنی داری در زمان مواجهه مشاهده نشد، اما تفاوت معنی داری در بیش ترین و کم ترین غلظت مشاهده شد ($p < 0.05$).

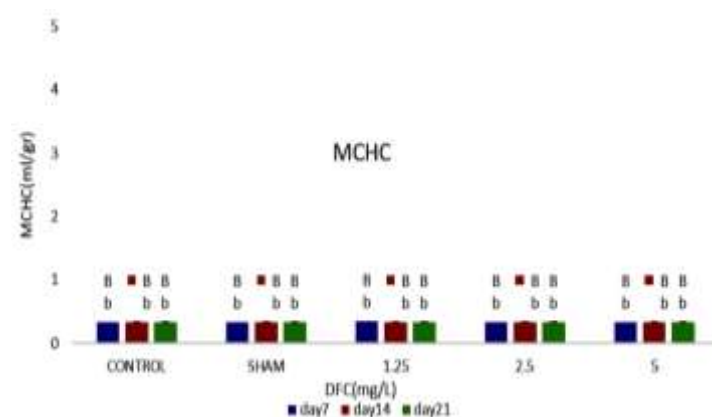


شکل ۶: نمودار تغییرات در مقدار MCH در ماهی *C. Carpio* با غلظت های زیر حد کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی SD (خطای استاندارد) هستند. (براساس آزمون تحلیل واریانس چند متغیره). تغییرات قابل توجهی در زمان مواجهه مشاهده شد، اما تغییر قابل توجهی در غلظت مشاهده نشد ($p < 0.05$).



شکل ۵: نمودار تغییرات در مقدار MCV در ماهی آب شیرین *C. Carpio* با غلظت های کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD (خطای استاندارد) هستند. تغییر معنی داری در غلظت مواجهه مشاهده نشد، اما کاهش معنی داری در زمان مواجهه با دارو مشاهده شد ($p < 0.05$).

شکل ۷: تغییرات در مقدار MCHC در ماهی آب شیرین *C. Carpio* با غلظت های کشنده DCF (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی که نشان دهنده SD خطای استاندارد است. (براساس آزمون تحلیل واریانس چند متغیره). هیچ تغییر قابل توجهی در زمان یا غلظت مواجهه مشاهده نشد ($p < 0.05$).



حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار در زمان مواجهه است. حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت معنی دار بین غلظت ها هستند.

بحث

اهمیت بررسی وضعیت خونی به عنوان تابلویی از وضعیت سلامت یا بیماری و نیز تعادل و یا عدم تعادل در ماهیان بسیار روشن است، زیرا مطالعات خون شناسی و بیوشیمیایی خون در بررسی های مختلف و در رابطه با موضوعات متفاوت، مورد سنجش و اندازه گیری قرار گرفته است (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶). بیومارکرهای مناسب برای آنالیز سمیت شیمیایی آب در مطالعات فیزیولوژیک می تواند فاکتورهای خونی ماهی باشد. استرس های محیطی می توانند آلاینده ها نیز باشند که در نهایت منجر به ایجاد تغییرات در پلازما یا خون ماهی و تغییر در فاکتورهای خونی و یا میزان فعالیت آنزیم ها می گردند (۳۷، ۳۸). تست های سمیت حاد و مزمن به طور گسترده ای برای ارزیابی سمیت مواد شیمیایی روی ارگانیسم های غیر هدف استفاده می شود (۲۶). داروها که از نظر بیولوژیکی موافق و پایدار هستند، بیش تر از طریق تصفیه خانه های فاضلاب (WWTP) وارد محیط آبی می شوند و ممکن است به دلیل فعالیت بیولوژیکی ذاتی در غلظت های حاد و مزمن بر موجودات آبی تأثیر بگذارند (۳۹، ۴۰). حتی در غلظت های پایین، داروها می توانند اثرات سمی روی ارگانیسم های غیر هدف ایجاد کنند بنابراین، بررسی روی سمیت حاد این ترکیبات و می تواند نحوه عملکرد و سمیت داروها را مشخص نماید (۴۱، ۳۹). حتی غلظت بسیار کم دیکلوفناک در محیط های آبی می تواند اثر سمی بر موجود زنده داشته باشد که میزان سمیت آن به غلظت، گونه، سن، جنس و دوره قرار گرفتن ارگانیسم بستگی دارد (۱). به نظر می رسد غلظت حاد دیکلوفناک در مطالعات فعلی و قبلی در محدوده ۱ mg/l باشد، که بالاتر از غلظت آن در محیط طبیعی است، از این رو، سمیت کشنده داروها روی ارگانیسم های غیر هدف اهمیت بیش تری پیدا می کند (۳۹، ۳۸). قرار گرفتن در معرض طولانی مدت آبیان با دیکلوفناک در غلظت های مرتبط با محیط زیست ممکن است اثرات جزئی آن را بر حیوانات غیر هدف کاهش دهد (۳۹، ۴۱). در مقابل، ممکن است غلظت بیش از ۱ mg/L دیکلوفناک موجودات آبی را از طریق مواجهه با تحت تأثیر قرار دهد (۳۷). مطالعات بیش تر در مورد سمیت مزمن دیکلوفناک ممکن است اطلاعاتی در مورد خطرات اکولوژیکی آن بر روی موجودات غیر هدف ارائه دهد (۳۷). مشخصات هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون می تواند اطلاعات مهمی در مورد شرایط بدن موجود ارائه دهد (۴۲). اخیراً، نشانگرهای زیستی به طور گسترده ای برای ارزیابی تأثیر داروها بر ماهی ها و سایر موجودات آبی برای دستیابی به سیگنال های هشدار اولیه خطرات زیست محیطی مورد استفاده قرار می گیرند (۳۵، ۶، ۴۳). تجزیه و تحلیل فاکتورهای خونی به طور گسترده ای به عنوان شاخص هایی برای ارزیابی استرس سمی، وضعیت عملکردی سلامت آبیان استفاده

می شود (۲۲، ۸). علاوه بر این، پارامترهای هماتولوژیکی و بیوشیمیایی موجودات آبی نیز ممکن است به عنوان نشانگرهای زیستی برای ارزیابی سمیت کشنده مواد شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند (۲۹، ۴۲). پارامترهای خونی مانند تعداد RBC، Hb، HCT و WBC و سایر شاخص های خونی مانند MCV، MCH و MCHC، به دلیل ارتباط نزدیک با محیط خارجی ممکن است به انواع خاصی از آلاینده ها حساس باشند و اغلب برای تشخیص وضعیت فیزیولوژیکی حیوانات مورد استفاده قرار گرفته اند (۴۴). در این مطالعه، پاسخ های خونی RBC، HCT، Hb و WBC تحت سمیت حاد دیکلوفناک در طول دوره مطالعه کاهش یافت. از طرف دیگر مقادیر MCH و MCV به طور مداوم افزایش می یابد. با این حال، در طول زمان قرار گرفتن در معرض، روند تغییرات RBC، HCT و Hb ثابت بود، اما روند تغییرات در MCV، WBC و MCH بعد از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز متفاوت بود. کاهش تعداد RBC در مطالعه حاضر ممکن است ناشی از مهار تولید RBC توسط دیکلوفناک باشد. با این حال، سطوح Hb و RBC در خون به دلیل توانایی آن ها در انتقال مواد غذایی، اکسیژن و مواد زائد متابولیک باید حفظ شود (۴۵). کاهش تعداد گلبول های قرمز در ماهی ها ممکن است نشان دهنده یک وضعیت کم خونی در این ماهی ها در شرایط استرس باشد (۸). علاوه بر این، تجمع مواد سمی در ناحیه آبشش ممکن است به ساختار آبشش آسیب برساند و منجر به همولیز شود. از سوی دیگر، اختلال در تنظیم اسمزی ناشی از سم ممکن است منجر به کاهش تعداد RBC شود (۲۹، ۴۶). در این مطالعه، درصد پایین قابل توجه هموگلوبین در گروه ها پس از مواجهه ۲۱ روزه با دیکلوفناک، شاید به اختلال در مکانیسم فعال سازی مجدد اریتروپوئیز توسط طحال و کبد برای جبران کمبود ناشی از استرس محیطی نسبت داده شود. ممکن است درصد پایین قابل توجه HCT در گروه ها پس از ۲۱ روز نشان دهنده تولید سرکوب شده RBC باشد. Roa و Jayabha کاهش میزان RBC و افزایش نوتروفیل ها را در اثر سمیت حاد مواجهه ماهی کپور معمولی با دیکلوفناک در مدت ۲۱ روز به دلیل استرس ایجاد شده در اثر آسیب به بافت های بدن ماهی و هم چنین افزایش لنفوسیت ها را به دلیل دفاع در برابر استرس ایجاد شده (لنفوسیتوز) مرتبط دانست. از سویی کاهش نوتروفیل ها به دلیل کاهش یا مختل شدن ظرفیت بیگانه خواری نوتروفیل ها می باشد که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد (۴۷). در تحقیق مشابه مطالعه حاضر فاکتورهای خونی در گربه ماهی *Rhamdia quelen* در مواجهه با دیکلوفناک به مدت ۹۶ ساعت ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که مواجهه دیکلوفناک با غلظت مشخص منجر به کاهش میزان RBC و هموگلوبین، مونوسیت ها و نوتروفیل ها افزایش یافت که دلیل کم خونی می تواند مرتبط با اثر داروهای ضد استروئیدی و ضد التهابی باشد. افزایش در مونوسیت ها و نوتروفیل ها

هشدار اولیه برای قرار گرفتن در معرض دارویی با موجودات آبی مورد استفاده قرار گیرند. نتایج حاکی از درک بهتر اثر سمیت این داروی خاص است و اطلاعات قابل توجهی در مورد سطوح ایمن آن در محیط آبی ارائه می‌دهد. با این حال، مطالعات دقیق‌تری در مورد استفاده از این نشانگرهای زیستی خاص برای نظارت بر داروهای انسانی مورد نیاز است. ماهی کپور مورد استفاده در این تحقیق یکی از گونه‌های مهم کاندیدای آبی‌پروری و شیلات در ایران است. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه در پایش اثرات زیرکشنده دیکلوفناک در ماهیان آب‌شیرین مفید خواهد بود.

منابع

1. Heberer, T., Reddersen, K. and Mechliniski, A., 2002. From municipal sewage to drinkingwater: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci. Technol.* 46(11): 81-88.
2. Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Frayse, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. and Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem.* 23(5): 1344-1354.
3. Gros, M., Petrovic, M., Ginebreda, A. and Barceló, D., 2009. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Int.* 36(1): 15-26.
4. Henschel, K.P., Wenzel, A., Diedrich, M. and Flidner, A., 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharm.* 25(3): 220-225.
5. Metcalfe, C.D., Miao, X.S., Koenig, B.G. and Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(12): 2881-2889.
6. Fent, K., Weston, A.A. and Caminada, D., 2006. Ecotoxicological of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76(2): 122-159.
7. Gómez, M., Bueno, M.M., Lacorte, S., Fernández-Alba, A. and Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere.* 66(6): 993-1002.
8. Li, Z.H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J. and Randak, T., 2011. Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses. *J. Hazard. Mater.* 185(2-3): 870-880.
9. Ginebreda, A., Munoz, I., López de Alda, M., Brix, R., López-Doval, J. and Barceló, D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macro invertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environ. Int.* 36(2): 153-162.
10. Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S. and Müller, S.R., 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrate

ممکن است به دلیل واکنش ماهی به دارو باشد و ممکن است در مواجهه طولانی مدت این میزان افزایش بیش‌تری داشته باشد (۴۸). در تحقیقی مشابه، Li و همکاران، کاهش میزان RBC در خون قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را در مواجهه با وراپامیل (VPR)، یک داروی قلبی‌عروقی گزارش کرد (۸). علاوه بر این، همان نتایج، از مواجهه ماهی کپور هندی در معرض ایبوپروفن (IB) کاهش RBC و افزایش مقادیر Hb و HCT به دست آمد (۲۹). مطالعه‌ای دیگر مواجهه *Oncorhynchus mykiss* با کاربامازپین، باعث افزایش مقادیر Hb و HCT شد (۱۸). علاوه بر این، بیش‌تر ترکیبات دارویی موجود در محیط آبی از طریق آبشش‌ها و مواد غذایی آلوده وارد بدن ماهی می‌شود. WBC‌ها در تنظیم عملکرد ایمنی در بسیاری از ارگان‌ها نقش دارند. در این مطالعه، کاهش مشاهده شده در تعداد WBC در ماهی‌های تیمار شده با دیکلوفناک نشان‌دهنده کاهش ناشی از کاهش لنفوسیت‌ها است. به نظر می‌رسد دیکلوفناک باعث ایجاد لنفوسیتوز می‌شود که نشان‌دهنده یک بیماری لوسمی است و معمولاً با علائم سلولی دژنراسیون، نابالغی یا بدخیمی همراه است. لنفوسیت‌ها یک نقش مهمی در ایمنی استخوان بازو و سلولی در ماهی دارد (۴۹). لنفوسیتوز ممکن است نشان‌دهنده تحریک ایمنی باشد، درحالی‌که لنفوپنی ممکن است بیانگر شرایط سرکوبگر سیستم ایمنی باشد (۵۰). عوامل استرس‌زا ممکن است باعث واکنش استرس قابل توجهی در اکثر ماهی‌ها شود، اما با مزمن شدن یا سازگاری، پاسخ ممکن است کاهش یابد. به نظر می‌رسد که تغییرات خونی مرتبط با پاسخ استرس ممکن است تا چند روز پس از حذف عامل استرس‌زا باقی بماند و لوکوگرام برای اکثر ماهی‌ها به‌صورت لکوپنی همراه با لنفوپنیا آشکار می‌شود (۵۱، ۵۲). در مطالعه حاضر، افزایش در مقادیر MCV و MCH همراه با زمان قرار گرفتن در معرض افزایش می‌یابد. مقدار ثابت MCHC نشان می‌دهد که کم‌خونی از نوع ماکروسیتی است (۲۱). در پژوهشی مشابه این تحقیق، Saravanan و همکاران، گزارش کردند که کپور هندی مواجهه شده با دیکلوفناک روند افزایشی در مقادیر MCV و MCH نشان داد. مقدار MCHC در طول زمان آزمایش ثابت بود (۲۹). همین نتیجه مطالعه حاضر توسط Li و همکاران و Saravanan و همکاران، گزارش شده است مواجهه دارویی *O. mykiss* و کپور هندی را در معرض کاربامازپین و دیکلوفناک منجر به افزایش ثابت MCHC، MCV و MCH در مواجهه مزمن با این داروها شده است (۲۹، ۱۸). در مطالعه حاضر، نتیجه‌گیری می‌شود که دیکلوفناک تأثیر عمیقی بر نمایه خونی *C. Carpio* دارد و دیکلوفناک برای موجودات آبی سمی است. این پارامترها می‌توانند به‌طور موثر به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه سمیت دیکلوفناک برای ماهیان آب شیرین در زمینه نظارت بر زیست محیطی و هم‌چنین سیگنال‌های

24. Sanderson, H., Brain, R.A., Johnson, D.J., Wilson, C.J. and Solomon, K.R., 2004. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology*. 203(1-3): 27-40.
25. Ericson, H., Thorsen, G. and Kumblad, L., 2010. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 99(2): 223-231.
26. Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131(1-2): 5-17.
27. Guiloski, I.C., Ribas, J.L.C., Pereira, L.D.S., Neves, A.P.P. and Asis, H.C.S.D., 2015. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114: 204-211.
28. Stavonca, V., Plhalova, L., Bartoskova, M., Zinva, D., Prokes, M., Marsalek, P., Blahova, J., Skoric, M. and Svobodova, Z., 2014. Effects of Mixture of Pharmaceuticals on Early Life Stage of Tench (*Tinca tinca*). *Biomed Res Inte.* 253468. doi: 10.1155/2014/253468.
29. Saravanan, M., Prabhu Kumar, K. and Ramesh, M., 2011. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100(3): 206-211.
30. APHA (American Public Health Association), 1998. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC. 874 p.
31. Happ, T., Triebskorn, R. and Kohler, H.R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO on *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere*. 73(3): 353-359.
32. Drabkin, D.L., 1946. Spectrometric studies XIV: the crystallographic and optimal properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.* 164(2): 703-723.
33. Rusia, V. and Sood, S.K., 1992. Routine hematological tests. In: Kanai, L. and Mukerjee, M., (Eds.), *Medical Laboratory Technology*, vol. 1, fifth reprint. Tata McGraw Hill Publishing Company Limited, New Delhi. 252-258.
34. Santos, L.H.M.L.M., Araujo, A.N., Fachini, A., Pena, A. and Deleure-Matos, C., 2010. Montene-gro MCBSM, Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175(1-3): 45-95.
35. Quinn, B., Gagné, F. and Blaise, C., 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 389(2-3): 306-314.
36. Ginebreda, A., Munoz, I., López de Alda, M., Brix, R., López-Doval, J. and Barceló, D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macro invertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environ. Int.* 36(2): 153-162.
37. Hoeger, B., Dietrich, D.R., Schmid, D., Hartmann, A. and Hitzfeld, B., 2008. Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout (*Salmo trutta* f. Fario). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71(2): 412-418.
11. Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. and Takada, H., 2006. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.* 40(17): 3297-3303.
12. Kosjek, T., Heath, E., Perez, S., Petrovic, M. and Barcelo, D., 2009. Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole time of flight mass spectrometry. *J. Hydrol.* 372(1-4): 109-117.
13. Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J.L., Budzinski, H. and Poulichet, E.F., 2006. Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium sized Mediterranean catchment. *Environ. Sci. Technol.* 40(17): 5282-5288.
14. Jux, U., Baginski, R.M., Arnold, H.G., Krönke, M. and Seng, P.N., 2002. Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205(5): 393-398.
15. Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A., 2000. Use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247(2-3): 295-311.
16. Van der Oost, R., Jonny, B. and Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment, a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13(2): 57-149.
17. El Sayed, Y.S., Saad, T.T. and El Bahar, S.M., 2007. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24(3): 212-217.
18. Li, Z.H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J. and Randak, T., 2010. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chem. Biol. Interact.* 183(1): 98-104.
19. Nemcsok, J. and Boross, L., 1982. Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. *Acta Biol. Hung.* 33(1): 23-27.
20. Kavitha, C., Malarvizhi, A., Kumaran, S.S. and Ramesh, M., 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. *Food and Chemical Toxicology*. 48(10): 2848-2854.
21. Talas, Z.S. and Gulhan, M.F., 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72(7): 1994-1998.
22. Lavanya, S., Ramesh, M., Kavitha, C. and Malarvizhi, A., 2011. Hematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. *Chemosphere*. 82(7): 977-985.
23. Remya, S., Ramesh, M., Sajwan, K.S. and Senthil Kumar, K., 2008. Influence of zinc on cadmium induced hematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. *Fish Physiol. Biochem.* 34(2): 169-174.

52. **Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. and McLeay, D.J., 1990.** Stress and acclimation. Bethesda, MD. American Fisheries Society.
38. **Malarvizhi, A., Kavitha, C., Saravanan, M. and Ramesh, M., 2012.** Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. J. King Saud Univ. Sci. 24(2): 179-186.
39. **Pounds, N., Maclean, S., Webley, M., Pascoe, D. and Hutchinson, T., 2008.** Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusk *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 70(1): 47-52.
40. **Parolini, M., Binelli, A. and Provini, A., 2011.** Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74(6): 1586-1594.
41. **Han, G.H., Hur, H.G. and Kim, S.D., 2006.** Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 25(1): 265-271.
42. **Velisek, J., Dobsikova, R., Svobodova, Z., Modra, H. and Luskova, V., 2006.** Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin Environmental Contamination Toxicology. 76(6): 992-998.
43. **Tellez -Bañuelos, M.C., Santerre, A., Casas -Solis, J., Bravo -Cuellar, A. and Zaitseva, G., 2009.** Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. Fish & Shellfish Immunology. 27(2): 105-111.
44. **Van Vuren, J.H.J., 1986.** The effects of toxicants on the haematology of *Labeo umbratus* (Teleostei: Cyprinidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. 83(1): 155-159.
45. **Narra, M.R., Rajender, K., Reddy, R.R., Murty, U.S. and Begum, G., 2017.** Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. Chemosphere. 168: 350-357.
46. **Kavitha, C., Ramesh, M., Senthil Kumaran, S. and Audhi Lakshmi, A., 2012.** Toxicity of Moringa oleifera seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. Exp. Toxicol. Pathol. 64(7-8): 681-687.
47. **Evans, D.L. and Jaso-Friedmann, L., 1992.** Nonspecific cyto-toxic cells as effectors of immunity in fish. Annu Rev Fish Dis. 2: 109-121.
48. **Blahová, J., Mikula, P., Doubková, V. and Svobodová, Z., 2022.** Effect of ibuprofen and diclofenac on selected indices in common (*Cyprinus carpio*). Mil. Med. Sci. Lett. 9.1 (supplementum 1) ISSN 0372-7025 (Print) ISSN 2571-113X (Online)
49. **Ghelfi, A., Coelho Ribas, J.L., Guiloski, I.C., Bettim, F.L., Stein Piancini, L.D., Cestari, M.M., Aramis Pereira, A.J., Sassaki, G.L., Silva de Assis, H.C., 2016.** Evaluation of Biochemical, Genetic and Hematological Biomarkers in a Commercial Catfish *Rhamdia quelen* Exposed to Diclofenac. Bull Environ Contam Toxicol. 96(1): 49-54. doi: 10.1007/s00128-015-1693-3.
50. **Clauss, T., Dove, A. and Arnold, J., 2008.** Hematologic disorders of fish, Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice. 11(3): 445-462.
51. **Houston, A.H., 1990.** Blood and circulation. In: Schreck, C. and Moyle, B., editors. Methods in fish biology. Bethesda (MD): American Fisheries Society;