

اثرات نانوذره دی اکسید تیتانیوم و ویتامین E بر بیان ژن های *CYP1A4* و *TOJ3* در بلدرچین ژاپنی

Effects of titanium dioxide nanoparticles on the expression of *CYP1A4* and *TOJ3* genes of Japanese quail

جلال رستم زاده^{*}، هیوا جلالی^۱، زهرا حیدری^۱، اردشیر احمدی^۱

۱- به ترتیب استادیار، دانشجویان کارشناسی ارشد، استادیار، ژنتیک گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه کردستان

Rostamzadeh J^{*1}, Jalali H¹, haydari Z¹, Sheikhhahmadi A¹

1- Assistant Professor, MSc Student, Assistant Professor, Department of Animal
Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: j.rostamzadeh@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

استفاده از نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2NP_s) به طور روز افزون در تغذیه دام و طیور در حال افزایش است. این ذرات می توانند سبب ایجاد آپتوز، آسیب های اکسیداتیو، پاسخ های التهابی ایمنی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی شوند و رونویسی، ترجمه، چرخه و تمایز سلولی را تحت تاثیر قرار دهند. سمیت زدایی موادمسمی درون زا و خارجی به وسیله سیتوکروم 450s (CYPs) کاتالیز می شود. ژن *CYP1A* توسط بسیاری از آلاینده های زیست محیطی القا شده و در بسیاری از مطالعات پایش زیستی مورد استفاده قرار گرفته است. ژن *TOJ3* (هومولوگ ژن *MCRS1*) به عنوان یک انکوژن رفتار می نماید و در تراخی و تومورزایی سلولی القایی توسط Jun نقش مهمی ایفا می کند. در این پژوهش، تغییرات احتمالی بیان ژن های *CYP1A4* و *TOJ3* در بافت کبد بلدرچین ژاپنی بعد از قرار گرفتن در معرض TiO_2NP_s و ویتامین E مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تحقیق حاضر با استفاده از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که در حیوانات تیمار شده با مقدار ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم نانوذره در کیلوگرم جیره سطح بیان ژن های *CYP1A4* و *TOJ3* در کبد، ۹۰ روز پس از قرار گرفتن در معرض TiO_2NP_s به صورت معنی داری افزایش یافت. همچنین ۲۰۰ میلی گرم ویتامین E توانست میزان بیان هر دو ژن را در تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم TiO_2NP_s در جیره، به صورت معنی داری کاهش دهد. در حالی که در تیمار ۵۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s همراه با ۲۰۰ میلی گرم ویتامین E فقط بیان ژن *TOJ3* به صورت معنی داری کاهش یافت. بیان هر دو ژن در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم ویتامین E در جیره به طور معنی داری کاهش یافت. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تیمار با TiO_2NP_s می تواند موجب تغییر در بیان ژن شود.

واژه های کلیدی

بیان ژن

کبد

نانو ذرات

CYP1A4
TOJ3

مقدمه

توسعه صنعت نانوتکنولوژی منجر به تولید و کاربرد گسترده انواع مختلفی از نانوذرات شده است. در میان این نانوذرات، در چند سال گذشته TiO_2NP_s به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد از جمله نسبت بالای سطح به وزن و واکنش پذیری بالا به عنوان ذره زیست سازگار غیر سمی و خنثی از نظر شیمیایی یا یک فتوکاتالیست، به طور افزایشی در حذف بسیاری از آلاینده های محیطی (ضد عفونی هوا، تصفیه آب و فاضلاب)، داروسازی، صنایع آرایشی و گندزدایی در افزودنی های غذایی به طور وسیعی استفاده شده است (Ma et al. 2009; Gui et al. 2013). علی رغم این خواص جالب، اطلاعات منتشر شده اخیر دلالت بر سمیت این مواد دارد. میزان سمیت نانوذرات با خواص فیزیکی و شیمیایی آن ارتباط دارد. اندازه های کوچک تر، واکنش پذیری، مؤثرتر و دارای سمیت بیشتری هستند. تنش اکسیداتیو یکی از مهم ترین مکانیسم های ایجاد کننده سمیت در کبد، کلیه، ریه، مغز و طحال می باشد (Soliman et al. 2013). نشان داده شده که درجه آسیب سلولی و تنش اکسیداتیو ناشی از TiO_2NPs با اندازه و ترکیب شیمیایی این مواد در ارتباط می باشد (Hoet et al. 2004).

برخی از مطالعات گزارش داده اند که TiO_2NP_s از طریق گردش خون به بافت های مختلف منتقل می شود و اثرات مضر را اعمال می کند. محققان نشان داده اند که استفاده از TiO_2NP_s در موش های ماده منجر به آسیب به کبد، طحال، کلیه، مغز، بیضه ها و تخمدان ها شده است (Gao et al. 2012). با تجزیه و تحلیل ریز آرایه ای کلیه موش در معرض TiO_2NP_s تغییر بیان بیش از ۱۲۰۰ ژن نشان داده شد که در پاسخ های التهابی ایمنی، تنش اکسیداتیو، انتقال یون ها، فرایندهای متابولیکی، رونویسی و ترجمه، چرخه و تمایز سلولی دخالت داشتند (Gui et al. 2013).

سیتوکروم ها (CYP) پروتئین های آهن داری هستند که ناقل های اصلی الکترون محسوب می شوند (Cui et al. 2010). از نشانگرهای زیست محیطی برای نظارت بر اثرات بیولوژیکی گروه های آگروبیوتیکی همچون فلزات سنگین، CYP1A است که در زیست دگرگونی و سم زدایی ترکیبات درونزا و برونزا نقش دارد. در کبد که اصلی ترین ارگان متابولیک بدن است این مواد

شامل داروها، مواد سمی و همچنین محصولات متابولیک مثل بیلی روبین می باشند. سیتوکروم ها توسط آلاینده هایی که وارد بدن شده القا و پس از واکنش با آلاینده ها سبب افزایش حلالیت آن ها در آب و دفع از بدن می شوند (Cheraghi et al. 2013). در طیور دو نوع از CYP1A ها شامل CYP1A4 و CYP1A5 شناخته شده است که کاتالیست انتخابی برای متابولیسم ترکیبات درونزا و یا تغییر شکل زنبیوتیک ها می باشد (Yang et al. 2013). ژن *TOJ3* (هومولوگ ژن *MCRS1*) به عنوان یک ژن سرطانزا در طی تغییر شکل فیروبلات رفتار می کند. افزایش بیان *MCRS1* در یک نوع از سرطان های انسانی به اثبات رسیده است و این افزایش بیان، منجر به تکثیر سلول های سرطانی می شود (Xu et al. 2012). ژن سرطانزای *v-jun* عامل تراریختی و ویروسی تومور سارکومای پرندگان ۱۷^۱ (ASV17) می باشد که رترو ویروسی جدا شده از فیروسارکومای بدخیم مرغی است. آنکو پروتئین *v-jun* نمایانگر یک نسخه جهش یافته از همتای سلولی *c-jun* است که به عنوان یک جزء فعال کننده مجموعه فاکتور رونویسی *AP-1*^۲ عمل می کند. *AP-1* برای تنظیم تکثیر و تمایز سلولی ضروری می باشد (Bader et al. 2001). به هر حال تعداد کمی از اهداف *AP-1* مثل *TOJ3* شناسایی شده که پتانسیل سرطانزا بودن را نشان می دهد (Karagiannidis et al. 2008). افزایش پاسخ های ایمنی با استفاده از روش های جایگزین واکسن ها و آنتی بیوتیک ها مانند انتخاب برای افزایش مقاومت به بیماری ها یا با استفاده از رژیم های غذایی بر پایه تعدیل گرهای ایمنی (همچون ویتامین ها) مجموعه ای از استراتژی های اعمال مدیریت در صنعت بهداشت و درمان طیور را بوجود آورده است. فهم تنظیم ژنتیکی این فرایندها منجر به بهبود ایمنی و اقتصادی شدن تولیدات مرغ و همچنین کاهش پتانسیل برای توسعه ای مقاومت به درمان ضد میکروبی شده است (Kumar et al. 2011). در این میان، استفاده از ترکیبات مختلف برای کاهش تنش اکسیداتیو همانند ویتامین E مورد توجه زیادی قرار گرفته است. در پرندگان نیز استفاده از ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان در موارد مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است (Kidd 2004). تاکنون پژوهشی در مورد اثرات آنتی اکسیدانی

¹ avian sarcoma virus 17² activator protein 1

استخراج RNA با استفاده از کیت CinnaPure RNA، شرکت سیناژن انجام گرفت. برای از بین بردن DNA موجود در نمونه‌ها از کیت DNase شرکت سیناژن استفاده شد. کمیت RNAهای بدست آمده با استفاده از دستگاه بایوفتومتر کمپانی اپندورف اندازه گیری شد و نمونه‌ها بر اساس میزان غلظت RNA هم غلظت شدند و برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. پس از این مرحله، سنتز cDNA از نمونه‌های مورد تأیید صورت گرفت. برای تبدیل توالی‌های mRNA به رشته‌های cDNA از آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase شرکت سیناژن استفاده شد.

طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo7 و oligoanalyzer انجام شد (جدول ۱). آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی توسط شرکت سیناژن سنتز شدند. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در دستگاه ترمال سایکلر ساخت شرکت Corbett به منظور تکثیر توالی‌های مورد نظر انجام شد. برای بررسی بیان ژن به صورت نیمه کمی (RT-PCR)، بیان ژن در چرخه‌های متفاوت بررسی و پس از ارزیابی نتایج روی ژل آگارز بهترین چرخه به تعداد ۲۸ برای بررسی بیان ژن مورد نظر و کنترل داخلی آن انتخاب شد. مبنای انتخاب بر اساس نرسیدن به وضعیت ثابت (قرار داشتن در فاز لگاریتمی) در نمودار تکثیر محصول PCR بود.

چرخه‌های PCR به ترتیب شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴ دقیقه و ۲۸ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ژن *CYP1A4* و ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ژن *TOJ3* به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۵ ثانیه و در انتها به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

ویتامین E بر کاهش عوارض سمی ذکر شده در مورد نانو ذرات گزارش نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی میزان بیان ژن-های *TOJ3* و *CYP1A4* به منظور درک اثرات TiO_2NP_s در بروز پاسخ‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو و تکثیر سلولی در بافت کبد و نیز به منظور بررسی نقش ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان در کاهش آسیب سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ۲۴ قطعه بلدرچین ژاپنی (شش تیمار و هر تیمار شامل چهار تکرار) در طول مدت ۹۰ روز با جیره حاوی TiO_2NP_s پوشش‌دار شده با نانو ذره‌ی نقره در دو سطح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به عنوان سطوح نهایی و ویتامین E در دو سطح صفر و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تغذیه شدند. تیمارها شامل جیره‌ی شاهد، جیره حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E، جیره حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم TiO_2 ، جیره حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم TiO_2 همراه با ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، جیره حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم TiO_2 و جیره حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم TiO_2 همراه با ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E بود. اندازه نانو ذرات مورد استفاده برای انجام این تحقیق کمتر از ۱۰ nm بود و این محصول از شرکت پارس نانو نصب خریداری شد. ویتامین E مورد استفاده از شرکت غرب دانه استان کردستان، شهرستان سنجید تهیه شد. در پایان دوره‌ی آزمایشی، از کبد بلدرچین‌ها نمونه برداری شد و نمونه‌ها در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده و خصوصیات آن‌ها

اندازه محصول (bp)	Tm	آغازگر (5'→3')	ژن
۱۹۰	۵۷/۶	CAGGACTCCATACCCAAGAA TGCGTGACATCAAGGAGAAG	بتا اکتین
۲۷۹	۵۴	GTCAATACCCGTTTCGATGC CTCTGCCTGAATCTTCTCTG	<i>CYP1A4</i>
۱۳۶	۵۸/۹	ATGAGCCAACCCACACTCGA CAGCACATCATCCCGTACATCC	<i>TOJ3</i>
	۵۷/۸		

۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s ، به صورت معنی داری کاهش دهد. بررسی سمیت سلولی نانوذراتی نظیر SiO_2 نشان داده است که اثر این مواد وابسته به اندازه ذره، زمان در معرض بودن و دوز مورد استفاده می باشد (Lin et al. 2006). ذرات ریزتر به علت سطح واکنش دهندگی بالاتر دارای اثرات بیشتری هستند. TiO_2NP_s با اندازه ۲۵ نانومتر اثرات التهابی بیشتری نسبت به ذرات با اندازه ۲۵۰ نانومتر در موش ایجاد کردند (Oberdörste et al. 2005).

تنش اکسیداتیو یکی از مکانیسم های مهم آسیب های بیولوژیکی می باشد که از آن به عنوان یکی از چندین علت آسیب به عملکرد طیور یاد می شود. در طی تنش اکسیداتیو محصولات اکسیداتیو و مواد حد واسطی تولید می شوند که می توانند موجب اکسید شدن لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک در بافت های حیوانی شوند (Lin et al. 2006). هنگامی که نانو ذرات وارد سلول می شوند، در داخل میتوکندری موجب اختلال در زنجیره انتقال الکترون، آسیب ساختاری و فعال کردن سیستم های آنزیمی همانند سیستم $NADPH^1$ و در نهایت موجب دیپلاریزه شدن غشای میتوکندری شده و سبب تحریک تولید رادیکال های فعال اکسیژن می شود (Xia et al. 2006). آسیب های ژنتیکی ممکن است به طور مستقیم در اثر واکنش نانو ذرات با مواد ژنتیکی به وجود بیاید یا اثرات ثانویه حاصل از تولید رادیکال های فعال اکسیژن باشد (Xie et al. 2012). مکانیسم مولکولی آسیب اکسیداتیو توسط TiO_2NP_s در کبد بررسی شده است. گزارش های قبلی نشان داده که دوز بالای TiO_2NP_s می تواند سبب حمله اکسیداتیو و آسیب به عملکرد کبد در موش شود (Wang et al. 2008). میزان تولید ROS^2 در کبد ناشی از دی اکسید تیتانیوم به طور قابل توجهی بالا می رود و این نشان می دهد که کبد از تنش اکسیداتیو رنج می برد. برهمکنش بین H_2O_2 و O_2 تولید رادیکال های O_2 و OH می نماید که می تواند منتهی به پراکسیداسیون چربی های غیر اشباع غشای سلولی شود (Cui et al. 2010).

حجم نهایی PCR برای هر نمونه ۲۰ میکرولیتر بود که شامل ۱۰ میکرولیتر از Master Mix 2x، پرایمر Beta actin با غلظت ۸۰ pmol، پرایمر اختصاصی با غلظت ۸۰ pmol و cDNA در حجم ۲۰ میکرولیتر بود. سپس محصولات PCR برای بررسی، بر روی ژل آگارز دو درصد بارگذاری شدند. برای مقایسه داده ها، بعد از عکس برداری، مساحت باند با استفاده از نرم افزار Gel Qunt.NET به صورت کمی اندازه گیری شد. نسبت بیان هر ژن به ژن مرجع تعیین شد و با استفاده از نرم افزار SAS V8 تجزیه داده ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

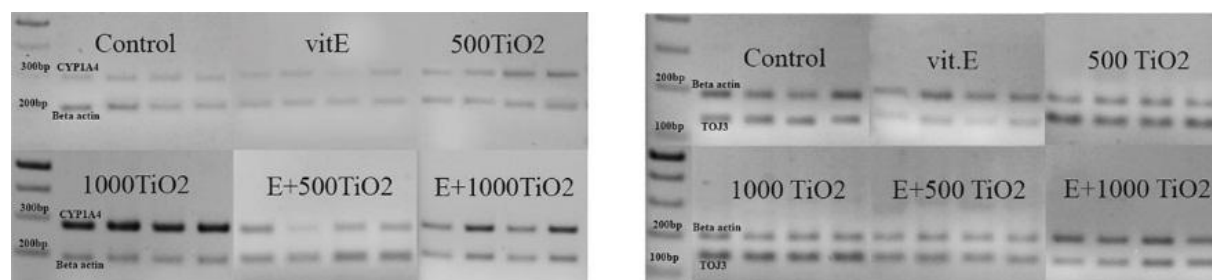
نتایج حاصل از تأثیر بیان هر ژن در هر تیمار و در مقایسه با ژن مرجع بتا اکتین در شکل ۱ نشان داده شده است. جدول ۲ میزان بیان ژن های $CYP1A4$ و $TOJ3$ را تحت تأثیر TiO_2NP_s نشان می دهد. میزان بیان ژن $CYP1A4$ تحت تأثیر TiO_2NP_s به صورت معنی داری در دوزهای ۵۰۰ میلی گرم ($p < 0.05$) و ۱۰۰۰ میلی گرم ($p < 0.01$) در کیلوگرم جیره افزایش یافت. ویتامین E موجود در تیمارها، میزان بیان $CYP1A4$ را نسبت به گروه شاهد تغییر نداد. در تیمار ۵۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s به همراه ۲۰۰ میلی گرم ویتامین E، میزان بیان ژن $CYP1A4$ در مقایسه با تیمار ۵۰۰ میلی گرم TiO_2 کاهش یافت، اما این کاهش معنی دار نبود. همچنین تحت تأثیر ویتامین E در تیمار حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2 میزان بیان ژن $CYP1A4$ به طور معنی داری کاهش یافت.

تیمار ۵۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s ، بیان ژن $TOJ3$ را در سطح پنج درصد و تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s بیان این ژن را در سطح یک درصد به صورت معنی داری افزایش داد. مقدار ویتامین E در تیمار با ۵۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s ، میزان بیان این ژن را به صورت معنی داری نسبت به تیمار شاهد کاهش داد و در تیمار با ۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s این مقدار ویتامین E میزان بیان ژن را به صورت معنی داری در سطح پنج درصد کاهش داد.

بنابراین با توجه به مطالب گفته شده می توان بیان کرد که در تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2NP_s بیان هر دو ژن به صورت معنی داری افزایش یافته است. هم چنین می توان گفت که ۲۰۰ میلی گرم ویتامین E توانسته میزان بیان هر دو ژن را در تیمار

¹ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

² Reactive oxygen species



شکل ۱- بیان ژن *CYP1A4* در سمت چپ و ژن *TOJ3* در سمت راست در تیمارهای مختلف نسبت به ژن مرجع بتا اکتین نشان داده شده است.

جدول ۲- مقایسات میانگین نسبت بیان ژن مورد بررسی به ژن مرجع در هر تیمار

اثرات سطوح مختلف	<i>TOJ-3</i> ± SE μ	<i>CYP1A4</i> ± SE μ
اثر ویتامین E		
صفر میلی گرم ویتامین E	۱/۰۸۹ ^a ± ۰/۰۸۹	۲/۲۷۷ ^a ± ۰/۱۶۳
۲۰۰ میلی گرم ویتامین E	۰/۷۱۴ ^b ± ۰/۰۸۵	۱/۶۸۲ ^b ± ۰/۱۷۲
اثر دی اکسید تیتانیوم		
صفر میلی گرم دی اکسید تیتانیوم	۰/۴۸۶ ^b ± ۰/۱۰۴	۰/۹۱۰ ^c ± ۰/۱۹۹
۵۰۰ میلی گرم دی اکسید تیتانیوم	۱/۰۲۷ ^a ± ۰/۱۱۲	۱/۸۶۳ ^b ± ۰/۲۱۵
۱۰۰۰ میلی گرم دی اکسید تیتانیوم	۱/۱۹۱ ^a ± ۰/۱۰۴	۳/۱۶۶ ^a ± ۰/۱۹۹
ویتامین E × دی اکسید تیتانیوم		
شاهد	۰/۵۹۷ ^{cd} ± ۰/۱۴۸	۰/۸۶۸ ^d ± ۰/۲۸۲
۲۰۰ ویتامین E	۰/۳۷۵ ^d ± ۰/۱۴۸	۰/۹۵۲ ^{cd} ± ۰/۲۸۲
۵۰۰ دی اکسید تیتانیوم	۱/۲۳۷ ^{ab} ± ۰/۱۷۱	۱/۸۶ ^b ± ۰/۲۸۲
۵۰۰ دی اکسید تیتانیوم + ویتامین E	۰/۸۱۷ ^{bc} ± ۰/۱۴۸	۱/۸۶۷ ^{bc} ± ۰/۳۲۶
۱۰۰۰ دی اکسید تیتانیوم	۱/۴۳۲ ^a ± ۰/۱۴۸	۴/۱۰۲ ^a ± ۰/۲۸۲
۱۰۰۰ دی اکسید تیتانیوم + ویتامین E	۰/۹۵ ^{bc} ± ۰/۱۴۸	۲/۲۳ ^b ± ۰/۲۸۲

موجودات زنده سیستم‌های دفاعی مختلفی برای مواجهه شدن با رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط سلول‌ها دارند. در طبیعت، هزاران ترکیب آنتی‌اکسیدانی وجود دارد که می‌تواند توسط حیوانات علیه رادیکال‌های آزاد استفاده شود (Surai et al. 2002). ویتامین E یکی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته شده است که می‌تواند از اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیر در غشای سلولی جلوگیری کند (Lin et al. 2006). همچنین تأثیر مثبت ویتامین E بر عملکرد رشد، تنش اکسیداتیو و بهبود کیفیت گوشت نشان داده شده است (Lu et al. 2014).

همان‌طور که در مقدمه ذکر شد استفاده از TiO_2NPs باعث تغییر در بیان ژن‌های زیادی در سلول‌های کشت داده شده می‌شود. استفاده از این نانو ذرات در جیره بلدرچین‌های ژاپنی با و بدون

ویتامین E و بررسی تغییرات احتمالی در بیان ژن‌های *CYP1A4* و *TOJ3* هدف تحقیق حاضر بود. این دو ژن به ترتیب در فرایندهای سم‌زدایی و ایجاد سرطان در بدن دخالت دارند. آنزیم CYP در سطح سیتوپلاسمی قرار گرفته و اتصال آن به غشا در چرخه‌های اکسید و ردوکتازی ضروری است. در یک بررسی، افزایش در بیان *CYP* تحت تأثیر نانو ذرات کربن گزارش شد که می‌تواند ناشی از اثر تنش اکسیداتیو القایی توسط نانو ذرات مذکور باشد (Alshatwiet al. 2013). با تزریق داخل صفاقی نانو ذرات در جوجه‌ها و بررسی میزان سمیت آن، بیان ژن *CYP1A4* در سلول‌های B کشت داده شده اندازه‌گیری شد و افزایش معنی-دار در سطح بیان *CYP1A4* پس از ۶-۱ ساعت نشان داده شد (Puebla-Osorio et al. 2004). نتایج این تحقیق نیز افزایش بیان

هپاتوسلولار انسانی⁴ (HCC) (Zhong et al. 2013) دخالت دارد و منجر به تکثیر و پیشرفت سلولهای سرطانی می شود. افزایش بیان مشاهده شده این ژن در تحقیق حاضر می تواند خطرات احتمالی ایجاد سرطان بر اثر استفاده از TiO_2NPs را نشان دهد و لزوم بررسی بیشتر تغییرات در بیان ژنهای انکوژن و سرکوبگر تومور دیگر را ضروری می سازد.

در این مطالعه، القای بالای CYP1A4 نشان دهنده این امر است که TiO_2NP_s سبب افزایش در میزان H_2O_2 و O_2 شده و میزان بیان CYP1A4 را تحت تأثیر گونه های اکسیژن فعال افزایش داده است. در این بین، تیمارهای تحت درمان با ویتامین E نشان دهنده ی تفاوت معنی داری با گروه شاهد است و توانسته تا حدودی از افزایش بیان CYP1A4 جلوگیری کند. همچنین میزان بیان ژن TOJ3 تحت تأثیر مقدار TiO_2NP_s تیمارها افزایش یافت. با توجه به اینکه این افزایش منجر به تکثیر سلولهای سرطانی می شود، می توان عنوان کرد که دوزهای بالای TiO_2NP_s سبب اختلال در تکثیر سلولها و بیان بالای ژن TOJ3 می شود.

⁴ Hepatocellular carcinoma

این ژن را در کبد بلدرچین ژاپنی با استفاده از این ذرات در جیره تایید نمود. این افزایش بیان تا اندازه ای تحت تأثیر ویتامین E کنترل شد. ویتامین E بیان این ژن را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد که می تواند ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانی آن و جلوگیری از ایجاد رادیکالهای آزاد و عدم نیاز به بیان بالای سیتوکرومها در حضور ویتامین E باشد. اثر ضد تنش اکسیداتیو این ویتامین قبلاً نیز گزارش شده است (Jena et al. 2013). TOJ3 (هومولوگ ژن MCRS1 در بلدرچین) به عنوان یک ژن سرطانزا در طی تغییر شکل فیروبلاست رفتار می کند و این فعالیت تغییر شکلی می تواند توسط سرکوبگر تومور¹ PTEN سرکوب شود (Liu et al. 2014). نشان داده شده که افزایش بیان MCRS1 در سلولهای NSCLC² اتفاق می افتد. MCRS1 نیز در همکاری با پروتئینهای متعدد از جمله پروتئینهای هسته ای، فاکتورهای رونویسی و پروتئینهای متصل شده به RNA در تنظیم رونویسی ژن کمک می کند (Renet et al. 1998). افزایش بیان MCRS1 در کارسینومای سلول مطبق مری³ (ESCC) (Xu et al. 2012) و کارسینومای

¹ phosphatase and tensin homologue

² non-small cell lung cancer

³ esophageal squamous cell carcinoma

منابع

Alshatwi AA, Periasamy VS, Subash-Babu P, Alsaif MA, Alwarthan AA, Lei KA (2013) CYP1A and POR gene mediated mitochondrial membrane damage induced by carbon nanoparticle in human mesenchymal stem cells. *Environmental toxicology and pharmacology* 36:215-222.

Bader AG, Schneider ML, Bister K, Hartl M (2001) TOJ3, a target of the v-Jun transcription factor, encodes a protein with transforming activity related to human microspherule protein 1 (MCRS1). *Oncogene* 20:7524-7535.

Cheraghi M, Espergham A, Zaboli A (2013) Cytochrome P450 and its role in detoxification. *The First National Conference on Planning and Environmental Protection*. Iran, Islamic Azad university Hamedan Branch, 1-18. (In Farsi).

Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, Hong M, Zhou M, Wang L, Wang H (2010) Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of hazardous materials* 183:874-880.

Gao G, Ze Y, Li B, Zhao X, Zhang T, Sheng L, Hu R, Gui S, Sang X, Sun Q (2012) Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of hazardous materials* 243:19-27.

Gui S, Sang X, Zheng L, Ze Y, Zhao X, Sheng L, Sun Q, Cheng Z, Cheng J, Hu R (2013) Intragastric exposure to titanium dioxide nanoparticles induced nephrotoxicity in mice, assessed by physiological and gene expression modifications. *Part Fibre Toxicol* 10:1-16.

Hoet PH, Bröske Hohlfeld I, Salata OV (2004) Nanoparticles known and unknown health risks. *Journal of nanobiotechnology* 2:12.

Jena B, Panda N, Patra R, Mishra P, Behura N, Panigrahi B (2013) Supplementation of vitamin e and c reduces oxidative stress in broiler breeder hens during summer. *Food and Nutrition Sciences* 4:33.

Karagiannidis AI, Bader AG, Hartl M, Bister K (2008) TOJ3, a v-jun target with intrinsic oncogenic potential, is directly regulated by Jun via a novel AP-1 binding motif. *Virology* 378:371-376.

Kidd M (2004) Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science* 83:650-657.

Kumar S, Ciraci C, Redmond S, Chuammitri P, Andreasen C, Palić D, Lamont S (2011) Immune response gene expression in spleens of diverse chicken lines fed dietary immunomodulators. *Poultry science* 90:1009-1013.

- Lin W, Huang Yw, Zhou XD, Ma Y (2006) In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology* 217:252-259.
- Liu MX, Zhou KC, Cao Y (2014) MCRS1 overexpression, which is specifically inhibited by miR-129*, promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in non-small cell lung cancer. *Molecular cancer* 13:245.
- Lu T, Harper A, Zhao J, Dalloul R (2014) Effects of a dietary antioxidant blend and vitamin E on growth performance, oxidative status, and meat quality in broiler chickens fed a diet high in oxidants. *Poultry science* 93:1649-1657.
- Ma L, Zhao J, Wang J, Liu J, Duan Y, Liu H, Li N, Yan J, Ruan J, Wang H (2009) The acute liver injury in mice caused by nano-anatase TiO₂. *Nanoscale research letters* 4:1275-1285.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113: 823-839.
- Puebla Osorio N, Ramos K, Falahatpisheh M, Smith R, Berghman L (2004) 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin elicits aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis in the avian DT40 pre-B-cell line through activation of caspases 9 and 3. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138:461-468.
- Ren Y, Busch RK, Perlaky L, Busch H (1998) The 58-kDa microspherule protein (MSP58), a nucleolar protein, interacts with nucleolar protein p120. *European Journal of Biochemistry* 253:734-742.
- Soliman MM, Attia HF, Hussein MM, Mohamed EH, Ismail TA (2013) Protective effect of n-acetylcystiene against titanium dioxide nanoparticles modulated immune responses in male albino rats. *American Journal of Immunology* 9:148.
- Surai PF (2003) Selenium-vitamin E interactions: Does 1+1 equal more than 2. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries* (TP Lyons and KA Jacques, eds) Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B (2008) Time dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* 254:82-90.
- Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE (2006) Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano letters* 6:1794-1807.
- Xie Y, Wang Y, Zhang T, Ren G, Yang Z (2012) Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. *Journal of Biomedical Science* 19:1-11.
- Xu CS, Zheng JY, Zhang HL, Zhao HD, Zhang J, Wu GQ, Wu L, Wang Q, Wang WZ, Zhang J (2012) MSP58 Knockdown inhibits the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Asian Pac J Cancer Prev* 13:3233-3238.
- Yang J, Liu Z, Li M, Qiu X (2013) Hydroxylation of quinocetone and carbadox is mediated by CYP1As in the chicken (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 158:84-90.
- Zhong M, Zhang X, Li B, Chen Cs, Ji Gl, Li Sx, Bi Dq, Zhao Qc, Shi H (2013) Expression of MSP58 in hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology* 30:1-10.