مقاله مروری

فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۹، دوره ۱۵، شماره ۳، تابستان۱۴۰۱، صفحه ۷۹تا ۹۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

اثرات اپی ژنتیک پاراکوات بر تکامل جنین قبل از لانه گزینی

حدیثه بهشتی دافچاهی[۱]، پرستو وکیلی نظامی[۱]، فاطمه سادات موسوی[۱]، **نجمه رنجی**[۲]

۱-کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی،رشت، ایران.
۲-استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی،رشت، ایران. نویسنده مسئول: n_ranji@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۳/۲۵ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۴**

چکیده

اولین مرحله حیاتی در برنامه رشد در زمان قبل از لانه گزینی، زمان پس از لقاح تخمک و قبل از لانه گزینی جنین در رحم اتفاق می افتد. این دوره نمایانگر یک پنجره آسیب‌پذیر است زیرا اپی ژنوم تحت تغییرات دینامیک در الگوی متیلاسیون DNA قرار می‌گیرد. تغییر در برنامه ریزی اولیه مجدد جنینی می تواند الگوهای متیلاسیون DNA را مختل کند و تغییرات دائمی را در برنامه رشد ایجاد کند و منجر به شروع پیامدهای نامطلوب سلامت در نتاج شود. اگرچه شواهد زیادی وجود دارد که نشان می دهد قرار گرفتن در معرض مواد مضر در طول رشد جنین قبل از لانه گزینی می تواند باعث ایجاد تغییرات اپی ژنتیکی پایدار در فرزندان شود، اما مکانیسم ها هنوز به طور کامل شناخته نشده اند. از آنجایی که تغییرات فیزیولوژیکی یا پاتولوژیک در متیلاسیون DNA می تواند به عنوان پاسخی به نشانه های محیطی رخ دهد، محیط زیست مناسب نقش مهمی در موفقیت رشد جنین ایفا می کند. در این مقاله مروری، مکانیسم‌های درگیر در برنامه‌ریزی مجدد اپی ژنتیک جنینی طی متیلاسیون DNA و عوامل استرس‌زای محیطی مادر، همچون اثرات علف کش پاراکوات در طول مراحل قبل از لانه گزینی جنین مورد بررسی قرار گرفته است.

کلید واژه‌ها: اپی ژنتیک،متیلاسیون DNA، لانه گزینی، جنین، پاراکوات

مقدمه

پاراکوات (PQ) یکی از پرمصرف ترین علف کش ها در سراسر جهان است و مشخص شده که با تاثیر بر اندامهای مختلف بدن سبب بیماریهای مختلفی همچون پارکیسنون(۱)، فیبروز ریوی(2) و مشکلات ناباروری(۳) شده و حتی می تواند بر جنین اولیه (۴) نیز اثرات مخربی داشته باشد. در حال حاضر هیچ پادزهر موثری به صورت تجاری در دسترس نیست و میزان مرگ و میر در افراد دچار مسمومیت با این علف کش، بسیار بالا می باشد. در مطالعه Qian و همکاران در مدل‌های *in vivo* و *ex vivo* مشخص شد که آنتراهیدروکینون-۲-۶-دیسولفونات (AH2QDS)به عنوان یک ترکیب احیاء کننده قادر است مسمومیت با پاراکوات را از طریق کاهش سطح پاراکوات در بدن رت، کاهش آسیب میتوکندریایی سلولهای A549 و کاهش آسیب بافتی ناشی از استرس اکسیداتیو مهار کند(۵).

در مطالعه Li و همکاران مشخص شد که پاراکوات از طریق راهیابی به پایانه‌های عصبی،باعث مرگ سلولی نورون‌های دوپامینی در اثر آسیب اکسیداتیو می شود. پاراکوات همراه با غلظت‌های پایین آهن کلات (Fe++/DETAPAC)، باعث فعال‌سازی و اتصال فاکتور های رونویسی AP-1 به DNA می‌شود(۶). فاکتورهای رونویسی خانواده AP-1 همچون c-fos و *c-jun* بصورت همودایمر یا هترودایمر با اتصال به نواحی تنظیمی ژنها نقش اکتیویتور رونویسی در شرایط مختلف سلولی در مسیرهای مختلف همچون تکثیر و رشد سلولی، اتوفاژی، اپوپتوز، مهاجرت سلولی و پاسخ ایمنی را دارند(۷). در مطالعه Li و همکاران مشخص شد که پاراکوات قادر به القاء اپوپتوز و اتصال خانواده AP-1 به DNA بوده و بواسطه دو ترکیب سیکلوهگزماید و جنیستین این دو فعالیت القائی پاراکوات مهار شد. القاء شده با پاراکوات بودند. از آنجایی که استرس اکسیداتیو باعث مرگ سلولی (اپوپتوز) در نورونهای دوپامینرژیک می شود Li و همکاران پیشنهاد کردند که پاراکوات ممکن است بدلیل القاء اپوپتوز باعث ایجاد پارکینسون شود (۶).

مکانیسم سمیت پاراکوات، تولید آنیون سوپراکسید از طریق چرخه ردوکس است. NADPH-سیتوکروم P450 اکسیدوردوکتاز (POR) آنزیم اصلی برای کاهش تک الکترونی پاراکوات است که چرخه ردوکس را آغاز می کند. با استفاده از سلول‌های Flp-In تخمدان همستر چینی (CHO) که به‌طور مستمر POR را بیان می‌کنند، تأیید شده است که POR مسئول سمیت سلولی ناشی از پاراکوات است (8).

پاراکوات به مناطق غنی از AT در شیار کوچک DNA متصل می‌شود. پارامترهای ترمودینامیکی و مدل‌سازی مولکولی نشان داده است که برهمکنش آبگریز از طریق پاراکوات در داخل شیار کوچک DNA نقش عمده‌ای در اتصال آن دارد. در مطالعهJafari و همکاران مشخص شد که محتمل‌ترین حالت عمل پاراکوات به‌عنوان یک عامل اتصال به DNA، از طریق قرارگیری حلقه‌های ۴-پیریدیل بین جفت‌های باز AT در شیار کوچک است(۸). در مطالعه Petrovská و همکاران آسیب DNA اکسیداتیو در دو رده سلولی انسانی (HeLa و HepG2) و لنفوسیت‌های محیطی انسانی در معرض پاراکوات مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد که پاراکوات باعث شکستن رشته های DNA و اکسیداسیون بازها می شود که مقدار هر کدام به غلظت پاراکوات و نوع سلولی بستگی دارد. مواجهه با غلظت‌های پایین پاراکوات به مدت ۱

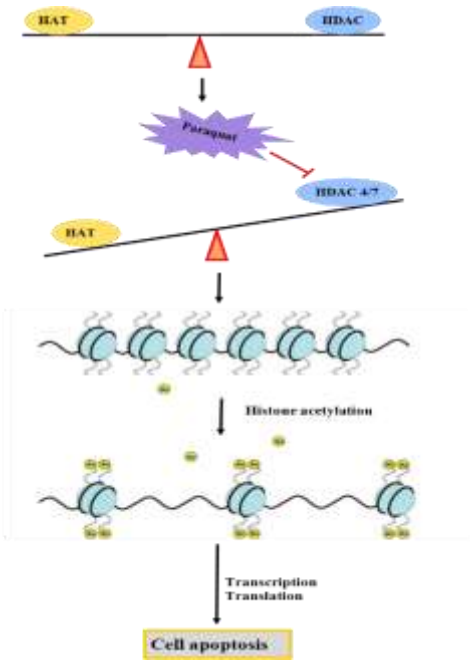
ساعت باعث آسیب DNA در سلول‌های HepG2 و لنفوسیت‌های محیطی انسان شد. مطالعه Petrovskáو همکاران نشان داد با اینکه پاراکوات استرس اکسیداتیو را القا می کند، اما در محدوده غلظتی خاصی، می تواند محافظت آنتی اکسیدانی را نیز تحریک کند. قرار گرفتن به مدت ۲۴ ساعت در معرض پاراکوات باعث ایجاد نسبت بالایی از بازهای اکسید شده و شکستگی رشته های DNA می شود. در مطالعه Petrovská و همکاران مشخص شد که سلول‌های Hep G2 بیشترین میزان شکستگی رشته DNA را بدون هیچ نشانه‌ای از اکسیداسیون باز، نشان دادند(۹).

اثرات پاراکوات بر استیلاسیون هیستون، یک نوع تغییر اپی ژنتیکی عمده در کروماتین است که می تواند بیان ژن ها، بازسازی کروماتین، بقاء و مرگ سلولی را تنظیم کند. در مطالعه Song و همکاران، مواجهه سلول های دوپامینرژیک N27 با پاراکوات، سبب القاء استیلاسیون هیستون H3 شد. همچنین، افزایش استیلاسیون (هایپر استلاسیون) هیستون ناشی از پاراکوات باعث کاهش فعالیت هیستون داستیلاز (HDAC) و کاهش بیان پروتئین HDAC4 و HDAC7 و در نتیجه القاء اپوپتوز در این سلولهای عصبی گردید (شکل ۱). در مطالعه Song و همکاران برای تعیین نقش هایپر استیلاسیون هیستون در القاء آپوپتوز ناشی از پاراکوات، از اسید آناکاردیک (مهارکننده هیستون استیل ترانسفراز (HAT)) استفاده شد. درمان با اسید آناکاردیک به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ ناشی از پاراکوات را کاهش و فعال شدن پروتئولیتیک و فعالیت کینازی پروتئین کیناز C دلتا (PKCδ) را مهار کرده و سمیت سلولی ناشی از پاراکوات را کاهش داد. در مطالعه Songو همکاران مشخص شد که ترکیب نوروتوکسیک پاراکوات باعث افزایش استیلاسیون هیستون‌های هسته به عنوان یک تغییر اپی ژنتیکی و القاء اپوپتوز در مدل‌های کشت سلولی مربوط به بیماری پارکینسون (PD) می‌شود، در حالیکه مهار فعالیت HAT و در نتیجه کاهش استیلاسیون هیستون ها بواسطه آناکاردیک اسید باعث کاهش مرگ سلولی آپوپتوز می شود (۱۰).

DNA و پروتئین های ساختاری کروماتین می توانند دچار تغییرات اپی ژنتیکی برگشت پذیر شوند که نحوه بیان ژن ها را در یک سلول تنظیم می کند. تغییرات اپی ژنتیکی برچسب های شیمیایی همچون گروه های فسفات، متیل و استیل هستند که بواسطه یک شبکه بسیار پویا از آنزیم های هسته ای به پروتئین های هیستونی و DNA متصل می شوند که در دسترس بودن کروماتین را تعدیل کرده و در نتیجه بیان ژن را تنظیم می کنند. به عنوان نمونه، در مهره داران بیش از ۸۰٪ از دو نوکلئوتیدی های CpG خارج از جزایر CpG، متیله هستند. در حالی که CpG ها در جزایر CpG اغلب غیر متیله می باشند. تقریبا نیمی از ژنهای قابل رونویسی، دارای جزایر CpG (غیر متیله)در نواحی کدینگ خودهستند. همه این ژنها بصورت عمومی بیان می شوند و کمتر از نیمی از آنها دارای بیان اختصاصی بافت می باشند (۱۱).

اپی ژنوم بواسطه تاثیر عوامل محیطی بر مراحل خاصی از تکامل جنین به ویژه در مراحل اولیه رشد و تکامل، از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا تنظیم اپی ژنتیکی بیان ژن ها،با تعیین سرنوشت سلول همراه است(۱۱).مهم ترین رویداد اپی ژنتیک قبل از لانه گزینی در پستانداران، برنامه ریزی مجدد الگوی متیلاسیون DNA است که مرحله ای محوری برای

رشد مناسب جنین محسوب می شود. اگرچه در بسیاری از مطالعات، اهمیت اپی ژنوم در رشد و تکامل پستانداران نشان داده شده است،اما هنوز نقش آن پیش از لانه گزینیبه خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه مکانیسم‌های برنامه‌ریزی مجدد اپی ژنتیک جنینی شامل هیستون استیلاسیون و متیلاسیون DNA را مورد بررسی قرار داده و تأثیر عوامل استرس‌زای محیطی از جمله سموم آفت کش مانند پاراکوات، قبل از لانه‌گزینی بر تکامل کوتاه‌مدت و بلندمدت با تمرکز ویژه بر محیط مادری موردارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱. نمایش شماتیک از مکانیسم های زمینه ساز هایپراستیلاسیون هیستون H3 القاء شده توسط پاراکوات. مواجهه با ترکیب نوروتوکسیک پاراکوات، فعالیت کل HDAC ها، به ویژه HDAC4 و HDAC7 را مهار می کند، که منجر به عدم تعادل بین HDAC و HAT می شود. کاهش فعالیت HDAC منجر به استیلاسیون بیشتر هیستون هسته ای H3 در کروماتین می شود که در نهایت منجر به تغییرات بیان ژن مرتبط با فرآیند نورودژنراتیو از جمله آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول های دوپامینرژیک می شود (۱۰).

متیلاسیون DNA جنینی (Embryo DNA Methylation)

متیلاسیون DNA شناخته شده ترین تغییر اپی ژنتیکی در تنظیم بیان ژن است که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مهم مانند چاپ ژنومی، غیرفعال شدن کروموزوم X و پیری نقش داشته و برای رشد و تکامل پستانداران ضروری می باشد (۸). در پستانداران، معمولا متیلاسیون DNA در سیتوزین موجود در دی نوکلئوتیدهای CpG در جزایر CpG رخ می‌دهد. علاوه بر این، متیلاسیون سیتوزین در دی نوکلئوتیدهای دیگر (CpA، CpT و CpC) نیز در مراحل خاصی از رشد سلولی، به خصوص در سلول های بنیادی و بافت مغز مشاهده می‌شود(۱۲). آنزیم های مسئول متیلاسیون DNA، DNA متیل ترانسفرازهایی (DNMTs) همچون DNMT1، DNMT3A و DNMT3B هستند. در حالیکه، DNMT1 مسئول متیلاسیون DNA

نیمه متیله بعد از همانندسازی است؛DNMT3A و DNMT3B متیل ترانسفراز های از نوع de novo برای ایجاد الگوی متیلاسیون در مراحل اولیه جنینی هستند (۸). اگرچه الگوهای متیلاسیون DNA از سلولی به سلول دیگر قابل وراثت است، و در طبیعت به صورت قابل توجهی پویا باقی می ماند، تغییرات فیزیولوژیکی یا پاتولوژیک در متیلاسیون DNA می تواند به عنوان پاسخی به محرک های محیطی رخ دهد، بنابراین دمتیلاسیون همزمان، فرآیندی مرتبط با متیلاسیون است. برخلاف متیلاسیون که به واسطه آنزیم رخ می دهد، دمتیلاسیون می تواند به صورت غیرفعال یا فعال رخ دهد . دمتیلاسیون غیرفعال (Passive demetylation) ژنوم، وابسته به همانندسازی و ناشی از کاهش فعالیت DNMT1 است که منجر به کاهش مقدار متیلاسیون DNA در تقسیمات متوالی سلولی می شود. برعکس، دمتیلاسیون فعال(active demetylation) توسط آنزیم های خانواده TET (Ten-Eleven Translocation Proteins) (TET1، TET2، TET3) صورت گرفته و بصورت غیر مستقیم در حذف 5mC و جایگزینی سیتوزین (C)در ژنوم همراه است. این دمتیلاز ها در اکسیداسیون 5mC بعد از حذف از ژنوم، نقش دارند. حذف یا اضافه شدن گروههای متیل در DNA و دیگر فرآیندهای اپی ژنتیکی، از جمله نیروهای محرکه رشد و تمایز جنین هستند که می توانند سطح بیان و زمان بیان ژنها را در دوران جنینی کنترل نمایند(۱۳).

CpGها در سراسر ژنوم پستانداران وجود دارند، اما متیلاسیون آنها بسته به موقعیت قرار گیری در ژنوم (به عنوان نمونه در نواحی پروموتری در جزایر CpG یا خارج از این جزایر، در اجسام ژنی، در توالی های تنظیمی و توالیهای تکراری) متفاوت است. اغلب ژنها در جزایر CpG غیر متیله بوده و نواحی پروموتوری آنها در صورت بیان ژن، فاقد ساختارهای نوکلئوزومی می شود. در دو طرف این نواحی پروموتری، نوکلئوزوم های حاوی H2A.Z (واریانت هیستون ۲) و H3K4me3 (هیستون ۳ تری متیله در لیزین ۴) قرار می گیرند. پروموتور در جزایر CpG به کمک مکانیسم های مختلفی همچون پروتئین های Polycomb مهار می شوند. با این حال بعضی از ژنها در جزایر CpG بواسطه متیلاسیون پروموتر غیر فعال شده اند که برای خاموشی طولانی مدت ژن همچون چاپ ژنومی برنامه ریزی شده است. حدود ۶۰٪ ژنهای انسان در نواحی پروموتر دارای جزایر CpG (CGIs) هستند. با غیر متیله بودن جزایر CpG در یک پروموتر، عدم اتصال نوکلئوزوم(Nucleosome-depleted regions، NDRs)به این نواحی شروع رونویسی رخ داده و در اطراف NDRs ها نیز نوکلئوزوم های تغییر یافته حاوی H3K9me3 و H3K27me3 قرار می گیرندو به این ترتیب فاکتورهای رونوسی قادر به اتصال به نواحی پروموتری و بیان ژن خواهند بود(۱۴). با اینکه متیلاسیون به عنوان یک عامل اپی ژنتیکی در مهار ژنها محسوب می شود، در مطالعه Pacis و همکاران مشخص شد که در پاسخ به عفونت در سلولهای دندریتیک انسانی، بیان ژنها قبل از تغییر در متیلاسیون DNA رخ داده و حتی غیر متیله شدن به عنوان یک نتیجه پایین دستی بیان ژنها بود(۱۵).

چاپ (نقش گذاری) ژنومی (genomic imprinting)، یکی از نتایج متیلاسیون DNA در

سلولهای رده زایا در پستانداران است. آلل های پدری و مادری گروه یاز ژنها در زمان لقاح، الگوی متیلاسیون متفاوتی دارند که باعث تفاوت رفتار بین آلل های پدری و مادری می شود. گروه کوچکی از ژن‌ها به نام ژن‌های نقش گذاری شده دارای نواحی خاصی به نام نواحی متیله شده متمایز رده زایا[1] (gDMRs،) هستند. gDMR ها متیلاسیون ژنومی تک آللی را با یک منشاء والدی به طوری که فقط یک آلل بیان گردد، سبب می شوند(۱۶). یک نوع مهم از gDMRها، نواحی کنترلی نقش گذاری(imprinting control region، ICR) هستند که مستقیماً در اتصال فاکتورهای نسخه برداری نقش دارند و بیان ژن‌های نقش گذاری شده متعدد (مانند *H19* و*Igf2*، فاکتور۲رشد شبه انسولین) را در یک زمان تنظیم می‌کنند (۱۷). چاپ (نقش گذاری) ژنومی قبل از لقاح در مرحله دیپلوتن تخمک و در مرحله پرواسپرماتوگونی اسپرم تعیین می‌شود و در تمام عمر فرزند حفظ می گردد (۱۸).

در بیماریهای ژنتیکی، حذف بینابینی بخشی از بازوی بلند کروموزوم ۱۵ انسان، بسته به اینکه این حذف در اسپرم یا تخمک رخ داده باشد، دو بیماری با علائم فنوتیپی متفاوت را باعث می شود. در این دو بیماری ژن های *SNRPN* و *UBE3A* نقش مهمی در بروز بیماری دارند. ژن *SNRPN* در اسپرم، غیر متیله و فعال بوده؛ اما در تخمک، متیله است. درنتیجه اگر این حذف در اسپرم صورت گیرد فرد دچار سندرم پرادر ویلی می شود(۱۹). همچنین ژن *UBE3A* در تخمک، غیر متیله و فعال بوده؛ اما در اسپرم، متیله است. درنتیجه اگر حذف این ناحیه در تخمک صورت گیرد، فرد دچار سندرم آنجلمن می شود(۲۰).

برنامه ریزی مجدد اپی ژنتیک جنینی (Embryonic Epigenetic Reprogramming)

در تشکیل جنین اولیه، جنین تحت طیفی از برنامه ریزی های مجدد متیلاسیون DNA قرار می گیرد که طی آن پروفایل های اصلی متیلاسیون، به استثنای نواحی متیله شده متمایز رده زایا(gDMR ها)، دچار تغییر می شوند. مدت زمان کوتاهی پس از لقاح، هنوز ژنوم تخم لقاح یافته (زیگوت) به صورت دو پیش هسته پدری و مادری هستند که باید دچار دمتیلاسیون گسترده شوند. به این ترتیب الگوی متیلاسیون اختصاصی هر یک از دو سلول اسپرم و تخمک حذف می شود و سلول های حاصل از تقسیم تخم قبل از لانه گزینی ، به سلول های جنینی هم توان (totipotent) تبدیل شوند (۲۱). یکی از اتفاقات عجیب برنامه‌ریزی مجدد، حفظ الگوهای متیلاسیون وابسته به جنسیت (الگوی پدری یا مادری) نواحی متیله شده متمایز رده زایا(gDMR ها)به عنوان یک مکانیسم مهم در رشد و تکامل طبیعی پستانداران محسوب می شود و آسیب به این الگو می تواند با مشکلاتی همچون بروز سرطانها و یا اوتیسم همراه باشد(۲۲). از آنجایی که در نقش گذاری ژنومی، فقط یک آلل فعال است، بیان این ژن ها بخاطر نقش در تنظیم تکامل می‌تواند اثرات چشمگیری بر رشد و تکامل داشته باشد. اینکه چگونهDNA متیل ترانسفراز نوع یک (

[1] germline differential methylation regions

DNMT1) به طور اختصاصی باعث حفظ متیلاسیون gDMR ها می شود، اما در متیلاسیون سراسری چنین نقشی ندارد، ناشناخته مانده است. بطوریکه، ژنوتیپ -/-Dnmt1 در موش والد باعث ایجاد جنین های مرده می شود و این امر نتیجه فقدان Dnmt1 است که باعث از بین رفتن کامل نقش گذاری ژنومی می‌شود و اجازه نمی‌دهد که متیلاسیون از ابتدا (*de novo*) به درستی در طول متیلاسیون مجدد ژنوم حفظ شود(۲۳). دو فرم از DNA متیل ترانسفراز نوع یک (DNMT1) با نامهای DNMT1 سوماتیک (DNMT1s) و DNMT1 تخمک (DNMT1o) در حفظ متیلاسیون DNA تا مرحله بلاستوسیت نقش دارند. در مطالعه McGraw و همکاران مشخص شد که فقدان ژن *DNMT1* تخمک (*DNMT1o*) در موش های ماده باعث نقص جفت (placentae) در نوزادان ماده آنها می شود. همچنین اختلال در غیرفعال‌سازی X نقش گذاری شده در بلاستوسیت های مونث در مرحله هشت سلولی مشاهده شد (۲۴). طبق مطالعهMcGraw و همکاران یک اختلال کوچک در فرآیند حفظ متیلاسیون DNA در مراحل اولیه رویان، بر رشد جنین تأثیر می گذارد.

کاهش متیلاسیون سراسری DNA در طول برنامه ریزی مجدد، آغازگر فعال شدن ژنوم جنینی است که برای رشد مناسب حیاتی است. زمان دقیق بیان ژن‌ها در جنین بواسطه تغییرات ساختاری کروماتین کنترل می‌شود. پس از دمتیلاسیون سراسری، متیلاسیون ژنوم در توده سلولی داخلی و تروفوبلاست بواسطه دو آنزیم DNMT3A و DNMT3B صورت می گیرد تا الگوهای اپی ژنتیکی را برای رشد و تکامل جنین و جفت فراهم سازند(۲۱). مطالعات نشان می دهد که موشهای با ژنوتیپ -/-Dnmt3a فنوتیپ متفاوتی نسبت به موشهای با ژنوتیپ -/-Dnmt3b دارند. بطوریکه موش‌های با ژنوتیپ -/-Dnmt3a دچار ناهنجاری های شدید بوده و مدت کوتاهی پس از تولد می‌میرند، در حالی که موش های با ژنوتیپ -/- Dnmt3b در دوران جنینی می میرند (۲۵). پویایی متیلاسیون DNA در دوران جنینی (دمتیله شدن، متیلاسیون مجدد و یا حفظ متیلاسیون) در برنامه ریزی رشد و تکامل جنین بسیار حائز اهمیت است که در پاسخ به عوامل محیطی خاص می تواند باعث تغییر در بیان ژن و در نتیجه نقص و اختلال در رشد جنین شود (۲۶). محیط مادری (به عنوان نمونه تغذیه، استرس و مواد) می تواند شرایط نامطلوبی را در محیط رحم ایجاد کند که بر رشد و تکامل جنین تأثیر بگذارد و اثرات مضری بر اپی ژنوم اولیه جنین داشته باشد و حساسیت و ابتلا به بیماری را در بزرگسالی افزایش دهد(۲۷).

پاراکوات

پاراکوات[۲] به عنوان یک علف کش کشاورزی در بسیاری از کشورها در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرد. پاراکوات با نام تجاری گراماکسون[۳] (۲۸, ۲۹)، یک علف کش تماسی و غیر انتخابی از گروه بی پیریدیلها بوده که برای کنترل علفهای هرز یکساله استفاده می شود. پاراکوات بصورت محلول در آب بوده که در تماس با خاک به سرعت بی اثر و غیر فعال می شود. این ترکیب

[2] 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichloride ،methylviologen ؛ CASRN: 4685-14-7

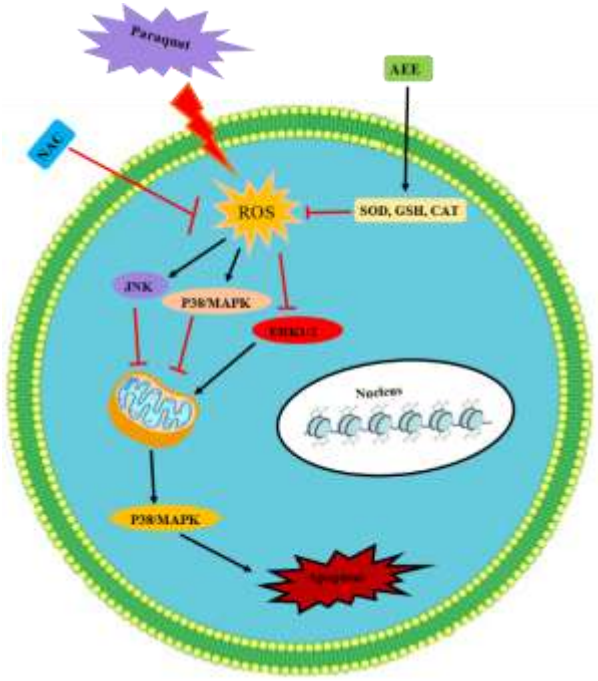
[3] GramaxonSL20%

در الکل به مقدار کم، و در آب بخوبی حل شده و در حالت محلول توسط نور ماورای بنفش و همچنین در دمای ۳۰۰ درجه سانتیگراد تجزیه می شود. پاراکوات در گیاه در اتم نیتروژن دمتیلاسیون ایجاد کرده و موجب گسستگی حلقه در ساختار شیمیایی آن می شود(۳۰). کمتر از ۵ درصد پاراکوات ممکن است پس از مصرف خوراکی عمدی (موارد خودکشی) یا سهوی، جذب بدن شود. جذب از راه خوراکی کارآمدتر از تماس های پوستی و یا استنشاقی است؛ در نتیجه مواجهه خوراکی اغلب منجر به سمیت شدیدتر می شود (۳۱). استرس اکسیداتیو مکانیسم اصلی سمیت سلولی ناشی از پاراکوات است. اثر پاراکوات را می توان با نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) کاهش داد؛ ولی اگر در حضور O_2، تحت چرخه ردوکس قرار گیرد باعث ایجاد گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شود (۳۲). افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش آنزیم های آنتی اکسیدان باعث تجزیه سریع ماکرومولکولهای زیستی نظیر پروتئین ها و DNA (۳۳) و در نتیجه القاء مرگ سلولی شود (۳۴). از عوارض افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS) آسیب شدید بافتهایی چون بافت مغزی و آپوپتوز سلولهای نورونی است (۳۵). غیر فعال کردن گونه های فعال اکسیژن (ROS) می تواند از طریق فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز رخ دهد. علاوه بر این، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) می‌تواند از گلوتاتیون احیاء (GSH) برای کاهش هیدروپراکسیدهایی که بواسطه واکنش ROS با مولکول‌های سلولی ایجاد شدند، استفاده کند و به این ترتیب گلوتاتیون اکسید (GSSG) تولیدشود(۳۶). گلوتاتیون احیاء، کوفاکتور آنزیم های آنتی اکسیدانی بوده و در مواجهه با ترکیبات سمی و گونه های فعال اکسیژن (ROS) مورد استفاده قرار می گیرد (۳۳). از آنجایی که گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) نسبت به کاتالاز تمایل بیشتری به H_2O_2 دارد، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) ممکن است نقش مهمی در محافظت در برابر سمیت پاراکوات داشته باشد. با این حال، تولید مداوم گونه‌های اکسیژن فعال می‌تواند منجر به کاهش گلوتاتیون احیاء (GSH)و کاهش نسبت GSH:GSSG شود که نشان‌دهنده استرس اکسیداتیو است. شایع ترین سمیت پاراکوات که هم در انسان و هم در حیوانات گزارش شده است، سمیتی است که در ریه رخ می دهد و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مواجهه طولانی‌مدت با پاراکوات است (۳۶). در مطالعه Rahmani Talatappeh و همکاران مشخص شد که مواجهه با ترکیبات سمی باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی (TAC) و افزایش سطح مالون دیالدهید (MDA)(۳۷) (یک مارکر اکسیداسیون چربی) می شود (۳۸). مواجهه پیوسته با پاراکوات در رژیم غذایی (۱۲۵ میلی گرم پاراکوات در یک کیلوگرم غذا) در موش قبل از بارداری، باعث کاهش تعداد زایمان شده است (۳۹). در مطالعه Cui و همکاران، مواجهه سلولهای A549 با پاراکوات باعث افزایش مقادیر میکیناز[4] فسفریله وجانوس کیناز[5] شد.

[4] Mitogen-activated protein kinase ،MAPK-(p38)

[5] c-Jun N-terminal Kinase،JNK

همچنین N–استیل سیستئین (NAC) به عنوان پیش تیمار آنتی اکسیدانی، باعث کاهش سطح میکیناز (MAPK)–p38 فسفریله و کاهش تولید ROS داخل سلولی و مهار آپوپتوز شد (شکل ۲) (۴۰). N–استیل ترکیبات آنتی اکسیدانی همچون چای سبز با افزایش سطح گلوتاتیون احیاء و سوپر اکسید دسموتاز، کاهش قطعه قطعه شدن DNA و کاهش آسیب بافتی بعد از مواجهه با ترکیبات سمی می توانند عوارض ترکیبات سمی را بر بدنن کاهش دهند(۳۳). N –استیل سیستئین (NAC) قادر است عوارض ترکیبات سمی را در بافتهای مختلف مثل کلیه ها، کبد و مغز، کاهش دهد و باعث کاهش آسیب به DNA، کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش التهاب بافتی شود. در مطالعه Shirin Sokhan و همکاران (۴۱) و در مطالعه Beigi Harchegani و همکاران (۴۲)، N–استیل سیستئین به ترتیب باعث کاهش عوارض سمی کادمیوم و سرب بر ریه و کبد رت ها شد. مطالعه Zhang و همکاران نشان داد که AEE (Aspirin eugenol ester) ممکن است آسیب سلولی ناشی از پاراکوات را بواسطه مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و ROS/p38-MAPK مهار کند (شکل ۲) (۴۳).



شکل ۲: مهار آسیب زایی ROS ایجاد شده توسط پاراکوات درون سلول. NAC و آسپرین، آسیب سلولی ناشی از PQ را با مهار مسیر میتوکندریایی آپوپتوز از طریق غیرفعال سازی ROS با افزایش مقدار گلوتاتیون احیاء (GSH)و افزایش تولید آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کاهش می دهند(۴۳).

مطالعات *in vivo* و *ex vivo* اثر پاراکوات بر تکامل جنین

قرار گرفتن در معرض آفت کش ها ممکن است خطر ناباروری و پیامدهای نامطلوب بارداری همچون سقط خود به خودی، زایمان زودرس و ناهنجاری های مادرزادی را افزایش دهد(۴۴). اطلاعات زیادی در مورد استفاده از آفت کش ها و عوارض آنها بر رشد و تولید مثل وجود ندارد. عوارض آفت کش ها در مطالعات

حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است و بسیاری از آسیب ها مانند وزن کم تخمدان (۴۵)، اختلال در فولیکولوژنز (۴۶)، نرخ بالای آنوپلوئیدی(۴۷)، و تسریع آترزی فولیکولی (Follicular atresia) گزارش شده است(۴۸, ۴۹). مشخص شده است که آفت کش ها، متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون ها در سلول های جنینی را تغییر می دهند و باعث بیان غیرطبیعی ژن‌های خاص و افزایش ناپایداری ژنومی (Genomic instability) می شوند. همچنین ممکن است باعث آسیب های نئوپلاستیک سلول ها شود(۵۰).

پاراکوات می تواند از طریق چرخه ردوکس باعث استرس اکسیداتیو شود و این در حالیست که جنین قبل از لانه گزینی به استرس اکسیداتیو حساس تر است. در مطالعه Hausburg و همکاران، اثرات پاراکوات بر رشد و تکامل جنین قبل از لانه گزینی مورد بررسی قرار گرفت (۵۱). مواجهه جنین ها با پاراکوات قبل از لانه گزینی به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی در غلظت های کمتر از ۸ میکرومولار باعث کاهش قابل ملاحظه تعداد جنین های ۸ سلولی و افزایش درصد مورولا های (morulae) متراکم شد، اما محتوای گلوتاتیون (GSH) در جنین تغییر نکرد. تغییر در رشد جنین به احتمال زیاد به دلیل فشردگی زودرس بود. زیرا کاهش ۴۲ درصدی تعداد سلول به ازای هر مورولای متراکم شده در جنین هایی که در معرض غلظت ۱ میلی مولار پاراکوات قرار گرفتند، مشاهده شد. مواجهه جنین ها با پاراکوات قبل از لانه گزینی در شرایط آزمایشگاهی به مدت ۴ روز به میزان ۲۰۰ میکرومولار یا بالاتر، مانع رشد بعد از مرحله بلاستوسیست شد. مواجهه موش های ماده در معرض ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم پاراکوات در روز دوم پس از تخمک گذاری منجر به کوچک شدن تخمک و بویژه باعث کاهش در درصد جنین های ۸ سلولی در روز سوم بدون افزایش قابل ملاحظه در درصد مورولا ها شد. پس از قرار گرفتن در معرض پاراکوات در روز تخمک گذاری (روز ۰) هیچ تغییر قابل تشخیصی در رشد جنین قبل از لانه گزینی مشاهده نشد، اگرچه کاهش قابل توجهی در GSH جنین در روز اول مشاهده شد. این داده ها نشان می دهد که پاراکوات می تواند بر رشد جنین ها قبل از لانه گزینی در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدن بدون تغییردر سطح GSH تأثیر منفی بگذارد و سبب مهار رشد جنین قبل از لانه گزینی شود(۵۱).

در مطالعه Trakulsrichai و همکاران ویژگی‌های بالینی و پیامدهای مسمومیت با پاراکوات در بیماران باردار، جنین‌ها و نوزادان مورد بررسی قرار گرفت. اثرات سیستمیک پاراکوات در ۳۶ زن باردار (میانگین مدت حاملگی:۲۳ هفته) شامل آسیب حاد کلیه (AKI) در ۱۳ بیمار (۳۶,۱٪) و مشکلات بارداری در پنج بیمار (۱۳/۹٪) مشاهده شد. همچنین مرگ چهار نوزاد پس از تولد رخ داد . یک بیمار مبتلا بعد از زایمان زودرس در ۲۶ هفتگی درگذشت، اما نوزاد زنده ماند. میزان مرگ و میر بیماران باردار و نوزادان در بیمارستان به ترتیب ۲۵٪ و ۴۴,۴٪ بود. نتایج نشان داد مسمومیت با پاراکوات در دوران بارداری موجب مرگ و میر بالایی در بیماران باردار، جنین‌ها و نوزادانی شد که در طی بستری در بیمارستان به دنیا آمدند(۵۲).

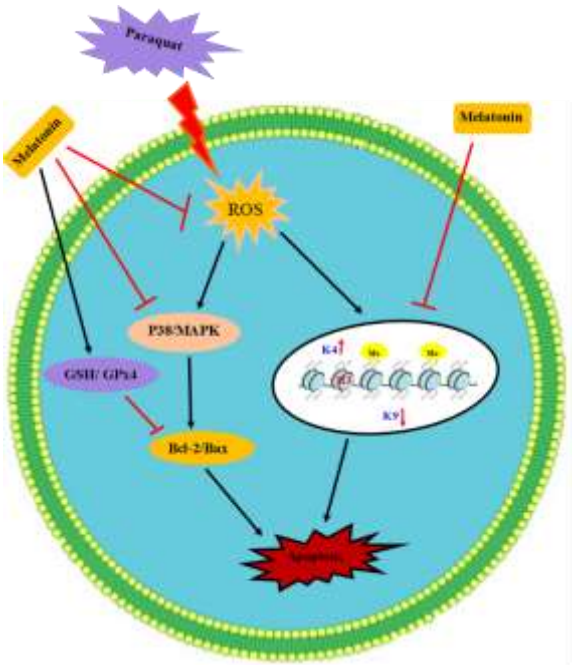
در مطالعه Mussi و همکاران با تاثیر پاراکوات بر جنین وزغ Chaunus arenarum مشخص شد که علاوه بر تولید ذاتی گونه های فعال اکسیژن (ROS) به عنوان یک نتیجه تکامل طبیعی، جهت تکامل خارجی دوزیستان اغلب جنین مجبور به مقابله با عوامل تولید کننده استرس اکسیداتیو محیطی است. بنابراین جنین باید سیستم حفاظتی برای کاهش سمیت ROS و همچنین برای تکامل موفق داشته باشد. نتایج مطالعه Mussi و همکاران نشان داد که مواجهه با پاراکوات، توانایی جنین ها را برای رشد و تکامل طبیعی کاهش می دهد، بطوری که منجر به توقف رشد و ایجاد ناهنجاری های شدید همچون ناهنجاری های دم، تورم شکمی، کاهش رشد سر و ساختارهای خمیده پشتی می شود. در جنین های بدون عوارض حاصل از پاراکوات، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز منگنز در مراحل بعد از گاسترولاسیون نشان‌دهنده نقش مهم سوپراکسید دیسموتاز در پاسخ آنتی‌اکسیدانی در طول تکامل اولیه جنین است(۵۳).

القاء آپوپتوز یکی از پیامدهای مواجهه سلولها با ترکیبات سمی است. در مطالعه Azarmehr و همکاران (۵۴) و همچنین در مطالعه Beigi Harchegani و همکاران به ترتیب مواجهه با کادمیوم و سرب به عنوان دو ترکیب سمی باعث القاء آپوپتوز در بافت کبد شد(۴۲). در مطالعه Greenlee و همکاران، مواجهه موش های باردار با غلظت کم مواد شیمیایی کشاورزی و آفت‌کش‌ها مشخص شد که ۱۱ ماده از ۱۳ ماده باعث افزایش آپوپتوز (مرگ سلولی) و سه ماده باعث کاهش رشد بلاستوسیست و کاهش تعداد سلول در هر جنین شدند. مطالعه Greenleeو همکاران نشان داد که آسیب‌های ناشی از آفت‌کش‌ها در مراحل اولیه رشد جنین و در غلظت‌های مختلف می‌تواند عواقب خطرناکی بر سلامتی مادر و جنین داشته باشد(۵۵).

در مطالعه Pang و همکاران مشخص شد که پاراکوات می تواند به میزان زیادی توانایی تخمک لقاح یافته گاو را برای تکامل به مرحله بلاستوسیست کاهش دهد(۵۶). در مطالعه دیگری، Pang و همکاران نشان دادند پاراکوات در تکامل هسته و سیتوپلاسم اختلال ایجاد می کند که شامل کاهش توسعه سلولهای کومولوس، کاهش خروج اولین جسم قطبی و توزیع غیر عادی میتوکندری ها و دانه های قشری (cortical granules) می باشد. در مطالعه Pang و همکاران استفاده از ملاتونین بعد از مواجهه با پاراکوات باعث افزایش آنزیم های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش گونه های فعال اکسیژن (ROS) شد (۵۷). از ژنهای آپوپتوتیک نظیر *Bax*، *Bid*، کاسپازها و *P53* و ژن ضد آپوپتوز *Bcl-2*، در مطالعات مختلف جهت بررسی القاء آپوپتوز استفاده می شود (۵۸-۶۲). در مطالعه Pang و همکاران، تیمار با ملاتونین باعث کاهش بیان ژن *Bax* و افزایش *Bcl-2* شد. همچنین ملاتونین، اووسیت گاو را از آسیب های ناشی از پاراکوات بواسطه کاهش فعالیت میکیناز p38 (p38 MAPK)کاهش داد. ملاتونین، پتانسیل رشد جنین های پیش از لانه گزینی گاو را تحت شرایط استرس اکسیداتیو افزایش می دهد. مکانیسم‌های اصلی ملاتونین شامل مهار فعال‌سازی پروتئین کیناز (MAPK) فعال‌شده با میتوژنP38 القاء شده توسط پاراکوات و بازسازی غیرطبیعی تری متیل هیستون H3 لیزین ۴ (H3K4me3) و تری متیل هیستون H3 لیزین

۹ (H3K9me3) می باشد. این نتایج نشان می دهد که ملاتونین به عنوان یک عامل قدرتمند در برابر سمیت ناشی از پاراکوات در طول بلوغ اووسیت گاو عمل می کند و می تواند مبنایی برای مطالعات بیشتر برای توسعه استراتژی های درمانی در برابر مسمومیت با پاراکوات باشد (شکل ۳) (۵۷)

.



شکل ۳: اثرات مهاری ملاتونین بر کاهش آسیب استرس اکسیداتیو در سلول تخمک در معرض با PQ. ملاتونین سبب مهار فعال‌سازی مپکیناز(MAPK) فعال‌شده با میتوژن‌P38 و بازسازی غیرطبیعی، تری متیل هیستون H3 لیزین ٤ (H3K4me3) و تری متیل هیستون H3 لیزین ۹ (H3K9me3) می شود.

بحث

پاراکوات یک علف کش ارزان و مؤثر در کشاورزی است که به طور گسترده در سراسر جهان برای حذف علف های هرز در مزارع زراعی استفاده می شود. با این حال، می تواند باعث آلودگی آب و خاک شود و آسیب جدی به محیط زیست و موجودات زنده وارد کند. چندین کشور در حال محدود کردن یا ممنوع کردن استفاده از این ترکیب به دلیل افزایش تعداد مرگ و میرهای انسانی هستند. پاراکوات با افزایش سطح استرس اکسیداتیو در سیستم های مختلف بیولوژیکی، از جمله سیستم تولید مثل، باعث سمیت سلولی می شود. مواجهه با پاراکوات باعث آسیب به جنین و کاهش توانایی های تکاملی جنین می شود.

پاراکوات در جنین انسان می تواند با متیلاسیون DNA یا استیلاسیون هیستون، بر بروز ژنهای دخیل در لانه گزینی جنین و تکامل آن موثر باشد. متیلاسیون DNA نقش مهمی در خاموشی بیان ژن ها، پایداری ژنومی در طول میتوز و نقش گذاری ژنومی اختصاصی والدی دارد. متیلاسیونDNA، برخی از نواحی پروموتری و تقویت کننده ها (enhancer) با محتوای کم CpG ، را مهار می کند. در مقابل، بسیاری از جزایرCpG، به

ویژه آنهایی که در پروموترها قرار دارند، اساساً از طریق مکانیسم‌های متضاد متعدد مبتنی بر سیس و ترانس متیلاسیون DNA محافظت می‌شوند. سلول های بنیادی جنینی (ESCs) یکی از مدل های مناسب آزمایشگاهی برای تشریح مکانیسم های اپی ژنتیکی طی تمایز سلولی و طی تکامل سلولی جنینی هستند(۶۳). سلول های بنیادی جنینی (ESCs) برای خاموش ماندن عناصر تکراری نیاز به فعالیت همیشگی آنزیم DNA متیل ترانسفراز ۱ (DNMT1) دارند و برای خاموشی مجدد این عناصر به طور مداوم به آنزیم DNA متیل ترانسفراز ۳ (DNMT3) نیاز دارند. مرحله رشد و تکامل قبل از کاشت (pre-implantation) یکی از معدود مراحلی است که در آن عناصر ترانسپوزونی درون ژنوم به طور فعال تنظیم می شوند. پروموتر ژن‌های اختصاصی ژرمینال توسط آنزیم DNA متیل ترانسفراز3B (DNMT3B) در دودمان‌های جنینی مهار می‌شوند و طی دمتیلاسیون در سلول‌های زایای اولیه (PGC) ،دوباره فعال می‌شوند(۶۴). متیلاسیون DNA ، طی گامتوژنز و لقاح حذف می شود؛ ژنوم پدری به طور خاص در این مراحل دمتیله می شود. متیلاسیون و دمتیلاسیون DNA به عنوان دو رویداد مهم دارای آبشارهای مرتبط متعددی از سازمان‌دهی مجدد کروماتین هستند که مکانیسم‌های اپی ژنتیکی مشابهی را برای حذف و ایجاد دوباره الگوی متیلاسیون هسته‌ای پیشنهاد می کنند (۶۵).

جنین های قبل از لانه گزینی به آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو حساس هستند که می تواند توسط گونه های فعال اکسیژن (ROS) ناشی از متابولیسم طبیعی جنین و یا محیط بیرونی ایجاد شود. پاراکوات به عنوان مولد قوی ROS، می تواند سمیت جنینی را القا کند. مطالعات نشان داده اند که پاراکوات در درجه اول از طریق چرخه ردوکس اثرات سمی دارد و رادیکال های آزاد اکسیژن را تولید می کند که باعث آسیب اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی می شود. ROS اضافی تولید شده توسط پاراکوات با لیپیدهای غیر اشباع واکنش داده و باعث پراکسیداسیون لیپیدی، از جمله تولید مالون دی آلدهید (Malondialdehyde) می شود (۶۶). NADPH اکسیداز، آنزیم کلیدی در تولید ROS است و پاراکوات با فعال کردن کمپلکس NADPH اکسیداز باعث افزایش ROS می شود(۶۷).

پاراکوات به تکامل بیضه‌ها آسیب می‌رساند و کیفیت مایع منی را کاهش می‌دهد و باعث اختلال در ترشح هورمون‌ها در دستگاه تناسلی می‌شود (۶۸). همچنین مواجهه با پاراکوات می تواند اثرات سمی بر بلوغ تخمک خوک داشته باشد (۶۸). قرار گرفتن در معرض ۱۰۰ میکرومولار پاراکوات، گسترش سلول های کومولوس را مهار کرده و به طور معنی داری میزان اولین بیرون زدگی جسم قطبی را در طول بلوغ تخمک کاهش می دهد. سلول های تخم مواجهه یافته با پاراکوات نمی توانند به مرحله ۲ سلولی و بلاستوسیست توسعه یابند. قرار گرفتن در معرض ۱۰۰ میکرومولار پاراکوات به طور معنی داری باعث افزایش نرخ غیر طبیعی تولید دوک میتوزی و تعداد ناهنجار کروموزومها شد. مقدار رشته های F-اکتین در تخمک های در معرض پاراکوات در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض پاراکوات، تعداد میتوکندری فعال را کاهش و مقدار گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) ، rH2AX و

LC3 (نشانگر اتوفاژی) را افزایش داده است. آنالیزهای qPCR نشان داده که قرار گرفتن در معرض پاراکوات باعث بیان نابجای ژن‌های مرتبط با گسترش سلول‌های کومولوس می‌شود، اما بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز تأثیری نمی‌گذارد. در مجموع، نتایج مطالعات نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض پاراکوات احتمالاً از طریق استرس اکسیداتیو بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک را مختل می‌کند(۶۸).

فهرست منابع

1. Goldman SM, Kamel F, Ross GW, Bhudhikanok GS, Hoppin JA, Korell M, et al. Genetic modification of the association of paraquat and Parkinson's disease. Mov Disord. 2012;27(13):1652-8.

2. Chen J, Su Y, Lin F, Iqbal M, Mehmood K, Zhang H, et al. Effect of paraquat on cytotoxicity involved in oxidative stress and inflammatory reaction: A review of mechanisms and ecological implications. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021;224:112711.

3. Okolonkwo B, Nwachuku E, Brisibie N. The Acute Toxicological Effects of Paraquat on Male Reproductive Hormones (Testosterone, Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone) of Intoxicated Rats. Research & Reviews: A Journal of Toxicology. 2015;5(3):13-6.

4. Mussi MA, Calcaterra NB. Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2010;151(2):240-7.

5. Qian J, Wu C-Y, Wu D-M, Li L-H, Li Q, Deng T, et al. Anthrahydroquinone-2-6-disulfonate is a novel, powerful antidote for paraquat poisoning. Scientific Reports. 2021;11(1):20159.

6. Li X, Sun AY. Paraquat induced activation of transcription factor AP-1 and apoptosis in PC12 cells. J Neural Transm (Vienna). 1999;106(1):1-21.

7. Wu Z, Nicoll M, Ingham RJ. AP-1 family transcription factors: a diverse family of proteins that regulate varied cellular activities in classical hodgkin lymphoma and ALK+ ALCL. Experimental Hematology & Oncology. 2021;10(1):4.

8. Han JF, Wang SL, He XY, Liu CY, Hong JY. Effect of genetic variation on human cytochrome p450 reductase-mediated paraquat cytotoxicity. Toxicol Sci. 2006;91(1):42-8.

9. Jafari F, Moradi S, Nowroozi A, Sadrjavadi K, Hosseinzadeh L, Shahlaei M. Exploring the binding mechanism of paraquat to DNA by a combination of spectroscopic, cellular uptake, molecular docking and molecular dynamics simulation methods. New Journal of Chemistry. 2017;41(23):14188-98.

10. Song C, Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy AG. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. Neurotoxicology. 2011;32(5):586-95.

11. Gibney E, Nolan C. Epigenetics and gene expression. Heredity. 2010;105(1):4-13.

12. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. Epigenetics. 2014;9(6):823-8.

13. Zeng Y, Chen T. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. Genes. 2019;10(4):257.

14. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nature Reviews Genetics. 2012;13(7):484-92.

15. Pacis A, Mailhot-Léonard F, Tailleux L, Randolph HE, Yotova V, Dumaine A, et al. Gene activation precedes DNA demethylation in response to infection in human dendritic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019;116(14):6938-43.

16. Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. Nature Reviews Genetics. 2011;12(8):565-75.

17. Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS. Genomic imprinting mechanisms in mammals. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2008;647(1-2):77-85.

18. Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. Human molecular genetics. 2000;9(19):2885-94.

19. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-willi syndrome. Genetics in medicine. 2012;14(1):10-26.

20. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. Journal of medical genetics. 2003;40(2):87-95.

21. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2013;368(1609):20110330.

22. McGraw S, Zhang JX, Farag M, Chan D, Caron M, Konermann C, et al. Transient DNMT1 suppression reveals hidden heritable marks in the genome. Nucleic acids research. 2015;43(3):1485-97.

23. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell. 1992;69(6):915-26.

24. McGraw S, Oakes CC, Martel J, Cirio MC, de Zeeuw P, Mak W, et al. Loss of DNMT1o disrupts imprinted X chromosome inactivation and accentuates placental defects in females. PLoS genetics. 2013;9(11):e1003873.

25. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. Development. 2012;139(5):829-41.

26. Adam MP. The all-or-none phenomenon revisited. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology. 2012;94(8):664-9.

27. Breton-Larrivée M, Elder E, McGraw S. DNA methylation, environmental exposures and early embryo development. Anim Reprod. 2019;16(3):465-74.

28. Smith P, Heath D, Fishman AP. Paraquat. CRC critical reviews in toxicology. 1976;4(4):411-45.

29. Lock EA, Wilks MF. Paraquat. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology: Elsevier; 2010. p. 1771-827.

30. Sittipunt C. Paraquat poisoning. Respiratory care. 2005;50(3):383-5.

31. Yang C-C, Wu J-F, Ong H-C, Hung S-C, Kuo Y-P, Sa C-H, et al. Taiwan national poison center: epidemiologic data 1985–1993. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology. 1996;34(6):651-63.

32. Gawarammana IB ,Buckley NA. Medical management of paraquat ingestion. British journal of clinical pharmacology. 2011;72(5):745-57.

33. Ranji N, Jafarzadeh MM, Kochakinegad R, Habibollahi H. Evaluation Of N-Acetyl Cyctein Effects In Inhibition Of Inflamation And Tissue Damage On The Lungs Of Rats Exposed To Acute And Chronic Doses Of Lead. URMIAMJ. 2022;32(11):831-9.

34. Jaafarzadeh MM, Ranji N, Aboutaleb E. The effect of N-acetylcysteine on the levels of copper, zinc and expression of matrix metalloproteinases in the liver. Pol J Vet Sci. 2021;24(2):191-9.

35. Alizadeh B, Salehzadeh A, Ranji N, Arasteh A. Effects of N-Acetyl Cysteine on Genes Expression of c-myc, and Ask-1, Histopathological, Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in the Liver of Male Rats Exposed to Cadmium. Biol Trace Elem Res. 2022;200(2):661-8.

36. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. Toxicology. 2002;180(1):65-77.

37. Rahmani Talatappeh N, Ranji N, Beigi Harchegani A. The effect of N-acetyl cysteine on oxidative stress and apoptosis in the liver tissue of rats exposed to cadmium. Archives of Environmental & Occupational Health. 2021;76(8):518-25.

38. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. Wiad Lek. 2004;57(9-10):453.٥-

39. Dial CAB, Dial NA. Effects of paraquat on reproduction and mortality in two generations of mice. Archives of environmental contamination and toxicology. 1987;16(6):759-64.

40. Cui S, Nian Q, Chen G, Wang X, Zhang J, Qiu J, et al. Ghrelin ameliorates A549 cell apoptosis caused by paraquat via p38-MAPK regulated mitochondrial apoptotic pathway. Toxicology. 2019;426:152267.

41. Shirinsokhan A, Khazaei Koohpar Z, Ranji N, safari F. Effects of N-Acetyl Cysteine on the Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in the Lung Tissue of Rats Exposed to Cadmium. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2020;22.(١١)

42. Harchegani AB, Rostami S, Mohsenifar Z, Dafchahi AB, Moghadam FM, Jaafarzadeh M, et al. Anti-apoptotic properties of N-Acetyl cysteine and its effects on of Liver X receptor and Sirtuin 1 expression in the liver of rats exposed to Lead. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2022;74:127070.

43. Zhang Z-D, Yang Y-J, Liu X-W, Qin Z, Li S-H, Li J-Y. Aspirin eugenol ester ameliorates paraquat-induced oxidative damage through ROS/p38-MAPK-mediated mitochondrial apoptosis pathway. Toxicology. 2021;453:152721.

44. Trakulsrichai S, Paisanrodjanarat B, Sriapha C, Tongpoo A, Udomsubpayakul U, Wananukul W. Clinical outcome of paraquat poisoning during pregnancy. Clinical Toxicology. 2019;57(8):712-7.

45. Goldman J, Stoker T, Perreault S, Cooper R, Crider M. Influence of the formamidine pesticide chlordimeform on ovulation in the female hamster: Dissociable shifts in the luteinizing hormone surge and oocyte release. Toxicology and applied pharmacology. 1993;121(2):279-90.

46. Bretveld RW, Thomas CM, Scheepers PT, Zielhuis GA, Roeleveld N. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? Reproductive Biology and Endocrinology. 2006;4(1):1-14.

47. Recio R, Robbins WA, Borja-Aburto V, Moran-Martinez J, Froines J, Hernandez R, et al. Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. Environmental health perspectives. 2.٤٠-١٢٣٧:(١٢)١٠٩;٠٠١

48. Borgeest C, Symonds D, Mayer L, Hoyer P, Flaws J. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. Toxicological sciences. 2002;68(2):473-8.

49. Bhardwaj JK, Mittal M, Saraf P, Kumari P. Pesticides induced oxidative stress and female infertility: a review. Toxin Reviews. 2018.

50. Das R, Thakur K, Shrivastava A, Puri A, Mutsuddi M. Identifying Epigenetic Endpoints Of Pesticide Exposure Can Curtail Risk To Develop Cancer: A Review. International Journal Of Advanced Research. 2017;5:1093-107.**51.** Hausburg MA, Dekrey GK, Salmen JJ, Palic MR, Gardiner CS. Effects of paraqua

t on development of preimplantation embryos in vivo and in vitro. Reprod Toxicol. 2005;20(2):239-46

52. Trakulsrichai S, Paisanrodjanarat B, Sriapha C, Tongpoo A, Udomsubpayakul U, Wananukul W. Clinical outcome of paraquat poisoning during pregnancy. Clinical Toxicology. 2019;57:1-6.

53. Mussi MA, Calcaterra NB. Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2010;151(2):240-7.

54. Azarmehr Z, Ranji N, Khazaei Koohpar Z, Habibollahi H. The effect of N-Acetyl cysteine on the expression of Fxr (Nr1h4), LXRalpha (Nr1h3) and Sirt ١genes, oxidative stress, and apoptosis in the liver of rats exposed to different doses of cadmium. Mol Biol Rep. 2021;48(3):2533-42.

55. Greenlee AR, Ellis TM, Berg RL. Low-Dose Agrochemicals and Lawn-Care Pesticides Induce Developmental Toxicity in Murine Preimplantation Embryos. Environmental Health Perspectives. 2004;112(6):703-9 .

56. Pang YW, Sun YQ, Sun WJ, Du WH, Hao HS, Zhao SJ, et al. Melatonin inhibits paraquat-induced cell death in bovine preimplantation embryos. Journal of pineal research. 20.٦٦-١٥٥:(٢)٦٠;١٦

57. Pang YW, Jiang XL, Wang YC, Wang YY, Hao HS, Zhao SJ, et al. Melatonin protects against paraquat-induced damage during in vitro maturation of bovine oocytes. Journal of pineal research. 2019;66(1):e12532.

58. Ranji N, Sadeghizadeh M ,Shokrgozar MA, Bakhshandeh B, Karimipour M, Amanzadeh A, et al. MiR-17-92 cluster: an apoptosis inducer or proliferation enhancer. Mol Cell Biochem. 2013;380(1-2):229-38 .

59. Ranji N, Sadeghizadeh M, Karimipoor M, Shokrgozar MA, Ebrahimzadeh-Vesal R. AKT family and miRNAs expression in IL-2 induced CD4(+)T cells. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(11):886-94.

60. Ranji N, Sadeghizadeh M, Karimipoor M, Shokrgozar MA, Nakhaei Sistani R, Paylakhi SH. MicroRNAs Signature in IL-2-Induced CD4+ T Cells and Their Potential Targets. Biochemical Genetics. 2015;53(7):169-83.

61. Pakizehkar S, Ranji N, Sohi AN, Sadeghizadeh M. Polymersome-assisted delivery of curcumin: A suitable approach to decrease cancer stemness markers and regulate miRNAs expression in HT29 colorectal cancer cells. Polymers for Advanced Technologies. 2020;31(1):160-77 .

62. Hossainzadeh S, Ranji N, Naderi Sohi A, Najafi F. Silibinin encapsulation in polymersome: A promising anticancer nanoparticle for inducing apoptosis and decreasing the expression level of miR-125b/miR-182 in human breast cancer cells. Journal of Cellular Physiology. 2019;234(12):22285-98.

63. Yin Y, Zhou L, Yuan S. Enigma of retrotransposon biology in mammalian early embryos and embryonic stem cells. Stem cells international. 2018.٢٠١٨;

64. Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM, et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. Nature genetics. 2015;47(5):469-78.

65. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. Nature Reviews Genetics. 2013;14(3):204-20.

66. O'Farrell NJ, Phelan JJ, Feighery R, Doyle B, Picardo SL, Ravi N, et al. Differential expression profiles of oxidative stress levels, 8-oxo-dG and 4-HNE, in barrett's esophagus compared to esophageal adenocarcinoma. International journal of molecular sciences. 2019;20(18):4449.

67. Arthikala M-K, Montiel J, Sánchez-López R, Nava N, Cárdenas L, Quinto C. Respiratory burst oxidase homolog gene a is crucial for rhizobium infection and nodule maturation and function in common bean. Frontiers in plant science. 2017;8:2003.

68. Zhou N, Liu Q, Qi X, Zhang X, Ru Z, Ma Y, et al. Paraquat exposure impairs porcine oocyte meiotic maturation. Theriogenology. 2022;179:60-8.

Review Article

Epigenetic effects of paraquat on development of preimplantation embryo

Hadiseh Beheshti Dafchahi[1], Parastoo Vakili nezami[1], Fatemeh Sadat Mousavi[1], **Najmeh Ranji[2]**

1- Msc, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

2- Assistant Proffesor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. Corresponding Authar: n_ranji@iaurasht.ac.ir , najmehranji@gmail.com

Received:2022.06.13 **Accepted: 2022.08.05**

Abstract

The first vital stage in the developmental program occurs at the time before implantation, after fertilization, and before implantation of the fetus in the uterus. This period represents a vulnerable stage because the epigenome undergoes dynamic changes in DNA methylation profiles. Changes in early embryonic reprogramming can disrupt DNA methylation patterns and cause permanent changes in the growth program, leading to the onset of adverse health outcomes in offspring. Although there are many evidences that exposure to harmful substances during embryonic development before implantation can cause lasting epigenetic changes in offspring, the mechanisms are not yet fully understood. Since the physiological or pathological changes in DNA methylation can occur in response to environmental cues, a suitable environment plays an important role in fetal growth success. In this review article, we investigated the mechanisms involved in fetal epigenetic reprogramming during DNA methylation and maternal environmental stressors, such as the effects of paraquat herbicide during the pre-implantation stages of the embryo.

Keywords: epigenetics, DNA methylation, pre-implantation embryos, prenatal exposures, developmental programing