[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

# تاثیر فاز محلول دیکلوفناک به عنوان آلاینده دارویی بر میزان فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز ماهی کپور (*Cyprinus carpio*)

پرستو محبی‌درخش[۱]، علی ماشین چیان مرادی[۱*]، عیسی شریف‌پور[۲]، شهلا جمیلی[۲]

*ali2m@yahoo.com

۱- گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۷

## چکیده

دیکلوفناک، دارویی ضد التهاب و ضد درد غیر استروئیدی است که در سرتاسر دنیا به مقدار زیادی تولید و مصرف می‌گردد. راهیابی این دارو از طریق پساب‌های صنایع دارویی و شهری و مواجهه با آبزیان منجر به ایجاد تغییراتی در فیزیولوژی در این جانداران غیر هدف می‌شود. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی اثر دیکلوفناک بر میزان فعالیت دو آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ماهی کپور به عنوان یک گونه اقتصادی دریای خزر بود. جهت انجام این تحقیق، دو گروه شاهد ۱ (آب) و شاهد ۲ (DMSO) و سه تیمار با غلظت های ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم دیکلو فناک بر لیتر انتخاب شدند. نمونه‌برداری از تیمارها با سه تکرار و در فواصل زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز انجام شد. پس از خونگیری از نمونه‌ها و تهیه سرم خون با استفاده از کیت Zellbio با استفاده از الایزا ریدر با روش رنگ سنجی میزان فعالیت‌های آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز تعیین گردید. نتایج آماری این پژوهش نشان داد که دو متغیر مستقل زمان و غلظت مواجهه تاثیر معنی‌داری بر تغییرات متغیرهای وابسته کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز داشتند ($p<۰/۰۵$). تغییرات در میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در هفته دوم و سوم تیمارهای ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر با مقدار U/ml ۲۶ دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$). شدت تغییرات ایجاد شده مرتبط با غلظت دارو بوده است. مابین تغییرات فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز بترتیب همبستگی معنی‌دار با غلظت و زمان مواجهه با دیکلوفناک مشاهده شد. این تغییرات در کلیه تیمارها در مقایسه با دو تیمار شاهد روند افزایشی داشتند. بیشترین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیداز دیسموتاز و کاتالاز متعلق به تیمار ۵ بود و بترتیب U/ml ۲۶ و۱۵/۳ در هفته سوم رخ داد.

**لغات کلیدی:** دیکلوفناک، ماهی کپور، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز

*نویسنده مسئول

[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

## مقدمه

دیکلوفناک دارویی ضد التهاب و ضد درد غیراستروئیدی است که به طور گسترده در سراسر جهان مصرف می‌شود (سالانه بیش از ۱۰۰۰ تن) و از طریق پساب‌ها وارد بوم سازگان آب شور و شیرین می‌گردد. در ایران نیز ورود این آلاینده به بوم سازگان آبی و حذف ناقص این آلاینده دارویی در سیستم تصفیه پساب گزارش شده است (Eslami *et al*., 2015). بر طبق آمارهای ارائه شده از منابع متعدد این دارو در صدر داروهای پرمصرف در قاره های اروپا، آمریکا و آسیا قراردارد (Burer *et al*., 1998; Barens *et al*., 2004; Bu *et al*., 2013; Boyd *et al*., 2003; Bordin *et al*., 2014; Deng *et al*., 2003; Diniz *et al*., 2015; Fent *et al*., 2006; Eslami *et al*., 2015;Ellis,2006).

در شرایط فیزیولوژیک، تولید مداوم گونه های فعال اکسیژن (ROS)[1] بویژه در میتوکندری، میکروزم‌ها، غشاء هسته و فاگوسیت‌ها ثبت شده است Halliwell and (Halliwell *et al*., 2004؛Gutteridge, 2006).آنتی اکسیدان‌ها ROS را به آب تبدیل کرده و از افزایش تولید ROS جلوگیری می‌کنند. اما هنگامی که فرآیندهای پراکسیدانی به اندازه کافی توسط سازوکارهای آنتی اکسیدان متعادل نشوند، ROS به طور کامل دفع نمی‌شود و مقدار آن در سلول زیاد می‌شود. این فرآیند هنگامی اتفاق می‌افتد که آنتی‌اکسیدان‌ها کم یا تخلیه شود یا سرعت تولید ROS بر دفاع آنزیمی پیشی گیرد. در این حالت که تنش اکسیداتیو نامیده می‌شود، بسیاری از ماکرومولکول‌ها آسیب می‌بینند و فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها و اختلال در عملکرد غشاهای مختلف اتفاق می‌افتد. در ماهی نیز مانند سایر مهره‌داران دفاع آنتی اکسیدانی در سلامت و پیشگیری از آسیب‌های سلولی حائز اهمیت است (Ballesteros *et al*., 2009). اتواکسیداسیون PUFA[2]، ترکیباتی مانند هیدروپراکسیدهای اسید چرب، آلدهیدها و هیدروکربن‌ها تولید می‌کند که می‌تواند موجب بوجود آمدن بعضی شرایط بیماری‌زا در ماهی شود و دفاع آنتی‌اکسیدانی ممکن است که در نتیجه آلودگی در محیط زیست ماهی نیز رخ دهد (Valhogianni *et al*., 2007; Valadanidis *et al*., 2006).

معمولاً حضور آلاینده در محیط زیست آبزیان منجر به افزایش غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Cheung *et al*., 2001). تعدادی از محققان اثر داروها را بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسیداز بررسی کردند، از جمله Nava-Alvarez و همکاران (۲۰۱۴) اثر دیکلوفناک و استامینوفن بر میزان فعالیت کاتالاز و سوپراکسیداز در ماهی کپور معمولی، Nunes و همکاران (۲۰۰۸) اثر تتراسایکلین برمیزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ماهی *Gambosia holbrooki*، نتایج این تحقیقات دال بر افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بود.

میزان مصرف دیکلوفناک برطبق آمارنامه وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران، با احتساب میانگین وزنی فرم‌های مختلف این دارو قابل توجه است. هر چند آمار دقیقی از میزان غلظت این دارو در دریای خزر در دسترس نمی‌باشد، ولی با توجه به راهیابی پساب‌ها به بوم سازگان دریایی و آب شیرین در حوضه خزر، ضرورت دارد تا نسبت به بررسی اثر این دارو به عنوان آلاینده بر فعالیت میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آبزیان مورد بررسی قرارگیرد.

## مواد و روش کار

به منظور انجام این تحقیق،ماهیان کپور با دامنه وزنی ۵±۳۰ گرمی از مرکز تکثیر سیجوال استان گلستان تهیه شد و با کیسه‌های نایلونی دوجداره با یک سوم حجم ماهی و آب و دو سوم اکسیژن خالص در خرداد ماه سال ۱۳۹۵ به کارگاه پرورش ماهیان زینتی در تهران منتقل شد. قبل از ذخیره‌سازی، آکواریوم‌ها بوسیله هیپوکلریت سدیم ضدعفونی گردیدند. سپس با آب شست و شو و با هدف حذف کلر از آب شهری اقدام به کلرزدایی شدند. ۳۵۰ عدد ماهی به صورت تصادفی در ۱۵ اکواریوم ۱۶۰

[1] Reactive Oxygen Species
[2] Poly Unsaturated Fatty Acid

لیتری تقسیم شدند و در هر اکواریوم ۲۴ عدد ماهی قرار داده شد. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب شامل درجه حرارت آب، اکسیژن محلول و pH به صورت روزانه انجام پذیرفت. میانگین دمای آب ۰/۵±۲۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۵ میلی‌گرم بر لیتر و pH برابر ۷/۱ بود. دوره نوری نیز به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. جهت حفظ کیفیت آب اکواریوم ها روزانه۵۰ ٪ آب تعویض گردید و مدفوع و بقایای غذا ماهیان سیفون شدند. ماهیان به مدت دو هفته جهت تطابق با شرایط جدید بدون مواجهه با دارو در این آکواریوم ها نگهداری شدند. میزان غذادهی ۱٪ وزن ماهیان روزانه انجام شد. داروی دیکلوفناک از شرکت سبحان دارو با غلظت ۹۹٪ تهیه شد و با توجه به حجم اکواریوم ها میزان دارو با توجه به غلظت‌های تعیین شده وارد آب گردید. از روز دوم با توجه به تعویض آب، غلظت داروها تجدید شد. طراحی هر تیمار آزمایش (غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ در میلی‌گرم دیکلوفناک در لیتر) در ۳ تکرار انجام پذیرفت. در پایان دوره آزمایش قبل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، ماهیان با پودر گل میخک به میزان ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شدند و با قطع ساقه دمی اقدام به خونگیری گردیدند. برای جداسازی سرم خون، نمونه‌های خون با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ و نمونه‌های سرم بدست آمده تا قبل از انجام تست‌های بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Saravanan *et al*., 2013,2011,2012; Heit *et al*., 2017).

اندازه‌گیری میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز با استفاده از کیت‌های مخصوص این آنزیم‌ها شرکت ZELL BIO بر اساس روش رنگ سنجی و با دستگاه الایزاریدر در آزمایشگاه غدد دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. در نهایت کلیه داده‌های جمع‌آوری شده در هر مرحله با نرم افزار spss۲۲ مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفتند و در ادامه در نرم افزار (Excel ۲۰۱۳) ثبت گردید و نمودارهای مربوطه ترسیم شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک[1] انجام شد. سپس با استفاده از آنالیز واریانس چند طرفه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح ۵ ٪ مورد بررسی قرار گرفت (Hallare *et al.*, 2004؛ منصوری‌فر، ۱۳۹۱).

## نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که مواجه ماهی کپور با دیکلو فناک منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌گردد. نتایج آماری نشان داد که دو متغیر مستقل زمان و غلظت مواجهه تاثیر معنی‌داری بر تغییرات متغیرهای وابسته کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز داشتند، ولی اثر همدیگر را تشدید نکردند ($p<۰/۰۵$). تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز در هفته دوم و سوم تیمارهای ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد بود ($p< ۰۵/$) (شکل ۱). میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز همه تیمارها بعد از گذشت ۷ ، ۱۴ و ۲۱ روز دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد ۱ و ۲ بودند و در مدت ۲۱ روز مواجه با دارو، بیشترین میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز مربوط به تیمارها ۲۶/۱۶ واحد بر میلی‌لیتر بود و در همه تیمارهای مواجه شده با دارو با گذشت زمان، روند افزایشی در میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مشاهده شد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف در زمان مشخص مشاهده نشد، اما با گذشت زمان اختلاف معنی‌دار و بین تیمارها و شاهد نمایان شد.

بر طبق آزمون فاکتوریل، شدت تغییرات ایجاد شده در میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ناشی از غلظت مواجه با دارو بوده است (شکل ۱) و تغییرات ایجاد شده درمیزان فعالیت آنزیم کاتالاز متاثر از غلظت مواجه با دارو بوده است (شکل ۲). نتایج این آزمون با استفاده از آزمون همبستگی اسپیرمن بین داده‌های مستقل و وابسته تایید شد و ارتباط معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بترتیب با زمان و غلظت مواجه دارو مشاهده نگردید.

[1] Shapiro-Wilk

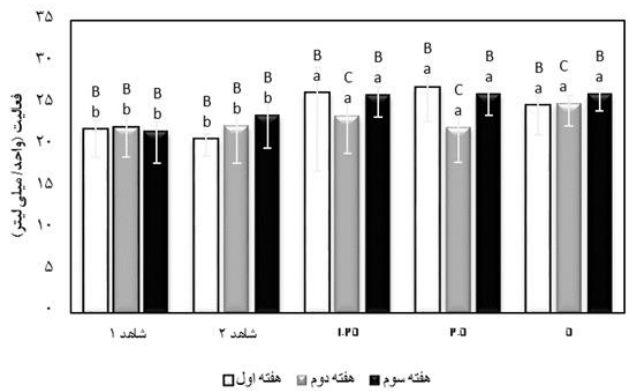


[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]




**شکل ۱: تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ماهی کپور (*C. carpio*) پس از مواجهه با دیکلوفناک. حروف بزرگ: نمایانگر تغییرات میزان فعالیت طی مدت مواجهه با دیکلو فناک و حروف کوچک نمایانگر تغییرات غلظت دیکلوفناک.**

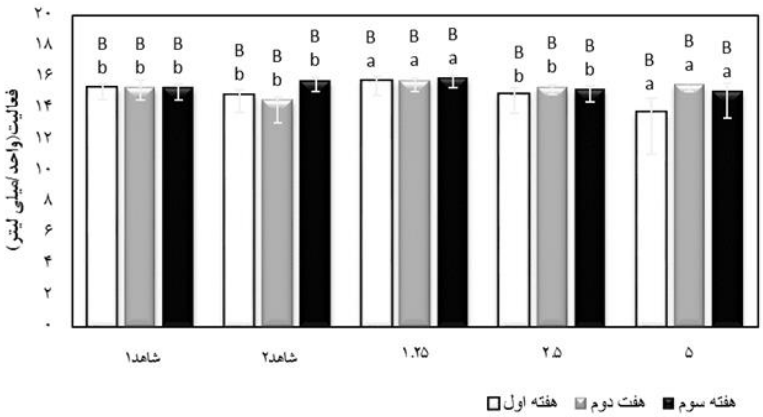
**B: نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسیداز تیمارهای شاهد در مدت زمان مواجهه.**

**b: نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیداز تیمارهای شاهد با غلظت مواجهه.**

**C : نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تیمارها با آب (شاهد ۱) و DMSO (شاهد ۲)در مدت زمان مواجهه.**

**a: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار بین فعالیت آنزیم سوپراکسیدازتیمار ها با شاهد (شاهد ۱) و DMSO (شاهد ۲) در مواجهه با غلظت های مختلف دیکلوفناک.**

**Figure 1: Changes in superoxide dismutase of (*C. carpio*) after exposure to diclofenac. Large letters: indicates changes in activity over the course of exposure to diclofenac and lower case letters reflecting variations in diclofenac concentrations.**
**B: Indicates that there is no significant difference in the activity of superoxide enzyme in control treatments during the time period.**
**b: No Significant differences in the level of activity of superoxidase enzyme in control treatments with concentration.**
**C: Significant difference was observed in the activity of the superoxide dismutase enzyme in water treatment (control 1) and DMSO (control 2).**
**a: Indicates a significant difference between the activity of the superoxidetidimers with the control (control 1) and DMSO (control 2) in the face of different concentrations of diclofenac.**




**شکل ۲: تغییرات آنزیم کاتالاز ماهی کپور (*C. carpio*) پس از مواجهه با دیکلوفناک حروف بزرگ: نمایانگر تغییرات میزان فعالیت طی مدت مواجهه با دیکلو فناک و حروف کوچک نمایانگر تغییرات غلظت دیکلوفناک.**

**B: نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بین تیمارها و شاهد در مدت زمان مواجهه.**

**b: نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بین تیمارها و شاهد با غلظت های ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی گرم بر لیتر**

**Figure 2: Changes in the catalase enzymes of *C. carpio* after exposure to diclofenac Large letters: indicates changes in activity over the course of exposure to diclofenac and lower case letters reflecting variations in diclofenac concentrations.**
**B: There was no significant difference in catalase activity between treatments and control during exposure time.**
**b:Indicates a significant difference in activity of catalase enzyme between treatments and control at concentrations of 5, 2.5 and 1.25 mg.**

[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

## بحث

یکی از آلاینده‌های اکوسیستم‌های دریایی و آب شیرین که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است، آلاینده‌های دارویی می‌باشند که از راهیابی پساب‌های شهری، بیمارستانی، مراکز دفن ذباله و صنایع داروسازی ایجاد می‌گردد. دیکلوفناک دارویی است که دارای مصرف بالایی در سراسر جهان می‌باشد و در اغلب اکوسیستم‌های دریایی و آب شیرین در سراسر دنیا قابل ردیابی است. احتمال حضور آلاینده‌های دارویی در اکوسیستم‌های آب شیرین و شور ایران به علت مصرف بالای دارو در ایران به لحاظ قیمت پایین، قابلیت دسترسی آسان و نیز فقدان محدودیت‌های قانونی مناسب در خصوص مصرف داروها و نیز تصفیه ناقص پسابها وجود دارد ( Fent *et al*., 2006; Eslami *et al*., 2015).

نتایج تحقیق حاضر پس از مواجهه ماهی کپور (*C. carpio*) با دیکلوفناک، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیداز دارای روند افزایشی بودند و تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده شد ($p<0.05$). بررسی نتایج آزمون همبستگی اسپیرمن نشان داد که تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز دارای همبستگی معنی‌دار با غلظت دیکلوفناک و تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز دارای همبستگی معنی‌دار با زمان مواجهه بود. اما ارتباط معنی‌داری بین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با زمان مواجهه با دیکلوفناک و آنزیم کاتالاز با غلظت مواجهه مشاهده نگردید. نتایج آزمون همبستگی بین دو آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز طی ۲۱ روز و در تمامی تیمارها نشان داد که همبستگی بین این دو آنزیم در ماهیان تحت آزمایش معنی‌دار بود و تغییرات این دو آنزیم از نظر آماری با هم مشابهت داشتند.

دیکلوفناک دارویی است که عمدتا برای تسکین دردهای روماتیدی بکار می‌رود و در آبزیان گیرنده اختصاصی این دارو وجود ندارد. به همین دلیل ممکن است که آثار مواجهه با داروی دیکلوفناک در آبزیان قابل پیش‌بینی و مشابه با موارد انسانی نباشد. دیکلوفناک و متابولیت‌های آن منجر به آسیب‌های فیزیولوژیک و تغییراتی در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهیان به عنوان جانداران غیر هدف می‌گردد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مهمترین و اولین مکانیسم دفاع آنزیمی است که مسئول خنثی کردن اثرات سمی ایجاد شده بواسطه حضور ROSها می‌باشد (Van der Oost *et al*., 2003) در ادامه روند حذف ROSها، سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، پراکسید هیدروژن را تبدیل به آب می‌کنند (Barata *et al*., 2005). پاسخ ماهیان به آلاینده‌ها به منظور آداپته شدن یا تغییر با شرایط متابولیک ایجاد می شود. بازدهی و تاثیر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ممکن است در شرایط استرس زا، افزایش یا مهار گردد که این امر وابسته به شدت و مدت مواجهه با عوامل استرس‌زا در گونه‌های مختلف متفاوت است (Ballesteros *et al*., 2009; Winston and Digiulio, 1991) بنظر می‌رسد ورود دیکلوفناک به بدن ماهی کپور (*C. carpio*) منجر به افزایش میزان ROS ها در خون ماهی گردیده است و در ادامه به منظور حذف ROSها فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این ماهی افزایش یافته است. همانطوریکه در نتایج اشاره شد، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیداز به دلیل ماهیت دفاعی این آنزیم در برابر آلاینده‌ها می‌باشد که در این تحقیق، افزایش غلظت دارو منجر به افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد شده است. همچنین افزایش میزان فعالیت کاتالاز در ماهی کپور مواجهه شده با دیکلوفناک متاثر از گذشت زمان مواجهه بوده است. با گذشت زمان تجمع پراکسید هیدروژن‌های ناشی از عمل آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز، منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، در خون ماهی شده بود.

تحقیقات مشابهی نتایج این پژوهش را تایید می‌کنند، از جمله افزایش میزان فعالیت کاتالاز و سوپراکسیداز در ماهی Zebra fish (*Danio rerio*) در اثر مواجهه با سه داروی دیکلوفناک، اتانول و کتوفن افزایش گزارش شده است. همچنین مواجه کوتاه‌مدت و بلندمدت ماهی کپور معمولی با دیکلوفناک منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیداز و کاتالاز در خون، عضله، آبشش، مغز، کلیه، آبشش و کبد ماهی کپور معمولی شده است. در مطالعات مشابهی اثر دیکلوفناک بر

[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

بافت کبد ماهی *Hoplias malabaricus* منجر به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده بود در مقابل، مواجهه ماهی *Rhamdia quelen* با دیکلوفناک، منجر به کاهش میزان فعالیت کاتالاز و سوپراکسیداز در بافت کبد شده بود( Saucedo- Vence *et al*., 2014; Nava-alvarez *et a*l., 2014; Praskova *et a*l., 2014; Guiloski *et al*., 2015; Islas- Flores *et al*., 2013).

مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند که وظایف هر کدام به صورت ذیل می باشد. کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به مولکول اکسیژن و آب می‌شود. سوپر اکسید دیسموتاز سبب تجزیه سوپر اکسیدها به پراکسید هیدروژن می‌شود و گلوتاتیون پراکسیداز به همراه گلوتاتیون اکسیداز سبب کاهش هیدرو پراکسیداز چربی و پراکسید هیدروژن می‌شود (Martineez-Alvarex *et al*., 2005). هنگامی که استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد، بسیاری از آنیون‌های سوپر اکسید رها شده در داخل سلول به مولکول‌های پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود که این مولکول‌ها توسط کاتالاز از بین می‌روند. سوپر اکسید دیسموتاز نیز همانند کاتالاز یک آنزیم محرک است و با اکسیژن فعال کاهش می‌دهد.

وقتی ارگانیسم‌ها در معرض آلاینده ها قرار می‌گیرند، سیستم ROS فعال می‌شود و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بخصوص سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش می‌یابد (Niyogi *et al*., 2001). با افزایش آلاینده‌ها افزایش شدید میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش آنزیم کاتالاز در ماهی کپور می‌گردد، هر چند نحوه پاسخ بافت‌های مختلف ماهی به میزان آلودگی متفاوت است و ممکن است یک بافت به استرس اکسیداتیو پاسخ ندهد و سیستم آنزیمی بخوبی فعال نشود و در نتیجه تخریب بافتی بیشتر باشد (Yilmaz *et al*., 2006).

در تحقیق حاضر همراه با آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز افزایش میزان کاتالاز نیز مشاهده شد. بنظر می‌رسد در ماهی کپور در گروه وزنی مورد مطالعه آنزیم سوپراکسیداز نقش پر رنگ تری نسبت به آنزیم کاتالاز برای از بین بردن پراکسید هیدروژن ایفاء می‌کند که برای رسیدن به پاسخ قطعی در این خصوص نیاز به تحقیق بیشتر در این زمینه می‌باشد. به طور کلی، نتایج نشان داد که آنزیم‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز سرم خون، بیومارکرهای مناسبی برای آلودگی فاز محلول دیکلوفناک در کپور ماهی (*C. carpio*) محسوب می‌شوند.

در بسیاری از موارد تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تحت آلودگی و تیمار شاهد از نظر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی در اندام‌هایی مانند کبد و هپاتوپانکراس وجود دارد که می‌تواند به دلیل قابلیت بالای آن اندام در بروز تاثیرات آلاینده‌های مورد نظر باشد (Hong *et al*., 2007).

در مجموع بر مبنای پژوهش حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که وجود دیکلوفناک در محیط‌های آبی منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور (*C. carpio*) می‌شود. مدت و غلظت مواجه با داروی دیکلوفناک رابطه مستقیم با افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسیداز داشت. نوع ماده آلاینده و حساسیت جانوران به آنها نیز در میزان القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موثر است. یکی دیگر از فاکتورهای مهم در میزان القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی زمان مواجهه با آلاینده است. معمولاً در بررسی آلاینده‌ها و تاثیر آنها بر سیستم دفاعی و بافت هر دو روش حاد و مزمن استفاده می‌شود و عکس‌العمل موجودات بر اساس حساسیت‌های گونه‌ای به آلاینده بسیار متفاوت است. هر چه زمان ماندگاری در برابر آلاینده بیشتر باشد، میزان عکس‌العمل آنزیمی به آلاینده بیشتر می‌باشد. بر طبق نظر Zhang و همکاران (۲۰۰۴) تعدادی از آنزیم‌ها نقشی مشترک را در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ایفاء می‌کنند (Lavanya *et al*., 2011). با توجه به پژوهش‌های سایر محققان در خصوص اثر دیکلوفناک بر

ماهی کپور معمولی، بنظر می‌رسد کپور ماهی (*C. carpio*) به آلاینده دارویی دیکلوفناک حساس باشد (Islas-Flores *et al*., 2013). بنابراین، ورود پساب‌های خانگی، بیمارستانی و صنعتی به اکوسیستم دریای خزر، با توجه وجود آلاینده‌های دارویی در این پساب‌ها و مواجه آبزیان با این آلاینده‌ها، می‌تواند سلامتی ماهی کپور دریای خزر را تهدید نماید.

## منابع


**منصوری فر، ک.، ۱۳۹۱.** روش های پیشرفته آماری همراه با برنامه های کامپیوتری. چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران. ۴۶۰ ص.

**Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A. and Bistoni, M.A., 2009.** Oxidantive stress responses in different organs of Jenynsia mutidentata exposed to edosulfan. Ecotoxicology Environmental Safty. *Safe*, 72: 199-205. DOI: 10.1080/03601230701309577

**Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S. and Porte, C., 2005**.Antioxidantenzyme activities and lipid peroxidation in freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *Part C*, 140: 175-186. DOI: 10.1016/j.cca.2005.01.013

**Barnes, K.K., 2004.** Pharmaceuticals and Other Organic Waste Contaminants within a Leachate Plume Downgradient of MAUNICIPAL Landfill. *Grand Water Monitoring and Remediation*, 24.2: 199-126. DOI: 10.1111/j.1745-6592.2004.tb00720.x

**Bordin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M. and Jonsson, M., 2014.** Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems- impacts through behavioural alterstions. Biological Science Royal Society Publishing, 369(1656): 20130580. DOI: 10.1098/rstb.2013.0580

**Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A. and Mitra, S., 2003.** Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface and treated water of Louisiana, USA and Ontario, Canada, 311:135-149. DOI**:** 10.1016/S0048-9697(03)00138-4

**Bu, Q., Wang, B., Huang, J., Deng, Sh. and Yu, G., 2013.** Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: *A review, Journal of Hazarous Materials*, 262:189-211. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.08.040

**Burer, H.R., Poiger, T. and Muller, M.D., 1998.**Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol*., 32 (22): 3449-3456. DOI: 10.1021/es980301x

**Cheung, C.C.C., Zheng, G.J. Li, A.M.Y., Richardson, B.J. and Lam, P.K.S., 2001.** Relationships between tissue concentrations of polycylic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat*. *Toxicol*. 52: 189-203. DOI: 10.1016/S0166-445X(00)00145-4

**Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q.Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Neessner, R. and Knopp, D., 2003.** Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using




[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

ELISAand GC-MS. Environ.Sci.Technol. 37:3422-3429. DOI: 10.1021/es0341945

**Diniz, M.S., Salgado, R., Pereira, V.J., Carvalho, G., Oehmen, A. and Reis, M.A.M., Noronha, 2015**. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (Danio rerio), *Sience of the Total Enviroment*, 505: 282-289. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.09.103

**Ellis, J.B., 2006.** Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Enviromental Pollution*, 144: 184-189. DOI:10.1016/j.envpol.2005.12.018

**Eslami, A., Amini, M.M., Yazdanbakhsh, A.R., Rastkkari, N., Mohseni-Bandpei, A., Nasseri, S., Pirotie, E. and Asadi, A., 2015.** Occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Tehran source water, municipal and hospital wastewaters, and their ecotoxicological risk assessment. *Environ. Monit. Assess.*, 187 (12): 724-734. DOI: 10.1007/s10661-015-4952-1.

**Fent, K., Weston, A.A. and Caminada, D., 2006**. Ecotoxicology of human pharmacuticals, *Aquatic Technology*, 76: 122-159. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009

**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 Enviromental Safty*, 114:204-211. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.020

**Hallare, A.V., Kohler H.R. and Triebskorn, R., 2004**.Development toxicity and stress protein responses in Zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. Chemospherr, 56: 659-666. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.04.007

**Halliwell, B., Long L.H., Yee T.P., Lims S. and Kelly. R**., **2004.** Establishing biomarkers of oxidative stress. The measurement of hydrogen peroxide in human urine Curr. Med. Chem.

**Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 2006.** Free Radicals in biology and medicine, Ed4, Clarendon Press Oxford. Oxford, United Kingdom. pp.1-27.

**Heit, C., Marshall, S., Singh, S., Yu, X., Charkoftaki, G., Zhao, H., Orlicky, D.J., Fritz, K.S., Thompson, D.C. and Vasiliou, V., 2017**. "Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice". Free Radical Biology and Medicine, 103: 48–56. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.011

**Hong, H.N., Kim, H.N., Park, K.S., Lee, S.K. and GU, M.B., 2007.** Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*, 67, 2115-2121.

**Islas-Flores, H., Gomez-Olivan, M., Galar-Martinez, M., Colin-Cruz, A., Neri-Cruz, N. and Garcia-Medina, S., 2013**. Diclofenac- induced ixidative stress in brain ,liver, gill, and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Enviroment Safty*, 92: 32-38. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.025

[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]

**Lavanya, S., Ramesh, M., Kavittha, C. and Malarvizhi, A., 2011**. Hematological, biochemical and ionoregulatory response of indianmajor carp Catla catla during chronic sub; ethal exposure to inorganic arsenic. *Chemosphere*, 82: 977-985.

**Martinez_Alvarez, R.M., Morales, A.E. and Sanz, A., 2005**.Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Fish Biology and Fisheries*, 15 (1): 75-88. DOI: 10.1007/s11160-005-7846-4

**Nava-Alvarez, R., Razo-Estrada, A.C. and Garcia-Medina, S., 2014**. Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio). Environmental Contamination and Toxicology*, 67: 281-295. DOI**:** 10.1016/j.ecoenv.2013.01.025

**Niyogi, S., Biswas, S. and Datta, A.G., 2001.** Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, Balanus balanoides, and their relation with *polyaromatic hydrocarbons*. *Mari Environ*, 52(1): 13-26. DOI: 10.1016/S0141-1136(00)00257-9

**Nunes, B., Gaio, A. and Carvalho, F., 2008.** Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71(2): 341–354. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.12.006

**Praskova, E., Plhalova, L., Chromcova, L., Stepanova, S., Bedanova, I., Hostovsky, M., Skoric, M., Marsalek, P. and Voslarova Svobodova, Z., 2014.** Effects of Subchronic Exposure of Diclofenac on Growth, Histopathological Changes and Oxidative Stress in Zebra fish (*Danio rerio*). *The Scientific World Journal*, 4: 545-549. DOI: 10.1155/2014/645737

**Saravanan, M., Karthika S., Malarvizhi, A. and Ramesh M., 2011.** Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: Hemological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *Journal of Hazardous Matherials*, 195: 188-194. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.029

**Saravanan, M., Usha Devi, K., Malarvizhi, A. and Ramesh, M., 2012**. Effects of Iboprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Enviromental Toxicology and Pharmacology*, 34: 14-22. DOI: 10.1016/j.etap.2012.02.005

**Saravanan, M. and Ramesh, M., 2013**. Short and long –term effects of clofibric acid and diclofenac on certain biochemical and ionoregulatory response in an Indian major carp *Cirrhinus mrigala*. *Chemo-sphere*, 93: 388-396. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.015

**Saucedo-Vence. K., Dublán-García O, López-Martínez, L.X., Morachis-Valdes, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H.**



[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

**and Gómez,Oliván, L.M., 2015.** Short and long-term exposure to diclofenac alter oxidative stress status in common carp *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology*; 24(3): 527-39. DOI: 10.1007/s10646-014-1401-9

**Valananidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. and Scoullos, M., 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safe*., 64: 178-189. DOI:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013

**Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P., 2003.** Fish bioaccumulation and bio markers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. *Pharmacol*, 13: 57-149. DOI: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6

**Vlahoginni,T., Dassenakis, M., Scoullos, M.J. and alavanidis, A., 2007**.Intergerate use of biomarkers (superoxidase dismutase, catalase and lipid peroxidase) in mussle *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull*, 54: 1361-1371. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2007.05.018

**Winston, G.W. and Digiulio, R.T., 1991.** Prooxidant and antioxidant mehanisms in aquatic organisms, *Aquat. Toxicol*., 19: 137-161. DOI: 10.1016/0025-326X(93)90498-9.

**Yilmaz, H.R., Turkoz, Y., Yuksel, E. and Orun, I., 2006**.An Investigation of Antioxidant Enzymes Activities in Liver of *Cyprinus carpio* Taken from Different Stations in the Karakaya Dam Lake. *International Journal of Science and Technology*, 1: 1-6.

**Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J. and Xue, Y., 2004.** Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver offreshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55 (2): 167-174. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.048



[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

[ Downloaded from isfj.ir on 2025-07-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.6.9.3 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118348 ]

# The effect of Diclofenac diluted phase as a pollutant on the activity of Catalase and Superoxide dismuthase in *Cyprinus carpio*

Mohebi derakhsh P.[1]; Mashinchian Moradi A.[1*]; Sharifpour I.[2] , Jamili Sh.[2]

[*]ali2m@yahoo.com

1- Department of marine biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

## Abstract

Diclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory and non-steroidal anti-inflammatory drug widely produced and consumed throughout the world. The advancement of this drug through medicinal and urban wastewater and exposure to aquatic organisms leads to changes in the physiology of non-target organisms. The aim of this study was to evaluate the effect of diclofenac on the activity of two antioxidant enzymes (Superoxide dismutase and Catalase) in *Cyprinus carpio* as a valuable species in the Caspian Sea. For this purpose, two control groups and three treatments with concentrations of 2.5, 5.1 and 5 mg/L diclofenac were selected. Samples from three replications were taken at 7, 14 and 21 days. After extracting the blood serum samples, colorimetric was performed using ELISA reader to determine the activity of Superoxide dismutase and Catalase enzymes by using Zellbio kits. The results of this study showed that two independent variables of time and exposure concentration had a significant effect on the changes of dependent variables of Catalase and Superoxide dismutase ($p<0.05$). Changes in the activity of Superoxide dismutase in the second and third weeks of treatment with 5 and 2.5 mg/L with 26 U/ml had a significant difference ($p<0.05$), the severity of the changes was related to the concentration of the drug. The activity changes of Superoxide dismutase and Catalase enzymes were significantly correlated with the concentration and exposure time of Diclofenac, respectively. These changes in all treatments have been increased in comparison with the two treatments. The highest activity of Superoxide dismutase and Catalase enzymes belonged to treatment 5 (26, 15.3 U/ml), respectively, during the third week.

**Keywords:** Diclofenac, Catalase, Superoxidase Dismotase, *Cyprinus carpio*

[*]Corresponding author