

Research Paper

The Impact of Folic Acid Supplementation During Pregnancy on the Expression of *Nav1* and *Nlgn1* Genes in the Cerebral Cortex of Newborn Mice



Zahra Khoshkar Chalaksarei¹ , *Farhad Mashayekhi¹

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.



Citation Khoshkar Chalaksarei Z, Mashayekhi F. [The Impact of Folic Acid Supplementation During Pregnancy on the Expression of *Nav1* and *Nlgn1* Genes in the Cerebral Cortex of Newborn Mice (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2025; 34(3):308-321. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.3.2348.1>

<https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.3.2348.1>

Received: 07 Nov 2024

Accepted: 18 Feb 2025

Available Online: 01 Oct 2025

ABSTRACT

Background Folic acid (FA), the synthetic form of folate, plays an important role in brain development. Neuron navigator 1 (*Nav1*) is a cytoskeleton-associated protein that plays a role in neuronal cell migration. Neuroligin1 (*Nlgn1*) is a cell adhesion molecule involved in the formation of synapses.

Objective This study aimed to assess the effects of FA supplementation during pregnancy on the expression of *Nav1* and *Nlgn1* genes in the cerebral cortex of newborn mice.

Methods Forty-five pregnant BALB/c mice were divided into three groups of 15. The first and second groups received FA at doses of 2 mg/kg/BW (normal) and 40 mg/kg/BW (high) daily during pregnancy, respectively. The third group did not receive FA and was the control group. Neonatal cerebral cortex was collected for *Nav1* and *Nlgn1* expression analysis using real-time PCR.

Results The expression levels of *Nav1* and *Nlgn1* in the normal-dose FA group were higher than in the control group, while their expression levels in the high-dose FA group were lower than in the controls ($P < 0.001$). The expression levels of *Nav1* and *Nlgn1* genes in the high-dose FA group were significantly lower than in the normal-dose FA group ($P < 0.001$).

Conclusion Using 2 mg/kg/BW FA during pregnancy increases the expression of *Nav1* and *Nlgn1* genes in the cerebral cortex of newborn mice, while 40 mg/kg/BW FA reduces their expression. Therefore, normal doses of FA affect brain development by changing the expression of two genes, while high doses of FA may have a negative effect. The protein-protein interaction showed the relationship between the two *Nav1* and *Nlgn1* proteins and their role in the synapse.

Keywords:

Folic acid (FA), *Nav1*, *Nlgn1*, Real-time PCR, Gene expression, Pregnancy

* Corresponding Author:

Farhad Mashayekhi, Professor.

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Tel: +98 (911) 3330017

E-Mail: mashayekhi@guilan.ac.ir



Copyright © 2025 The Author(s);
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Extended Abstract

Introduction

Synapse formation is a critical step in the assembly of neuronal circuits. Both secreted and membrane-associated proteins contribute to the assembly and maturation of synapses. In addition, vitamins, including folate and genes, have been suggested to play an important role in synaptogenesis. Folate is essential for the development and proper functioning of the nervous system. Getting enough folic acid (FA), the synthetic form of folate, at the time of conception lowers the risk for most neural tube defects in the offspring. It has been demonstrated that periconceptional FA supplementation promotes synaptic plasticity in male rat offspring and exerts long-term beneficial effects on cognitive performance. Moreover, some studies revealed that FA had a positive impact on the recovery of learning and memory abilities through alleviating synapse loss and synaptic dysfunction in Alzheimer's disease.

Many genes have been shown to be involved in the differentiation, proliferation, and migration of neurons during brain development. For example, during neuronal migration, growth, and axon guidance, there are cytoskeletal proteins known as navigators. The neuron navigator 1 (*Nav1*) is involved in neuronal migration and neuronal signaling pathways that guide axons in the appropriate direction. Other genes involved in synapse formation include the neuroligin family members, which may form trans-synaptic contacts with presynaptic neurexins. Neuroligins are essential for the proper maturation of synapses and brain function by recruiting scaffolding proteins, postsynaptic receptors, and signaling proteins. neuroligin1 (*Nlgn1*) is a cell adhesion molecule involved in the formation of synapses. The aim of this study was to evaluate the effect of normal and high doses of FA during pregnancy on the expression of *Nav1* and *Nlgn1* genes in the cerebral cortex of newborn mice.

Methods

Forty-five pregnant BALB/c mice were divided into three groups (15 per group). The first and second groups received FA at doses of 2 mg/kg/BW (normal) and 40 mg/kg/BW (high) daily during pregnancy, respectively. The third group did not receive FA and was considered the control group. Neonatal cerebral cortex was collected for the expression analysis of *Nav1* and *Nlgn1* genes using real-time PCR.

Results

Based on the results of the Nanodrop device, the concentration of total RNA in most samples was in the range of 600-900 ng/μl, and the absorbance ratio at 260/280 nm (which is an indicator for examining purity, lack of contamination, and quality of RNA) was in the range of 1.8-2. In order to examine the quality of the extracted RNAs, they were examined by agarose gel electrophoresis, and the rRNA bands of 18s, 28s, and 8/5s were observed, indicating good quality of the RNAs. The expression level of the *Nav1* gene in the group treated with 2 mg/kg/BW FA was 1.48 ± 0.08 , which was significantly higher than in the control group (1.001 ± 0.05) ($P < 0.001$). The expression level of this gene in the group treated with 40 mg/kg/BW FA was 0.20 ± 0.02 , which was significantly lower than in the control group ($P < 0.001$). Also, a significant difference in *Nav1* gene expression was observed between the normal and high-dose FA groups ($P < 0.0001$). Similar results were observed for the *Nlgn1* gene. The expression of this gene in the normal-dose FA group was significantly higher than in the control group (1.21 ± 0.02 vs 1.001 ± 0.04 , $P < 0.001$). In the high-dose FA group, the expression level was significantly lower than in the control group (0.13 ± 0.03 , $P < 0.001$).

The protein-protein interaction was also examined by bioinformatics analysis. A network of 100 proteins related to *Nlgn1* and *Nav1* was mapped and functionally enriched to find the most relevant biological processes, molecular functions, cellular structures, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways. The two genes were connected to each other through protein or functional interactions, as well as through synaptic regulation.

Conclusion

The results of this study showed that the normal dose of FA can increase the expression of *Nav1* and *Nlgn1* genes in the cerebral cortex of newborn mice. However, the high dose of FA reduces the expression of both genes. One of the reasons for the decrease in gene expression after injection of high doses of FA is probably due to the increase in the level of gene promoter methylation by the methyl donor, folic acid. High doses of FA cause the methylation of gene promoters, a mechanism that suppresses gene expression. Additionally, the protein-protein interaction revealed the relationship between the two *Nav1* and *Nlgn1* proteins, highlighting the crucial role of these two proteins in synapses and ultimately in brain development.

Ethical Considerations



Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of the [University of Guilan](#), Rasht, Iran (Code: IR.GUILAN.REC.1403.027).

Funding

This study was funded by the [University of Guilan](#), Rasht, Iran.

Authors contributions

Conceptualization, study design, funding acquisition, critical revision and supervision: Farhad Mashayekhi; preparing the initial draft and statistical analysis: Zahra Khoshkar Chalaksarei; Data analysis and interpretation, administrative, technical, or material support: All authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Vice-Chancellor for Research of the [University of Guilan](#) for providing financial support.



مقاله پژوهشی

تأثیر مصرف مکمل اسید فولیک در دوران بارداری بر تغییرات بیان ژن های *Nav1* و *Nlgn1* در قشر مغز نوزاد موش

زهرا خوشکار چالکسرائی^۱، *فرهاد مشایخی^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Khoshkar Chalaksarei Z, Mashayekhi F. [The Impact of Folic Acid Supplementation During Pregnancy on the Expression of *Nav1* and *Nlgn1* Genes in the Cerebral Cortex of Newborn Mice (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2025; 34(3):308-321. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.3.2348.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.3.2348.1>

چکیده

زمینه: اسید فولیک فرم مصنوعی فولات نقش مهمی در تکوین مغز ایفا می‌کند. هدایتگر عصبی ۱ (*Neuron Navigator 1 (Nav1)*) پروتئین مرتبط با اسکلت سلولی است که در مهاجرت سلول‌های عصبی نقش دارد. هدایتگرهای عصبی (*Neurologin1 (Nlgn1)*) مولکول چسبندگی سلولی است که در تشکیل سیناپس نقش دارد.

هدف: این مطالعه تأثیر مکمل اسید فولیک در دوران بارداری بر تغییرات بیان ژن‌های *Nav1* و *Nlgn1* در قشر مغز نوزاد موش است. **روش‌ها:** ۴۵ موش‌های باردار به ۳ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول و دوم به ترتیب اسید فولیک با دزهای ۲ (طبیعی) و ۴۰ (بالا) میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه در دوران بارداری دریافت کردند. گروه سوم به عنوان کنترل، اسید فولیک دریافت نکردند. قشر مغز نوزادان برای آنالیز بیان *Nav1* و *Nlgn1* با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی (Real-time PCR) جمع‌آوری شد.

یافته‌ها: بیان *Nav1* و *Nlgn1* در قشر مغز در دز طبیعی (۲) بیشتر از گروه کنترل و در گروه دز بالا، یعنی ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کمتر از گروه کنترل بود ($P < 0.001$). در حالی که میزان بیان این ۲ ژن در دز بالا (۴۰) کاهش معنی داری نسبت به گروه دز طبیعی (۲) نشان داد ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: دز طبیعی اسید فولیک باعث افزایش بیان *Nav1* و *Nlgn1* و دز بالای اسید فولیک بیان هر دو ژن را در مقایسه با کنترل کاهش می‌دهد. بنابراین مقادیر طبیعی اسید فولیک با تغییر بیان ۲ ژن بر رشد مغز تأثیر می‌گذارد، ولی مقادیر بالای آن ممکن است اثر منفی داشته باشد. شبکه برهمکنش پروتئین‌ها ارتباط میان ۲ پروتئین *Nav1* و *Nlgn1* و نقش آن‌ها را بر سیناپس نشان داد.

تاریخ دریافت: ۱۷ آبان ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۳۰ بهمن ۱۴۰۳

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۴

کلیدواژه‌ها:

اسید فولیک، *Nav1*، *Nlgn1*، ریل تایم، پی‌سی‌آر، بیان ژن، بارداری

* نویسنده مسئول:

دکتر فرهاد مشایخی

نشانی: رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

تلفن: ۰۱۷ ۳۳۳۰۰۹۱۱ (۹۱۱) +۹۸

رایانامه: mashayekhi@guilan.ac.ir



Copyright © 2025 The Author(s);

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

مقدمه

تکوین مغز شامل مراحل مختلفی از رشد سلول‌های عصبی و سازماندهی آن‌ها است. در طی گاسترولاسیون که ۳ لایه جنینی تشکیل می‌شود، مغز از اکتودرم منشأ می‌گیرد. سپس در طی نورولاسیون لوله عصبی از اکتودرم شکل می‌گیرد و سیستم عصبی مرکزی را می‌سازد [۱]. تکوین مغز در موش‌ها از نظر مراحل کلیدی، مانند ایجاد سیناپس‌ها و مهاجرت نورون‌ها بسیار شبیه به انسان است، ولی تفاوت‌هایی در زمان‌بندی و برخی جزئیات وجود دارد. تشکیل نورون‌ها از حدود E11 شروع می‌شود. در این مرحله، سلول‌های پیش‌ساز عصبی شروع به تولید نورون‌ها می‌کنند که به نواحی مختلف قشر مغز مهاجرت می‌کنند. این مهاجرت به شکل‌گیری لایه‌های قشری منجر می‌شود [۲، ۳].

مواد غذایی شامل ویتامین‌ها نقش مهمی در بیان ژن‌ها دارند. فولات که به‌عنوان ویتامین B9 نیز شناخته می‌شود، یک حامل کلیدی برای متیل عمل است 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 [۴]. به‌طور کلی واژه اسید فولیک به اشکال مصنوعی ویتامین B9 و فولات به فرم طبیعی آن گفته می‌شود [۵]. کمبود اسید فولیک 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 ایجاد نورون‌ها تأثیر می‌گذارد و باعث نقص‌های لوله عصبی^۱ می‌شود [۶]. شواهد نشان می‌دهد کمبود فولات با تغییر رشد عصبی زاده‌ها، از جمله حجم کوچک‌تر کل مغز، تغییر در ضخامت قشر مغز، نوروزن تغییر یافته و ایجاد سیناپس مرتبط بوده و نقش مهمی در تغییر بیان ژن‌های مؤثر در تکوین مغز دارد [۷].

ژن‌های زیادی در تمایز، تکثیر و مهاجرت نورون‌ها در طی تکوین مغز نقش دارند. به‌عنوان نمونه برای مهاجرت نورون‌ها، رشد و هدایت آکسون‌ها، پروتئین‌های مرتبط با اسکلت سلولی به نام نایبرهای عصبی^۲ وجود دارند. هدایتگر عصبی^۳ (Nav1) به‌عنوان یکی از پروتئین‌های مرتبط با اسکلت سلولی، در مهاجرت عصبی و مسیرهای سیگنال‌دهی عصبی دخالت دارد که آکسون‌ها را در جهت مناسب هدایت می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند موش‌های فاقد Nav1 یا دارای جهش‌ها در این ژن دچار نقص‌هایی در هدایت آکسون‌ها و شکل‌گیری صحیح شبکه‌های عصبی می‌شوند. این نقص‌ها می‌توانند منجر به مشکلات عملکردی در سیستم عصبی، از جمله اختلالات حرکتی و شناختی شوند [۸]. کاهش بیان Nav1 در نورون‌ها، شکل ظاهری مخروط

رشد و نوریتوزن^۴ یا جوانه زدن رشته‌های عصبی از یک سلول، که اولین گام در توسعه شکل ظاهری یک نورون بالغ است را مختل می‌کند [۹-۱۱]. از ژن‌هایی دیگری که در ایجاد سیناپس نقش دارد، اعضای خانواده نوروليجين^۵ هستند که ممکن است تماس‌های ترانس سیناپسی با نورکسین‌های^۶ پیش‌سیناپسی ایجاد کنند. نوروليجين‌ها از طریق به‌کارگیری پروتئین‌های داربست، گیرنده‌های پس‌سیناپسی و سیگنال‌دهی پروتئین‌ها برای بلوغ مناسب سیناپس‌ها و عملکرد مغز نیاز هستند [۱۲]. به‌علاوه نوروليجين‌ها، به‌عنوان مولکول‌های چسبندگی سلولی پس‌سیناپسی، با اتصال به نورکسین‌ها (که بر روی غشای پیش‌سیناپسی قرار دارند) عوامل مهم تنظیم‌کننده رشد عصبی و انتقال سیناپسی هستند [۱۳]. ژنوم موش شامل حداقل ۴ ژن نوروليجين است که شامل Nlgn1، Nlgn2، Nlgn3 و Nlgn4 است. Nlgn1 در سطوح پایین قبل از تولد بیان می‌شود، ولی بیان آن پس از تولد افزایش می‌یابد و نسبتاً بالا باقی می‌ماند [۱۴]. پروتئین Nlgn1 در تنظیم عملکرد سیناپس‌های تحرکی دخیل بوده و تغییر در بیان آن می‌تواند به اختلالات رفتاری و شناختی، مشابه آنچه در برخی از اختلالات طیف اتیسم مشاهده می‌شود، منجر شود [۱۵].

به‌طور کلی، فولات یک ماده مغذی ضروری است که برای تکثیر DNA و به‌عنوان بستری برای طیف وسیعی از واکنش‌های آنزیمی درگیر در سنتز اسید آمینه و متابولیسم ویتامین نیاز است. نیاز به فولات در دوران بارداری افزایش می‌یابد، زیرا برای تکثیر سلول‌ها و رشد و تکوین جنین نیز لازم است. کمبود فولات با ناهنجاری‌هایی در مادران (کم‌خونی، نوروپاتی محیطی) و جنین (ناهنجاری‌های مادرزادی) همراه است. مکمل‌های غذایی با اسید فولیک در چند ماه قبل از لقاح و در مراحل اولیه رشدونمو جنینی خطر نقص لوله عصبی را کاهش می‌دهد [۱۶]. بنابراین با توجه به مطالب مذکور میزان طبیعی فولات می‌تواند با تغییر بیان ژن‌ها باعث کاهش نقص‌های لوله عصبی شده و به تکوین طبیعی سیستم عصبی مرکزی کمک کند. از طرف دیگر، بسیاری از ژن‌های پروتئین سیناپسی با پاتوزن اختلال طیف اتیسم مرتبط هستند. همچنین نشان داده شده است مجموعه‌ای از جهش‌ها در ژن‌های دخیل در تشکیل سیناپس در انسان با اختلال طیف اتیسم مرتبط هستند [۱۷]. به همین دلیل در این تحقیق به بررسی اثر اسید فولیک بر ژن‌های دخیل در سیناپس پرداخته شده است. به‌طور خلاصه، با توجه به نقش اسید فولیک در تنظیم بیان ژن و همچنین عملکردهای ژن‌های Nav1 و Nlgn1 در مهاجرت نورون‌ها، ایجاد سیناپس و تکوین مغز، در این تحقیق به بررسی اثر دزهای مختلف اسید فولیک (دز ۲ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بر بیان Nav1 و Nlgn1 در قشر مغز زاده‌های موش پس از تولد پرداخته شد.

4. Neuritogenesis
5. Neuroligins
6. Neurexins

1. Neural Tube Defects (NTDs)
2. Navigators
3. Neuron navigator1 (Nav1)

روش‌ها

روش انتخاب ژن‌های هدف

با استناد به مقالات پاور و همکاران [۱۰] و جانگ و همکاران [۱۸] ژن‌های مورد مطالعه انتخاب و میزان بیان آن‌ها در قشر مغز موش به کمک پایگاه داده اکسپرسیون اطلس^۷ به دست آمد (تصویر شماره ۱).

نحوه انتخاب دژ اسید فولیک خوراکی

بر اساس استاندارد رژیم غذایی توصیه شده توسط مؤسسه تغذیه آمریکا^۸، ۲ گروه از رژیم غذایی اسید فولیک برای موش‌ها طراحی شد: (الف) رژیم غذایی متشکل از ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک که نیاز اساسی برای جوندگان از جمله موش است. (ب) رژیم غذایی متشکل از ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک که بیش از نیاز اساسی است. دژ ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به عنوان دژ بالای اسید فولیک انتخاب شد. دژ ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر اساس نیاز اساسی جوندگان طبق استاندارد مؤسسه تغذیه آمریکا تعیین شد. دژ ۴۰ میلی گرم، که بیش از نیاز طبیعی است، برای بررسی اثرات بالقوه دزهای بالا و خطرات مرتبط با مصرف بیش از حد انتخاب شد [۱۹-۲۱].

محاسبه حجم نمونه

به کمک نرم افزار جی پاور (نسخه ۳/۱/۹/۴) [۲۲]، حجم نمونه بر اساس تحلیل توان آماری محاسبه شد. برای این منظور حجم کل نمونه بر اساس آزمون آماری به کار رفته در پژوهش، خطای نوع اول ۰/۰۵، توان آماری ۰/۸۰، و اندازه اثر ۰/۴۹ برابر با ۴۵ رأس موش به دست آمد؛ به طوری که موش‌ها به ۳ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند.

تهیه نمونه

موش‌های سوری نژاد BALB/c از پژوهشکده شمال انستیتو پاستور ایران، واقع در شهر آمل تهیه و به اتاق حیوانات دانشکده علوم دانشگاه گیلان منتقل و نگهداری شد. در طی این دوره، چرخه‌های شبانه‌روزی به صورت ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب تنظیم شد و غذای مخصوص موش از شرکت دام و طیور پارس واقع در تهران خریداری و در اختیار موش‌ها قرار داده شد. برای به دست 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^۹ مورد بررسی قرار گرفتند. وجود درپوش واژنی نشان دهنده جفت گیری است. از روز

نخست بارداری به طور روزانه، به گروه اول مقدار ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک (دژ طبیعی)، به گروه دوم ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم اسید فولیک (دژ بالا) داده شد و گروه سوم به عنوان گروه کنترل تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفت. به طور متوسط ۶۷ نوزاد ۱ روز پس از تولد هر گروه جمع آوری شدند. ۲۰ نمونه بافت قشر مغز موش‌ها استخراج شد. از واکنش ذنجیره‌ای پلیمرز کمی (Real Time PCR) جهت بررسی بیان *Nav1* و *Nlgn1* استفاده شد.

استخراج RNA از بافت مغز

۵±۶۰ میلی گرم بافت قشر مغز در یک میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتر ریخته شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر تریزول سرد به میکروتیوب افزوده شد. توسط سانتریفیوژ یخچال دار RNA از DNA و پروتئین جدا شد. میکروتیوب حاوی نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با دور در دقیقه ۱۲۰۰۰ در سانتریفیوژ یخچال دار قرار گرفت. سپس ایزوپروپانول بیرون ریخته شد و فقط رسوب RNA در انتهای میکروتیوب باقی ماند. ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۵ درصد سرد به میکروتیوب افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور در دقیقه ۷۵۰۰ 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 دقیقه زیر هود به صورت وارونه قرار داده شد تا الکل باقی مانده تبخیر شود. سپس مقدار ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب DEPC سرد به میکروتیوب اضافه شد. در نهایت RNA استخراج شده جهت آنالیزهای بعدی به فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی گراد منتقل شد.

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

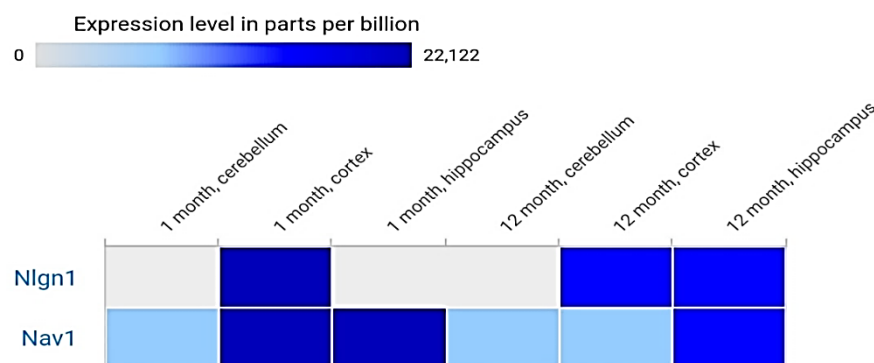
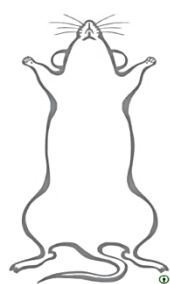
الف) سطح کمی غلظت RNA، به کمک دستگاه نانودراپ (NanoDrop Spectrophotometer Blue-Ray EZ1000) مورد بررسی قرار گرفت. جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر، خلوص RNA استخراج شده را نشان داد. بهترین حالت در محدوده ۱/۸-۲/۲ نانومتر است.

ب) جهت تأیید نتایج نانودراپ، کیفیت نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز (آگارز ۱/۵) درصد بررسی شدند.

سنتز cDNA

سنتز cDNA مطابق با پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده کیت سنتز cDNA انجام شد (شرکت زیست ویرایش - ایران). در نهایت جهت نگهداری طولانی مدت، cDNA سنتز شده به فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. جهت صحت انجام تست PCR و نیز نرمال سازی کردن بیان ژن‌ها، از ژن کنترل داخلی GAPDH برای *Nav1* و *Nlgn1* استفاده شد.

7. Expression Atlas
8. American Institute of Nutrition (AIN-93G)
9. Vaginal plug



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۱. نتایج حاصل از پایگاه داده اکسپرسیون اطلس میزان بیان ژن‌ها در بخش‌های مختلف مغز موش (مخچه، قشر مغز، هیپوکامپ) در گروه سنی ۱ ماه تا ۱۲ ماه نشان داده شده است. شدت رنگ نشان‌دهنده میزان بیان ژن‌هاست. به‌طور کلی بیان Nlgn1 با افزایش سن در قشر مغز بیشتر بیان می‌شود، در حالی که بیان Nav1 با افزایش سن کاهش می‌یابد.

۱.

رقیق سازی پرایمرها و انواع آن

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

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

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

برای مقایسه بیان ژن‌ها بین گروه‌ها، از آزمون آنوای یک‌طرفه با سطح معنی‌داری $P < 0.05$ استفاده شد. پیش‌فرض‌های آماری مانند نرمالیتی داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شدند. مقادیر Fold Change به روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه و نمودارها با نرم‌افزار GraphPad Prism ترسیم شدند.

آنالیز بیوانفورماتیک

ساخت شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین^{۱۲}

به کمک نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳/۱۰/۲) شبکه ۱۰۰ پروتئین مرتبط با Nlgn1 و Nav1 ترسیم شد و غنی‌سازی کاردی^{۱۳} برای یافتن مرتبط‌ترین فرایندهای زیستی^{۱۴}، کارکردی‌های مولکولی^{۱۵}، ساختارهای سلولی^{۱۶} و مسیرهایی^{۱۷}، KEGG، انجام شد.

به‌منظور استفاده از رسوب پرایمرهای سنتز شده، ابتدا رقیق‌سازی اولیه و سپس رقیق‌سازی ثانویه صورت گرفت (مطابق پروتکل پیشنهادی شرکت سیناکلون، ایران).

بررسی بیان ژن توسط Real Time PCR

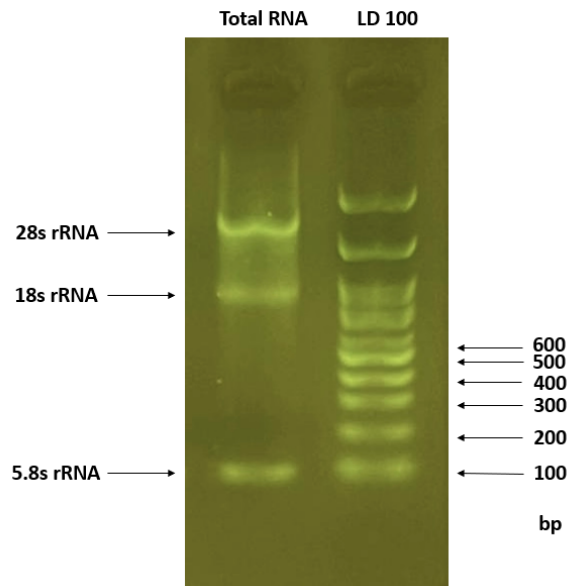
باتوجه به پروتکل پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده SYBR Green، میکس مرتبط با Real Time PCR ساخته شد و به استریپ اضافه شد. به جهت اطمینان از صحت نتایج، هر نمونه به‌صورت ۲ تکرار به درون استریپ انتقال یافت و برای هر نمونه به‌عنوان کنترل منفی^{۱۰} در نظر گرفته شد. در انتها استریپ‌های حاوی نمونه به دستگاه Real Time PCR انتقال داده شد. جهت تعیین دمای مناسب، شیب دمایی از دمای ۵۳ تا ۵۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا دمای مناسب تعیین شود (شیب دمایی PCR). در نهایت باتوجه به کیفیت باندها برای Nav1 و Nlgn1 به ترتیب دمای ۵۷ و ۵۴ در نظر گرفته شد. برنامه دستگاه Real Time PCR باتوجه به پروتکل پیشنهادی SYBR Green شرکت زیست ویرایش انجام شد.

آنالیز آماری داده‌ها

بیان نسبی ژن Nlgn1 و Nav1 در ۲ گروه تیمار شده با دُزهای ۲ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک و گروه کنترل به روش $\Delta\Delta Ct$ به دست آمد و مقادیر چند برابری^{۱۱} براساس فرمول شماره ۱ محاسبه شد.

12. Protein-Protein interactive
13. Functional Enrichment
14. GO Biological Process
15. GO Molecular Function
16. GO Cellular Component
17. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

10. No Template Control (NTC)
11. Fold change



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۲. تصویر ژل آگارز ۱/۵ درصد که از RNA کل استخراج شده است. اولین ستون از سمت راست نشان دهنده مارکر 100 bp و ستون سمت چپ نشان دهنده RNA کل استخراج شده است. ۳ باندها 28 s، 18 s و 5.8 s در تصویر نشان داده شده است. LD: مارکر 100 bp.

یافته‌ها

نتایج بیان *Nlgn1* در قشر مغز نوزادان تیمار شده با اسید فولیک و گروه کنترل

نمودار ذوب برای *Nlgn1* و GAPDH با توجه به شیب دمایی پرایمرها در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد رسم شد (تصویر شماره ۵). نتایج مشابهی برای بیان ژن *Nlgn1* مشاهده شد. بیان این ژن در گروه دز طبیعی افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($1/21 \pm 0/02$ در مقابل $1/001 \pm 0/04$ ، $P < 0/0001$). در حالی که در گروه دز بالا کاهش قابل توجهی مشاهده شد ($0/13 \pm 0/03$ ، $P < 0/0001$)، (تصویر شماره ۶).

نتایج حاصل از برهمکنش پروتئین - پروتئین

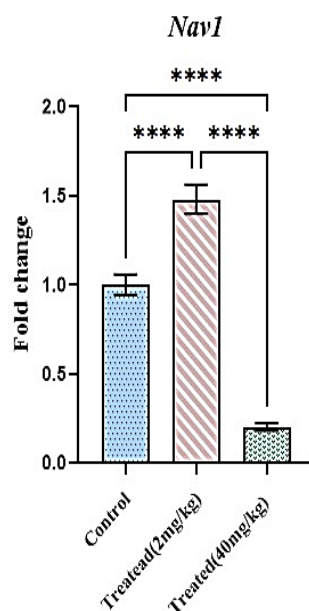
شبکه ۱۰۰ پروتئین مرتبط با *Nlgn1* و *Nav1* ترسیم شد و غنی سازی کارکردی برای یافتن مرتبط ترین فرایندهای زیستی، کارکردی های مولکولی، ساختارهای سلولی، و مسیرهایی KEGG انجام شد. رنگ هر پروتئین نشان دهنده تعداد برهمکنش های آن در شبکه و رنگ دور پروتئین بیانگر نقش آن در تکوین سیستم عصبی است. خطوط بین گره ها، نمایانگر تعاملات بین پروتئین ها هستند. هرچه ضخامت یا تعداد این خطوط بیشتر باشد، نشان دهنده تعاملات قوی تر بین دو پروتئین است. ۲ ژن *Nlgn1* و *Nav1* از طریق تعاملات پروتئینی یا عملکردی به یکدیگر متصل اند و از طریق تنظیمات سیناپسی هم در ارتباط هستند. خطوط آبی دور ۲ پروتئین *Nlgn1* و *Nav1* و بقیه نشان دهنده نقش ویژه آن ها در تنظیم سیناپس است (تصویر شماره ۷).

نتایج حاصل از بررسی کمی و کیفی Total RNA

بر اساس نتایج دستگاه نانودراپ، غلظت اکثر نمونه ها در بازه ۶۰۰ تا ۹۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و جذب در طول موج های ۲۶۰/۲۸۰ که شاخصی جهت بررسی خلوص، عدم آلودگی و کیفیت است، در بازه ۱/۸ تا ۲ قرار داشت. بعد از آن به منظور بررسی کیفیت RNA های استخراجی، ژل آگارز با دستگاه الکتروفورز بررسی شد و باندهای 28 s، 18 s و 5.8 s rRNAs مشاهده شد که نشان دهنده کیفیت خوب RNA ها است (تصویر شماره ۲).

نتایج بیان *Nav1* در قشر مغز نوزادان تیمار شده با اسید فولیک و گروه کنترل

در گروه تیمار با دز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، میزان بیان ژن *Nav1* به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود ($1/48 \pm 0/08$ در مقابل $1/001 \pm 0/05$ ، $P < 0/0001$). در گروه تیمار با دز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم، بیان این ژن کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($0/20 \pm 0/02$ ، $P < 0/0001$). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه دز طبیعی و دز بالا مشاهده شد ($P < 0/0001$) (تصویر شماره ۴).



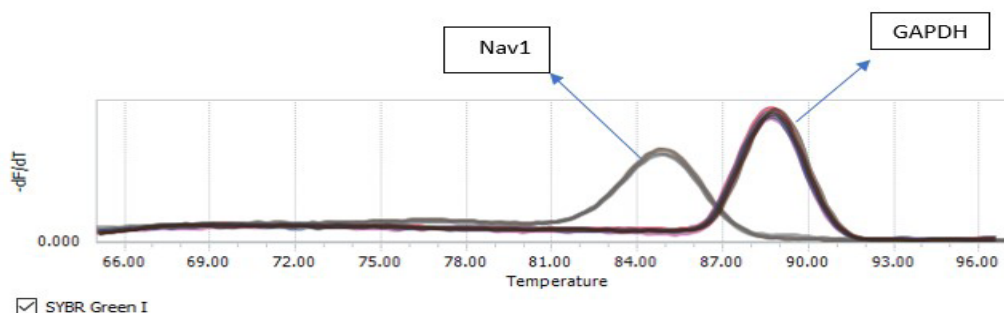
تصویر ۳. منحنی ذوب مربوط به نمونه‌های GAPDH و Nav1. هر قله (Peak) نشان‌دهنده یک محصول است.

بحث

می‌تواند باعث ایجاد ناهنجاری‌های سیستم عصبی شود [۲۵]. مطالعات متعددی در خصوص اثر اسید فولیک بر بیان ژن‌ها انجام شده است. ولی مکانیسم دقیق اثر اسید فولیک در تکوین مغز هنوز مشخص نیست.

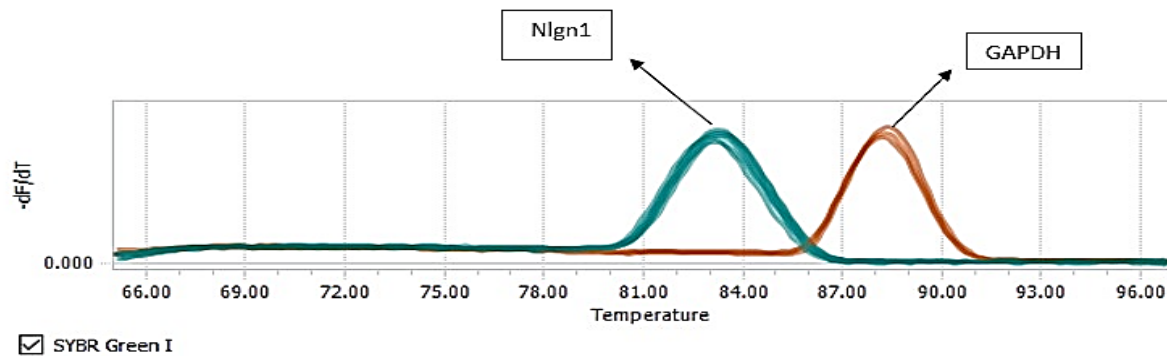
وانگ و همکارانش در سال ۲۰۲۴ نشان دادند دز بالای اسید فولیک در دوران بارداری موش‌ها، تأثیر منفی بر رشد فیزیولوژیکی و عصبی رفتاری فرزندان دارد [۲۶]. در مطالعه‌ای دیگر حیدری و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان دادند تزریق داخل جنینی اسید فولیک باعث افزایش بیان DAB1 در قشر مغز جنین جوجه می‌شود [۲۷]. در سال ۲۰۲۳ لینگ و همکاران با مطالعاتی که

فولات یا ویتامین B9 طی چرخه متابولیسمی خود در بدن موجودات زنده با شرکت در واکنش یک کربن به یکسری از فرایندهای حیاتی، از جمله سنتز متیونین، کاهش سطح هموسیستئین، ساخت بازهای آلی مورد استفاده در ساختار DNA و متیلاسیون DNA کمک می‌کند [۲۳]. در طول تشکیل مغز در مهره‌داران، یکی از مهم‌ترین اتفاقات شکل‌گیری لوله عصبی است که مقدار ناکافی فولات در رژیم غذایی مادر باردار می‌تواند بر این فرایند تأثیر منفی بگذارد [۲۴]. ژن‌های زیادی در تکوین صحیح مغز نقش دارند و هرگونه تغییر در بیان این ژن‌ها



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۴. میزان بیان نسبی Nav1 در ۳ گروه تیمار ۲ (دز طبیعی) و ۴۰ (دز بالا) میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک و گروه کنترل. **** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌هاست. Control: گروه کنترل، (۲ میلی گرم/کیلوگرم) Treated: گروه تیمار دز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک؛ (۴۰ میلی گرم/کیلوگرم) Treated: گروه تیمار دز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک. در گروه تیمار با دز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، میزان بیان ژن Nav1 به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($1/48 \pm 0/08$ در مقابل $1/001 \pm 0/05$ ، $P < 0/0001$). در گروه تیمار با دز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم، بیان این ژن کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($0/20 \pm 0/02$ ، $P < 0/0001$). همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه دز طبیعی و دز بالا مشاهده شد ($P < 0/0001$).



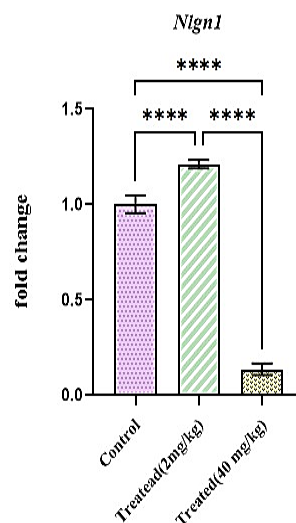
مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۵. منحنی ذوب مربوط به نمونه‌های مختلف GAPDH و *Nlgn1*. هر قله (Peak) نشان‌دهنده یک محصول است.

دریافتند کمبود اسید فولیک مادر باعث افزایش مرگ سلولی فیزیولوژیک سلول‌های عصبی در هیپوکامپ و قشر مغز در زاده‌ها شده و کمبود اسید فولیک مادر، بیان ژن Bcl-2 را کاهش و بیان ژن Bax و microRNA-34a را افزایش داد [۳۱]. در سال ۲۰۱۷، هنزل و همکارانش نشان دادند اختلال در رشد جنین، از دست دادن جنین و تأخیر در رشد جنینی موش‌ها می‌تواند ناشی از مصرف دز بالای اسید فولیک در غذای مادر در طول بارداری باشد. همچنین وضعیت فولات مادر در موش‌ها بر متیل‌سیون DNA و بیان ژن در نیمکره‌های مغزی زاده‌ها تأثیر می‌گذارد [۳۲]. در سال ۲۰۱۶ پارتیو و همکاران اسید فولیک را با دزهای صفر، ۸، ۴۰ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در موش‌های صحرایی بررسی کردند و دریافتند موش‌های در حال رشدی که

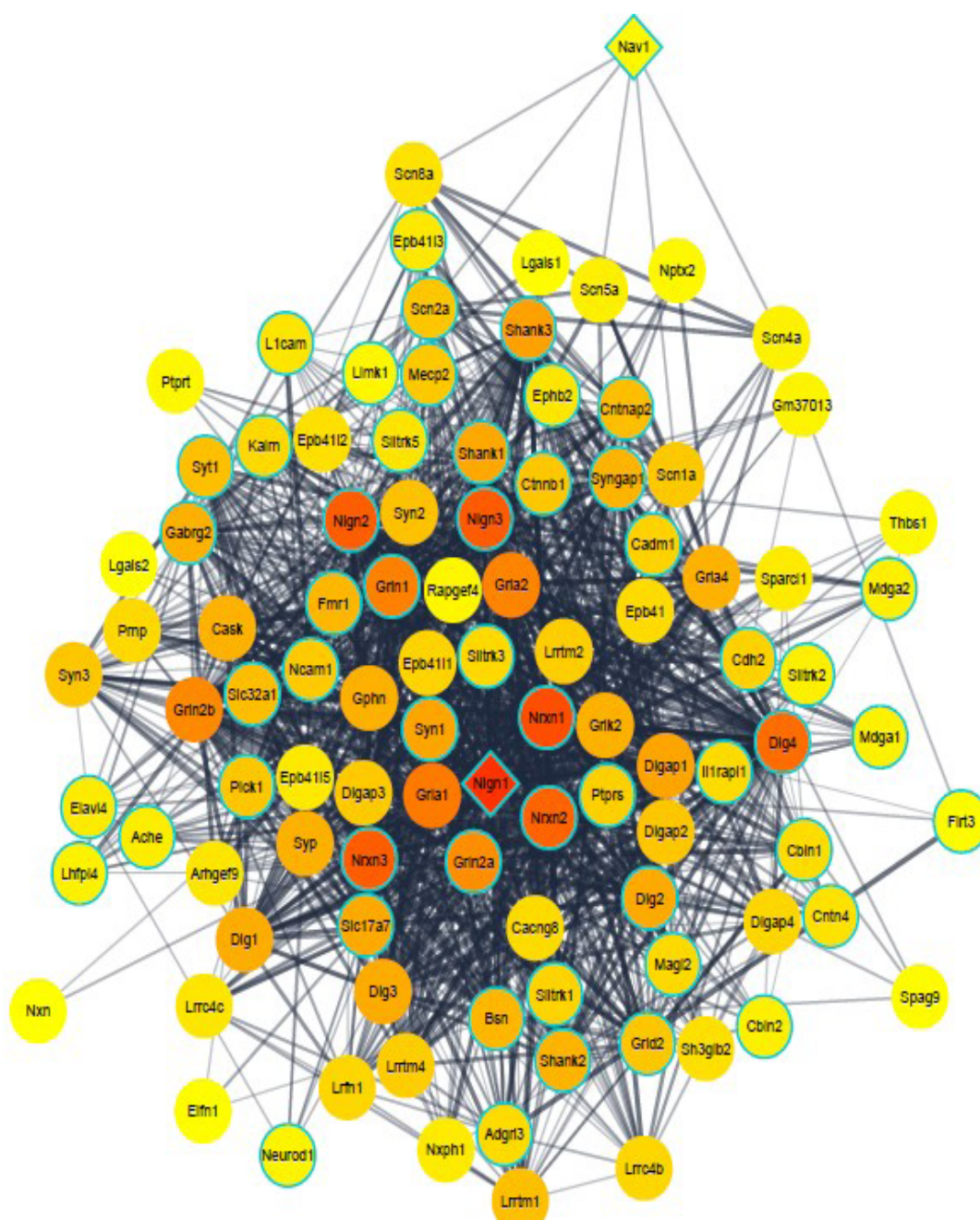
روی موش‌های صحرایی انجام دادند و دریافتند اسید فولیک سبب کاهش مرگ سلول‌های عصبی و افزایش تعداد سیناپس‌ها و بیان پروتئین‌های مرتبط با سیناپس‌ها می‌شود [۲۸]. در مطالعه‌ای دیگر رازقی و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان دادند دز طبیعی اسید فولیک باعث افزایش بیان BDNF (فاکتور رشد نروتروفیک مغزی)^{۱۸} در قشر مغز جنین جوجه می‌شود [۲۹]. همچنین یان و همکاران در سال ۲۰۲۲ با بررسی اثرات اسید فولیک با غلظت ۵ برابر بیشتر از سطح توصیه‌شده در جنین‌ها و نوزادان موش نشان دادند افزایش دز اسید فولیک باعث تغییرات رونویسی در قشر مغز جنین‌ها و نوزادان موش می‌شود [۳۰]. لی و همکاران در سال ۲۰۱۹ با مطالعاتی که بر روی موش‌های صحرایی انجام دادند،

18. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۶. میزان بیان نسبی *Nlgn1* در ۳ گروه تیمار ۲ (دز طبیعی) و ۴۰ (دز بالا) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک و گروه کنترل. **** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها است. Control: گروه کنترل، (۲ میلی‌گرم/کیلوگرم) Treated: گروه تیمار دز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک، (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) Treated: گروه تیمار دز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک. بیان ژن *Nlgn1* در گروه دز طبیعی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت (۱/۲۱±۰/۲) در مقابل ۱/۰۰۱±۰/۰۴، $P<۰/۰۰۰۱$ ، در حالی که در گروه دز بالا کاهش معنی‌داری مشاهده شد (۰/۱۳±۰/۰۳)، $P<۰/۰۰۰۱$.



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۷. نتایج حاصل از برهمکنش پروتئین - پروتئین. هر گره نمایانگر یک پروتئین است. هر گره دارای یک رنگ خاص است که شدت و اهمیت آن پروتئین را در سیستم عصبی نشان می‌دهد. خطوط بین گره‌ها، نمایانگر تعاملات بین پروتئین‌ها هستند. هرچه ضخامت یا تعداد این خطوط بیشتر باشد، نشان‌دهنده تعاملات قوی‌تر بین ۲ پروتئین است. ۲ ژن *Nav1* و *Nlgn1* در این شبکه دیده می‌شوند.

از رژیم غذایی غنی‌شده با اسید فولیک تغذیه می‌شوند، شامل رژیم‌های غذایی دز صفر و ۸، خطر اختلال در تکوین مخچه را افزایش می‌دهند [۳۳]. در مطالعه‌ای دیگر بورا و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی دزهای ۲ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک در موش دریافتند اسید فولیک اضافی در طول بارداری می‌تواند متیلاسیون DNA و بیان ژن‌هایی مثل *Slc6a4* را در مخچه زاده‌ها تغییر داده و باعث تغییر بیان این ژن‌ها می‌شود [۳۴]. در طی مطالعاتی که بورا و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، نشان داده شد افزایش مصرف اسید فولیک در طول بارداری بیان ژن‌هایی را در نیمکره مغزی زاده‌ها تغییر می‌دهد که در رشد مغز نقش دارند و باعث کاهش بیان ژن‌های *Slc17a7*، *Vgl2*، *Zfp353*، *Htr4*، *Cpn2* و افزایش بیان ژن‌های

شامل رژیم‌های غذایی غنی‌شده با اسید فولیک تغذیه می‌شوند، شامل رژیم‌های غذایی دز صفر و ۸، خطر اختلال در تکوین مخچه را افزایش می‌دهند [۳۳]. در مطالعه‌ای دیگر بورا و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی دزهای ۲ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسید فولیک در موش دریافتند اسید فولیک اضافی در طول بارداری می‌تواند متیلاسیون DNA و بیان ژن‌هایی مثل

می‌شود، اما دُر بالاتر از حد طبیعی آن سبب کاهش بیان هر دو ژن نسبت به گروه کنترل می‌شود. بنابراین اسید فولیک باعث تغییر بیان *Nav1* و *Nlgn1* شده و ممکن است از این طریق بر تکوین مغز تأثیر بگذارد. بررسی‌های بیوانفورماتیک شامل برهمکنش پروتئین‌ها نشان‌دهنده اهمیت این دو ژن در تشکیل سیناپس و در نتیجه تکوین مغز است.

از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به استفاده از موش به‌عنوان مدل اشاره کرد که ممکن است نتوان نتایج آن را برای انسان نیز تعمیم داد. ضمن اینکه در این پژوهش فقط به بررسی بیان ۲ ژن دخیل در تکوین مغز پرداخته شده است. بنابراین پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده به بررسی اثرات اسید فولیک بر تعداد بیشتری از ژن‌های مؤثر در تکوین مغز و همچنین اثرات آن بر رفتارها و عملکرد شناختی جانور پرداخته شود. همچنین پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده به بررسی اثر دُرهای مختلف اسید فولیک بر میزان بیان فرم متیله‌شده ژن‌ها نیز پرداخته شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق **دانشگاه گیلان** با شناسه اخلاق (IR.GUILAN.REC.1403.027) تصویب شد.

حامی مالی

مطالعه حاضر با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری **دانشگاه گیلان** انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، طراحی مطالعه، بازبینی نقادانه دست‌نوشته برای محتوای فکری مهم، جذب منابع مالی و نظارت: فرهاد مشایخی؛ تحلیل و تفسیر داده‌ها و حمایت اداری، فنی یا موادی: زهرا خوشکار و فرهاد مشایخی؛ تهیه پیش‌نویس دست‌نوشته، تحلیل آمار: زهرا خوشکار.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده علوم پایه **دانشگاه گیلان** جهت تأمین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

Leprel1، Nfxf و Xist می‌شود. بنابراین باتوجه به اهمیت ویژه اسید فولیک در تکوین مغز، ممکن است در مقادیر بالا اثر منفی داشته باشد [۳۵]. گیروتو و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند دُر بالای اسید فولیک سبب تغییر انتقال سیناپسی و افزایش سطح تشنج در زاده‌های موش‌های صحرایی می‌شود [۳۶]. در مطالعه‌ای دیگر لیون و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند بروز نقص لوله عصبی از زمان غنی‌سازی مواد غذایی با اسید فولیک به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. رژیم غذایی حاوی ۲۰ برابر بیشتر از میزان مصرف توصیه‌شده برای جوندگان، اثرات نامطلوبی بر رشد جنین موش داشت [۳۷]. در تحقیقی دیگر نشان داده شد کاهش میزان فولات خون و بالا رفتن هموسیستئین در طی حاملگی در مادران احتمال ابتلا به نقص لوله عصبی در فرزندان را بیشتر می‌کند [۳۸]. به‌طور کلی نتایج تحقیقات نشان می‌دهد اسید فولیک می‌تواند با تغییر در حالت متیلاسیون DNA بر بیان ژن‌ها اثر داشته باشد. متیلاسیون DNA یک عامل تعیین‌کننده اپی‌ژنتیکی مهم در بیان ژن (رابطه معکوس)، در حفظ یکپارچگی و پایداری DNA، در تغییرات کروماتین و در ایجاد جهش است. الگوهای غیرطبیعی متیلاسیون DNA با تغییر در بیان ژن در ایجاد بیماری‌ها و اختلالات رشدونموی مرتبط است. فولات، به شکل ۵-متیل تتراهیدروفولات، در متیلاسیون مجدد هموسیستئین به متیونین، که پیش‌ساز S-آدنوزیل متیونین^{۱۹}، دهنده اولیه گروه متیل برای اکثر واکنش‌های متیلاسیون بیولوژیکی، از جمله DNA است، نقش دارد. متیلاسیون DNA توسط متیل ترانسفرازهای DNA انجام می‌شود؛ آنزیم‌هایی که می‌توانند با استفاده از SAM، یک گروه متیل را به پنجمین اتم کربن باقی‌مانده سیتوزین برای تشکیل ۵-متیل سیتوزین منتقل کنند [۳۹].

نتایج این تحقیق نشان داد دُر طبیعی اسید فولیک سبب افزایش بیان *Nav1* و *Nlgn1* نسبت به گروه کنترل شد. اما دُر بالای اسید فولیک سبب کاهش بیان هر دو ژن مذکور نسبت به گروه کنترل شد. بنابراین یکی از علت‌های کاهش بیان ژن‌ها در دُر بالای اسید فولیک احتمالاً افزایش سطح متیلاسیون پروموتور ژن توسط دهنده متیل، یعنی اسید فولیک است. دُر بالای اسید فولیک سبب متیله شدن پروموتور ژن‌ها می‌شود که یک مکانیسم سرکوب بیان ژن است. بنابراین در دُر بالا می‌تواند تأثیر منفی بر بیان ژن‌ها داشته باشد. همچنین شبکه برهمکنش پروتئین‌ها برای نمایش ارتباط میان ۲ پروتئین *Nav1* و *Nlgn1* و نیز یافتن کارکردهای مرتبط با آن‌ها، نشان‌دهنده نقش مهم این دو پروتئین در سیناپس و در نهایت تکوین مغز است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتیجه‌گیری می‌شود که دُر طبیعی اسید فولیک سبب افزایش بیان *Nav1* و *Nlgn1* نسبت به گروه کنترل

19. S-adenosylmethionine (SAM)

References

- [1] Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychology Review*. 2010; 20(4):327-48. [DOI:10.1007/s11065-010-9148-4] [PMID] [PMCID]
- [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. [DOI:10.3389/fimmu.2018.02186] [PMID] [PMCID]
- [3] Kwan KY, Sestan N, Anton ES. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*. 2012; 139(9):1535-46. [DOI:10.1242/dev.069963] [PMID] [PMCID]
- [4] 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. [DOI:10.1016/j.rvsc.2020.02.002] [PMID]
- [5] Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013; 10(9):4352-89. [DOI:10.3390/ijerph10094352] [PMID] [PMCID]
- [6] Harlan De Crescenzo A, Panoutsopoulos AA, Tat L, Schaaf Z, Racherla S, et al. Deficient or excess folic acid supply during pregnancy alter cortical neurodevelopment in mouse offspring. *Cerebral Cortex*. 2021; 31(1):635-49. [DOI:10.1093/cercor/bhaa248] [PMID] [PMCID]
- [7] Virdi S, Jadavji NM. The impact of maternal folates on brain development and function after birth. *Metabolites*. 2022; 12(9):876. [DOI:10.3390/metabo12090876] [PMID] [PMCID]
- [8] Sandeep P, Sharma P, Luhach K, Dhiman N, Kharkwal H, Sharma B. Neuron navigators: A novel frontier with physiological and pathological implications. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2023; 127:103905. [DOI:10.1016/j.mcn.2023.103905] [PMID]
- [9] Powers RM, Hevner RF, Halpain S. The neuron navigators: Structure, function, and evolutionary history. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2023; 15:1099554. [DOI:10.3389/fnmol.2022.1099554] [PMID] [PMCID]
- [10] Powers RM, Daza R, Koehler AE, Courchet J, Calabrese B, Hevner RF, et al. Growth cone macropinocytosis of neurotrophin receptor and neuriteogenesis are regulated by neuron navigator 1. *Molecular Biology of the Cell*. 2022; 33(7):ar64. [DOI:10.1091/mbc.E21-12-0623] [PMID] [PMCID]
- [11] van Haren J, Boudeau J, Schmidt S, Basu S, Liu Z, Lammers D, et al. Dynamic microtubules catalyze formation of navigator-TRIO complexes to regulate neurite extension. *Current Biology*. 2014; 24(15):1778-85. [DOI:10.1016/j.cub.2014.06.037] [PMID]
- [12] Wang J, Sudhof T, Wernig M. Distinct mechanisms control the specific synaptic functions of neuroligin 1 and neuroligin 2. *EMBO Reports*. 2025; 26(3):860-79. [DOI:10.1038/s44319-024-00286-4] [PMID] [PMCID]
- [13] Nguyen TA, Lehr AW, Roche KW. Neuroligins and neurodevelopmental disorders: X-linked genetics. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2020; 12:33. [DOI:10.3389/fnsyn.2020.00033] [PMID] [PMCID]
- [14] Lisé MF, El-Husseini A. The neuroligin and neurexin families: From structure to function at the synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006; 63(16):1833-49. [DOI:10.1007/s00018-006-6061-3] [PMID] [PMCID]
- [15] Trobiani L, Meringolo M, Diamanti T, Bourne Y, Marchot P, Martella G, et al. The neuroligins and the synaptic pathway in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2020; 119:37-51. [DOI:10.1016/j.neubiorev.2020.09.017] [PMID]
- [16] Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Yu YH. Folic Acid supplementation and pregnancy: More than just neural tube defect prevention. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2011; 4(2):52-9. [DOI:10.18370/2309-4117.2017.34.57-63]
- [17] Giovedì S, Corradi A, Fassio A, Benfenati F. Involvement of synaptic genes in the pathogenesis of autism spectrum disorders: the case of synapsins. *Frontiers in Pediatrics*. 2014; 2:94. [DOI:10.3389/fped.2014.00094] [PMID] [PMCID]
- [18] Jang S, Lee H, Kim E. Synaptic adhesion molecules and excitatory synaptic transmission. *Current Opinion in Neurobiology*. 2017; 45:45-50. [DOI:10.1016/j.conb.2017.03.005] [PMID]
- [19] Huang Y, He Y, Sun X, He Y, Li Y, Sun C. Maternal high folic acid supplement promotes glucose intolerance and insulin resistance in male mouse offspring fed a high-fat diet. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(4):6298-313. [DOI:10.3390/ijms15046298] [PMID] [PMCID]
- [20] Naninck EFG, Stijger PC, Brouwer-Brolsma EM. The importance of maternal folate status for brain development and function of offspring. *Advances in Nutrition*. 2019; 10(3):502-19. [DOI:10.1093/advances/nmy120] [PMID] [PMCID]
- [21] Sun WX, Shu YP, Yang XY, Huang W, Chen J, Yu NN, et al. Effects of folic acid supplementation in pregnant mice on glucose metabolism disorders in male offspring induced by lipopolysaccharide exposure during pregnancy. *Scientific Reports*. 2023; 13(1):7984. [DOI:10.1038/s41598-023-31690-w] [PMID] [PMCID]
- [22] Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. 2007; 39(2):175-91. [DOI:10.3758/BF03193146] [PMID]
- [23] 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 & Metabolism*. 2012; 60(4):272-92. [DOI:10.1159/000337945] [PMID]
- [24] Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annual Review of Neuroscience*. 2014; 37:221-42. [DOI:10.1146/annurev-neuro-062012-170354] [PMID] [PMCID]

- [25] Douet V, Chang L, Cloak C, Ernst T. Genetic influences on brain developmental trajectories on neuroimaging studies: From infancy to young adulthood. *Brain Imaging and Behavior*. 2014; 8(2):234-50. [DOI:10.1007/s11682-013-9260-1] [PMID] [PMCID]
- [26] Wang D, Xu Y, Hong L, Qi B, Li X, Xie C, et al. Exposure to high doses of folic acid during pregnancy causes adolescent anxiety- and depression-like behaviors in offspring mice. *Journal of Affective Disorders*. 2025; 368:770-8. [DOI:10.1016/j.jad.2024.09.105] [PMID]
- [27] 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. [DOI:10.1111/jpn.13889] [PMID]
- [28] Liang X, Shi L, Wang M, Zhang L, Gong Z, Luo S, et al. Folic acid ameliorates synaptic impairment following cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting excessive activation of NMDA receptors. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2023; 112:109209. [DOI:10.1016/j.jnutbio.2022.109209] [PMID]
- [29] 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; 154:73-77. [DOI:10.1016/j.rvsc.2022.11.010] [PMID]
- [30] 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. [DOI:10.3390/nu14051051] [PMID] [PMCID]
- [31] 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. [DOI:10.1016/j.ijdevneu.2018.11.002] [PMID]
- [32] Henzel KS, Ryan DP, Schröder S, Weiergräber M, Ehninger D. High-dose maternal folic acid supplementation before conception impairs reversal learning in offspring mice. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):3098. [DOI:10.1038/s41598-017-03158-1] [PMID] [PMCID]
- [33] 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. *The British Journal of Nutrition*. 2016; 115(11):1967-77. [DOI:10.1017/S0007114516001008] [PMID]
- [34] 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. [DOI:10.3390/brain-sci5010014] [PMID] [PMCID]
- [35] Barua S, Chadman KK, Kuizon S, Buenaventura D, Stapley NW, Ruocco F, Begum U, 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. [DOI:10.1371/journal.pone.0101674] [PMID] [PMCID]
- [36] Girotto F, Scott L, Avchalumov Y, Harris J, Iannattone S, Drummond-Main C, et al. High dose folic acid supplementation of rats alters synaptic transmission and seizure susceptibility in offspring. *Scientific Reports*. 2013; 3:1465. [DOI:10.1038/srep01465] [PMID] [PMCID]
- [37] 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. [DOI:10.1002/bdra.23092] [PMID]
- [38] Kucha W, Seifu D, Tirsit A, Yigeremu M, Abebe M, Hailu D, et al. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in women with neural tube defect-affected pregnancy in Addis Ababa, Ethiopia. *Frontiers in Nutrition*. 2022; 9:873900. [DOI:10.3389/fnut.2022.873900] [PMID] [PMCID]
- [39] Kiselev IS, Kulakova OG, Boyko AN, Favorova OO. DNA methylation as an epigenetic mechanism in the development of multiple sclerosis. *Acta Naturae*. 2021; 13(2):45-57. [DOI:10.32607/actanaturae.11043] [PMID] [PMCID]