فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۰، جلد ۱۳، شماره ۳، تابستان ۹۹، صفحه۶۹ تا۸۳
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی تاثیر آلودگی داروی ایبوپروفن بر روی تغییرات ژنتیکی گورخرماهی به روش *QPCR*

مهسا افشاری کاشانیان[۱]، دکترپرگل قوام مصطفوی[۲]، دکتر علی ماشینچیان مرادی[۳]
۱-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات **mahsa_afshari73@yahoo.com**
۲-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.
۳-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.

تاریخ دریافت:۹۸/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: داروی ایبوپروفن به عنوان یک آلاینده دارویی، اثرات مخرب و در برخی موارد جبران ناپذیری بر موجودات آبزی و به طور کلی موجودات زنده می گذارد که در بسیاری از مواقع این اثرات به صورت تخریب های ژنتیکی و آسیب به ساختار DNA می باشد.هدف این تحقیق بررسی تاثیرات غلظت های مختلف داروی ایبوپروفن در تخریب و آسیب به ساختار DNA در گورخرماهی می باشد.

روش کار: در این مطالعه تغییرات ژنتیکی ژن P53 و بیان آن در گورخرماهی پس از مواجه دو هفته ای با غلظت های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر ایبوپروفن در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در انجام این تحقیق گورخرماهی به مدت دو هفته در معرض غلظت های ذکر شده قرار گرفتند و پس از آن استخراج RNA از آن ها صورت گرفت، با استفاده از روش QPCR نتایج به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج نشان دادند که غلظت کم دارو یعنی ۰/۱ میلی گرم بر لیتر تاثیری بر بیان ژن P53 نداشته است، در حالی که در دو غلظت دیگر که به ترتیب ۱ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر ایبوپروفن بودند، نشان داده شد که اختلاف معناداری بین کنترل و نمونه حاوی دارو بوده است، که در نتیجه آن، ژن P53 به میزان زیادی بیان شده است.همچنین برای ژن کنترل داخلی که GAPDH بود، در کمترین غلظت دارو هیچ گونه اختلاف معناداری بین نمونه تیمار و کنترل مشاهده نشد، در حالی که در تیمارهای بعدی اختلاف معنادار در حد بسیار کم بین نمونه کنترل و تیمار مشاهده شد.

واژه های کلیدی: ایبوپروفن، گورخرماهی، ژن p53، QPCR.

مقدمه

اخیراً فرآورده های دارویی و محصولات مراقبت شخصی به فراوانی در پساب تصفیه خانه های فاضلاب، آب های سطحی، زیرزمینی و به خصوص آب های آشامیدنی یافت شده اند . این محصولات، با دارا بودن نیمه عمر طولانی، در محیط زیست پایدار هستند(۴). هم چنین از آن جایی که داروها عناصری بسیار مهم و جدانشدنی زندگی مدرن امروزی به شمار می آیند و برای درمان بیماری های انسان و حیوان مورد استفاده قرار می گیرند، وجود آن ها در محیط زیست یکی از مسائل مهم و قابل تامل امروزه دنیاست که اخیراً تنها تعدادی از کشورهای پیشرفته مثل آمریکا، انگلستان، آلمان و ایتالیا شروع به بررسی اثرات منفی آلاینده ها در محیط زیست کرده اند. داروها در شرایط عادی قابلیت تجزیه شدن نداشته و برای این که تجزیه شوند به واکنش های خاصی تحت شرایط خاص نیاز دارند که این ها همگی به علت مقاومت بسیار بالای آن ها در مقابل تجزیه شدن است(۲). با در نظر گرفتن این موضوع که این داروهای مصرفی بدون هیچ گونه تغییری وارد محیط زیست می شوند، طی یک سری فرآیندهای متابولیکی توسط باکتری ها مجدداً

تبدیل به ترکیبات فعال می شـوند. لذا این گونه به نظر می‌رسد که فاضلاب های شهری آلوده به این داروها بوده که در طی زمان های مختلف در طول سال توسط انسان‌ها و حیوانات مصـرف شـده اند که در نهایت از راه های مختلفی بـه آب هـای زیر زمینی وارد شـده و طی چرخه‌هایی از آب مجدداً این آلاینده های دارویی وارد بدن موجودات زنده می شـوند(۳). در چند دهه گذشـته طیف وسیعی از محصولات مراقبت شخصی و داروها طی دفعات متوالی در محیط های آبی در نقاط مختلف جهان مشـاهده شـده اند. در میان انواع مختلفی از داروها، ضـد دردهای اسـتروئیدی، داروهای ضـد تب، ضـد میکروبی، ضد افسردگی، آنتی بیوتیک ها و ضدعفونی کننده ها و هم چنین بسیاری از دیگر مواد شیمیایی به طور وسیعی به صورت روزانه به منظور مقاصد مختلف استفاده می شوند که با توجه به مصـارف زیاد انسـانی، این گونه از داروها امکان این که در محیط های آبی به صـورت مسـتقیم و یا غیر مستقیم از طریق فعالیت هایی مانند: تخلیه کود، دام و فاضلاب به زمین وارد شوند و در نتیجه خود را به آب‌های زیرزمینی و سـطحی برسـانند وجود دارد که این راه یابی می توانـد عواقبی مخرب،غیر منتظره و هم چنین اثرات ناخواسـته بر روی گونه های غیر هدف داشـته و در کنار این هـا می توانـد اثرات نـامطلوبی بر روی انسـان و اکوسـیسـتم بگذارد که در نتیجه تمامی موارد گفته شـده حضـور این ترکیبات در محیط زیسـت ممکن اسـت تهدیدی جدی برای سلامت انسان ها و حیوانات به شمار می رود(۳). انتشار داروها و متابولیت های آن ها به محیط زیسـت مساله ای پر اهمیت اسـت که در اصـل فاضـلاب شـهری مسـیر اصـلی این ترکیبات برای رسـیدن به محیط‌های آبی اسـت. بسـیاری از این ترکیبات به راحتی توسط گیاهان تصفیه کننده فاضلاب، تصفیه نمی شوند. علاوه بر این دفع غیر مستقیم داروها از طریق فاضلاب‌های خانگی و تاسـیسـات تولیدی به تاثیر داروها بر محیط زیسـت کمک می کند(۲۹). در حالت کلی داروها در مراحل مختلف چرخه عمر محصول(تولید، مصرف و دفع زباله) به محیط زیست منتقل می شوند. به طور مثال دریای بالتیک در اروپای شـمالی یکی از منابع اصـلی ورودی داروها از طریق دفع مواد فعال مصرف شده توسط انسان و حیوان(از طریق ادرار و مدفوع) و هم چنین دفع نادرست محصـولات پزشـکی اسـتفاده شـده از راه سـرویس های بهداشـتی می باشـد. دیگر مسـیرهای ورودی داروها به دریای بالتیک شامل انتشارات پراکنده از خانه هایی که به سیستم های فاضلاب متصل نیستند، روان آب ها، شست و شـوی زمین هایی که حاوی کود کشـاورزی یا لجن فاضـلاب و سـموم زباله های دفع شـده و هم چنین زباله های پزشـکی در صـورتی که به صـورت نادرسـت از راه زباله های جامد دفع شـوند، می باشـد.امکان سـنجش اهمیت مسـیرهای ورودی دیگر توسـط اطلاعات و داده هایی که در حال حا ضر موجود ا ست، وجود ندارد(۲۹). در ده های اخیر اثرات سـمی برای تعدادی از داروها و مشـتقات دارویی نشـان داده اسـت. یکی از بهترین نمونه های ثبت شـده موجود، تاثیر داروی ضـد التهابی دیکلوفناک بر روی جمعیت چندین کرکس آسـیایی در هند و پاکستان است. کاهش بیش از ۹۵ ٪ جمعیت برخی از کرکس های آسـیایی در دهه ۱۹۹۰ موجب شـد که گونه ها به یک وضـعیت ناشـناخته رسـیده و در معرض خطر انقراض قرار گیرند. یکی دیگر از نمونه های اثبات شـده از اثرات نامطلوب که در نتیجه اسـتفاده از دارو در دسـترس اسـت، مربوط به ماهی های نر رودخانه بریتانیا و پسـاب های STP اسـت. در مطالعه ای که دسـبرو و همکاران انجام دادند، مولکول فعال قرص ضـد بارداری بانوان با نام اتینیل اسـترادیول را به عنوان مهم ترین آلودگی اسـتروژنی ناشـی از پسـاب های STP در رودخانه‌های انگلیس که منجر به اختلال غدد درون ریز در ماهی ها می شـد، شـناسـایی کردند(۲۸). از اوایل دهه

۱۹۹۰، بسیاری از داروها در آزمایشات سمیت حاد مورد بررسی قرار گرفته اند و کشف شده که اثرات مخربی برای حیات وحش آبی دارند. این ها شامل چندین داروی هورمونی استروئیدی(استروژن، آندروژن، پروژسترون، گلوکوکورتیکوئید)، داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی، فیبرها و استاتین ها، مواد فعال عصبی(داروهای ضد افسردگی و صرع)، آنتی بیوتیک ها و آنتی نئوپلاستیک ها(سیتو توکسیک و سیتو استاتیک) هستند(۲۸). داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی مانند ایبوپروفن، ناپروکسن و دیکلوفناک به طور گسترده ای مورد استفاده عمومی قرار می گیرند و در نتیجه اغلب در فا ضلاب، آب های سطحی و همچنین سیستم آب های زیرزمینی ممکن است یافت شوند. ایبوپروفن، کتوپروفن، ناپروکسن، ایندومتاسین، دیکلوفناک، استیل سالسیلیک و فنازون در سیستم آب های سطحی یافت شده اند. با این حال، دیکلوفناک، ایبوپروفن و پروپایفنازون رایج ترین داروهایی هستند که بعد از کلروفیبیک اسید در بدنه آب یافت می شوند. علاوه بر این اثبات شده است که دیکلوفناک برای کرکس ها و گاوها به شدت سمی است. مطابق با مرجع NSAID داروهایی مانند ایبوپروفن، ناپروکسن، و آسپرین رایج ترین داروهایی هستند که به طور معمول در مقادیر تاثیر گذاری در پساب های شهری یافت می شوند(۲۴). از آن جایی که امروزه مطالعات ژنتیکی بسیار گسترش پیدا کرده است، در سال های اخیر گور خرماهی به عنوان یک موجود زنده معروف در جهت مطالعه بر روی عملکرد ژن ها و بیماری های ژنتیکی در مهره داران تبدیل شده است که علت آن این است که گور خر ماهی دارای تعدادی ویژگی های منحصر به فرد ذاتی است که از جمله این ویژگی ها عبارتند از : کوچک بودن سایز بدن این ماهی (طول آن بین ۳ تا ۴ سانتی متر است)، نرخ تولید مثل بالای آن (حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ لارو در هر بار جفت گیری) و سرعت بالای چرخه تولید مثلی آن(جنس ماده می تواند هر دو هفته یک بار تخم ریزی کند). هم چنین پرورش و رشد جنین گورخر ماهی به صورت خارجی بوده و در دوران لاروی به صورت لارو های شفاف و کاملا مشخص هستند(۱۵). از دیگر مزایایی که منجر به استفاده از گورخر ماهی در بسیاری از تحقیقات شده، این است که این ماهی در کارهای مرتبط با توسعه ژنتیکی توانسته به صورت موفقیت آمیزی پاسخ دهد که علت این امر شباهت بیش از ۷۰٪ ژن های گورخرماهی به انسان است که با کمک گرفتن از این ویژگی می توان جهش های ژنتیکی که در انسان توسط بسیاری از بیماری ها و داروهای مورد مصرفی آن ها ایجاد شده اند را بررسی کرد. در گزارش هایی که اخیراً در زمینه مطالعه بر روی گور خر ماهی داده شده است، مشخص شده که در تعیین ترادفژن های این ماهی بیش از ۲۶۰۰۰ پروتئین کد شونده یافت شده که این تعداد بزرگ ترین مجموعه در مهره‌داران است که تاکنون تحقیقات بر روی آن صورت گرفته است(۱۵). از طرف دیگر محققان اخیراً توانسته اند مکان ۱۲۴ ژن را با استفاده از نقشه های ارتوژنیک و در زیر میکروسکوپ با جایگاه همین ژن ها در انسان تطابق دهد که براساس نقشه برداری های صورت گرفته به این نتیجه رسیده اند دو یا چند ژنی که بر روی کروموزوم گورخرماهی یافت شده، بر روی همان کرورموزوم در انسان نیز یافت شده اند(۶). هم چنین دانستن رابطه ی بین ژن های انسان و گور خر ماهی هم به نقشی که جهش ها می تواند برای انسان ایجاد کنند و هم به شناسایی مدل‌هایی از گورخرماهی برای شناخته شدن ژن هایی که به وسیله انسان بیماری ایجاد می کنند، کمک می کند. شناسایی صدها ژن از گورخرماهی و هزاران Est's از آن، پایه و اساس مقایسه بین ژن های انسان و گور خر ماهی را فراهم می کند که این می تواند با ژن های انسان برای شنا سایی اورتولوگ ها مقایسه شود(۶). مطالعات اثرات

سم شناسی داروی ایبوپروفن حاکی از اثرات این دارو بر روی برخی از اندام های انسان از جمله بیضه ها و در موجودات دیگر بر روی تخریب کروموزومی، آسیب به DNA و غیره می باشد که در نهایت این دارو باعث ایجاد اثرات مخرب ژنتیکی بر موجودات مختلف می شود. از آن جایی که اطلاعات کمی از اثرات داروی ایبوپروفن بر روی آبزیان به خصوص گورخرماهی وجود دارد لذا در مطالعه حاضر به بررسی سمیت نیمه حاد این دارو بر تغییرات ژنتیکی گورخرماهی و بیان ژن P53 پرداخته شده است.

مواد و روش ها

آماده سازی آکواریوم ها، تهیه و نگهداری گورخرماهی

ابتدا آکواریوم های مورد نیاز با ابعاد ۳۰ x ۵۰ x ۸۰ سانتی متر، به دقت با مواد شوینده شسته، استریل شده و خشک شدند. سنگ ها و پمپ های هوا هم به همین ترتیب استریل شده و آماده گردیدند. سپس آکواریوم ها را با آب شهری کلرزدایی شده، آبگیری شدند. تعداد آکواریوم های مورد نیاز برای این تحقیق ۵ آکواریوم بود که در همان ابتدا کار ۵ آکواریوم از نظر آماده سازی استریل شدن، تمیز و تنها ۲ تا از آن ها را برای انجام مرحله اول کار که آداپتا سیون ماهی بود، آبگیری شدند. در این تحقیق حدود ۱۷۰ قطعه گورخرماهی در ۵ گروه و ۳۴ قطعه ماهی هر گروه در نظر گرفت شده بود، از استخر پرورش ماهی در شهر تبریز به کارگاه پرورش ماهی در تهران منتقل شدند. این ماهی ها در ابتدا در ۲ آکواریوم ۱۰۰ لیتری با سیستم هوادهی ممتد و فیلترینگ، به مدت ۱ هفته به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. آب ذخیره آکواریوم ها مدام با یک پمپ هوادهی می شد. شرایط آب آکواریوم ها برای نگهداری ماهیان به شرح زیر بود: درجه حرارت ۰/۵± ۲۷ درجه سانتی گراد، سختی آب ۱۸۱ میلی گرم بر لیتر، pH ۷/۳ ۰±/۲۵، تنظیم درجه حرارت آب آکواریوم ها از طریق قرار دادن یک بخاری آبی و تنظیم دمای ۲۷ درجه سانتی گراد انجام شد. ماهی ها روزانه ۲ مرتبه با غذای Starter و بیومار به اندازه چشم ماهی تغذیه شدند و در پایان هر روز غذای اضافی و زائدات کف آکواریوم به روش سیفون از آکواریوم حذف شدند(۲۶).

شرایط غلظت دهی به ماهیان

براساس تحقیقات که توسط Bartoskova و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت، آن ها LC50 ایبوپروفن را طبق راهنما OECD شماره های ۲۰۳ و ۲۱۵ تعیین کردند که این میزان ۳۰ میلی گرم بر لیتر بود(۷). ۳ غلظت غیر کشنده ایبوپروفن شامل ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر بر اساس مطالعات قبلی تعیین دوز کشندگی ایبوپروفن انتخاب شد(۷). سپس ۱۶ قطعه ماهی در هر یک از آکواریوم های ۱۰۰ لیتری قرار داده شد و به مدت ۲ هفته در معرض ایبوپروفن قرار گرفتند. به منظور تهیه غلظت‌های مختلف استاندارد ایبوپروفن تهیه شده از شرکت داروسازی حکیم با کمک حلال DMSO در غلظت های مختلف تهیه شد. روش غلظت دهی به این ترتیب بود که بر اساس نیمه عمر ایبوپروفن که بین ۷۲تا ۹۶ ساعت بود(۹،۱۰،۲۰)، هر ۳ روز در میان ۴۰ درصد از آب هر آکواریوم تخلیه شده و با آب گیری مجدد، غلظت دهی مجدد به آکواریوم ها هم صورت گرفت. نمونه شاهد با غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر DMSO و نمونه کنترل هم آب خالی بود. در مجموع تعداد ۵ آکواریوم در این بخش استفاده شد(۵،۱۰،۳۰).

انتخاب ژن اصلی

به عنوان ژن اصلی که قرار بود تغییرات بیان را که در اثر داروی ایبوپروفن ایجاد می شد، در آن بررسی شود، ژن p53 انتخاب شد که یک ژن سرکوب کننده اصلی تومور است که تقریباً در تمام انواع سرطان ها به صورت غیر فعال حضور دارد. P53 از تشکیل و رشد سرطان به وسیله تنظیم مسیرهای چندگانه از جمله: دو تومور سلولی که بیشترین مشخصه P53 را دارند، تعادل را به نفع زنده

ماندن و یا مرگ سلولی سرعت می بخشند، جلوگیری می کند(۱۸). P53 یک فاکتور رونویسی است که به طور خاص به عنوان یک ترامر متصل می شود تا توالی DNA را از طریق عناصر واکنش مربوط به P53 منتقل کند، بنابراین تنظیم بیان ژن را کنترل می کند(۱۸). P53 در *Drosophila* نقش های دوگانه ای در مرگ سلولی و تمایز سلولی دارد. از یک طرف، P53 موجب ایجاد آپوپتوزیز از طریق مخفی و خاموش شدن ژن شده، از سوی دیگر، تمایز نورون های فتورسپتور(گیرنده تصویر) و سلول های مخروطی در چشم، به طور مستقل القای مرگ سلولی را کاهش می دهد(۱۱).

ژن مرجع و دلایل انتخاب آن

روش QPCR که در این تحقیق از آن استفاده شد، به دلیل حساسیت، اختصاصی بودن، توانایی عملیاتی بالا و دقت روشی استاندارد به منظور تجزیه و تحلیل بیان ژن است، اما در صورتی که درست از آن استفاده نشود، امکان این که نتایج آن گمراه کننده باشد، وجود دارد. یکی از مهم ترین نکاتی که می بایست در زمینه به کارگیری این روش رعایت کرد انتخاب ژن مرجع مناسب برای کنترل خطا های آزمایش بین نمونه ها است(۱). ژن مرجع ایده آل در اصل ژنی است که می‌بایست در بافت ها و سلول های مورد نظر بدون هیچ گونه تغییری در اثر وضعیت بیماری و یا شرایط آزمایش، بیان شود(۱). در این تحقیق از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد که در اصل این ژن گلیسرآلدهید -۳- فسفات دهیدروژناز یک آنزیم مسئول گلیکولیز(مرحله ششم) و برای تبدیل گلیسرآلدهید -۳- فسفات به ۳و۱ دوفسفات گلسرات در حضور فسفات معدنی و NAD^+می باشد(۲۵). این ژن مرجع که اساساً برای حفظ عملکرد اولیه سلولی مورد نیاز است، در همه سلول های موجود در شرایط طبیعی و غیر پاتولوژیک در همه جا بیان شده است. از این رو، این ژن یکی از ژن های مرجع کاندید است که معمولاً برای آزمایش های مقایسه بیان ژن / پروتئین استفاده می شود(۲۵). علاوه بر نقش مشارکتی در مسیر گلیکولیتیک، GAPDH نیز در چندین پروسه سلولی مانند آپوپتوزیز و سایر عملکردهای هسته شامل: انتقال، رونویسی و تکثیر DNA نقش دارد(۲۵).

استخراج RNA و انجام QPCR

جهت استخراج RNA، از هر تیمار ۳ نمونه برداشته شد. در ابتدا ماهی ها به خوبی توسط ازت مایع و در شرایط استریل و سرد پودر شدند و سپس به میزان ۰/۰۸ گرم از هر ماهی وزن و در میکروتیوب های جدید ریخته شدند. در مرحله بعد توسط کیت استخراج RNA یکتا تجهیز آزما، استخراج RNA صورت گرفته و پس از آن به منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده، نمونه ها بر روی ژل آگارز ۲ درصد برده شدند و جهت بررسی کمیت RNA های استخراج شده، نانو دراپ شدند. پس از اطمینان حاصل کردن از مناسب بودنRNA های استخراج شده، از RNAها توسط کیت سنتز cDNA پارس طوس، DNA ساخته شد و در ادامه جهت پیدا کردن مناسب ترین دما برای اتصال پرایمرها به ژن، PCR با شیب دمایی گذاشته شد. مرحله بعدی به این ترتیب بود که با پیدا کردن مناسب ترین دما، Real Time با پروتکل مستر میکس Ampliqon real q plus 2x Master Mix Green، گذاشته شد.

بررسی داده ها و آنالیز نتایج

پس از انجام Real Time، داده هایی که توسط دستگاه در غالب Ct به دست آمدند، توسط نرم افزار اکسل و فرمول های مربوطه که در ادامه به توضیح آن ها پرداخته شده، مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا به منظور نرمال کردن داده ها، Ct ژن کنترل داخلی (GAPDH) همه نمونه ها از Ct ژن مورد بررسی(P53) کم شدند که عدد به دست آمده ΔCt نامیده می شود.

$$\Delta Ct = Ct\ (P53) - Ct\ (GAPDH)$$

در ادامه به منظور بررسی fold change ژن های مورد آزمون از ΔΔCt استفاده شد، به این ترتیب که ΔCt نمونه های حاوی ژن p53 از ΔCt کنترل کم شد.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (P53) - \Delta Ct\ (control)$$

پس از این مرحله جهت محاسبه fold change برای نتایج اصلی از فرمول زیر استفاده شد.

$$2^{-(Ct_{target} - Ct_{ref})}\ sample$$

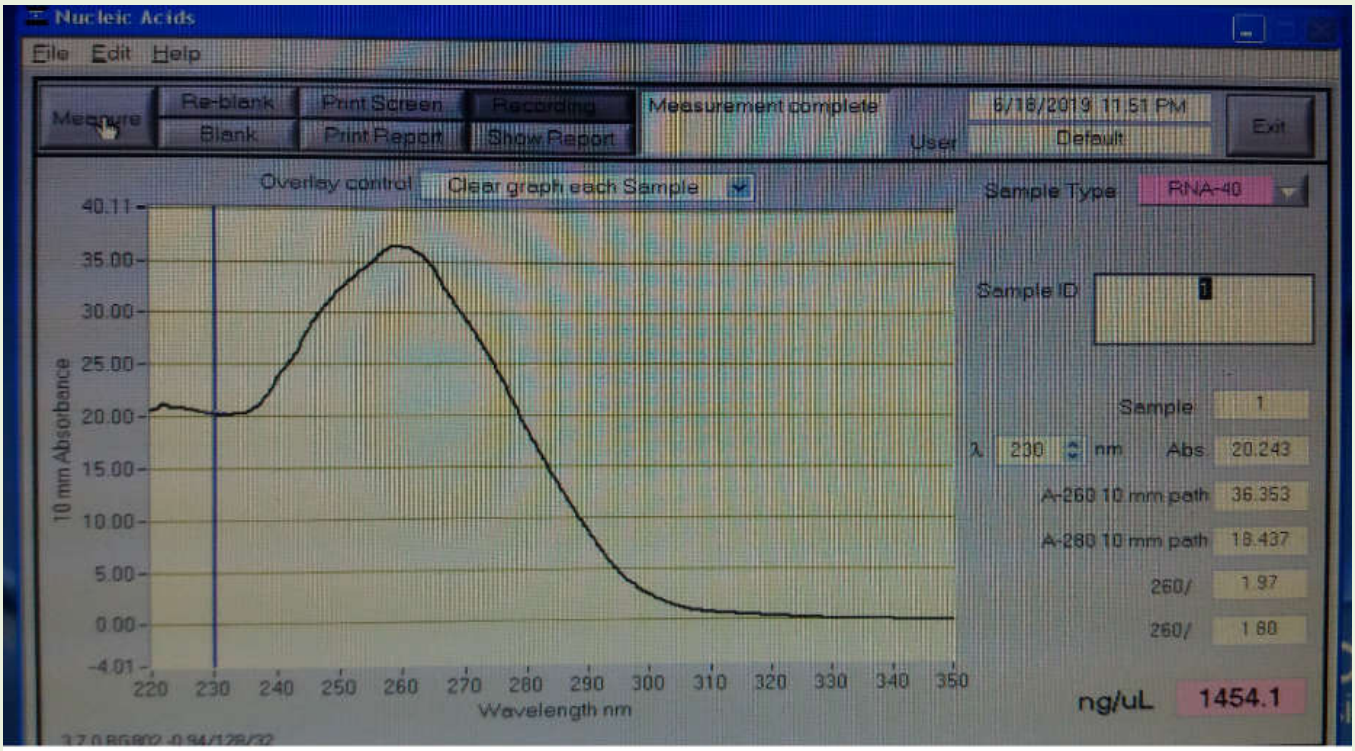
میانگین Ct برای ژن هدف = Ct_{target} میانگین Ct برای ژن رفرنس = Ct_{ref}

انجام واکنش qRT- PCR

در نهایت پس از محاسبه داده های مورد نیاز جهت پاسخ اصلی آزمون، اعداد به دست آمده با استفاده از نرم افزارspss مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

به طور کلی نتایج این تحقیق بر اساس مراحل انجام روش تحقیق به چندین بخش تقسیم شدند که به ترتیب زیر به بررسی آن ها پرداخته شد.نتایج کیفی RNA استخراج شده از کل بخش های بدن گورخرماهی، دو باند ۱۸S و ۲۸S را با وضوح و باندهای شارپ، بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان داد. توسط دستگاه نانودراپ کمیت RNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده به این ترتیب بودند که تمامی جذب‌های نشان داده شده توسط دستگاه نانودراپ بالای ۱/۸ نا به دست آمده از یکی از نمونه ها یکی از نمونه ها در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده در قسمت بعدی انجام تحقیق، به منظور اطمینان حاصل کردن از کارکرد اختصاصی پرایمرهای طراحی شده و تعیین مناسب ترین دمای اتصال این پرایمرها به رشته الگو، از PCR با شیب دمایی بر طبق پروتکل Amplicon Master Mix PCR استفاده شد و بهترین دما جهت حداکثر کارآیی پرایمرهای طراحی شده، تعیین شد(برای هر دو ژن GAPDH و P53، دمای ۵۳ درجه مناسب بود) که در شکل ۲ که تصویر آن در صفحه بعد موجود است نتیجه PCR با شیب دمایی آورده شده است. در مرحله بعد که نتایج Real Time مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند، Fold changeو ΔΔCt که توسط فرمول های ذکر شده در قسمت روش کار و نرم افزار Excel محاسبه شدند، به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ مشاهده می شوند. جدول ۳ نشان دهنده ی تغییرات ژن p53 و ژن GAPDH در شرایط مواجهه با غلظت های مختلف دارو و نمونه های کنترل و شاهد می باشد. در نمودار ۱، مقایسه ی میانگین Ct های ژن p53 نمونه های حاوی غلظت و شاهد با کنترل نشان داده شده است. در نمودار ۲، مقایسه ی میانگین Ctهای ژن GAPDH نمونه های حاوی غلظت و شاهد با کنترل نشان داده شده است.



شکل۱- بررسی کمی RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ

شکل۲- نتیجه PCR با شیب دمایی جهت تعیین دمای مناسب اتصال ژن با پرایمر

جدول ۱- نتایج Fold change

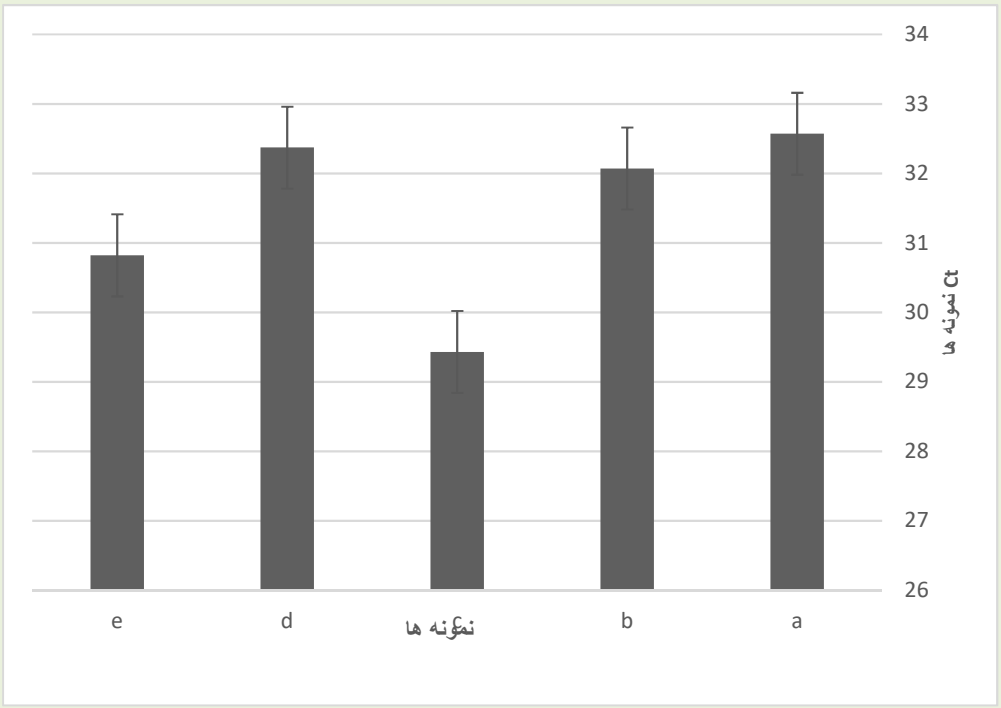
نمونه	Fold change
a (غلظت ۰/۱)	۳/۱۴
b (غلظت ۱)	۱/۶۵
c (غلظت ۱۰)	۶/۳۸
d (کنترل)	-
e (شاهد)	۲/۸۷

جدول۲- نتایج ΔΔCt

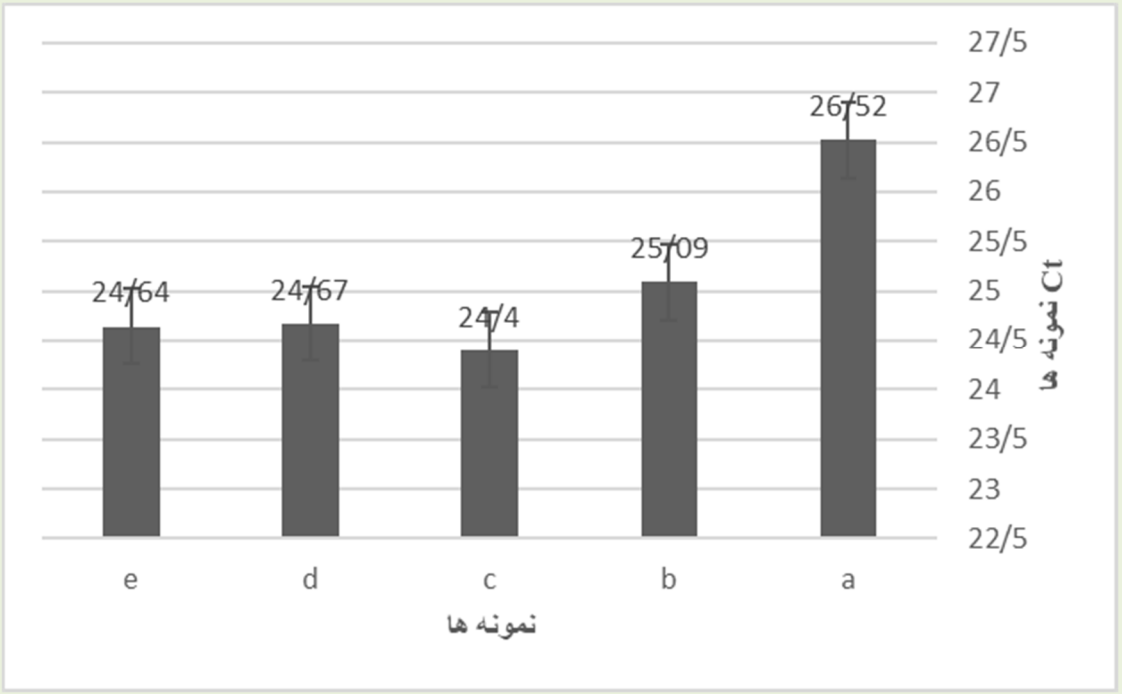
نمونه	ΔΔCt
a	۰/۰۱۵۱
b	۰/۰۰۷۹
c	۰/۰۳۰۷
d	۰/۰۰۴۸
e	۰/۰۱۳۸

جدول ۳. تغییرات ژن p53 و ژن GAPDH در شرایط مواجهه با غلظت های مختلف دارو

نمونه	میانگین Ctژن P53	میانگین Ct ژن GAPDH	p53 ژن P value	GAPDH ژن P value
a (غلظت ۰/۱)	۳۲/۵۷	۲۶/۵۲	۰/۱۵۶	۰/۰۲۰
b (غلظت ۱)	۳۲/۰۷	۲۵/۰۹	۰/۰۰۱	۰/۰۱۲۰
c (غلظت ۱۰)	۲۹/۴۳	۲۴/۴۰	۰/۰۰۵	۰/۴۶۳
d (کنترل)	۳۲/۳۷	۲۴/۶۷	-	-
e (شاهد)	۳۰/۸۲	۲۴/۶۴	۰/۰۱۶	۰/۰۸۶۸



نمودار۳-مقایسه Ct های ژن p53 نمونه های حاوی غلظت و شاهد با کنترل



نمودار٤- مقایسه Ct های ژن GAPDH نمونه های حاوی غلظت و شاهد با کنترل

نتایج به این ترتیب بودند که در ارتباط با ژن p53: با مقایسه دو گروه کمترین غلظت دارو که ۰/۱ میلی گرم بر لیتر بوده است و کنترل که آب خالی بود، به وسیله آزمون T مشخص شد که اختلاف معنی داری بین ۲ گروه مشاهده نمی شود(p value =۰/۱۵۶). با مقایسه دو گروه غلظت متوسط دارو که ۱ میلی گرم بر لیتر بوده است و کنترل به وسیله آزمون T، مشخص شد که اختلاف معنی داری بین ۲ گروه مشاهده می شود(۰/۰۱= p value). با مقایسه دو گروه بیشترین غلظت دارو که ۱۰ میلی گرم بر لیتر بوده است و کنترل به وسیله آزمون T مشخص شد که اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده می شود(۰/۰۰۵= p value). با مقایسه دو گروه DMSO و کنترل با آزمون T، مشخص شد که اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده می شود(۰/۰۱۶= p value). هم چنین در ارتباط با ژن GAPDH، در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی گرم بر لیتر اختلاف معنی دار بین نمونه و کنترل وجود داشت در حالی که در غلظت ۱۰ میلی گرم ب لیتر و شاهد اختلاف معنی داری وجود نداشت.

بحث و نتیجه گیری

بررسی و مقایسه تغییر بیان ژن P53 در معرض ایبوپروفن قرار گرفته در غلظت های مختلف شامل: ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر در گورخرماهی نشان داد که در معرض این دارو قرار گرفتن، منجر به افزایش معنی دار در بیان ژن p53 در مقایسه با نمونه کنترل می شود.به طور کلی در حال حاضر مطالعاتی که توسط دانشمندان صورت گرفته است، نشان دهنده این امر است که داروها در سطح وسیع از کارخانجات تولید کننده دارو، داروهای مورد مصرف انسان وحیوان، داروهای تاریخ گذشته و بیش از نیاز بیماران، به محیط زیست وارد می شوند. داروهای مصرفی توسط انسان به دلیل حلالیت بالای آن ها، علاوه بر این که احتمال وجودشان در منابع آبی بسیار بیشتر از محیط های خشک است، به عنوان منابع آلودگی نیز شناخته شده اند. هم چنین متاسفانه

تصفیه آب معمولی قادر به حذف این آلاینده ها نبوده و داروهایی که دارای نیمه عمر بالاتری در مقایسه به دیگر داروها هستند، از جمله آنتی بیوتیک ها، در محیط آبی تجمع پیدا کرده و موجب مقاوم سازی بدن انسان و جهش میکروارگانیسم ها می شود که در نتیجه این موارد عواقب خطرناک و بعضا جبران ناپذیری به دنبال دارد(۲). دانشمندان با تحقیقات فراوان در پی بررسی اثرات آلاینده های دارویی در دنیا هستند، اما به علت وجود حجم بالا و تنوع زیاد داروها، نیاز به تحقیقات بیشتر و کامل تری است تا به روشن شدن کامل اثرات زیست محیطی آلاینده های دارویی پی برده شود. در انجام تحقیقات بر روی آلاینده های دارویی نکته ای که باید رعایت شود این است که تحقیقات می بایست با داشتن اطلاعات کافی و دانش لازم بر روی آلاینده ها و منابع ورودی آن ها و هم چنین اثرات آن ها بر روی سلامت انسان ها و محیط زیست صورت گیرد(۴). براساس داده های گزارش شده در مورد غلظت این داروها، بیشترین خطر مربوط به داروهای ضدالتهابی و ضد دردهای قلبی – عروقی و داروهای مربوط به سیستم عصبی مرکزی و ضد میکروب ها بوده است. داروهای ضدالتهاب و ضد درد اغلب متشکل از دیکلوفناک، ایبوپروفن و پاراستامول بودند که تقریباً در تمام محیط دریای بالتیک تشخیص داده شدند. اطلاعات مربوط به غلظت ترکیبات دارویی فعال در بیوتای دریایی نشان داد که بیشترین تعداد مواد دارویی و هم چنین بیشترین غلظت در صدف های آبی مشاهده شده است. نتایج حاصل از نظارت بر غلظت داروها در محیط دریایی دریای بالتیک، احتمال وقوع و اثرات آن را به صورت بیان می کند، زیرا روش های تحلیلی مورد استفاده در برخی موارد به اندازه کافی حساس نیستند و در بعضی موارد از سطحی که اثرات زیان آور بیولوژیکی روی می دهد، فراتر می روند(۲۹).

نتایج بررسی های حضور ایبوپروفن در محیط زیست دریای وادی القیط نشان داد که، ایبوپروفن تنها در تصفیه خانه پیشرفته فاضلاب در پساب های نمونه داری اول و دوم با غلظت ۳۰۰ نانوگرم بر لیتر و ۱۰۰۰ نانوگرم بر لیتر تشخیص داده می شود و سپس در سایر ایستگاه های نمونه برداری از بین می رود، زیرا در تصفیه خانه پیشرفته فاضلاب حذف شده است. نتیجه نهایی این بررسی نشان داد که، غلظت ترکیبات دارویی (ایبوپروفن، دیکلوفناک، کاربامازپین) در حوضه آبریز القیط در زیر سطح یا نزدیکی آن قرار دارد، بنابراین هیچ خطری برای آب های زیر زمینی و بهداشت عمومی ندارند. مطابق با بررسی های صورت گرفته در مقالات، ممکن است این داروها در غلظت های بالاتر از غلظت های کشف شده در این مطالعه، به نسبت قابل توجهی برای حیوانات کوچک به عنوان بی مهره گان و ماهی خطر داشته باشد و برای انسان خطری نداشته باشد(۱۳). براساس اثرات سم شناسی دیکلوفناک و ایبوپروفن بر روی *Paramecium sp*، نشان دادند که بر خلاف غلظت های بالا، در غلظت های پایین تر، ایبوپروفن به طور چشم گیری بر *Paramecium sp* تاثیر نزاشته است. هم چنین اثرات مشاهده شده پس از قرار گرفتن در معرض هر دو این داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی به صورت مخلوط و جداگانه بسیار متفاوت بود. پس از مقایسه نتایج مختلف به دست آمده با تمامی غلظت های مورد استفاده برای هر ترکیب به طور جداگانه و برای مخلوط‌ها، مشخص شد که غلظت ایبوپروفن کم ایبوپروفن منشا رشد سلولی و تحریک متابولیسمی دارد. در حقیقت، به نظر می رسید که این یک القا پاسخ هورمونی مخصوص پارامترهای اندازه گیری شده، بوده است و مستقیماً مربوط به مدل سلول مورد استفاده *Paramrcium sp* شناخته شده می باشد. با این وجود، نتایج سمیت به دست آمده با دیکلوفناک و مخلوط ها

برای نتیجه گیری قطعی کافی نیست. بنابراین، تحقیقات با تعداد بیشتری نمونه لازم است و باید با استفاده از ارزیابی های زمانی، بر طیف گسترده ای از غلظت ها تمرکز شود(۱۷). داروی ایبوپروفن به عنوان یک آلاینده قادر است فیزیولوژی بیضه انسان را تغییر داده تا هیپوگنادیسم جبران شونده ایجاد کند، انجام دادند. آزمایشات نشان دادند که مصرف ایبوپروفن در مردان منجر به افزایش LH، کاهش نسبت تستوسترون / LH و در مراتب پایین تر، کاهش نسبت اینهبین B / FSH به مهارکننده ها و کاهش در سطح هورمون ضد مولر سلول سرتولی می شود. کاهش در نسبت تستوسترون آزاد / LH ، در درجه اول ناشی از افزایش سطح، نشان می دهد که پاسخ بیضه به گنادوتروپین ها احتمالاً در طول در معرض ایبوپروفن قرار گرفتن، کاهش یافته است. باید توجه داشت که فقدان تاثیر ایبوپروفن بر میزان ژن های گیرنده گنادوتروپین، نشان می دهد که پاسخگویی سلول های لایدیگ و سرتولی به عملکرد LH و FSH احتمالاً تحت تاثیر ایبوپروفن قرار نمی گیرد(۱۹). هم چنین از بررسی هایی که از در معرض قرار گرفتن شدید ایبوپروفن در سه موجود *Oryzias latipes*، *Daphnia magna* و *Moina macrocopa* انجام شد، نتایج مربوط به تولید هورمون و فعالیت آروماتاز در سلول های H295R ، نشان دادند که ایبوپروفن ممکن است به طور متفاوتی، مسیر COX در *Orzias*(ماهی) و سپس *Daphnia* (سخت پوست)، را تحت تاثیر قرار می دهد. نتایج مربوط به تاثیرات بر روی *Daphnia* و ماهی نشان می دهند که اثرات مرتبط با تولید مثل *Oryzias latipes* با در معرض قرار مزمن ایبوپروفن، ممکن است تا حدودی با اثرات آن بر هموستازی استروژن، روشن شود. نسبت حاد به مزمن نسبتاً زیاد بوده و مشاهده میزان آسیب در تولید مثل ماهی در غلظت های مربوط به محیط زیست از ایبوپروفن، مطالعات بیشتری را به منظور روشن کردن پیامدهای زیست محیطی بالقوه آلودگی ایبوپروفن در محیط زیست، تامین می کند(۱۴). در گزارشی دیگر که اثرات ایبوپروفن در ماهی مورد بررسی قرار گرفت، یک واکنش مربوط به عملکرد این دارو در مورد سطح متابولسیم پروستاگلاندین E، در ماهی هایی که در معرض قرار گرفته بودند، نشان می‌دهد که در غلظت پلاسمای خون، مشابه آن چه که در انسان موثر است، می باشد(۲۳). مطالعه دیگری مربوط به تاثیر ایبوپروفن بر تغییر رشد بیضه جنین انسان بود که نتیجه- گیری نشان داد که قرار گرفتن در معرض سطوح درمانی ایبوپروفن می تواند منجر به اثرات متعدد بر رشد و عملکرد سلول های سرتولی،لایدیگ و سلول های جوانه‌زای در بیضه جنین انسان می شود که این شامل تاثیراتی در تولید چندین هورمون بیضه در سه ماه اول است. این یافته ها مبتنی بر نتایج دو مدل سیستم مختلف از رشد بیضه جنین انسان است. در حالی که نمی توان این یافته ها را به طور مستقیم به توصیه هایی برای استفاده از ایبوپروفن در انسان ترجمه کرد، اما آن ها از آزمایشات اپیدیمولوژیک بین استفاده از ضد درد و ایجاد اختلالات تولید مثلی در مردان حمایت می کنند، شواهدی که می تواند از جلوگیری از استفاده از ایبوپروفن در سه ماهه اول بارداری، در جایی که عملی باشد، پشتیبانی می کند(۲۱). در مطالعه ای که تاثیر داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی بر هورمون ها و ژن- های محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد و تولید مثل در گورخرماهی بررسی شد، نشان داده شد که قرار گرفتن در معرض داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی می تواند استروژن بودن در ماهی را افزایش دهد، اگرچه مکانیسم‌های دقیق پاسخ وابسته به جنس در اثر در معرض قرار گرفتن این داروها، ناشناخته است. این مطالعه اولین گزارشی است که رونویسی از ژن های محور HPG را به تغییرات هورمونی در ماهی با قرار

گرفتن در معرض داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی، مرتبط می کند. لازم به ذکر است که چنین تغییراتی حتی ممکن است در غلظت های مربوط به محیط زیست، به ویژه در ایبوپروفن اتفاق بیافتد. عواقب احتمالی اختلال در غدد درون ریز توسط این داروها مستحق بررسی بیشتر است(۱۶). در گزارشی که از اثرات ژنتیکی ایبوپروفن بر روی موش موجود بود، نشان داد که دو هفته تجویز مداوم ایبوپروفن موجب کاهش در فعالیت میتوزی شده و باعث افزایش جزئی فرکانس های ناهنجاری های کروموزومی در سلول های مغز استخوان موش ها شده است. این اثرات از نظر آماری معنی دار نبود، مگر در هر دوز بالاتر و بیشتر، این نشان می دهد که ایبوپروفن در دوزهای بالا، دارای سمیت ژنتیکی متوسط است. اگرچه مکانیسم دقیق پدیده سمیت زایی آن مشخص نیست، اما پیشنهاد شده است که بسیاری از مواد با عملکرد ضد التهابی بر متابولیسم DNA اثر می گذارد(۲۷). آسپرین و سایر داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی به عنوان عوامل احتمالی سرطان پستان مورد توجه قرار گرفته اند. نتایج تجزیه و تحلیل ها منجر به این نتیجه می شود که آسپیرین و احتمالاً سایر داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی، خطر ابتلا به سرطان پستان را کاهش می دهد. با توجه به بازگشت سرطان پستان و رخ داد مجدد آن، ممکن است اثر محافظتی داشته باشند. با این حال، نقش این اثر با توجه به بقا، به صورت حاشیه ای و کم یا دوبرابر است.واضح است که مطالعات در مورد تاثیر داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی بر ریسک سرطان پستان، اغلب منجر به نتایج مغایر با هم می شود. پژوهشگران معتقدند که نقش این داروها در سرطان پستان نیازمند بررسی های تجربی بیشتر و آزمایشات بالینی تصادفی در مقیاس بزرگ می-باشد(۲۲). در مطالعه ای دیگر آسپرین و ایبوپروفن تاثیر شیمیایی را بر ضد آسیب DNA که ناشی از بلومایسین در لنفوسیت های انسان به دست آمده بود، در بیماران مبتلا به سرطان پستان و زنان سالم با استفاده از روش comet assay نشان دادند. آسپرین و ایبوپروفن باعث کاهش آسیب DNA در لنفوسیت های خون به چالش کشیده شده با بلئومایسین می شوند. به ترتیب در غلظت-های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر آسپرین و ایبوپروفن، اثر محافظتی به نمایش گذاشتند. در روش comet assay، آسپرین بیان ژن p53 را در لنفوسیت های بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش می دهد. با استفاده از روش QPCR هم نتایج برای آسپرین به این صورت بود که بیان ژن p53 در سلول های بیمار مبتلا به سرطان پستان، از نظر آماری به طور معنی داری افزایش پیدا کرده است. برای هر دو دارو COX1 در افراد سالم و لنفوسیت های بیماران سرطانی کاهش پیدا کرده بود. علاوه بر این، کاهش COX2 فقط در لنفوسیت های بیماران مبتلا به سرطان پستان بود. نتایج این پژوهش مطابق با این دیدگاه است که داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی، به ویژه آسپرین و ایبوپروفن، می توانند نقش امیدوارکننده ای در درمان سرطان، از جمله سرطان پستان داشته باشند(۱۲). با توجه به نتیجه ای که از این تحقیق به دست آمده بود نتایج پژوهش در حال حاضر هم با آن مقایسه شده بود که این نتایج به شرح زیر بودند: با مقایسه گروه-های تست و کنترل با یکدیگر مشاهده شد که: در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر لیتر دارو ایبوپروفن اختلاف معناداری بین دو گروه وجود نداشت که در این قسمت نشان دهنده این موضوع بود که دارو ایبوپروفن اثری در بیان ژن P53 نداشته است. در غلظت های ۱ میلی گرم بر لیتر و ۱۰ میلی گرم بر لیتر دارو ایبوپروفن اختلاف معناداری بین دو گروه تست و کنترل مشاهده شد، که این اختلاف نشان دهنده ی اثر مثبت داروی ایبوپروفن در بیان ژن p53 می باشد و موجب افزایش بیان آن شده است. هم چنین با مقایسه دو گروهی که یکی از آن ها حاوی

DMSO فاقد ایبوپروفن و دیگری کنترل(آب خالی) بود، مشاهده شد که، اختلاف معنادار به گروه هست که این اختلاف نشان می دهد که، وجود DMSO به عنوان حلال دارویی ایبوپروفن اثر منفی بر بیان ژن نداشته و هم چنین ایبوپروفن به تنهایی هم قادر به افزایش بیان ژن P53 می باشد. بر مبنای نتایج به دست آمده می توان گفت که از آن جایی که ژن P53، ژن سرکوب کننده تومور بوده و در انواع خاص تومور نقش مهمی را ایفا می کند و داروی ایبوپروفن هم موجب افزایش بیان آن شده است پس بنابراین این احتمال وجود دارد که بتوان از این دارو در پیشگیری از سرطان استفاده کرد.

منابع

۱– رستمی، ر.، حسنی، ا.، برقعی، م.، ترابیان، ع. ۱۳۹۶. اندازه گیری میکروآلاینده های دیکلوفناک و ایبوپروفن در فاضلاب ورودی و خروجی تصفیه خانه های فاضلاب شهری و بررسی عملکرد سیستم در کاهش آن ها مطالعه موردی تصفیه خانه فاضلاب جنوب تهران. هشتمین سمینار ملی شیمی و محیط زیست ایران، ۱ تا ۷.

۲–صیادی، ا.، اسدپور، م.، شعبانی، ز.، صیادی، م. ۱۳۹۱. برهمکنشی داروهای موجود در محیط زیست و اثرات آن بر سلامت جامعه. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان دوره یازدهم، شماره ۲ و ۳.

۳–طهماسبی پور، ن.، رضوی، ر. ۱۳۹۷. نقش داروها در آلودگی کیفیت آب زیرزمینی. سیزدهمین همایش ملی علوم و مهندسی آبخیزداری ایران و سومین همایش ملی صیانت از منابع طبیعی و محیط زیست.

٤–ناصح، ن.، باریک بین، ب.، تقوی، ل.، ناصری، م.ع. ۱۳۹۵. تاثیرات مخرب آلودگی آنتی بیوتیک ها بر محیط زیست و بررسی کارآیی روش های مختلف در حذف آن ها از پساب های آلوده. فصلنامه پرستار و پزشک در رزم، شماره دهم و یازدهم، ۵۰ تا ۶۲.

5.Araujo, L., Troconis, M.E., Espina, M.B., Prieto, A. (2014). Persistence of ibuprofen, ketoprofen, diclofenac and clofibric acid in natural waters. Journal of Environment and Human, 1(2); pp.32-38.

6.Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D., Johnson, S.L. (2000). The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. Genome research, 10(9); 1351-1358.

7.Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Pana, O., Zivna, D., Plhalova, L. (2014). Norfloxacin—toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters. BioMed research international, 2;14-20.

8.Bombardo, M., Malagola, E., Chen, R., Rudnicka, A., Graf, R. and Sonda, S. (2018). Ibuprofen and diclofenac treatments reduce proliferation of pancreatic acinar cells upon inflammatory injury and mitogenic stimulation. British journal of pharmacology, 175(2); 335-347.

9.Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., Wang, B. (2016). Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. Emerging Contaminants, 2(3); 145-147.

10. Carr, D.L., Morse, A.N., Zak, J.C., Anderson, T.A. (2011). Biological degradation of common pharmaceuticals and personal care products in soils with high water content. Water, Air, & Soil Pollution, 217(1-4); 127-134.

11. Charni, M., Aloni-Grinstein, R., Molchadsky, A. and Rotter, V. (2017). p53 on the crossroad between regeneration and cancer. Cell Death and Differentiation, 24(1); 8.

12. Dandah, O.M. (2017). Genoprotective effect of aspirin and ibuprofen in human lymphocyte cells: Effect of nano and bulk forms of aspirin and ibuprofen on lymphocytes from breast cancer patients compared with those from healthy females. Doctoral dissertation: University of Bradford.

13. Fkhaida, N.M. (2014). Fate of pharmaceutical compounds in Wadi Al Qilt catchment area. Doctoral dissertation: Birzeit University

14. Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans Daphnia magna and

Moina macrocopa. Aquatic Toxicology, 98(3); 256-264.
15. Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, 496(7446); 498.
16. Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J.P., Choi, K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. Journal of Hazardous Materials, 254; 242-251.
17. Kermiche, F., Berrebah, H., Djebar, M.R. (2016). Toxicological effects of drugs (Diclofenac, Ibuprofen, mixture) and Hormesis on a non-target organism: *Paramecium sp*. J. Entomol. Zool. Stud, 4(5); 187-191.
18. Khoury, M.P., Bourdon, J.C. (2011). p53 isoforms: an intracellular microprocessor?. Genes & cancer, 2(4); 453-465.
19. Kristensen, D.M., Desdoits-Lethimonier, C., Mackey, A.L., Dalgaard, M.D., De Masi, F., Munkbøl, C.H. (2018). Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(4); E715-E724.
20. Kunkel, U., Radke, M.(2008). Biodegradation of acidic pharmaceuticals in bed sediments: insight from a laboratory experiment. Environmental Science & Technology, 42(19); 7273-7279.
21. Maamar, M.B., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K.R., Coiffec, I. (2017). Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. Scientific Reports, 7; 44184.
22. Moris, D., Kontos, M., Spartalis, E., Fentiman, I.S. (2016). The role of NSAIDs in breast cancer prevention and relapse: current evidence and future perspectives. Breast Care, 11(5); 339-344.
23. Patel, A., Panter, G.H., Trollope, H.T., Glennon, Y.C., Owen, S.F., Sumpter, J.P. (2016). Testing the "read-across hypothesis" by investigating the effects of ibuprofen on fish. Chemosphere, 163; 592-600.
24. Patneedi, C.B., Prasadu, K.D. (2015). Impact of pharmaceutical wastes on human life and environment. Rasayan Journal of Chemistry, 8(1); 67-70.
25. Rasal, K.D., Chakrapani, V., Patra, S.K., Jena, S., Mohapatra, S.D., Nayak, S. (2016). Identification and prediction of the consequences of nonsynonymous SNPs in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene of zebrafish (*Danio rerio*). Turkish Journal of Biology, 40(1); 58-64.
26. Reed, B., Jennings, M. (2010). Guidance on the housing and care of zebrafish Danio rerio. Rasayan Journal of Chemistry, 7(3); 48-57.
27. Tripathi, R., Pancholi, S.S., Tripathi, P. (2012). Genotoxicity of ibuprofen in mouse bone marrow cells in vivo. Drug and Chemical Toxicology, 35(4); 389-392.
28. Thrupp, T.J. (2016). Effects of pharmaceutical pollutants and their mixtures on aquatic organisms–with particular focus on reproduction and endocrine function in a fish model species. Doctoral dissertation: Brunel University London.
29. Vieno, N., Hallgren, P., Wallberg, P. (2017). Pharmaceuticals in the aquatic environment of the baltic sea region. A status Report.
30. Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I. (2009). Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. Water Research, 43(2); 351-362.

The Effect of the Ibuprofen on the Genetic Changes of Zebrafish (*Danio rerio*) Using QPCR Methods

M. Afshari Kashaniyan[1], Dr P. Ghavam Mostafavi[2], Dr A. Mashinchiyan Moradi[3]

1. Islamic Azad University Science and Research Branch.**Mahsa_Afshari73@yahoo.com**

2: Islamic Azad University Science and Research Branch.

3: Islamic Azad University Science and Research Branch.

Received:2019.3. 9 **Accepted: 2020.10.5**

Abstract

Inroduction & Objective: Ibuprofen, as a drug contaminant, has deleterious and in some cases irreversible effects on aquatic organisms and in general on living things, which in many cases can result in genetic damage and damage to the DNA structure. The effects of different concentrations of ibuprofen on DNA damage and damage to zebrafish are investigated. In this study, genetic changes of p53 gene and its expression in zebrafish after two weeks of exposure to 0.1, 1 and 10 mg / l ibuprofen in vitro were investigated.

Material and Method: In this study zebrafish were exposed to the above mentioned concentrations for two weeks and then RNA extracted from them. The results were analyzed using QPCR method.

Results: The low drug, 0.1 mg / l had no effect on p53 gene expression, while the other two concentrations, which were 1 and 10 mg / l ibuprofen, respectively, showed a significant difference between the control and the drug containing sample. As a result, the p53 gene was highly expressed. Also for the internal control gene that was GAPDH, there was no significant difference at the lowest drug concentration. Ray did not show a significant difference between the treatment and control samples, while in the subsequent treatments there was a significant difference between control and treatment samples.The final result of this study was that p53 gene expression increased 1.09, 0.57 and 2.2 fold in sample with lowest drug concentration, mean concentration and highest drug concentration, respectively.

.

Keywords: Ibuprofen, Zebrafish, P53 Gene, QPCR.

.