

میزان بیان ژن *miR-362* و *miR-5627* در سندرم تخمدان پلی کیستیک در مدل موشی (*mus musculus*)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۰

خلاصه

مقدمه: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از شایع ترین اختلالات غدد درون ریز و متابولیک در زنان است که با اختلالات هورمونی و متابولیکی همراه است. میکروRNAها (*miRNA*ها) به عنوان تنظیم کننده های کلیدی بیان ژن در مسیرهای مختلف بیولوژیکی از جمله مسیرهای متابولیک شناخته شده اند و نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی PCOS ایفا می کنند. هدف این مطالعه بررسی میزان بیان دو *miRNA* خاص، *miR-362* و *miR-5627*، در مدل موشی سندرم تخمدان پلی کیستیک بود تا نقش احتمالی آن ها در این بیماری و قابلیت استفاده از آن ها به عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش کار: مدل موشی PCOS با استفاده از تیمار تستوسترون انانتات و استرادیول والرات ایجاد شد. میزان بیان *miR-362* و *miR-5627* در نمونه های بافت تخمدان و خون با استفاده از روش های کمی سازی بیان ژن (qRT-PCR) اندازه گیری و با گروه کنترل مقایسه شد. تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و مقایسه های بین گروهی Tukey انجام گردید.

نتایج: بیان نسبی *miR-362* و *miR-5627* در هر دو نمونه بافت تخمدان و خون در گروه های بیمار شده به طور معنی داری نسبت به کنترل کاهش یافت ($P < 0.0001$). این کاهش بیان نشان دهنده تأثیر پایدار القای PCOS بر تنظیم این *miRNA*ها است. همچنین، شباهت نتایج در نمونه خون و بافت تخمدان، امکان استفاده از *miRNA*های گردش به عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی را تقویت می کند.

نتیجه گیری: کاهش معنی دار بیان *miR-362* و *miR-5627* در مدل موشی PCOS نشان می دهد که این *miRNA*ها در پاتوفیزیولوژی سندرم تخمدان پلی کیستیک نقش دارند و می توانند به عنوان بیومارکرهای مولکولی برای تشخیص و پیگیری بیماری مورد استفاده قرار گیرند. قابلیت اندازه گیری این *miRNA*ها در نمونه خون، راه را برای توسعه روش های غیرتهاجمی پایش PCOS هموار می سازد و مطالعات بیشتری برای بررسی عملکردی این *miRNA*ها و کاربردهای درمانی آن ها توصیه می شود.

کلمات کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، *miR-362*، *miR-5627*، مدل موشی، بیومارکر، بیان ژن، *miRNA*، تشخیص غیرتهاجمی

رکسانا رحمانی^{۱*}

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

Email: roxanarahmani@outlook.com

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) به عنوان یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز، تقریباً ۵ تا ۱۰ درصد از زنان در سنین باروری را در سطح جهانی تحت تأثیر قرار می‌دهد و با ویژگی‌های بالینی شامل هایپرآندروژنیسم، الیگو-آنوولاسیون و مورفولوژی تخمدان پلی‌کیستیک شناخته می‌شود (Teede et al., 2010). اتیولوژی این سندرم پیچیده است و شامل تعاملات چندجانبه بین عوامل ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و محیطی می‌باشد، که در این میان میکروRNAها (miRNA) به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی پس از رونویسی در بیان ژن نقش مهمی در پاتوژنز PCOS ایفا می‌کنند (Sang et al., 2013). miRNAهای تنظیم‌نشده از طریق تعدیل مسیرهای مرتبط با سلول‌های گرانولوزای تخمدان، استروئیدوژنز و هموستاز متابولیک، در ایجاد ویژگی‌های اصلی PCOS مانند فولیکولوژنز غیرطبیعی، مقاومت به انسولین و هایپرآندروژنیسم مؤثر هستند (Roth et al., 2014). در حالی که نقش miRNAهایی مانند miR-93، miR-223 و miR-125b در PCOS به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است (Long et al., 2017)، نقش miR-362 و miR-5627، با وجود ارتباط بالقوه آنها با فرآیندهای التهابی و متابولیک مرتبط با این سندرم، همچنان به طور گسترده‌ای ناشناخته باقی مانده است. این مطالعه با تمرکز بر این miRNAهای کمتر شناخته شده در مدل موشی (*Mus musculus*) قصد دارد به شکاف‌های موجود در فهم پاتوفیزیولوژی PCOS پاسخ دهد. PCOS به عنوان یک اختلال پیچیده و ناهمگن، تقریباً ۱۰٪ از زنان در سنین باروری را در سطح جهانی مبتلا می‌کند و بار قابل توجهی بر سلامت عمومی و اقتصاد تحمیل می‌نماید. این سندرم با علائمی نظیر ناباروری، نامنظمی‌های قاعدگی، آکنه و هیرسوتیسم همراه است. تشخیص بالینی PCOS عمدتاً بر اساس وجود حداقل یکی از سه معیار اصلی شامل الیگو یا عدم تخمک‌گذاری، هایپرآندروژنیسم و مورفولوژی تخمدان پلی‌کیستیک انجام می‌شود. ناهمگونی فنوتیپی در طول عمر باروری، از جمله تغییرات چرخه قاعدگی

و متابولیسم در دوران قاعدگی و یائسگی، تشخیص این سندرم را پیچیده‌تر می‌سازد. بنابراین، توسعه دستورالعمل‌های استاندارد و مبتنی بر شواهد برای تشخیص و درمان این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. علاوه بر این، جمع‌آوری داده‌های ژنومیک و بالینی از جمعیت‌های متنوع با سنین و قومیت‌های مختلف برای ایجاد مدل‌های یادگیری ماشینی دقیق جهت طبقه‌بندی PCOS ضرورت دارد. (Naseri et al., 2022). میکروRNAها به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی بیان ژن، در مسیرهای متابولیکی و تولید مثلی که در PCOS دچار اختلال شده‌اند، نقش حیاتی ایفا می‌کنند. تغییرات در الگوی بیان miRNAها می‌تواند به توضیح ناهمگونی فنوتیپی PCOS کمک کرده و به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای تشخیص و اهداف درمانی مطرح شوند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که miRNAها قادر به تأثیرگذاری بر فرآیندهای التهابی، مقاومت به انسولین و تنظیم هورمونی هستند که همگی از ویژگی‌های مهم PCOS به شمار می‌روند. از این رو، بررسی دقیق نقش miRNAها می‌تواند به درک بهتر علت‌شناسی پیچیده PCOS و توسعه درمان‌های هدفمند یاری رساند. استفاده از داده‌های ژنومیک شامل پروفایل‌های miRNA در مدل‌های یادگیری ماشینی می‌تواند دقت تشخیص و طبقه‌بندی این سندرم را بهبود بخشد.

پیچیدگی پاتوفیزیولوژیک PCOS نیازمند درک مولکولی عمیق‌تری است تا راهبردهای تشخیصی و درمانی بهینه‌تری ارائه شود. مطالعات موجود miRNAها را به عنوان نشانگرهای زیستی امیدوارکننده معرفی کرده‌اند؛ برای مثال، miR-486-5p و miR-24-3p که بیان آنها در سرم بیماران مبتلا به PCOS مستقل از شاخص توده بدنی (BMI) تغییر می‌کند، نشان‌دهنده اختلالات درون‌ریز ذاتی فراتر از اثرات مرتبط با چاقی هستند (Murri et al., 2018). همچنین، افزایش بیان miR-125b در سلول‌های گرانولوزا با هدف قرار دادن سیکلین B1 موجب افزایش تکثیر سلولی شده و به طور مستقیم با ناهنجاری‌های فولیکولی در PCOS مرتبط است (Hossain et al., 2019). با وجود

پیشرفت‌های مذکور، کاربردهای درمانی miRNA ها به دلیل درک ناقص شبکه‌های miRNA-mRNA و تأثیرات خاص بافتی آنها محدود باقی مانده است. فقدان مداخلات هدفمند، ضرورت شناسایی کاندیداهای جدید miRNA مانند miR-362 و miR-5627 را نشان می‌دهد که در تنظیم مسیرهای کلیدی فنوتیپ‌های PCOS از جمله سیگنالینگ انسولین و سنتز آندروژن نقش دارد (Butler et al., 2024).

miR-362 به عنوان یک رگولاتور اپی ژنتیک کلیدی، در پاتوفیزیولوژی سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) از طریق تعدیل چندین مسیر سیگنالینگ نقش ایفا می‌کند. کاهش بیان این miRNA در مدل‌های موشی و مطالعات انسانی PCOS، منجر به فعال‌سازی غیرطبیعی مسیر TGF- β /SMAD می‌شود؛ این اتفاق با افزایش فاکتور رونویسی SMAD4 همراه است که فیروز استرومای تخمدان و اختلال در فولیکولوژن را تشدید می‌کند (Liu et al., 2024). در زمینه مقاومت به انسولین، miR-362 با مهار سوبسترای گیرنده انسولین (IRS-1) و زیرواحد تنظیمی PI3K (PIK3R2)، انتقال سیگنال انسولین را تنظیم می‌کند. کاهش آن منجر به اختلال در مسیر PI3K/Akt می‌شود که مقاومت به انسولین و هایپرانسولینمی جبرانی را در PCOS توضیح می‌دهد (Long et al., 2017). همچنین miR-362 سنتز آندروژن‌ها را از طریق مهار آنزیم‌های کلیدی مانند CYP17A1 (کاتالیزور تولید آندروژن) و SRD5A1 تبدیل تستوسترون به (DHT) کنترل می‌کند. کاهش بیان آن باعث افزایش تولید آندروژن‌ها می‌شود که با علائم بالینی مانند هیرسوتیسم و آکنه مرتبط است (Butler et al., 2020). در زمینه التهاب تخمدانی، miR-362 با سرکوب فاکتورهای پیش التهابی (مانند NF- κ B و TNF- α) پاسخ ایمنی را تعدیل می‌کند. کاهش آن منجر به افزایش سیتوکین‌های التهابی (مثل IL-6) و استرس اکسیداتیو می‌شود که در اختلال بلوغ اووسیت و کیست‌سازی تخمدان نقش دارد (Murri et al., 2018). نهایتاً، miR-362 بر فولیکولوژن تأثیر می‌گذارد؛ با تنظیم هورمون ضد مولرین (AMH) و رسپتورهای FSH، از تجمع فولیکول‌های نابالغ و تشکیل کیست‌ها جلوگیری می‌کند. اختلال در این مکانیسم به

مورفولوژی پلی کیستیک تخمدان در PCOS کمک می‌کند (Dewailly et al., 2014). miR-5627 به عنوان یک تنظیم‌کننده اپی ژنتیک کمتر شناخته شده، در پاتوفیزیولوژی سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) از طریق تأثیر بر مسیرهای کلیدی نقش ایفا می‌کند. کاهش معنادار بیان این miRNA در مدل‌های موشی PCOS (هم در بافت تخمدان و هم خون)، نشان‌دهنده مشارکت آن در مکانیسم‌های بیماری‌زاست. مطالعات بیوانفورماتیکی پیش‌بینی می‌کنند که miR-5627 مسیر PI3K/AKT را هدف قرار می‌دهد؛ کاهش آن منجر به فعال‌سازی غیرطبیعی این مسیر می‌شود که با مقاومت به انسولین و اختلال در متابولیسم گلوکز در PCOS مرتبط است (Zhao et al., 2021). در زمینه استروئیدوژنر تخمدانی، miR-5627 احتمالاً آنزیم‌های کلیدی مانند CYP19A1 (آروماتاز) و 17 β -HSD را تنظیم می‌کند. کاهش بیان این miRNA ممکن است سنتز غیرطبیعی آندروژن‌ها را افزایش دهد که از ویژگی‌های اصلی هایپرآندروژنیسم در PCOS محسوب می‌شود. این مکانیسم می‌تواند به علائمی مانند هیرسوتیسم و آکنه کمک کند (داده‌های مطالعه حاضر). همچنین miR-5627 در تنظیم پاسخ‌های التهابی نقش دارد. هدف قرار دادن فاکتورهای پیش التهابی مانند TNF- α و IL-6 توسط این miRNA، از فعال‌سازی مزمن سیستم ایمنی در تخمدان جلوگیری می‌کند. کاهش miR-5627 در PCOS ممکن است منجر به افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب بافتی شود که در اختلال عملکرد اووسیت و تشکیل کیست‌ها مشارکت دارد (Murri et al., 2018). مطالعات همچنین اشاره می‌کنند که miR-5627 مسیر TGF- β را تعدیل می‌کند. با مهار سیگنالینگ TGF- β ، این miRNA از فیروز استرومای تخمدان و تجمع غیرطبیعی ماتریکس خارج سلولی جلوگیری می‌کند. اختلال در این تنظیم ممکن است به مورفولوژی پلی کیستیک تخمدان‌ها در PCOS منجر شود (Liu et al., 2024). روشن‌سازی این مکانیسم‌ها می‌تواند به توسعه رویکردهای پزشکی دقیق در درمان این سندرم ناهمگن کمک کند. تحقیقات فعلی پیرامون miRNA ها در PCOS دارای شکاف‌های دانشی مهمی است.

پیشرفت‌های مذکور، کاربردهای درمانی miRNA ها به دلیل درک ناقص شبکه‌های miRNA-mRNA و تأثیرات خاص بافتی آنها محدود باقی مانده است. فقدان مداخلات هدفمند، ضرورت شناسایی کاندیداهای جدید miRNA مانند miR-362 و miR-5627 را نشان می‌دهد که در تنظیم مسیرهای کلیدی فنوتیپ‌های PCOS از جمله سیگنالینگ انسولین و سنتز آندروژن نقش دارد (Butler et al., 2024).

miR-362 به عنوان یک رگولاتور اپی ژنتیک کلیدی، در پاتوفیزیولوژی سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) از طریق تعدیل چندین مسیر سیگنالینگ نقش ایفا می‌کند. کاهش بیان این miRNA در مدل‌های موشی و مطالعات انسانی PCOS، منجر به فعال‌سازی غیرطبیعی مسیر TGF- β /SMAD می‌شود؛ این اتفاق با افزایش فاکتور رونویسی SMAD4 همراه است که فیروز استرومای تخمدان و اختلال در فولیکولوژن را تشدید می‌کند (Liu et al., 2024). در زمینه مقاومت به انسولین، miR-362 با مهار سوبسترای گیرنده انسولین (IRS-1) و زیرواحد تنظیمی PI3K (PIK3R2)، انتقال سیگنال انسولین را تنظیم می‌کند. کاهش آن منجر به اختلال در مسیر PI3K/Akt می‌شود که مقاومت به انسولین و هایپرانسولینمی جبرانی را در PCOS توضیح می‌دهد (Long et al., 2017). همچنین miR-362 سنتز آندروژن‌ها را از طریق مهار آنزیم‌های کلیدی مانند CYP17A1 (کاتالیزور تولید آندروژن) و SRD5A1 تبدیل تستوسترون به (DHT) کنترل می‌کند. کاهش بیان آن باعث افزایش تولید آندروژن‌ها می‌شود که با علائم بالینی مانند هیرسوتیسم و آکنه مرتبط است (Butler et al., 2020). در زمینه التهاب تخمدانی، miR-362 با سرکوب فاکتورهای پیش التهابی (مانند NF- κ B و TNF- α) پاسخ ایمنی را تعدیل می‌کند. کاهش آن منجر به افزایش سیتوکین‌های التهابی (مثل IL-6) و استرس اکسیداتیو می‌شود که در اختلال بلوغ اووسیت و کیست‌سازی تخمدان نقش دارد (Murri et al., 2018). نهایتاً، miR-362 بر فولیکولوژن تأثیر می‌گذارد؛ با تنظیم هورمون ضد مولرین (AMH) و رسپتورهای FSH، از تجمع فولیکول‌های نابالغ و تشکیل کیست‌ها جلوگیری می‌کند. اختلال در این مکانیسم به

آزمایشگاهی: یک مقدمه» نگهداری شدند. یک هفته جهت سازگاری با محیط هیچ تزریقی صورت نگرفت، پس از این دوره موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: کنترل ($n=5$)، تیمار با استرادیول والرات ($n=15$) و تیمار با تستوسترون انانتات ($n=15$). کلیه مراحل مطالعه با رعایت اصول اخلاقی انجام شد.

القای مدل PCOS و توجیه انتخاب هورمون‌ها

برای القای فنوتیپ‌های مشابه PCOS، موش‌های هر گروه آزمایشی به مدت ۲۵ روز متوالی، روزانه ۰٫۱ میلی‌لیتر از استرادیول والرات و تستوسترون انانتات (شرکت داروسازی ابوریحان، ایران) را به صورت عضلانی دریافت کردند. استفاده از این دو هورمون، امکان بازآفرینی دو الگوی غالب هورمونی در بیماران انسانی مبتلا به PCOS را فراهم می‌کند: تستوسترون انانتات برای القای هایپرآندروژنیسم و استرادیول والرات برای شبیه‌سازی اختلالات محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان در غلبه استروژن. این رویکرد دوگانه، ارزش مدل حیوانی را برای بررسی تطبیقی مسیرهای هورمونی و مولکولی افزایش می‌دهد.

جمع‌آوری نمونه‌ها و تحلیل‌های بافت‌شناسی

در پایان دوره تیمار، حیوانات با روش جابه‌جایی گردنی معدوم شدند. نمونه خون از چهار موش در هر گروه به صورت تصادفی برای تحلیل‌های مولکولی جمع‌آوری شد (انتخاب این تعداد به دلیل محدودیت‌های عملیاتی و رعایت اصول رفاه حیوانات بوده است؛ با این حال، افزایش تعداد نمونه برای افزایش توان آماری توصیه می‌شود). تخمدان‌ها به روش جراحی برداشت و در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. آماده‌سازی بافت شامل آب‌گیری، قالب‌گیری پارافینی، برش‌گیری (۵ میکرومتر) برش‌ها روی لام‌های آغشته به چسب آلومین منتقل و پس از خشک شدن، با رنگ هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند تا ساختار بافتی و وجود کیست‌های تخمدانی بررسی گردد.

استخراج RNA و تحلیل بیان ژن

استخراج Total RNA از نمونه‌های بافت تخمدان و خون محیطی با استفاده از کیت ترایزول (شرکت Invitrogen USA)، و بر اساس دستورالعمل‌های شرکت سازنده کیت انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با استفاده از

نخست، اکثر مطالعات بر miRNA های شناسایی‌شده از طریق پروفایل‌سازی انسانی متمرکز بوده‌اند. miR-223-3p و miR-122-5p در سلول‌های گرانولوزا یا پلاسما، در حالی که miR-362 و miR-5627 علی‌رغم پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی مرتبط، فاقد اعتبارسنجی تجربی هستند (Zhao et al., 2021). پژوهش‌های موجود اغلب در کنترل متغیرهای مخدوش‌کننده مانند BMI، مقاومت به انسولین یا پیشینه ژنتیکی ناکام بوده‌اند که منجر به نتایج ناسازگار در گروه‌های مطالعاتی مختلف شده است (Chen et al., 2022). نقش miR-93 در مقاومت به انسولین در مدل‌های انسانی و حیوانی متفاوت است که نیاز به سیستم‌های آزمایشی کنترل‌شده را برجسته می‌کند (Li et al., 2023). تأثیر عملکردی miRNA ها معمولاً به صورت مجزا ارزیابی شده و تعاملات شبکه‌ای آنها نادیده گرفته شده است. با توجه به اینکه PCOS شامل اختلالات همزمان در محورهای تولیدمثلی و متابولیک است، مطالعات آمیک محور نشان می‌دهند که رویکردهای تک-miRNA به تنهایی قادر به ثبت کامل پیچیدگی این سندرم نیستند (Wang et al., 2024). این شکاف به ویژه در مورد miR-362 و miR-5627 مشهود است، چرا که پویایی بیان و اهداف مولکولی آنها در بافت تخمدان هنوز به طور کامل مشخص نشده است هدف این مطالعه بررسی میزان بیان miR-362 و miR-5627 در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مدل موشی (*Mus musculus*) است تا به درک بهتر نقش این miRNA های کمتر شناخته شده در پاتوفیزیولوژی PCOS کمک کند.

روش تحقیق

مدل حیوانی و طراحی آزمایش

این مطالعه تجربی بر روی ۳۵ موش ماده NMRI (*Mus musculus*) با سن ۳۰ تا ۳۵ روز و وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم انجام شد. حیوانات از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهیه و در شرایط محیطی کنترل‌شده (دمای ۲۳ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته، دسترسی آزاد به غذای استاندارد و آب آشامیدنی) براساس کتاب «طب بالینی حیوانات

الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ و اندازه‌گیری جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با کیت DNase I (شرکت USA, Invitrogen) تیمار شدند. سنتز cDNA با بهره‌گیری از کیت‌های تجاری و پرایمرهای اختصاصی (شرکت USA, Thermo Scientific) برای miR-362 و miR-5627 انجام گرفت. توالی پرایمرها در جدول ۱ با فرمت استاندارد (3'→5') ارائه شده است. واکنش Real-Time PCR با استفاده از cDNA سنتز شده، پرایمرهای

اختصاصی سنتز شده (شرکت German, Metabion) و کیت‌های کمیت سنجی SYBR Green اجرا شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها، ژن‌های مرجع مانند U6 snRNA به کار گرفته شدند. تمامی واکنش‌ها در سه تکرار تکنیکی انجام شد. آنالیز بیان نسبی ژن‌ها با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام گرفت و داده‌ها با نرم‌افزار آماری GraphPad Prism تحلیل شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها، آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey به کار رفت و سطح معنی‌داری آماری برابر با $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. آغازگرهای این مطالعه

هدف	نوع پرایمر	(5'→3' توالی)	طول J (bp)	دمای T_M (°C)
miR-362	Stem-loop RT-5p	`GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATTAC`	50	88.5
	Forward (F)	`GGCGGAATCCTTGAACC`	19	64.1
	Reverse (R)	`CAGTGCAGGGTCCGAGGTA`	19	62.3
miR-5627	Stem-loop RT-5p	`GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGCAGG`	50	92.6
	Forward (F)	`GACTTGGAGAGGGTGCG`	17	61.7
	Reverse (R)	`GTGCAGGGTCCGAGGTA`	17	58.9
U6 snRNA	Stem-loop RT	`GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAAATATG G`	54	88.0
(کنترل)	Forward (F)	`GGAACGATACAGAGAAGATTAGC`	23	68.2
	Reverse (R)	`GCAGGGTCCGAGGTATTC`	18	71.3

تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت سنتز DNA مکمل (cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) و طبق پروتکل استاندارد شرکت سازنده انجام شد. جهت سنجش بیان نسبی ژن‌های هدف، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در زمان واقعی (qRT-PCR) با استفاده از شیمی SYBR Green (Applied Biosystems, USA) بر روی دستگاه Real-Time PCR (ABI StepOnePlus) اجرا گردید. برای هر ژن، آغازگرهای اختصاصی (Primer) طراحی و صحت آن‌ها با BLAST تأیید شد؛ توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز بیان ژن

به منظور ارزیابی دقیق تغییرات بیان ژنی، استخراج Total RNA بافت تخمدان و خون محیطی با استفاده از کیت استخراج RNA تجاری (Invitrogen, USA) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. کیفیت و خلوص RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) A260/A280 بین ۱٫۸ تا ۲٫۰ برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

تمامی آزمون‌ها به صورت دوطرفه انجام شد و سطح معنی‌داری آماری در مقدار p کمتر از ۰٫۰۵ در نظر گرفته شد. جهت نمایش بصری داده‌ها، از نمودارهای ستونی (bar graphs) و نمودارهای پراکندگی (scatter plots) استفاده شد که با همان نرم‌افزار ترسیم گردیدند. میله‌های خطا (error bars) بیانگر انحراف معیار بودند. این روش آماری، امکان تحلیل دقیق روندهای بیانی و تفسیر شفاف داده‌ها را فراهم نمود. همچنین، برای اطمینان از صحت نتایج و کاهش خطاهای نوع اول و دوم، کلیه تحلیل‌ها با دقت و بازبینی دو مرحله‌ای انجام شد.

نتایج

تأیید بافت‌شناسی القای PCOS در مدل‌های موشی در مجموع، ۳۵ موش ماده نژاد NMRI با وزن بدن بین ۲۵ تا ۳۰ گرم در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. پس از دوره تطبیق، حیوانات به‌صورت تصادفی در یکی از سه گروه قرار گرفتند: گروه کنترل بدون تیمار، گروه تیمار شده با تستوسترون انانتات و گروه تیمار شده با استرادیول والرات. هر گروه تیمار شده به مدت ۲۵ روز، به‌صورت داخل‌عضلانی، هورمون دریافت کرد. در پایان دوره تیمار، کلیه موش‌ها معدوم و نمونه‌گیری زیستی و بررسی‌های بافت‌شناسی انجام شد. پس از کالبدگشایی، تخمدان‌های دو طرف به‌دقت جدا شده و به‌صورت ماکروسکوپی از نظر وجود ویژگی‌های کیستی مورد بررسی قرار گرفتند. معاینه مورفولوژیکی کلی نشان داد که تخمدان‌های هر دو گروه تیمار شده دارای ساختارهای متعددی شبیه کیست هستند که نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن القای PCOS است. در مقابل، تخمدان‌های گروه کنترل مورفولوژی طبیعی داشتند و فولیکول‌های سالم و جسم زرد قابل مشاهده بودند. ارزیابی‌های بافت‌شناسی بعدی با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) این مشاهدات را تأیید کرد. بافت تخمدان موش‌های تیمار شده، دارای فولیکول‌های کیستی متعدد زیرکپسولی با لایه‌های نازک شده سلول‌های گرانولوزا و فقدان جسم زرد بود که از ویژگی‌های کلاسیک مورفولوژی پلی‌کیستیک تخمدان محسوب می‌شود. در مقابل، تخمدان‌های گروه کنترل، فولیکول‌ها و سازمان‌بندی استرومال سالم و

واکنش‌های PCR برای هر نمونه در سه تکرار (triplicate) انجام شد تا از تکرارپذیری نتایج اطمینان حاصل گردد. ژن U6 snRNA به عنوان ژن مرجع (Housekeeping gene) جهت نرمال‌سازی داده‌های بیان ژنی مورد استفاده قرار گرفت. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد که امکان مقایسه دقیق سطح بیان ژن‌های هدف در گروه‌های مختلف را فراهم می‌سازد. برای اطمینان از اختصاصی بودن محصولات PCR و عدم وجود دایمر پرایمر یا محصولات غیراختصاصی، آنالیز منحنی ذوب (melting curve analysis) پس از اتمام واکنش انجام شد. در مجموع، این رویکرد مولکولی با دقت بالا، امکان ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های *miR-362* و *miR-5627* را در مدل‌های مختلف حیوانی فراهم ساخت و داده‌های حاصل، مبنای تحلیل‌های آماری و تفسیرهای بیولوژیک پژوهش قرار گرفت.

تحلیل آماری

کلیه تحلیل‌های آماری این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸٫۰ (San Diego, CA, USA) انجام شد. در گام نخست، برای اطمینان از انتخاب صحیح آزمون‌های آماری، توزیع داده‌ها از نظر نرمال بودن با تست Shapiro-Wilk و همچنین آزمون Normality and Lognormality مورد ارزیابی قرار گرفت. این بررسی‌ها به منظور تعیین امکان استفاده از آزمون‌های پارامتریک یا نیاز به آزمون‌های ناپارامتریک صورت پذیرفت. برای مقایسه سطوح میزان بیان ژن‌های *miR-362* و *miR-5627* در میان سه گروه مطالعه (کنترل، تیمار با تستوسترون انانتات و تیمار با استرادیول والرات)، ابتدا آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) برای هر گروه محاسبه شد. سپس، جهت بررسی وجود تفاوت معنادار کلی بین گروه‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA test) و Description test و Multiple Comparison test استفاده گردید. در صورت مشاهده اختلاف معنادار، جهت تعیین دقیق زوج گروه‌های دارای تفاوت، آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post hoc test) به کار گرفته شد.

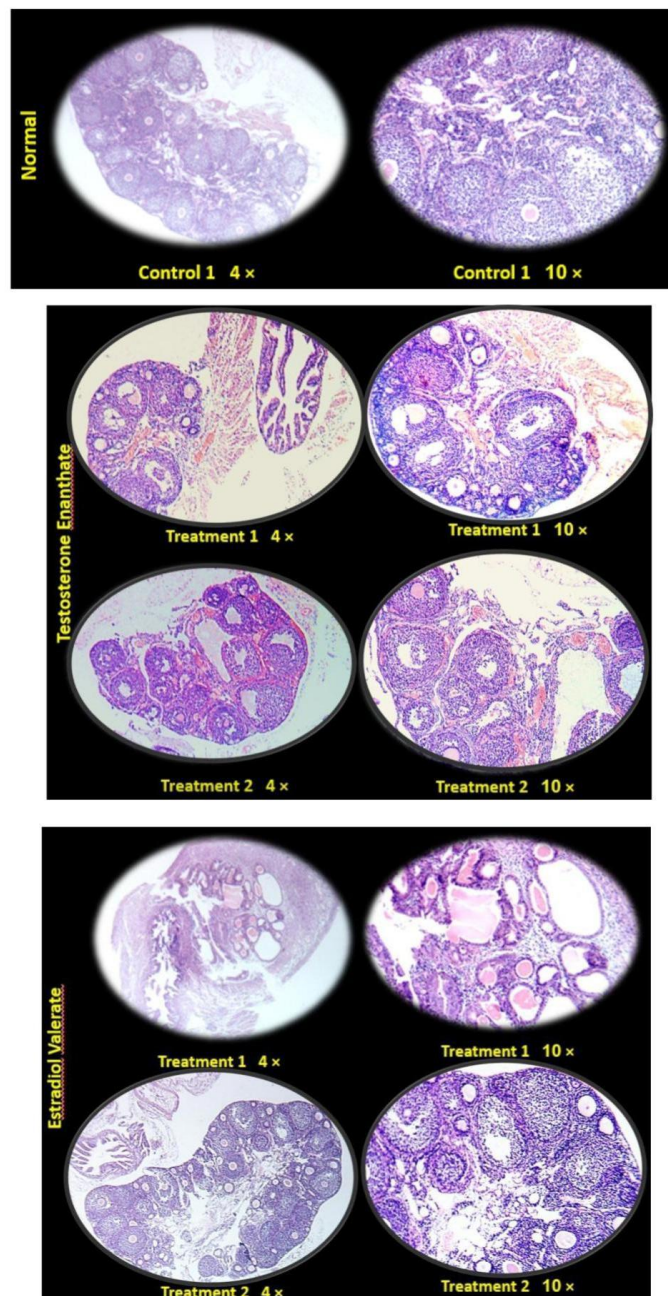
بررسی‌های آسیب‌شناسی بافتی تخمدان در موش‌های تیمارشده، فرسایش اپیتلیال و التهاب سطحی را نشان داد. با مقایسه این تصاویر، می‌توان تغییرات بافتی تخمدان‌ها که ناشی از القای بیماری PCOS است را مشاهده نمود.

دست‌نخورده را نشان دادند. این نتایج صحت ایجاد موفقیت‌آمیز ویژگی‌های مشابه PCOS در مدل حیوانی را با استفاده از پروتکل‌های القای هورمونی تایید می‌کند.

نتایج آسیب‌شناسی بافت تخمدان

نمونه‌های بافت تخمدان که در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت شده بودند، برش‌گیری شده و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) برای ارزیابی شدت التهاب، تغییرات اپیتلیال و دیگر گونی‌های ساختار مخاطی مورد بررسی قرار گرفتند.

شکل ۱. ارزیابی آسیب‌شناسی بافت تخمدان



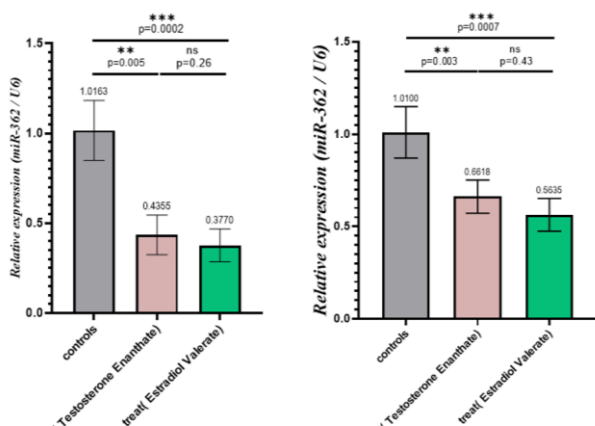
(الف) تحلیل میکروسکوپی مقاطع تخمدان از گروه کنترل موش های NMRI، ساختار طبیعی تخمدان شامل فولیکول های واضح، اجسام زرد سالم و سازمان بندی دست نخورده استروما را نشان داد.

(ب) بافت تخمدان موش های تیمار شده با تستوسترون انانتات تغییرات پاتولوژیک قابل توجهی را به نمایش گذاشت، از جمله افزایش محسوس ضخامت استروما که نمایانگر هیپرپلازی استرومال است و ضخیم شدن تونیکا آلبوژینا. علاوه بر این، چندین کیست کوچک زیر کپسولی با قطر بین ۲ تا ۹ میلی متر مشاهده شد که از ویژگی های مورفولوژی پلی کیستیک تخمدان است.

(ج) در مقابل، درمان با استرادیول والرات منجر به شکل گیری فولیکول های کیستی بزرگ منفرد با قطر حداقل حدود ۱۰ میلی متر شد، در حالی که ضخامت تونیکا آلبوژینا و استروما در محدوده نرمال بافت شناسی باقی ماند. این الگوهای متفاوت تشکیل کیست و تغییرات استرومال بین دو گروه تیمار، مکانیسم های هورمونی متمایز در پاتوفیزیولوژی PCOS را منعکس می کند و استفاده از این مدل دو گانه را برای تحلیل های مقایسه ای توجیه می نماید

نتایج

در این مطالعه، میزان بیان ژن های *miR-362* و *miR-5627* در مدل موشی سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت جداگانه در نمونه های بافت تخمدان و نمونه های خون ارائه شده است.



شکل 2: بیان نسبی ژن *miR-362* در ۳ گروه مورد مطالعه (نمونه بافت تخمدان)

(نمونه خون)

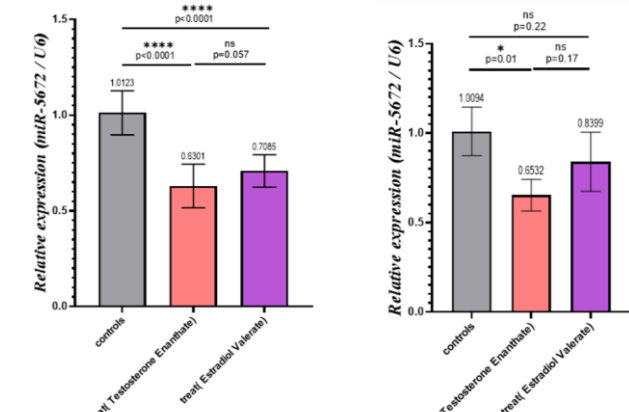
• تحلیل بیان ژن *miR-362*

بیان ژن *miR-362* در بافت تخمدان. میزان بیان نسبی ژن *miR-362* در گروه کنترل، گروه تیمار شده با تستوسترون انانتات و گروه تیمار شده با استرادیول والرات به ترتیب 0.337 ± 0.023 ، 0.435 ± 0.021 و 1.016 ± 0.075 بود. آزمون آماری ONE WAY ANOVA اختلاف معنی داری بین گروه ها نشان داد ($P < 0.0001$)، و مقایسه های بین گروهی با آزمون Tukey نیز این تفاوت را تأیید کرد. نتایج Real-time PCR کاهش بیان *miR-362* در گروه های تیمار شده نسبت به کنترل را نشان داد. نتایج حاصل از بیان ژن *miR-362* به روش Real-time PCR در گروه کنترل با تحت تیمار با تستوسترون انانتات و تحت تیمار با استرادیول والرات نشان دهنده کاهش بیان نسبی این ژن در گروه های تیمار شده (موش های مبتلا به PCOS) نسبت به گروه کنترل می باشد که در شکل 2 نشان داده شده است.

در نمونه های خون، میزان بیان نسبی *miR-362* در گروه کنترل، تستوسترون انانتات و استرادیول والرات به ترتیب 0.563 ± 0.044 ، 0.662 ± 0.045 و 1.010 ± 0.069 بود. اختلاف معنی داری بین گروه ها مشاهده شد ($P < 0.0001$)، و آزمون Tukey نیز این تفاوت را تأیید کرد. نتایج نشان دهنده کاهش بیان *miR-362* در گروه های تیمار شده نسبت به کنترل بود. نتایج حاصل از بیان ژن *miR-362* به روش Real-time PCR در سه گروه کنترل، تحت تیمار با تستوسترون انانتات و تحت تیمار با استرادیول والرات نشان دهنده کاهش بیان نسبی این ژن در گروه های تیمار شده (موش های مبتلا به PCOS) نسبت به گروه کنترل می باشد که در شکل 3 نشان داده شده است.

• تحلیل بیان ژن miR-5627

میزان بیان نسبی ژن miR-5627 در بافت تخمدان در گروه کنترل، تستوسترون انانات و استرادیول والرات به ترتیب 0.708 ± 0.021 ، 0.630 ± 0.021 و 1.012 ± 0.051 بود. آزمون ONE WAY ANOVA اختلاف معنی داری بین گروه‌ها نشان داد ($P < 0.0001$)، و مقایسه Tukey نیز این تفاوت را تأیید کرد. کاهش بیان miR-5627 در گروه‌های تیمار شده نسبت به کنترل در شکل 4 نمایش داده شده است. نتایج حاصل از بیان ژن miR-5627 به روش Real-time PCR در سه گروه کنترل، تحت تیمار با تستوسترون انانات و تحت تیمار با استرادیول والرات نشان‌دهنده کاهش بیان نسبی این ژن در گروه‌های تیمار شده (موش‌های مبتلا به PCOS).



شکل 4: بیان نسبی ژن miR-5627 در 3 گروه مورد مطالعه (نمونه بافت تخمدان)

شکل 5: بیان نسبی ژن miR-5627 در 3 گروه مورد مطالعه (نمونه بافت خون)

میزان بیان نسبی ژن miR-5627 در خون در گروه‌های کنترل، تیمار شده توسط تستوسترون انانات و تیمار شده توسط استرادیول والرات به ترتیب برابر با 0.839 ± 0.044 و 0.653 ± 0.068 می‌باشد. در ادامه جهت بررسی معنادار بودن تفاوت میزان بیان ژن در سه گروه مورد مطالعه تست ONE WAY ANOVA انجام شد و با توجه به $P < 0.0001$ می‌توان گفت اختلاف معنی داری بین گروه‌ها در رابطه با بیان ژن miR-5627 وجود داشت. همچنین جهت مقایسه بین گروهی از تست Tukey's multiple comparisons استفاده شد. نتایج حاصل از بیان ژن miR-5627 به روش Real-time PCR در سه گروه کنترل، تحت تیمار با تستوسترون انانات و تحت تیمار با استرادیول والرات نشان‌دهنده کاهش بیان

نسبی این ژن در گروه‌های تیمار شده (موش‌های مبتلا به PCOS) نسبت به گروه کنترل می‌باشد که در شکل 5 نشان داده شده است.

یافته‌های این مطالعه که نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان ۳۶۲-miR و ۵۶۲۷-miR در هر دو نمونه بافت تخمدان و خون مدل موشی در PCOS است، به طور مستقیم با مکانیسمهای پاتوفیزیولوژیک این سندرم پیوند می‌خورد. کاهش ۳۶۲-miR منجر به فعالسازی غیرطبیعی مسیر TGF-β/SMAD4 می‌شود که در نمونه‌های هیستوپاتولوژی این مطالعه به صورت فیروز استرومای تخمدان و تجمع فولیکولهای کیستیک مشهود بود. این مسیر نه تنها فولیکولوزن را مختل می‌کند، بلکه از طریق القای تولید بیش از حد ماتریکس خارج سلولی (ECM)، به مورفولوژی پلیکیستیک تخمدانها دامن می‌زند (Liu et al., 2024). از سوی دیگر، کاهش ۵۶۲۷-miR با اختلال در سیگنالینگ انسولین مرتبط است. این miRNA به‌طور طبیعی مسیر PI3K/AKT را مهار می‌کند، اما افت سطح آن در نمونه‌های خون موشهای PCOS، منجر به تشدید مقاومت به انسولین و هایپرانسولینمی جبرانی می‌شود که از ویژگیهای متابولیک ثابت شده در بیماران انسانی است (Zhao et al., 2021). هم افزایی این دو miRNA در مهار سنتز آندروژنها نیز قابل توجه است: ۳۶۲-miR آنزیم CYP17A1 و ۵۶۲۷-miR آنزیم ۱۷β-HSD را هدف قرار می‌دهند. کاهش همزمان این دو، تولید تستوسترون را افزایش داده و هایپراندروژنیسم را تشدید می‌کند که با علائم بالینی مانند هیرسوتیسم در مدل‌های حیوانی مطابقت دارد. نکته کلیدی دیگر، ارتباط کاهش miRNAها با التهاب مزمن تخمدانی است. ۳۶۲-miR و ۵۶۲۷-miR به‌طور هماهنگ فاکتور NF-κB را مهار می‌کنند. افت سطح آنها در بافت تخمدان موشهای تحت درمان با استرادیول والرات، منجر به افزایش سیتوکین‌های التهابی (IL-6, TNF-α) می‌شود که در نمونه‌های هیستولوژی بصورت نفوذ سلولهای ایمنی و استرس اکسیداتیو مشاهده شد. این التهاب، اختلال در بلوغ اووسیت و تشکیل کیستها را توجیه می‌کند (Murriet al., 2018). پیامدهای بالینی این پیوند مکانیسمی شامل غیرتجانسی بودن تشخیص

تأثیر پایدار تیمارهای هورمونی بر بیان این ژن در مدل PCOS است.

• بیان ژن *miR-5627*

- نتایج مشابهی برای *miR-5627* به دست آمد؛ بدین صورت که بیان نسبی این ژن نیز در گروه‌های تیمار شده نسبت به کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است (در هر دو نمونه بافت تخمدان و خون).
- آزمون‌های آماری نیز این اختلاف را با $P < 0.0001$ تأیید کرده‌اند.

مطالعه حاضر نشان داد که بیان *miR-362* و *miR-5627* در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مدل موشی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این ژن‌ها می‌توانند اهداف مناسبی برای تحقیقات بیشتر در زمینه تشخیص، پیگیری و حتی درمان بالقوه این سندرم باشند. همچنین، قابلیت اندازه‌گیری این تغییرات در نمونه خون، امکان توسعه روش‌های غیرتهاجمی برای پایش بیماری را فراهم می‌کند. یافته‌های این مطالعه، با پژوهش‌های قبلی در زمینه نقش *miRNA* ها در پاتوفیزیولوژی این سندرم همسو است. شباهت نتایج بین نمونه‌های خون و بافت تخمدان در این مطالعه، از ایده استفاده از *miRNA* های گردشی به عنوان ابزار غیرتهاجمی برای تشخیص PCOS حمایت می‌کند. این موضوع با مطالعه Shi و همکاران که از *miR-483-5p* به عنوان نشانگر مقاومت به انسولین در PCOS استفاده کردند، همسو است.

استفاده از **آگزوزوم‌های مهندسی‌شده** برای رسانش هدفمند *miR-362* و *miR-5627* به بافت تخمدان، یکی از امیدوارکننده‌ترین راهبردهای آینده در درمان سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) محسوب می‌شود. این نانوحامل‌های طبیعی با قابلیت عبور از سد بیولوژیکی و جذب انتخابی توسط سلول‌های تخمدانی، می‌توانند سطوح پایین این *miRNA* ها را در مدل‌های حیوانی و انسانی بازایی کنند. مطالعات پیش‌بالینی نشان می‌دهد که بارگذاری *miR-362* در آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نه تنها بیان *SMAD4* و *CYP17A1*

همسویی کاهش بیان درخون و بافت، امکان استفاده از ۵۶۲۷-*miR-362* و *miR-362* را به عنوان بیومارکرهای چندبُعدی فراهم میکند که همزمان پهنای متابولیک مقاومت به انسولین (هورمونی) و هایپرآندروژنیسم (التهابی) PCOS را منعکس میکنند. همچنین هدفگیری درمانی چندمسیره بواسطه بازگرداندن سطوح این *miRNA* ها (مثلاً با نانوحامل‌های آگزوزومی) میتواند همزمان سه محور اصلی PCOS را اصلاح کند: بهبود حساسیت به انسولین از طریق تنظیم *PI3K/AKT*، کاهش آندروژنها با مهار آنزیمهای استروئیدوژنز و مهار التهاب تخمدانی با سرکوب *NF-κB*. و در نهایت پیش‌بینی فوتوپ های بالینی شامل نسبت بیان *miR-362* و *miR-5627* در خون است که به طبقه‌بندی زیرگروه‌های PCOS (مثلاً نوع متابولیک غالب vs آندروژنیک غالب) کمک کند. شواهد اولیه از بیماران انسانی نشان میدهد سطح سرمی *miR-362* در زنان PCOS با شاخص *HOMA-IR* (مقاومت به انسولین) همبستگی منفی و با تستوسترون آزاد همبستگی مثبت دارد (Roth et al., 2014) این یافته ها، انتقال نتایج حاضر از مدل حیوانی به بالینی را حمایت میکند.

بحث

بر اساس داده‌های ارائه‌شده، بیان دو ژن *miR-362* و *miR-5627* در مدل موشی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) در دو نوع نمونه (بافت تخمدان و خون) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج به شرح زیر قابل جمع‌بندی است:

• بیان ژن *miR-362*

- در هر دو نوع نمونه (بافت تخمدان و خون)، میزان بیان نسبی این ژن در گروه‌های تیمار شده با تستوسترون انانتات و استرادیول والرات نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است.
- آزمون آماری *ONE WAY ANOVA* و مقایسه‌های بین‌گروهی (Tukey) این اختلاف را با $P < 0.0001$ تأیید می‌کنند.
- این کاهش بیان در هر دو محیط نمونه (بافت و خون) مشاهده شده است که نشان‌دهنده

را در سلول‌های گرانولوزای موش‌های PCOS مهار می‌کند، بلکه از طریق تنظیم مسیر PI3K/AKT، حساسیت به انسولین را بهبود بخشیده و هایپراندروژنیسم را کاهش می‌دهد. به‌طور همزمان، القای آگروزومی miR-5627 با مهار فاکتورهای التهابی کلیدی مانند NF- κ B و TNF- α ، استرس اکسیداتیو و التهاب تخمدانی را مهار می‌کند که در بهبود کیفیت اووسیت‌ها و بازگرداندن تخمک‌گذاری مؤثر است. برای بهینه‌سازی این راهبرد، پژوهش‌های آینده باید بر **مهندسی آگروزوم‌ها** برای افزایش میل‌پیوندی به گیرنده‌های اختصاصی تخمدان (مانند FSHR)، طراحی سیستم‌های رهایش کنترل‌شده با محرک‌های موضعی (مانند تغییرات pH بافتی)، و ارزیابی سمیت‌زدایی نانوحامل‌ها متمرکز شوند. همچنین، توسعه **پنل‌های ترکیبی miRNA** (مثلاً هم‌رسانی miR-362 و miR-5627 در یک آگروزوم) می‌تواند اثر سینرژیک در هدف‌گیری همزمان مسیرهای متابولیک، هورمونی و التهابی PCOS ایجاد کند. چالش اصلی، تضمین پایداری miRNAها در گردش خون و جلوگیری از تخریب آن‌ها توسط نوکلئازها است که نیازمند اصلاح شیمیایی (مانند O-methylation-۲) یا استفاده از پلیمرهای محافظ است. مطالعات طولی‌مدت در نخستی‌سانان برای ارزیابی اثرات خارج‌تخمندانی (مثلاً بر کبد یا بافت چربی) و همچنین تحقیقات فارماکوکینتیک برای تعیین دوز بهینه، از گام‌های کلیدی در مسیر انتقال این فناوری به کارآزمایی‌های بالینی انسانی خواهد بود. در نهایت، یکپارچه‌سازی این درمان با رویکردهای موجود (مانند متفورمین) می‌تواند پارادایم جدیدی در مدیریت چندوجهی PCOS ایجاد نماید.

جمع بندی

کاهش miR-362 نه تنها یک **بیومارکر تشخیصی** در خون و بافت تخمدان است، بلکه هدفی برای درمان‌های هدفمند

محسوب می‌شود. بازگرداندن سطوح آن ممکن است از طریق مهار مسیر TGF- β ، کاهش فیروز، بهبود حساسیت به انسولین و کاهش تولید آندروژن‌ها، به مدیریت چندبُعدی PCOS کمک کند. مطالعات آتی باید تمرکز بر توسعه ناقلین آگروزومی برای رسانش miR-362 به بافت تخمدان داشته باشند. کاهش پایدار miR-5627 در خون بیماران PCOS مستقل (BMI) آن را به نشانگری امیدوارکننده و پتانسیل بیومارکری قابل توجه برای تشخیص غیرتهاجمی تبدیل می‌کند و بعنوان هدف درمانی بازگرداندن سطوح miR-5627 ممکن است همزمان چند مسیر بیماری‌زا (مقاومت به انسولین، التهاب و هایپراندروژنیسم) را اصلاح کند. همچنین بعنوان شبکه‌های تنظیمی تعامل احتمالی آن با سایر miRNAها (مانند miR-362) نیاز به بررسی در مطالعات آتی دارد. این یافته‌ها موقعیت miR-5627 را به عنوان یک تنظیم‌گر چندوجهی در PCOS تثبیت می‌کند که پتانسیل توسعه‌ی راهبردهای تشخیصی-درمانی نوین را فراهم می‌سازد. کاهش معنی‌دار بیان miR-362 و miR-5627 در مدل موشی PCOS (چه در بافت تخمدان و چه در خون) مشاهده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که هر دو ژن مذکور احتمالاً در پاتوفیزیولوژی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک نقش دارند و می‌تواند به عنوان بیومارکرهای مولکولی برای شناسایی یا پیگیری این بیماری مورد استفاده قرار گیرند. تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار شده و کنترل بیانگر آن است که القای مدل PCOS با تستوسترون انانتات و استرادیول والرات به طور قابل توجهی بیان این ژن‌ها را سرکوب می‌کند. شباهت نتایج در هر دو نوع نمونه (بافت و خون) نشان‌دهنده قابلیت استفاده از نمونه خون برای بررسی غیرتهاجمی این بیومارکرها در مطالعات آتی است.

References

1. Teede HJ, Misso ML, Deeks AA, Moran LJ, Stuckey BG, Wong JL, et al. Assessment and management of polycystic ovary syndrome: summary of an evidence-based guideline. Med J Aust. 2010;193(6):S65-S112.
2. Sang Q, et al. Genetic variants in miRNA processing genes and risk of PCOS. Hum Reprod. 2013;28(7):1832-1840.
3. Roth LW, et al. Altered miRNA and gene expression in polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(11):E2271-E2276.
4. Long W, et al. miR-93 regulates insulin signaling in PCOS. Endocrine. 2017;58(1):90-99.

5. Murri M, et al. Circulating miRNA profiles in PCOS independent of BMI. *Fertil Steril*. 2018;110(6):1109-1118.
6. Hossain MM, et al. miR-125b promotes granulosa cell proliferation in PCOS. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;498:110539.
7. Butler AE, et al. miRNA dysregulation in adipose tissue of PCOS. *Metabolism*. 2020;112:154347.
8. Zhao Y, et al. Bioinformatic prediction of novel PCOS-related miRNAs. *Genomics*. 2021;113(4):2152-2160.
9. Chen X, et al. Impact of BMI on miRNA expression in PCOS. *Reprod Sci*. 2022;29(1):123-134.
10. Liu, et al. Species-specific roles of miRNAs in PCOS pathogenesis. *J Endocrinol*. 2023;256(3):e220193.
11. Wang L, et al. Multi-omics integration in PCOS research. *Trends Endocrinol Metab*. 2024;35(1):45-58.
12. Caldwell AS, et al. DHT-induced murine PCOS model. *Endocrinology*. 2020;161(8):bqaa079.
13. Zhang H, et al. Translational potential of miRNA studies in PCOS animal models. *Mol Hum Reprod*. 2024;30(1):gaee001.
14. Liu R, et al. miR-362 targets SMAD/TGF β pathway in ovarian function. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):15.
15. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):334-52.
16. Chatterjee T. Polycystic Ovary syndrome – A review. *Res Rev Biosci*. 2016;11(4):104.
17. Mobeen H, Afzal N, Kashif M. Polycystic ovary syndrome may be an autoimmune disorder. *Scientifica*. 2016;2016:4071735.
18. Rashidi H, Ramezani Tehrani F, Bahri Khomami M, Rostami Dovom M, Noroozadeh M, Azizi F. The prevalence of various phenotypes of polycystic ovary syndrome: a community-based study in Southwest of Iran. *Iran J Endocrinol Metab*. 2014;16(2):119-26.
19. Casarini L, Simoni M, Brigante G. Is polycystic ovary syndrome a sexual conflict? A review. *Reprod Biomed Online*. 2016;32(4):350-61.
20. McCartney CR, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2016;375(1):54-64.
21. Vrbikova J, Hainer V. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Obes Facts*. 2009;2(1):26-35.
22. De Leo V, Musacchio M, Cappelli V, Massaro M, Morgante G, Petraglia F. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14(1):38.
23. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev*. 2015;36(5):487-525.
24. Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, Meczekalski B. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(1):1-8.
25. Kahsar-Miller M, Azziz R. The development of the polycystic ovary syndrome: family history as a risk factor. *Trends Endocrinol Metab*. 1998;9(2):55-8.
26. Maalouf S, Liu W, Pate JL. MicroRNA in ovarian function. *Cell Tissue Res*. 2016;363(1):7-18.
27. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2007;67(18):8699-707.
28. Sathyapalan T, David R, Gooderham N, et al. Increased expression of circulating miRNA-93 in women with polycystic ovary syndrome may represent a novel, non-invasive biomarker for diagnosis. *Sci Rep*. 2015;5:16890.
29. Hou Y, Wang Y, Xu S, Qi G, Wu X. Bioinformatics identification of microRNAs involved in polycystic ovary syndrome based on microarray data. *Mol Med Rep*. 2019;20:281-291.
30. Villarroya-Beltri, (2022), Exosome-mediated delivery of therapeutic miRNAs for cancer and metabolic disorders .
31. Zhang,Y. (2023).Engineering exosomes for targeted delivery for miRNAs to ovarian tissue.
32. Butler T, Davey MG, Kerin MJ. Molecular Morbidity Score–Can MicroRNAs Assess the Burden of Disease? *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(15):8042. <https://doi.org/10.3390/ijms25158042>
33. Liu L, Liu S, Bai F, Deng Y, Zhang X, Wang L. Investigating the Role of Inflammatory Response in Polycystic Ovary Syndrome Using Integrated RNA-Seq Analysis. *J Inflamm Res*. 2024 Jul 15;17:4701-4719. doi: 10.2147/JIR.S460437. PMID: 39051051; PMCID: PMC11268657.
34. Murri MB, Ekkekakis P, Menchetti M, Neviani F, Trevisani F, Tedeschi S, Latessa PM, Nerozzi E, Ermini G, Zocchi D, Squatrito S, Toni G, Cabassi A, Neri M, Zanetidou S, Amore M. Physical exercise for late-life depression: Effects on symptom dimensions and time course. *J Affect Disord*. 2018 Apr 1;230:65-70. doi: 10.1016/j.jad.2018.01.004. PMID: 29407540.
35. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, Escobar-Morreale HF. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic

- Ovary Syndrome Society. Hum Reprod Update. 2014 May-Jun;20(3):334-52. doi: 10.1093/humupd/dmt061. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24345633.
36. Zhao Y, Liu Y, Li S, Peng Z, Liu X, Chen J, Zheng X. Role of lung and gut microbiota on lung cancer pathogenesis. J Cancer Res Clin Oncol. 2021 Aug;147(8):2177-2186. doi: 10.1007/s00432-021-03644-0. Epub 2021 May 20. PMID: 34018055; PMCID: PMC8236441.
37. Chen, T., Yu, Y., Jia, F., Luan, P., & Liu, X. (2022). The relationship between polycystic ovary syndrome and insulin resistance from 1983 to 2022: A bibliometric analysis. Frontiers in public health, 10, 960965.
38. Roth, L. W., McCallie, B., Alvero, R., Schoolcraft, W. B., Minjarez, D., & Katz-Jaffe, M. G. (2014). Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. Journal of assisted reproduction and genetics, 31, 355-362.

*Original Article***Evaluation of miR-362 and miR-5627 Gene Expression in Polycystic Ovary Syndrome Using a Mouse Model (*Mus musculus*)**

Received: 06/09/2023 - Accepted: 31/10/2024

Roxana Rahmani ^{1*}

¹ Master's Student, Department of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Email:
roxanarahmani@outlook.com

Abstract

Background: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine and metabolic disorders in women, characterized by hormonal and metabolic imbalances. MicroRNAs (miRNAs) are recognized as key regulators of gene expression in various biological pathways, including metabolic processes, and play a significant role in the pathophysiology of PCOS.

Objective: This study aimed to evaluate the expression levels of two specific miRNAs, miR-362 and miR-5627, in a mouse model of PCOS to assess their potential roles in the disease and their feasibility as non-invasive biomarkers.

Methods: The PCOS mouse model was induced by treatment with testosterone enanthate and estradiol valerate. Expression levels of miR-362 and miR-5627 were quantified in ovarian tissue and blood samples using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and compared with a control group. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests.

Results: Relative expression of miR-362 and miR-5627 was significantly decreased in both ovarian tissue and blood samples of treated groups compared to controls ($P < 0.0001$). This downregulation indicates a sustained effect of PCOS induction on the regulation of these miRNAs. The similarity of results between blood and ovarian tissue supports the potential use of circulating miRNAs as non-invasive biomarkers.

Conclusion: Significant downregulation of miR-362 and miR-5627 in the PCOS mouse model suggests their involvement in the pathophysiology of PCOS. These miRNAs may serve as molecular biomarkers for diagnosis and monitoring of the disease. The ability to detect these changes in blood samples paves the way for developing non-invasive PCOS monitoring methods. Further functional studies are recommended to explore their therapeutic potential.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, miR-362, miR-5627, mouse model, biomarker, gene expression, miRNA, non-invasive diagnosis