



# The effects of maternal folic acid administration on the expression of *mmu-miR-103-1-5p* and *Mtr* in the cerebral cortex of mouse pups

Khoshkar Chalaksarei Z<sup>a</sup>, Mashayekhi F<sup>b</sup>

<sup>a</sup>MSC Student, Department of Basic Science, University of Guilan, Rasht, Postcode 4193833697, Iran

<sup>b</sup> Ph.D, Department of Basic Science, University of Guilan, Rasht, Postcode 4193833697, Iran

## Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Khoshkar Chalaksarei Z, Mashayekhi F. The effects of maternal folic acid administration on the expression of *mmu-miR-103-1-5p* and *Mtr* in the cerebral cortex of mouse pups. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(1):1-17.

<https://doi.org/10.61882/JCT/16..1.1>

## KEYWORDS

MicroRNAs  
FolicAcid  
real-time PCR  
Mtr

## EXTENDED ABSTRACT

**Aim:** Folate, also known as Vitamin B9, is a water-soluble nutrient present in natural food sources. It plays a crucial role in DNA synthesis and repair, as well as in methylation reactions. Folic acid (FA) is the synthetic form of folate found in enriched foods and supplements. The effects of folate deficiency after birth have not been extensively studied. MicroRNAs (miRNAs) are a type of non-coding RNAs that play essential roles in regulating gene expression. In recent years, miRNAs have been associated with various aspects of brain development, including neurogenesis, neuronal migration, axon and dendrite formation, and synaptogenesis. Additionally, altered expression and dysregulation of miRNAs have been linked to neurodevelopmental disorders. Methionine synthase (*Mtr*) is involved in amino acid metabolism and is responsible for converting the amino acid homocysteine to methionine. *Mtr* is crucial for brain development and is associated with myelin content. This project aimed to investigate the impact of maternal FA supplementation during pregnancy on the expression of *mmu-miR-103-1-5p* and *Mtr* in the cerebral cortex of mouse pups.

**Materials and Methods:** A total of 45 pregnant mice were divided into three groups, with 15 mice in each group. The first and second groups received FA at doses of 2 and 40 mg/kg of body weight daily by gavage throughout their entire pregnancy, respectively. The third group did not receive FA and served as the control. Subsequently, the cerebral cortex of the offspring was collected immediately after birth for the analysis of *mmu-miR-103-1-5p* and *Mtr* expression using real-time PCR. Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism software.

**Results:** In the FA-treated group, the expression of *mmu-miR-103-1-5p* at a dose of 2 mg/kg body weight was  $0.46 \pm 0.01$ , and at a dose of 40 mg/kg body weight, it was  $0.27 \pm 0.02$ , whereas in the control group, it was  $1.0007 \pm 0.03$ . Statistical analysis

\* Corresponding author. Tel.: 01332117496

E-mail address: [mashayekhi@guilan.ac.ir](mailto:mashayekhi@guilan.ac.ir)

DOI: <https://10.61882/JCT/16.1.1>

Received: 21 Oct. 2024; Received in revised form: 7 Jan. 2025; Accepted: 12 Jan. 2025

Review article

© Author



revealed a significant decrease in mmu-miR-103-1-5p expression at both the 2 mg/kg and 40 mg/kg doses compared to the controls ( $p < 0.0001$ ). Furthermore, there was a significant decrease in mmu-miR-103-1-5p expression between the FA-treated groups ( $p < 0.0001$ ). The expression level of *Mtr* in the cerebral cortex was also studied. In the FA-treated groups, the expression at a dose of 2 mg/kg body weight was  $1.54 \pm 0.04$ , and at a dose of 40 mg/kg body weight, it was  $0.20 \pm 0.01$ , compared to the control group, which was  $1.0003 \pm 0.02$ . One-way variance analysis showed a significant increase in *Mtr* expression at the 2 mg/kg dose compared to the controls and a significant decrease at the 40 mg/kg dose compared to the controls ( $p < 0.0001$ ). Additionally, there was a significant decrease in *Mtr* expression between the FA-treated groups ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** It is concluded that the standard dose of FA was found to reduce the expression of mmu-miR-103-1-5p and enhance the expression of *Mtr* when compared to the controls. However, an elevated dose of FA decreases the expression of both genes in comparison to the controls. Therefore, FA alters the expression of mmu-miR-103-1-5p and *Mtr*, potentially impacting brain development, while excessive amounts may have an adverse effect.



## اثرات تجویز اسیدفولیک مادر بر بیان *Mtr* و *mmu-miR-103-1-5p* در قشر مغز نوزادان موش

زهرا خوشکارچالکسرائی<sup>۱</sup>، فرهاد مشایخی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

<sup>۲</sup> استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

واژگان کلیدی	چکیده
<b>MicroRNAs</b> اسیدفولیک ریل تایم پی سی آر ۵-متیل تتراهیدروفولات- هوموسیستتین متیل ترانسفراز	<p><b>هدف:</b> با توجه به نقش مهم اسیدفولیک در سنتز و ترمیم DNA و تکثیر سلولی و تکوین مغز، در این پروژه به بررسی تاثیر اسیدفولیک (FA) در دوران بارداری بر بیان <i>Mtr</i> و <i>mmu-miR-103-1-5p</i> در قشر مغز نوزادان موش بود. <b>مواد و روش:</b> در مجموع ۴۵ موش بارداری به سه گروه با پانزده موش در هر گروه تقسیم شدند. گروه اول و دوم به ترتیب FA با دوزهای ۲ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه از طریق گاوژ در تمام دوران بارداری دریافت کردند. گروه سوم FA دریافت نکردند (کنترل). متعاقباً، قشر مغز نوزادان بلافاصله پس از تولد برای آنالیز بیان <i>Mtr</i> و <i>mmu-miR-103-1-5p</i> جمع آوری شد. <b>نتایج:</b> نتایج نشان داد که کاهش معنی داری در بیان <i>mmu-miR-103-1-5p</i> در دوزهای ۲ و ۴۰ نسبت به گروه کنترل وجود دارد. ضمناً، کاهش معنی داری در بیان <i>mmu-miR-103-1-5p</i> بین گروه‌های تحت تیمار با FA مشاهده شد. همچنین افزایش معنی داری در بیان <i>Mtr</i> در دوز ۲ نسبت به گروه کنترل و کاهش معنی داری در دوز ۴۰ نسبت به گروه کنترل نشان داد. به علاوه کاهش معنی داری در بیان <i>Mtr</i> بین گروه‌های تحت تیمار با FA مشاهده شد. <b>نتیجه‌گیری:</b> دوز طبیعی FA بیان <i>mmu-miR-103-1-5p</i> را کاهش و بیان <i>Mtr</i> را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد. دوز بالای FA بیان هر دو ژن را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌دهد. در نتیجه AF بیان <i>p5-1-301-Rim-umm</i> و <i>rtM</i> را تغییر می‌دهد و به‌طور بالقوه بر رشد مغز تاثیر می‌گذارد، در حالی که مقادیر بیش از حد ممکن است تاثیر نامطلوبی داشته باشد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۱۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳	

### ۱- مقدمه

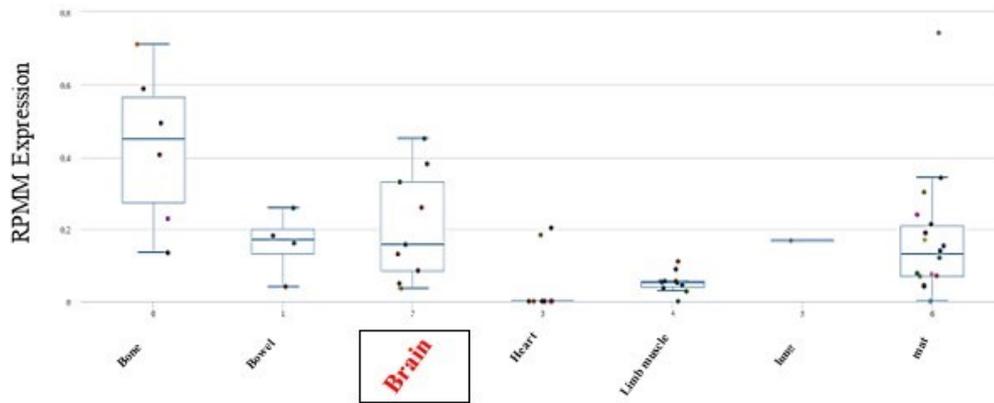
تکوین مغز در پستانداران با نورولاسیون (Neurulation) آغاز می‌شود، نورولاسیون فرآیند پیچیده‌ای است که در موش، از روز ۸/۵ جنینی شروع و در طی آن لوله‌ی عصبی ایجاد می‌شود (۱). متعاقباً تولید نورون‌ها، نوروگلیاها و مهاجرت آن‌ها و تشکیل سیناپس‌ها رخ می‌دهد (۲). همراه با ایجاد سیناپس‌ها (Synaptogenesis)، تشکیل میلین (Myelination) یکی از ویژگی‌های تعیین کننده رشد اولیه مغز پس از تولد است. تشکیل میلین قبل از تولد در سطح بسیار پایین شروع می‌شود و در دوره پس از

تولد تسریع می‌یابد (۳). برای رشد و نمو صحیح مغز عوامل محیطی و ژنتیکی نقش مهمی ایفا می‌کنند، به طوری که مغز در غیاب سیگنال‌های ژنتیکی و ورودی‌های محیطی ضروری به طور طبیعی رشد نخواهد کرد (۴). مواد غذایی شامل ویتامین‌ها نقش مهمی در بیان ژن‌ها ایفا می‌کنند. فولات که به‌عنوان ویتامین B<sub>9</sub> نیز شناخته می‌شود از منابع غذایی مشتق شده است و به‌عنوان یک حامل کلیدی متیل عمل کرده و در واکنش‌های متیلاسیون مانند واکنش‌های لازم برای سنتز نوکلئوتیدها شرکت می‌کند. بنابراین، فولات با فعال کردن سنتز DNA در سلول‌های در حال تکثیر، از رشد سریع پشتیبانی می‌کند (۵). به‌طور کلی اصطلاح اسیدفولیک به اشکال مصنوعی ویتامین B<sub>9</sub> و فولات به فرم طبیعی آن اطلاق می‌شود (۶). کمبود اسیدفولیک در رژیم غذایی که منجر به افزایش سطح هموسیستئین خون به دلیل تبدیل ناکافی هموسیستئین به متیونین می‌شود، منجر به کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز عصبی در حال تکثیر شده و بر نورون‌ها تأثیر می‌گذارد و باعث نقض‌های لوله‌ی عصبی (sDTN = stcefed ebut larueN) می‌شود (۷). فراوان‌ترین گونه فولات در گردش، ۵-متیل تتراهیدروفولات است که برای سنتز متیونین از هموسیستئین از طریق آنزیم متیونین سنتاز استفاده می‌شود. سلول‌های مغزی فقط از طریق آنزیم متیونین سنتاز می‌توانند هموسیستئین را به متیونین تبدیل کنند (۸). علاوه بر عوامل محیطی بیان ژن‌ها هم برای رشد طبیعی مغز ضروری هستند. یکی از ژن‌های مهم، ژن متیونین سنتاز ( $rtM = esahtmys\ eninoihtem$ ) است که برای ساخت آنزیمی به نام متیونین سنتاز نقش دارد. این آنزیم در پردازش آمینواسیدها، واحدهای سازنده پروتئین‌ها نقش دارد و انتقال یک گروه متیل از ۵-متیل تتراهیدروفولات به هموسیستئین را کاتالیز می‌کند و تتراهیدروفولات و متیونین تولید می‌کند (۹). مهار متیونین سنتاز به‌عنوان واسطه چرخه متیونین و فولات باعث مهار متیل ترانسفرازها شده و در نتیجه هیپومتیلاسیون AND را به همراه دارد (۱۰). هیپومتیلاسیون AND عملکردهای حیاتی سیستم عصبی مرکزی را که برای زندگی پس از تولد لازم است، مختل می‌کند (۱۱).

علاوه بر متیلاسیون DNA، عوامل دیگری نظیر miRNA ها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها دارند. miRNA ها، RNA های غیرکننده ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که پس از رونویسی بیان ژن‌ها را با جفت شدن به mRNA تنظیم می‌کنند. پیش بینی می‌شود که بیش از نیمی از همه mRNA ها اهداف miRNA ها باشند و هر miRNA تا صدها ژن هدف را تنظیم می‌کند (۱۲). miRNA ها در رشد و فعالیت عصبی مغز نقش مهمی ایفا می‌کنند به طوری که در تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی و سلول‌های بنیادی عصبی مغز نقش مهمی دارند (۱۳). روابط دو جهته‌ای بین وضعیت فولات و پروفایل‌های ANRim وجود دارد، فولات می‌تواند وضعیت ANRim را از طریق تنظیم بیان ژن تغییر دهند که ممکن است از طریق نقش فولات به‌عنوان منبع گروه‌های متیل برای متیلاسیون AND یا مکانیسم‌های دیگر رخ دهد. ANRim به‌نوبه خود می‌تواند بیان ژن‌ها یا آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیسم کربن وابسته به فولات، تغییر دهد (۱۴). هدف از این پژوهش بررسی اثرات تجویز اسیدفولیک مادر بر بیان *rtM* و *p5-1-301-Rim* در قشر مغز نوزادان موش است.

## ۲- مواد و روش

جهت اطمینان از بیان *Mtr* و *mmu-miR-103-1-5p* از پایگاه‌های اطلاعات علمی mirdb (<https://mirdb.org>) و tissueatlas2 (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas2>) استفاده شد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱: داده‌های پایگاه tissueatlas2 نشان می‌دهد که *mmu-miR-103-1-5p* در بافت‌های گوناگون از جمله مغز بیان می‌شود.

**MicroRNA and Target Gene Description:**

miRNA Name	<b>mmu-miR-103-1-5p</b>	miRNA Sequence	GGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUG
Previous Name	mmu-miR-103-1*		
Target Score	93	Seed Location	198, 227
NCBI Gene ID	<b>238505</b>	GenBank Accession	<b>NM_001081128</b>
Gene Symbol	<b>Mtr</b>	3' UTR Length	468
Gene Description	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase		

شکل ۲: داده‌های پایگاه mirdb نشان می‌دهد که ژن Mtr یکی از ژن‌های هدف *mmu-miR-103-1-5p* است.

**روش تهیه نمونه:** موش‌های سوری نژاد BALB/c از پژوهشکده شمال انستیتو پاستور ایران واقع در شهر آمل تهیه و در اتاق حیوانات دانشکده علوم دانشگاه گیلان نگهداری شد. در طی این دوره، غذای مخصوص موش از شرکت دام و طیور پارس واقع در تهران خریداری و در اختیار موش‌ها قرار داده شد. چرخه‌های شبانه روزی به صورت ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب تنظیم شد. برای به‌دست آوردن نوزادان، موش‌های نر و ماده به مدت ۱۰ ساعت در طول شب در یک قفس قرار داده شدند. صبح روز بعد، موش‌های ماده از نظر وجود یا عدم وجود درپوش واژنی (Vaginal plug) مورد بررسی قرار گرفتند. وجود درپوش واژنی نشان دهنده جفت‌گیری است. موش‌ها به سه گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. از روز نخست بارداری به طور روزانه، به گروه اول مقدار ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک (دوز طبیعی)، به گروه دوم ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک (دوز بالا) و به گروه سوم به‌عنوان گروه کنترل تحت هیچ‌گونه تیماری قرار نگرفتند. به طور متوسط ۴۵ نوزاد از هر گروه جمع‌آوری شدند

و ۲۰ تا از نمونه‌های حاصل از استخراج بافت قشر مغز آن‌ها جهت بررسی بیان *Mtr* و *miR-1-5p* با Real time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

در این پژوهش کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. تمامی مراحل انجام شده، طبق آیین نامه اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه گیلان با شناسه کداخلاق IR.GUILAN.REC.1403.027 انجام شد.

### مراحل بررسی بیان ژن

**روش استخراج RNA از بافت مغز:**  $60 \pm 5$  میلی‌گرم بافت مغز را به‌وسیله تیغ در هاون قطعه قطعه کرده تا به‌صورت ماده همگن دربیاید.

- (۱) بافت به کمک تیغ اسکالپل جمع‌آوری و در یک میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتر ریخته شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر تریزول سرد به میکروتیوب افزوده شد. میکروتیوب حاوی نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی یخ انکوبه شد.
- (۲) پس از آن مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد به میکروتیوب افزوده و ۲۰ ثانیه تکان داده، سپس برای ۱۵ دقیقه نمونه روی یخ قرار گرفت.
- (۳) برای جداسازی RNA از DNA و پروتئین، نمونه بلافاصله به مدت ۱۵ دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با دور ۲۱۰۰۰ mpr سانتریفیوژ شد. محلول ۳ فاز حاصل شده، به ترتیب شامل: فاز رویی RNA، فاز سفید رنگ DNA و پروتئین و فاز رنگی فنولی (تریزول و کلروفرم) است.
- (۴) به کمک سمپلر حجم ۵۰۰-۲۰۰ میکرولیتر از فاز رویی جدا و به میکروتیوب جدید منتقل شد. سپس هم حجم فاز رویی کشیده شده، ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.
- (۵) میکروتیوب حاوی نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ mpr در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال‌دار قرار گرفت و ایزوپروپانول بیرون ریخته شد و فقط رسوب RNA در انتهای میکروتیوب باقی ماند.
- (۶) ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۵ درصد سرد به میکروتیوب افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ mpr سانتریفیوژ شد. پس از آن مایع رویی حاوی اتانول بیرون ریخته شد و فقط رسوب سفید رنگ RNA در انتهای میکروتیوب باقی ماند. در ادامه میکروتیوب‌های حاوی رسوب به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه زیر هود به‌صورت وارونه قرار داده شد تا الکل باقی‌مانده تبخیر شود. سپس با توجه به مقدار رسوب داخل میکروتیوب حجم ۵۰-۲۰ میکرولیتر آب DEPC سرد به میکروتیوب اضافه شد. در نهایت برای نگهداری RNA استخراج شده، میکروتیوب حاوی نمونه به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

### بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به طریقه زیر ارزیابی شد:

الف) سطح کمی غلظت RNA، به کمک دستگاه NanoDrop Spectrophotometer Blue-Ray EZ1000 مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا دستگاه به کمک آب DEPC کالیبره شد.

۳ میکرولیتر از آن روی شناساگر دستگاه بارگذاری شد. نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر، خلوص RNA استخراج شده را نشان داد. بهترین حالت در محدوده ۲/۲-۱/۸ نانومتر است. از آنجایی که پروتئین‌ها در ۲۸۰ نانومتر جذب می‌شوند، کم‌تر از

این مقدار نشان دهنده آلودگی RNA استخراج شده با پروتئین می‌باشد. همچنین بهترین مقدار جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر حدود ۲ یا بالاتر می‌باشد و مقدار کمتر از آن نشان دهنده آلودگی نمونه با نمک‌ها و ترکیبات فنول دار است.

ب) جهت تایید نتایج نانودراپ، کیفیت نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز بررسی شد. ابتدا ۱۰/۸ گرم تریس (Tris) باز، ۰/۷۴۴ گرم EDTA و ۵/۵ گرم بوریک‌اسید (Boric acid) توسط ترازو وزن و به‌وسیله آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه ژل ۰/۳۷ گرم آگارز و ۲۵ میلی‌لیتر بافر TBE درون بشر ریخته و مخلوط شد.

بشر به ماکروویو با درجه حرارت ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و ۰/۲۵ میکرولیتر Safe stain اضافه شد. پس از گذشت حدود ۲۰ دقیقه، ژل آگارز ۱/۵ درصد آماده و شانه به درون تانک الکتروفورز منتقل شد. مقدار ۳ میکرولیتر مارکر (Ladder) ۱۰۰ bp به‌داخل چاهک اول و ۵ میکرولیتر نمونه‌ی RNA با ۱ میکرولیتر رنگ Loading Dye مخلوط شده و به‌درون چاهک‌های بعدی ریخته شد. در ادامه دستگاه به‌مدت ۵۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت روشن شد.

**سنتز Cdna.** به‌دلیل ناپایدار بودن رشته RNA و امکان تخریب آن در طول آزمایش، پس از استخراج، به cDNA تبدیل می‌شود.

برای انجام سنتز cDNA، ابتدا مقدار RNA مورد نیاز با توجه به میزان غلظتی که نانودراپ نشان داده بود، تعیین شد سپس سنتز cDNA مطابق با پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده‌ی کیت سنتز cDNA انجام شد. مقدار RNA محاسبه شده به میکروتیوب ۰/۲ میکرولیتر اضافه شد و سپس مقدار لازم از میکس به نمونه اضافه شد (با توجه به پروتکل شرکت، محتویات میکروتیوب به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد). سپس میکروتیوب طبق برنامه درون دستگاه PCR انکوبه شد. در نهایت جهت نگهداری طولانی مدت، ANDc سنتز شده به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. جهت صحت انجام تست RCP و نیز نرمال‌سازی کردن بیان ژن‌ها، از ژن کنترل داخلی HDPAG و 6U به ترتیب برای rtM و p5-1-301-Rim-umm استفاده شد.

**رقیق‌سازی پرایمرها و انواع آن:** به‌منظور استفاده از رسوب پرایمرهای سنتز شده، ابتدا رقیق‌سازی اولیه و سپس رقیق‌سازی ثانویه صورت گرفت. در ادامه درون استوک‌های حاوی پرایمر، طبق دستورالعمل شرکت سنتز کننده، میزان مشخصی آب مقطر تزریقی استریل به آرامی افزوده. سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. هر بار قبل از استفاده از پرایمرها، ابتدا استوک‌های حاوی پرایمر پس از قرار گرفتن در دمای اتاق به نسبت ۱ (پرایمر) به ۹۱ (آب) تحت رقیق‌سازی ثانویه قرار گرفتند.

**بررسی بیان ژن توسط Real Time PCR.** در Real Time PCR، از گزارشگرهای فلورسنت استفاده می‌شود که به DNA متصل شده و هنگامی که DNA تکثیر می‌شود، مقدار فلورسانس افزایش می‌یابد.

با توجه به پروتکل پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده SYBR Green، میکس مرتبط با Real Time PCR ساخته شد و به استریپ اضافه شد. به جهت اطمینان از صحت نتایج، هر نمونه به‌صورت دو تکرار به‌درون استریپ انتقال یافت و برای هر نمونه به‌عنوان کنترل منفی (CTN = lortnoC etalpmE oN) در نظر گرفته شد؛ زیرا انتظار می‌رود در نمونه CTN به‌دلیل عدم وجود ANDc، نتیجه منفی گزارش شود. در انتها استریپ‌های حاوی نمونه به دستگاه RCP emiT laeR انتقال داده شد. تعیین دمای اتصال در دستگاه RCP emiT laeR بر اساس نتایج حاصل از RCP tneidarG، برای rtM و p5-1-301-Rim-umm به ترتیب ۶۰ و ۵۷ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جزئیات برنامه دستگاه RCP emiT laeR با توجه به پروتکل neerG RBYS شرکت زیست ویرایش به دستگاه داده شد.

### ۳- آنالیز آماری

بیان نسبی ژن *Mtr* و *mmu-miR-103-1-5p* در دو گروه تیمار شده با دوزهای ۲ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک و کنترل نسبت به هم مقایسه شد. برای این کار ابتدا داده‌های حاصل از Real Time PCR وارد نرم افزار Excel شد و سپس طبق فرمول  $\Delta\Delta Ct$ ،  $\Delta Ct$  و  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Fold change)، بیان نسبی ژن‌های دو گروه مورد مطالعه به دست آمد.

$\Delta Ct = Ct - Ct$  (ژن کنترل داخلی) -  $Ct$  (ژن مورد نظر)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct$  (میانگین گروه کنترل)

Fold change =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

در نهایت نمودار تغییر بیان ژن‌ها به کمک نرم افزار GraphPad Prism رسم شد و برای بررسی معنادار بودن تغییرات، Fold change وارد نرم افزار شد و تحت آزمون‌هایی از قبیل آزمون نرمال بودن داده‌ها (Normality Tests) و آنالیز واریانس یک‌طرفه (AVONA yaw-eno) قرار گرفت.

### آنالیز بیوانفورماتیک

#### الف) ساخت شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین (*Protein-Protein interactive network*)

شبکه ۳۲ پروتئین مرتبط با *Mtr* با امتیاز برهم‌کنش (Interactor Score) بالای ۰/۹ ترسیم شد و غنی‌سازی کارکردی (Functional Enrichment) برای یافتن مرتبط‌ترین فرایندهای زیستی (GO Biological Process)، کارکردهای مولکولی (GO Molecular Function)، ساختارهای سلولی (GO Cellular Component) و مسیرهای KEGG انجام شد.

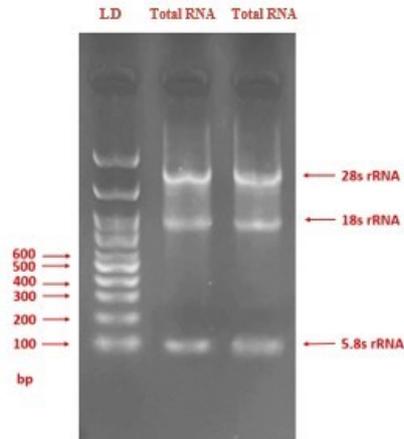
#### ب) شناسایی miRNA های موثر به عملکرد *Mtr*

برای شناسایی miRNA های پیش‌بینی شده‌ای که بر *Mtr* تاثیر می‌گذارند، از چهار پایگاه داده مختلف، شامل: TargetScan، miRDB، NPInter و RNAInter استفاده شد. ما به دنبال miRNA هایی بودیم که در بین هر ۴ پایگاه داده مشترک بودند. پیوند تنظیمی بین ANRm و ANRim برای ساخت شبکه تنظیمی ANRm-ANRim استفاده شد. این شبکه با استفاده از نرم‌افزار epacsotyC (نسخه ۲.۹.۳) رسم شد. همچنین تمامی ژن‌های هدف p5-1-301-Rim-umm از پایگاه داده BDRim شناسایی و به کمک نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شدند.

### ۵- نتایج

#### نتایج حاصل از بررسی کمی و کیفی *Total RNA*

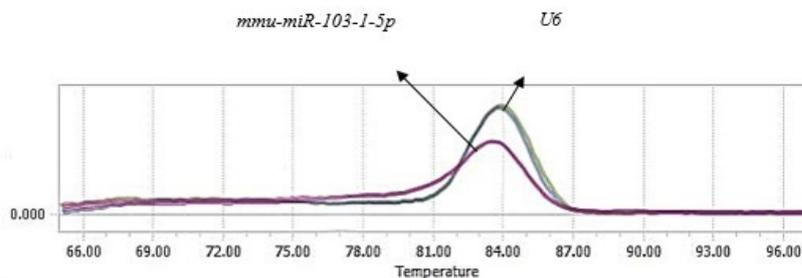
بر اساس نتایج دستگاه نانودراپ، غلظت اکثر نمونه‌ها در بازه‌ی ۶۰۰ تا ۹۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و جذب در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ که شاخصی جهت بررسی خلوص، عدم آلودگی و کیفیت می‌باشد در بازه‌ی ۱/۸ تا ۲ قرار داشت. بعد از آن به منظور sANRr ۵ مشاهده/بررسی کیفیت ANR های استخراجی، ژل آگارز با دستگاه الکتروفورز بررسی شد و باندهای s، ۸۱، ۸۲ و ۸s گردید که نشان دهنده کیفیت خوب ANR ها می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳: ژل آگارز ۱/۵ درصد از RNA استخراج شده. اولین ستون از سمت چپ نشان دهنده مارکر ۱۰۰ bp و ستون‌های سمت راست نشان دهنده RNA کل استخراج شده است. سه باند ۱۸S، ۲۸S و ۵/۸S در تصویر نشان داده شده است. LD: مارکر ۱۰۰ bp.

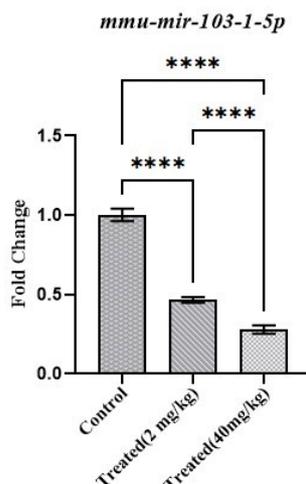
### نتایج بیان *mmu-miR-103-1-5p* در قشر مغز نوزادان تیمار شده با اسید فولیک و گروه کنترل

با توجه به شیب دمایی پرایمر miRNA، نمودار ذوب برای *mmu-miR-103-1-5p* و *u6* در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد رسم شد (شکل ۴).



شکل ۴: نمودار ذوب مربوط به *mmu-miR-103-1-5p* و *U6*. در تصویر بالا دما روی محور افقی، فلورسانس روی محور عمودی راست و تغییرات فلورسانس به دما روی محور عمودی چپ نشان داده شده است. تمام قله‌های مربوط به نمونه‌های مختلف *mmu-miR-103-1-5p* در یک مکان نشان داده شدند.

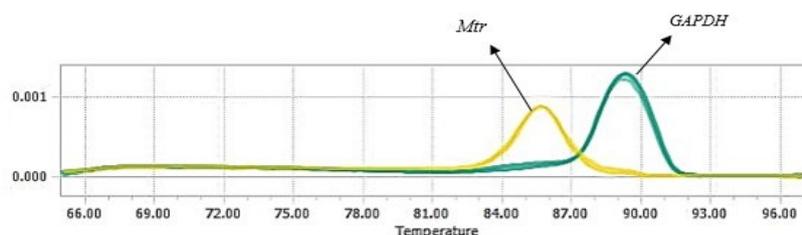
میزان بیان *mmu-miR-103-1-5p* در گروه تیمار ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک، برابر با  $0.1 \pm 0.46$  و در گروه تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک برابر  $0.2 \pm 0.27$  بود که در مقایسه با گروه کنترل  $0.3 \pm 0.007$  است. بررسی واریانس یک‌طرفه نشان داد که بیان *mmu-miR-103-1-5p* کاهش معناداری در گروه تیمار دوز ۲ نسبت به گروه کنترل ( $p < 0.0001$ ) و گروه تیمار دوز ۴۰ نسبت به گروه کنترل ( $p < 0.0001$ ) و همچنین گروه تیمار دوز ۲ نسبت به گروه تیمار دوز ۴۰ وجود دارد ( $p < 0.0001$ ) (شکل ۵).



شکل ۵: میزان بیان نسبی *mmu-miR-103-1-5p* در سه گروه تیمار ۲ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک و گروه کنترل. \*\*\*\* نشان دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌ها است. Control: گروه کنترل، Treated (2mg/kg): گروه تیمار دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک، Treated (40mg/kg): گروه تیمار دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک. میزان بیان *mmu-miR-103-1-5p* در گروه تیمار ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک،  $0.46 \pm 0.01$  و در گروه تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک  $0.27 \pm 0.02$  در مقایسه با گروه کنترل  $1.00 \pm 0.03$  است، کاهش معناداری بین هر دو گروه تیمار نسبت به گروه کنترل و دو گروه تیمار با یکدیگر وجود دارد ( $p < 0.0001$ ).

### نتایج بیان *Mtr* در قشر مغز نوزادان تیمار شده با اسیدفولیک و گروه کنترل

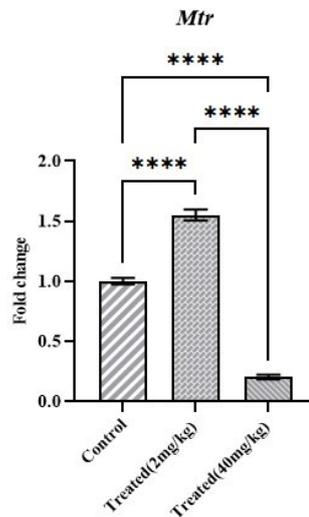
نمودار ذوب برای *Mtr* و *GAPDH* با توجه به شیب دمایی پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد رسم گردید (شکل ۶).



شکل ۶: نمودار ذوب مربوط به نمونه‌های مختلف *Mtr* و *GAPDH*. در تصویر بالا دما روی محور افقی، فلورسانس روی محور عمودی راست و تغییرات فلورسانس به دما روی محور عمودی چپ نشان داده شده است.

میزان بیان *Mtr* در گروه تیمار ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک برابر با  $1.54 \pm 0.04$  و گروه تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک برابر با  $0.20 \pm 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل  $1.00 \pm 0.03$  است. بررسی واریانس یک‌طرفه افزایش معناداری بین گروه تیمار دوز ۲ نسبت به گروه کنترل و کاهش معناداری بین گروه تیمار دوز ۴۰ نسبت به گروه کنترل

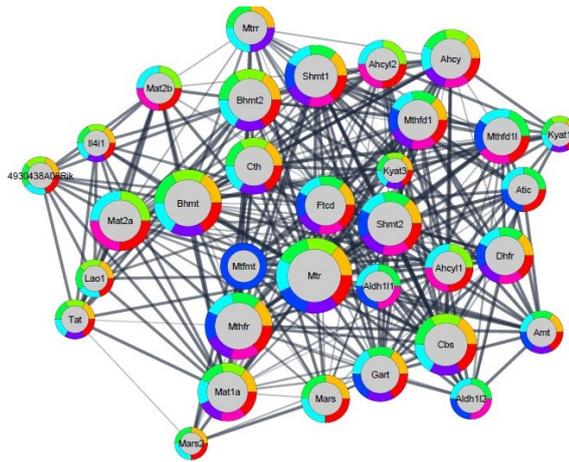
نشان داد ( $p < 0/0001$ ). همچنین کاهش معناداری بین بیان *Mtr* گروه تیمار دوز ۲ در مقایسه با گروه تیمار دوز ۴۰ وجود دارد ( $p < 0/0001$ ) (شکل ۷).



شکل ۷: میزان بیان نسبی *Mtr* در سه گروه تیمار ۲ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک و گروه کنترل. \*\*\*\* نشان دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌ها است. Control: گروه کنترل، Treated (2mg/kg): گروه تیمار دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک، Treated (40mg/kg): گروه تیمار دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک. میزان بیان *Mtr* در گروه تیمار ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک،  $1/54 \pm 0/04$  و گروه تیمار ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک،  $0/20 \pm 0/01$  در مقایسه با گروه کنترل،  $1/0003 \pm 0/02$  است. افزایش معناداری بین گروه تیمار دوز ۲ نسبت به گروه کنترل و کاهش معناداری بین گروه تیمار دوز ۴۰ نسبت به گروه کنترل دیده شد ( $p < 0/0001$ ). همچنین کاهش معناداری بین بیان گروه تیمار دوز ۲ در مقایسه با گروه تیمار دوز ۴۰ وجود دارد ( $p < 0/0001$ ).

### نتایج حاصل از برهمکنش پروتئین-پروتئین

نتایج حاصل از غنی‌سازی کارگردی و یافتن مرتبط ترین فرایندهای زیستی مرتبط با *rtM* اندازه هر پروتئین بیانگر تعداد برهم‌کنش‌های آن در شبکه و رنگ‌های دور هر پروتئین بیانگر هشت غنی‌سازی نخست از نظر مقدار نرخ کشف نادرست (False Discovery Rate=FRD) می‌باشد. در مرکز این شبکه پروتئین متیونین سنتاز یا *rtM* قرار دارد که نقش کلیدی در مسیرهای متابولیکی و متیلاسیون ایفا می‌کند. پروتئین‌های مرتبط با *Mtr* مانند *Mthfr*، *Shmt*، *Bhmt* و بقیه در این شبکه دیده می‌شود. تعاملات پروتئینی یا مسیرهای متابولیکی مرتبط با متیلاسیون یا متابولیسم اسیدفولیک نشان داده شد (شکل ۸). همچنین جزئیات داده‌های حاصل در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.



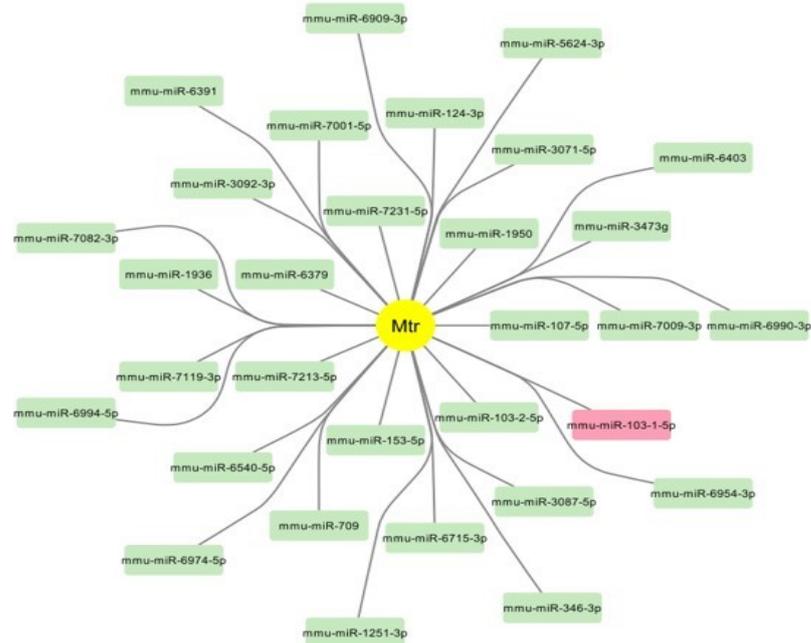
شکل ۸: تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن‌های انتخاب شده. برای هر فرآیند بیولوژیک یک رنگ اختصاص داده شده است. هر دایره نمایانگر یک پروتئین و خطوط بین آن‌ها بیانگر ارتباطات بین آن‌ها است.

جدول ۱: جزئیات فرآیندهای بیولوژیک نشان داده شده در شکل ۸.

پایگاه داده‌ها	رنگ	عملکرد بیولوژیکی	FDR value
GO Biological Process	Orange	متابولیسم آمینواسید سلولی	1.29E-34
KEGG Pathways	Light Green	متابولیسم سیستئین و متیونین	7.52E-33
GO Biological Process	Green	متابولیسم اسید کربوکسیلیک	4.80E-31
GO Biological Process	Cyan	متابولیسم مولکول‌های کوچک	4.80E-31
KEGG Pathways	Blue	ایجاد مخزن فولات برای واکنش یک کربن	1.67E-30
GO Biological Process	Purple	متابولیسم آلفا آمینواسیدها	2.39E-29
GO Biological Process	Magenta	متابولیسم یک کربن	7.08E-28
KEGG Pathways	Red	مسیرهای متابولیسمی	1.57E-27

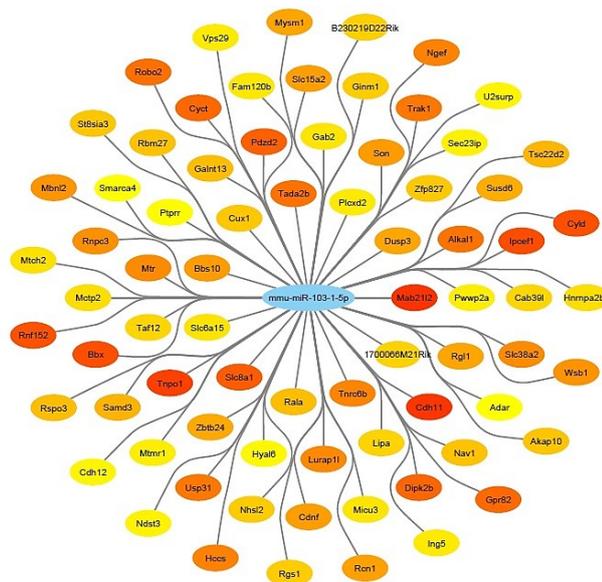
### نتایج برهمکنش پروتئین-miRNA

بر اساس نتایج حاصل از چهار پایگاه داده مختلف (TargetScan، NPInter، miRDB و RNAInter)، miRNA هایی که اثر تنظیمی بر بیان *Mtr* دارند شناسایی و در نرم‌افزار Cytoscape به تصویر کشیده شدند. در مجموع ۳۱ miRNA به‌طور مشترک در همه پایگاه‌های داده پیش بینی شده است. ارتباط ژن هدف با ANRim های مختلف از جمله *p5-1-301-rim-umm* مورد مطالعه در این تحقیق نشان داده شده است (شکل ۹).



شکل ۹: شبکه تعاملی پروتئین-miRNA. هر مستطیل نشان دهنده یک miRNA است. گره صورتی نشان رنگ دهنده *mmu-miR-103-1-5p* است.

همچنین تمامی ژن‌های هدف *mmu-miR-103-1-5p* که از پایگاه داده miRDB شناسایی و به کمک نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شدند. نقش تنظیمی *mmu-miR-103-1-5p* در مسیرهای مختلف سلولی و بیان ژن‌های مربوط به رشد مغز یا فرآیند‌های دیگر است. شدت هر رنگ از زرد تا قرمز نشان دهنده میزان اهمیت و نقش هر ژن و در نهایت پروتئین در تکوین مغز است (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: شبکه تعاملی پروتئین-miRNA. این شبکه نشان دهنده نقش تنظیمی *mmu-miR-103-1-5p* در مسیرهای مختلف سلولی و بیان ژن‌های مربوط به رشد مغز یا فرآیند‌های دیگر است. شدت هر رنگ از زرد تا قرمز نشان دهنده میزان اهمیت و نقش هر ژن و در نهایت پروتئین در تکوین مغز است.

## ۵- بحث

فولات یا ویتامین B<sub>9</sub> یک ریزمغذی ضروری است که مانند سایر اعضای خانواده خود محلول در آب می‌باشد. این ویتامین طی چرخه متابولیسمی خود در بدن موجودات زنده با شرکت در واکنش یک کربن به یک‌سری از فرآیندهای حیاتی از جمله سنتز متیونین، کاهش سطح هموسیستئین، ساخت بازهای آلی مورد استفاده در ساختار DNA و متیلاسیون DNA کمک می‌کند (۱۵). در طول تشکیل مغز در مهره‌داران یکی از مهم‌ترین اتفاقات شکل‌گیری لوله عصبی است که نبود مقدار کافی فولات در رژیم غذایی مادر باردار می‌تواند بر این فرآیند تأثیر بگذارد (۱۶). عملکرد متیونین سنتز چرخه متیونین و فولات را به هم متصل و آن را به یک گروه مهم در متابولیسم اولیه تبدیل می‌کند که بر فرآیندهای مهم سلولی مانند آنابولیسم، رشد و سنتز پروتئین‌ها، پلی آمین‌ها، نوکلئوتیدها و لیپیدها تأثیر می‌گذارد (۱۷). یکی دیگر از عوامل موثر در بیان صحیح ژن‌ها و در نهایت شکل‌گیری مغز دسته‌ای miRNA هستند که می‌توانند در اکثر موارد روی بیان ژن‌ها اثر مهاري و یا گاهی تحریکی داشته باشند (۱۸). مطالعات متعددی در خصوص اثر اسیدفولیک بر بیان ژن‌ها انجام شده است:

در مطالعه‌ای Heydari و همکاران (۱۹)، نشان دادند که تزریق داخل جنینی اسیدفولیک باعث افزایش بیان *DABI* و کاهش *gga-miR-182-5p* در قشر مغز جنین جوجه در حال رشد می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر Razeghi و همکاران (۲۰) نشان دادند که اسیدفولیک باعث افزایش *BDNF* و کاهش بیان *gga-miR-190a-3p* در قشر مغز جوجه در حال رشد می‌شود. همچنین Yan و همکاران (۲۱) با بررسی اثرات اسیدفولیک با غلظت ۵ برابر بیشتر از سطح توصیه شده در جنین‌های ۱۷/۵ روزه و نوزادان ۳۰ روزه موش نشان دادند افزایش دوز اسیدفولیک باعث تغییرات رونویسی در قشر مغز جنین ۱۷/۵ روزه و نوزاد ۳۰ روزه موش می‌شود. Li و همکاران (۲۲). با مطالعاتی که بر روی موش‌های صحرایی انجام دادند؛ دریافتند کمبود اسیدفولیک مادر باعث افزایش آپوپتوزیس سلول‌های عصبی در هیپوکامپ و قشر مغز در فرزندان شد و کمبود اسیدفولیک مادر، بیان ژن *Bcl-2* را کاهش و بیان ژن *Bax* و *microRNA-34a* افزایش داد. همچنین Mahajan و همکاران تأثیر اسیدفولیک و ویتامین B<sub>12</sub> را در دو نسل از موش‌ها بررسی کردند. نسل اول مادرانی بودند که به مدت چهار هفته با دو ویتامین B<sub>9</sub> و B<sub>12</sub> تغذیه شدند و نسل دوم زاده‌های این نسل بودند که به مدت شش هفته رژیم غذایی شامل همان دو ویتامین را پس از آن که از شیر گرفته شدند تجربه کردند. نتایج نشان داد که میزان بیان *122-Rim* و *384-Rim* در هر دو نسل افزایش یافت. Henzel و همکاران (۲۳) نشان دادند که، اختلال در رشد جنین، از دست دادن جنین و تاخیر در رشد جنینی موش‌ها می‌تواند ناشی از مصرف دوز بالای اسیدفولیک در غذای مادر در طول بارداری باشد. همچنین وضعیت فولات مادر در موش‌ها بر متیلاسیون DNA و بیان ژن در نیمکره‌های مغزی فرزندان تأثیر می‌گذارد (۲۴). Partearroyo و همکاران با بررسی دوزهای ۰، ۸، ۴۰ و ۲ (گروه شاهد) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک بر روی موش‌های صحرایی دریافتند که موش‌های در حال رشدی که از رژیم غذایی اصلاح شده با اسیدفولیک تغذیه می‌شوند، شامل رژیم‌های غذایی کم مصرف و مکمل، خطر اختلال در کورتیکوژنز مخچه را افزایش می‌دهند (۲۵). همچنین Liu و همکاران (۲۶)، دریافتند کمبود اسیدفولیک می‌تواند تجمع آمیلوئید بتا را در مغز موش افزایش دهد و بیان *miR-200b-3p* و *miR-339-5p* که miRNA های مرتبط با آمیلوئید هستند را کاهش دهد. در مطالعه‌ای دیگر Barua و همکاران (۲۷)، با بررسی دوزهای ۲ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک در موش دریافتند که اسیدفولیک اضافی در طول بارداری می‌تواند متیلاسیون DNA و بیان ژن‌هایی مثل *4a6c1S* را در مخچه فرزندان تغییر داده و لذا باعث تغییر بیان این ژن‌ها می‌شود.

در طی مطالعاتی که Barua و همکاران (۲۸) انجام دادند، نشان داده شد که افزایش مصرف اسیدفولیک در طول بارداری بیان ژن‌ها را در نیمکره مغزی نوزادان تغییر می‌دهد و باعث کاهش بیان ژن‌های *Vgll2*، *Zfp353*، *Htr4*، *Cpn2* و افزایش بیان

ژن‌های *Xist* و *Nkx6-3*، *Leprel1*، *Nfix*، *Slcl7a7* می‌شود. بنابراین باتوجه به اهمیت ویژه اسیدفولیک در تکوین مغز، ممکن است در مقادیر بالا اثر منفی داشته باشد. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که نوشیدن مزمن الکل سطح فولات را کاهش و متیونین سنتاز را مهار می‌کند، در نتیجه باعث کاهش متیونین و اس-آدنوزیل متیونین ( $S\text{-Adenosyl methionine} = SAM$ ) و افزایش همزمان هموسیستئین و آدنوزیل هموسیستئین ( $S\text{-adenosylhomocysteine} = SAH$ ) می‌شود. *SAH* بیشتر متیل ترانسفرازهای دی ان ای ( $DNA\ methyl\text{-}transferases = DNMTs$ ) را مهار می‌کند و در نهایت منجر به هیپومتیلاسیون *DNA* می‌شود (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که، بروز نقص لوله عصبی از زمان غنی‌سازی مواد غذایی با اسیدفولیک به طور قابل توجهی کاهش یافته است. رژیم غذایی حاوی ۲۰ برابر بیشتر از میزان مصرف توصیه شده برای جوندگان، اثرات نامطلوبی بر رشد جنین موش در روزهای جنینی ۰۱/۵ و ۴۱/۵ داشت (۲۹).

نتایج این تحقیق نشان داد که دوز طبیعی اسیدفولیک (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) سبب کاهش بیان *mmu-miR-103-1-5p* و افزایش بیان *Mtr* نسبت به گروه کنترل شد، اما دوز بالا (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) سبب کاهش بیان هر دو ژن نسبت به گروه کنترل گردید. یکی از مکانیسم‌های تنظیمی که در سطح *AND* عمل می‌کند، متیلاسیون آن است. بنابراین یکی از علت‌های کاهش بیان *p5-1-301-Rim-umm* احتمالاً افزایش سطح متیلاسیون پروموتور ژن توسط دهنده‌ی متیل یعنی اسیدفولیک باشد. هر *ANRim* تحت تاثیر *ANRim*‌های مختلفی است. بنابراین کاهش یا افزایش یک *ANRim* به تنهایی نمی‌تواند سبب تغییر بیان ژن‌ها شود. *ANRim*‌ها معمولاً نقش مهاری دارند، لذا با کاهش بیان *p5-1-301-Rim-umm* احتمالاً یکی از دلایل افزایش بیان *rtM* می‌تواند این تحقیق باشد. در مورد کاهش بیان *rtM*، مکانیسم تنظیمی احتمالاً به رونویسی ژن بر می‌گردد که همانند *miRNA*‌ها، متیله شدن پروموتور ژن و نبود فاکتورهای رونویسی اختصاصی و عدم انجام رونویسی از ژن پیش‌بینی می‌شود. از آنجایی‌که در نتیجه چرخه فولات گروه‌های متیل جهت متیله شدن *DNA* مورد استفاده قرار می‌گیرند، دوز بالای اسیدفولیک سبب متیله شدن پروموتور ژن‌ها می‌شود که یک مکانیسم سرکوب بیان ژن است. بنابراین در دوز بالا می‌تواند تاثیر منفی بر بیان ژن‌ها داشته باشد.

## ۶- نتیجه گیری

به‌طور کلی نتیجه گیری می‌شود که دوز طبیعی اسیدفولیک سبب کاهش بیان *mmu-miR-103-1-5p* و افزایش بیان *rtM* نسبت به گروه کنترل می‌شود، اما دوز بالاتر از حد طبیعی آن سبب کاهش بیان هر دو ژن نسبت به گروه کنترل می‌شود. بنابراین اسیدفولیک باعث تغییر بیان *mmu-miR-103-1-5p* و *Mtr* شده و احتمالاً از این طریق بر تکوین مغز تاثیر می‌گذارد. همچنین آنالیز بیوانفورماتیک و نتایج حاصل از بررسی شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین نیز نقش این ژن‌ها را در تکوین مغز تایید می‌کند.

## ۷- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان رشت جهت تامین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

## ۸- منابع

1. Zohn IE, Sarkar AA. Modeling neural tube defects in the mouse. *Current topics in developmental biology*. 2008;84:1-35.

2. Schepanski S, Buss C, Hanganu-Opatz IL, Arck PC. Prenatal immune and endocrine modulators of offspring's brain development and cognitive functions later in life. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2186.
3. Jiang DL. Deficiency of Myelin Proteins during Brain Development in Fragile X Mice: University of Toronto (Canada); 2015.
4. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychology review*. 2010;20(4):327-48.
5. Grützner N, Opriessnig T, Lopes R, Suchodolski JS, Nathues H, Steiner JM. Assessment of folate and cobalamin concentrations in relation to their dependent intracellular metabolites in serum of pigs between 6 and 26 weeks of age. *Research in veterinary science*. 2020;130:59-67.
6. Imbard A, Benoist J-F, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(9):4352-89.
7. Kruman II, Mouton PR, Emokpae Jr R, Cutler RG, Mattson MP. Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport*. 2005;16(10):1055-9.
8. Miller AL. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. (*Homocysteine & Cognitive*). *Alternative Medicine Review*. 2003;8(1):7-20.
9. Mascarenhas R, Gouda H, Ruetz M, Banerjee R. Human B12-dependent enzymes: Methionine synthase and Methylmalonyl-CoA mutase. *Methods in enzymology*. 668: Elsevier; 2022. p. 309-26.
10. Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol research: current reviews*. 2013;35(1):6.
11. Fan G, Beard C, Chen RZ, Csankovszki G, Sun Y, Siniiaia M, et al. DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(3):788-97.
12. Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, Stavetska RV, Oleshko VP, Babenko OI, et al. Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Ruminant Research*. 2020;193:106276.
13. Sharma H, Kaushik M, Goswami P, Sreevani S, Chakraborty A, Ashique S, et al. Role of miRNAs in Brain Development. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*. 2024.
14. Beckett EL, Veysey M, Lucock M. Folate and microRNA: bidirectional interactions. *Clinica Chimica Acta*. 2017;474:60-6.
15. Van De Rest O, Van Hooijdonk LW, Doets E, Schiepers OJ, Eilander A, De Groot LC. B Vitamins and n-3 fatty acids for brain development and function: Review of human studies. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2012;60(4):272-92.
16. Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annual review of neuroscience*. 2014;37(1):221-42.
17. Scott J, Amich J. The role of methionine synthases in fungal metabolism and virulence. *Essays in Biochemistry*. 2023;67(5):853-63.
18. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Briefings in bioinformatics*. 2019;20(5):1836-52.
19. Heydari B, Mashayekhi F, Kashani MHG. Effect of in ovo feeding of folic acid on Disabled-1 and gga-miR-182-5p expression in the cerebral cortex of chick embryo. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2024;108(2):285-90.

20. Razeghi E, Mashayekhi F, Ghasemian F, Salehi Z. Effect of in ovo feeding of folic acid on brain derived neurotrophic factor (BDNF) and gga-miR-190a-3p expression in the developing cerebral cortex of chickens. *Research in Veterinary Science*. 2023;154:73-7.
21. Luan Y, Cosín-Tomás M, Leclerc D, Malysheva OV, Caudill MA, Rozen R. Moderate folic acid supplementation in pregnant mice results in altered sex-specific gene expression in brain of young mice and embryos. *Nutrients*. 2022;14(5):1051.
22. Li W, Li Z, Zhou D, Zhang X, Yan J, Huang G. Maternal folic acid deficiency stimulates neural cell apoptosis via miR-34a associated with Bcl-2 in the rat foetal brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2019;72:6-12.
23. Mahajan A, Sapehia D, Thakur S, Mohanraj PS, Bagga R, Kaur J. Effect of imbalance in folate and vitamin B12 in maternal/parental diet on global methylation and regulatory miRNAs. *Scientific reports*. 2019;9(1):17602.
24. Henzel KS, Ryan DP, Schröder S, Weiergräber M, Ehninger D. High-dose maternal folic acid supplementation before conception impairs reversal learning in offspring mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):3098.
25. Partearroyo T, Pérez-Miguelsanz J, Peña-Melián Á, Maestro-de-Las-Casas C, Úbeda N, Varela-Moreiras G. Low and high dietary folic acid levels perturb postnatal cerebellar morphology in growing rats. *British Journal of Nutrition*. 2016;115(11):1967-77.
26. Liu H, Tian T, Qin S, Li W, Zhang X, Wang X, et al. Folic acid deficiency enhances abeta accumulation in APP/PS1 mice brain and decreases amyloid-associated miRNAs expression. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(12):1502-8.
27. Barua S, Kuizon S, Chadman KK, Brown WT, Junaid MA. Microarray analysis reveals higher gestational folic acid alters expression of genes in the cerebellum of mice offspring—a pilot study. *Brain sciences*. 2015;5(1):14-31.
28. Barua S, Chadman KK, Kuizon S, Buenaventura D, Stapley NW, Ruocco F, et al. Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. *PLoS One*. 2014;9(7):e101674.
29. Mikael LG, Deng L, Paul L, Selhub J, Rozen R. Moderately high intake of folic acid has a negative impact on mouse embryonic development. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2013;97(1):47-52.