Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Induction of antioxidant and immune genes expression in zebra fish (*Danio rerio*) exposed to polystyrene nanoplastic

Bahareh Shokuhian[1], Hadise Kashiri[*2], Seyed Ali Akbar Hedayati[3], Roghieh Safari[4]

1. Dept. of Aquatics Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: bahar1373.shokouhian@gmail.com
2. Corresponding Author, Dept. of Aquatics Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hadiskashiri@gmail.com
3. Dept. of Aquatics Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: marinebiology1@gmail.com
4. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: roghi_safari@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 01.02.2023
Revised: 01.15.2023
Accepted: 01.16.2023

Keywords:
Freshwater,
Immune,
Nanoplastic,
Zebra fish (*Danio rerio*)

ABSTRACT

During recent years, nanoplastics have been widely entered into aquatic environments so that nanoplastics pollution has become a global concern. In this regard, information on nanoplastics toxicity is limit for freshwater aquatics, especially at the molecular level. Thus, in the present study, effect of polystyrene nanoplastic was investigated on antioxidant and immune genes expression in zebra fish (*Danio rerio*). For this, polystyrene neoplastic was synthetized and sprayed on fish food. Zebra fish were then fed with the food containing 1, 2, 4 and 8% polystyrene nanoplastic, respectively, for 14 days. One group was also fed with the fish food without nanoplastic as the control. The relative gene expression levels of SOD, CAT and HSP70 were assessed after 14 days. The results indicated that polystyrene nanoplastic induced antioxidant genes expression so that a considerable increase was observed in CAT and SOD genes levels. An increase trend was also observed in antioxidant genes levels with the increase in polystyrene concentration up to 8%. Polystyrene also induced the HSP70 gene. The observed trend in HSP70 gene expression level with the increase in nanoplastic concentration was similar to the antioxidant genes. Considering the results, it could be said that nanoplastic can induce immune and antioxidant system in zebra fish.

Cite this article: Shokuhian, Bahareh, Kashiri, Hadise, Hedayati, Seyed Ali Akbar, Safari, Roghieh. 2024. Induction of antioxidant and immune genes expression in zebra fish (*Danio rerio*) exposed to polystyrene nanoplastic. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (3), 1-12.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.20945.1738
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

القای بیان ژن‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی گورخری (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) در رویارویی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن

بهاره شکوهیان[۱]، حدیثه کشیری*[۲]، سید علی‌اکبر هدایتی[۳]، رقیه صفری[٤]

۱. گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: bahar1373.shokouhian@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hadiskashiri@gmail.com

۳. گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: marinebiology1@gmail.com

٤. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: roghi_safari@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱۰/۱۲
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۱۰/۲٥
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۰/۲٦

واژه‌های کلیدی:
آب شیرین،
ایمنی،
ماهی گورخری (*Danio rerio*)،
نانوپلاستیک

چکیده

طی سال‌های اخیر، نانوپلاستیک‌ها به‌طور گسترده‌ای وارد محیط‌های آبی شده به‌نحوی‌که آلودگی نانوپلاستیکی تبدیل به یک نگرانی جهانی شده است. در این خصوص، اطلاعات مربوط به سمیت این مواد برای آبزیان آب شیرین به ویژه در سطح مولکولی محدود می‌باشد. بنابراین، در پژوهش حاضر به بررسی اثر نانوپلاستیک پلی‌استایرن بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی گورخری (*Danio rerio*) پرداخته شد. بدین‌منظور، ابتدا نانوپلاستیک پلی‌استایرن سنتز و بر روی غذای ماهیان اسپری شد. سپس ماهیان گورخری به مدت ۱٤ روز در غالب چهار تیمار آزمایشی با غذای حاوی به ترتیب ۱، ۲، ٤ و ۸ درصد نانوپلی‌استایرن تغذیه شدند. یک گروه هم به عنوان شاهد با غذای معمولی بدون نانوپلاستیک تغذیه شد. پس از پایان دوره ۱٤ روزه، سطح بیان نسبی ژن‌های SOD، CAT و HSP70 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بیانگر آن بود که نانوپلاستیک پلی‌استایرن منجر به القای بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی شد به‌نحوی‌که افزایش قابل‌توجهی در میزان ژن‌های SOD و CAT وجود داشت. هم‌چنین با افزایش غلظت پلی‌استایرن تا سطح ۸ درصد، روند افزایشی در سطح بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. در خصوص ژن HSP70 نیز نانوپلاستیک پلی‌استایرن اثر القایی داشت. روند مشاهده شده در سطح بیان ژن HSP70 با افزایش غلظت نانوپلاستیک نیز مشابه با ژن‌های آنتی‌اکسیدانی بود. با توجه به

نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان داشت که نانوپلاستیک می‌تواند باعث تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی و ایمنی گورخر ماهی شود.

استناد: شکوهیان، بهاره، کشیری، حدیثه، هدایتی، سید علی‌اکبر، صفری، رقیه (۱۴۰۳). القای بیان ژن‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی گورخری (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) در رویارویی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۳)، ۱۲-۱.

DOI: 10.22069/japu.2023.20945.1738

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

تولید پلاستیک‌ها از اوایل دهه ۱۹۰۰ شروع و میزان تولید و مصرف آن‌ها به سرعت رو به افزایش می‌باشد (۱) به‌نحوی‌که انتظار می رود بشر تا سال ۲۰۵۰، در مجموع ۲۶ میلیارد تن زباله پلاستیکی تولید کند که چهار برابر بیش‌تر از میزان کنونی آن است. بیش از ۶۰ درصد پلاستیک‌های ایجاد شده در محل‌های دفن زباله یا محیط طبیعی ریخته می‌شوند که سالانه ۸ میلیون تن زباله پلاستیکی وارد اقیانوس‌ها و دریاها می‌شود (۲). امروزه، آلودگی پلاستیک‌ها تبدیل به یک نگرانی جهانی شده است (۳، ٤). تعداد گونه‌های آسیب‌دیده توسط زباله در محیط‌های آبی بسیار نگران‌کننده می‌باشد به‌نحوی‌که بر اساس گزارش‌های موجود، رویارویی با آلودگی‌های پلاستیکی می‌تواند تأثیری جهانی بر بیش از ۸۰۰ گونه آبزی داشته باشد (۵). تجزیه پلاستیک‌ها باعث تولید ذرات در حد میکرو و نانو با ویژگی‌های متمایز می‌شود. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فردی هم‌چون اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالا، ارزیابی اثرات سمی نانوپلاستیک‌ها بر موجودات زنده و شناخت مکانیسم‌های ایجادکننده سمیت امری ضروری به‌نظر رسیده و این آلودگی به عنوان یک مشکل جهانی، توجه بسیاری از پژوهش‌گران را به خود جلب نموده است (٦، ۷).

برخی پژوهش‌های پیشین نشان داده که نانوپلاستیک‌ها می‌توانند روی تغذیه، رشد، پاسخ‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی آبزیان دریایی اثرگذار باشند (۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). در این خصوص، بسیاری از مطالعات بیانگر حضور گسترده نانو و میکروپلاستیک‌ها در محیط‌های آب شیرین می‌باشند (۱۳، ١٤، ۱۵، ١٦). تاکنون بیش از ۱۶۰ گونه دریایی و ۳۹ گونه آب شیرین این ذرات را بلعیده‌اند (۱۷، ۱۸). پژوهش‌های اخیر بیانگر سمیت نانوپلاستیک‌ها در موجودات آب شیرین از جمله جلبک سبز (۱۹)، زئوپلانکتون (۲۰) و ماهی (۲۱) بوده است. این در حالیست که هم‌چنان اطلاعات بسیار محدود و گمراه‌کننده‌ای در خصوص اثرات زیستی نانوپلاستیک‌ها روی آبزیان آب شیرین به ویژه در سطح مولکولی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به پژوهش‌های انجام شده توسط جیانگ و همکاران (۲۲)، چنگ و همکاران (۲۳)، فنگ و همکاران (٢٤) اشاره داشت.

در بین پلاستیک‌ها، نانوپلاستیک پلی‌استایرن بیش از ٦/۷ درصد از کل محصولات پلاستیکی را تشکیل داده و در بسیاری از محیط‌های آبی یافت می‌شود. بنابراین در پژوهش حاضر، به بررسی اثر نانوپلاستیک پلی‌استایرن بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در ماهی گورخری (*Danio rerio*) پرداخته شد که به‌عنوان یک سیستم مدل زیستی مناسب از مزایای متعددی جهت استفاده در مطالعات آزمایشگاهی مختلف هم‌چون زیست‌شناسی تکاملی (۲۵)، سم‌شناسی (۲٦) و مطالعات ژنتیک و سلول‌های بنیادی (۲۷) برخوردار است.

مواد و روش‌ها

نانوپلاستیک پلی‌استایرن: تمامی مراحل سنتز نانوپلاستیک در پژوهشگاه رنگ و رزین تهران صورت گرفت. استایرن به عنوان مونومر، پلی وینیل الکل (PVA) با جرم مولکولی ۱۲۸۰۰۰ گرم بر مول به عنوان تثبیت‌کننده و ماده رنگ‌زای رودامین بی از شرکت مرک آلمان و بنزوئیل پراکسید به عنوان آغازگر از شرکت آلفا آریزر (آمریکا) خریداری شدند. استایرن قبل از استفاده تقطیر شد و سایر مواد شیمیایی به همان صورت مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین در تمام آزمایش‌ها آب دیونیزه استفاده شد. ۳-۱ درصد وزنی آغازگر (بنزوئیل پراکسید)، ٤-۱ درصد وزنی تثبیت‌کننده (پلی وینیل الکل) انتخاب شد و

سرعت هم‌زدن ۷۵۰-۵۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پلیمریزاسیون در یک راکتور یک لیتری سه‌دهانه مجهز به قیف اضافه‌کننده (اضافه کردن قطره‌ای مونومر استایرن)، خنک‌کننده و دماسنج انجام شد. در ظرف واکنش ٤۰۰ میلی لیتر آب مقطر، آغازگر و تثبیت‌کننده اضافه شد و گاز نیتروژن به‌مدت ۲۰ دقیقه برای خارج کردن اکسیژن محلول از آن عبور داده شد. سپس دما را به ۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و همراه با هم‌زدن به‌تدریج در مدت نیم ساعت استایرن قطره‌قطره اضافه شد و واکنش پلیمریزاسیون به‌مدت ۸ ساعت ادامه یافت. تمامی این مراحل برای تهیه پلی‌استایرن قلورسنت با اضافه کردن رودامین بی به محلول آبی تکرار شد (۲۸).

***Danio rerio* و تیمارهای آزمایش:** تعداد ۹۰ قطعه ماهی گورخری در تیرماه سال ۱٤۰۱ از یک کارگاه خصوصی تهیه و به سالن آبزی‌پروری انتقال یافتند. پس از انتقال، به‌منظور سازگاری با شرایط جدید، ماهیان به‌مدت ۲۱ روز در آکواریوم‌های شیشه‌ای در محیط جدید نگهداری شدند. در این مدت، غذادهی روزی دو بار انجام شد. بقایای غذایی و مواد دفعی به‌طور روزانه از طریق سیفون کردن و جایگزینی ۵۰ درصد از آب هر آکواریوم با آب شهری کلرزدایی شده خارج شد. پس از آن ماهیان به‌طور تصادفی در غالب چهار تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد در آکواریوم‌های شیشه‌ای توزیع شدند (۷ نمونه و سه تکرار برای هر تیمار). طول مدت آزمایش نیز ۱٤ روز تعیین شد. امولسیون نانوپلاستیک روی غذا اسپری شد و از ژلاتین ۲ درصد نیز برای تثبیت آن روی غذا استفاده شد. سپس این غذا به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای محیط خشک و در ظرف استریل قرار داده شد. در این پژوهش تیمارهای زیر در نظر گرفته شد: گروه شاهد که شامل تغذیه ماهیان با غذای پایه بدون NP-PS بود و تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ٤ که به‌ترتیب با غذای حاوی ۱، ۲، ٤ و ۸ درصد NP-PS تغذیه شدند. پس از طی ۱٤ روز، ماهیان از طریق پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش شدند. پس از بیهوشی، سر و دم هر ماهی جدا و بدن آن در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل و در تانک ازت نگهداری شد. پس از آن نمونه‌ها تا زمان شروع آزمایش‌های مولکولی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

آزمایش‌های مولکولی: RNA کل از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه هموژن شده با کمک ازت مایع با استفاده از کیت بایوزول (Biozol-Bioflux-Bioer) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. هم‌چنین، نسبت جذب در طول موج ۲٦۰/۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانوفتومتر خوانش و بررسی شد. پس از آن RNAهای با کیفیت و کمیت مناسب انتخاب و سنتز cDNA با استفاده از کیت مخصوص (Fermentas) انجام گرفت. cDNAهای سنتز شده نیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ویژگی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های SOD، CAT و HSP70 در جدول ۱ آورده شده است. واکنش qPCR پس از بهینه‌سازی دما و مواد واکنش، در حجم نهایی ۲۰ مایکرولیتر با استفاده از پرایمرهای یاد شده و هم‌چنین پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین با استفاده از کیت سایبرگرین (Fermentas) انجام شد. جهت اطمینان از بهینه بودن شرایط، سری غلظت‌های ۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰ از نمونه‌های cDNA ترکیبی از تیمارهای مختلف تهیه و با پرایمرهای هدف و رفرنس در غالب سه تکرار تکثیر و منحنی استاندارد جهت تعیین کارایی و تکرارپذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد.

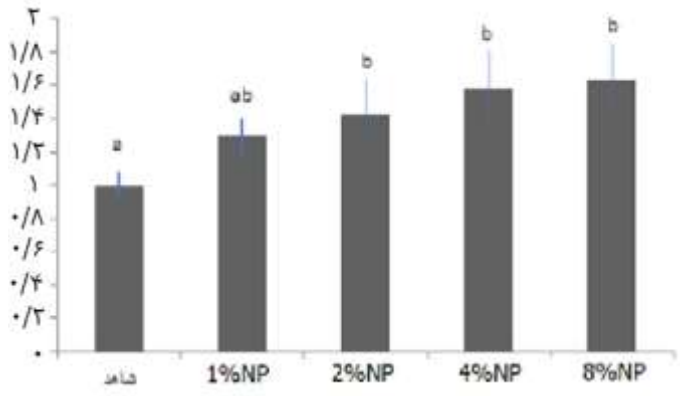
جدول ۱- ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر.

SOD q-PCRF SOD q-PCRR	GGGTGGCAATGAGGAAAG GCCCACATAGAAATGCACAG	58
HSP70 q-PCRF HSP70 q-PCRR	CAGGTGTTCGAGGGAGAAAG CTTGTCGTTGGTGATGGTGA	53
CAT q-PCRF CAT q-PCRR	GCATGTTGGAAAGACGACAC GTGGATGAAAGACGGAGACA	58
β- actin q-PCRF β- actin q-PCRR	AGCAGATGTGGATCAGCAAG TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	58

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های به‌دست آمده مربوط به بیان نسبی ژن‌های SOD، CAT و HSP70 پس از محاسبه با استفاده از فرمول ۲-ΔΔct (ΔΔCt برابر ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) جهت بررسی نرمالیتی از طریق آزمون کولوموگروف اسمیرنوف تست شدند. پس از آن، آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۵ درصد انجام شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. آنالیز داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام و نمودارها در فضای اکسل ۲۰۱۶ رسم شدند.

نتایج

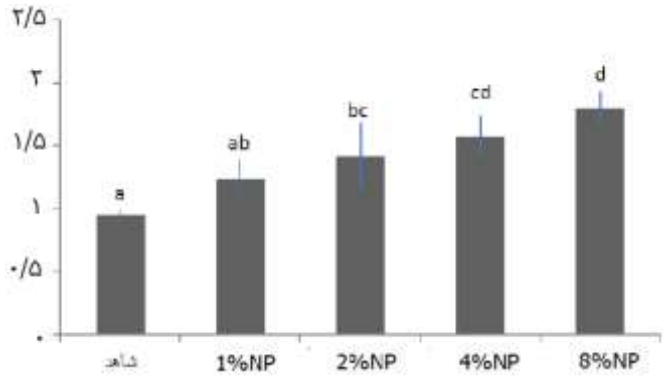
تغییرات بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز در ماهی *D. rerio* ناشی از رویارویی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که از شکل مشخص است، NP-PS منجر به القای بیان نسبی ژن SOD در ماهی گورخری شد به‌نحوی‌که بیان این ژن در تمامی تیمارهای مواجه شده با NP-PS بالاتر از تیمار شاهد بود. در مقایسه تیمارهای مختلف مورد بررسی، با افزایش غلظت نانوپلاستیک، روند افزایشی در بیان ژن SOD مشاهده شد. بالاترین سطح بیان مربوط به تیمار مواجهه یافته با ۸ درصد نانوپلاستیک بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت (P≤۰/۰۵) (شکل ۱).



شکل ۱- تغییرات بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در ماهی گورخری در رویارویی با نانوپلاستیک؛ تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ٤ به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های تغذیه شده با غذای حاوی ۱، ۲، ٤ و ۸ درصد نانوپلاستیک پلی‌استایرن.

حروف کوچک انگلیسی متفاوت در انتهای هر ستون نمودار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد.

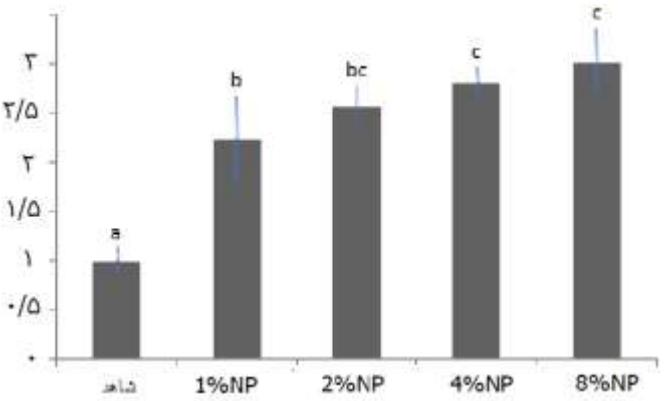
اثر غلظت‌های تحت کشنده نانوپلاستیک پلی استایرن بر بیان نسبی ژن CAT در شکل ۲ نشان داده شده است. بر این اساس، NP-PS باعث افزایش سطح بیان نسبی ژن CAT در ماهی گورخری شد. بیان این ژن آنتی‌اکسیدانی در تمامی تیمارهای مواجه شده با نانوپلاستیک در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. در این مورد، افزایش مشاهده شده در تمامی تیمارها به‌جز تیمار تغذیه شده با غذای حاوی نانوپلاستیک در سطح ۱ درصد، در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). روند افزایش در بیان ژن CAT با افزایش غلظت‌های مورد بررسی مشاهده شد به‌نحوی‌که غلظت ۸ درصد نانوپلاستیک اثر القایی بالاتری در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر داشت.



شکل ۲- تغییرات بیان ژن کاتالاز در ماهی گورخری در رویارویی با نانوپلاستیک؛ تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ٤ به ترتیب مربوط به نمونه‌های تغذیه شده با غذای حاوی ۱، ۲، ٤ و ۸ درصد نانوپلاستیک پلی‌استایرن.

حروف کوچک انگلیسی متفاوت در انتهای هر ستون نمودار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد.

تغییرات بیان نسبی ژن HSP70 در ماهی *D. rerio* در رویارویی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن در شکل ۳ نشان داده شده است. NP-PS در غلظت‌های تحت کشنده منجر به القای بیان نسبی ژن HSP70 نیز شد که این اثر القایی برای تمام تیمارهای مورد بررسی در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). روند تغییرات مشاهده شده مشابه با ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی بود طوری‌که با افزایش غلظت‌های مورد استفاده NP-PS، افزایش اثر القایی مشاهده شد و بالاترین و پایین‌ترین میزان بیان به ترتیب مربوط به تیمارهای ۱ و ۸ درصد نانوپلاستیک بود (شکل ۳).



شکل ۳- تغییرات بیان ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در ماهی گورخری در رویارویی با نانوپلاستیک؛ تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ٤ به ترتیب مربوط به نمونه‌های تغذیه شده با غذای حاوی ۱، ۲، ٤ و ۸ درصد نانوپلاستیک پلی‌استایرن.

حروف کوچک انگلیسی متفاوت در انتهای هر ستون نمودار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد.

بحث

نانو و میکروپلاستیک‌ها می‌توانند به راحتی توسط موجودات آبزی و خشکی‌زی بلعیده شده و در زنجیره غذایی وارد شوند (۲۹، ۳۰). در این خصوص، اثرات ناشی از آلودگی نانو و میکروپلاستیک‌ها بر ماهیان به دلیل نقش مهم آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی و هم‌چنین به عنوان منابع شیلاتی باارزش، از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۲، ۳۱). گزارش‌های پیشین بیانگر تجمع نانوپلاستیک‌ها در بدن ماهیان مواجه شده با این آلاینده‌ها بوده است (۳۲، ۳۳، ۳٤). برندت و همکاران (۳۵) بیان داشتند که نانوپلاستیک‌ها می‌توانند روی برخی ژن‌های هدف مرتبط با عملکرد ایمنی و استرس سلولی و هم‌چنین ترشح هورمون مرتبط با استرس اثرگذار باشند. در این ارتباط، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (دربرگیرنده گونه‌های رادیکال و غیر رادیکال اکسیژن) به عنوان مولکول‌های پیام‌دهنده و تحریک‌کننده آپوپتوز نرمال در سلول عمل می‌کند (۳٦) و مقادیر بالای آن باعث اختلال در تعادل ردوکس (اکسیداسیون و احیا) سلول و استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۷). SOD و CAT به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های اندوژن که قابلیت تبدیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) به متابولیت‌های غیرمضر را دارند به عنوان اولین گروه محافظتی در برابر رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند(۳۸). نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیانگر آن بود که نانوپلاستیک پلی‌استایرن منجر به القای بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی SOD در ماهی گورخری پس از ١٤ روز رویارویی با این آلاینده شد. در پژوهش صورت گرفته توسط باسوم (۳٤)، نیز افزایش سطح بیان ژن SOD در مواجهه با نانوپلاستیک پلی‌استایرن گزارش شده است. افزایش قابل‌توجه بیان ژن SOD در اثر نانوپلاستیک پیش‌تر نیز توسط لیو و همکاران (۳۹) در دافنی پولکس گزارش شده بود. در بررسی شدت اثرگذاری غلظت‌های مختلف نانوپلاستیک پلی‌استایرن، با افزایش غلظت NP-PS تا ۸ درصد، روند افزایشی در سطح بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی مشاهده شد که نشان از آسیب اکسیداتیو بیش‌تر در غلظت‌های بالاتر می‌باشد. این در حالیست که در پژوهشی توسط فنگ و همکاران (۲٤) بیان شد که با افزایش غلظت نانوپلاستیک در ابتدا SOD افزایش و پس از آن کاهش نشان داد. در این خصوص، شاید بتوان تفاوت در غلظت‌های مورد استفاده از نانوپلاستیک را به‌عنوان یک دلیل بالقوه برای تفاوت مشاهده شده بیان داشت. همان‌طور که به خوبی مشخص شده، SOD، O^{2-} را به H_2O_2 با سمیت کم‌تر تبدیل کرده و سپس این ماده توسط CAT به مواد بی‌ضرر تبدیل می‌شود (٤۰). بنابراین در این پژوهش سطح بیان نسبی ژن CAT نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان این ژن نیز هم‌چون SOD در رویارویی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن افزایش نشان داد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش در تطابق با یافته‌های لیو و همکاران (۳۹) و لی و همکاران (٤۱) بود که افزایش بیان ژن CAT را به‌ترتیب در *Daphnia pulex* و *Macrobrachium nipponense* در رویارویی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن را گزارش کرده بودند. در پژوهش حاضر، روند تغییرات بیان ژن CAT در غلظت‌های مختلف NP-PS کاملاً مشابه با روند مشاهده شده برای SOD بود. بیان بالای ژن CAT در این شرایط می‌تواند بیانگر افزایش ROS در بدن ماهی گورخری باشد که ممکن است فیزیولوژی موجود را تحت‌تأثیر قرار دهد (٤۲). تأثیرپذیری سیستم اکسیداتیو در سایر موجودات از جمله *Arenicola marina*، کلرلا و سندسموس، خرچنگ *Eriocheir sinensi* نیز گزارش شده است (٤۳، ٤٤، ٤٥).

علاوه بر دفاع سیستم آنتی‌اکسیدانی، پروتئین‌های خاصی در جهت سازگاری با آلودگی‌های محیطی و سایر عوامل استرس‌زا در بدن آبزیان سنتز می‌شود (۳۹). در این راستا، پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) نقش مهمی در پایداری ساختار پروتئینی داشته و اغلب به‌عنوان نشانگرهای مهمی برای آلودگی‌های زیست محیطی مطرح می‌باشند (٤٦). در پژوهش حاضر، سطح بیان ژن HSP70 در ماهی گورخری در رویارویی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن سنجیده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، NP-PS باعث افزایش قابل‌توجه سطح بیان نسبی ژن HSP70 در *D. rerio* در مقایسه با شاهد شد که نشان‌دهنده اثرگذاری نانوپلاستیک پلی‌استایرن بر ساختار پروتئینی ماهی گورخری و القای بیان HSP70 می‌باشد که در خنثی‌سازی دناتوره شدن پروتئین و جلوگیری از تخریب یا تجمع بیش‌تر آن نقش دارد (٤٧). اثر القایی نانوپلاستیک پلی‌استایرن بر بیان ژن پروتئین‌های شوک حرارتی پیش‌تر توسط لیو و همکاران (۳۹) در دافنی پولکس نیز گزارش شده بود. در پژوهش حاضر، در بررسی اثر غلظت‌های مختلف NP-PS، روند افزایشی با افزایش غلظت تا ۸ درصد در سطح بیان ژن HSP70 مشاهده شد. در این خصوص، لیو و همکاران (۳۹) نیز روند افزایشی بیان ژن HSP70 در دافنی را با افزایش غلظت نانوپلی‌استایرن از ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر گزارش نمودند. به هر حال، رونویسی، ترجمه و عملکرد HSPs فرایندهایی با صرف انرژی می‌باشد. بنابراین، رویارویی با شرایط استرس‌زا برای طولانی‌مدت می‌تواند روی رشد ماهی اثرگذار باشد.

نتیجه‌گیری کلی

اطلاعات محدودی در خصوص سمیت نانوپلاستیک‌ها در محیط‌های آبی وجود دارد که با توجه به افزایش رشد استفاده از این مواد در صنایع مختلف، نیاز مبرم به درک اثرات نانوپلاستیک‌ها به‌عنوان یک تهدید بالقوه بر محیط زیست می‌باشد. یافته‌های پژوهش حاضر بیانگر آن بود که نانوپلاستیک پلی‌استایرن می‌تواند اثر القایی قابل‌توجهی بر بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس در ماهی گورخری داشته باشد به نحوی‌که حتی با افزایش غلظت این نانوپلاستیک تا سطح ۸ درصد روند افزایشی در بیان ژن‌های SOD، CAT و HSP70 مشاهده شد. از آن‌جایی‌که آبزیان به‌طور معمول در معرض نانوپلاستیک‌ها و سایر آلاینده‌های محیط زیستی می‌باشند، پژوهش‌های بیش‌تر در خصوص اثرات نانوپلاستیک‌ها روی آبزیان مختلف برای درک خطرات اکولوژیکی در اکوسیتم‌های آبی ضروری به‌نظر می‌رسد.

منابع

1. Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*. 23, 2388e2392.
2. Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3, e1700782.
3. Lavers, J. L., & Bond, A. L. (2017). Exceptional and rapid accumulation of anthropogenic debris on one of the world's most remote and pristine islands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 114, 6052-6055.
4. Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte-Rose, B., Aitken, J., Marthouse, R., Hajbane, S., Cunsolo, S., Schwarz, A., Levivier, A., Noble, K., Debeljak, P., Maral, H., Schoeneich-Argent, R., Brambini, R., & Reisser, J. (2018). Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports*. 8, 4666.

5.Harding, S. (2016). Marine debris: understanding, preventing and mitigating the significant adverse impacts on marine and coastal biodiversity. Technical Serie, Secretariat of the Convention on Biological Diversity: Montreal, QC, Canada.
6.Hale, R. C., Seeley, M. E., La Guardia, M. J., Mai, L., & Zeng, E. Y. (2020). A global perspective on microplastics. *Journal of Geophysical Research*: *Oceans*. 125 (1), e2018JC014719.
7.Horton, A. A., & Barnes, D. K. A. (2020). Microplastic pollution in a rapidly changing world: Implications for remote and vulnerable marine ecosystems. *Science of the Total Environment*. 738, 140349.
8.Cole, M., & Galloway, T. S. (2015). Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific Oyster Larvae. *Environmental Science and Technology*. 49, 14625-14632.
9.Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., Canonico, B., & Corsi, I. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research*. 111, 34-40.
10.Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M.L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K.A., & Corsi, I. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicoly and Environmental Safety*. 123, 18-25.
11.Sjollema, S. B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H. A., Kraak, M. H. S., & Vethaak, A. D. (2016). Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? Aquatic Toxicology. 170, 259-261.
12.Manfra, L., Rotini, A., Bergami, E., Grassi, G., Faleri, C., & Corsi, I. (2017). Comparative ecotoxicity of polystyrene nanoparticles in natural seawater and reconstituted seawater using the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 145, 557-563.
13.Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., & Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*. 77, 177-182.
14.Free, C. M., Jensen, O. P., Mason, S. A., Eriksen, M., Williamson, N. J., & Boldgiv, B. (2014). High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Marine Pollution Bulletin*. 85, 156-163.
15.Peng, G., Xu, P., Zhu, B., Bai, M., & Li, D. (2018). Microplastics in freshwater river sediments in Shanghai, China: a case study of risk assessment in mega-cities. *Environmental Pollution*. 234, 448-445.
16.Su, L., Xue, Y., Li, L., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., & Shi, H. (2016). Microplastics in Taihu Lake, China. *Environmental Pollution*. 216, 711-719.
17.Lusher, A. (2015). Microplastics in the marine environment: Distribution, interactions and effects. In: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (eds). Marine Anthropogenic Litter. Springer, Cham, pp. 245-307.
18.Scherer, C., Weber, A., & Lambert, S. (2018). Interactions of microplastics with freshwater biota, In: Freshwater Microplastics. The Handbook of Environmental Chemistry, Wagner, M. and Lambert, S. (eds.). Springer, Cham.
19.Nolte, T. M., Hartmann, N. B., Kleijn, J. M., Garnæs, J., van de Meent, D., Jan Hendriks, A., & Baun, A. (2017). The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption. *Aquatic Toxicology*. 183, 11-20.
20.Rist, S., Baun, A., & Hartmann, N. B. (2017). Ingestion of micro-and nanoplastics in *Daphnia magna* e quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution*. 228, 398e407.

21. Mattsson, K., Ekvall, M. T., Hansson, A.L., Linse, S., Malmendal A., & Cedervall, T. (2015). Altered behaviour, Physiology and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environmental Science and Technology*. 49 (1), 553-561.
22. Jiang, Q., Chen, X., Jiang, H., Wang, M., Zhang, T., & Zhang, W. (2022). Effects of acute exposure to Polystyrene nanoplastics on the channel catfish larvae: insights from energy metabolism and transcriptomic Analysis. *Frontiers in Physiology*. 13, 923278.
23. Cheng, H., Dai, Y., Ruan, X., Duan, X., Zhang, C., Li, L., Huang, F., Shan, J., Liang, K., Jia, X., Wang, Q., & Zhao, H. (2022). Effects of nanoplastic exposure on the immunity and metabolism of red crayfish (*Cherax quadrinatus*) based on high-throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 245, 114114.
24. Feng, M., Luo, J., Wan, Y., Zhang, J., Lu, C., Wang, M., Dai, L., & Cao, X. (2022). Polystyrene nanoplastic exposure induces developmental toxicity by activating the oxidative stress response and base excision repair pathway in zebrafish (*Danio rerio*). *ACS Omega*. 7, 32153-32163.
25. Xiang, J., Yang, H., Che, C., Zou, H., Yang, H., Wei, Y., & Lin, S. (2009). Identifying tumor cell growth inhibitors by combinatorial chemistry and zebrafish assays. *PLoS ONE*. 4, 2.
26. Bugel, S. M., Tanguay, R. L., & Planchart, A. (2014). Zebrafish: A marvel of high-throughput biology for 21 (st) century toxicology. *Current Environmental Health Reports*. 1, 4.
27. Parichy, D. M. (2006). Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity*. 97, 3.
28. Sobhani, Z., Zhang, X., Gibson, C., Naidu, R., Megharaj, M., & Fang, C. (2020). Identification and visualisation of microplastics/nanoplastics by Raman imaging (i): Down to 100 nm. *Water research*. 174, 115658.
29. Jeong, J., & Choi, J. (2019). Adverse outcome pathways potentially related to hazard identification of microplastics based on toxicity mechanisms. *Chemosphere*. 231, 249-255.
30. Cheng, Y., Zhu, L., Song, W., Jiang, C., Li, B., Du, Z., Wang, J., Wang, J., Li, D., & Zhang, K. 2020. Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). *Science of the Total Environment*. 746, 141280.
31. Patra, I., Huy, D. T. N., Alsaikhan, F., Catalan, M. J., Tuan, P. V., Nurmatova, K. C., Majda, A., Shoukat, S., Yasin, G., Margiana, R., Walker, T. R., & Karbalaei, S. (2022). Toxic effects on enzymatic activity, gene expression and histopathological biomarkers in organisms exposed to microplastics and nanoplastics: a review. *Environmental Sciences Europe*. 34, 80.
32. Manabe, M., Tatarazako, N., & Kinoshita, M. (2011). Uptake, excretion and toxicity of nano-sized latex particles on medaka (*Oryzias latipes*) embryos and larvae. *Aquatic Toxicology*. 105 (3), 576-581.
33. Guerrera, M. C., Aragona, M., Porcino, C., Fazio, F., Laurà, R., Levanti, M., Montalbano, G., Germanà, G., Abbate, F., & Germanà, A. (2021). Micro and nano plastics distribution in fish as model organisms: histopathology, blood response and bioaccumulation in different organs. *Applied Sciences*. 11, 5768.
34. Busom, I. B. (2022). Short term effects of nanoparticles in fish. Doctoral Thesis. Institute of Biotechnology and Biomedicine. 240 p.
35. Brandts, I., Balasch, J., Tvarijonaviciute, A., Barreto, A., Martins, M., Tort, L., Oliveira, M., & Teles, M. (2019). The role of humic acids on the effects of nanoplastics in Fish. In Proceedings of the 2nd International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea. Capri, Italy. 164-169.
36. Zucker, B., Hanusch, J., & Bauer, G. (1997). Glutathione depletion in fibroblasts is the basis of apoptosis-induction by endogenous reactive oxygen species. *Cell Death and Differentiation*. 4, 388-395.

37. Sies, H. (1985). Oxidative stress: Introductory Remarks. 108 p.
38. Rangasamy, B., Hemalatha, D., Shobana, C., Nataraj, B., & Ramesh, M. (2018). Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. Chemosphere. 213, 423-433.
39. Liu, Z., Yu, P., Cai, M., Wu, D., Zhang, M., Huang, Y., & Zhao, Y. (2019). Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex*. *Chemosphere*. 215, 74-81.
40. Liu, Z., Jiao, Y., Chen, Q., Li, Y., Tian, J., Huang, Y., Cai, M., Wu, D., & Zhao, Y. (2020). Two sigma and two mu class genes of glutathione S-transferase in the waterflea *Daphnia pulex*: molecular characterization and transcriptional response to nanoplastic ex-posure. *Chemosphere*. 248, 126065.
41. Li, Y., Liu, Z., Li, M., Jiang, Q., Wu, D., Huang, Y., Jiao, Y., Zhang, M., & Zhao, Y. (2020). Effects of nanoplastics on antioxidant and immune enzyme activities and related gene expression in juvenile *Macrobrachium nipponense. Journal of Hazardous Materials*. 398, 122990.
42. Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research*. 66 (2), 121-127.
43. Bhattachrya, P., Lin, S., Turner, J. P., & Ke, P. C. (2010). Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry C*. 114, 16556-16561.
44. Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastics move pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and bio-diversity. *Current Biology*. 23, 2388-2392.
45. Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., & Zhao, Y., 2018. Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquatic Toxicology*. 28e36.
46. Rhee, J. S., Raisuddin, S., Lee, K. W., Seo, J. S., Ki, J. S., Kim, I. C., Park, H. G., & Lee, J. S. (2009). Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. Comparative Biochemistry and Physiology C: *Toxicology and Pharmacology*. 149, 104e112.
47. Kiang, J. G., & Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology and Therapeutics*. 80 (2), 183-201.