

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

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

جلال رستم زاده^{۱*}، 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^{۱*}, Jalali H^۱, haydari Z^۱, Sheikahmadi A^۱

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 درونزا 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 *TOJ3* و *CYP1A4* 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 *TOJ3* و *CYP1A4* 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 نانو تکنولوژی منجر به تولید و کاربرد گسترده انواع مختلفی از نانوذرات شده است. در میان این نانوذرات، در چند سال گذشته TiO_2NPs 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 پذیرتر، 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_2NPs 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_2NPs 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_2NPs 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 آگزوبیوتیکی 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 *MCRSI*) به عنوان یک ژن سرطانزا در طی تغییر شکل فیروپلاست رفتار می کند. افزایش بیان *MCRSI* 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 (ASV17)^۱ می باشد که رترو ویروسی جدا شده از فیروسارکومای بدخیم مرغی است. آنکو پروتئین *v-jun* نمایانگر یک نسخه جهش یافته از هم تایی 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 گره های 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 فرآیندها 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 17

² 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 بیوفتومتر 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_2NPs در بروز پاسخ‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو و تکثیر سلولی در بافت کبد و نیز به منظور بررسی نقش ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان 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_2NPs پوشش‌دار شده با نانو ذره 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 جیره 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 در کیلوگرم 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 سنندج 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

ژن	پرایمر (5'→3')	Tm	اندازه محصول (bp)
بناکتین	CAGGACTCCATACCCAAGAA	۵۷/۶	۱۹۰
	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	۶۰	
<i>CYP1A4</i>	GTCAATACCCGTTTCGATGC	۵۴	۲۷۹
	CTCTGCCTGAATCTTCTTCTG	۵۳	
<i>TOJ3</i>	ATGAGCCAACCCACACTCGA	۵۸/۹	۱۳۶
	CAGCACATCATCCCGTACATCC	۵۷/۸	

۲۰۰ میلی گرم ویتامین E توانسته میزان بیان هر دو ژن را در تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2NPs ، 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 بعلت سطح واکنش دهندگی بالاتر دارای اثرات بیشتری هستند. TiO_2NPs 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 اکسیده 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 $NADPH^+$ و در نهایت موجب دپلاریزه 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_2NPs 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 ۴pmol، پرایمر اختصاصی با غلظت ۸۰pmol و cdNA در حجم دو 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 آنالیز 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.

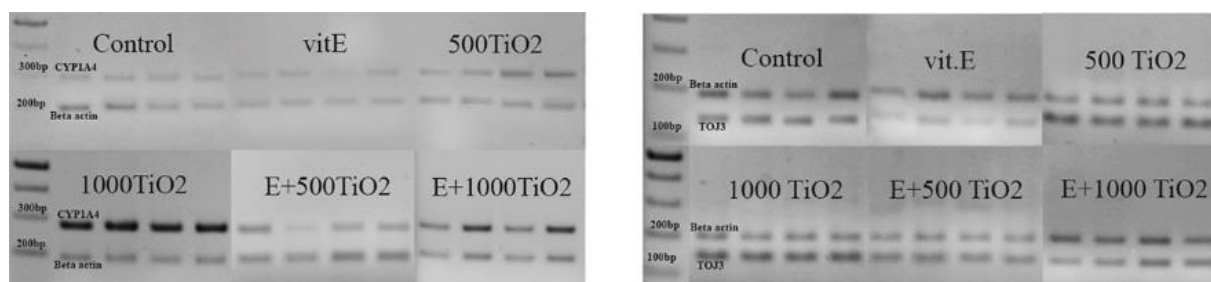
داده های جدول ۲ میزان بیان ژن های $CYP1A4$ و $TOJ3$ را تحت تأثیر TiO_2NPs نشان می دهد. میزان بیان ژن $CYP1A4$ تحت تأثیر TiO_2NPs به صورت معنی داری در دوزهای ۵۰۰ میلی گرم ($p < 0.05$) و ۱۰۰۰ میلی گرم ($p < 0.01$) در کیلوگرم جیره افزایش یافت. ویتامین E موجود در تیمارها، میزان بیان $CYP1A4$ را نسبت به گروه شاهد تغییر نداد. در تیمار ۵۰۰ میلی گرم TiO_2NPs 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_2NPs ، بیان ژن $TOJ3$ را در سطح پنج درصد و تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2NPs بیان این ژن را در سطح یک درصد به صورت معنی داری افزایش داد. مقدار ویتامین E در تیمار با ۵۰۰ میلی گرم TiO_2NPs ، میزان بیان این ژن را به صورت معنی داری نسبت به تیمار شاهد کاهش داد در تیمار با ۱۰۰۰ میلی گرم TiO_2NPs 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

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

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

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

موجودات زنده سیستم های دفاعی مختلفی برای مواجه شدن با رادیکال های آزاد تولید شده توسط سلول ها دارند. در طبیعت، هزاران ترکیب آنتی اکسیدانی وجود دارد که می تواند توسط حیوانات علیه رادیکال های آزاد استفاده شود (Surai et al. 2002). ویتامین E یکی از آنتی اکسیدان های طبیعی شناخته شده است که می تواند 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). همان طور که در مقدمه ذکر شد استفاده از TiO_2 NPs باعث تغییر در بیان ژن های زیادی در سلول های کشت داده شده می شود. استفاده از این نانو ذرات در جیره بلدرچین های ژاپنی با و بدون

(HCC)⁴ (Zhong et al. 2013) دخالت دارد و منجر به تکثیر و پیشرفت سلول‌های سرطانی می‌شود. افزایش بیان مشاهده شده این ژن در تحقیق حاضر می‌تواند خطرات احتمالی ایجاد سرطان بر اثر استفاده از TiO₂NPs را نشان دهد و لزوم بررسی بیش‌تر تغییرات در بیان ژن‌های انکوژن و سرکوبگرتومور دیگر را ضروری می‌سازد.

در این مطالعه، القای بالای CYP1A4 نشان دهنده این امر است که TiO₂NPs سبب افزایش در میزان O₂...H₂O₂ شده و میزان بیان CYP1A4 را تحت تأثیر گونه‌های اکسیژن فعال افزایش داده است. در این بین، تیمارهای تحت درمان با ویتامین E نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد است و توانسته تا حدودی از افزایش بیان CYP1A4 جلوگیری کند. همچنین میزان بیان ژن TOJ3 تحت تأثیر مقدار TiO₂NPs تیمارها افزایش یافت. با توجه به اینکه این افزایش منجر به تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود، می‌توان عنوان کرد که دوزهای بالای TiO₂NPs سبب اختلال در تکثیر سلول‌ها و بیان بالای ژن TOJ3 می‌شود.

⁴ Hepatocellular carcinoma

بیان این ژن را در کبد بلدرچین ژاپنی با استفاده از این ذرات در جیره تایید نمود. این افزایش بیان تا اندازه‌ای تحت تأثیر ویتامین E کنترل شد. ویتامین E بیان این ژن را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد که می‌تواند ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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 فیروپلاست رفتار می‌کند و این فعالیت تغییر شکلی می‌تواند توسط سرکوبگر تومور PTEN¹ سرکوب شود (Liuet al. 2014). نشان داده شده که افزایش بیان MCRS1 در سلول‌های NSCLC² اتفاق می‌افتد. MCRS1 نیز در همکاری با پروتئین‌های متعدد از جمله پروتئین‌های هسته‌ای، فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های متصل شده به RNA در تنظیم رونویسی ژن کمک می‌کند (Renet al. 1998). افزایش بیان MCRS1 در کارسینومای سلول مطبق مری (ESCC)³ (Xu et al. 2012) و کارسینومای هپاتوسلولار انسانی

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, Zabolli 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 FibreToxicol* 10:1-16.

Hoet PH, Brüske-Hohfeld 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 Y-w, Zhou X-D, Ma Y (2006) In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology* 217:252-259.
- Liu M-X, Zhou K-C, 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-acetylcysteine 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 C-S, Zheng J-Y, Zhang H-L, Zhao H-D, Zhang J, Wu G-Q, Wu L, Wang Q, Wang W-Z, 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 C-s, Ji G-l, Li S-x, Bi D-q, Zhao Q-c, Shi H (2013) Expression of MSP58 in hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology* 30:1-10.