

## Dose- and size-dependent effects of polystyrene microplastic on antioxidant and immune genes of gold fish (*Carasius auratus*)

Azim Liaghi<sup>1</sup>, Hadise Kashiri<sup>\*2</sup>, Ainaz Shirangi<sup>3</sup>, Mohammad Gholizadeh<sup>4</sup>, Safura Abarghouei<sup>5</sup>

1. Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: [azimliagi@gmail.com](mailto:azimliagi@gmail.com)
2. Corresponding Author, Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: [hadiskashiri@gmail.com](mailto:hadiskashiri@gmail.com)
3. Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavus University, Gonbad, Iran. E-mail: [ainazshirangi@gmail.com](mailto:ainazshirangi@gmail.com)
4. Dept. of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavus University, Gonbad, Iran. E-mail: [gholizade\\_mohammad@yahoo.com](mailto:gholizade_mohammad@yahoo.com)
5. Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: [s.abarghouei@gmail.com](mailto:s.abarghouei@gmail.com)

### Article Info

#### Article type:

Full Length Research Paper

#### Article history:

Received: 05.28.2022

Revised: 05.12.2022

Accepted: 06.15.2022

#### Keywords:

Gene expression,  
Gold fish (*Carasius auratus*),  
Pollution,  
Polystyrene microplastic

### ABSTRACT

Nowadays, plastic pollution is regarded as one of the most threatening environmental pollution. In this regard, microplastics may enter the food web and produce some negative impacts in aquatics. The goal of the present study was to study effects of polystyrene microplastic on antioxidant and immune genes expressions in gold fish (*Carasius aurata*). For this, polystyrene microplastic was synthesized via suspension and emulsion polymerization method in two sizes of 0.25 and 8  $\mu\text{m}$ . The fish were exposed to the microplastic with sizes of 0.25 and 8  $\mu\text{m}$  and concentrations of 0.05, 0.5 and 5 mg/L during 28 days under 6 treatments. Based on the results, polystyrene microplastic induced gene expression of SOD, CAT and HSP70 that were dependent on the microplastic concentration and size. Smaller size of microplastic showed higher induction effect on the studied genes expressions so that in most cases, the highest level in the same concentrations was observed in the treatments exposed to 0.25  $\mu\text{m}$  microplastic. With increase in microplastic concentration from 0.05 to 5 mg/L, a similar decreasing-increasing trend was observed in the investigated genes expressions but the CAT gene reaction was slightly different. Overall, more studies seem necessary to understand polystyrene microplastic effects on aquatics and its potential mechanisms. With respect to the results from the present study indicating the changes in antioxidant and immune genes expressions under microplastic exposure, establishing some strategies seem to be obligatory to manage the effluents entered to the aquatic ecosystems and prevent more microplastics increase in the environment. Totally, based on the results, it could be said that polystyrene microplastic as a pollutant can induce the antioxidant and immune system of gold fish.

Cite this article: Liaghi, Azim, Kashiri, Hadise, Shirangi, Ainaz, Gholizadeh, Mohammad, Abarghouei, Safura. 2023. Dose- and size-dependent effects of polystyrene microplastic on antioxidant and immune genes of gold fish (*Carasius auratus*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (4), 109-121.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2022.20742.1722

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

## اثرات وابسته به اندازه و غلظت میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی کاراس طلائی (*Carasius auratus*)

عظیم لیاقی<sup>۱</sup>، حدیثه کشیری<sup>۲\*</sup>، آیناز شیرنگی<sup>۳</sup>، محمد قلی‌زاده<sup>۴</sup>، صفورا ابرقویی<sup>۵</sup>

۱. گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: [azimliagi@gmail.com](mailto:azimliagi@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](mailto:hadiskashiri@gmail.com)
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران. رایانامه: [ainazshirangi@gmail.com](mailto:ainazshirangi@gmail.com)
۴. گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران. رایانامه: [gholizade\\_mohammad@yahoo.com](mailto:gholizade_mohammad@yahoo.com)
۵. گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: [s.abarghouei@gmail.com](mailto:s.abarghouei@gmail.com)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	امروزه، آلودگی پلاستیکی یکی از خطرناک‌ترین آلودگی‌های زیست‌محیطی محسوب می‌شود. در این خصوص، میکروپلاستیک‌ها ممکن است وارد شبکه غذایی شده و باعث بروز برخی اثرات منفی در آبزیان شوند. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در کاراس طلائی ( <i>Carasius auratus</i> ) انجام گرفت. بدین منظور، میکروپلاستیک پلی‌استایرن از طریق پلیمریزه شدن امولسیون و تعلیقی در دو اندازه ۰/۲۵ و ۸ میکرومتر تهیه شد. ماهیان در غالب ۶ تیمار با اندازه‌های ۰/۲۵ و ۸ میکرومتر و غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر میکروپلاستیک طی ۲۸ روز مواجه شدند. بر اساس نتایج، میکروپلاستیک پلی‌استایرن باعث القای بیان ژن‌های SOD، CAT و HSP70 شد که وابسته به غلظت و اندازه میکروپلاستیک بود. اندازه کوچک‌تر میکروپلاستیک اثر القایی بالاتری در بیان ژن‌های مورد بررسی نشان داد به نحوی که در بیش‌تر موارد بالاترین سطح در غلظت‌های مشابه در تیمارهای مواجهه یافته با میکروپلاستیک ۰/۲۵ میکرومتر مشاهده شد. با افزایش غلظت میکروپلاستیک از ۰/۰۵ تا ۵ میلی‌گرم بر لیتر، روند مشابه کاهشی-افزایشی در بیان ژن‌های مورد مطالعه مشاهده شد که البته رفتار ژن CAT قدری متفاوت بود. روی هم‌رفته با توجه به نتایج، می‌توان بیان داشت
واژه‌های کلیدی: آلودگی، بیان ژن، کاراس طلائی ( <i>Carasius auratus</i> )، میکروپلاستیک پلی‌استایرن	

---

میکروپلاستیک پلی‌استایرن به‌ویژه در اندازه‌های پایین‌تر می‌تواند به عنوان یک آلاینده باعث تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی کاراس طلایی شود.

---

استناد: لیاقی، عظیم، کشیری، حدیثه، شیرنگی، آبناز، قلی‌زاده، محمد، ابرقویی، صفورا (۱۴۰۱). اثرات وابسته به اندازه و غلظت میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی کاراس طلایی (*Carasius auratus*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۱ (۴)، ۱۰۹-۱۲۱.

DOI: 10.22069/japu.2022.20742.1722



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

---

## مقدمه

امروزه، آلودگی پلاستیکی یکی از خطرناک‌ترین آلودگی‌های زیست‌محیطی در دنیا محسوب می‌شود. براساس گزارش‌های موجود، تولید جهانی پلاستیک‌ها در سال ۲۰۲۰ بیش از ۳۶۰ میلیون تن بوده که بخش قابل توجهی از این مقدار وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شود (۱). ضایعات پلاستیکی وارد شده به محیط‌های آبی بعد از هوازگی طولانی مدت می‌توانند به قطعات پلاستیکی کوچک‌تر از ۵ میلی‌متر تبدیل شوند که به آن‌ها میکروپلاستیک گفته می‌شود. این قطعات کوچک، که به عنوان آلاینده‌های نوظهور شناخته شده‌اند، ممکن است به راحتی وارد شبکه غذایی شده و اثرات منفی بر آبزیان داشته باشند (۲). برخی مطالعات بیانگر آن است که میکروپلاستیک‌ها ممکن است باعث ایجاد آسیب‌های جدی به روده شامل ترک خوردن پرزهای روده، شکسته شدن سلول‌های انتروسیست در ماهیان و سایر آسیب‌های بافت‌شناسی (۳)، تغییرات متابولیکی کبد (۴)، تغییر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (۵)، کاهش مصرف غذا و رشد (۶) در ماهیان شوند.

آلاینده‌ها به عنوان استرس‌های محیطی می‌توانند منجر به بروز یک‌سری تغییرات فیزیولوژیکی در موجودات گردند. در این خصوص تغییر در بیان ژن و ساخت برخی پروتئین‌ها هم‌چون پروتئین‌های شوک حرارتی به‌عنوان پاسخ‌های معمول در مقابل استرس‌های محیطی از جمله آلودگی‌ها شناخته شده است (۷). از این‌رو، بررسی تغییرات ایجاد شده در بیان mRNA این پروتئین‌ها به‌ویژه HSP70، روشی کارآمد در شناخت پاسخ‌های فیزیولوژیکی موجود در مقابل شرایط نامساعد محیطی می‌باشد (۸). آلاینده‌ها هم‌چنین ممکن است باعث تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی و تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن آن‌ها نیز شوند (۹). در

شرایطی که تعادل بین تولید و حذف گونه اکسیژن فعال (ROS) از بین رود، ماهیان نسبت به استرس اکسیداتیو حساس شده و میزان ابتلا به بیماری در آن‌ها بالا می‌رود (۱۰). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل آنتی‌اکسیدان‌های اندوژن مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) می‌باشد که نقش بسیار مهمی در حفظ سلامت ماهیان دارند (۱۱). SOD و CAT به‌دلیل قابلیت تبدیل ROS به متابولیت‌های غیرمضر به عنوان اولین گروه‌های محافظت‌کننده در برابر رادیکال‌های آزاد در نظر گرفته می‌شوند (۱۲).

روی هم رفته، با وجود این‌که به خوبی مشخص شده فرایندهای فیزیولوژیکی - زیستی و سلولی در سطح ژن تنظیم می‌شوند، اطلاعات محدودی در زمینه تأثیر میکروپلاستیک‌ها بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس در سطح ژن در ماهیان وجود دارد. بنابراین، در پژوهش حاضر به بررسی اثر غلظت‌ها و اندازه‌های مختلف میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر بیان ژن‌های کلیدی تنظیم‌کننده پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در گونه کاراس طلائی (*Carassius auratus*) به عنوان مدلی مناسب در مطالعات سم‌شناسی محیطی پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

**تهیه و نگهداری ماهی:** ماهیان کاراس طلائی (*Carassius auratus*) با وزن متوسط  $30 \pm 2/1$  گرم در خردادماه ۱۳۹۹ از کارگاه پرورش ماهی خصوصی تهیه و به سالن آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهیان تا زمان شروع آزمایش‌ها به‌منظور سازگار شدن با شرایط جدید، به‌مدت ۲ هفته در محیط آزمایشگاهی نگهداری شدند. طی این مدت ماهیان با استفاده از غذای تجاری دو بار در روز غذادهی شدند. شاخص‌های فیزیوشیمیایی

قرار گرفته و به مدت ۲۸ روز با غلظت‌ها و اندازه‌های مختلف میکروپلاستیک پلی‌استایرن مواجه شدند. تیمارهای مورد بررسی (هر تیمار، سه تکرار) بدین شرح بودند: شاهد: بدون PS-MP، گروه ۱: مواجهه با PS-MP ۰/۲۵ میکرومتر در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر، گروه ۲: مواجهه با PS-MP ۰/۲۵ میکرومتر در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، گروه ۳: مواجهه با PS-MP ۰/۲۵ میکرومتر در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، گروه ۴: مواجهه با PS-MP ۸ میکرومتر در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر، گروه ۵: مواجهه با PS-MP ۸ میکرومتر در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و گروه ۶: مواجهه با PS-MP ۸ میکرومتر در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر. در نهایت، ماهیان با استفاده از پودر گل میخک بی‌هوش و به‌منظور استخراج RNA، از بافت روده ماهیان نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌ها تا زمان استخراج در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**استخراج RNA، ساخت cDNA و بررسی بیان ژن:** RNA نمونه‌های روده با استفاده کیت ترایزول (Invitrogen) براساس دستورالعمل موجود استخراج شد. از DNase I (GeneAll) برای حذف DNA ژنومیک استفاده شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت به‌ترتیب با استفاده از نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, 2000c) و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد (Bio-Rad, USA)، RNA استخراج شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthethis (Thermo Fisher) جهت ساخت cDNA استفاده شد. بدین‌منظور، ترکیب ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo dT (تکاپوزیست) و آب DEPC (تکاپوزیست) تا حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر تهیه و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه) قرار داده شد. پس از کاهش دما روی یخ، بافر واکنش (۴ میکرولیتر، ۵X)

آب طی مدت نگهداری ماهیان مورد بررسی قرار می‌گرفت. بدین جهت، اکسیژن محلول، دما و pH با دستگاه واتر چک (Water Checker U-10، ژاپن) و سختی آب نیز با دستگاه فتومتر (Wagtech، آلمان) اندازه‌گیری گردید: اکسیژن محلول:  $7/1 \pm 0/2$  میلی‌گرم بر لیتر، دما  $21 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، pH  $7/0 \pm 6/3$  و سختی  $248 \pm 4/9$  میلی‌گرم بر لیتر.

**میکروپلاستیک پلی‌استایرن:** ذرات پلی‌استایرن از طریق پلیمریزه شدن امولسیون و تعلیقی در دو اندازه ۰/۲۵ و ۰/۸ میکرومتر طبق روش Tahami و همکاران (۱۳) و Shohani و همکاران (۱۴) در پژوهشگاه علوم و فناوری رنگ تهران تهیه شد. پلیمریزه شدن در راکتور یک لیتری سه دهنه مجهز به قیف اضافه‌کننده، خنک‌کننده و دماسنج انجام گرفت. بدین‌منظور، ۴۰۰ میلی‌لیتر بنزوئیل پراکساید (۳-۱ درصد وزنی)، پلی‌وینیل الکل (۱-۱ درصد وزنی) به‌عنوان تثبیت‌کننده و آب مقطر به ظرف واکنش اضافه و در ۷۵۰-۵۵۰ rpm ترکیب شد. ازت ۲۰ دقیقه جهت حذف اکسیژن از محلول عبور داده شد. پس از تنظیم دما روی ۹۰ درجه سانتی‌گراد، استایرن به صورت قطره‌ای و به آهستگی (۳۰ دقیقه) اضافه شد. واکنش پلیمریزه شدن تا ۸ ساعت ادامه یافت و در نهایت پلی‌استایرن‌های سنتز شده با افزودن رودامین B رنگ‌آمیزی شدند (۱۳، ۱۴).

**طرح آزمایش:** به‌منظور تعیین LC<sub>50</sub> غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک پلی‌استایرن (PS-MP) مورد بررسی قرار گرفت. در این خصوص، حتی غلظت‌های بالای این ذرات (۲۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) نیز منجر به مرگ و میر طی ۹۶ ساعت نشد. بنابراین، غلظت‌های مواجهه برای این میکروپلاستیک بر اساس غلظت‌های پلی‌استایرن در محیط زیست انتخاب گردید (۴، ۱۵). پس از گذشت دوره دو هفته‌ای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، ماهیان به‌طور تصادفی در مخازن شیشه‌ای (هر مخزن ۶ قطعه ماهی)

داده آنالین آغازگرهای مورد نظر و ژن  $\beta$ Actin به‌عنوان ژن رفرنس انتخاب شد (جدول ۱) و در نهایت Real Time PCR (StepOne Real Time PCR, ABI) به روش مبتنی بر رنگ فلئورسنت سایبرگرین برای بررسی بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ انجام گرفت.

RiboLock RNase Inhibitor (۱ میکرولیتر، ۲۰ U/ $\mu$ l)، dNTP (۲ میکرولیتر، ۱۰ میکرومولار) و RevertAid M-MuLV RT (۱ میکرولیتر، ۲۰۰ U/ $\mu$ l) افزوده و به ترتیب در ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. با بررسی از منابع پایگاه

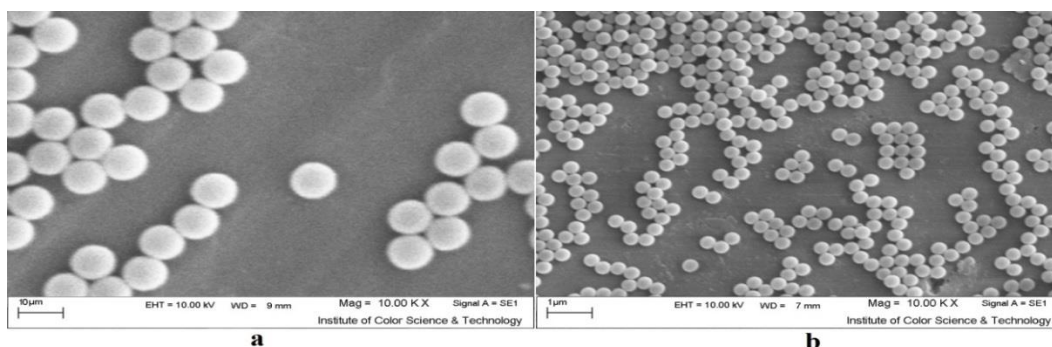
جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در مطالعه حاضر (NCBI GenBank).

ژن	توالی	کد دسترسی
سوپراکسید دیسموتاز	F: TGAGCTGTCGGAAGCCATCAAG R: TTGGTCCCACATGCAGCAATCC	XM_019111527
کاتالاز	F AGACGACACCCATCGCTGTTCG R AAGGTCCCAGTTGCCCTCATCG	GQ376154
پروتئین شوک حرارتی ۷۰	F GGCAGAAGGTGACAAATGCA R TGGGCTCGTTGATGTTCTCA	JN544930
بتا-اکتین	F ACTGCACAGCCAAGAGAGTTCA R GTTATTAAGCGGCCGATATGC	AB039726

### نتایج

بر اساس نتایج، پیک‌های جذب در  $3026\text{ cm}^{-1}$ ،  $1601$ ،  $1492$ ،  $1450$ ،  $757$  و  $698$  و مرتبط با حلقه بنزن در پلی‌استایرن بود. پیک جذب در  $1601\text{ cm}^{-1}$ ،  $2921$ ،  $1285$  و  $1367$  به ترتیب مرتبط با  $C=C$  حلقه اروماتیک،  $-CH_2-$  اروماتیک، پیوندهای کششی آلیفاتیک و گروه خمشی بود (شکل ۱،  $P < 0/01$ ). نتایج FTIR تأییدکننده میکروپلاستیک پلی‌استایرن در این پژوهش می‌باشد. تصویر SEM ذرات پلی‌استایرن در شکل ۱ نشان داده شده است.

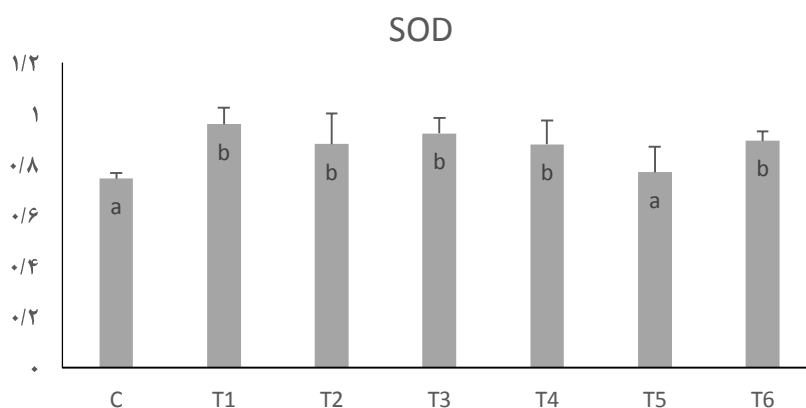
تجزیه و تحلیل داده‌ها: از مدل  $\Delta\Delta Ct2$  برای بررسی داده‌های به‌دست آمده از بیان ژن‌های مورد بررسی استفاده شد. تحلیل داده‌های مربوط به تیمارهای مختلف مورد بررسی (غلظت‌ها و اندازه‌های مختلف PS-MP) با استفاده از SPSS انجام شد. برای بررسی و مقایسه تفاوت بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست دانکن انجام شد.  $P < 0/05$  نیز به عنوان تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.



شکل ۱- تصویر SEM ذرات پلی‌استایرن؛ a و b به ترتیب نشان‌دهنده ذرات با اندازه ۲۵/۰ و ۸ میکرومتر هستند.

مختلف مورد بررسی، پایین‌ترین میزان بیان ژن SOD در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر PS-MP (برای هر دو اندازه مورد بررسی) مشاهده شد. در بررسی اثر اندازه، PS-MP با اندازه کوچک‌تر (۰/۲۵ میکرومتر) اثر القایی بیش‌تری روی بیان ژن SOD در غلظت‌های مشابه نشان داد (شکل ۲).

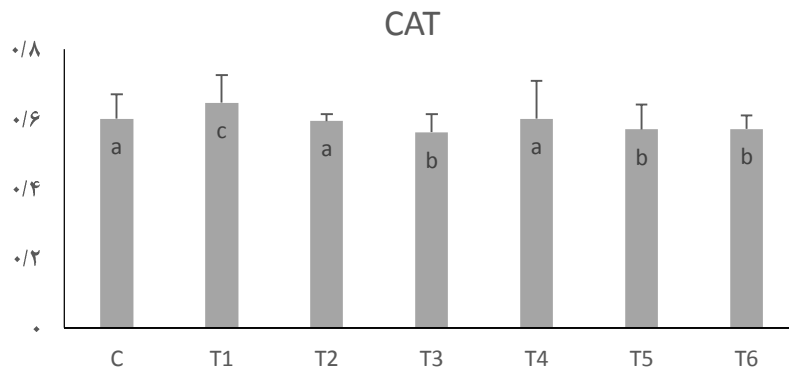
تغییرات بیان ژن SOD در بافت روده *C. aurata* در رویارویی با PS-MP در شکل ۲ نشان داده شده است. PS-MP منجر به القای بیان ژن SOD در تمامی تیمارهای مورد بررسی گردید که در بیش‌تر موارد افزایش سطح بیان مشاهده شده در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در بین تیمارهای



شکل ۲- تغییرات بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت روده *C. auratus* در رویارویی با میکروپلاستیک پلی‌استایرن: C: شاهد، PS-MP: T1 اندازه ۰/۲۵ میکرومتر و غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر، PS-MP: T2 اندازه ۰/۲۵ میکرومتر و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، PS-MP: T3 اندازه ۰/۲۵ میکرومتر و غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، PS-MP: T4 اندازه ۸ میکرومتر و غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر، PS-MP: T5 اندازه ۸ میکرومتر و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، PS-MP: T6 اندازه ۸ میکرومتر و غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر؛ حروف کوچک انگلیسی متفاوت در انتهای هر ستون نمودار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد.

پلی‌استایرن از ۰/۰۵ تا ۵ میلی‌گرم بر لیتر روند کاهشی مشاهده شد که در بیش‌تر موارد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در مقایسه دو اندازه مورد بررسی، PS-MP ۰/۲۵ میکرومتر نیز اثر القایی بالاتری در بیان نسبی ژن CAT در غلظت‌های مشابه نشان داد (شکل ۳).

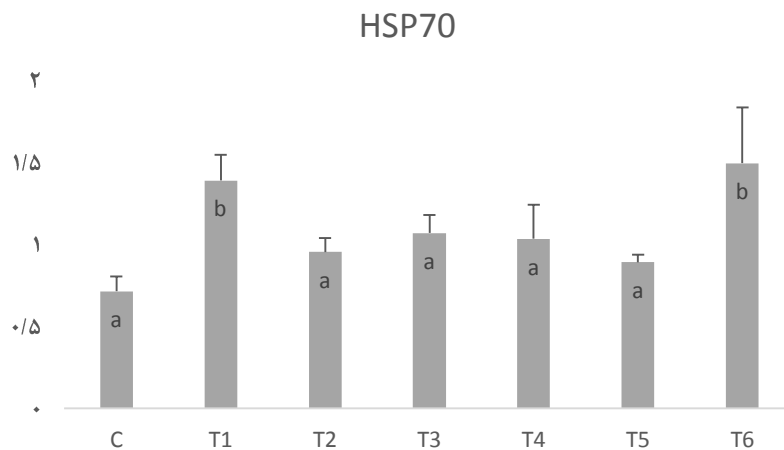
اثر اندازه‌ها و غلظت‌های مختلف PS-MP بر بیان نسبی ژن CAT در روده *C. aurata* در شکل ۳ نشان داده شده است. تغییرات مشاهده شده در ژن CAT در مقایسه با شاهد، وابسته به غلظت و اندازه میکروپلاستیک بود. پروفایل تغییرات در غلظت‌های مختلف برای هر دو اندازه مورد بررسی تقریباً مشابه بود به نحوی که با کاهش غلظت میکروپلاستیک



شکل ۳- تغییرات بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت روده *C. auratus* در رویارویی با میکروپلاستیک پلی‌استایرن.

گروه‌ها، مربوط به تیمار مواجهه یافته با میکروپلاستیک در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. در بررسی اثر غلظت میکروپلاستیک بر بیان ژن HSP70، با افزایش غلظت تا ۵ میلی‌گرم بر لیتر روند کاهشی - افزایشی مشابهی برای هر دو اندازه مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۴).

سطح بیان نسبی ژن HSP70 بافت روده *C. auratus* در شکل ۴ نشان داده شده است. براساس نتایج، میکروپلاستیک پلی‌استایرن باعث افزایش بیان نسبی ژن HSP70 در تمام تیمارهای مورد بررسی در مقایسه با شاهد شد که افزایش مشاهده شده در به جز تیمارهای T1 و T6 معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). بالاترین میزان بیان ژن در بین تمامی



شکل ۴- تغییرات بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت روده *C. auratus* در رویارویی با میکروپلاستیک پلی‌استایرن.



## بحث

امروزه، پلاستیک‌ها به عنوان آلاینده‌های محیطی مهمی در نظر گرفته می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده میکروپلاستیک‌ها می‌توانند از طریق تغذیه و یا فیلترینگ وارد بدن موجود شوند (۱۶). عدم وجود آنزیم‌های تجزیه‌کننده میکروپلاستیک‌ها در بسیاری از آبزیان از جمله زئوپلانکتون‌ها و ماهیان می‌تواند باعث تشدید اثرات این نوع آلاینده‌ها در بدن گردد (۱۷، ۱۸). با وجود پژوهش‌های انجام شده طی سال‌های اخیر، ابعاد مختلف اثرگذاری میکروپلاستیک‌ها بر ماهیان هنوز به‌خوبی شناسایی نشده است (۱۹). Lu و همکاران (۴) بیان داشتند که پلی‌استایرن بلعیده شده توسط ماهی گورخری (*Danio rerio*) با تغییر سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و CAT در آبشش و کبد این ماهی می‌تواند باعث القای استرس اکسیداتیو شود. در واقع، استرس اکسیداتیو و تغییر در فعالیت و بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ممکن است در اثر مواجهه با پلی‌استایرن رخ دهد (۲۰، ۲۱). در پژوهشی در خصوص بررسی اثرات میکروپلاستیک بر گونه *Paramisgurnus dabryanus* مشخص شد که این مواد می‌توانند باعث تغییراتی در سطح بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی، القای استرس اکسیداتیو و فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی گردد (۲۲). در مطالعه‌ای توسط Busom (۲۳)، افزایش سطح بیان ژن SOD در ماهی گورخری در مواجهه با نانوپلاستیک پلی‌استایرن گزارش شده است. در پژوهش حاضر، سطح بیان نسبی ژن SOD در بافت روده ماهیان در تمام تیمارهای مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش نشان داد که این افزایش در بیش‌تر موارد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). افزایش مشاهده شده وابسته به غلظت و اندازه میکروپلاستیک بود. در این راستا، اندازه کوچک‌تر PS-MP اثر القایی بالاتری روی بیان ژن SOD نشان داد. بر اساس برخی گزارش‌های

موجود، احتمالاً ذرات کوچک‌تر میکروپلاستیک به‌دلیل دارا بودن ناحیه سطحی بیش‌تر، راحت‌تر جذب سلول شده و در نتیجه اثر منفی بیش‌تری روی سلول خواهند داشت (۶). به هر حال، به شکل کلی میکروپلاستیک‌هایی با اندازه کم‌تر از ۱۰ میکرومتر احتمالاً اثرات منفی بیش‌تری نسبت به اندازه‌های بالاتر دارند (۲۴). هم‌چنین، بالاترین سطح بیان در پایین‌ترین غلظت مورد بررسی (۰/۰۵ ppm) مشاهده شد. چنین الگویی در برخی مطالعات دیگر هم‌چون Yu و همکاران (۲۰)، Wang و همکاران (۲۲)، Liu و همکاران (۲۵) نیز گزارش شده است. در این ارتباط به‌نظر می‌رسد غلظت‌های پایین میکروپلاستیک باعث فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شود اما در غلظت بالاتر سیستم آنتی‌اکسیدانی تدریجاً تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد (۶). به‌هر حال، در این بررسی پس از کاهش سطح بیان ژن SOD با افزایش غلظت تا ۰/۵ ppm مجدداً سطح mRNA در بالاترین غلظت (۵ ppm) کمی افزایش نشان داد که باز هم در مقایسه با پایین‌ترین غلظت مورد بررسی کمی پایین‌تر بود. در ارتباط با ژن CAT نیز افزایش سطح بیان ناشی از مواجهه با میکروپلاستیک در *Eriocheir sinensis* گزارش شده است (۲۰). در بررسی حاضر، تغییرات وابسته به اندازه و غلظت در بیان نسبی ژن مربوطه مشاهده شد. در این خصوص، با افزایش اندازه میکروپلاستیک تا ۸ میکرومتر، سطح بیان ژن CAT نیز در غالب موارد روند کاهشی نشان داد. این در حالیست که در مطالعه پیشین توسط Wang و همکاران (۲۲)، ژن CAT در *P. dabryanus* در مواجهه با اندازه‌های ۰/۵ و ۵ میکرومتر میکروپلاستیک رفتار متفاوتی تحت شرایط مختلف نشان داد به‌نحوی که تغییرات مشاهده شده الگوی منظمی نداشت. هم‌چنین بالاترین سطح بیان ژن CAT در پژوهش حاضر مربوط به بالاترین غلظت مورد بررسی

سیستم آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه تحریک بدن به تولید میزان بالای ROS شده که پس از آن فعالیت SOD جهت تبدیل  $O^2$  به  $H_2O_2$  افزایش می‌یابد (۲۹). برخی از پروتئین‌های شوک حرارتی هم‌چون HSP70 شاخص مستقیم و اختصاصی نشان‌دهنده بروز استرس سلولی بوده (۳۰) و در مسیر بیوشیمیایی سلولی مرتبط با دفاع، ترمیم و سم‌زدایی شرکت می‌کنند. مطالعات اندکی، افزایش سطح بیان ژن HSP70 در آبزیان در رویارویی با میکروپلاستیک‌ها را گزارش کرده‌اند (۳۱، ۳۲). در این پژوهش نیز میکروپلاستیک پلی‌استایرن منجر به القای بیان ژن HSP70 شد. افزایش بیان مشاهده شده می‌تواند ناشی از فسفریله شدن فاکتورهای رونویسی در محل پروموتور و یا راه‌اندازی ژن مورد نظر بوده (۳۳) که احتمالاً مرتبط با نقش چاپرونی HSP70 در جلوگیری از برهم‌کنش نامناسب بین پروتئین‌ها (تاخوردگی اشتباه و تجمع پروتئین‌ها) است. در بررسی اثر اندازه میکروپلاستیک نیز هم‌چون ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی، اندازه کوچک‌تر میکروپلاستیک در غالب موارد اثر القایی بیش‌تری روی بیان ژن HSP70 نشان داد. هم‌چنین روند تغییرات مشاهده شده در سطح بیان HSP70 mRNA در مواجهه با غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک مشابه با SOD mRNA بود. در این خصوص، براساس مطالعات انجام شده، پاسخ پروتئین‌های استرس در غلظت‌های مختلف آلاینده‌ها می‌تواند متفاوت می‌باشد (۳۴، ۳۵).

### نتیجه‌گیری کلی

روی هم رفته، نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن بود که مواجهه *C. auratus* با میکروپلاستیک پلی‌استایرن به‌ویژه در اندازه کوچک‌تر (۰/۲۵ میکرومتر) باعث بروز تغییراتی در سطح بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی

(۵ ppm) بود. در بررسی صورت گرفته توسط Choi و همکاران (۲۶) نیز تغییرات وابسته به غلظت در بیان ژن‌های SOD و CAT در گونه *Cyprinodon variegatus* گزارش گردید که طی آن سطح بیان ژن مربوطه با افزایش غلظت میکروپلاستیک در فرم‌های مختلف تا  $250 \text{ mg/L}$  کاهش یافت این در حالی بود که بیان ژن CAT در ماهیان مواجهه یافته با فرم کروی و بی‌قاعده میکروپلاستیک با افزایش اندازه به‌ترتیب افزایش و کاهش نشان داد. در پژوهشی دیگر توسط Hsieh و همکاران (۲۷) تأثیر قابل‌توجه غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میکروپلاستیک پلی‌اتیلن بر عملکرد ژن‌های SOD و CAT در *Litopenaeus Vannamei* گزارش شد. با این وجود، در بررسی انجام‌شده توسط Busom (۲۳)، تغییر چندانی در بیان ژن CAT در مواجهه با نانوپلاستیک استایرن در غلظت‌های مختلف در مقایسه با شاهد مشاهده نشد در حالی که نانوپلاستیک پلی‌استایرن باعث القای بیان ژن SOD وابسته به غلظت شد به‌نحوی که بالاترین سطح بیان در غلظت  $0.01 \text{ mg/L}$  گزارش گردید. با مقایسه نتایج مختلف حاصل از پژوهش‌های انجام شده در این زمینه به‌نظر می‌رسد که احتمالاً نوع گونه و هم‌چنین نوع، اندازه و غلظت میکروپلاستیک می‌تواند بر سطح تغییرات ژن‌های مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانی اثرگذار باشد که این امر نیازمند مطالعات بیش‌تر و دقیق‌تر در این زمینه می‌باشد. هم‌چنین در خصوص برخی تفاوت‌های مشاهده شده در بیان ژن SOD و CAT می‌توان بیان داشت با توجه به نقش SOD در تغییر شکل آنیون سوپراکسید به آب و پراکسید هیدروژن، فعالیت بالای SOD ممکن است منجر تجمع  $H_2O_2$  گشته و فعالیت آنزیم CAT تحت‌تأثیر قرار گیرد (۲۸). این امر احتمالاً به آن دلیل باشد که ورود PS-MPs به بدن ماهی در ابتدا باعث فعالسازی

میکروپلاستیک‌ها بر آبزیان و مکانیسم‌های بالقوه این اثرات ضروری به نظر می‌رسد هر چند اخیراً گام‌های مثبتی با استفاده از مطالعات مبتنی بر ترانسکریپتومیک در این زمینه برداشته شده است (۳۶، ۳۷). به هر حال با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر مبنی بر تحت‌تأثیر قرار گرفتن ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در رویارویی با میکروپلاستیک پلی‌استایرن، اتخاذ تدابیری جهت مدیریت پساب‌های ورودی به اکوسیستم‌های آبی و جلوگیری از افزایش بیش‌تر میکروپلاستیک‌ها در محیط زیست امری مهم به‌نظر می‌رسد.

و ایمنی می‌گردد به‌نحوی که این تغییرات می‌تواند تحت‌تأثیر غلظت و اندازه میکروپلاستیک قرار گیرد. در این رابطه، پژوهش‌های انجام شده طی سال‌های اخیر در بسیاری موارد بیانگر اثرات منفی میکروپلاستیک‌ها بر آبزیان بوده اما روند بروز این اثرات در شرایط مختلف از جمله غلظت‌ها و اندازه‌های متفاوت این مواد رویه یکسانی را نشان نداده است. عوامل زیادی هم‌چون برخی تفاوت‌ها در مطالعات انجام شده (مانند گونه، سن و طول آبی)، نوع، اندازه و غلظت پلاستیک و حتی آلاینده‌های ثانویه می‌توانند در بروز نتایج متفاوت اثرگذار باشند. بنابراین، بررسی‌های بیش‌تر برای درک اثرات

#### منابع

1. Plastics-the Fact. 2021. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>.
2. Romano, N., Renukdas, N., Fischer, H., Shrivastava, J., Baruah, K., Egnew, N., and Sinha, A.K. 2020. Differential modulation of oxidative stress, antioxidant defense, histomorphology, ion-regulation and growth marker gene expression in goldfish (*Carassius auratus*) following exposure to different dose of virgin microplastics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 238: 108862.
3. Karami, A., Romano, N., Galloway, T., and Hamzah, H. 2016. Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental Research*. 151: 58-70.
4. Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., and Ren, H. 2016. Response to Comment on "Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver." *Environmental Science and Technology*. 50: 4054-4060.
5. Romano, N., Ashikin, M., Teh, J.C., Syukri, F., and Karami, A. 2018. Effects of pristine polyvinyl chloride fragments on whole body histology and protease activity in silver barb *Barbodes gonionotus* fry. *Environmental Pollution*. 237: 1106-1111.
6. De Sá, L.C., Luís, L.G., and Guilhermino, L. 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution*. 196: 359-362.
7. Lakhota, S.C., and Prasanth, K.V. 2002. Tissue and development specific induction and turnover of hsp70 transcripts from 87A and 87C loci after heat shock and during recovery in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*. 205: 345-358.
8. Bierkens, J.G.E.A. 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*. 153: 61-72.
9. Kim, J.H., Rhee, J.S., Lee, J.S., Dahms, H.U., Lee, J., Han, K.N., and Lee, J.S. 2010. Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river pufferfish,

- Takifugu obscurus* (Tetraodontiformes). Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 152: 473-479.
10. Sheikhzadeh, N., Tayefi-Nasrabadi, H., Oushani, A.K., and Enferadi, M.H.N. 2012. Effects of *aematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry. 38: 413-419.
  11. Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., and Sanz, A. 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 15: 75-88.
  12. Rangasamy, B., Hemalatha, D., Shobana, C., Nataraj, B., and Ramesh, M. 2018. Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. Chemosphere. 213: 423-433.
  13. Tahami, S.V., Pourmahdian, S., Hadavand, B.S., Azizi, Z.S., and Tehranchi, M.M. 2016. Thermal tuning the reversible optical band gap of self-assembled polystyrene photonic crystals. Photonics and Nanostructures-Fundamentals and Applications. 22: 40e45.
  14. Shohani, N., Pourmahdian, S., and Shirkavand Hadavand, B. 2017. Response surface methodology for design of porous hollow sphere thermal insulator. Management Science and Engineering. 1: 012073.
  15. Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., and Koelmans, A.A. 2014. Nanoplastics affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. Environmental Science and Technology. 48: 20. 12336e12343.
  16. Baulch, S., and Perry, C. 2014. Evaluating the impacts of marine debris on cetaceans. Marine Pollution Bulletin. 80: 1-2. 210-221.
  17. Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., and Galloway, T.S. 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. Environmental Science and Technology. 49: 2. 1130-1137.
  18. Van Pomeroy, M., Brun, N.R., Peijnenburg, W.J.G.M., and Vijver, M.G. 2017. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano) particles in zebrafish embryos at different developmental stages. Aquatic Toxicology. 190: 40-45.
  19. Cunningham, E.M., Kiriakoulakis, K., Dick, J.T.A., Kregting, L., Schuchert, P., and Sigwart, J.D. 2020. Driven by speculation, not by impact-the effects of plastic on fish species. Journal of Fish Biology. 96: 6. 1294-1297.
  20. Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., and Zhao, Y. 2018. Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. Aquatic Toxicology. 200: 28-36.
  21. Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., and Na, G. 2019. The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 173: 110-117.
  22. Wang, W., Jian, S., Zhang, S., Wang, D.W.J., Gao, M., Sheng, J., and Hong, Y. 2022. Enrichment of polystyrene microplastics induces histological damage, oxidative stress, Keap1-Nrf2 signaling pathway-related gene expression in loach juveniles (*Paramisgurnus dabryanus*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 237: 113540.
  23. Busom, I.B. 2022. Short term effects of nanoparticles in fish. Doctoral Thesis. Institute of Biotechnology and Biomedicine, 240p.
  24. Guerrero, M.C., Aragona, M., Porcino, C., Fazio, F., Laurà, R., Levanti, M., Montalbano, G., Germanà, G., Abbate, F., and 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.
  25. Liu, Z., Yu, P., Cai, M., Wu, D., Zhang, M., Chen, M., and Zhao, Y. 2019. Effects of Microplastics on the Innate Immunity and Intestinal Microflora of Juvenile *Eriocheir Sinensis*. Science of the Total Environment. 685: 836-846.

26. Choi, J.S., Jung, Y.J., Hong, N.H., Hong, S.H., and Park, J.W. 2018. Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Pollution Bulletin*. 18: 129. 231-240.
27. Hsieh, S.L., Wu, Y.C., Xu, R.Q., Chen, Y.T., Chen, C.W., Singhanian, R.R., and Dong, C.D. 2021. Effect of polyethylene microplastics on oxidative stress and histopathology damages in *Litopenaeus vannamei*. *Environmental Pollution*. 288: 117800.
28. Ghelichpour, M., Taheri Mirghaed, A., Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Yousefi, M., Van Doan, H., and Perez-Jimenez, A. 2019. Expression of immune, antioxidant and stress related genes in different organs of common carp exposed to indoxacarb. *Aquatic Toxicology*. 208: 208-216.
29. Halliwell, B., and Gutteridge, J. 2015. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3: 199-283.
30. Mukhopadhyay, I., Nazir, A., Mahmood, K., Saxena, D.K., Das, M., Khanna, S.K., and Chowdhuri, D.K. 2002. Toxicity of argemone oil: Effect on hsp70 expression and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70 lac Z) Bg<sup>9</sup>. *Cell Biology and Toxicology*. 18: 1-11.
31. Kim, W.S., Park, K., Kim, J.K., and Kwak, I.S. 2016. Expression of the heat shock protein 70 gene and external developmental traits of two Bivalvia species, *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*, under aquaculture environments. *Korean Journal of Ecology and Environment*. 49: 1. 22e30.
32. Fadare, O.O., Wan, B., Guo, L.H., Xin, Y., Qin, W., and Yang, Y. 2019. Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastic particles to *Daphnia magna*. *Environmental Science: Nano Journal*. 6: 5. 1466e1477.
33. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium. *Toxicology*. 192: 95-117.
34. Kohler, H.R., Knodler, C., and Zanger, M. 1999. Divergent kinetics of HSP70 induction in *Onniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, HCH, PCP): Suitability and limits of a biomarker. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36: 179-185.
35. Lewis, S., Donkin, M.E., and Depledge, M.H. 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquatic Toxicology*. 51: 3. 277-291.
36. Pang, M., Wang, Y., Tang, Y., Dai, J., Tong, J., and Jin, G. 2021. Transcriptome sequencing and metabolite analysis reveal the toxic effects of nanoplastics on tilapia after exposure to polystyrene. *Environmental Pollution*. 277: 116860.
37. Zhao, J., Rao, B.Q., Guo, X.M., and Gao, J.Y. 2021. Effects of microplastics on embryo hatching and intestinal accumulation in larval zebrafish *Danio rerio*. *Huan Jing Ke Xue*. 42: 485-491.

