

بررسی اثرات سطوح مختلف نانوپلاستیک پلی استایرن بر بیان برخی ژن های مرتبط با سیستم ایمنی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

ملیکا میرزائی نشترویدی^۱، کامران رضایی توابع^{۱*}، امیررضا عابدعلم دوست^۱، غلامرضا رفیعی^۱، حسن رحیمیان^۲، بهزاد شیرکوند هداوند^۳

^۱گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

^۲گروه علوم جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۳گروه رزین و مواد افزودنی، پژوهشکده علوم رنگ و تکنولوژی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱

چکیده

بسیاری از مواد پلاستیکی که در حال حاضر برای بسته بندی مواد غذایی استفاده می شوند، غیر قابل تجزیه بوده یا فرآیند تجزیه بسیار طولانی دارند، که باعث افزایش آلودگی محیط زیست می شوند. این تحقیق، با هدف بررسی اثرات سمی نانوپلاستیک پلی استایرن NPsPS به صورت انتقال از جیره غذایی به بدن بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام گردید. برای این تحقیق، چهار تیمار از غلظت های NPsPS در غذا طبق تحقیقات انجام شده با مقادیر ۰ (شاهد)، ۰/۱، ۱۰ و ۱۰۰ در نظر گرفته و در یک دوره زمانی مزمون ۲۸ روزه، پس از گذشت یک هفته دوره سازگاری، در سه تکرار (در هر تکرار از هر غلظت، ۱۵ قطعه بچه ماهی)، طراحی و اجرا گردید. بررسی تغییرات دو زیست نشانگر ژنی شاخص سیستم ایمنی و استرس در پروفایل بیانی بافت کبد و طحال، نشان داد که به دنبال افزایش غلظت NPsPS، سطوح بیان ژن های پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- α) در هر دو بافت کبد و طحال، با افزایش رونویسی mRNA افزایش معنی داری داشته است ($P < 0.05$). براساس نتایج به دست آمده، رهائش NPsPS برای سلامت و ایمنی در سطح سلولی-مولکولی در نمونه آبی مورد پژوهش، تأیید شد و احتمال می رود در صورت رهائش این نانو ماده در محیط زیست آبی، القاگر اثرات نامطلوب زیست محیطی باشد.

کلید واژگان: سمیت شناسی، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، فاکتور نکروز توموری آلفا، قزل آلاهی رنگین کمان

مقدمه

پلی‌استایرن یکی از پلی‌مرهای پرکاربرد است که برای سال‌ها در محیط زیست باقی می‌ماند، این پلی‌مر ممکن است به‌علت ویژگی‌های مونومر استایرن که سرطان‌زا و مختل‌کننده غدد درون‌ریز است؛ یک خطر جدی برای ارگان‌سیم‌های دریایی شناخته شود (Lithner *et al.*, 2011). طی آمار ۸۵ درصد از کل زباله‌های دریایی را مواد پلاستیکی تشکیل می‌دهد که ۸۰ درصد آن از منابع زمینی منشأ می‌گیرد (Auta *et al.*, 2017). براساس تحقیقات، آسیا بزرگ‌ترین تولیدکننده محصولات پلاستیکی می‌باشد (O'Connor *et al.*, 2020) در نتیجه تحقیقات مربوط به اثرات این زباله‌ها بر موجودات آبی به‌خصوص در کشورهای آسیایی ضروری به‌نظر می‌رسد.

در مورد نانوپلاستیک‌ها تعاریف مختلفی وجود دارد اما به‌صورت کلی فرض بر آن است که ذرات بین ۱ تا ۱۰۰۰ نانومتر در محدوده نانوپلاستیک در نظر گرفته می‌شود (Gigault *et al.*, 2018). امروزه وجود ذرات میکروپلاستیک‌ها در نمونه‌های خاک، اقیانوس‌ها، رسوبات، آب شیرین و جانوران آبی ثابت شده است (Campanale *et al.*, 2020)، آب شیرین نه تنها منبع آب آشامیدنی بلکه منبع زیست بسیاری از گونه‌های ماهی (Zhang *et al.*, 2020) از جمله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هم است. به‌طور کلی مشخص شده است که نانوذرات پلی‌استایرن سمیت‌حادتری نسبت به میکروذرات پلی‌استایرن ایجاد می‌کنند (Fadare *et al.*, 2019).

تعیین کمیت و سرنوشت نانوپلاستیک‌ها در محیط‌های دریایی و منابع آب شیرین به‌علت محدودیت روش‌های استاندارد برای شناسایی، نمونه‌برداری، نرمال‌سازی واحد، تجزیه و تحلیل و بیان داده‌ها عمدتاً کار دشواری است (Da Costa *et al.*, 2016; Avio *et al.*, 2017; Piccardo *et al.*, 2020). از آنجا که اطلاعات کمی در مورد نانوپلاستیک‌ها در محیط طبیعی به‌علت محدودیت‌های اساسی در تعیین میزان این ذرات وجود دارد، محققان اغلب با برآوردهای تقریبی محاسبه‌شده از غلظت‌های میکروپلاستیک در محیط طبیعی، آزمایش‌های خود را روی مدل‌های آبی هدف انجام می‌دهند (Martin *et al.*, 2022).

با توجه به اینکه ایمنی ذاتی نقش مهمی در دفاع از

عفونت‌ها ایفا نموده و به‌عنوان اولین خط دفاع بدن برای جلوگیری از عفونت به‌شمار می‌رود؛ بنابراین در این راستا لازم است تحقیقات دقیق صورت گیرد. التهاب، نمونه یک پاسخ ایمنی ذاتی است و با عبور اجرام از جمله نانوپلاستیک‌ها از سد پوششی، ایجاد می‌گردد. بنابراین گروه بزرگی از سلول‌ها و سایتوکین‌ها در فرآیند التهاب درگیر می‌باشند. فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- α) یک سایتوکین با اثرات متعدد است که توسط سلول‌های تک هسته‌ای از جمله ماکروفاژها در پاسخ به التهاب، عفونت و استرس‌های فیزیولوژیک دیگر تولید می‌شود زیرا سایتوکین‌ها بخش بسیار مهمی در سیستم ایمنی در ماهیان به‌شمار می‌آیند (Mulder *et al.*, 2007) و بررسی سطح بیان ژن‌های سایتوکین می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای وضعیت سیستم ایمنی باشد (Whyte, 2007).

پروتئین‌های HSP70 تقریباً در همه ارگان‌سیم‌ها و ارگان‌ها یافت می‌شوند. در پستانداران و اغلب یوکاریوت‌ها این پروتئین‌ها در همه اجزاء مهم سلولی نظیر سیتوزول، میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک یافت می‌شوند و در اعمالی از جمله تاخوردن پروتئین‌ها در غشاء و تجزیه پروتئین‌ها دخالت دارند. پروتئین‌های شوک حرارتی را می‌توان کاندیدای مناسب به‌عنوان زیست‌نشانگر آلودگی در مراحل ابتدایی مواجهه با آلاینده دانست (Yamashita *et al.*, 2010).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌عنوان مهم‌ترین گونه پرورشی سردآبی در ایران می‌باشد. با توجه به محدود بودن مطالعات نانوپلاستیک و خطرات احتمالی آن بر ماهیان از طریق انتقال از طریق زنجیره غذایی از این گونه به‌عنوان یک گونه حساس برای مطالعات اثرات سمیت‌شناسی و سیستم ایمنی در سطح سلولی و مولکولی نانوپلاستیک پلی‌استایرن NPsPS استفاده شد. یکی دیگر از دلایل انتخاب ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای بررسی پیامدهای انواع آلاینده در زیست‌بوم آبی، حساسیت بالای این ماهی حتی به غلظت‌های بسیار اندک در محیط آبی است (Cavas and Ergene-Gozukara, 2005). از این‌رو، انتظار بر این بود که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز بتواند نسبت به نانوذرات پلاستیک پلی‌استایرن، سطوح واکنشی استرس‌زا و بوم‌تجدیدگر را به‌خوبی آشکار کند.

جدول ۱. اطلاعات تکمیلی آغازگرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی	دمای اتصال (سلسیوس)	اندازه محصول (جفت باز)
TNFa-F	CAGGCTTCGTTTAGGGTCAAG	۵۹	۱۸۶
TNFa-R	AACTGCATTGTACCAGCCTTC	۵۹	
HSP70-F	CGAGGATGGGATCTTTGAGGTG	۵۹	۱۳۱
HSP70-R	TCTGGCTGATGTCCTTCTTGTG	۵۹	

مواد و روش‌ها

تهیه و تقسیم ماهیان: این مطالعه طی مدت ۲۸ روزه و در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. ۲۵۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی $17/24 \pm 0/5$ گرم از پرورش ماهیان سردآبی در استان البرز تهیه شدند و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش ماهی گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شدند. ماهیان به مدت ۱۴ روز جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه با غذای پایه تغذیه شدند. ماهیان پس از توزین، به صورت تصادفی در ۱۲ مخزن ۷۵ لیتری با تراکم ۱۵ قطعه در هر مخزن (۴ تیمار با ۳ تکرار) توزیع شدند. شرایط کیفی شامل دمای آب $14/76 \pm 0/87$ درجه سلسیوس، TDS و pH به ترتیب $345/83 \pm 16/05$ میلی‌گرم بر لیتر و $8/21 \pm 0/29$ بود.

تهیه نانوپلاستیک پلی‌استایرن: استایرن به عنوان مونومر، پلی‌وینیل الکل (PVA) با جرم مولکولی ۱۲۸۰۰۰ گرم بر مول به عنوان تثبیت‌کننده از شرکت مرک آلمان و بنزوئیل پراکسید از شرکت آلفا آریزر (آمریکا) خریداری شدند. ذرات پلی‌استایرن با میانگین اندازه ۷۰ نانومتر با پلی‌مریزاسیون امولسیون و تعلیقی، مطابق با تحقیقات قبلی ساخته شد (Shohani et al., 2017). جهت تأیید جنس ذرات از دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR/ATR) استفاده شد.

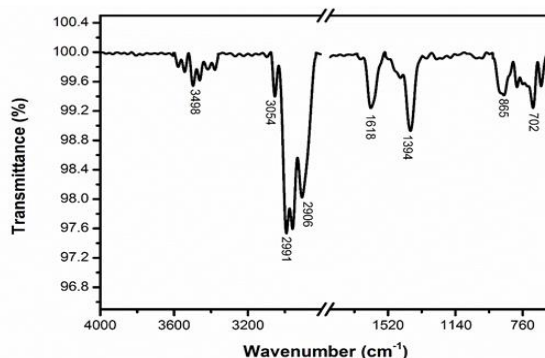
تعیین محدوده LC₅₀ و غلظت‌های آزمایش: جهت تعیین محدوده LC₅₀ (Lethal Concentration 50%) در ابتدا غلظت‌های بسیاری اعمال شد. پیش تست‌های ما نشان داد، حتی غلظت‌های بالا در محدوده ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر هم باعث مرگ و میر در مدت زمان ۹۶ ساعت نخواهد شد. پس از مرور منابع در مطالعات پیشین چه در روش‌های میدانی و آزمایشگاهی (Lai et al., 2021; Xu et al., 2022) تیمار به شرح شاهد ۰، ۰/۱، ۱۰ و ۱۰۰ mg/kg (NPs) در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی: برای تهیه و آماده‌سازی

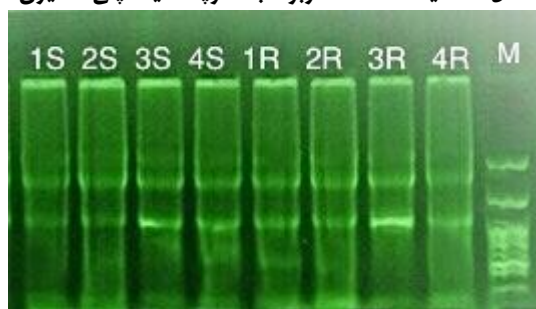
جیره غذایی ابتدا غذا رشد ۲ از شرکت ۲۱ بیضاء تهیه شد، سپس رقت‌های امولسیون نانوپلاستیک برای هر تیمار ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک با طول موج ۲۰ کیلوهرتز و توان ۱۳۰ وات سونیک شدند (Thiagarajan et al., 2019; Lai et al., 2021). سپس با استفاده از سمپلر و آب دیونیزه، رقیق و همراه با محلول ۱۰ درصد ژلاتین گاوی (Merck) جهت جلوگیری از ورود نانوذرات به محیط آبی روی غذا اسپری شد (Ramsden et al., 2009). جهت یکسان بودن شرایط برای تیمار شاهد، آب دیونیزه فاقد نانو ذره همراه با ژلاتین روی غذا تیمار شاهد اسپری شد (Lai et al., 2021). غذاهای در طول روز در ساعات ۸ صبح و ۱۵ بعدازظهر به میزان ۵ درصد وزن بدن صورت گرفت.

نمونه‌برداری: در پایان آزمایش، روز ۲۸، ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شدند و قبل از نمونه‌گیری با پودر گل میخک بیهوش شدند. در ادامه جهت مطالعات ژنتیکی، نمونه‌های بافت برای هر تیمار به صورت تصادفی از ۳ ماهی در هر تکرار گرفته شد. بافت کبد و طحال استحصال و در تیوب‌های فاقد نوکلئاز (RNase Free Tube) (RNase) و استریل گذاشته و بلافاصله در ازت مایع (دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری و بعد از روند نمونه‌برداری تا زمان انجام مراحل تکمیلی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی پرایمرها: جهت استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از هاون چینی و ازت مایع پودر شدند. استخراج RNA با کمک کیت ستونی شرکت دنازیست (Denazist, Iran) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000/USA) و با الکتروفورز ژل آگارز سنجیده شد. برای سنتز cDNA پس مرحله تیمار DNase از کیت SMOBIO cDNA synthesis استفاده شد. cDNA های سنتز شده تا شروع مراحل بعد در فریزر ۲۰-



شکل ۱- طیف FT-IR مربوط به نانوپلاستیک پلی‌استایرن



شکل ۲. باندهای RNA استخراج شده روی ژل آگارز (٪) از بافت کبد (R) و طحال (S) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

آزمون کولموگروف-اسمیرنوف از تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2010 و SPSS 26 و با انجام آزمون ANOVA یک‌طرفه و تست دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد ($P < 0/05$) تجزیه و تحلیل آماری انجام شد. نتایج به‌دست آمده به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار محاسبه شدند. در آنالیز داده‌های حاصل از مطالعات بیان ژن براساس سیکل‌های آستانه (Ct) از نمونه‌های مورد آزمایش (تیمارهای مواجهه داده‌شده با نانوپلاستیک) با نمونه‌های شاهد و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع محاسبه شد.

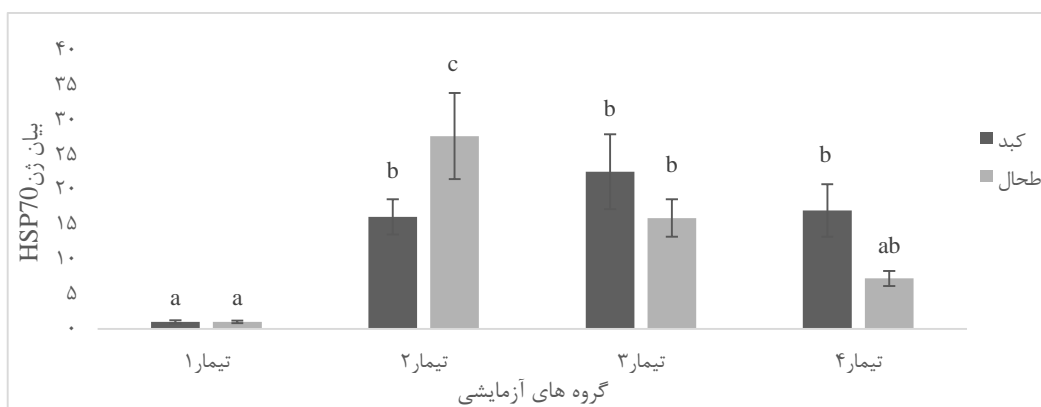
نتایج

در طیف FT-IR (Bruker (USA) – Equinox 55) مربوط به نانوپلاستیک پلی‌استایرن (شکل ۱) است. اثبات‌کننده پلی‌استایرن بودن این نانوپلاستیک بوده و ترکیبات دیگر در این طیف قابل مشاهده نیست.

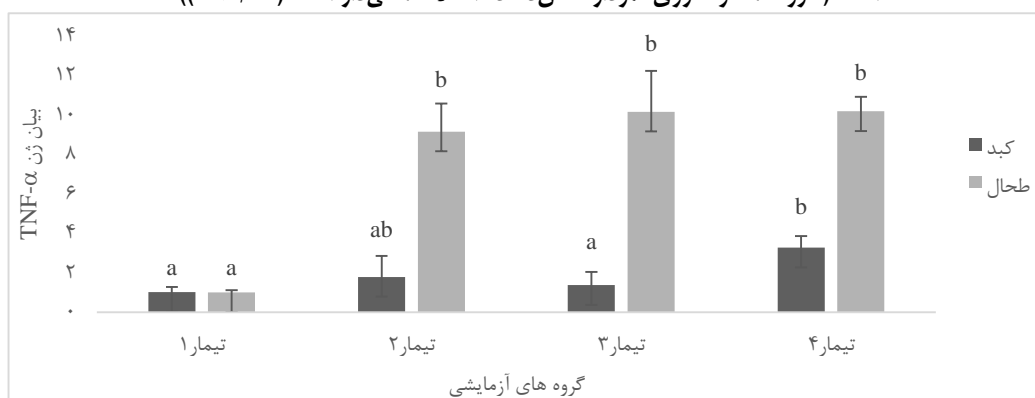
کیفیت و کمیت RNA استخراج شده: نتایج کیفی RNA استخراج شده از نمونه‌های کبد و طحال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره غذایی حاوی نانوپلاستیک پلی‌استایرن در دو باند مجزا متعلق به دو زیر واحد ۱۸ S و ۲۸ S از RNA ریبوزومی با وضوح بالا نشان داد (شکل ۲). جهت بررسی خلوص کمی نمونه‌های RNA استخراج شده

درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار primer3 مخصوص نرم‌افزار Geneious IR9.1.8 انجام شد. لیست پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

واکنش RT-PCR و Real time PCR: برای آزمایش cDNA و آغازگرها، روش RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) با استفاده از آغازگرهای لامینار (Laminar Flow Hood) با استفاده از هر نمونه انجام شد. این مربوطه در دمای بهینه و cDNA هر نمونه انجام شد. این کار با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس شرکت سیناکلون (PCR Master Mix)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمرهای رفت و برگشت و ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده (رقت ۱/۵) اجرا شد. ترکیبات ذکر شده در دستگاه ترموسایکلر (MultiGene OptiMax, Labnet International, USA) قرار گرفتند. جهت انجام واکنش Real Time PCR (Rotor Gene Q, Germany) با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و با استفاده از میکس (Ampliqon) SYBR green (2x SYBR green Low rox) با همان فرمول قبل انجام شد. در نهایت منحنی ذوب از دامنه دمایی ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با شیب ۰/۳ درجه سلسیوس ترسیم شد. همچنین نمونه‌ها در ۳ تکرار تکنیکی ران شدند. **محاسبات آماری:** پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با



شکل ۳. بیان نسبی ژن HSP70 در بافت کبد و طحال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است (حروف متفاوت روی نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)).



شکل ۴. بیان نسبی ژن TNF- α در بافت کبد و طحال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است (حروف متفاوت روی نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)).

بیان متعلق به تیمار ۲ بود ($P < 0.05$). در بیان نسبی ژن TNF- α دارای اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۲ و ۴ در بافت کبد مشاهده گردید به طوری که بیش‌ترین میزان بیان متعلق به تیمار ۴ بود ($P < 0.05$). اما اختلاف معنی‌داری بین خود تیمارها (به جز تیمار شاهد) در بافت طحال مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

در کنار روش‌های ارزیابی سایتوتوکسیک و ژنوتوکسیک، تجزیه و تحلیل بیان ژن نیز در سم‌شناسی اکولوژیکی آبیان استفاده شده است. این روش حساسیت بالایی در شناسایی آلودگی زیست‌محیطی دارد. سم‌شناسی ژنی می‌تواند به‌عنوان بررسی تغییرات ناشی از آلاینده‌ها در ماده ژنتیکی موجود در طبیعت تعریف شود.

پروتئین‌های شوک حرارتی می‌توانند گزینه مناسب به‌عنوان زیست‌نشانگر در ارزیابی میزان استرس به‌شمار آیند (Koehler et al., 2001; Varo et al., 2002;) (Heredia-Middleton et al., 2005). در بین ایزوفرم‌های

نسبت به آلودگی‌های پروتئینی، نسبت جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر در گستره ۲-۲/۱ قرار داشت. همچنین خلوص نمونه‌های RNA استخراج شده نسبت به آلودگی‌های نمکی و سایر آلاینده‌ها، جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر در گستره ۱/۵-۲/۱ قرار داشت. محدوده غلظت RNAهای استخراج شده نیز از ۵۰۰ تا ۱۳۰۰ ng/ μ l گزارش گردید.

ارزیابی بیان ژن‌ها: روند تغییرات بیان نسبی ژن HSP70 و TNF- α در بافت کبد و طحال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار غذایی ذرات نانوپلاستیک پلی‌استایرن به مدت ۲۸ روز در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. براساس نتایج میزان بیان این ژن‌ها در تیمارهای غذایی نانوپلاستیک درون بافت‌های کبد و طحال روند افزایشی معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشته است ($P < 0.05$). اما در بیان ژن HSP70 اختلاف معنی‌داری بین تیمارها (به جز تیمار شاهد) در بافت کبد مشاهده نشد ($P > 0.05$). با این حال اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در بافت طحال مشاهده گردید به طوری که بیش‌ترین میزان

ایمنی ماهی سیبرییم (*Sparus aurata*) در غلظت‌های انتخابی بود (Barría et al., 2020).

فاکتور نکروز کننده تومور یک سایتوکین پیش‌التهابی است که عموماً در جریان التهاب‌های سیستمیک و واکنش فاز حاد حضور آن مشهود است. TNF- α در ماهیان بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Goetz et al., 2004) و دارای نقش‌های متعددی می‌باشد، اما نقش اصلی آن، تنظیم وظایف سلول‌های ایمنی می‌باشد (Gruss, 1996). در مطالعه حاضر طبق نتایج میزان بیان این ژن در تیمارهای غذایی نانوپلاستیک درون بافت‌های کبد و طحال روند افزایشی معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت. اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در بافت کبد مشاهده گردید به طوری که بیش‌ترین میزان بیان متعلق به تیمار ۴ بود. اما اختلاف معنی‌داری بین خود تیمارها (به‌جز تیمار شاهد) در بافت طحال مشاهده نشد. براساس نتایج دیگر، داده‌ها نشان می‌دهد که بیان ژن TNF- α در بافت عضلانی ماهی سیبرییم (*Sparus aurata*) در سائز انگشت‌قندی که در معرض ذرات نانوپلاستیک قرار گرفته‌اند، کاهش سطوح ژن TNF- α را نشان می‌دهد (Barría et al., 2020; Yong et al., 2020). سایتوکین‌هایی از جمله TNF α ماکروفاژها را تحریک می‌کنند تا گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را به‌عنوان بخشی از دفاع ضد باکتریایی تولید کنند، که به نوبه خود ممکن است باعث بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی برای به حداقل رساندن آسیب استرس اکسیداتیو شود (Grayfer et al., 2018). در ماهی، مانند پستانداران، بیان افزایش یافته ژن‌های سیستم کولینرژیک (Cholinergic)، تنظیم پاسخ‌های التهابی را نشان می‌دهد و واکنش ایمنی را با استفاده از هیدرولیز استیل کولین ضد التهابی (Ach) به‌واسطه Acetylcholinesterase (AChE) کنترل می‌کند، که قادر به مهار تولید TNF α و سایر سایتوکین‌های پیش‌التهابی می‌باشد (Rosas-Ballina and Tracey, 2009). به‌طور کلی اثرات سمی نانوپلاستیک‌ها فعال سازی/مهار ژن‌ها در سیستم ایمنی آبزیان، بین گونه‌ها و اندام‌های مختلف متفاوت و شناخته نشده است، که ضرورت تحقیقات گسترده‌تر را در این زمینه نشان می‌دهد (Barría et al., 2020).

به‌عنوان یک نتیجه‌گیری کلی، یافته‌های این تحقیق نشان داد که نانوپلاستیک پلی‌استایرن به‌عنوان یک آلاینده

مختلف پروتئین‌های شوک حرارتی، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، پروتئین غالبی است که به‌دنبال ورود آلودگی‌ها افزایش بیان پیدا می‌کند. تغییرات در بیان پروتئین شوک حرارتی در پاسخ به آلودگی‌های محیطی در رده‌های سلولی و بافت‌های ماهی بررسی شده است (Iwama et al., 1997).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که میزان بیان ژن HSP70 در بافت کبد و طحال تحت تأثیر نانوپلاستیک پلی‌استایرن افزایش بیان را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد، که می‌توان از این ژن به‌عنوان یک نشانگر برای نانوپلاستیک پلی‌استایرن استفاده کرد. Lee و همکاران (۲۰۱۴) پژوهشی درباره اثرات فلزات سنگین در ارتباط با میزان بیان ژن شوک حرارتی انجام دادند، که نتایج حاصل نشان داد اکثر فلزات سنگین سبب افزایش بیان این ژن می‌شوند. در مطالعه‌ای دیگر اثرات آلاینده‌ها بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد، که نتایج حاصل نشان داد آلاینده‌ها باعث افزایش میزان استرس در اندام‌های مختلف این ماهی می‌شوند که یکی از پروتئین‌هایی که به سرعت افزایش می‌یابد، پروتئین شوک حرارتی ۷۰ است. همچنین بیان داشتند که بیشترین میزان افزایش بیان ژن شوک حرارتی ۷۰ مربوط به بافت آبشش است (Williams et al., 2002). در مطالعه حاضر ارتباط مستقیم بین افزایش بیان ژن با افزایش میزان دوز در هر دو بافت کبد و طحال مشاهده شد به طوری که در تمامی تیمارهای نانوپلاستیک پلی‌استایرن افزایش بیان ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید. اما بیشترین میزان بیان در بافت طحال متعلق به تیمار ۲ بود. در مطالعه دیگر بر روی ماهی باس راه‌راه (*Morone saxatilis*) در مواجهه با اثر چهار ساعته سم اسفنوالریت افزایش بیان ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در بافت‌های کبد و طحال گزارش شد (Geist et al., 2007). در پژوهشی دیگر بررسی رفتارشناسی و بیان ژن شوک حرارتی بر روی ماهی باس راه‌راه (*Morone saxatilis*) در مواجهه با فلز مس و سم اسفنوالریت انجام شد، نتایج بیانگر حساسیت بیشتر غلظت‌های پایین‌تر بر بیان ژن HSP70، رفتار شنا، رشد و مرگ و میر بود (Rhee et al., 2009). در تحقیق دیگر بیان ژن HSP70 در بافت ماهیچه در مواجهه با مقادیر مختلف نانوپلاستیک پلی‌متیل متاکریلات نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود، که نشان دهنده فرآیند کنترل شده التهابی و عدم تحریک سیستم

تیمارها معنی‌دار نبود. برای ژن TNF- α در بافت کبد بیشترین بیان متعلق به بالاترین غلظت (تیمار ۴) بود و در بافت طحال روند افزایش بیان، میان تیمارها معنی‌دار نبود. احتمالاً در صورت ادامه مواجهه آلودگی، این تغییرات می‌تواند در سطوح دستگاه، موجود، جمعیت و اکوسیستم اثر گذار باشد. با این وجود تحقیقات بیشتری باید در آینده در مورد جنبه‌های مختلف قابلیت اثرگذاری بر اجزای مختلف سیستم ایمنی موجودات آبی انجام شود.

در سطوح مختلف بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثرگذار است. این مطالعه نشان داد، ورود این ذرات از طریق لوله گوارش باعث تغییر در پارامترهای مهمی در سیستم ایمنی گونه هدف می‌شود. به‌طور کلی پاسخ زیستی این گونه به استرس آلاینده با تغییرات در سطوح مولکولی و با افزایش بیان ژن‌های HSP70 و TNF- α نسبت به تیمار شاهد ردیابی شد. به‌طوری که برای ژن HSP70 بیشترین بیان در بافت طحال متعلق به کمترین غلظت نانوپلاستیک (تیمار ۲) بود و همچنین روند افزایش بیان این ژن در بافت کبد میان

منابع

- Auta H.S., Emenike C.U., Fauziah S.H. 2017.** Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International* 102, 165-176.
- Avio C.G., Gorbi S., Regoli F. 2017.** Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research* 128, 2-11.
- Barría C., Brandts I., Tort L., Oliveira M., Teles M., 2020.** Effect of nanoplastics on fish health and performance: A review. *Marine Pollution Bulletin* 151, 110791.
- Campanale C., Massarelli C., Savino I., Locaputo V., Uricchio V.F., 2020.** A detailed review study on potential effects of microplastics and additives of concern on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(4), 1212.
- Cavaş T., Ergene-Gozukara S. 2005.** Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74(3), 264-271.
- Da Costa J.P., Santos P.S., Duarte A.C., Rocha-Santos T. 2016.** (Nano) plastics in the environment—sources, fates and effects. *Science of the Total Environment* 566, 15-26.
- Fadare O.O., Wan B., Guo L.H., Xin Y., Qin W., Yang Y., 2019.** Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastic particles to *Daphnia magna*. *Environmental Science: Nano* 6(5), 1466-1477.
- Geist J., Werner I., Eder K.J., Leutenegger C.M. 2007.** Comparisons of tissue-specific transcription of stress response genes with whole animal endpoints of adverse effect in striped bass (*Morone saxatilis*) following treatment with copper and esfenvalerate. *Aquatic Toxicology* 85(1), 28-39.
- Gigault J., Ter Halle A., Baudrimont M., Pascal P.Y., Gauffre F., Phi T.L., El Hadri H., Grassl B., Reynaud S. 2018.** Current opinion: what is a nanoplastic? *Environmental Pollution* 235, 1030-1034.
- Goetz F.W., Planas J.V., MacKenzie S. 2004.** Tumor necrosis factors. *Developmental & Comparative Immunology* 28(5), 487-497.
- Grayfer L., Kerimoglu B., Yaparla A., Hodgkinson J.W., Xie J., Belosevic M. 2018.** Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity. *Frontiers in Immunology* 9, 1105.
- Gruss H.J. 1996.** Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 26(3), 143-159.
- Heredia-Middleton P., Brunelli J., Drew R.E., Thorgaard G.H. 2008.** Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149(4), 552-556.
- Iwama G.K., Takemura A., Takano K., 1997.** Oxygen consumption rates of tilapia in fresh water, sea water, and hypersaline sea water. *Journal of Fish Biology* 51(5), 886-894.
- Kim G.H., Kim J.E., Rhie S.J., Yoon S. 2015.** The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental Neurobiology* 24(4), 325.
- Koehler H.R., Bartussek C., Eckwert H., Farian K., Gränzer S., Knigge T., Kunz N. 2001.** The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various

- levels of pollution. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8(3), 261-279.
- Lai W., Xu D., Li J., Wang Z., Ding Y., Wang X., Li X., Xu N., Mai K., Ai Q. 2021.** Dietary polystyrene nanoplastics exposure alters liver lipid metabolism and muscle nutritional quality in carnivorous marine fish large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Hazardous Materials* 419, 126454.
- Lee J.W., Kim J.E., Shin Y.J., Ryu J.S., Eom I.C., Lee J.S., Kim Y., Kim P.J., Choi K.H., Lee B.C., 2014.** Serum and ultrastructure responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) during long-term exposure to zinc oxide nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104, 9-17.
- Lithner D., Larsson Å., Dave G. 2011.** Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of the Total Environment* 409(18), 3309-3324.
- Martin L.M., Gan N., Wang E., Merrill M., Xu W. 2022.** Materials, surfaces, and interfacial phenomena in nanoplastics toxicology research. *Environmental Pollution* 292, 118442.
- Mulder I.E., Wadsworth S., Secombes C.J. 2007.** Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 23(4), 747-759.
- O'Connor J.D., Mahon A.M., Ramsperger A.F., Trotter B., Redondo-Hasselerharm P.E., Koelmans A.A., Lally H.T., Murphy S., 2020.** Microplastics in freshwater biota: a critical review of isolation, characterization, and assessment methods. *Global Challenges* 4(6), 1800118.
- Piccardo M., Renzi M., Terlizzi A. 2020.** Nanoplastics in the oceans: theory, experimental evidence and real world. *Marine Pollution Bulletin* 157, 111317.
- Ramsden C.S., Smith T.J., Shaw B.J., Handy R.D. 2009.** Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* 18(7), 939-951.
- 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 Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(1), 104-112.
- Rosas-Ballina M., Tracey K.J. 2009.** Cholinergic control of inflammation. *Journal of Internal Medicine* 265(6), 663-679.
- Shohani N., Pourmahdian S., Hadavand B.S., 2017.** November. Response surface methodology for design of porous hollow sphere thermal insulator. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 269(1), 12073. IOP Publishing.
- Thiagarajan V., Pavani M., Archana S., Seenivasan R., Chandrasekaran N., Suraishkumar G.K., Mukherjee A. 2019.** Diminishing bioavailability and toxicity of P25 TiO₂ NPs during continuous exposure to marine algae *Chlorella* Sp. *Chemosphere* 233, 363-372.
- Varo I., Serrano R., Pitarch E., Amat F., Lopez F.J., Navarro J.C. 2002.** Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42(2), 229-235.
- Whyte S.K., 2007.** The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 23(6), 1127-1151.
- Williams B.A., Hirt R.P., Lucocq J.M., Embley T.M. 2002.** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418(6900), 865-869.
- Xu K., Ai W., Wang Q., Tian L., Liu D., Zhuang Z., Wang J., 2022.** Toxicological effects of nanoplastics and phenanthrene to zebrafish (*Danio rerio*). *Gondwana Research* 108, 127-132.
- Yamashita M., Yabu T., Ojima N. 2010.** Stress protein HSP70 in fish. *Aqua-BioScience Monographs* 3(4), 111-141.
- Yong C.Q.Y., Valiyaveetil S., Tang B.L. 2020.** Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(05), 1509.
- Zhang B., Chao J., Chen L., Liu L., Yang X., Wang Q. 2020.** Research progress of nanoplastics in freshwater. *Science of the Total Environment* 757, 143791.

Determining the effects of different levels of polystyrene nanoplastics on the expression of immune-related- genes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Melika Mirzaei Nashtoroudi¹, Kamran Rezaei Tavabe*¹, Amirreza Abed Elmdoust¹, Gholamreza Rafiee¹, Hassan Rahimian², Behzad Shirkavand Hadavand³

¹Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

²Department of Zoology, Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.

³Department of Resin and Additives, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran.

*Corresponding author: krtavabe@ut.ac.ir

Received: 10.Apr.2023

Accepted: 06.Jun.2023

Abstract

Most of the plastic materials used for food packaging are non-biodegradable, resulting in more environmental pollution. Hence, this study was designed and conducted to measure the effect of toxicity of the PSNPs while transferring from the diet to the body of the fish (food concentrations = 0, 0.1, 10, and 100 mg/kg) on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a 28-day chronic treatment and the control group (food concentration= 0mg/kg) after the 7-day adaptation period, in three repetitions (15 juvenile trout were included in each repetition per concentration). In addition, changes in two genetic biomarkers of the immune system and stress in the expression profile of the liver and spleen tissues indicated that following the increase in the concentration of PSNPs, the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and expression level of heat shock protein 70 (HSP70) in both liver and spleen tissues significantly increased with the increase of mRNA transcription ($P<0.05$). Based on the obtained results, the release of NPsPS was confirmed for health and safety at the cellular-molecular level in the aquatic sample under study, and it is likely that if this nanomaterial is released in the aquatic environment, it will induce adverse environmental effects.

Keywords: Toxicology, 70 heat shock proteins, Tumor necrosis factor Alpha, *Oncorhynchus mykiss*