



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):10.70102/AEJ.2025.16.2.11

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 سیاه‌کلرودی^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 (۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۵ میلی‌گرم 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 پارامترهایی 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: mdparastool356@yahoo.com

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

(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.2.11

مقدمه

ماده سمی و سیستم بیولوژیکی را می توان با استفاده از نشانگرهای زیستی هماتولوژیک اندازه گیری کرد (۱۸). تغییر در بیومارکرهای هماتولوژیک (تعداد گلبول های قرمز (RBC) و لکوسیت ها (WBC)، غلظت هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (HCT)، میانگین حجم سلولی (MCV)، میانگین هموگلوبین سلولی (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) به طور گسترده ای برای ارزیابی استرس سمی، یکپارچگی سیستم ایمنی و آسیب بافت استفاده می شود (۲۰، ۲۱، ۲۲). این نشانگرهای زیستی اغلب به تغییرات پدیده های محیطی یا فیزیولوژیکی حساس هستند. آن ها به راحتی قابل اندازه گیری می باشند و معیار یکپارچه ای از تغییرات فیزیولوژیکی را در موجود ارائه می دهند (۲۳). داروهای دارای خصوصیات فیزیوشیمیایی مشابهی با مواد شیمیایی مضر هستند و دائماً در محیط پراکنده می شوند و اطلاعات کمی در مورد اثرات آن ها بر گونه های 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 حساس تر مانند یک آزمون مبتنی بر نشانگرهای زیستی برای ارزیابی محیط واقعی ضروری است (۲۶). از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی سمیت مزمن زیر کشنده دیکلوفناک بر روی ماهی کپور معمولی با استفاده از نشانگرهای زیستی فاکتورهای خونی برای مشاهده اثرات سمی انجام شد.

مواد و روش ها

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 $16/1 \pm 1/02$ سانتی متر در یک آکواریوم (۱۴۰ لیتر) نگهداری و پس از دوره سازگاری، ماهی هایی با میانگین وزن مشابه جدا و آزمایش با ۳ تکرار بر اساس 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 1% وزن بدن و 50% تعویض روزانه نگهداری شدند (۲۷).

تیمارها و طراحی آزمایش: ماهی ها در پنج تیمار با سه تکرار دسته بندی شدند سپس در معرض غلظت های $1/25$ ، $2/5$ و 5 دیکلوفناک قرار گرفتند (۲۸). برای کنترل عوارض جانبی احتمالی حلال مورد استفاده، گروه دیگری از ماهی ها در معرض $0/12$ میلی لیتر در لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) قرار گرفتند (۲۹). پارامترهای فیزیوشیمیایی آب آکواریوم ها به طور منظم بررسی شد (دما: 25 درجه سانتی گراد؛ اکسیژن محلول: $5/2$ میلی گرم در لیتر؛ مقدار $pH: 7/1$ ؛

ترکیبات دارویی به طور گسترده در درمان بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند. اخیراً به دلیل تولید بیش از حد و استفاده بی رویه، مواد دارویی و دفع پساب های شهری و صنایع از طریق شیرابه های محل های دفع زباله و دفع داروهای بلا استفاده وارد محیط زیست شده اند (۱، ۲، ۳). علاوه بر این، استفاده از داروهای دام پزشکی در صنعت آبی پروری نیز به معرفی مقادیر قابل توجهی به ورود دارو ها به محیط زیست کمک می کند (۴). امروزه، حضور این مواد فعال و متابولیت های آن ها در بخش های مختلف محیط زیست، مانند پساب های فاضلاب تصفیه شده و تصفیه نشده، آب های زیرزمینی، آب های سطحی، آب آشامیدنی و مصب ها با غلظت هایی مشاهده شده است (۵، ۶، ۷). ورود مداوم دارو ها به محیط آبی ممکن است بر موجودات غیر هدف از جمله ماهی تأثیر بگذارد (۶، ۸، ۹). داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) به یکی از مهم ترین گروه های دارویی در سراسر جهان تعلق دارند. این دارو ها به دلیل حجم بالای مصرف و حذف ناقص آن ها در طی تصفیه فاضلاب در محیط شناسایی شده اند (۱۰، ۱۱). دیکلوفناک (DFC) یکی از دارو های ضد التهاب غیر استروئیدی است که به طور گسترده به عنوان ضد درد، ضد التهاب برای تسکین علائم آرتریت و اختلالات روماتیسمی، دردهای قاعدگی ناشی و هم چنین یک مهار کننده سیکلواکسیژناز در سراسر جهان استفاده می شود (۶، ۱۲). این دارو یکی از پر مصرف ترین دارو های انسانی و در فهرست دارو های ضروری منتشر شده توسط سازمان بهداشت جهانی گنجانده شده است (۱، ۶، ۱۳، ۱۴). دیکلوفناک، به عنوان یکی از اصلی ترین مواد دارویی موجود در اکوسیستم های آبی شناخته شده است به دلیل تولید آن در مقادیر زیاد در سراسر جهان و راهیابی پساب های تصفیه خانه های کارخانه های داروسازی در آب های سطحی شناسایی شده است. علاوه بر این، غلظت این دارو در منابع آبی گزارش شده از کشوری به کشور دیگر متفاوت است (۶). ارزیابی آب های آلوده و نشانگرهای زیستی سلامت آبریان به طور گسترده به عنوان ابزار تشخیص اولیه استفاده می شود (۱۵). در میان موجودات آبی، ماهیان به طور گسترده برای ارزیابی اثرات آلودگی محیطی بر اکوسیستم آبی مورد استفاده قرار گرفته اند. اخیراً استفاده از نشانگرهای زیستی حساس به طور گسترده برای ارزیابی خطر موجودات آبی مورد استفاده قرار گرفته اند به طور کلی، تغییرات این نشانگرهای زیستی در خون برای تشخیص وضعیت ساختاری و عملکردی ماهی در معرض سموم و هم چنین در نظارت بر محیط آبی مفید است (۱۶، ۱۷). فاکتورهای خونی به طور معمول به عنوان نشانگرهای زیستی ارزشمند برای ارزیابی سمیت آلاینده های محیطی در اکوسیستم آبی مورد استفاده قرار می گیرند بر همکنش بین

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 گلوبول های قرمز؛ هموگلوبین و ... با آزمون پارامتریک بررسی شد. پس از تعیین نرمال بودن داده ها از آزمون خطی، پیرسون، t تست، t دو طرفه 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 هر چند 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).

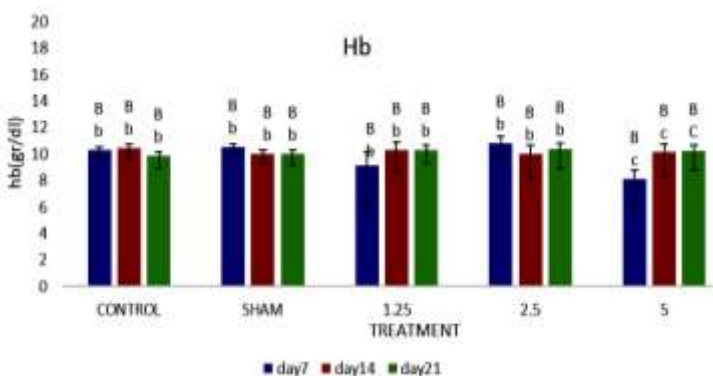
جمع آوری و تهیه نمونه خون: با قطع ساقه دمی ماهی از آن ها نمونه خون گرفته شد. نمونه خون جمع آوری شده به ویال های کوچکی که قبلاً هپارینه شده بودند، منتقل و برای تخمین پارامترهای خونی مانند شمارش Hb، RBC و WBC مورد استفاده قرار گرفتند.

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 مویینه، سانتیفیوژ و خط کش هماتوکریت براساس روش کار Nelson and Morris برآورد شد (۳۲). شاخص های گلوبول قرمز مانند MCV، MCH، MCHC نیز طبق فرمول استاندارد محاسبه شدند:

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

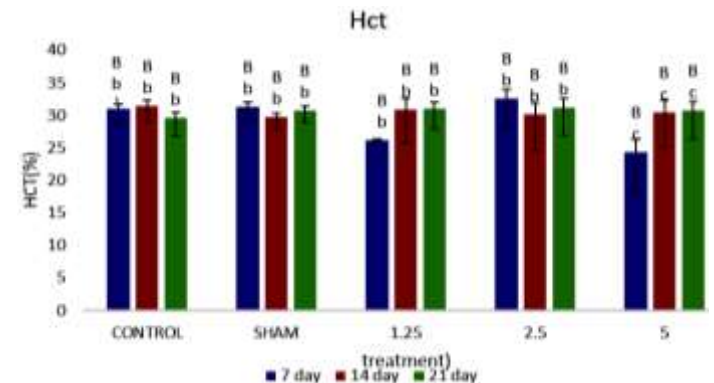
$$MCH (pg) = \frac{Hb (\frac{g}{dl})}{RBC (million \times cu \times 106)} \times 100$$

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

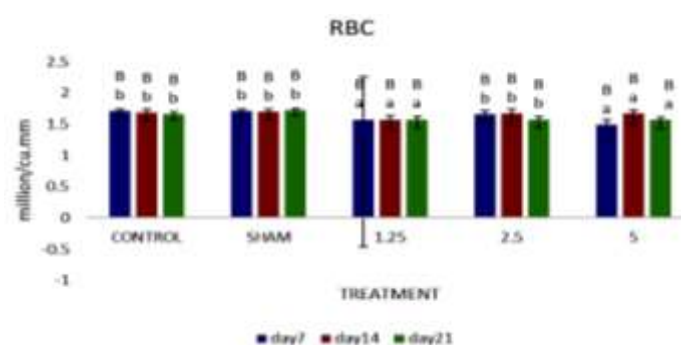
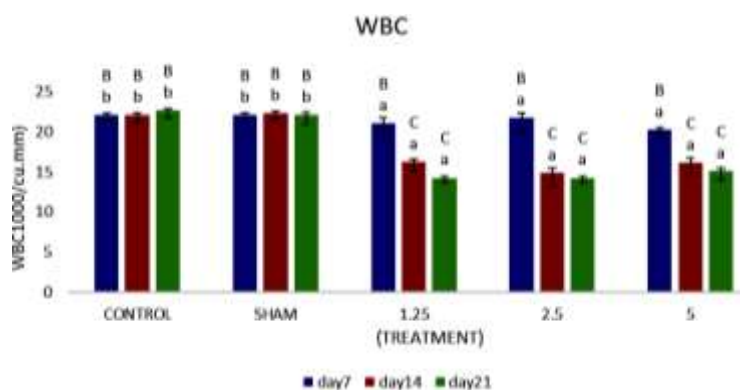


شکل ۲: نمودار تغییرات میزان هموگلوبین در ماهی آب شیرین *C. Carpio* با غلظت های زیر حد کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD هستند. براساس تحلیل واریانس چندمتغیره هیچ تغییر قابل توجهی در زمان مواجهه مشاهده نشد، اما کاهش قابل توجهی از مقدار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

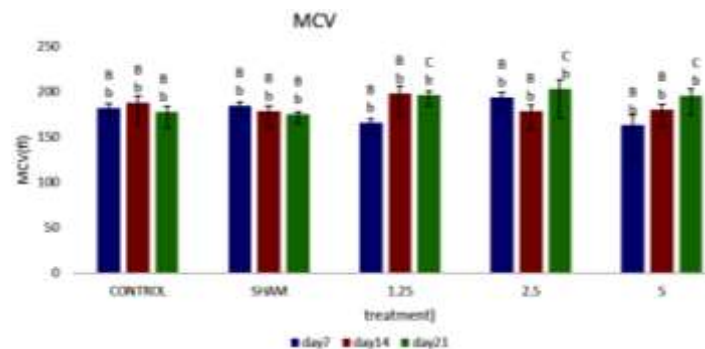
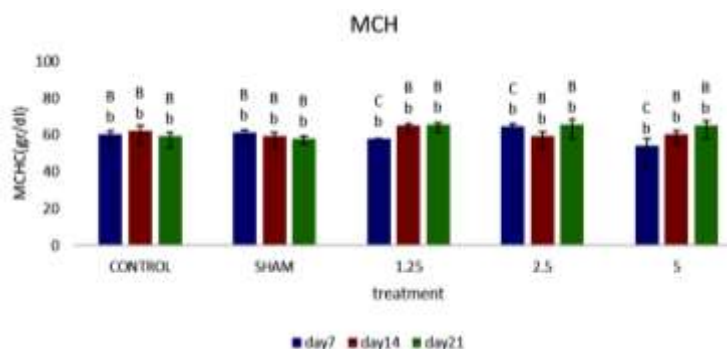


شکل ۱: نمودار تغییرات مقادیر HCT در ماهی آب شیرین *C. carpio* تیمار شده با غلظت های زیر حد کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD هستند. براساس آزمون تحلیل واریانس چندمتغیره تغییر معنی داری در زمان مواجهه در بالاترین غلظت ها کاهش معنی داری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

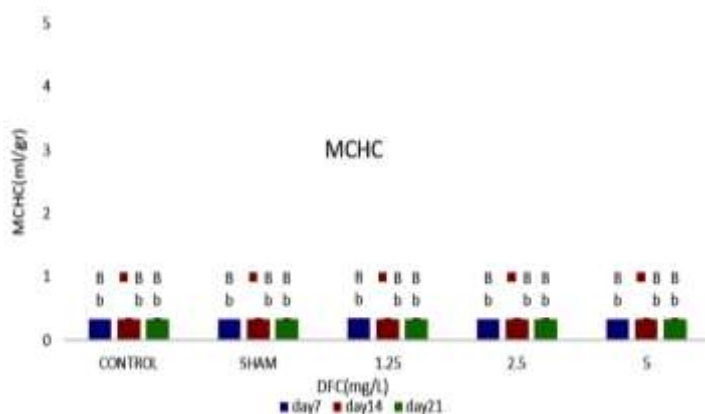
شکل ۳: نمودار تغییرات تعداد گلبول های قرمز در ماهی *C. Carpio* با غلظت های زیر کشنده دیکلوفناک (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر). میله ها نشان دهنده میانگین و خطوط عمودی نشان دهنده SD (خطای استاندارد) هستند (براساس تحلیل واریانس چندمتغیره). تفاوت معنی داری در زمان مواجهه مشاهده نشد، اما تفاوت معنی داری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



شکل ۶: نمودار تغییرات در مقدار MCHC 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 (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 بزرگ نشان دهنده تفاوت معنی دار در زمان مواجهه است. حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار بین غلظت ها هستند.

بحث

اهمیت بررسی وضعیت خونی به‌عنوان تابلویی از وضعیت سلامت یا بیماری و نیز تعادل و یا عدم تعادل در ماهیان بسیار روشن است، زیرا مطالعات خون‌شناسی و بیوشیمیایی خون در بررسی‌های مختلف و در رابطه با موضوعات متفاوت، موردسنجش و اندازه‌گیری قرار گرفته است (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶). بیومارکرهای مناسب برای آنالیز سمیت شیمیایی آب در مطالعات فیزیولوژیک می‌تواند فاکتورهای خونی ماهی باشد. استرس‌های محیطی می‌توانند آلاینده‌ها نیز باشند که در نهایت منجر به ایجاد تغییرات در پلازما یا خون ماهی و تغییر در فاکتورهای خونی و یا میزان فعالیت آنزیم‌ها می‌گردند (۳۷، ۳۸). تست‌های سمیت حاد و مزمن به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی سمیت مواد شیمیایی روی ارگانیسم‌های غیرهدف استفاده می‌شود (۲۶). داروها که از نظر بیولوژیکی موافق و پایدار هستند، بیش‌تر از طریق تصفیه‌خانه‌های فاضلاب (WWTP) وارد محیط آبی می‌شوند و ممکن است به‌دلیل فعالیت بیولوژیکی ذاتی در غلظت‌های حاد و مزمن بر موجودات آبی تأثیر بگذارند (۳۹، ۴۰). حتی در غلظت‌های پایین، داروها می‌توانند اثرات سمی روی ارگانیسم‌های غیرهدف ایجاد کنند بنابراین، بررسی روی سمیت حاد این ترکیبات و می‌تواند نحوه عملکرد و سمیت داروها را مشخص نماید (۴۱، ۳۹). حتی غلظت بسیار کم دیکلوفناک در محیط‌های آبی می‌تواند اثر سمی بر موجود زنده داشته باشد که میزان سمیت آن به غلظت، گونه، سن، جنس و دوره قرار گرفتن ارگانیسم بستگی دارد (۱). به‌نظر می‌رسد غلظت حاد دیکلوفناک در مطالعات فعلی و قبلی در محدوده ۱ mg/l باشد، که بالاتر از غلظت آن در محیط طبیعی است، از این‌رو، سمیت کشنده داروها روی ارگانیسم‌های غیرهدف اهمیت بیش‌تری پیدا می‌کند (۳۹، ۳۸). قرار گرفتن در معرض طولانی مدت آبیان با دیکلوفناک در غلظت‌های مرتبط با محیط‌زیست ممکن است اثرات جزئی آن را بر حیوانات غیر هدف کاهش دهد (۳۹، ۴۱). درمقابل، ممکن است غلظت بیش از ۱ mg/L دیکلوفناک موجودات آبی را از طریق مواجهه با تحت تاثیر قرار دهد (۳۷). مطالعات بیش‌تر در مورد سمیت مزمن دیکلوفناک ممکن است اطلاعاتی در مورد خطرات اکولوژیکی آن بر روی موجودات غیرهدف ارائه دهد (۳۷). مشخصات هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد شرایط بدن موجود ارائه دهد (۴۲). اخیراً، نشانگرهای زیستی به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی تأثیر داروها بر ماهی‌ها و سایر موجودات آبی برای دستیابی به سیگنال‌های هشدار اولیه خطرات زیست محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۵، ۶، ۴۳). تجزیه و تحلیل فاکتورهای خونی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان شاخص‌هایی برای ارزیابی استرس سمی، وضعیت عملکردی سلامت آبیان استفاده

می‌شود (۲۲، ۸). علاوه بر این، پارامترهای هماتولوژیکی و بیوشیمیایی موجودات آبی نیز ممکن است به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای ارزیابی سمیت کشنده مواد شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند (۲۹، ۴۲). پارامترهای خونی مانند تعداد Hb، HCT، RBC و WBC و سایر شاخص‌های خونی مانند MCV، MCH و MCHC، به‌دلیل ارتباط نزدیک با محیط خارجی ممکن است به‌انواع خاصی از آلاینده‌ها حساس باشند و اغلب برای تشخیص وضعیت فیزیولوژیکی حیوانات مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴۴). در این مطالعه، پاسخ‌های خونی HCT، RBC، Hb و WBC تحت سمیت حاد دیکلوفناک در طول دوره مطالعه کاهش یافت. از طرف دیگر مقادیر MCH و MCV به‌طور مداوم افزایش می‌یابد. 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 به‌دلیل توانایی آن‌ها در انتقال مواد غذایی، اکسیژن و مواد زائد متابولیک باید حفظ شود (۴۵). کاهش تعداد گلبول‌های قرمز در ماهی‌ها ممکن است نشان دهنده یک وضعیت کم‌خونی در این ماهی‌ها 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 گروه‌ها پس از مواجهه ۲۱ روزه با دیکلوفناک، شاید به اختلال در مکانیسم فعال‌سازی مجدد اریتروپوئیس توسط طحال و کبد برای جبران کمبود ناشی از استرس محیطی نسبت داده شود. ممکن است درصد پایین قابل توجه HCT در گروه‌ها پس از ۲۱ روز نشان‌دهنده تولید سرکوب شده RBC باشد. Roa و Jayabha کاهش میزان RBC و افزایش نوتروفیل‌ها را در اثر سمیت حاد مواجهه ماهی کیپور معمولی با دیکلوفناک در مدت ۲۱ روز به‌دلیل استرس ایجاد شده در اثر آسیب به بافت‌های بدن ماهی و هم‌چنین افزایش لنفوسیت‌ها را به‌دلیل دفاع در برابر استرس ایجاد شده (لنفوسیتوز) مرتبط دانست. از سویی کاهش نوتروفیل‌ها به‌دلیل کاهش یا مختل شدن ظرفیت بیگانه‌خواری نوتروفیل‌ها می‌باشد که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد (۴۷). در تحقیق مشابه مطالعه حاضر فاکتورهای خونی در گربه ماهی *Rhamdia quelen* در مواجهه با دیکلوفناک به‌مدت ۹۶ ساعت ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که مواجهه دیکلوفناک با غلظت مشخص منجر به کاهش میزان RBC و هموگلوبین، مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها افزایش یافت که دلیل کم‌خونی می‌تواند مرتبط با اثر داروهای ضد استروئیدی و ضدالتهابی باشد. افزایش در مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها

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 آبی پروری 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 Mechlinski, 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., Fraysse, 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 Fliedner, 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., Muñoz, 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, clofibrac

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 قلبی عروقی 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 ارگانسیم‌ها 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 Safty*. 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., Triebkorn, 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 optical 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 clofibrac 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 hematological 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. Remyala, 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.
53. **Hartigan and Padilla., 2024.** Advancement of Dose Efficacy in Pharmacogenomics with Clinical Practice, Clinical Journal for Medicine, Health and Pharmacy. 2(2): 1-10
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., Sasaki, 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;