

(OPEN ACCESS)

Dietary Effects of Ivy (*Hedera helix*) Polyphenols on the Relative Expression of SOD and CAT Genes and Biochemical Parameters in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Polyethylene Nanoplastics

Farahnaz Kakavand¹, Roghieh Safari^{*2}, Seyed Hossein Hoseinifar³,
Seyed Aliakbar Hedayati⁴, Mohammad Reza Imanpour⁵, Marina Paolucci⁶

1. Ph.D. Student in Fisheries, Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: kakavand1393@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com
3. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hoseinifar@gau.ac.ir
4. Professor, Dept. of Aquatics Production and Exploitation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: marinebiology1@gmail.com
5. Professor, Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: imanpour@yahoo.com
6. Professor of Comparative Anatomy and Cytology, Dept. of Science and Technology, University of Sannio, Benevento, Italy. E-mail: paolucci@unisannio.it

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 01.28.2025
Revised: 02.03.2025
Accepted: 02.05.2025

Keywords:
Antioxidant,
Nanoplastic,
Polyphenol,
Zebrafish

ABSTRACT

Background and Objectives: This study aimed to investigate the protective effects of polyphenols extracted from ivy (*Hedera helix*) against the damages caused by nanoplastics in Zebrafish (*Danio rerio*).

Materials and Methods: Zebrafish fed with diets supplemented with polyphenols at levels of 0%, 0.5%, 1% and 2% for 8 weeks, exposed to a constant concentration of 1% polyethylene nanoplastics for 2 weeks. Samples were collected to assess biochemical parameters such as ALT, ALP, AST, CAT and SOD, as well as the relative expression of SOD and CAT genes.

Result: Results showed that the levels of ALT, ALP, AST, CAT and SOD and SOD and CAT gene expression decreased significantly ($P < 0.05$) with increasing polyphenol supplementation, exposed to nano plastic. This research suggests that ivy polyphenols can be a promising strategy to mitigate oxidative damage caused by nanoplastics and improve the health of aquatic organisms.

Cite this article: Kakavand, Farahnaz, Safari, Roghieh, Hoseinifar, Seyed Hossein, Hedayati, Seyed Aliakbar, Imanpour, Mohammad Reza, Paolucci, Marina. 2025. Dietary Effects of Ivy (*Hedera helix*) Polyphenols on the Relative Expression of SOD and CAT Genes and Biochemical Parameters in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Polyethylene Nanoplastics. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (3), 153-166.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2025.23249.1926

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثرات تغذیه‌ای پلی‌فنل گیاه پیچک (*Hedera helix*) بر بیان نسبی ژن‌های SOD و CAT و برخی پارامترهای بیوشیمیایی ماهی زبرا (*Danio rerio*) در مواجهه با نانوپلاستیک پلی‌اتیلن

فرحناز کاکاوند^۱، رقیه صفری^{۲*}، سید حسین حسینی^۳، سید علی اکبر هدایتی^۴،
محمدرضا ایمانپور^۵، مارینا پائولوچی^۶

۱. دانشجوی دکتری شیلات، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: kakavand1393@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com
۳. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hoseinifar@gu.ac.ir
۴. استاد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: marinebiology1@gmail.com
۵. استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: imanpour@yahoo.com
۶. استاد آناتومی و سیتولوژی تطبیقی، گروه علم و فناوری، دانشگاه سانیو، بنونتو، ایتالیا. رایانامه: paolucci@unisannio.it

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثرات پلی‌فنل استخراج‌شده از گیاه پیچک
مقاله کامل علمی- پژوهشی	(<i>Hedera helix</i>) در کاهش آسیب‌های ناشی از نانوپلاستیک‌ها در ماهی زبرا (<i>Danio rerio</i>) انجام شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۹	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵	مواد و روش‌ها: ماهیان زبرا که به مدت ۸ هفته با مکمل پلی‌فنل در سطوح صفر، ۰/۵، ۱ و ۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۷	درصد تغذیه شده بودند به مدت ۲ هفته در مواجهه با غلظت ۱ درصد نانوپلاستیک پلی‌اتیلن
واژه‌های کلیدی:	نگهداری و با جیره‌های مشابه تغذیه شدند. در پایان آزمایش نمونه‌برداری جهت بررسی
آنتی‌اکسیدان، پلی‌فنل،	شاخص‌های بیوشیمیایی سرم بدن (ALT، ALP، AST، CAT و SOD) و بیان نسبی ژن‌های
ماهی گورخری، نانوپلاستیک	آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) انجام شد.
	یافته‌ها: نتایج شاخص‌های بیوشیمیایی (ALT، ALP، AST، CAT و SOD) و بیان
	نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) کاهش معنی‌دار وابسته به دوز را نشان داد

($P < 0.05$). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پلی‌فنل‌های گیاه پیچک می‌توانند به‌عنوان یک ماده مؤثر در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از نانوپلاستیک‌ها و بهبود سلامت آبزیان عمل نمایند.

استناد: کاکوند، فرحناز، صفری، رقیه، حسینی‌فر، سید حسین، هدایتی، سید علی‌اکبر، ایمانپور، محمدرضا، پائولوچی، مارینا (۱۴۰۴). اثرات تغذیه‌ای پلی‌فنل گیاه پیچک (*Hedera helix*) بر بیان نسبی ژن‌های SOD و CAT و برخی پارامترهای بیوشیمیایی ماهی زبرا (*Danio rerio*) در مواجهه با نانوپلاستیک پلی‌اتیلن. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۳)، ۱۶۶-۱۵۳.

Doi: 10.22069/japu.2025.23249.1926



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

آلودگی نانوپلاستیکی، به‌عنوان یک چالش زیست‌محیطی نوظهور، اثرات مخربی بر اکوسیستم‌های آبی و سلامت آبزیان وارد کرده است (۱). نانوپلاستیک‌ها، با ابعاد کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر، به دلیل پایداری شیمیایی و فیزیکی بالا، به‌طور گسترده‌ای در محیط زیست منتشر شده و به‌راحتی وارد زنجیره غذایی می‌شوند (۲). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که این ذرات می‌توانند اختلالات فیزیولوژیک شدیدی از جمله اختلال در رشد، تکامل و عملکرد سیستم‌های فیزیولوژیکی ایجاد نمایند (۳، ۴، ۵ و ۶).

مواجهه با غلظت کم این آلاینده‌ها ممکن است در بدن اثرات مختلف ازجمله آسیب‌های بافتی، فیزیولوژیکی، تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی و درنهایت مرگ را موجب می‌شود که می‌توان از این تغییرات به‌عنوان نشانگرهای زیستی به‌منظور بررسی وجود آلاینده‌ها استفاده نمود (۷ و ۸). نشانگرهای زیستی بیوشیمیایی به غلظت‌های پایین محرک‌ها و آلاینده‌های محیطی حساس بوده و تغییرات احتمالی محیط را هشدار می‌دهند. در مطالعات پیشین اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان یکی از راه‌های ارزیابی اثرات آلاینده‌ها بوده است (۹). ارزیابی این آنزیم‌ها در سطح ژنتیکی و پروتئینی می‌تواند به درک بهتر اثرات فیزیولوژیکی و سلولی آلاینده‌ها در محیط کمک نماید. سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیدازها، از آنزیم‌های کلیدی در مسیر آنتی‌اکسیدانی، به‌عنوان اولین خطوط دفاعی در مقابل استرس‌های اکسیداتیو عمل می‌نمایند (۱۰).

استفاده از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مدیریتی جهت کنترل عوارض

ناشی از آلودگی‌های میکروپلاستیک در ماهیان مطرح باشد. پلی‌فنل‌ها، به‌عنوان ترکیبات زیست‌فعال طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، پتانسیل قابل‌توجهی در کاهش آسیب‌های ناشی از استرس‌های محیطی، از جمله آلودگی نانوپلاستیکی، نشان داده‌اند (۱۱). مطالعات نشان داده است که پلی‌فنل‌ها قادرند فرایندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی را تعدیل کرده و با تعدیل پاسخ‌های التهابی، به تقویت سیستم ایمنی و بهبود سلامت کلی آبزیان کمک کنند (۱۲ و ۱۳). گیاه پیچک (*Hedera helix*) به‌عنوان یک منبع غنی از پلی‌فنل‌ها، در طب سنتی کاربرد گسترده‌ای داشته و به‌دلیل خواص درمانی خود، می‌تواند به‌عنوان یک مکمل غذایی بالقوه در آبی‌پروری مطرح باشد (۱۴). پژوهش‌های پیشین کاهش سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز را در آبزیانی که با پلی‌فنل‌ها تغذیه شدند را تأیید می‌کنند (۱۵ و ۱۶). این تغییرات مثبت در شاخص‌های بیوشیمیایی، نشانگر بهبود سلامت و افزایش مقاومت در برابر اثرات مخرب نانوپلاستیک‌ها می‌باشند.

ماهی زبرا (*Danio rerio*) به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله شفافیت جنین، کوتاه بودن دوره رشد و شباهت‌های ژنتیکی به انسان، به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک ارگانیسم مدل در پژوهش‌های زیست‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سال‌های اخیر، این ماهی به‌عنوان یک ابزار ارزشمند برای بررسی اثرات سمی نانوپلاستیک‌ها بر سلامت آبزیان و به‌تبع آن اکوسیستم‌های آبی مطرح شده است (۱۷ و ۱۸). حساسیت بالای ماهی زبرا به تغییرات محیطی، امکان انجام مطالعات رفتاری و فیزیولوژیکی دقیق را فراهم و آن را به یک مدل مناسب برای

۲۰ درصد حجم آب در هر تکرار سیفون و با آب تازه بدون کلر تعویض می‌گردید. در دو هفته آخر آزمایش جهت کنترل غلظت نانوپلاستیک در زمان تعویض آب، از مخزن نگهداری آب حاوی ۱ درصد نانوپلاستیک استفاده شد.

نمونه‌برداری: در پایان آزمایش نمونه‌برداری از ماهی‌ها پس از بیهوشی توسط پودر گل میخک (۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد. ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی قطع گردید. جهت استخراج عصاره بدن ماهی‌ها پس از صید و حذف آب اضافی در کرایوتیوب‌های استریل قرار گرفتند و بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور شدند. سپس با ازت کوبیده و نمونه‌های هموژن شده با بافر فسفات مخلوط و با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سوپرناتانت به عنوان عصاره کل بدن تا زمان سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت انجام مطالعات ژنتیکی و بررسی بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی نمونه‌برداری از کبد انجام شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- قرار گرفتند (۲۴).

ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی: اندازه‌گیری آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در عصاره کل بدن با استفاده از کیت تجاری دلتا درمان (تهران) (۲۵) و جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در عصاره کل بدن نیز از کیت تجاری نوند سلامت (ارومیه، پارک علم و فناوری آذربایجان غربی) مطابق با دستورالعمل ارائه شده از طرف شرکت سازنده انجام شد (۲۶).

ارزیابی آسیب‌های ناشی از آلودگی‌های محیطی تبدیل کرده است (۱۹ و ۲۰). با توجه به عدم وجود اطلاعات کافی در زمینه تأثیر پلی‌فنل استخراج شده از گیاه پیچک بر آبزیان، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر پلی‌فنل‌های گیاه پیچک در معرض نانوپلاستیک پلی‌اتیلن بر تغییرات بیوشیمیایی سرم ماهی زبرا و بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جهت انجام مطالعه حاضر، تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی زبرا (*D. rerio*) با میانگین وزن 50 ± 200 میلی‌گرم از شرکت گرگان ماهی تهیه و به مدت ۲ هفته جهت سازگاری پرورش داده شدند. برای آماده‌سازی خوراک، پلی‌فنل گیاه پیچک از شرکت Sri Estratti Pianta Officinali ایتالیا خریداری شد و چهار سطح صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد پس از مخلوط شدن با محلول ژلاتین ۲ درصد روی خوراک بیومار تجاری موجود در بازار اسپری شد (۲۱). جیره‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت جهت خشک شدن در دمای محیط قرار گرفتند و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ماهیان به مدت ۸ هفته با غذاهای آماده شده تغذیه و سپس به مدت ۲ هفته در معرض نانو پلاستیک پلی‌اتیلن تهیه شده از شرکت آریا پلیمر پیشگاه (اصفهان) قرار گرفتند (۲۲ و ۲۳). در طول دوره آزمایش ۱۰ هفته‌ای، ماهی‌های مربوط به هر تکرار در آکواریوم‌های ۴۰ لیتری با شرایط کنترل‌شده نگهداری شدند و هوادهی به شکل مداوم انجام گرفت و میانگین دما (25 ± 1 درجه سانتی‌گراد) و pH (در حدود ۷/۵) ثابت نگه داشته شد. به منظور حفظ کیفیت آب، روزانه

ساخت شرکت GENETBIO (کره) مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. سپس فرآیند Real-Time PCR پس از تنظیم دما و مواد مصرفی با استفاده از آغازگرهای ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) (جدول ۱) به همراه آغازگر ژن مرجع بتا اکتین (β -actin) توسط کیت Ampliqon SYBR green Master Mix (کره) انجام شد (۲۷).

بررسی بیان ژن: جهت بررسی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) از نمونه بافت‌های کبد هموزن شده جهت استخراج RNA استفاده شد [۲۲]. استخراج RNA با کمک کیت استخراج RNX plus طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد و بیوفتومتری بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Reverse Transcriptase

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان نسبی ژن‌های در ماهی زبرا.

Table 1. Characteristics of used primers in study of gene expression in zebrafish.

پرایمر Primer	توالی Sequence	دما Temperature	کارایی پرایمر Primer efficiency	شماره دسترسی Accession number
SOD q-PCR SOD q-PCR	GGGTGGCAATGAGGAAAG GCCACATAGAAATGCACAG	59	95%	BC055516.1
CAT q-PCR CAT q-PCR	GCGTGTGGGAAAGACGACAC GTGGATGAAAGACGGAGACA	59	95%	AJ007505.1
B- actin q-PCR B- actin q-PCR	AGCAGATGTGGATCAGCAAG TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	59	95%	NM131031.1

نتایج

میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP: قرار گرفتن ماهی زبرا برای تغذیه شده با مکمل پلی‌فنیل گیاه پیچک در معرض غلظت ۱ درصد نانوپلاستیک پلی‌اتیلن کاهش معنی دار وابسته به دوز آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP را نشان داد. همه آنزیم‌های کبدی در تیمارهای مورد بررسی روند وابسته به دوزی را نشان ندادند. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان این آنزیم‌ها در گروه کنترل و کم‌ترین سطح در گروه تغذیه شده با ۲ درصد پلی‌فنل مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای تحلیل داده‌های به‌دست آمده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۶) استفاده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) بررسی شدند. مقایسه میانگین‌های گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد. از آزمون دانکن (Duncan) برای شناسایی تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها استفاده شد و داده‌های نهایی در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد گزارش گردید ($P < 0.05$). همچنین آنالیز داده‌های به‌دست آمده از بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد.

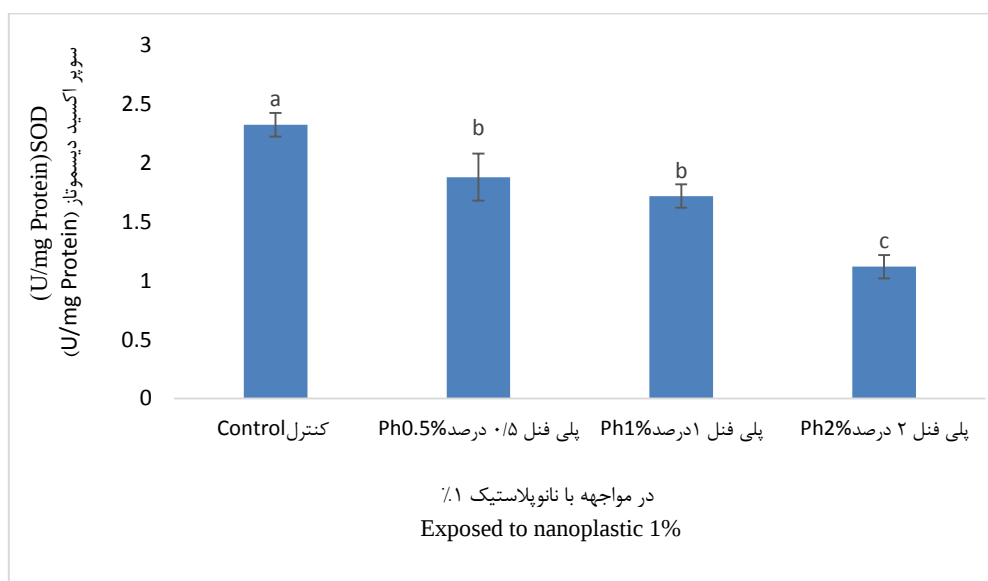
جدول ۲- میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در ماهیان زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل پلی فنلی در معرض غلظت ۱ درصد آلاینده نانوپلاستیک پلی اتیلن). حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح میانگین داده‌ها می‌باشند. داده به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند.

Table 2. The activity levels of enzymes-alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP)-in zebra fish fed with different levels of polyphenol supplement exposed to 1% concentration of polyethylene nanoplastic pollutant.
Different letters in each row indicate a significant difference in the mean levels.
Data are reported as mean $\pm$ standard deviation.

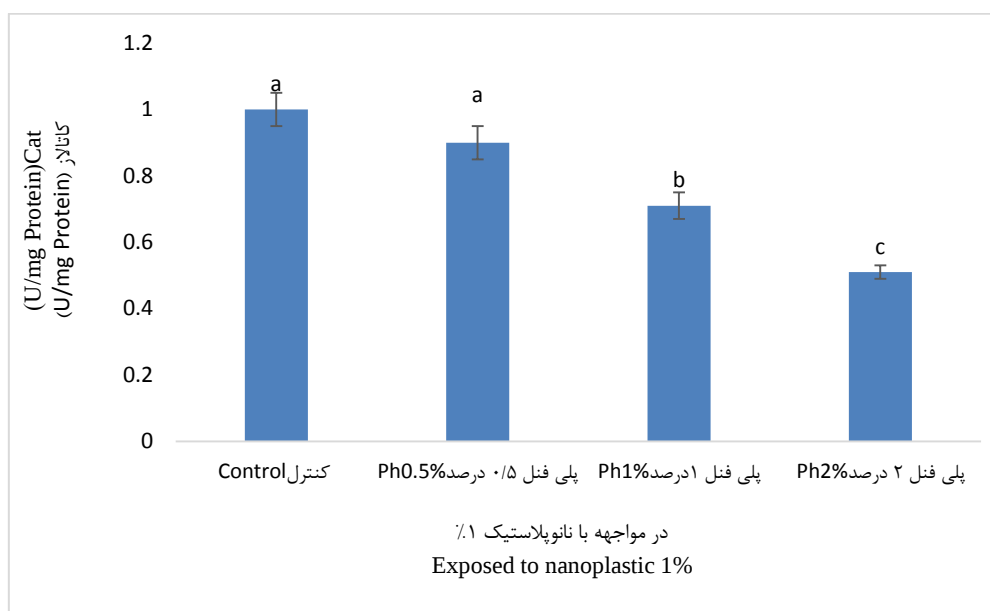
پلی فنل ۲ درصد Polyphenol 2%	پلی فنل ۱ درصد Polyphenol 1%	پلی فنل ۰/۵ درصد Polyphenol 0.5%	کنترل Control	
13.5 $\pm$ 0.5 ^d	18.5 $\pm$ 0.7 ^c	22.1 $\pm$ 1.2 ^b	24.5 $\pm$ 0.5 ^a	آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) (U/L)
110 $\pm$ 15 ^d	140 $\pm$ 18.3 ^c	190 $\pm$ 21.5 ^b	250 $\pm$ 10 ^a	آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) (U/L)
49.75 $\pm$ 2 ^d	55.5 $\pm$ 1.5 ^c	60.3 $\pm$ 2.5 ^b	70.5 $\pm$ 3.5 ^a	آلکالین فسفاتاز (ALP) (U/L)

تیمار تغذیه شده با ۰/۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار نبوده ($P>0/05$) ولی بین این تیمارها با تیمار ۲ درصد اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P<0/05$). در میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز اختلاف بین تیمار تغذیه شده با ۰/۵ درصد و کنترل معنی‌دار نبوده ($P>0/05$) ولی بین این تیمارها با تیمار ۲ درصد و ۱ درصد اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P<0/05$).

میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی SOD و CAT: سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان این آنزیم‌ها در تیمارهای تغذیه شده با مکمل پلی فنولی نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی داری نشان داد ($P<0/05$). در میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز اختلاف بین



A



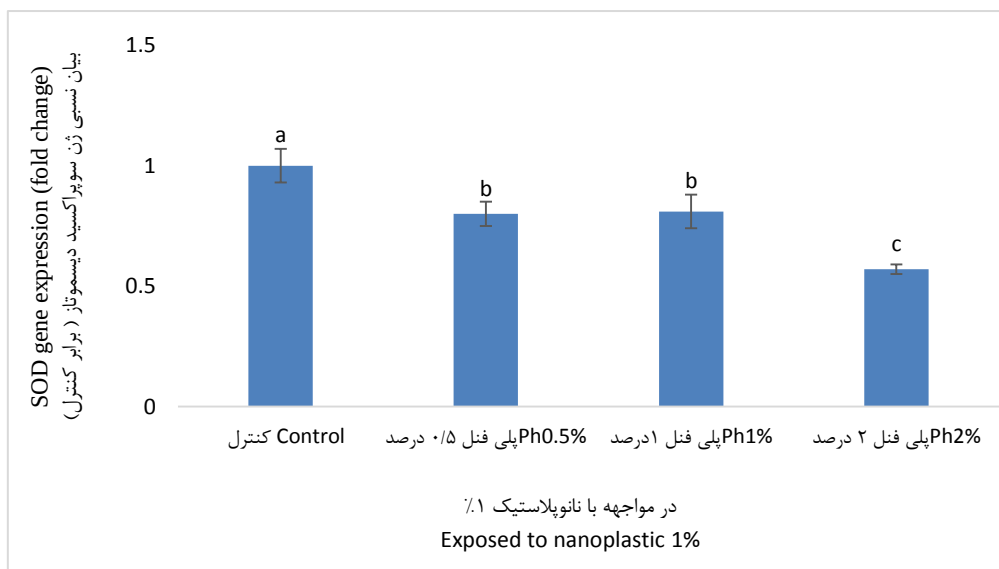
B

شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (A) و کاتالاز (CAT) (B) در ماهیان زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل پلی فنل در معرض غلظت ۱ درصد آلاینده نانوپلاستیک پلی اتیلن). حروف متفاوت روی نمودارها نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح میانگین داده‌ها می‌باشند. داده به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند.

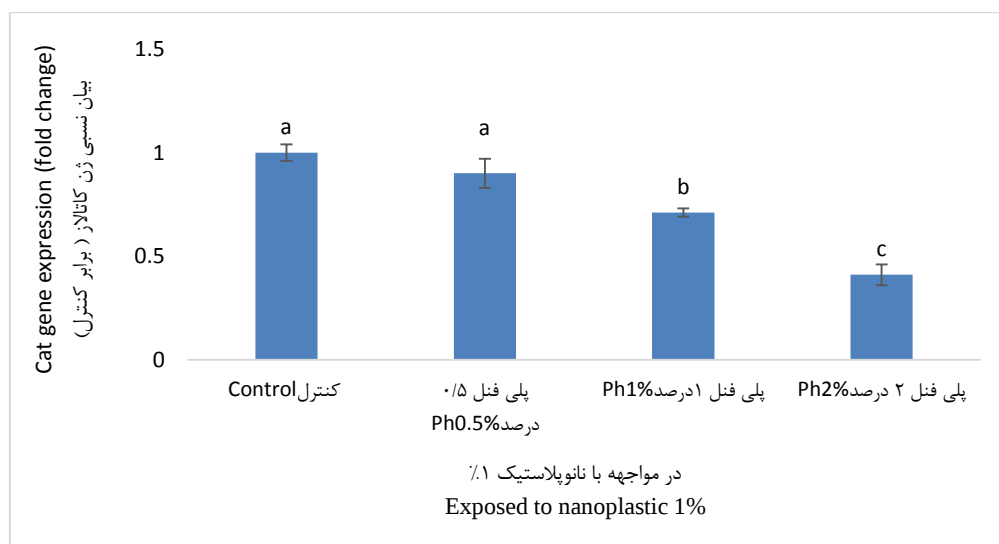
Figure 1. The activity levels of superoxide dismutase (SOD) (A) and catalase (CAT) (B) enzymes in zebra fish fed with different levels of polyphenol supplement exposed to 1% concentration of polyethylene nanoplastic pollutant. Different letters on the graphs indicate a significant difference in the mean levels. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation.

آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه کاهش معنی‌دار بیان را در تیمارهای تغذیه‌شده با سطوح مختلف مکمل پلی‌فنلی نشان داد ($P < 0.05$). این روند کاهشی بین تیمارهای مختلف نیز معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

سنجش بیان نسبی ژن SOD و CAT: شکل ۲ تغییرات میزان بیان ژن‌های SOD و CAT را در ماهیان تغذیه‌شده با سطوح مختلف مکمل پلی‌فنل در مواجهه با غلظت ثابت ۱ درصد آلاینده نانوپلاستیک پلی‌اتیلن نشان می‌دهد. میزان بیان هر دو ژن



A



B

شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (A) و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (B) در ماهیان زیر تغذیه‌شده با سطوح مختلف مکمل پلی‌فنل در معرض غلظت ۱ درصد آلاینده نانوپلاستیک پلی‌اتیلن). حروف متفاوت روی نمودارها نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح میانگین داده‌ها می‌باشند. داده به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند.

Figure 2. Superoxide dismutase (SOD) (A) and catalase (CAT) (B) enzymes gene expression in zebra fish fed with different levels of polyphenol supplement exposed to 1% concentration of polyethylene nanoplastic pollutant. Different letters on the graphs indicate a significant difference in the mean levels. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation.

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش زباله‌های پلاستیکی، میکروپلاستیک‌ها، نانوپلاستیک‌ها و تأثیر زیست‌محیطی آن برای دانشمندان نگرانی عمده‌ای بوده است. این ترکیبات ممکن است در نهایت از طریق رواناب سطحی وارد اکوسیستم‌های آبی شوند. تجمع این ذرات پلاستیکی در محیط‌های آبی تهدیدی بالقوه برای آبزیان و تعادل اکولوژیکی محسوب می‌شود. قرار گرفتن در معرض میکرو و نانوپلاستیک‌ها می‌تواند منجر به اختلالات قابل توجهی از جمله آسیب بافتی، التهاب، استرس اکسیداتیو، اختلال در سیگنالینگ سلولی و فرآیندهای بیوشیمیایی سلولی، سرکوب سیستم ایمنی، آسیب ژنتیکی و کاهش نرخ رشد و تولیدمثل در جانوران شود (۲۲). مطالعه محمدزاده و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد قرارگرفتن ماهی زبرا در معرض نانوپلاستیک منجر به افزایش معنی‌دار سطح گلوکز و کورتیزول در مقایسه با گروه شاهد می‌گردد (۲۳). هم‌چنین افزایش معنی‌داری در سطوح AST، ALT و ALP در ماهی زبرا تحت مواجهه با نانوپلاستیک مشاهده شد. این تغییرات در سطح گلوکز، کورتیزول و فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP می‌تواند بیانگر آسیب‌های وارد شده به بافت‌های مختلف ماهی در نتیجه استرس اکسیداتیو باشد. گزارش لی و همکاران (۲۰۲۳) نشان داد قرار گرفتن ماهی‌های *Pseudobagrus fulvidraco* در معرض میکروپلاستیک‌های پلی‌اتیلنی منجر به تجمع قابل توجهی به ترتیب در بافت‌های روده، آبشش و کبد شد. بررسی پلاسما نشان داد قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک‌های پلی‌اتیلنی منجر به افزایش سطح گلوکز، کلسترول، AST، ALT و ALP می‌گردد. هم‌چنین سطح پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GST با قرار گرفتن ماهی‌ها در معرض میکروپلاستیک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۲۸).

پلی‌فنول‌ها ترکیبات گیاهی با فعالیت‌های بیولوژیکی شناخته شده و مزایای بالقوه سلامتی هستند. مطالعات متعددی در رابطه با تأثیرات ترکیبات پلی‌فنولی مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و لیگنان‌ها بر عملکرد رشد و سلامت آبزیان وجود دارند. مکمل پلی‌فنل مستخرج از چوب شاه‌بلوط تأثیر معنی‌داری بر افزایش فعالیت آنزیم‌های لیروزیم در موکوس فیل‌ماهی جوان (*Huso huso*) نشان داد. با این حال فعالیت آنزیمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در سرم خون فیل‌ماهی‌های تغذیه شده با پلی‌فنل نشان‌دهنده تغییرات معنادار نبود (۲۹). سطح فعالیت CAT، گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و گلوکاتایون اس ترانسفراز (GST) در بچه‌ماهی‌های سی‌باس آسیایی (*Lates Calcarifer*) تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی مخلوط پلی‌فنل‌های تجاری در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد افزایش یافت. به دنبال آن، کاهش معنی‌داری در سطح MDA در کبد ماهی‌های تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی مخلوط پلی‌فنل‌های تجاری مشاهده شد (۳۰). تغذیه ماهی زبرا با عصاره برگ *Vitis vinifera* به‌طور معنی‌داری فعالیت‌های CAT، SOD و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد. هم‌چنین در ماهی‌های تغذیه شده با عصاره برگ *V. vinifera* کاهش معنی‌داری در محتوای MDA مشاهده شد. بیان ژن‌های CAT و SOD در ماهی‌های تغذیه شده با عصاره برگ *V. vinifera* به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد بیش‌تر بود که در پی آن افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD در موکوس مشاهده شد (۳۱). افزودن پلی‌فنول‌های استخراج شده از گیاه چای به جیره غذایی ماهی تیلپیا منجر به افزایش سطح فعالیت اسید فسفاتاز سرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سرم به شکل وابسته به دوز شد. هم‌چنین بیان ژن‌های SOD

رونویسی سپس به نواحی پروموتور ژن‌های CAT و SOD متصل شده و رونویسی آن‌ها را با کمک مسیرهای MAPK و Nrf2 کنترل می‌کنند (۳۷ و ۳۸). همچنین پلی‌فنل‌ها ممکن است با کاهش متیلاسیون DNA در نواحی پروموتور ژن‌های CAT و SOD، دسترسی عوامل رونویسی به DNA را کاهش دهند (۳۶).

پلی‌فنل‌های استخراج‌شده از گیاه پیچک (*H. helix*) اثرات محافظتی قابل‌توجهی بر سلامت ماهی زبرا (*D. rerio*) دارند. پلی‌فنل‌ها می‌توانند اثرات مضر نانوپلاستیک‌ها بر سلامت ماهی‌ها را تعدیل کنند. با این حال، تعامل بین پلی‌فنل‌ها و نانوپلاستیک‌ها پیچیده بوده و ممکن است به عوامل مختلفی از جمله نوع پلی‌فنل، نوع نانوپلاستیک و غلظت آن‌ها بستگی داشته باشد. پلی‌فنول‌های طبیعی می‌توانند به عنوان جایگزین‌های نسبتاً ایمن و قابل‌دوام برای ترکیبات شیمیایی مصنوعی در نظر گرفته شوند که نه تنها وضعیت سلامت ماهی را بهبود می‌بخشند، بلکه کیفیت ماهی، بهره‌وری و ایمنی غذایی مصرف‌کنندگان را نیز افزایش می‌دهند. با این حال، برای درک کامل مکانیسم‌های مولکولی و بهینه‌سازی استفاده از پلی‌فنل‌ها در مدیریت آلودگی‌های آبی، نیاز به انجام مطالعات بیشتر می‌باشد.

GST در نتیجه مصرف پلی‌فنول‌های گیاه چای در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (۳۲).

مطالعه حاضر کاهش میزان آنزیم‌های کبدی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سطح پروتئینی و ژنتیکی را در ماهیان تغذیه شده با پلی‌فنل در مواجهه با نانوپلاستیک پلی‌اتیلن نشان داد. نانوپلاستیک‌ها می‌توانند با فعال کردن گیرنده‌های سطح سلولی یا نفوذ به داخل سلول، مسیرهای سیگنالینگ مختلفی را فعال کنند که منجر به افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۳۹). کاهش سطوح آنزیم‌های مذکور در ماهیان تغذیه‌شده با پلی‌فنل نشان‌دهنده اثرات محافظتی پلی‌فنل‌ها در کاهش استرس اکسیداتیو، از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد و التهاب کبدی است (۳۲ و ۳۳). آنزیم SOD مهم‌ترین و اولین آنزیم آنتی‌اکسیدانی در تمام ارگانیسم‌های هوازی شناخته می‌شود. این آنزیم، تبدیل رادیکال سوپراکسید تولید شده در سلول به مولکول اکسیژن و H_2O_2 کاتالیزه و تسهیل می‌کند. در مرحله بعد H_2O_2 توسط آنزیم CAT به اکسیژن و آب تجزیه می‌شود (۳۴ و ۳۵). ارتباط پیچیده‌ای بین غلظت پلی‌فنل‌ها و پاسخ‌های بیوشیمیایی می‌تواند ناشی از تأثیر پلی‌فنل‌ها بر مسیرهای متابولیکی و واکنش‌های آنزیمی مختلف باشد (۱۳ و ۳۰). پلی‌فنل‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم به عوامل رونویسی خاصی متصل شوند. این عوامل

منابع

1. Kumar, M., Chen, H., Sarsaiya, S., Qin, S., Liu, H., Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2021). Current research trends on micro-and nano-plastics as an emerging threat to global environment: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124967.
2. Gonçalves, J. M., & Bebianno, M. J. (2021). Nanoplastics impact on marine biota: A review. *Environmental Pollution*, 273, 116426.
3. Anwaruzzaman, M., Haque, M. I., Sajol, M. N. I., Habib, M. L., Hasan, M. M., & Kamruzzaman, M. (2022). Micro and nanoplastic toxicity on aquatic life: fate, effect and remediation strategy. In *Biodegradation and Detoxification of Micropollutants in Industrial Wastewater* (pp. 145-176). Elsevier.
4. Han, Y., Lian, F., Xiao, Z., Gu, S., Cao, X., Wang, Z., & Xing, B. (2022). Potential toxicity of nanoplastics to fish

- and aquatic invertebrates: Current understanding, mechanistic interpretation, and meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 427, 127870.
5. Benson, N. U., Agboola, O. D., Fred-Ahmadu, O. H., De-la-Torre, G. E., Oluwalana, A., & Williams, A. B. (2022). Micro (nano) plastics prevalence, food web interactions, and toxicity assessment in aquatic organisms: a review. *Frontiers in Marine Science*, 9, 851281.
6. Shi, C., Liu, Z., Yu, B., Zhang, Y., Yang, H., Han, Y., & Zhang, H. (2024). Emergence of nanoplastics in the aquatic environment and possible impacts on aquatic organisms. *Science of the Total Environment*, 906, 167404.
7. Oner, M., Atli, G., & Canli, M. 2008. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(2): 306-366.
8. Banaee, M., Mehrpak, M., Nematdoost Haghi, B., & Noori, A. 2015. Amelioration of cadmium-induced changes in biochemical parameters of the muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*) by Vitamin C and Chitosan. *International Journal of Aquatic Biology*. 2(6), 362-371.
9. Jo, P. G., Choi, Y. K., & Choi, Ch. Y. (2008). Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 147, 460-469.
10. Woo, S., Yum, S., Kim, D. W., & Park, H. S. 2009. Transcripts level responses in a marine medaka (*Oryzias javanicus*) exposed to organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*. 149, 427-432.
11. Sim, H. H., Shiwakoti, S., Lee, J. H., Lee, I. Y., Ok, Y., Lim, H. K., & Oak, M. H. (2024). 2, 7-Phloroglucinol-6, 6'-bieckol from *Ecklonia cava* ameliorates nanoplastics-induced premature endothelial senescence and dysfunction. *Science of the Total Environment*, 949, 175007.
12. Shokry, A., El-Shiekh, R., Kamel, G., & Ramadan, A. (2022). Phytochemical contents, biological activities and therapeutic applications of *hedera helix* (ivy leaf) extracts: a review. *The Natural Products Journal*, 12(4), 22-32.
13. Ahmadifar, E., Yousefi, M., Karimi, M., Fadaei Raieni, R., Dadar, M., Yilmaz, S., & Abdel-Latif, H. M. (2021). Benefits of dietary polyphenols and polyphenol-rich additives to aquatic animal health: an overview. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(4), 478-511.
14. Imperatore, R., Orso, G., Facchiano, S., Scarano, P., Hoseinifar, S. H., Ashouri, G., & Paolucci, M. (2023). Anti-inflammatory and immunostimulant effect of different timing-related administration of dietary polyphenols on intestinal inflammation in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 563, 738878.
15. Yang, G., Yu, R., Geng, S., Xiong, L., Yan, Q., Kumar, V., & Peng, M. (2021). Apple polyphenols modulates the antioxidant defense response and attenuates inflammatory response concurrent with hepatoprotective effect on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed low fish meal diet. *Aquaculture*, 534, 736284.
16. Bhat, R. A. H., Sidiq, M. J., & Altinok, I. (2024). Impact of microplastics and nanoplastics on fish health and reproduction. *Aquaculture*, 741037.
17. Chen, J., Lu, C., Xie, W., Cao, X., Zhang, J., Luo, J., & Li, J. (2024). Exposure to Nanoplastics Cause Caudal Vein Plexus Damage and Hematopoietic Dysfunction by Oxidative Stress Response in Zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Nanomedicine*, 13789-13803.
18. Sankar, S., Chandrasekaran, N., Moovendhan, M., & Parvathi, V. D. (2025). Zebrafish and *Drosophila* as Model Systems for Studying the Impact of Microplastics and Nanoplastics-A Systematic Review. *Environmental Quality Management*, 34(3), e70021.

19. Crouzier, L., Richard, E. M., Sourbron, J., Lagae, L., Maurice, T., & Delprat, B. (2021). Use of zebrafish models to boost research in rare genetic diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13356.
20. Angom, R. S., & Nakka, N. M. R. (2024). Zebrafish as a Model for Cardiovascular and Metabolic Disease: The Future of Precision Medicine. *Biomedicines*, 12(3), 693.
21. Jahazi, M. A., Hoseinifar, S. H., Jafari, V., Hajimoradloo, A., Van Doan, H., & Paolucci, M. (2020). Dietary supplementation of polyphenols positively affects the innate immune response, oxidative status, and growth performance of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*, 517, 734709.
22. Banaee, M., Multisanti, C. R., Impellitteri, F., Piccione, G., & Faggio, C. (2024). Environmental toxicology of microplastic particles on fish: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 110042.
23. Mohammadzadeh, S., Zaretabar, A., Ahmadifar, E., Khajeh, M., Moghadam, M. S., & Milla, S. (2024). Polystyrene nanoplastics disrupt hepatic vitellogenin metabolism and impairs the reproduction process in female zebrafish. *Annals of Animal Science*.
24. Zargari, A., Nejatian, M., Abbaszadeh, S., Jahanbin, K., Bagheri, T., Hedayati, A., & Sheykhi, M. (2023). Modulation of toxicity effects of CuSO₄ by sulfated polysaccharides extracted from brown algae (*Sargassum tenerrimum*) in *Danio rerio* as a model. *Scientific Reports*, 13(1), 11429.
25. Rastiannasab, A., Afsharmanesh, S., Rahimi, R., & Sharifian, I. (2016). Alternations in the liver enzymatic activity of Common carp, *Cyprinus carpio* in response to parasites, *Dactylogyrus* spp. and *Gyrodactylus* spp. *Journal of Parasitic Diseases*, 40, 1146-1149.
26. Batista, M. T. O., Rodrigues Junior, E., Feijó-Oliveira, M., Ribeiro, A. C., Rodrigues, E., Suda, C. N. K., & Vani, G. S. (2014). Tissue levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in fish *Astyanax bimaculatus* from the Una River Basin. *Revista Ambiente & Água*, 9, 621-631.
27. Safari, R., Hoseinifar, S. H., & Kavandi, M. (2016). Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 1733-1739.
28. Lee, J. H., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2023). Toxic effects of microplastic (Polyethylene) on fish: Accumulation, hematological parameters and antioxidant responses in Korean Bullhead, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Science of the Total Environment*, 877, 162874.
29. Safari, R., Hoseinifar, S. H., Imanpour, M. R., Mazandarani, M., Sanchouli, H., & Paolucci, M. (2020). Effects of dietary polyphenols on mucosal and humoral immune responses, antioxidant defense and growth gene expression in beluga sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture*, 528, 735494.
30. Ahmadi, A., Bagheri, D., Hoseinifar, S. H., Morshedi, V., & Paolucci, M. (2022). Beneficial role of polyphenols as feed additives on growth performances, immune response and antioxidant status of Lates Calcarifer (Bloch, 1790) juveniles. *Aquaculture*, 552, 737955.
31. Hoseinifar, S. H., Fazelan, Z., El-Haroun, E., Yousefi, M., Yazici, M., Van Doan, H., & Paolucci, M. (2023). The effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on growth performance, antioxidant status, and immunity of zebrafish (*Danio rerio*). *Fishes*, 8(6), 326.
32. Qian, Y. C., Wang, X., Ren, J., Wang, J., Limbu, S. M., Li, R. X., & Du, Z. Y. (2021). Different effects of two dietary levels of tea polyphenols on the lipid deposition, immunity and antioxidant capacity of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed a high-fat diet. *Aquaculture*, 542, 736896.

33. Ahmadifar, E., Yousefi, M., Karimi, M., Raieni, R. F., Dadar, M., Yilmaz, S., Dawood, M. A., & Abdel-Latif, H. M. (2020). Benefits of Dietary Polyphenols and Polyphenol-Rich Additives to Aquatic Animal Health: An Overview. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29, 478-511.
34. Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
35. Pan, S., Yan, X., Li, T., Suo, X., Liu, H., Tan, B., & Dong, X. (2022). Impacts of tea polyphenols on growth, antioxidant capacity and immunity in juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂) fed high-lipid diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 128, 348-359.
36. Yang, H., Ju, J., Wang, Y., Zhu, Z., Lu, W., & Zhang, Y. (2024). Micro-and nano-plastics induce kidney damage and suppression of innate immune function in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Science of the Total Environment*, 931, 172952.
37. Kanner, J. (2020). Polyphenols by generating H₂O₂, affect cell redox signaling, inhibit PTPs and activate Nrf2 axis for adaptation and cell surviving: in vitro, in vivo and human health. *Antioxidants*, 9(9), 797.
38. Yu, H., Sattanathan, G., Yu, L., Li, L., & Xiao, Y. (2024). Impact of Nutritional Tea Polyphenols on Growth, Feed Efficiency, Biochemical Traits, Antioxidant Capacity, Haematological Parameters and Immunity in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Animals*, 14(14), 2104.
39. Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131.