

Study of miR-93 expression compared to miR-21 in serum exosomes of PCOS-induced rats after vitamin D treatment |

Fatemeh Attarian¹, Jina Khayatzaheh^{*1}, Mohammad Mahdi Forghanifard ², Saeedeh Zafar Balanezhad ¹

1- Department of Biology, Ma. C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2- Department of Biology, Da. C., Islamic Azad University, Damghan, Iran

***Corresponding Author:** Jina Khayatzaheh, Department of Biology, Ma.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran;

Email: jkhayatzaheh@iau.ir

| Received | 2025/08/16

| Revised | 2026/02/07

| Accepted | 2026/06/22

| Abstract |

Abstract

Background and Aim: Vitamin D, as a biological regulator, plays a key role in inflammation, metabolism, and ovarian function, and is implicated in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome (PCOS). PCOS is one of the most common endocrine disorders in women and is associated with altered expression of exosome-derived microRNAs. Among these, miR-93 has been identified as a critical regulator in molecular pathways related to PCOS. This study aimed to investigate the effect of vitamin D on the expression of miR-93 in serum exosomes of PCOS-induced rats and compare the findings with previously reported data on miR-21.

Materials and Methods: In this experimental study, 24 female rats were divided into four groups: negative control, positive control, PCOS model, and PCOS treated with vitamin D. The PCOS phenotype was induced by subcutaneous testosterone injections for 35 days, and vitamin D treatment was administered via weekly intraperitoneal injections for five weeks. Serum samples were collected, followed by exosome isolation, RNA extraction, and miR-93 expression analysis using RT-qPCR. Data were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method and compared with miR-21 results from a similar study.

Results: Expression levels of miR-93 and miR-21 were significantly reduced in the PCOS and positive control groups compared to the negative control ($p < 0.001$). Vitamin D treatment led to a significant increase in miR-21 expression ($p < 0.0001$) and a further decrease in miR-93 expression ($p < 0.01$).

Conclusion: These findings highlight the potential role of vitamin D as a bio-regulatory agent in modulating cellular mechanisms associated with PCOS and its differential effects on specific microRNAs.

| Keywords |

Vitamin D|
miR-93|
miR-21|
Serum Exosomes|
Polycystic|
Ovary Syndrome|

| Iau Science |

بررسی بیان miR-93 در مقایسه با miR-21 در آگروزوم‌های سرمی رت‌های PCOS القاشده پس از تیمار با ویتامین D

فاطمه عطاریان^۱، جینا خیاط زاده^{۱*}، محمدمهدی فرقانی فرد^۲، سعیده ظفر بالانژاد^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

*نویسنده مسئول: جینا خیاط زاده، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران؛ پست الکترونیکی

Jkhavatzadeh@iaui.ir

تاریخ دریافت | ۱۴۰۴/۰۵/۲۵ | تاریخ ویرایش | ۱۴۰۴/۱۱/۱۸ | تاریخ پذیرش | ۱۴۰۵/۰۴/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: ویتامین D به عنوان یک تنظیم‌کننده زیستی، در فرایندهای مرتبط با التهاب، متابولیسم و عملکرد تخمدان می‌باشد و در پاتوفیزیولوژی سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) نقش مهمی ایفا می‌کند. PCOS از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز زنان بوده و با تغییر در بیان microRNAهای مشتق از آگروزوم‌ها همراه است. در این میان، miR-93 به عنوان تنظیم‌کننده‌ای مهم در مسیرهای مولکولی مرتبط با PCOS شناخته شده است. هدف این مطالعه بررسی اثر ویتامین D بر بیان miR-93 در آگروزوم‌های سرمی رت‌های PCOS القاشده و مقایسه آن با داده‌های قبلی مربوط به miR-21 بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، ۲۴ رت ماده به چهار گروه شامل کنترل منفی، کنترل مثبت، مدل القایی PCOS و PCOS تیمار شده با ویتامین D تقسیم شدند. القای فنوتیپ PCOS با تزریق زیرجلدی تستوسترون به مدت ۳۵ روز انجام شد و تیمار با ویتامین D به صورت تزریق صفاقی هفتگی به مدت پنج هفته صورت گرفت. پس از نمونه‌گیری سرم، استخراج آگروزوم، استخراج RNA و بررسی بیان miR-93 با روش RT-qPCR انجام شد. داده‌ها با روش آماری $\Delta\Delta Ct$ تحلیل گردیدند و با نتایج miR-21 در مطالعه‌ای مشابه مقایسه شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که بیان miR-93 و miR-21 در گروه‌های PCOS و کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.001$). همچنین، تیمار با ویتامین D موجب افزایش بیان miR-21 ($P < 0.0001$) و کاهش بیشتر miR-93 ($P < 0.01$) گردید.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نقش بالقوه ویتامین D را به عنوان عامل زیست‌تنظیم‌کننده در تعدیل مکانیسم‌های سلولی مرتبط با PCOS و اثرهای متفاوت آن بر microRNAهای خاص برجسته می‌سازد.

واژگان کلیدی

ویتامین D
miR-93
miR-21
آگروزوم‌های سرمی
پلی کیستیک
سندروم تخمدان
علوم Iau

۱ | مقدمه

سندرم تخمدان پلی کیستیک^۱ (PCOS) یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز در زنان سنین باروری است که با هایپراندرورژنیسم، اختلالات تخمک‌گذاری و کیست‌های متعدد تخمدانی همراه است (۱). این سندرم علاوه بر تأثیرهای مستقیم بر سیستم تولیدمثل، با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های متابولیک مانند مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی-عروقی نیز مرتبط است (۲). در سال‌های اخیر، نقش ریزاران‌های^۲ (miRNAs) در پاتوفیزیولوژی PCOS به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. miRNAs مولکول‌های کوچک غیرکدکننده RNA هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند و می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی برای این سندرم مورد استفاده قرار گیرند؛ در میان آن‌ها miR-93 به‌عنوان یکی از miRNAهای کلیدی در تنظیم فرایندهای آنژیوژنز، تکثیر سلولی و متابولیسم شناخته شده است.

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که بیان miR-93 در بافت‌های تخمدانی و سرم زنان مبتلا به PCOS دچار تغییر می‌شود (۳). این miRNA از طریق تنظیم منفی فاکتورهایی مانند VEGF^۳ و TGF-β^۴ در اختلالات رگ‌زایی و رشد سلولی نقش دارند (۴). همچنین در تنظیم متابولیسم گلوکز و لیپیدها مؤثر بوده و می‌توانند به مقاومت به انسولین و اختلالات متابولیک در PCOS کمک کنند (۵). در کنار miR-93، miR-21 نیز به‌عنوان یک miRNA مهم در پاتوفیزیولوژی PCOS مورد توجه قرار گرفته است.

این miRNA در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با التهاب و مقاومت به انسولین نقش دارد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که بیان miR-21 در بافت‌های تخمدانی و سرم زنان مبتلا به PCOS به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۴). miR-21 از طریق تنظیم منفی PTEN و فعال‌سازی مسیر PI3K/AKT^۵، به تکثیر غیرطبیعی سلول‌های تخمدانی و مقاومت به انسولین کمک می‌کند (۵) و همچنین با تنظیم سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-6^۶ و TNF-α^۷ در ایجاد التهاب سیستمیک نقش دارد (۶).

اگرچه PCOS، یک سندرم متابولیک است، اما می‌تواند به‌عنوان یک سندرم متابولیک در نظر گرفته شود. PCOS با اختلالات متابولیک و اختلالات تخمک‌گذاری و کیست‌های متعدد تخمدانی همراه است. این سندرم علاوه بر تأثیرهای مستقیم بر سیستم تولیدمثل، با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های متابولیک مانند مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی-عروقی نیز مرتبط است (۲). در سال‌های اخیر، نقش ریزاران‌های^۲ (miRNAs) در پاتوفیزیولوژی PCOS به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. miRNAs مولکول‌های کوچک غیرکدکننده RNA هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند و می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی برای این سندرم مورد استفاده قرار گیرند؛ در میان آن‌ها miR-93 به‌عنوان یکی از miRNAهای کلیدی در تنظیم فرایندهای آنژیوژنز، تکثیر سلولی و متابولیسم شناخته شده است.

بین سلولی و پاتوفیزیولوژی بیماری‌ها نقش دارند (۵). در PCOS، اگرچه PCOS یک سندرم متابولیک است، اما می‌تواند به‌عنوان یک سندرم متابولیک در نظر گرفته شود. PCOS با اختلالات متابولیک و اختلالات تخمک‌گذاری و کیست‌های متعدد تخمدانی همراه است. این سندرم علاوه بر تأثیرهای مستقیم بر سیستم تولیدمثل، با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های متابولیک مانند مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی-عروقی نیز مرتبط است (۲). در سال‌های اخیر، نقش ریزاران‌های^۲ (miRNAs) در پاتوفیزیولوژی PCOS به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. miRNAs مولکول‌های کوچک غیرکدکننده RNA هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند و می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی برای این سندرم مورد استفاده قرار گیرند؛ در میان آن‌ها miR-93 به‌عنوان یکی از miRNAهای کلیدی در تنظیم فرایندهای آنژیوژنز، تکثیر سلولی و متابولیسم شناخته شده است.

ویتامین D، یک هورمون استروئیدی با عملکردهای متعدد از جمله تنظیم سیستم ایمنی، متابولیسم استخوان و هموستاز گلوکز، به‌عنوان یک عامل بالقوه در مدیریت PCOS مطرح شده است. کمبود ویتامین D در زنان مبتلا به PCOS شایع است، همچنین مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که مکمل‌سازی آن می‌تواند در بهبود علائم این سندرم مؤثر باشد (۷). با این حال، مکانیسم‌های دقیق تأثیر ویتامین D بر بیان miR-93 و miR-21 در اگرچه PCOS یک سندرم متابولیک است، اما می‌تواند به‌عنوان یک سندرم متابولیک در نظر گرفته شود. PCOS با اختلالات متابولیک و اختلالات تخمک‌گذاری و کیست‌های متعدد تخمدانی همراه است. این سندرم علاوه بر تأثیرهای مستقیم بر سیستم تولیدمثل، با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های متابولیک مانند مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی-عروقی نیز مرتبط است (۲). در سال‌های اخیر، نقش ریزاران‌های^۲ (miRNAs) در پاتوفیزیولوژی PCOS به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. miRNAs مولکول‌های کوچک غیرکدکننده RNA هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند و می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی برای این سندرم مورد استفاده قرار گیرند؛ در میان آن‌ها miR-93 به‌عنوان یکی از miRNAهای کلیدی در تنظیم فرایندهای آنژیوژنز، تکثیر سلولی و متابولیسم شناخته شده است.

با توجه به نقش برجسته miR-93 در فرایندهای مولکولی مرتبط با PCOS و اهمیت miR-21 در مسیرهای التهابی و متابولیکی، هدف این مطالعه بررسی اثر ویتامین D بر بیان miR-93 و miR-21 در بافت‌های تخمدانی و سرم زنان مبتلا به PCOS است (۸). این پژوهش می‌تواند گامی مؤثر در شناخت سازوکارهای سلولی و مولکولی حاکم بر این بیماری باشد و مسیر را برای مطالعه‌های پایه‌ای آینده در جهت روشن‌سازی ابعاد ناشناخته PCOS هموار سازد.

۲ | مواد و روش‌ها

پس از اخذ کد اخلاق با شناسه IR.IAU.MSHD.REC.1401.042 از کارگروه اخلاق در پژوهش دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم پزشکی مشهد، تعداد ۲۴ سرت ماده با محدوده وزنی ۲۵۰ گرم و سن ۲۱ روزه از دانشکده علوم پزشکی مشهد تهیه و به اتاق حیوانات دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد مشهد منتقل شدند. موش‌هایی که در مرحله استروس^۸ سیکل تولیدمثلی قرار داشتند، برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. سپس به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی تقسیم‌بندی شدند. قبل از شروع کار، موش‌ها به مدت دو هفته در شرایط آزمایشگاهی تحت کنترل دمای ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته با

^۵ Phosphoinositide 3-Kinase/ Protein Kinase B

^۶ Interleukin-6

^۷ Tumor Necrosis Factor Alpha

^۸ Estrous Cycle

^۱ Polycystic Ovary Syndrome

^۲ microRNA

^۳ Vascular Endothelial Growth Factor

^۴ Transforming Growth Factor Beta

رطوبت نسبی ۵۰-۵۵ درصد، تهویه مناسب و تغذیه با غذای خشک استاندارد و آب شرب شهری نگهداری شدند (۹-۱۱).

۱-۲ | اسمیر واژن برای تعیین چرخه جنسی

برای ارزیابی منظم بودن چرخه فحلی (پذیرش) از اسمیر واژینال استفاده شد. موش‌هایی با دو تا سه چرخه منظم متوالی انتخاب شدند. مراحل چرخه با تجزیه و تحلیل انواع سلول‌های غالب در اسمیر واژینال روزانه از روز ۱۰ام تا پایان آزمایش تعیین شد (۱۲).

۲-۲ | القای فنوتیپ PCOS

چندین روش هورمونی و غیرهورمونی از جمله تستوسترون، استرادیول والرات^۱ (EV)، دهیدرواپی آندروسترون^۲ (DHEA) و هورمون آدرنوکورتیکوتروپیک^۳ (ACTH) می‌توانند فنوتیپ PCOS را القا کنند. در این مطالعه از تستوسترون برای القای هورمونی در موش‌های صحرایی منتخب استفاده شد (۹).

۳-۲ | تهیه محلول تستوسترون

PCOS با استفاده از تستوسترون انانتات (شرکت هورمون ایران)، محلول در روغن کجند و اتانول، با دوز ۶ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن بدن^۴ (BW) برای تزریق زیرجلدی در ناحیه گردن در طی ۳۵ روز القا شد (۹).

۴-۲ | تهیه محلول Vit-D

Vit-D3 (شرکت تأمین کاسپین ایران) با دوز مشخص (ng/g BW) به موش‌ها تزریق شد. برای تهیه محلول ۱۰۰ میکرولیتر ویتامین D با ۹۰۰ میکرولیتر روغن کجند مخلوط شد و سپس رقت دوم با ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط و ۹۰۰ میکرولیتر روغن کجند انجام شد. محلول حاصل با ترکیب ۱۰۰ میکرولیتر با ۶/۶ میلی‌لیتر روغن کجند رقیق شد و به حجم نهایی ۶/۶ میلی‌لیتر رسید. در نهایت به هر موش ۲۰ واحد با استفاده از سرنگ انسولین با محلول نهایی تزریق شد (۸).

۵-۲ | گروه‌های حیوانات

حیوانات به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند (n=۶):

(۱) گروه ۱: که هیچ ماده و دارویی را دریافت نکردند (کنترل منفی).

(۲) گروه ۲: دریافت حلال تستوسترون (روغن کجند و اتانول) به مدت ۳۵ روز به‌صورت روزانه و زیرپوستی که در ناحیه پشت گردن تزریق شد (کنترل مثبت).

(۳) گروه ۳: شاهد PCOS که القای تخمدان پلی‌کیستیک با دریافت تستوسترون (گروه PCOS) به مدت ۳۵ روز و روزانه به‌صورت زیرپوستی و در ناحیه پشت گردن تزریق شد.

(۴) گروه ۴: گروه PCOS تحت تیمار با ویتامین D (گروهی که در آن سندروم تخمدان پلی‌کیستیک القا شده است و با ویتامین D تیمار گردید)، به مقدار ۱۲۰ نانوگرم بر وزن بدن به مدت ۵ هفته و هر هفته یک‌بار به‌صورت صفاقی تزریق شد (۱۰).

۶-۲ | تیمار رت‌ها با ویتامین D

پس از تأیید القای سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (پس از اتمام دوره ۳۵ روزه تزریق تستوسترون) با استفاده از تهیه اسمیر واژینال، که نشان‌دهنده بی‌نظمی پایدار چرخه فحلی مداوم یک فاز و فقدان الگوی منظم ۴-۵ روزه بود، تیمار نمونه‌ها از روز ۳۶ام با ویتامین D آغاز شد. تزریق ویتامین D به موش‌ها هر هفته یک‌بار به‌صورت صفاقی و به مدت ۵ هفته انجام شد (۱۰).

۷-۲ | جمع‌آوری نمونه‌های سرم

معدوم‌سازی حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورالعمل‌های کمیته اخلاق در پژوهش‌های حیوانی انجام شد. حیوانات تحت بیهوشی عمیق با استفاده از استنشاق کلروفرم قرار گرفتند و پس از حصول اطمینان از بیهوشی کامل به‌منظور جلوگیری از درد و رنج، معدوم‌سازی صورت گرفت. نمونه‌گیری سرم به‌صورت خون‌گیری از قلب انجام شد و در لوله‌های بدون ماده ضدانعقاد قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند و سرم با سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه به‌دست آمد. سرم ذخیره‌شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج اگزوزوم miR-21 و miR-93 مورد استفاده قرار گرفت (۸).

۸-۲ | استخراج و شناسایی اگزوزوم از سرم

اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت جداسازی اگزوزوم Exocib C ساخت شرکت Ana cell از سرم استخراج و از طریق اولتراسانتریفوژ جدا شدند. ویژگی‌های اگزوزوم از جمله مورفولوژی و قطر با استفاده از

³ Adrenocorticotrophic Hormone

⁴ Body Weight

¹ Estradiol Valerate

² Dehydroepiandrosterone

در ادامه کمیّت RNA استخراج شده از اگزوزومها با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. برای این منظور ۱ میکرولیتر از نمونه RNA روی صفحه حسگر نانودراپ قرار داده شد و غلظت RNA براساس جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه شد. غلظت RNA برحسب نانوگرم بر میکرولیتر (ng/μL) گزارش شد. این مقدار نشان دهنده میزان RNA استخراج شده از اگزوزومها بود. به طور معمول، غلظت RNA استخراج شده از اگزوزومهای سرمی در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر متغیر بود. این مقدار به حجم اولیه سرم مورد استفاده و کارایی روش استخراج RNA بستگی داشت. برای اطمینان از دقت اندازه گیری، هر نمونه حداقل دوبار با نانودراپ بررسی شد و میانگین غلظت RNA گزارش گردید.

۲-۱۰ | بررسی مقایسه بیان miR-93 با miR-21

بیان نسبی miR-93 و miR-21 در اگزوزومهای سرمی رت‌های PCOS القاشده، با استفاده از روش RT-qPCR^۳ ارزیابی شد. RNA استخراج شده ابتدا با استفاده از کیت اختصاصی سنتز cDNA^۴ برای miRNA (شرکت بن‌یاخته) به cDNA تبدیل شد. واکنش‌های Real-Time PCR با رنگ سایبرگرین و دستگاه StepOnePlus انجام شد. شرایط واکنش شامل دمای دناتوراسیون اولیه، تعداد چرخه‌های تکثیر و دمای اتصال پرایمرها مطابق دستورالعمل کیت تنظیم شد. منحنی‌های ذوب برای بررسی اختصاصیت پرایمرها رسم شدند و صحت واکنش‌ها تأیید شد. همچنین تحلیل داده‌ها با روش $\Delta\Delta C_t$ انجام شد که امکان مقایسه بیان ژن هدف نسبت به ژن مرجع را فراهم می‌سازد (۱۴). ژن U87 به عنوان کنترل داخلی برای نرمال سازی داده‌ها استفاده شد. Ct‌های حاصل از هر نمونه در فاز لگاریتمی منحنی تکثیر استخراج شدند و برای محاسبه Fold Change نسبت به گروه کنترل منفی به کار رفتند. داده‌ها با نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸ تحلیل آماری شدند.

به علاوه برای miR-93، پرایمرهای اختصاصی طراحی و سنتز شدند. برای miR-21 و ژن U87 از توالی‌هایی استفاده شد که در مطالعه قبلی گزارش شده‌اند (۸). توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به miR-93، miR-21 و ژن U87 در جدول ۱ آورده شده‌اند.

میکروسکوپ الکترونی عبوری^۱ (TEM) پس از تثبیت با گلو تار آلدئید ۱ درصد ارزیابی شد. اندازه و درصد اگزوزومها با تکنیک DLS^۲ با استفاده از دستگاه زتا سائزر کمپانی Malvern بافر فسفات ۱۰۰ میکرولیتری تعیین شد. این روش غیرمخرب، سریع و مقرون به صرفه، قطر اگزوزوم را در محدوده نانومتر تا میکرون تعیین و روش جداسازی را تأیید نمود (۱۳).

۲-۹ | استخراج Total RNA اگزوزومی و بررسی کمیّت RNA استخراج شده

پس از جداسازی و خالص سازی اگزوزومها، استخراج RNA براساس کیت دنایست صورت گرفت. معرف‌های استفاده شده عبارت بودند از:

- AR1 (محلول لیزکننده): کاهش ویسکوزیته و هموژنیزه سازی
- AR2 (محلول رسوب دهنده): ته نشینی RNA
- AR3 (۷۵ درصد اتانول): شست و شو
- AR4 (DEPC treated water: انحلال RNA)

۲-۹-۱ | مراحل کلی استخراج

- ۱- تمامی لوازم (تیوب‌ها و سرسمپلرها) پس از ضد عفونی و اتوکلاو آماده شدند و کار روی یخ انجام گردید.
- ۲- دو میلی لیتر سرم در تیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل و ۱۷۵ میکرولیتر AR1 افزوده شد. مخلوط برای ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه و سپس ۱ میلی لیتر محلول RNX-plus سرد اضافه گردید.
- ۳- پس از ۵ تا ۱۰ ثانیه وُرتکس و ۵ دقیقه انکوباسیون، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده و ۱۵ ثانیه وُرتکس انجام و سپس در ۴ درجه سانتی گراد و ۱۲۰۰۰ ×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد.
- ۵- فاز آبی جدا شده با حجم مساوی ایزوپروپانول مخلوط و ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شد.
- ۶- سانتریفوژ در ۴ درجه سانتی گراد و ۱۲۰۰۰ ×g برای ۱۵ دقیقه، دور ریز فاز فوقانی و شست و شو با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد در ۴ درجه سانتی گراد و ۷۵۰۰ ×g برای ۸ دقیقه انجام شد.
- ۷- پس از تبخیر مختصر اتانول، رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر DEPC treated water حل و از ستون عبور داده شد تا RNA خالص شده به دست آید.

^۳ Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

^۴ Complementary Dna

^۱ Transmission Electron Microscope

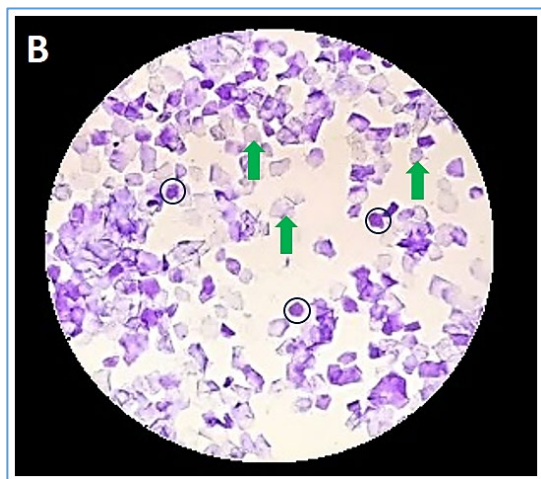
^۲ Dynamic Light Scattering

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی miRNAهای موردنظر.

Genes	Primers Sequence	TM
U87	Forward: 5'-ACTTATGTTTTTGGCGTT-3'	69.5
	Reverse: 5'-GAGCAGGGTCCGAG-3'	69.5
miR-39	Forward: 5'-CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGG-3'	65
	Reverse: 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'	65
miR-21	Forward: 5'-GGCTTGTGTCAGACTGATG-3'	65
	Reverse: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'	65

۳ | نتایج

با توجه به آزمایش‌های انجام‌شده، موش‌هایی که در مرحله استروسی سیکل تولیدمثلی قرار داشتند، برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. در مرحله استروس، اسمیر واژینال عمدتاً شامل سلول‌های سنگ‌فرشی شاخی‌شده است و حضور لکوسیت‌ها به حداقل می‌رسد که با یافته‌های Bekyürek و همکاران (۱۵) هم‌خوانی دارد. همچنین لازم است بیان شود که توسط این روش مشخص شد که تمام نمونه‌های موردآزمایش در سیکل استروسی منظم قرار دارند. در شکل A-۱ دوره دی‌استروسی نمونه‌های آزمایشگاهی نشان داده شده است که سلول‌های لکوسیتی آن زیاد می‌باشد اما با رسیدن جانور به دوره استروس که در شکل B-۱ نشان داده شده است وجود سلول‌های اپیتلیال شاخی‌شده مشخص می‌باشد.

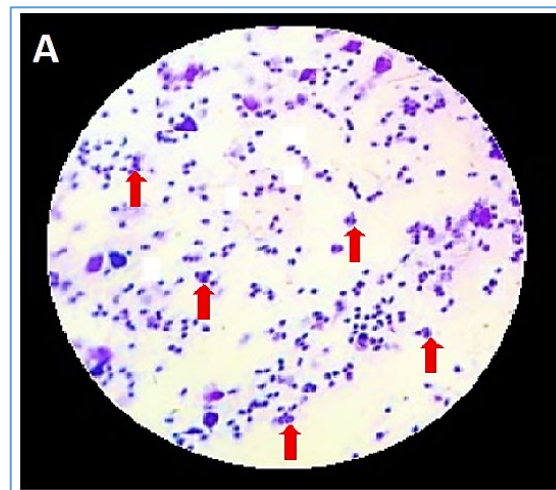


شکل ۱- اسمیر رت‌های ماده و با رنگ آمیزی گیمسا (بزرگ‌نمایی ۴۰۰X).

A: مربوط به دوره دی‌استروس (این مرحله به‌طور عمده از لکوسیت‌ها تشکیل شده است که با علامت پیکان مشخص شده‌اند).
B: مربوط به دوره استروس (این مرحله به‌طور عمده از سلول‌های اپیتلیال سنگ‌فرشی شاخی‌شده تشکیل شده که با علامت پیکان و سلول‌های اپیتلیال نیز با علامت دایره مشخص شده‌اند).

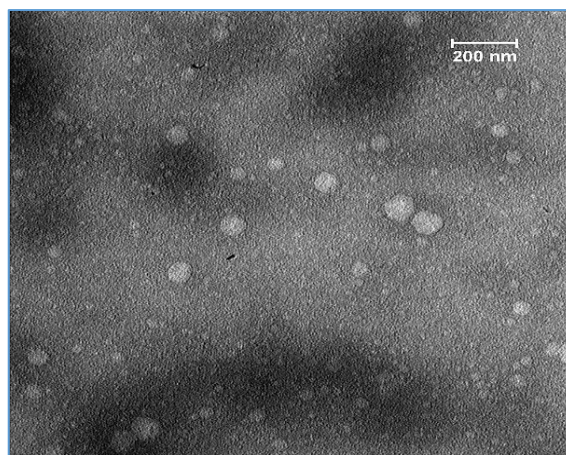
۳-۱ | بررسی اگزوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (TEM)

با استفاده از میکروسکوپ TEM، ساختار اگزوزوم‌ها به‌صورت میکروسکوپی موردبررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در مطالعه‌های پیشین نیز گزارش شده، شکل ۲، تصویری به‌صورت تصادفی از اگزوزم در تمام گروه‌ها می‌باشد. تمامیت غشای اگزوزوم‌ها طی فرایند جداسازی حفظ‌شده و ساختار کروی دچار آسیب نشده است. همچنین در این تصویر قطر بیشینه اگزوزوم‌ها ۲۰۰ نانومتر (۲۰۰-۳۰ nm) گزارش شد (۸).



۲-۳ | نتایج حاصل از آنالیز DLS

همچنین تجزیه و تحلیل اندازه اگزوزوم با استفاده از روش DLS انجام شد و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است (جدول ۲).



شکل ۲- تصویر میکروسکوپی اگزوزومها با تکنیک TEM. نشانگر یکنواختی و عدم پارگی غشای اگزوزومها می باشد.

جدول ۲- نتایج تجزیه و تحلیل DLS اگزوزومها.

پارامتر	مقدار گزارش شده	توضیحات
اندازه متوسط اگزوزومها	۱۳۹/۵۶ نانومتر	در محدوده قابل قبول برای وزیکولها قرار دارد.
قطر هیدرودینامیکی	۲۲۴/۲۱ نانومتر	شامل قطر متوسط ذرات و بار اطراف آن می شود.
شاخص پراکندگی چندگانه (PDI)	۰/۱۷	مقدار PDI پایین نشان دهنده پراکندگی یکنواخت و تک پراکندگی اگزوزومهاست.
توزیع اندازه ذرات	یکنواخت و تک پراکنده	نشان دهنده سطح بالایی از سازگاری در توزیع اندازه اگزوزومهاست.

۶-۳ | توزیع اندازه ذرات

پراکندگی یکنواخت و تک پراکندگی اگزوزومها نشان دهنده کیفیت بالا و سازگاری در توزیع اندازه آنهاست. تحلیل DLS نشان داد که اگزوزومهای استخراج شده از نظر اندازه، قطر هیدرودینامیکی و شاخص پراکندگی (PDI) در محدوده استاندارد قرار دارند و از همگنی مناسبی برخوردارند که نشان دهنده کیفیت مطلوب نمونهها برای مطالعه های مولکولی است. این نتایج تأیید می کند که اگزوزومها برای مطالعه های بعدی مناسب هستند (شکل ۳).

۳-۳ | اندازه متوسط اگزوزومها (۱۳۹/۵۶ نانومتر)

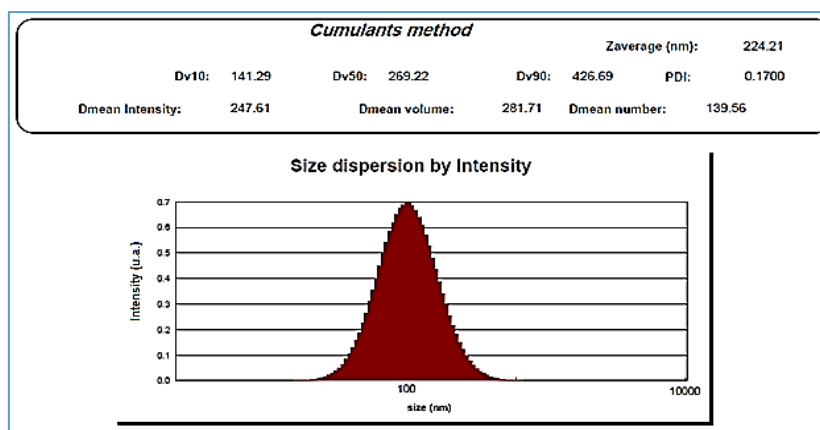
اندازه متوسط ۱۳۹/۵۶ نانومتر در محدوده استاندارد اگزوزومها (۲۰۰-۳۰۰ نانومتر) قرار دارد و نشان دهنده صحت فرایند جداسازی و خلوص نمونههاست.

۴-۳ | قطر هیدرودینامیکی (۲۲۴/۲۱ نانومتر)

این مقدار شامل اندازه ذرات و بار سطحی آنها و نشان دهنده ویژگی های فیزیکی اگزوزومهاست.

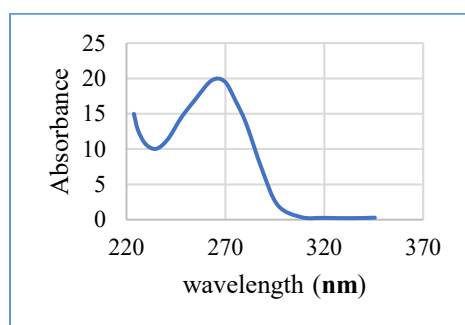
۵-۳ | شاخص پراکندگی چندگانه (PDI = ۰/۱۷)

مقدار PDI پایین (کمتر از ۰/۲) نشان دهنده توزیع یکنواخت و تک پراکندگی اگزوزومهاست. این موضوع نشان می دهد که نمونه از نظر اندازه ذرات بسیار همگن است.



شکل ۳- نتایج حاصل از DLS آگروزوم‌های سرمی.

براساس میانگین وزنی بیشترین میزان وزیکول‌ها در سایز ۱۳۹/۵۶ نانومتر است. هرچه کمتر یا بیشتر از این مقدار شود، پراکندگی آگروزوم‌ها کاهش می‌یابد.



نمودار ۱- نتایج نانودراپ: نشان‌دهنده RNA استخراج‌شده.

همچنین جدول ۳ نشان‌دهنده مقادیر Fold change نسبت به مقادیر کنترل (Control) برای miR-21 و miR-93 در شرایط مختلف است.

۳-۷ | نتایج کمیّت RNA استخراج‌شده

نتایج بررسی کمیّت RNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ در نمودار ۱ تنظیم شده است. این نمودار اطلاعات مربوط به غلظت RNA، نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر است:

نتایج نانودراپ نشان می‌دهند که RNA استخراج‌شده از کیفیت بالایی برخوردار است. نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ در محدوده ۱/۸ تا ۲/۰ و وجود یک پیک مشخص در طیف نانودراپ نشان‌دهنده خلوص بالای RNA و عدم آلودگی با پروتئین‌ها و سایر ناخالصی‌هاست. این نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های بعدی مانند Real-Time PCR مناسب هستند.

جدول ۳- تغییر فولد miR-93 و miR-21 نسبت به مقادیر کنترل.

miR-93			
کنترل منفی	کنترل مثبت	PCOS (6mg/kg Testosterone)	PCOS (120ng/kg Vit D)
۱	۰/۵۷	۰/۵۳	۰/۳۴
۱	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴۱
۱	۰/۶۵	۰/۳۹	۰/۳۱
۱	۰/۶۴	۰/۳۶	۰/۴۵
۱	۰/۵۱	۰/۴۲	۰/۴۷
۱	۰/۵۶	۰/۴۲	۰/۳۹
miR-21			
۱	۰/۴۵	۰/۱۸	۰/۵۸
۱	۰/۶۷	۰/۳۸	۰/۶۱
۱	۰/۴۱	۰/۰۵	۰/۸۱
۱	۰/۶۲	۰/۲۳	۰/۶۱
۱	۰/۶۸	۰/۱۵	۰/۵۲
۱	۰/۵۶	۰/۲۰	۰/۶۳

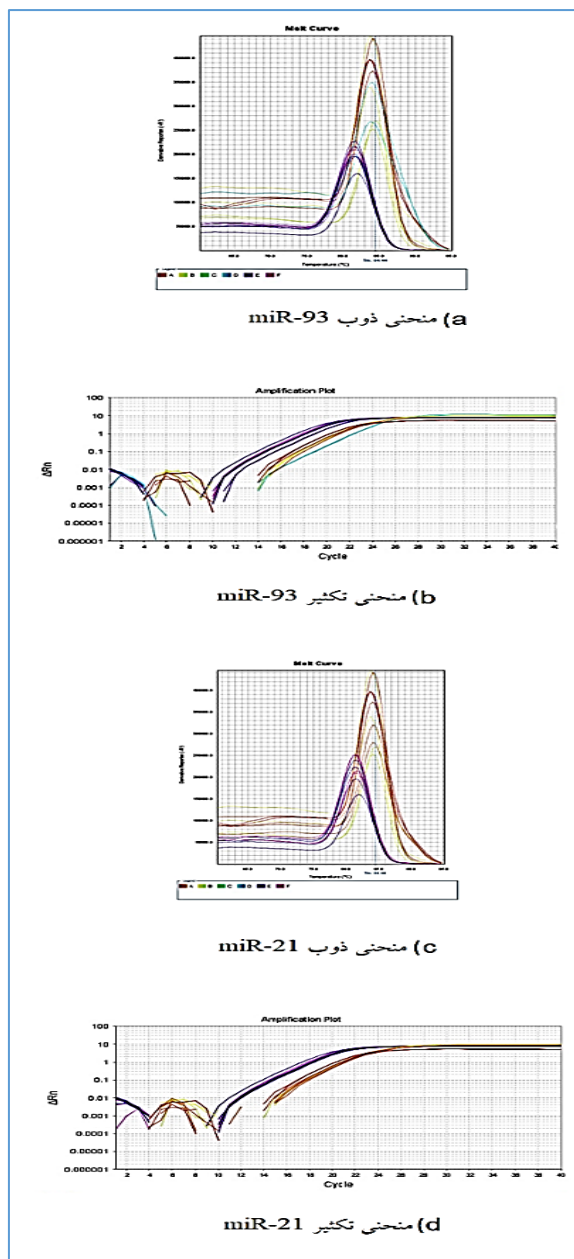
Fold change معمولاً به صورت نسبت بیان ژن (یا miRNA) در گروه آزمایشی به بیان آن در گروه کنترل محاسبه می‌شود. فرمول کلی برای محاسبه Fold change به این صورت است:

$$\text{Fold Change} = \frac{\text{مقدار بیان در گروه آزمایشی}}{\text{مقدار بیان در گروه کنترل}}$$

در جدول ۳ مقادیر کنترل منفی به عنوان مرجع، ۱ در نظر گرفته شده‌اند و مقادیر سایر گروه‌های کنترل مثبت، PCOS (6mg/kg Testosterone) و PCOS (120ng/kg Vit D) نسبت به این کنترل محاسبه شده‌اند.

۸-۳ | مقایسه بیان miR-93 با miR-21 اگزوزوم‌های سرمی

در ابتدا به منظور ارزیابی اختصاصیت پرایمرهای سنتز شده، منحنی ذوب مربوط به آن‌ها رسم گردید (شکل ۵-a و ۵-c). براین اساس، پرایمرها تقابلی باهم نداشته و واکنش دارای بازدهی مناسب برای تعیین کمیت بیان ژن می‌باشد. همچنین با توجه به منحنی ذوب برای هر دو پرایمر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پرایمرها به طور اختصاصی عمل کرده‌اند و یک نمونه منفرد از cDNA را تکثیر نموده‌اند. منحنی تکثیر مربوط به miR-93 و نیز miR-21 در (شکل ۵-b و ۵-d) قابل مشاهده است.



شکل ۵- منحنی‌های ذوب و تکثیر مربوط به miR-93 و miR-21. منحنی‌های ذوب با پیک‌های تیز و یکتا، اختصاصی بودن پرایمرها و خلوص بالای محصولات RT-qPCR را نشان می‌دهند. نبود پیک‌های جانبی، صحت داده‌های کمی‌سازی را تأیید می‌کند (a, c). منحنی‌های تکثیر با روند صعودی یکنواخت و شیب مناسب، بیانگر کارایی بالای واکنش (بیش از ۹۰ درصد) و قابلیت تکرارپذیری آزمایش هستند. همچنین، مقدار Ct به دست آمده در فاز لگاریتمی منحنی‌ها امکان مقایسه دقیق بین نمونه‌ها را فراهم می‌سازد (b, d).

نتایج حاصل از بیان نسبی miR-93 با miR-21 در اگزوزوم‌های سرم حیوان در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل و ویتامین D در نمودار ۲ نشان داده شده است. نمودارها، داده‌های اندازه‌گیری را نشان می‌دهند که به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار مشخص شده‌اند.

تفاوت بیان می‌تواند نشان‌دهنده نقش تنظیمی اختصاصی ویتامین D در مسیرهای التهابی و متابولیکی مرتبط با PCOS باشد.

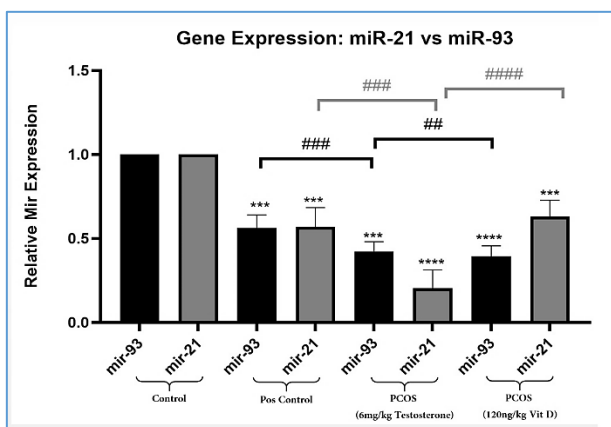
۴ | بحث

سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز در زنان در سنین باروری است که با ناباروری، مقاومت به انسولین و التهاب مزمن همراه است. پاتوفیزیولوژی پیچیده این بیماری شامل اختلال در عملکرد تخمدان، عدم تعادل هورمونی و تغییرهای متابولیکی است که به‌طور مستقیم بر کیفیت اووسیت و باروری تأثیر می‌گذارد. در سال‌های اخیر، نقش تنظیمی ریزRNAها (miRNA) در این فرایندها به‌شدت موردتوجه قرار گرفته است؛ به‌ویژه miR-93 و miR-21 به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه در تشخیص و درمان PCOS مطرح شده‌اند.

ویتامین D به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اپی‌ژنتیک، در تعدیل بیان ژن‌ها و مسیرهای سیگنالینگ سلولی نقش دارد. مطالعه‌های متعددی از سال ۲۰۲۰ تاکنون به بررسی ارتباط بین ویتامین D، miRNAها و مسیرهای مولکولی مرتبط با PCOS پرداخته‌اند. در مطالعه حاضر، اثر ویتامین D بر بیان miRNAها در اگزوزوم‌های سرمی رت‌های مبتلا به PCOS بررسی شد. یافته‌ها نشان دادند که بیان هر دو miR-21 و miR-93 در گروه‌های PCOS و کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری داشت. تیمار با ویتامین D موجب افزایش بیان miR-21 و کاهش بیشتر بیان miR-93 نسبت به گروه PCOS بدون تیمار شد. یافته‌های مربوط به miR-21 پیش‌تر توسط Attarian و همکاران (۸) گزارش شده‌اند و در این مطالعه نیز تأیید شدند.

با توجه به نقش شناخته‌شده miR-21 در مسیرهای التهابی (NF-κB) و miR-93 در مقاومت به انسولین (PI3K/Akt) این تغییرهای بیان می‌توانند نشان‌دهنده پتانسیل تنظیمی ویتامین D در مسیرهای مولکولی مرتبط با التهاب و متابولیسم باشند (۵) و (۱۶). مطالعه‌های پیشین نیز از این یافته‌ها حمایت می‌کنند. Bai و همکاران (۱۷) نیز نشان دادند که miR-21 و miR-93 تعامل با lncRNAها و mRNAها مسیرهای مهمی نظیر Hippo و MAPK را در سلول‌های گرانولوزا تنظیم می‌کنند (۱۷). مطالعه Sahraeian و همکاران (۱۸) نیز نشان داد که درمان ترکیبی فوتوبایومدولاسیون و اگزوزوم موجب افزایش بیان miR-21

براساس نمودار ۲ بیان miR-93 در گروه‌های کنترل مثبت، PCOS و PCOS تحت تیمار با Vit D به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافت (به ترتیب $p < 0.001$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.0001$). گروه تجربی PCOS تحت تیمار با ویتامین D بیان miR-93 را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه PCOS کاهش داد ($p < 0.01$). علاوه بر این، بیان miR-93 در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل مثبت به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($p < 0.001$). همچنین بیان miR-21 در گروه‌های کنترل مثبت، PCOS و PCOS تحت تیمار با Vit D به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافت (به ترتیب $p < 0.001$ ، $p < 0.0001$ و $p < 0.001$). گروه تجربی PCOS تحت تیمار با ویتامین D بیان miR-21 را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه PCOS افزایش داد ($p < 0.0001$). علاوه بر این، بیان miR-21 در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل مثبت به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($p < 0.001$) (۸).



نمودار ۲- ارزیابی بیان miR-93 در مقایسه با miR-21 در

نمونه‌های کنترل، کنترل مثبت، PCOS و PCOS پس از تیمار با ویتامین D.

نمودارها داده‌های اندازه‌گیری را نشان می‌دهند که به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان می‌شوند (داده‌های مربوط به miR-21 برگرفته از مطالعه قبلی) (۸).

*** تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی در سطح $p < 0.001$

**** تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی در سطح $p < 0.0001$

تفاوت معنی‌دار با گروه PCOS در سطح $p < 0.01$

تفاوت معنی‌دار با گروه PCOS در سطح $p < 0.001$

تفاوت معنی‌دار با گروه PCOS در سطح $p < 0.0001$

این نتایج نشان می‌دهند که ویتامین D اثرهای متفاوتی بر بیان miR-21 و miR-93 دارد؛ به‌طوری‌که موجب افزایش بیان miR-21 و کاهش بیشتر miR-93 در رت‌های PCOS القاشده می‌شود. این

در اووسيت‌هاي PCOS شده و كيفيت اووسيت را ارتقا داده است (۱۸). همچنين، مطالعه Rashid و همكاران بيانگر آن بود كه بيان miRNA در مایع فولیکولی و سلول‌هاي تخمداني زنان مبتلا به PCOS دچار اختلال است و تيمار با ويتامين D موجب تعديل اين اختلال‌ها می‌شود (۱۹).

مطالعه‌هاي جديدتر نيز يافته‌هاي اين مطالعه را تقويت می‌کنند. Zhang و همكاران (۵) نيز نشان دادند كه اگزوزوم‌ها و miRNA‌هاي درون آن‌ها نقش کليدي در تنظيم رشد فولیکول، ترشح هورمون‌ها، استرس اکسيداتيو، پاسخ‌هاي التهابي و مقاومت به انسولين دارند. Vitale و همكاران (۵ و ۱۶) نيز در مرور سيستماتيک خود بر نقش miRNA‌ها در PCOS تأکيد کردند و آن‌ها را اهداف بالقوه درمانی معرفی نمودند. همچنين Chen و همكاران (۳) نيز نشان دادند كه تغييرهاي اگزوزومي و miRNA‌ها می‌توانند تحت‌تأثير رېتم‌هاي شبانه‌روزی قرار گیرند و اين موضوع در پاتوفيزيولوژی PCOS اهميت دارد. از سوي ديگر مطالعه‌هاي باليني اخير ارتباط كمبود ويتامين D با مقاومت به انسولين، هايپرآندروژنيسم و محيط التهابي در زنان مبتلا به PCOS را گزارش کرده‌اند. به‌علاوه مطالعه Song (۷) به بررسی ارتباط وضعيت ويتامين D با ذخيره تخمداني پرداخت و نشان داد كه سطح ويتامين دي‌هيدروکسي ۲۵ (25(OH)D) با سطح AMH همبستگي مثبت دارد. اين يافته‌ها بيانگر آن است كه ويتامين D می‌تواند نوسان‌هاي AMH را تعديل کرده و كيفيت فولیکول‌ها را بهبود بخشد. اين نتايج به‌طور غيرمستقيم با يافته‌هاي اين مطالعه درباره افزايش بيان miR-21، کاهش miR-93 پس از تيمار با ويتامين D و بهبود كيفيت اووسيت‌ها هم‌خوانی دارد.

مطالعه Pourmohammad و همكاران (۲۰) نشان داد كه تيمار رت‌هاي مبتلا به PCOS القاشده با DHEA توسط ويتامين D موجب کاهش سطح IL-8 در اگزوزوم‌هاي سرمی شد. علاوه بر اين کاهش فولیکول‌هاي آترتيك و كيستيک و نيز کاهش سطح LH، FSH و تستوسترون در گروه تيمار مشاهده گرديد. اين يافته‌ها نشان‌دهنده اثر ضدالتهابي و تنظيم‌کننده هورموني ويتامين D است و با نتايج مطالعه حاضر در زمينه تعديل مسيرهاي التهابي و متابوليکي از طريق miRNA‌ها هم‌سو می‌باشد.

مطالعه Çelik و همكاران (۱۰) نيز نشان داد كه ويتامين D موجب بهبود ساختار تخمدان و حفظ تماميت سلولي در مدل PCOS القاشده با DHEA می‌شود.

علاوه بر اين، مطالعه‌هاي EL-komy و همكاران (۶) نشان دادند كه عصاره دارچين از طريق تعديل مسير 3βGSK-1/SIRT-1/miR-21 برخي اختلالات متابوليکي مرتبط با PCOS را بهبود می‌بخشد. اين يافته‌ها نشان می‌دهند كه مسيرهاي تنظيمي مشترک بين ويتامين D و ساير عوامل طبيعي وجود دارد كه می‌تواند در آينده به توسعه درمان‌هاي ترکيبي منجر شود.

در مجموع نتايج اين مطالعه با مطالعه‌هاي پيشين هم‌سو بوده و نشان می‌دهد كه ويتامين D از طريق تعديل بيان miRNA‌ها به‌ويژه miR-21 و miR-93 می‌تواند نقش مهمی در ارزيابي اختلالات التهابي و متابوليکي مرتبط با PCOS ايفا کند.

۵ | نتيجه‌گيري

به‌طور کلی، نتايج اين مطالعه حاکی از آن است كه بيان miR-93 و miR-21 در اگزوزوم‌هاي سرمي رت‌هاي مبتلا به PCOS کاهش يافته است و تيمار با ويتامين D توانست به تنظيم اين اختلال بيان کمک کند. تفاوت در پاسخ اين دو miRNA به ويتامين D نشان‌دهنده عملکردهاي متفاوت آن‌ها در پاتوفيزيولوژی PCOS است؛ miR-93 بيشتر در تنظيم مقاومت به انسولين و رشد فولیکولی نقش دارد، درحالي كه miR-21 در مسيرهاي التهابي فعال‌تر است. احتمال می‌رود با توجه به نقش کليدي اين دو miRNA، تبیین دقيق‌تر مکانيسم‌هاي مولکولي دخيل در PCOS بتواند مسير پژوهش‌هاي پايه‌اي آتی را در جهت طراحي رويکردهاي درمانی هدفمند هموار سازد. همچنين پيشنهادهای می‌شود در مطالعه‌هاي آينده، ارزيابي پتانسيل درمانی ترکيبي اين ريزRNA‌ها در مدل‌هاي پيش‌باليني و باليني موردتوجه ويژه قرار گیرند.

۶ | ملاحظات اخلاقي

در اين پژوهش تمامی اصول اخلاقي مرتبط با، کار با حيوانات آزمایشگاهی رعایت شد و تلاش گرديد تعداد حيوانات مورداستفاده و ميزان درد و استرس آن‌ها به حداقل برسد. به‌علاوه نگهداری، تيمار و نمونه‌گيري حيوانات مطابق ضوابط و دستورالعمل‌هاي اخلاق در پژوهش انجام شد.

۷ | تشکر و قدرداني

نويسندگان مراتب قدرداني خود را از اعضای محترم هيئت علمي گروه زیست‌شناسي دانشگاه آزاد اسلامي واحد مشهد، كه با

راهنمایی‌های علمی و حمایت‌های معنوی خود زمینه‌ساز پیشبرد این پژوهش بودند، ابراز می‌دارد.

۸ | تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع مالی، شخصی، سازمانی یا حرفه‌ای مرتبط با پژوهش حاضر و انتشار نتایج آن وجود ندارد.

۹ | سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی پژوهش، اجرای مطالعه، تحلیل و تفسیر داده‌ها و نگارش یا بازبینی علمی مقاله مشارکت داشتند؛ همچنین نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کردند و مسئولیت پاسخ‌گویی درباره صحت و تمامیت اثر را پذیرفتند.

۱۰ | کد اخلاق

تمامی مراحل این پژوهش پس از اخذ تأییدیه از کارگروه اخلاق در پژوهش دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی مشهد، با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1401.042 انجام شد.

۱۱ | استفاده از هوش مصنوعی

—

| **Extended Abstract****Study of miR-93 expression compared to miR-21 in serum exosomes of PCOS-induced rats after vitamin D treatment |**

Background and Aim: Vitamin D, as a biological regulator, plays a key role in inflammation, metabolism, and ovarian function, and is implicated in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome (PCOS). PCOS is one of the most common endocrine disorders in women and is associated with altered expression of exosome-derived microRNAs. Among these, miR-93 has been identified as a critical regulator in molecular pathways related to PCOS. This study aimed to investigate the effect of vitamin D on the expression of miR-93 in serum exosomes of PCOS-induced rats and compare the findings with previously reported data on miR-21.

Materials and Methods: In this experimental study, 24 female rats were divided into four groups: negative control, positive control, PCOS model, and PCOS treated with vitamin D. The PCOS phenotype was induced by subcutaneous testosterone injections for 35 days, and vitamin D treatment was administered via weekly intraperitoneal injections for five weeks. Serum samples were collected, followed by exosome isolation, RNA extraction, and miR-93 expression analysis using RT-qPCR. Data were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method and compared with miR-21 results from a similar study.

Results: Expression levels of miR-93 and miR-21 were significantly reduced in the PCOS and positive control groups compared to the negative control ($p < 0.001$). Vitamin D treatment led to a significant increase in miR-21 expression ($p < 0.0001$) and a further decrease in miR-93 expression ($p < 0.01$).

Conclusion: These findings highlight the potential role of vitamin D as a bio-regulatory agent in modulating cellular mechanisms associated with PCOS and its differential effects on specific microRNAs.

| **Keywords**

Vitamin D, miR-93, miR-21, Serum Exosomes, Polycystic Ovary Syndrome

1. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2016;106(1):6-15.
2. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2(1):1-18.
3. Chen W-h, Huang Q-y, Wang Z-y, Zhuang X-x, Lin S, Shi Q-y. Therapeutic potential of exosomes/miRNAs in polycystic ovary syndrome induced by the alteration of circadian rhythms. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:918805.
4. Wang K, Li Y. Signaling pathways and targeted therapeutic strategies for polycystic ovary syndrome. *Frontiers in endocrinology*. 2023;14:1191759.
5. Zhang Z, Shi C, Wang Z. The physiological functions and therapeutic potential of exosomes during the development and treatment of polycystic ovary syndrome. *Frontiers in Physiology*. 2023;14:1279469.
6. EL-komy EA, Abd El-Magid AD, Mahfouz MK, Abdel-Hamid OM, Abozaid OA. Cinnamon zeylanicum extract improves some metabolic disorders associated with polycystic ovary syndrome by modulating miR-21/SIRT-1/GSK-3 β pathways. *Journal of Advanced Veterinary Research*. 2025;15(2):162-9.
7. Song G. Vitamin D deficiency and polycystic ovary syndrome: an opinion and positioning article. *Frontiers in Nutrition*. 2025;12:1602472.
8. Attarian F, Khayatzaheh J, Forghanifard MM, Balanezhad SZ. To Evaluate the Effect of Vitamin D on MicroRNAs in Polycystic Ovary Syndrome in Rat; An Animal Study: Effect of vitamin D on Expression of MicroRNAs in Rat. *Galen Medical Journal*. 2025;14:e3759-e.
9. Noroozzadeh M, Behboudi-Gandevani S, Zadeh-Vakili A, Tehrani FR. Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Life sciences*. 2017;191:259-72.
10. Çelik LS, Kuyucu Y, Yenilmez ED, Tuli A, Dağlıoğlu K, Mete UÖ. Effects of vitamin D on ovary in DHEA-treated PCOS rat model: A light and electron microscopic study. *Ultrastructural Pathology*. 2018;42(1):55-64.
11. Hadjadj L, Monori-Kiss A, Horváth EM, Heinzlmann A, Magyar A, Sziva RE, et al. Geometric, elastic and contractile-relaxation changes in coronary arterioles induced by Vitamin D deficiency in normal and hyperandrogenic female rats. *Microvascular Research*. 2019;122:78-84.
12. SADOUGH S, RAHBARIAN R. Investigation the effect of glycyrrhizic acid on ovarian follicle in polycystic ovarian syndrome mice model. 2017.
13. Ding S-Q, Chen Y-Q, Chen J, Wang S-N, Duan F-X, Shi Y-J, et al. Serum exosomal microRNA transcriptome profiling in subacute spinal cord injured rats. *Genomics*. 2020;112(2):2092-105.
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
15. Bekyürek T, Liman N, Bayram G. Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Laboratory Animals*. 2002;36(1):51-60.
16. Vitale SG, Fulghesu AM, Mikuš M, Watrowski R, D'Alterio MN, Lin L-T, et al. The translational role of miRNA in polycystic ovary syndrome: from bench to bedside—a systematic literature review. *Biomedicines*. 2022;10(8):1816.
17. Bai L, Gong J, Guo Y, Li Y, Huang H, Liu X. Construction of a ceRNA network in polycystic ovary syndrome (PCOS) driven by exosomal lncRNA. *Frontiers in genetics*. 2022;13:979924.
18. Sahraeian S, Abbaszadeh HA, Taheripanah R, Edalatmanesh MA, Keshavarzi S, Ghazifard A. Exosome Therapy and Photobiomodulation Therapy

Regulate mi-RNA 21, 155 Expressions, Nucleus Acetylation and Glutathione in a Polycystic Ovary Oocyte: An In Vitro Study. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2024;15:e10.

19. Rashid G, Khan NA, Elsoni D, Youness RA, Hassan H, Siwan D, et al. miRNA expression in PCOS: Unveiling a paradigm shift toward biomarker discovery.

Archives of Gynecology and Obstetrics. 2024;309(5):1707-23.

20. Pourmohammad M, Khayatizadeh J, Erfanian S, Zafarbalanezhad S. Vitamin D's Impact on Serum Exosome IL-8 Gene Expression, Biochemical and Microscopic Study in PCOS Rats: An Experimental Study. 2025.