



بررسی تأثیر داروی ایندومتاسین بر استرس اکسیداتیو ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده

احمد قرایی^{۱*}، مینا بزمانی^۲، جواد میردار هریجانی^۱، علی خسروانی زاده^۳

^۱دانشیار دانشگاه زابل، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

^۲دانشجو دانشگاه زابل، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

^۳استادیار دانشگاه زابل، گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران

چکیده

در سال‌های اخیر، داروها به‌عنوان آلاینده‌های نوظهور و تهدیدکننده محیط زیست شناسایی شده‌اند. به‌همین منظور، در این تحقیق به بررسی تأثیر داروی ایندومتاسین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) پرداخته شد. ابتدا به‌منظور تعیین LC_{50} ماهی‌ها با میانگین وزنی (3 ± 5) در معرض غلظت‌های مختلفی از داروی ایندومتاسین (۳۰، ۶۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند و تلفات روزانه طی ۹۶ ساعت ثبت شد. پس از به‌دست آوردن غلظت تحت‌کشنده ۹۶ ساعته این دارو، ماهیان در معرض غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۱، ۰/۰۱ میزان LC_{50} ۹۶ ساعته در قالب پنج تیمار به‌ترتیب شامل تیمار ۱ (شاهد)، ۲ ($32/8 \text{ mg/l}$)، ۳ ($6/4 \text{ mg/l}$)، ۴ ($6/6 \text{ mg/l}$)، ۵ ($3/3 \text{ mg/l}$) و ۳ میلی‌گرم طی مدت ۲۸ روز قرار گرفتند و در انتهای دوره‌ی آزمایش، شاخص‌های استرس اکسیداتیو از جمله کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت‌های کبد و آبشش ماهیان تیمار شده، اندازه‌گیری شد. غلظت سمیت‌کشنده (LC_{50}) ایندومتاسین برای ماهی کپور معمولی $328/49 \text{ mg/l}$ به‌دست آمد. فعالیت آنزیم GPX در بافت آبشش و کبد در همه‌ی تیمارها افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد داشت. میزان MDA در بافت کبد در تیمارهای ۴ و ۵ و در بافت آبشش در تیمارهای ۳ و ۴ افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. همچنین فعالیت آنزیم CAT در بافت کبد و آبشش در تیمارهای ۴ و ۵ در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. ایندومتاسین از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش پراکسیداسیون چربی را به‌دنبال دارد که باعث ایجاد استرس شده و بنابراین با سیستم آنتی‌اکسیدانی بافت کبد و آبشش ماهی مواجه می‌شود و سبب القاء پاسخ در قالب افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. نتایج این تحقیق بیان می‌دارد که داروی ایندومتاسین در محیط آبی می‌تواند وضعیت آنتی‌اکسیدانی و سلامتی ماهیان را تحت تأثیر جدی قرار دهد.

واژه‌های کلیدی:

C. carpio، ایندومتاسین، مالون دی آلدئید، گلوکاتایون پراکسیداز، غلظت نیمه کشنده

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۷/۱۱/۰۲

پذیرش: ۹۸/۰۲/۰۶

نویسنده مسئول مکاتبه:

احمد قرایی، ^۱دانشیار دانشگاه زابل، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

ایمیل: agharaei551@gmail.com

۱ | مقدمه

فاضلاب‌های داخلی، دفع از طریق آب و سیستم‌های تصفیه فاضلاب به محیط آبی وارد شود. این ترکیبات به‌طور کامل تجزیه نمی‌شوند، در نتیجه تعدادی از داروها و متابولیت‌های آنها در رودخانه‌ها، دریاها، دریاچه‌ها، آب‌های آشامیدنی، آب‌های زیرزمینی، آب‌های سطحی، رسوبات و خاک‌ها شناسایی شده‌اند. به‌طور کلی، داروها در اکوسیستم‌های

استفاده گسترده از داروها در پزشکی و دامپزشکی و فعالیت‌های آبی پروری، تهدید جدی برای موجودات آبی است. داروها به‌طور گسترده - ای در علوم انسانی و دامپزشکی، کشاورزی و آبی‌پروری برای حفاظت از زندگی علیه بیماری‌های مختلف و بهبود سلامت انسان استفاده می‌شوند. مصرف گسترده و زیاد این ترکیبات می‌تواند از طریق تخلیه

آبی به مقدار کم وجود دارند اما باتوجه به حالت خاص آنها ممکن است بر سیستم‌های بیولوژیکی مانند اکوسیستم‌های خشکی و آبی تأثیرگذار باشند (Saravanan and Ramesh, 2013).

ایندومتاسین به دسته داروهای ضد التهاب غیر کورتونی که به اصطلاح پزشکی NSAIDS گفته می‌شوند، تعلق دارند. ایندومتاسین برای کاهش تب، درد و تورم استفاده می‌شود و این کار را با مهار تولید پروستاگلاندین‌ها انجام می‌دهد، مولکولی که منجر به بروز این عوارض می‌شود. ایندومتاسین با مسدود کردن اثر آنزیم سیکلواکسیژناز، منجر به کاهش ساخت ماده‌ای شیمیایی به نام پروستاگلاندین در بدن می‌شود که مسئول ایجاد درد و التهاب در ناحیه آسیب دیده می‌باشند (Mozaffari et al., 2016).

آنتی‌اکسیدان‌ها ساختارهای آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که از طریق روش‌های مختلف سبب کاهش استرس‌های اکسیداتیو شده و به‌نوعی نقش پاکسازی رادیکال‌های آزاد را در سلول ایفا می‌کنند. آنزیم‌های مهم آنتی‌اکسیدانی در سیستم دفاعی ماهی شامل سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز است. کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به مولکول اکسیژن و آب می‌شود. گلوکاتایون-پراکسیداز به همراه گلوکاتایون اکسیداز باعث کاهش هیدروپراکسیداز چربی و پراکسید هیدروژن می‌شود (Halliwell and Gutteridge, 1990; Almedia et al., 2007; Martinez-Alvarez et al., 2005).

رادیکال‌های آزاد به واسطه چندین مکانیسم در بدن موجود زنده ایجاد می‌شوند. این عوامل با گرفتن الکترون یا با از دست دادن اتم هیدروژن از ترکیبات شیمیایی تشکیل می‌شوند (Halliwell and Gutteridge, 1990). استرس اکسیداتیو باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، از طریق سلول می‌شود که در نهایت باعث تخریب سلول می‌شود (Gao et al., 2014). یکی از مسیرهای تولید ROS در بدن، انتقال زنجیره الکترون در فرآیند تنفس سلولی است که در این زنجیره، مولکول اکسیژن نقش آخرین پذیرنده الکترون را دارد که بر اثر احیای آن به مولکول آب، رادیکال‌های آزادی نظیر آنیون سوپراکسید (O^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) تولید می‌شود (Gao et al., 2014; Mourente et al., 2007). این گونه‌های فعال اکسیژن، پتانسیل بالایی در آسیب رساندن به سیستم بیولوژیک دارند و طی فرآیند اکسیداسیون مولکول‌های زیستی، از جمله لیپیدها، رادیکال‌های آزاد دیگری مانند پروکسیل را به وجود می‌آورند و با آغاز واکنش‌های زنجیره اکسیداسیون، سبب آسیب بافتی می‌شوند. ماهیان همانند تمامی موجودات زنده هوای برای حذف گونه‌های اکسیژن فعال، دارای مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی پیشرفته می‌باشند (Rudneva, 1997). لیپیدها به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء سلولی جزء حساس‌ترین مولکول‌های بیولوژیکی هستند که در معرض حمله ROSها قرار می‌گیرند و این مسئله موجب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (Caylak et al., 2008). MDA شاخص اصلی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است و به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در شناسایی بیماری‌ها به کار

می‌رود (Liu et al., 2007). برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی نظیر ایبوپروفن و دیکلوفناک منجر به افزایش استرس اکسیداتیو در ماهیان می‌گردد (Islas-Flores et al., 2013, 2014; Ajima et al., 2016). ماهی‌ها به‌عنوان نماینده‌های مهره‌داران برای محیط زیست در آزمایشات سمیت و همچنین برای نظارت بر کیفیت پساب‌ها و آب‌های سطحی مورد استفاده قرار می‌گیرند. به دلیل آلودگی‌های محتمل موجود در آب‌ها و اکوسیستم‌های طبیعی و افزایش پتانسیل استرس‌های اکسیداتیو در آبزیان، در این تحقیق به بررسی تأثیر ایندومتاسین بر استرس اکسیداتیو کپور معمولی با استفاده از شاخص‌های زیستی پرداخته شده است.

۲ | مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی 5 ± 0.5 گرم به‌صورت تصادفی از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی زهک صید و به آزمایشگاه جهت ادامه کار منتقل شدند. برای مطالعه سمیت حاد داروی ایندومتاسین و تعیین میزان LC_{50} ۹۶ ساعته، براساس دستورالعمل OECD (TG 203) اقدام شد. به‌طوری‌که ماهیان پس از انتقال به وان‌های فایبرگلاس جهت رفع استرس و سازگاری، به مدت ۸ روز در محیط جدید نگهداری و تغذیه شدند. سپس تعداد موردنیاز ماهی به‌صورت اتفاقی جمع‌آوری و ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش‌ها به آکواریوم که کاملاً ضد عفونی و شستشو داده شده بودند، منتقل و تغذیه آنها قطع گردید. آزمایش بقا برای اندازه‌گیری توان زیستی و تعیین وضعیت بقا در بچه‌ماهیان در شرایط طبیعی آزمایش و محیط عاری از سم در ۳ تکرار انجام شد.

در ادامه انجام آزمایش سمیت حاد، آکواریوم‌ها با آب دکلرینه شده آبگیری و هوادهی شد و به ازای هر لیتر آب دو گرم بچه‌ماهی به هر آکواریوم اضافه شد (Yavari et al., 2013). پس از قرار گرفتن بچه‌ماهیان در آکواریوم‌ها، غذادهی قطع گردید. برای تعیین محدوده کشندگی داروی ایندومتاسین در بچه‌ماهیان کپور، ۱۰ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزنی ۵ گرم در آکواریوم‌هایی که به میزان ۲۵ لیتر آبگیری شده بود، قرار گرفتند. در این آزمایش غلظت بین ۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ۷ تیمار (۰، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تقسیم شد (Yavari et al., 2013). در ماهیان مورد آزمون تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تلفات بسیار کم بود. اما در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر تقریباً همه ماهیان در مدت ۹۶ ساعت تلف شدند. بعد از محاسبه LC_{50} ۹۶ ساعته داروی ایندومتاسین، اقدام به ایجاد سمیت مزمن در ماهی به مدت ۲۸ روز گردید. به این منظور غلظت ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۱، ۹۶ LC_{50} ساعته ایندومتاسین (۳۲۸/۴۹ میلی‌گرم در لیتر) در ۱۵ آکواریوم (۵ تیمار در ۳ تکرار) تهیه شده که این میزان به ترتیب برابر با ۳۲/۸، ۶/۴، ۶/۶ و ۳/۳ میلی‌گرم در لیتر و یک تیمار با شرایط مشابه بدون اضافه نمودن دارو به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. به هر آکواریوم ۱۰ قطعه ماهی با محدوده وزنی ۵ گرم اضافه شد. در طی دوره آزمایش هر ۲۴ ساعت یکبار آب آکواریوم‌ها با

MPA-TBA تشکیل شده توسط واکنش مالون‌دی‌آلدئید و تیوباریتوریک اسید در دمای بالا انجام شد. سنجش مالون‌دی‌آلدئید در محیط اسیدی و در دمای ۱۰۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد و به روش رنگ‌آمیزی با قرائت در طول موج ۵۳۵ (۵۴۰-۵۳۰ نانومتر) انجام شد (Dawn-Linsley et al., 2005; Yagi, 1998).

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-24 و به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) انجام شد. قبل از انجام آزمون واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلوموگروف-اسمیرنوف بررسی و برای تعیین LC₅₀ از آنالیز پروبیت استفاده شد.

۳ | نتایج

ماهیانی که در معرض ایندومتاسین قرار گرفته بودند دچار شنای سریع و اختلالات تنفسی شده به‌طوری‌که سرپوش‌های آبششی را تندتر باز و بسته کرده و اطراف سنگ هوا و حباب‌های هوا شنا می‌کردند. اضطراب ماهیان به‌صورت افزایش عکس‌العمل در مقابل محرک‌های بیرونی، گرفتگی عضلات دور دهانی و باله‌ای، تنفس ناموزون و غیرعادی نمود یافت. وجود مخاط فراوان روی سطح بدن از عوارض ظاهری قرارگرفتن ماهیان در معرض این دارو بود.

پس از انجام آزمایشات، میزان سمیت تحت کشنده ایندومتاسین (LC₅₀) برای بچه‌ماهیان کپور ۳۲۸/۴۹ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. غلظت ایجاد کننده ۱۰، ۵۰، ۹۰ درصد تلفات در ۹۶ ساعت پس از مجاورت با ایندومتاسین برای ماهی کپور مطابق جدول ۱ مشخص گردید.

همان غلظت دارو تعویض گردید (Bartoskova et al., 2013). داروی مصرفی در این تحقیق متعلق به شرکت داروسازی آریا بوده و هر قرص آن واجد ۷۵ میلی‌گرم ماده مؤثره ایندومتاسین بود. پس از تعیین وزنی هر قرص و محاسبه دوز مورد نیاز بسته به ماده مؤثره و پودر کردن و حل کردن ماده مؤثره در دی متیل سولفواکساید، محاسبه داروی موردنیاز انجام شد.

در پایان دوره آزمایش و پس از بیهوش کردن ماهیان، کالبد شکافی، جداکردن بافت‌های کبد و آبشش انجام شد. همچنین برای تهیه عصاره بافت، یک گرم از هر بافت (آبشش و کبد) را با ۵ mL بافر فسفات (pH=۷/۴) و با استفاده از دستگاه هموژنایزر (مدل ULTRATURRAX, basic IKA T10 ساخت کشور آلمان) همگن و در ۴۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس لایه رویی برداشته شده و تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Mason, 1991).

فعالیت کاتالیزوری آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) به روش طیف‌سنجی در طول موج نوری ۳۴۰ نانومتر با تجزیه گلوکاتایون اکسیدشده (GSSG) به گلوکاتایون (GSH) تعیین شد. فعالیت‌های خاص به‌صورت نانومول (nmol) مصرف دارو در هر دقیقه در هر میلی-گرم پروتئین بیان شد (Carlberg and Mannervik, 1975).

فعالیت کاتالیزوری کاتالاز (CAT) با اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری تجزیه H₂O₂ در طول موج نوری ۲۴۰ نانومتر تعیین شد. فعالیت خاص به‌صورت ماکرومول (μmol) تجزیه H₂O₂ در هر دقیقه در هر میلی-گرم بر پروتئین بیان شد (Aebi, 1984).

سنجش آنزیم مالون‌دی‌آلدئید به‌وسیله کیت‌های تهیه شده از شرکت زلبیوی آلمان انجام شد. اندازه‌گیری با استفاده از ترکیب اضافی

جدول ۱- غلظت تحت کشنده پس از در معرض قرارگیری با ایندومتاسین در ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) (واحد میلی‌گرم بر لیتر) است.

غلظت تحت کشنده ۹۶ ساعت	میانگین (mg/l)	بیشینه-کمینه (mg/l)
LC ₁₀	۸۷/۲۱۴	۷۹/۷۵-۹۴/۶۷
LC ₅₀	۳۲۸/۴۹۷	۲۸۷/۶۵-۳۶۹/۳۴
LC ₉₀	۱۲۳۷/۳۰۴	۱۱۸۳/۴۸-۱۲۹۱/۱۳
LC ₉₅	۱۸۰۱/۹۴۶	۱۷۲۳/۳۵-۱۸۸۰/۵۴

افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد ($p < 0.05$) و آنزیم CAT در تیمارهای ۴ و ۵ در بافت کبد و آبشش افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد ($p < 0.05$).

براساس نتایج حاصل از سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو مشخص شد که آنزیم MDA در بافت آبشش در تیمارهای ۳ و ۴ و در بافت کبد در تیمارهای ۴ و ۵ افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$) (جدول ۲ و ۳)، آنزیم GPX در بافت کبد و آبشش در سایر تیمارها

جدول ۲- میزان فعالیت شاخص‌های استرس اکسیداتیو MDA, GPX و CAT (IU/ml) در بافت کبد ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) تحت غلظت‌های مختلف

آزمایش	تیمار	این‌دومتاسین طی مدت ۲۸ روز				
		شاهد (تیمار ۱)	۰/۰۱ mg/l (تیمار ۲)	۰/۰۲ mg/l (تیمار ۳)	۰/۰۵ mg/l (تیمار ۴)	۰/۱ mg/l (تیمار ۵)
MDA		۶۶±۰/۵۷ ^a	۶۶±۱/۱۵ ^a	۷۰/۵±۰/۲۸ ^{ab}	۷۹±۳/۴۶ ^b	۷۵±۱/۷۳ ^b
GPX		۵۳±۱/۴۴ ^a	۵۹±۰/۵۷ ^b	۶۲±۰/۵۷ ^b	۶۷/۵±۱/۴۴ ^c	۷۴/۵±۰/۸۶ ^d
CAT		۸/۷±۱/۱۵ ^a	۹/۱۳±۰/۳۱ ^a	۱۰/۱۳±۰/۳ ^a	۱۳/۱۳±۰/۳ ^b	۱۲/۹۳±۰/۶ ^b

*حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

جدول ۳- میزان فعالیت شاخص‌های استرس اکسیداتیو MDA, GPX و CAT (IU/ml) در بافت آبشش کپور معمولی (*C. carpio*) تحت غلظت‌های مختلف

آزمایش	تیمار	این‌دومتاسین طی مدت ۲۸ روز				
		شاهد (تیمار ۱)	۰/۰۱ mg/l (تیمار ۲)	۰/۰۲ mg/l (تیمار ۳)	۰/۰۵ mg/l (تیمار ۴)	۰/۱ mg/l (تیمار ۵)
MDA		۷۰±۰/۵۷ ^a	۷۲/۵±۰/۲۸ ^a	۷۶±۰/۸۶ ^b	۸۷±۱/۱۵ ^c	۷۲±۰/۵۷ ^a
GPX		۵۱±۱/۱۵ ^a	۵۶±۱/۱۵ ^b	۵۸±۰/۵۷ ^{bc}	۶۲±۰/۵۷ ^c	۵۷±۱/۱۵ ^b
CAT		۹/۳±۰/۰۸ ^a	۹/۵±۰/۰۵ ^a	۹/۶±۰/۳۷ ^a	۱۴/۶±۰/۴۶ ^b	۱۳/۶±۰/۱۴ ^b

*حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

از حساس‌ترین نشانه بالقوه داروها، تغییرات رفتاری است. در این تحقیق علائم غیرطبیعی نظیر شنای غیرعادی و اختلالات تنفسی، شنا کردن در اطراف سنگ هوا، اضطراب به‌صورت افزایش عکس‌العمل در مقابل محرک‌های محیطی بیرونی، عدم تعادل و وجود مخاط فراوان روی سطح بدن مشاهده شد که باتوجه به تحقیقات صورت گرفته توسط هورتون و همکاران، چامبلی و تونکی می‌توان در مطالعه حاضر بیان کرد که این‌دومتاسین با مهار پروستاگلاندین موجب اختلال در سیستم عصبی، ایمنی و تنفس کپور معمولی شده است (Horton et al., 1963; Chumbley and Tuncay, 1986).

آزمون غلظت تحت‌کشنده، حدود سلامت اکوسیستم آبی را مشخص کرده و به ما جهت ارائه راهکار مناسب برای محافظت از اکوسیستم آبی کمک می‌کند. این موارد برای بررسی آثار مخرب زیست‌محیطی ناشی از آلاینده‌ها و برقراری معیارهای کیفیت آب جهت محافظت از اکوسیستم آبی مؤثر است. در تحقیق حاضر میزان غلظت کشنده این‌دومتاسین در طی ۹۶ ساعت ۳۲۸/۴۹ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد که نشان‌دهنده مقاومت بالای ماهی کپور معمولی می‌باشد. در همین راستا کیم و همکاران (Kim et al., 2009) LC_{50} این‌دومتاسین در ماهی مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) را ۹۲/۸۱ میلی‌گرم، ایسلاس فلورس و همکاران (Islas-Flores et al., 2014) غلظت نیمه‌کشنده ایبوبروفن را ۱۷۵/۶ میلی‌گرم برلیتر و ایسلاس فلورس و همکاران (Islas-Flores et al., 2013) غلظت LC_{50} ۹۶ دی‌کلوفناک را در ماهی کپور معمولی ۷۰/۹۸ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند. در نتیجه می‌توان بیان کرد که پارامترهای متعددی در تعیین غلظت کشنده (LC_{50}) این دارو وجود دارد. از آن جمله می‌توان به شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط آزمایش و نیمه عمر دارو اشاره کرد.

با وجود تأثیر فاکتورهای زیاد بر سمیت حاد داروها به‌ویژه این‌دومتاسین، اندازه‌گیری میزان LC_{50} هیچگاه مقدار مطلق و ثابتی نبوده و به تنهایی نمی‌تواند برای ارزیابی سمیت حاد مواد دارویی کافی باشد. براساس نتایج به‌دست آمده در مورد داروهای اشاره شده می‌توان ادعان نمود که شدت سمیت داروی این‌دومتاسین در مقایسه با ایبوبروفن و دی‌کلوفناک کم‌تر است.

از آنجا که GPX و CAT از آنزیم‌های دفاعی مؤثر در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی هستند جهت پایش اکوسیستم‌های آبی مناسب‌تر به‌نظر می‌رسند. از طرفی سنجش MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید که محصول مواجهه غشاء سلول با رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل حاصل از متابولیسم این‌دومتاسین است، می‌تواند شاخص مناسبی جهت سنجش مقادیر آسیب‌های وارده به موجودات آبرزی در محیط زیست آن باشد. در بررسی نتایج سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در پژوهش حاضر میزان فعالیت MDA در بافت آبشش در تیمارهای ۳ و ۴ و در بافت کبد در تیمارهای ۴ و ۵ افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های اجیما و همکاران (Ajima et al., 2016)، گویوسکی و همکاران (Guiloski et al., 2015)، ایسلاس فلورس و همکاران (Islas-Flores et al., 2013)، الیزالد ولازکوئز و همکاران (Elizalde-Velázquez et al., 2017) همسو بود. در واقع افزایش فعالیت MDA می‌تواند در پاسخ به سمیت و رادیکال آزاد تولید شده ناشی از این‌دومتاسین باشد. میزان پراکسیداسیون لیپید در ماهیان اغلب برای ارزیابی اثر تنش‌های محیطی تعیین می‌شود. افزایش غلظت MDA در سلول‌هایی که در معرض استرس اکسیداتیو قرار دارند، نشان دهنده اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است که افزایش پراکسیداسیون

تغییرات این پارامترها می‌تواند در نظارت بر باقی‌مانده‌های دارویی در آبزی مفید باشد. ایندومتاسین از طریق افزایش تولید ROS، افزایش پراکسیداسیون چربی را به دنبال دارد که باعث ایجاد استرس شده و بنابراین با سیستم آنتی‌اکسیدانی بافت کبد و آبشش ماهی مواجه می‌شود و سبب القاء پاسخ در قالب افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی می‌شود. این شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌توانند به طور موثر به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه سمیت داروها در آبزیان به عنوان موجودات الگو و همچنین به عنوان سیگنال هشداردهنده برای موجودات آبزی در معرض داروها در زمینه متابولیت‌های زیست‌محیطی مفید واقع شوند.

۵ | تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی زیر نظر مسئول محترم تالاب بین‌المللی هامون و با استفاده از گرنت پژوهشی به شماره UOZ-GR-9618-94 انجام گرفت. بدینوسیله از اساتید و دوستان محترم گروه شیلات تشکر و قدردانی می‌گردد.

پست الکترونیک نویسندگان

احمد قرایی: agharaei551@gmail.com
مینا بزمانی: bazmani.m12@gmail.com
جواد میردار هریجانی: javadmirdar@gmail.com
علی خسروانی‌زاده: akhosravanizadeh@gmail.com

REFERENCES

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. In: Kaplan NP, Colowick NP, Sies H (Eds.). *Methods in enzymology*, Academic Press, Vol., 105, pp: 121-126.
- Ajima M.N., Pandey P.K., Kumar K., Poojary N., Mane A.M. 2016. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes biomarkers in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) chronically treated with diclofenac (DCF). *Indian Journal of Experimental Zoology*, 19(2): 671-676.
- Almedia E.A., Loureiro G.R., Martinez S., Miyamoto J., Onuki L.F., Barbosa C.C. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian Marie environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146: 588-600.
- Atli G., Canli M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a fresh water fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145(8): 282-287.
- Bartoskova M., Dobsikova R., Stancova V., Zivna D., Blahova J., Marsalek P., Zelnickova L., Bartos M., di Tocco F.C., Faggio C. 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinology Letters*, 34: 102-108.
- Carlberg I.N.C.E.R., Mannervik B.E.N.G.T. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 14: 5475-5480.

لیپدهای غشا در شرایط تنش ایندومتاسین نشان داد که سرکوب رادیکال‌های آزاد اکسیژن خارج از توان ماهی بوده و به‌طور کلی تجزیه ایندومتاسین می‌تواند با تولید اکسی رادیکال‌های آزاد از جمله یون‌های سوپر اکساید آنیون و رادیکال قوی هیدروکسیل موجبات افزایش سطح MDA را فراهم آورد. علت این افزایش را می‌توان به تجزیه لیپدهای غشاء سلول ضمن مواجهه با رادیکال‌های هیدروکسیل تولیدشده از متابولیت‌های ایندومتاسین دانست (Slaninova et al., 2009).

در پژوهش حاضر، آنزیم GPX در بافت آبشش و کبد در همه تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. این افزایش را می‌توان به حضور مواد اکسیداتیو در سلول‌ها نسبت داد که ممکن است باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بعنوان یک مکانیسم دفاعی شود (Li et al., 2010). نتایج به‌دست آمده در تحقیقات انجام شده توسط ایسلاس فلورس و همکاران (Islas-Flores et al., 2014)، الیزالد ولازکوئز و همکاران (Elizalde-Velázquez et al., 2017) و اجیما و همکاران (Ajima et al., 2016) نیز نشان داد که فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در داروها افزایش قابل توجهی نسبت به شاهد داشته است. نتایج پژوهش حاضر و سایر تحقیقات قیدشده با یکدیگر همسو هستند و می‌توان بیان کرد که افزایش گلوکاتایون پراکسیداز به دلیل مهار ایزوانزیم‌های سیکلواکسیژناز توسط داروی ایندومتاسین، باعث افزایش گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) و سمیت در بافت کبد و آبشش کپور معمولی شده است.

در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم CAT در بافت کبد و آبشش در تیمارهای ۴ و ۵ در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. یافته‌های تحقیق حاضر با نتایج ایسلاس فلورس و همکاران (Islas-Flores et al., 2014)، اجیما و همکاران (Ajima et al., 2016) و الیزالد ولازکوئز و همکاران (Elizalde-Velázquez et al., 2017) نیز همسو بود. آسیب سلولی ناشی از ایندومتاسین که افزایش رادیکال‌های آزاد را به دنبال دارد، سبب فعال شدن سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. یکی از سیستم‌ها که قادر به پاکسازی رادیکال‌های آزاد است، آنزیم کاتالاز می‌باشد (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). این آنزیم با اثر مستقیم بر پراکسید هیدروژن و با تجزیه سریع این ماده به آب و اکسیژن، اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند (Atli and Canli, 2007). افزایش میزان کاتالاز نشان‌دهنده افزایش مقادیر پراکسید هیدروژن طی فرآیند سم‌زدایی در داخل سلول است و علت آن مکانیسم اثر ایندومتاسین روی آنزیم سیکلواکسیژناز می‌باشد. با مهار این آنزیم، در روند تولید متابولیت‌های آراشیدونیک اسید اثر گذاشته و مانع از تولید پروستاگلاندین می‌شود که موجب افزایش رادیکال‌های آزاد و پراکسید هیدروژن در بافت کبد و آبشش کپور معمولی شده است.

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تنش ایندومتاسین سبب القاء پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالسازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کپور معمولی شده است.

با استناد به نتایج پژوهش حاضر، قرار گرفتن در معرض داروی ایندومتاسین به مدت ۲۸ روز سبب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد و آبشش کپور معمولی نسبت به تیمار شاهد شد. بنابراین

- Caylak E., Aytekin M., Halifeoglu I. 2008. Antioxidant effects of methionine, α -lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60: 289-94.
- Chumbley A.B., Tuncay O.C. 1986. The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics*, 89(4): 312-314.
- Dawn-Linsley M., Ekinici F.J., Ortiz D. 2005. Monitoring thiobarbituric acid- reactive substances (TBARS) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. *Journal of Neuroscience Methods*, 141: 219-222.
- Elizalde-Velázquez A., Martínez-Rodríguez H., Galar-Martínez M., Dublán-García O., Islas-Flores H., Rodríguez-Flores J., Castañeda-Peñalvo G., Lizcano-Sanz I., Gómez-Oliván, L.M. 2017. Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver, and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): The role of amoxicilloic acid. *Environmental toxicology*, 32(4): 1102-1120.
- Gao J., Koshio S.h., Ishikawa M., Yokoyama S., Mamauag R. 2014. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. *Aquaculture*, 568: 84-90.
- Guiloski I.C., Ribas J.L.C., da Silva Pereira L., Neves A.P.P., de Assis H.C.S. 2015. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114: 204-211.
- Halliwell B., Gutteridge J. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
- Horton E.W., Main I.H., Thompson C.J. 1963. The action of intravaginal prostaglandin E_1 on the female reproductive tract. *Journal of Physiology*, 168: 54-55.
- Islas-Flores H., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., Colín-Cruz A., Neri-Cruz N., García-Medina S. 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92: 32-38.
- Islas-Flores H., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., García-Medina S., Neri-Cruz N., Dublán-García O. 2014. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7): 5157-5166.
- Kim J.W., Ishibashi H., Yamauchi R., Ichikawa N., Takao Y., Hirano M., Koga M., Arizono K. 2009. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of Toxicological Sciences*, 34(2): 227-232.
- Li Z.H., Li P., Randak T. 2010. Ecotoxicological effects of short-term exposure to a human pharmaceutical Verapamil in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3): 385-391.
- Limón-Pacheco J., Gonsebatt M.E. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2): 137-147.
- Liu Y., Zhang H., Zhang L., Zhou Q., Wang X., Long J., Dong T., Zhao W. 2007. Antioxidant Nacetylcysteine attenuates the acute liver injury caused by X-ray in mice. *European Journal of Pharmacology*, 575: 142-8.
- Martinez-Alvarez R.M., Morales A.E., Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15: 75-88.
- Mason C.F. 1991. *Biology of freshwater pollution*. 2nd edition. Harlow, Essex, England: Longman Scientific & Technical. Wiley, New York, USA. 351 P.
- Mourente G., Bell J.G., Tocher D.R. 2007. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 269-280.
- Mozaffari E., Tazikeh-lemeski E., Saboury A.A. 2016. Isothermal titration calorimetry and molecular dynamics simulation studies on the binding of indomethacin with human serum Albumin. *Bio Macromolecular Journal*, 2(1): 34-43.
- Rudneva I.I. 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 118(2): 255-260.
- Saravanan M., Ramesh M. 2013. Short and long-term effects of clofibrate acid and diclofenac on certain biochemical and ion regulatory responses in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Chemosphere*, 93(2): 388-396.
- Slaninova A., Smutna M., Modra H., Svobodova Z. 2009. Reviews Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*, 30(1): 2-8.
- Yagi K. 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*, 108: 101-106.
- Yavari A., Gharaei A., Ghaffari M., Sharifpoor E. 2013. Determination of LC_{50} and examination of tissue lesions caused by diazinon toxin in whitefish Sistan *Schizothorax zarudnyi*. *Fisheries Science and Technology*, 2(2): 69-80.

نحوه استناد به این مقاله:

قرایی ا.، بزمانی م.، میردار هریجانی ج.، خسروانی‌زاده ع. بررسی تأثیر داروی ایندومتاسین بر استرس اکسیداتیو ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio* Linnaeus، 1758 در مواجهه با غلظت‌های تحت‌کشنده. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۳۹۹، ۶۶-۶۰: ۸(۲).

Gharaei A., Bazmani M., Mirdar Harijani J., Khosravanizadeh A. Effect of lethal concentrations of indomethacin on the oxidative stress of common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Applied Ichthyological Research*, University of Gonbad Kavous. 2020, 8(2): 60-66.

Effect of lethal concentrations of indomethacin on the oxidative stress of common carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Gharaei A^{*1}., Bazmani M²., Mirdar Harijani J¹., Khosravanizadeh A³.

¹Associate prof., Dept. of Fisheries, Zabol University, Zabol, Iran

²M.Sc, Dept. of Fisheries, Zabol University, Zabol, Iran

³Assistente prof., Department of Fisheries, Zabol University, Zabol, Iran

Type:

Original Research Paper

Paper History:

Received: 22-01-2019

Accepted: 26-04- 2019

Corresponding author:

Gharaei A. Associate prof., Dept. of Fisheries,
Zabol University, Zabol, Iran

Email: agharaei551@gmail.com

Abstract

In recent years, drugs have been identified as newly emerging and threatening pollution in aquatic and terrestrial ecosystems. Therefore, in this study, the effect of indomethacin on oxidative stress in *Cyprinus carpio* was investigated. In order to determine the LC₅₀, fish were exposed to various concentrations (30, 60, 100, 150, 250, and 400 mg/l) of indomethacin and daily mortality were recorded during 96 hours. In the next step, fish were exposed to various concentrations of indomethacin (0, 0.01, 0.02, 0.05, and 0.1 time of LC₅₀ 96h) in five treatments including T1 (control), T2 (3.3), T3 (6.4), T4 (6.6), and T5 (32.8 mg/l) for 28 days. At the end of the experiment, antioxidant enzymes such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and malondialdehyde (MDA) were measured in the liver and gill. The lethal toxicity (LC₅₀) of indomethacin was obtained for carp (328.49 mg/l). GPX had higher activity in gill and liver in all treatments compared to the control group. MDA levels in liver in T4 and T5 groups and gill tissue in T3 and T4 groups showed a significant increase compared to the control group. Also, CAT had higher activity in liver and gill in T4 and T5 groups compared to the control group. Indomethacin leads to stress by increasing the production of reactive oxygen species and increasing lipid peroxidation, therefore, it is exposed to the antioxidant system of liver tissue and gills of fish and induces a response in the form of increased antioxidant enzyme activities. The results of this study demonstrated that the presence of indomethacin in an aqueous environment can influence the antioxidant status and health of the fishes.

Keywords: *C. carpio*, Indometacin, MDA, GPX, Lethal concentration