فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۸، جلد ۱۳، شماره ۱، زمستان ۹۸، صفحه ۳۵ تا ۴۵
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

سنجش غلظت های اینترلوکین های۳، ۵ و ۶ در مایع فولیکولی و ارزش تشخیصی آن‌ها در زنان نابارور با علت ناشناخته

محمد قدسی [۱]، **ویدا حجتی** [۲]، آرمین عطاران زاده [۳]، بیتا سیفی [۴]

۱-دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

۲-استادیار، دکترای تخصصی زیست شناسی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. **Vida.hojati@gmail.com**

۳-فلوشیپ پاتولوژی و سیتوژنتیک مولکولی، بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

٤-استادیار، دکترای تخصصی بیولوژی تولیدمثل، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۷/۲۵ تاریخ پذیرش:۹۸/۱۰/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: سایتوکاین های سیستم ایمنی در فرآیند های متعدد فیزیولوژیکی در سیستم تولید مثل فعالیت دارند. هم چنین بین سیستم ایمنی و تولید مثل یک رابطه دو طرفه وجود دارد. هدف این مطالعه مقطعی بررسی غلظت‌های اینترلوکین‌های۳، ۵ و ٦ در مایع فولیکولی در افراد دارای ناباروری با علت ناشناخته و مقایسه آن‌ها با افراد سالم در طول درمان با لقاح آزمایشگاهی و فاکتور های بالینی آن‌ها بود.

روش کار: شروع تحریک تخمک‌گذاری با داروهای محرک تخمک‌گذاری تحت پروتکل آنتاگونیست و آگونیست در ٦۰ بیمار نابارور با علت ناشناخته و ٤۰ خانم سالم آغاز گردید. سپس مایع فولیکولی آن‌ها جدا شده و غلظت فولیکولی اینترلوکین های ۳، ۵ و ٦ با روش الایزا اندازه‌گیری شد و هم‌چنین ارزش تشخیصی این ۳ اینترلوکین با استفاده از سطح زیر منحنی(Roc curve) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از فاکتورهای مورد مطالعه ضخامت آندومتر و سطح تستوسترون بین دو گروه معنی‌دار شدند($p<۰/۰۰۰۱$ و $p=۰/۰۰۲$). که میانگین ضخامت آندومتر پایین‌تر و میانگین سطح تستوسترون بیشتر از گروه کنترل بود. هم‌چنین بین دو گروه مورد مطالعه هیپرسوتیسم و هایپرآندروژنیسم ارتباط معنی‌داری مشاهده شد($p=۰/۰٤٦$ و$p=۰/۰٤٦$). غلظت‌های اینترلوکین-۳، ۵ و ٦ در گروه بیمار پایین‌تر از گروه سالم بود که تنها کاهش غلظت اینترلوکین-۵ در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه سالم معنی‌دار بود($p<۰/۰۰۰۱$). ارزش تشخیصی اینترلوکین-۵ با سطح زیر منحنی(AUC) ۰/۷۱ متوسط بود.

نتیجه گیری: اختلاف معنی‌دار در غلظت فولیکولی اینترلوکین-۵ بین زنان بارور و نابارور با علت ناشناخته نشان می‌دهد که این سیتوکین ممکن است در پاتوژنز ناباروری با علت ناشناخته دخیل باشد

واژه های کلیدی: ناباروری با علت ناشناخته، اینترلوکین-۳، اینترلوکین- ۵، اینترلوکین-۶، لقاح آزمایشگاهی.

مقدمه

ناباوری با علت ناشناخته یکی از شایع‌ترین نوع تشخیص‌هاینابارووری است(۴). حدود ۳۰ درصد از زوج‌ها بعد از بررسی‌های تشخیصی به‌عنوان ناباروری با علت ناشناخته تشخیص داده می‌شوند(۱۵). اگر یک زن و شوهر پس از یک سال مقاربت منظم محافظت نشده و نرمال بودن تمام آزمون‌های اولیه ارزیابی هم‌چنان نابارور باشند، ناباروری را نامشخص تعریف می‌کنند(۱۰). ثابت‌شده است که بسیاری از عوامل ایمونولوژیک مانند سیتوکین‌ها برای فرآیندهای طبیعی تولیدمثل زنان، مانند رشد فولیکول، تخمک‌گذاری، لانه گزینی و حاملگی طبیعی ضروری هستند(۱۶، ۶). ناباروری زمانی رخ می‌دهد که سایتوکاین‌های Tکمکی نوع۱(Th1) مانند اینترلوکین‌های ۲، ۳، ۱۲ و ۱۵ با اقدامات ضد بارداری از جمله مهار ترشح گنادوتروپین کوریونی انسانی و سنتز

پروتئین جداکننده، القای آپوپتوز سلول‌های تروفوبلاست بیش‌ازحد بیان شوند در نتیجه سبب آسیب به جفت و جنین می‌شود. سایتوکاین‌های T کمکی نوع ۲(Th2) مانند اینترلوکین‌های ۴، ۵، ۶ و ۱۰ اثرات خاصی بر روی رشد و تکامل جنین دارند. هنگامی‌که سایتوکاین‌های Th1 بیش‌ازحد بیان شوند سایتوکاین‌های Th2معمولاً سرکوب می‌شوند و درنتیجه عملکرد ایمنی هومورال بدن مهار می‌شود و سطح آنتی‌بادی‌ها نیز کاهش می‌یابد(۲). باروریک وضعیت پیچیده ایمونولوزیک است. در حالی‌که مادر باید جنین را به‌عنوان یک جسم خارجی تحمل کند نیازمند به درجه‌ای از سرکوب سیستم ایمنی است و از طرف دیگر مادر باید عملکرد ایمنی کافی را برای مبارزه با عفونت‌ها حفظ کند. یکی از مکانیسم‌هایی که در حفظ حاملگی موفق عمل می‌کند تغییر مشخصه‌ای از سیتوکین‌های Th1 به سایتوکاین‌هایTh2 است و نیازمند یک تعادل مناسبی بین اثرات پیش التهابی و ضدالتهابی است؛ بنابراین تبدیل به فنوتیپ Th2 در رابطه مادر و جنینی هم ناشی از مهاجرت و هم القای سلول‌هایTh2 است اما تغییر کمی در سیستم ایمنی سیستمیک وجود دارد؛ و هرگونه تغییر در هر قسمت از این فرآیند سبب عدم باروری و یا رد جنین می‌شود(۲۱، ۲۰). در ناباروری با علت ناشناخته، ناهنجاری دارند اما با روش‌های فعلی هنوز مشخص نیستند. چرخه تخمدان شبیه یک فرآیند التهابی است و بیان سیتوکین‌های التهابی در طی مراحل خاص از چرخه قاعدگی افزایش می‌یابد(۲۳، ۲۱، ۱۶، ۲). اینترلوکین-۳ و ۵ به عنوان سایتوکاین‌های سلول‌هایTکمکی از نوع دو(Th2) طبقه‌بندی می‌شوند و در واکنش‌های التهابی و ایمنی نقش دارند(۱۲، ۱۱). اینترلوکین-۳ و ۵ در یک شرایط فیزیولوژی نرمال سبب تنظیم رشد، تمایز و فعال سازی ائوزینوفیل‌ها می‌شوند. برخی از مطالعات نشان دادند که تولید بیش از حد اینترلوکین-۵ در موش‌های ترانس ژنیک سبب تولید مقادیر بسیار بالای ائوزینوفیل‌ها در بافت‌های تولیدمثل و بافت پستان می‌شود(۱۷). از طرف دیگر اینترلوکین-۵ در اصل به‌عنوان فاکتور جایگزینی سلول‌های تی هستند که از سلول‌های تی ترشح می‌شوند تا تولید آنتی‌بادی را از سلول‌های بی فعال‌شده(Activated B cells) تحریک کنند در نتیجه سبب کاهش التهاب می‌گردد(۱۱)؛ اینترلوکین-۳ و ۵ از دو زیر واحد آلفا و بتا(α و β) تشکیل شده‌اند. زیر واحد آلفا برای هر دو سایتوکاین اختصاصی است و به لیگاند خود اتصال ضعیفی را برقرار می‌کند. در انسان اینترلوکین-۵ تنها یک نوع از زیر واحد بتا را دارد(βc) که ظرفیت اتصال به خودش را ندارد اما باگیرنده‌های اینترلوکین-۳، GM-CSF و با زیر واحدهای مربوط به خود اتصال قوی را تشکیل می‌دهد(۲۱، ۹)؛ بنابراین اینترلوکین-۳ و ۵ فعالیت‌های زیستی مشابهی را با انتقال سیگنال از طریق یک زیر واحد مشترک در گیرنده انجام می‌دهد. اینترلوکین ۶(IL-6) در ابتدا به‌عنوان یک پروتئین مشتق شده از سلول تی شناخته شد که سبب تمایز سلول‌های بی و تولید آنتی‌بادی می‌شود. اینترلوکین ۶ در سلول‌های گرانولوزای فولیکول گرافیان، در سلول‌های پوششی تخمدان و در جنین چند هسته‌ای پیش از لانه گزینی تولید می‌شود(۸). اگرچه اینترلوکین-۶ توسط سلول‌های تی کمکی نوع دو تولید می‌شود، اما این یک سیتوکین پیش التهابی است و یک واسطه کلیدی در پاسخ میزبان به التهاب و عفونت و توسط سلول‌های دیگر از جمله سلول‌های تی کمکی نوع ۱ و سلول‌های بی نیز تولید می‌شود(۱۴، ۳). سطوح اینترلوکین-۶ در جفت نسبتاً افزایش‌یافته و به‌طور معنی‌داری در آمنیون و choriodecidual زنانی که زایمان زودرس دارند در مقایسه با زنان با زایمان طولانی افزایش می‌یابد(۱). به نظر می‌رسد اینترلوکین-۶ از شاخص‌های حساس و خاص در میان زایمان زودرس

همراه با عفونت است(۲۲، ۱۹)؛ بنابراین به نظر می‌رسد که در یک حاملگی طبیعی سطوح اینترلوکین-۶ در مایع فولیکولی کاهش یابد و در حاملگی‌هایی که دچاراختلال هستند افزایش یابد.تستوسترون تنها یکی از هورمون‌های شناخته‌شده به‌عنوان آندروژن است که سطوح بالای آندروژن در زنان را هایپرآندروژنیسم می‌گویند و با هیرسوتیسم(رویش غیرطبیعی مو در صورت و بدن) و سیکل قاعدگی نامنظم در ارتباط است. بسیاری از زنان با سطح بالای آندروژن تخمک‌گذاری می‌کنند(۲۵). اگرچه مطالعات زیادی اثبات کرده‌اند که هایپرآندروژنیسم در ناباروری با علت‌های مختلف ازجمله سندروم تخمدان پلی کیستیک(PCOs) ارتباط دارد(۱۳، ۷)؛ اما هنوز در ناباروری با علت ناشناخته مطالعه‌ای صورت نگرفته است. اکنون تحقیقات بسیاری در این زمینه در حال انجام است که آیا سایتوکاین ها در پاتوژنز ناباروری با علت ناشناخته نقش دارند.هدف از این مطالعه، ارائه یک روش جدید تشخیصی در مورد ناباروری ایمونولوژیک با بررسی ارتباط سلول‌های تی کمکی موجود در مایع فولیکولی و سایتوکاین های ترشح‌شده آن‌ها با علت ناباروری افراد نابارور با علت نامشخص است. با توجه به اهمیت اینترلوکین-۳، ۵ و ۶ در سیستم ایمنی و حضور آن‌ها در مایع فولیکولی و ازآن‌جایی‌که این مطالعه برای اولین بار است سطح اینترلوکین های ۳ و۵ را در مایع فولیکولی در این ناباروری بررسی می‌کند؛ در تمامی موارد هیچ یک از مطالعات غلظت اینترلوکین ها را در سطح مایع فولیکولی بررسی نکرده اند. که تمامی یا در سطح سرمی یا مایع صفاقی بوده است. و این برای اولین بار است که این سایتوکاین ها در سطح فولیکولی بررسی می گردد. از طرف دیگر سایتوکاین های ۳ و ۵ نیز برای اولین بار است که در این نوع ناباروری برای اولین بار است که بررسی می گردد. بنابراین غلظت‌های اینترلوکین های ۳، ۵و ۶ در مایع فولیکولی این بیماران بررسی تا به نقش آن‌ها در پاتوفیزیولوژی این زنان پی برده شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب بیماران

این آزمایش در سال ۱۳۹۷در مرکز تحقیقات و پژوهش ناباروری میلاد بیمارستان امام رضا دانشگاه علوم پزشکی مشهد و تحت نظر دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شد. در این مطالعه ۶۰ خانم با ناباروری با علت ناشناخته و ۴۰ خانم سالم با علت ناباروری مردانه انتخاب شدند. میانگین سن خانم‌ها در دو گروه نابارور و بارور به ترتیب ۹/۲±۳۴/۳ و ۵/۶±۳۰/۱ سال بودند. میانگین شاخص توده بدنی(وزن به کیلوگرم/ قد به مترمربع) در گروه بیمار kg/m^2 ۴/۵±۲۴/۳ و در گروه کنترل kg/m^2 ۱/۵±۲۵/۳ بود. خانم‌هایی با ناباروری ناشناخته انتخاب شدند که حداقل یک سال مقاربت محافظت نشده و تخمک‌گذاری کافی(پروژسترون فاز میانی لوتئال بیشتر از ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) داشته باشند. در ۶ ماه گذشته لوله‌ها باز بوده و حفره دهانه رحم طبیعی به صورت هیستروسالپینگور می باشد. بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی آنالیزهای اسپرم نرمال(۲۰ میلیون اسپرم بر میلی‌لیتر، درصد حرکتی >۵۰٪ و مورفولوژی طبیعی بیش از >۴۰٪) و غلظت هورمون محرک فولیکول(FSH)در روز سوم سیکل قاعدگی کمتر از ۱۵mlU/mL بوده باشد. علاوه بر این‌همه خانم‌ها بیشتر یا مساوی ۴ فولیکول انتریال در مرحله اولیه فولیکولی داشته باشند(۸). گروه دیگر زنان سالمی بودند که مشکل ناباروری آن‌ها علت مردانه(ازواسپرمی) بوده است(n=۴۰) که با گروه اول که ازنظر سن و شاخص توده بدنی مشابه بودند، مقایسه شدند. همه افراد دارای غلظت پرولاکتین طبیعی و هورمون محرکه تیروئید(TSH) نرمال و دارای چرخه‌های قاعدگی منظم بودند. در تمامی بیماران آن‌هایی که دیابت قندی(از

طریق انجام آزمایش گلوکز ناشتا) و سندرم تخمدان پلی کیستیک(از طریق ارزیابی سونوگرافی ترانس واژینال)، داشتند از مطالعه حذف شدند. هیچ‌کدام از خانم‌ها تا ۲ ماه قبل از مطالعه هیچ‌گونه دارویی مصرف نکرده بودند. فاکتورهای حذف شامل بیماری‌های مغزی و عروقی، قلبی و عروقی یا حوادث ترومبوآمبولیک، عفونت‌های حد یا مزمن، سیگار کشیدن، فشارخون، دیابت، چاقی(شاخص توده بدنی۳۰ کیلوگرم در مترمربع یا بیشتر)، هیپرلیپیدمی ارثی شناخته‌شده؛ استفاده از داروها،بیماری‌های سیستمیک مهم، عدم رضایت خود و همسران جهت ورود به مطالعه است. تحریک تخمدان در تمام بیماران به صورت کنترل شده و روزانه برای ۷–۸ روز متوالی توسط هورمون نوترکیب محرک فولیکولی انسانی(rFSH،فولیستیم) دست خوش تغییراتی شده‌اند. و رشد فولیکول‌ها توسط التراسونوگرافی ترانس واژینال به صورت متوالی و سنجش میزانا ستراديول سرم مورد بررسی قرارگرفتند. داروهای تحریک تخمک‌گذاری همه بیماران جهت تحریک کنترل شده تخمدان پروتکل‌های هورمون آزادکننده گنادوتروپین(GnRH) دریافت کردند. هر دو آگونیست یا آنتاگونیست توسط هر پزشک انتخاب و بر اساس نتایج ذخیره تخمدان بیمار جدا شد. دوز گنادوتروپین با توجه به سن، شاخص توده بدنی، الگوی تخمدان، چرخه قاعدگی، FSHپایه، هورمون ضد مولر(AMH) و استرادیول(E2) و پاسخ به تحریکات کنترل شده قبلی تخمدان، برای هر بیمار به‌طور جداگانه محاسبه شده بود. آزمایش‌های ترتیبی جهت تشخیص پاسخ به تحریک و هم‌چنین سونوگرافی جهت مشاهده رشد فولیکول و آندومتر انجام گرفت(شکل ۱). برای اندازه‌گیری هورمون آنتی مولر سرم از روش الایزا و با استفاده از کیت Ultra-Sensitive AMH/MIS ELISA(bioactive diagnostic GmbH, Germany) انجام شده است. برای بررسی هورمون‌های استرادیول(E2)، FSH سرم از تکنیک Immunoassay و با استفاده از کیت ADVIA Centaur, ADVIA Centaur XP, and ADVIA Centaur XPT systems (SIEMENS, USA) صورت گرفته است. هنگامی که قطر بزرگ‌ترین فولیکول(ها) به‌طور میانگین به ۱۸ میلی‌متررسید عمل تخمک‌گذاری باتزریق ۱۰۰۰۰ یونیت هورمون گنادوتروپین جفتی انسان(HCG) القا گردید. معمولاً تخمک‌گذاری حدود ۳۶–۳۸ ساعت بعد از تزریق هورمون گنادوتروپین جفتی انسان، صورت می‌گیرد(۲۴، ۱۸). این اتفاق به پزشک و گروه تخصصی لقاح آزمایشگاهی(In vitro fertilization) اجازه می‌دهد که زمان مناسب جهت کشیدن یا آسپیراسیون تخمک(عمل پانکچر) را تعیین کنند.

جمع‌آوری تخمک‌ها(پانکچر یا تخمک کشی)

پس از تحریک تخمک‌گذاری زمان مناسب برای استخراج تخمک‌ها یا عمل پانکچر از طریق واژن با کمک سونوگرافی است(حدود ۳۶ تا ۳۸ ساعت پس از تزریق). اووسیت‌ها به‌صورت جداگانه(از ۴ فولیکول برای هر بیمار)جمع‌آوری و سلول‌های کومولوس و کرونا توسط انکوباسیون در ۸۰ واحدبین‌المللی(IU) هیالورونیداز حذف شدند. تحت یک بیهوشی کوتاه مدت فولیکول‌ها با هدایت یک سوزن مخصوص ازطریق سونوگرافی ترانس واژینال سوراخ می‌شوند تا تخمک‌ها همراه با مایع فولیکولی اطراف خود برداشته شوند. سپس مقدار ۱۰ سی‌سی مایع فولیکولی توسط سرنگ استریل برداشته و به لوله‌های استریل منتقل شوند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در۴°C و دور ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ و مایع رویی در داخل لوله‌های دربسته استریل تا زمان اندازه‌گیری اینترلوکین‌ها ابتدا در ۲۰– و سپس در ۸۰– درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. مایع فولیکولی از فولیکول‌های برداشته شده بدون هیچ دست‌کاری یا رقیق‌سازی توسط روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. سطح تستوسترون آزاد خون(fT) در بررسی‌های روزمره

آزمایشگاهی انجام شد. برای به اندازه‌گیری غلظت این هورمون از تکنیک Immunoassay و با استفاده از کیت ADVIA Centaur, ADVIA Centaur XP, and ADVIA Centaur XPT systems) (SIEMENS,USA صورت گرفته است. تمام مراحل نمونه برداری در مرحله اولیه فولیکولار(روز ۲-۵ چرخه قاعدگی) در صبح که بیمار از شب قبل ناشتا بوده است، انجام شد.

تکنیک الایزا

روش کمی سنجش ایمنی آنزیم اتصالی، مطابق با پروتکل کارخانه سازنده مورداستفاده قرار گرفت. کیت‌های الایزا بسیار اختصاصی و حساس هستند و با هیچ‌یک از سایتوکاین های انسانی دیگر و یا با سایتوکاین مورد بررسی دیگر واکنش متقابل نمی‌دهد.

سنجش اینترلوکین-۳ و ۵

غلظت اینترلوکین -۳ و ۵در مایع فولیکولی با استفاده از تکنیک الایزا و از کیت Human Interleukin-3 (IL-3)and Interleukin-5(IL-5) ELISA (EASTBIOPHARMCo,China, Hangzhou)استفاده شد. تکنیک الایزا به‌طوری اختصاصی برای اندازه‌گیری اینترلوکین-۳ و ۵ در مایعات بدن طراحی می‌شوند. غلظت‌ها با توجه به پروتکل کارخانه سازنده اندازه‌گیری شدند. در ابتدا نمونه‌ها و استانداردها آماده شده‌اند. سپس در چاهک‌های نمونه ۴۰ میکرو لیتراز محلول نمونه و در چاهک‌های استاندارد ۵۰ میکرو لیتر استاندارد آماده‌شده اضافه گردید. و به هر دو نوع چاهک‌ها ۱۰ میکرو لیترآنتی‌بادی مربوط به اینترلوکین-۳ و ۵ افزوده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پلیت برای ۵ بار شستشو شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر از محلول‌های کروموژن A و B به درون هر چاهک اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از اضافه کردن محلول توقف چگالی نوری(OD) هر چاهک در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر در مدت ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. محدوده سنجش برای اینترلوکین-۳ بین ۲pg/ml-۶۰۰، برای اینترلوکین-۵ و میزان حساسیت سنجش برای اینترلوکین‌های ۳ و۵ به ترتیب ۱/۵۲pg/mlو۱/۰۲ng/L بود.

سنجش اینترلوکین-۶

برای بررسی غلظت اینترلوکین-۶ در مایع فولیکولی از روش الایزا و با استفاده از کیت Human IL-6 Platinum ELISA (eBioscience, an Affymetrix Co, North America and Europe) توسط دستگاه اتوآنالایزر الایزا داینکس اندازه‌گیری شد(با حساسیت ۰/۹۲ pg/m). معرف‌ها، استانداردها و نمونه‌ها آماده شدند. نوارهای میکرو ول با محلول شستشو دو بار شسته شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از بافر استاندارد به صورت دو تایی به چاهک‌های شاهد و ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌های نمونه اضافه گردید. بعد از اضافه کردن بیوتین به همه چاهک‌ها در آن‌ها را بسته و به مدت ۲ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. در انتها پس از اضافه کردن محلول توقف چگالی نوری میکرو ول‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت‌های خوانده شده از منحنی استاندارد در ۲ ضرب شدند. رنج سنجش اینترلوکین-۶ بین۱pg/ml-۱۰۰بود.

تحلیل آماری

صفات کمی شامل قد، وزن، سن، هورمون تستوسترون و ضخامت آندومترو صفات کیفی از جمله سیکل قاعدگی، ازدواج فامیلی، هیرسوتیسم دیسم نوره، دیسپارونی، هایپر آندروژنیسم اندازه‌گیری و در نهایت اطلاعات حاصل از آزمایش توسط نرم‌افزار اکسل گروه‌بندی و سازمان‌دهی شد. اطلاعات حاصل توسط نرم‌افزار آماریSPSS نسخه۱۶(SPSS, Inc. Chicago, IL). تجزیه‌های آماری نظیر ضریب همبستگی آزمون من- ویتنی، آزمون دقیق فیشر، آزمون کای- دو انجام شد و رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار پریسم ۸ و نمودار ROC با نرم‌افزارSPSS صورت گرفت.

نتایج

در این مطالعه ۶۰ بیمار نابارور با علت ناشناخته موردبررسی قرار گرفتند که در مرکز تحقیقات و ناباروری میلاد دانشکده علوم پزشکی مشهد در طی سال ۱۳۹۸-۱۳۹۷ تحت درمان IVF بودند. گروه کنترل زنان سالمی بودند که علت ناباروری آن‌ها مردانه(آزواسپرمی) بودند. ضخامت آندومتر در بیماران با علت ناشناخته(۸/۱±۴/۱) به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل(۱/۰±۱۰/۰) بود و هم چنین سطح تستوسترون در گروه بیمار(۱۲/۲ ± ۵۰/۸ ng/dl) به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه سالم(۱۳/۷ ± ۴۱/۹) بود(به ترتیب p<۰/۰۰۰۱و p=۰/۰۰۲، جدول ۱). جدول ۲خصوصیات بالینی افراد را بررسی کرده است که در بین دو گروه هیرسوتیسم و هایپرآندروژنیسم معنی‌دار بودند(p=۰/۰۴۶و p=۰/۰۰۱). غلظت اینترلوکین-۳ نیز در بیماران با علت ناشناخته کمتر از زنان سالم بود(۸۸/۲ ± ۱۵۱/۸ نسبت به ۱۰۹/۳ ± ۱۷۳/۹ و p=۰/۲۰۴) و هم چنین میانگین غلظت اینترلوکین-۶ در گروه نابارور ۴/۴ ± ۷/۶ و در گروه سالم ۶/۵ ± ۹/۷ بود که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت(p=۰/۱۶۶). میانگین سطح فولیکولی اینترلوکین-۵ به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در گروه نابارور با علت ناشناخته کمتر از گروه کنترل بود(۱۳۱/۶ ± ۱۱۴/۴ در مقابل ۱۸۰/۷ ± ۲۲۸/۵ و p<۰/۰۰۰۱، نمودار ۱).با استفاده از منحنی راک(ROC curve) در پیش‌بینی میزان حساسیت، سطح زیر منحنی برای(AUC) برای اینترلوکین-۵ برابر با ۰/۷۱ بود که این سطح ازنظر آماری دارای ارزش تشخیصی متوسط است. هم چنین مقدار حساسیت این متغیر برای تشخیص ناباروری با علت ناشناخته ۶۵٪، ویژگی ۸۵٪ محاسبه‌شده است (شکل ۲).

شکل ۱- نمونه‌ای ازفولیکول‌ها که برخی از آن‌ها بیشتر رشد کرده‌اند.

جدول۱- مقایسه ضخامت آندومتر و سطح تستوسترون بین بیماران با ناباروری با علت نامشخص و گروه کنترل

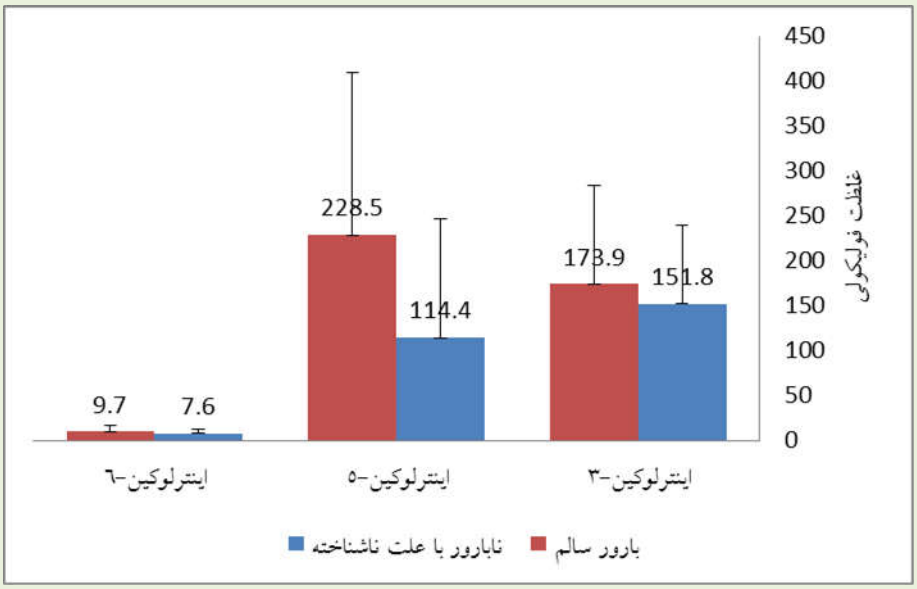
متغیر†	ناباروری با علت نامشخص (n=۶۰)	کنترل(n=۴۰)	P-value‡
ضخامت آندومتر (میلی‌متر)	۸/۴ ± ۱/۱	۱۰/۰ ± ۱/۰	<۰/۰۰۰۱**
	۸/۵(۷ – ۱۱)	۹/۷(۸/۵ – ۱۱/۸)	
تستوسترون (nd/dl)	۵۰/۸ ± ۱۲/۲	۴۱/۹ ± ۱۳/۷	۰/۰۰۲**
	۴۶/۰(۳۷/۰ – ۷۸/۰)	۴۲/۰(۱۵/۰ – ۷۱/۰)	

†داده‌هابه‌صورت انحراف معیار± میانگین ، (محدوده تغییرات) میانه گزارش‌شده‌اند. ‡بر اساس آزمونمن- ویتنی **معنی‌داریدرسطح ۱ درصد.

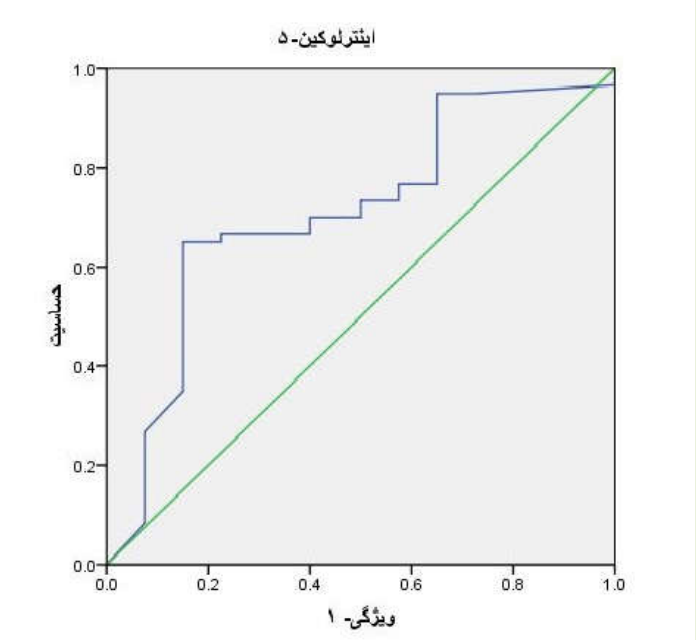
جدول۲- مقایسه ارتباط خصوصیات بالینی افراد در دو گروه بیماران با ناباروری با علت نامشخص و گروه سالم

متغیر†		ناباروری با علت نامشخص(n=۶۰)	کنترل(n=۴۰)	p-value
سیکل قاعدگی	منظم	۵۵ (۹۱٪/۷)	۴۰ (۱۰۰٪)	۰/۰۸۱‡
	نامنظم	۵ (۸٪/۳)	۰	
ازدواج فامیلی	خیر	۵۰(۸۳٪/۳)	۳۸(۹۵٪)	۰/۱۱۷‡
	بلی	۱۰(۱۶٪/۷)	۲(۵٪)	
هیرسوتیسم	منفی	۵۰ (۸۳٪/۳)	۳۹ (۹۷٪/۵)	۰/۰۴۶‡**
	مثبت	۱۰ (۱۶٪/۷)	۱ (۲٪/۵)	
دیسپارونی	منفی	۵۵ (۹۱٪/۷)	۴۰ (۱۰۰٪)	۰/۰۸۱‡
	مثبت	۵ (۸٪/۳)	۰	
دیس منوره	منفی	۴۹ (۸۱٪/۷)	۳۵ (۸۷٪/۵)	۰/۵۸§
	مثبت	۱۱ (۱۸٪/۳)	۵ (۱۲٪/۵)	
هایپرآندروژنیسم	منفی	۵۰(۸۳٪/۳)	۳۹(۹۷٪/۵)	۰/۰۴۶*‡
	مثبت	۱۰(۱۶٪/۷)	۱(۲٪/۵)	

†داده‌ها به‌صورت (درصد) فراوانی گزارش‌شده‌اند.§بر اساس آزمون کای دو. ‡بر اساس آزمون دقیق فیشر.*معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد و ** معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ درصد.



نمودار ۱- مقایسه سطح فولیکولی اینترلوکین-۳، ۵ و ۶ در دو گروه
(p< ۰/۰۰۱برای اینترلوکین-۵ در گروه زنان نابارور نسبت به گروه زنان بارور)



شکل ۲- منحنی راک نشان‌دهنده میزان حساسیت اینترلوکین-۵

بحث ونتیجه گیری

در این مطالعه غلظت‌های اینترلوکین-۳، ۵ و ۶ را در مایع فولیکولی بیماران نابارور با علت نامشخص رابا افراد سالم مقایسه شدند. نتایج نشان داد که غلظت اینترلوکین-۵ به‌طور چشم‌گیری در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل کاهش‌یافته بود. از طرفی غلظت‌های اینترلوکین-۳ و ۶ در مایع فولیکولی دو گروه تغییر کرده است اما ازنظر آماری تفاوتی مشاهده نشد. مطالعات زیادی نشان دادند که اینترلوکین ها در ناباروری با علت ناشناخته تأثیر دارند. اما تا به حال هیچ گزارشی در مورد نقش اینترلوکین-۳ و ۵ در ناباروری با علت ناشناخته صورت نگرفته است. اینترلوکین-۵ تولیدآنتی‌بادی را از سلول‌های بی فعال شده تحریک می‌کند و التهاب‌های مزمن را کاهش می‌دهد(۱۱)؛ بنابراین باید مقدار این سایتوکاین در یک بارداری طبیعی افزایش یابد. اما در این مقاله نیز نشان داده‌شده است که سطح مایع فولیکولی اینترلوکین-۵ در گروه بیماران به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه افراد سالم کاهش‌یافته است؛ که به خوبی مطلب فوق را اثبات می‌کند. با توجه به این که اینترلوکین-۳ و ۵ دارای زیر واحد مشترک بتا سی(βc) هستند بنابر این احتمالاً با انتقال یک سیگنال نا به جا از طریق این زیر واحد مشترک می‌تواند منجر به ایجاد شرایط التهابی مانند ناباروری با علت ناشناخته گردد(۵). اگر چه در این مقاله رابطه معنی‌داری بین کاهش غلظت اینترلوکین-۳ در دو گروه پیدا نشده است اما با توجه به توضیحات داده شده نمی‌توان نقش احتمالی این پروتئین ضدالتهابی در ناباروری این افراد نادیده گرفت اوکپالاجی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ سطح سرمی سایتوکاین‌هایی از قبیل فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و گاما(TNF-αو TNF-γ) اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۰ را در بیماران نابارور با علت ناشناخته اندازه‌گیری کردند. آن‌ها نشان دادند که هیچ تفاوت معنی‌داری بین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین-۶ واینترلوکین-۱۰ بیند و گروه وجود ندارد اما فاکتور نکروز دهنده تومور گاما می‌تواند در ناباروری این افراد نقش داشته باشد(۶). لی‌فنگ آن و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ در مقاله بیان کردند که تشخیص و اندازه‌گیری سلول‌هایT کمکی فولیکولی (Tfh)، اینترلوکین ۲۱، اینترلوکین-۱۲ و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا ممکن است شاخص‌های تشخیصی جدیدی را برای غربالگری ناباروری ایمنی فراهم

کند(۲). اینترلوکین-۶ یکی از سایتوکاین های مطرح است که اثرات بیولوژیکی متنوعی را در پاسخ‌های التهابی و ایمنی ایفائ می‌کند(۸). نتایج ضد و نقیضی در ارتباط بین سطح اینترلوکین-۶ و ناباروری با علت ناشناخته وجود دارد. در مقاله‌ای که توسط بالنت دیمر و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شده بودن شان دادند که در سطح سرمی اینترلوکین-۶ بین زنان بارور و نابارور با علت ناشناخته تفاوت معنی‌داری وجود دارد و غلظت اینترلوکین-۶ در بیماران با ناباروری با علت ناشناخته نسبت به گروه کنترل بالاتر بوده است که نشان می‌دهد این سایتوکاین ممکن است در پاتوفیزیولوژی ناباروری باعلت ناشناخته نقش داشته باشد(۸). که با نتایج حاصل از این مقاله مغایرت دارد. نیز دراین مقاله مشخص شدکه ناباروری با علت ناشناخته با ضخامت آندومتر تفاوت معنی‌داری دارد به‌گونه‌ای که ضخامت آندومتر در افراد نابارور نسبت به افراد سالم کاهش‌یافته است. در مقاله‌ای که توسط دکتر احمد شاهین در سال ۲۰۰۸ انجام شده نیز همین نتیجه را اظهار کردند. آنان در مقاله خود نشان دادند که ضخامت آندومتر به‌طور معنی‌دار در بیماران نابارور با علت ناشناخته نسبت به افراد بارور کاهش یافته بود. بیان کردند که ضخامت آندومتر در این بیماران بیشتر به سمت نازک بودن تمایل دارند و به همین دلیل است که شکست در لانه گزینی در سطح بالایی از انتقال جنین اتفاق می‌افتد(۱۸). در مطالعه حاضر سطح تستوسترون در گروه بیمار نسبت به گروه سالم به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است. در زنان سطح بالای تستوسترون می‌تواند مشکل بالقوه‌ای را در باروری ایجاد کند از آن‌جا که هیچ گونه مطالعه‌ای در ارتباط با نقش تستوسترون و ناباروری با علت ناشناخته تاکنون وجود ندارد از آن‌جا که هیرسوتیسم و هایپرآندروژنیسم با هورمون تستوسترون در ارتباط این دو فاکتور نیز بین دو گروه معنی‌دار است. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که تغییر پاسخ ایمنی در افراد نابارور با علت ناشناخته می‌تواند مربوط به کاهش غلظت‌های اینترلوکین های ۳، ۵ و ۶ به‌عنوان سیتوکین های تی کمکی نوع ۲ باشد. بنابراین با توجه به این‌که غلظت فولیکولی اینترلوکین-۵ دارای ارزش خوبی در تشخیص ناباروری با علت ناشناخته دارد؛ کاهش قابل‌ملاحظه میزان اینترلوکین-۵ در مایع فولیکولی افراد نابارور با علت ناشناخته در مقایسه با گروه کنترل می‌تواند حاکی از درگیری این سایتوکاین در پاتوژنز این بیماری باشد. با توجه به این که اطلاعات کمی در مورد نقش اینترلوکین-۳ و اینترلوکین-۵ در تولیدمثل و بارداری وجود دارد و هم چنین هیچ مطالعه مولکولی برای اندازه‌گیری غلظت این سایتوکاین ها در نمونه مایع فولیکولی بیماران نابارور با علت ناشناخته انجام نشده است؛ ضروری است که مطالعه‌های بیشتری با تعداد نمونه بیشتربا استفاده از فن‌های مولکولی انجام داده شود تا ارتباط بین عوامل پیش التهابی و ضد التهابی در پاتوژنز ناباروری با علت ناشناخته روشن شود و هم چنین یک ابزار تشخیصی جدید در بیماران نابارور که تحت عمل ART قرار دارند، فراهم شود.

منابع

1.Altun, T. (2011). Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. J Assist Reprod Genet, 28(3); 245-51.

2.An, L. F. (2015). Unexplained infertility patients have increased serum IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-21, TNFalpha, IFNgamma and increased Tfh/CD4 T cell ratio: increased Tfh and IL-21 strongly correlate with presence of autoantibodies. Immunol Invest, 44(2); 164-73.

3.Azad, M. (2017). T helper cell subsets and related cytokines in infertile women undergoing in vitro fertilization before and after seminal plasma exposure. Clin Exp Reprod Med, 44(4); 214-223.

4.Brandes, M. (2011). Unexplained infertility: overall ongoing pregnancy rate and mode of conception. Hum Reprod, 26(2); 360-8.
5.Broughton, S. E. (2015). The betac receptor family - Structural insights and their functional implications. Cytokine, 74(2); 247-58.
6.CbOkpalaji, B. (2016). Serum cytokine concentrations in infertile and fertile women. a preliminary study in port harcourt, nigeria. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 15(09); 77-79.
7.Chan, K. J. (2018). Exogenous testosterone does not induce or exacerbate the metabolic features associated with pcos among transgender men. Endocr Pract, 24(6); 565-572.
8.Demir, B. (2009). Serum IL-6 level may have role in the pathophysiology of unexplained infertility. Am J Reprod Immunol, 62(4); 261-7.
9.Gillessen, S. (2001). Overlapping roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 in eosinophil homeostasis and contact hypersensitivity. Blood, 97(4); 922-8.
10. Harry Hatasaka, MD. (2011). New perspectives for unexplained infertility. Clinical Obstetrics And Gynecology, 54(4); 727–733.
11. Kouro, T., Takatsu, K. (2009). IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. Int Immunol, 21(12); 1303-9.
12. Kritas, SK., Saggini, A., Cerulli, G., Caraffa, A., Antinolfi, P., Pantalone, A. (2014). Interrelationship between IL-3 and mast cells. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 28(1); 17-21.
13. Lerchbaum, E. (2014). Hyperan drogenemia in polycystic ovary syndrome: exploration of the role of free testosterone and androstenedione in metabolic phenotype. PLoS One, 9(10); e108263.
14. Mutar, M. B. (2011). Role of some cytokines on reproduction. Middle East Fertility Society Journal, 16(3); 220-223.
15. Ray, A. (2012). Unexplained infertility: an update and review of practice. Reprod Biomed Online, 24(6); 591-602.
16. Sarapik, A. (2012). Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. Clin Dev Immunol, 2012; 606459.
17. Sferruzzi-Perri, A., Robertson, N., S. A., L. A. (2003). Dent, interleukin-5 transgene expression and eosinophilia are associated with retarded mammary gland development in mice. Biol Reprod, 69(1); 224-33.
18. Shahin, A. Y. (2008). Endometrial sonographic characters predicting pregnancy following recurrent clomiphene induction in unexplained infertility. Reproductive BioMedicine, 17(6); 795-802.
19. Sorokin, Y. (2010). Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth <32 weeks and adverse neonatal outcomes. Am J Perinatol, 27(8); 631-40.
20. Sykes, L. (2012). Changes in the Th1:Th2 cytokine bias in pregnancy and the effects of the anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. Mediators Inflamm, 2012; 416739.
21. Sykes, L. (2012). The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. Mediators Inflamm, 2012; 967629.
22. Vieira, A., Garra, O', P. (2007). TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. Nature Publishing Group, 7; 587-601.
23. Whitcomb, B. W. (2014). Urinary cytokine and chemokine profiles across the menstrual cycle in healthy reproductive-aged women. Fertil Steril, 101(5); 1383-91.
24. Younis, A. (2014). Serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, monocyte chemotactic protein-1 and paraoxonase-1 profiles in women with endometriosis, PCOS, or unexplained infertility. J Assist Reprod Genet, 31(11); 1445-51.
25. Zarko, S., Zvonimir, P. (2004). Effect increased testosterone level on women's fertility. Diabetologia Croatica, (3); 33-38.

Assessment Interleukins 3, 5 and 6 Concentration in Follicular Fluid and Their Diagnostic Value in Patients with Unexplained Infertility

M. Ghodsi[1], **V. Hojati[2]**, A. Attaranzadeh[3], B. Saifi[4]

1.Ph.D. Student of Biology, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2.Assistant Professor, PhD in Developmental Biology, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.**vida.hojati@gmail.com**
3. Fellowship of molecular pathology and cytogenetic, Imam Reza Hospital, Mashhad University of medical science, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Anatomy, Mashhad Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received:2019.17.10 **Accepted: 2019.22.12**

Abstract

Inroduction & Objective: Our aim a cross-sectional study was to compare the follicular fluid level of interleukins 3, 5, and 6 and clinical factors in patients with unexplained infertility with healthy subjects in the outcome of In vitro fertilization (IVF).

Material and Methods: Initiation of ovulation stimulating with ovulation stimulating drugs in different protocols started in 60 infertile patients with unexplained infertility and 40 fertile women. Subjects underwent antagonist and agonist protocol for ovarian stimulation.Then their follicular fluid was separated and the follicular concentration of interleukins 3, 5 and 6 determined by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The diagnostic value of these 3 interleukins was also evaluated using the Roc curve.

Results: Among the clinical factors, the endometrial thickness and testosterone levels significantly between the two groups (P <0.0001and P = 0.002), that the mean endometrial thickness was lower and the mean testosterone level was higher than the control group. So, hirsutism and hyperandrogenism significantly correlated between the patient and control groups (P = 0.046 and P = 0.046). Interleukin-3, 5, and 6 concentrations decreased in the patient, that the only reduction in IL-5 concentration significantly in the case group compared to the healthy group (P <0.0001). The diagnostic accuracy of IL-5 in the FF wasmoderate with the area under the curve (AUC) of 0.71.

Conclusion: There is a significant difference in the follicular fluid interleukin-5 concentration between infertile and fertile women. This cytokine may be involved in the pathophysiology of unexplained infertility.

Keywords: Unexplained Infertility, Interleukin (IL)-3, IL-5, IL-6, IVF.