اثرات IL-6 بر استروئیدوژنز سلولهای گرانولوزا انسان در محیط *In vitro*

محمد نوری (Ph.D.)[۱]، معرفت غفاری (M.D-Ph.D.)[۲]، علی سلماسی(Ph.D.)،[۳] لعیا فرزدی(M.D.)[۴]، عالیه قاسم زاده (M.D.)[۴]، Sh.Lu (M.D.)[۳]، L. Mettler (M.D.)[۵]

۱- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار گروه غدد تولید مثل، پژوهشکده ابن سینا، تهران،ایران

۳- استادیار بخش درمان ناباروری دانشگاه کیل، کیل، آلمان

۴- استادیار گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران

۵- استاد گروه زنان و زایمان ، دانشگاه کیل، کیل، آلمان

چکیده

مطالعات اخیر نشان می دهد که علاوه بر گنادوتروپین ها ، فاکتورهای ایمنولوژیک مانند سیتوکاین ها، نقش مهمی در تنظیم ترشح هورمونهای استروئیدی بر عهده دارند. هدف از مطالعه اخیر بررسی اثر اینترلوکین-٦ (IL-6) بر ترشح پایه و تحریکی استرادیول و پروژسترون توسط سلولهای گرانولوزای (GC) انسان در حضور آندرستندیون می باشد. سلولهای GC مورد مطالعه به دنبال تحریک تخمک گذاری با پروتکل استاندارد hMG در زمان آسپیراسیون فولیکولی از بیماران تحت درمان IVF-ET بدست آمد. سلولها (۲×۱۰^{٤} سلول زنده در هر چاهک پلیت کشت ۲٤ حفره ای) در محیط کشت HAM's F10 فاقد هر گونه ماده افزودنی (کنترل) و یا محیط حاوی غلظت های فزاینده (pg/ml ۸، ۱٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸) recombinant human (rh) IL-6 (در حضور یا عدم حضور FSH (۹٦ IU/ml) کشت داده شدند. محیط کشت با فواصل ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت بعد از کشت جمع آوری شده و سطح استرادیول و پروژسترون بوسیله روش ایمنواسی آنزیمی (EIA) به صورت اتوماتیک اندازه گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که GC لوتئینیزه شده در حضور آندرستندیون و بدون حضور FSH در محیط کشت قادر به تولید هر دو هورمون استرادیول و پروژسترون می باشد. این تولید بطور معنی داری در حضور FSH افزایش می یابد. ترشح پایه و تحریکی استرادیول در حضور FSH با افزایش مقدار IL-6 (وابسته به دوز) بطور معنی داری ($p<۰/۰۵$) مهار شد. اگر چه این اثرات مهاری بر روی ترشح پایه ای پروژسترون تاثیر معنی داری نداشت، ولی با مکانیسم وابسته به دوز، بطور معنی داری ($p<۰/۰۵$) سبب مهار ترشح تحریکی پروژسترون توسط FSH در GC گردید. نتایج این مطالعه اشاره بر آن دارد که IL-6 می تواند نقش مهمی در استروئیدوژنز بازی نموده و هر گونه اختلال غلظتی IL-6 در تخمدان ممکن است سبب اختلال در ترشح استرادیول و پروژسترون گردد.

گل واژگان: استروئیدوژنز، سلولهای گرانولوزا انسان، اینترلوکین ٦، سیتوکاین.

آدرس مکاتبه: بخش درمان ناباروری بیمارستان الزاهراء، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران.

پست الکترونیک: Nourim@tbzmed.ac.ir.

www.SID.ir

مقدمه

تولید هورمون های استروئیدی در تخمدان بوسیله تئوری دو سلولی یا دو جایگاهی (Two Compartment) بطور صحیحی واکنش بین سلولهای بینابینی، تکا و سلولهای گرانولوزا(GC)[1] از یک طرف و گنادوتروپین ها و استروئیدها را توضیح داده است (۱). سلولهای تکا داخلی توسط LH [2] تحریک و آندروژن های مورد اثر آنزیم آروماتاز را تولید نموده که سپس این آندروژنها به سلولهای گرانولوزا منتقل می شود (٤-۲) درGC آنزیم آروماتاز آنها را تبدیل به استروژن می کند. این آنزیم بوسیله FSH [3] تحریک می شود (٥-٤).

تئوری دو سلولی یا دو جایگاهی ناکامل بوده زیرا فاکتورهای اتوکراین و پاراکراین متعددی را که اخیراً کشف شده نادیده گرفته است. این تئوری بوسیله افزودن تنظیم کننده های متعدد جدید کامل می شود. بخش سوم که هنوز در حال بررسی است شامل فاکتورهای ایمنولوژیک می باشد که رابطه عملکردی بین فرایندهای اندوکرینی و سیستم ایمنی را بیان می کند. مطالعات متعددی نشان داده است که سیتوکاین های متعددی تنظیم ترشح استروئیدها توسط گنادها را کنترل می کنند. IL-6 [4](یک کلیکوپروتئین kDa [5] ۳۰-۲۳) یکی از این مواد می باشد که در وحله اول بعنوان سیتوکاین مترشحه از لنفوسیتهای T، شناخته شده است. این سیتوکاین بطور اختصاصی موجب فعالیت لنفوسیتهای T، تمایز سلولهای B و تولیدآنتی بادی می شود.IL-6 توسط انواع مختلف سلولها از جمله فیبروبلاست ها، ماست سلها، سلولهای آندوتلیال، منوسیت ها، ماکروفاژها، سلولهای هیپوفیز قدامی و کراتینوسیت ها تولید می شود (۷-٦). تولید IL-6 در محیط آزمایشگاه توسط IL-1[6]، TNF-α [7] ، دی اسیل گلیسرول و یونوفور کلسیم تحریک می شود (۹،۸). Watson در سال ۱۹۹۰ (۱۰) شواهد ترشح IL-6 بوسیله تخمدان را نشان داد که تولید پایه ای IL-6 در کشت تومورهای اولیه تخمدانی و رده سلولی سرطان تخمدان رخ می دهد. علاوه بر این سلولهای گرانولوزای بسیاری از گونه ها محل فعال تولید IL-6 می باشد. تولید IL-6 در سلولهای گرانولوزای موش صحرائی، گاو، خرگوش و انسان طی مطالعات مختلف نشان داده شده است (١٤-١١). تولید IL-6 در سلولهای گرانولوزا بوسیله FSH و IL-1 و لیپوپلی ساکارید (LPS) تحریک می شود (۱۱). Keck وهمکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که سلولهای گرانولوزای انسان علاوه بر تولید IL-6، دارای گیرنده IL-6 نیز می باشند (١٤). بنابراین IL-6 می تواند از طریق مکانیسم اتوکراین بر فعالیت سلولهای گرانولوزا و بطور اختصاصی استروئیدوژنز این سلولها تأثیر گذارد. هر چند دخالت IL-6 در تنظیم تولید استروئیدهای گرانولوزا در حیوانات اثبات شده است، ولی اطلاعات محدودی در رابطه با اثرات IL-6 بر روی سلولهای گرانولوزای انسان در دسترس می باشد. بنابراین هدف از این مطالعه در ابتدا بررسی استروئیدوژنز توسط سلولهای گرانولوزای انسان قبل و بعد از تحریک توسط FSH در محیط کشت بوده و سپس نقش بالقوه IL-6 بر استروئیدژونز پایه و تحریکی توسط FSH در سلولهای گرانولوزای انسان در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

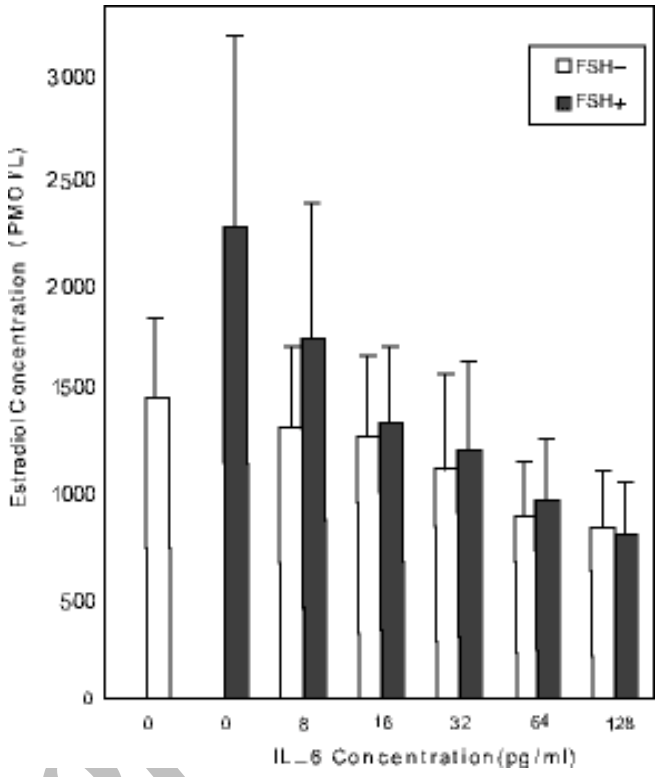
مواد و روشها

جمع آوری سلول : GC از بیماران نابارور تحت درمان با IVF-ET بدست آمد. آزمایشات حداقل چهار نوبت با استفاده از سلولهای جمع آوری شده از بیماران مختلف

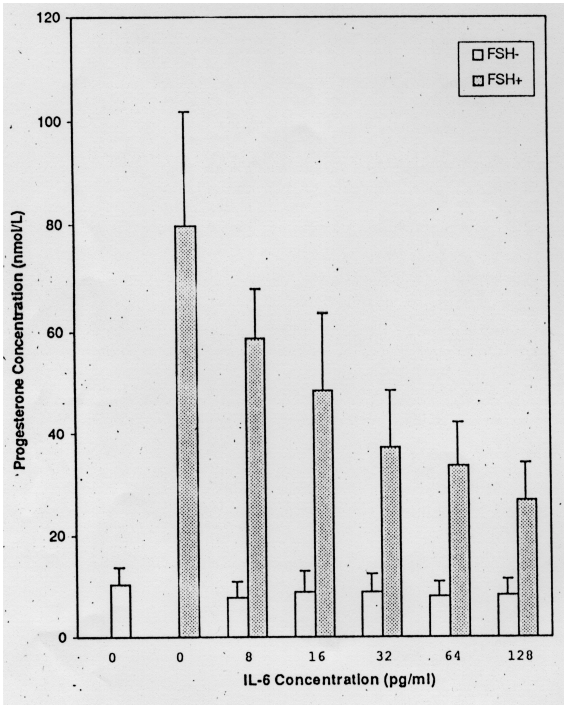
1- Granulosa Cells
2- Luteinizing Hormone
3- Follicle – Stimulating Hormone
4- Interleukin-6
5- Kilo Dalton

6- Interleukin-1
7- Tumour Necrosis Factor-α

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱- اثر مهاری IL-6 بر ترشح پایه ای و تحریکی (با FSH : ۹۶ IU/ml) استرادیول توسط GC بعد از ۷۲ ساعت کشت.



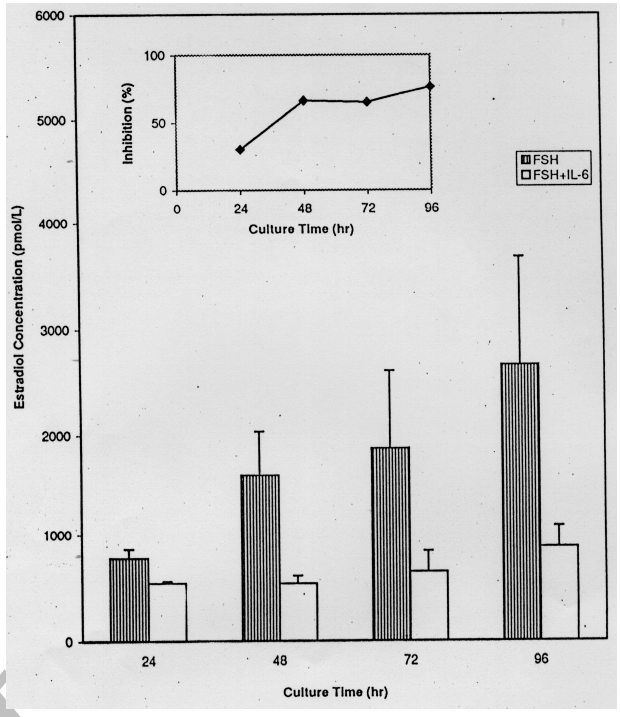
نمودار ۲- اثر مهاری IL-6 بر ترشح پایه ای و تحریکی (با FSH : ۹۶ IU/ml) پروژسترون توسط GC بعد از ۷۲ ساعت کشت.

تکرار شد. تحریک تخمک گذاری در بیماران تحت درمان با IVF-ET توسط تجویز hMG[1] (Menogon,Ferring,Germany) از روز ٤،٣ یا ٥ سیکل قاعدگی انجام شد. کنترل روزانه بیمار از روز ششم به بعد بوسیله سونوگرافی و اندازه گیری سطح استرادیول سرم تا روز ١٦-١٤ سیکل انجام شد. در صورت رسیدن قطر فولیکول غالب به بیش از ١٨ میلی متر و افزایش کافی سطح ١٧ بتا استرادیول (ولی کمتر از ٣٠٠٠ pg/ml)، مقدار ١٠٠٠٠ IU hCG (Choragon, Ferring, Germany) بصورت داخل عضلانی تزریق شد. فولیکول ها ٣٦ ساعت پس از تجویز hCG آسپیره شده و پس از برداشت اووسیت برای انجام IVF، GC از مایع فولیکولی جدا و جمع آوری شد.

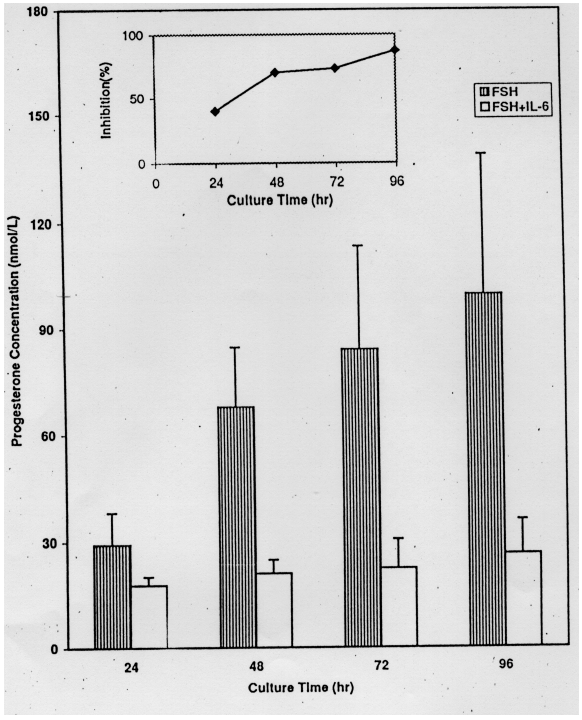
مایع فولیکولی در ٣٥٠ g به مدت ٥ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی برداشته شد. سلولهای حاصل از فولیکولهای آسپیره شده از بیمار (٣ تا ١٨ اووسیت) جمع آوری و مجدداً در ١٠-٥ میلی لیتر محیط Ham's F-10 (Sigma, USA) معلق شدند. به محیط کشت گلوتامین به میزان ٢ mM (Sigma, USA)، آندرستندیون به میزان ٤٠ ng/ml، پنی سیلین به میزان ١٠٠ IU/ml (Sigma, USA) و استرپتومایسین به میزان ١٠٠mg/ml (Sigma, USA) افزوده شد. سپس سلولها بر روی ٥ میلی لیتر از هر یک از گرادیان های پرکول (Sigma, USA) ٦٤٪ و ٣٦٪ تهیه شده بوسیله محلول D-Hank's Balanced Salt (D-HBSS) افزوده شد و با دور ٤٥٠ g بمدت ١٥ دقیقه در درجه حرارت اطاق سانتریفوژ شد. سلولها از سطح بین دو گرادیان پرکول آسپیره شده و بعد از جمع آوری، دوبار با D-HBSS

1- Human Chorionic Gonadotropin

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۳- بررسی سینتیک اثر مهاری IL-6 بر ترشح تحریکی (با FSH) استرادیول توسط in vitro GC (IL-6 ۱۲۸ pg/ml و FSH ۹۶ IU/ml) مهار در ٪ آمده است



نمودار ۴- بررسی سینتیک اثر مهاری IL-6 بر ترشح تحریکی (با FSH) پروژسترون توسط in vitro GC (IL-6 ۱۲۸ pg/ml و FSH ۹۶ IU/ml) مهار در ٪ آمده است

شستشو شدند. سپس با قرار دادن سلولها در کلاژناز ۰/۱٪ (Sigma, USA) بمدت ۳۰ دقیقه جدا شده و دوباره با D-HBSS شستشو داده شدند.

سلولها در ۳ میلی لیتر D-HBSS معلق و ۵۰ میکرولیتر دانه های مغناطیسی که با آنتی بادی اختصاصی علیه مولکول CD45 کنژوگه شده بودند (Dynabeads M450; DYNAL ING, Sigma) به آنها افزوده تا سلولهای حاوی +CD45 (مانند لنفوسیت ها) از سلولهای معلق GC جدا شوند. سپس سلولهای معلق (GC) جمع آوری شده، سه مرتبه با محیط HAM's-F10 بدون سرم شستشو داده شد. ارزیابی حیات و شمارش سلولی بوسیله رنگ حیاتی تریپان بلو انجام شد. در کشت سلولی ۶۰ تا ۷۰٪ سلولهای گرانولوزا زنده بوده و غلظت سلولی در حد ۴×۱۰^{۴} سلول در هر میلی لیتر محیط تنظیم شد.

کشت GC: سوسپانسیون GC (۲×۱۰^{۴} سلول زنده) در محیط کشت HAM's-F10 عاری از سرم در ظروف کشت ۲۴ حفره ای ریخته شد. در یک سری آزمایشات، سلولها با محیط HAM's-F10 عاری از سرم (کنترل) یا محیط حاوی غلظت های فزاینده IL-6(hr)[1] (Sigma, USA) در حضور یا عدم حضور FSH (Serono,Germany ۹۶ IU/ml) مجاور شد. غلظت نهایی rhIL-6 pg/ml ۱۲۸،۶۴،۳۲،۱۶،۸ در محیط بود. سلولها در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور مرطوب حاوی ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO_2 قرار داده شد. محلول رویی کشت سلولی در فواصل ۲۴، ۴۸، ۷۲و ۹۶ ساعت بعد از کشت برای اندازه گیری پروژسترون و استرادیول جمع آوری شد.

1- Human Recombinant

Archive of
www.SID.ir

سنجش استرادیول و پروژسترون: سطوح استرادیول و پروژسترون بوسیله ایمنواسی آنزیمی (EIA) با Autosystem SR1 (Serono) اندازه گیری شد.

نتایج

بررسی استروئیدوژنز پایه و تحریکی در GC: به منظور بررسی استروئیدوژنز پایه و تحریک شده در GC در حضور FSH (۹٦ IU/ml) و یا عدم حضور FSH در شش نمونه مختلف کشت داده شد. نتایج نشان داد که GC لوتئینیزه شده در عدم حضور FSH قادر به تولید هر دو هورمون استرادیول و پروژسترون می باشد ولی تولید پروژسترون نسبت به استروژن به مراتب بیشتر می باشد. برای مثال بعد از ۷۲ ساعت کشت، میزان تولید پروژسترون ۱۰±۳ nmol/l (Mean±SD) و استرادیول ۱٤۰۰±٤۰۰ pmol/l (Mean±SD) بود. تولید استرادیول و پروژسترون توسط GC با حضور FSH افزایش یافته، بطوریکه بعد از ۷۲ ساعت کشت میزان تولید پروژسترون به ۸۰±۲۰ nmol/L و استرادیول به pmol/L ۱۱۰۰±۲۳۰۰ رسید. همچنین افزایش تولید استرادیول و پروژسترون با افزایش زمان کشت نسبت مستقیم دارد. بطوریکه میزان تولید پروژسترون توسط GC پس از ۲٤ ساعت کشت در حضور FSH از ۳۰±۱٤ nmol/L به ۹۸±٤/۲ nmol/L بعد از ۹٦ ساعت کشت رسید. همچنین میزان تولید استرادیول مترشحه از GC در حضور FSH از ۱۰۰±۸۵۰ pmol/L پس از ۲٤ ساعت کشت به ۱۰۰۰±۲۸۰۰ pmol/L پس از ۹٦ ساعت کشت افزایش یافت.

اثرات IL-6 بر استروئیدوژنز پایه و تحریکی در GC

به منظور بررسی اثرات مستقیم IL-6 بر استروئیدوژنز در GC، این سلولها با غلظت های افزاینده rh IL-6 (۱۲۸ pg/ml-۸) در حضور یا عدم حضور FSH (۹٦ IU/m1) در شش نمونه مختلف کشت داده شد. همانطور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می شود ترشح پایه و تحریکی استرادیول توسط GC بطور معنی داری ($p<۰/۰۵$) با افزایش مقدار IL-6 (وابسته به دوز) مهار می شود. اگر چه این اثرات مهاری بر روی ترشح پایه پروژسترون توسط GC تاثیر معنی داری ندارد ولی با مکانیسم وابسته به دوز بطور معنی داری ($p<۰/۰۵$) سبب مهار ترشح تحریکی پروژسترون توسط GC میشود (نمودار شماره ۲). اثرات مهاری غلظت های مختلف IL-6 بر ترشح پروژسترون و استرادیول در حضور یا عدم حضور FSH در جدول شماره یک نشان داده شده است افزایش غلظت IL-6 بیش از pg/ml ۱۲۸ اثر ناچیز یا هیچگونه اثری بر کاهش ترشح استرادیول و پروژسترون ندارد که بیان کننده اشباع گیرنده IL-6 در سلولهای گرانولوزا در این غلظت می باشد.

مطالعات سینتیک[1] اثر IL-6 بر ترشح هورمون های تحریکی FSH، کاهش معنی دار ($p<۰/۰۵$) فعالیت IL-6 بر ترشح پروژسترون و استرادیول بعد از ۲٤ ساعت کشت را نشان داد. مطالعات نقطه ای زمانی[2] ۳۰٪، ٦۵٪، ٦٦٪ و ۷۳٪ مهار ترشح استرادیول و ٤۰٪، ٦۸٪، ۷۳٪ و ۷٦٪ مهار ترشح پروژسترون را بترتیب در ۷۲،٤۸،۲٤ و ۹٦ ساعت بعد از افزودن IL-6 را نشان داد (نمودارهای۳ و٤).

بحث

در این مطالعه قدرت بیولوژیکی FSH در محیط کشت بر اساس توانایی آن در تحریک ترشح استرادیول و پروژسترون توسط سلولهای گرانوزای لوتئینیزه انسانی ارزیابی شد. سلولهای فوق از مایع فولیکولی افراد کاندید درمان IVF بدست آمده بود. پس از سانتریفوژ با پرکول و هضم ماتریس خارج سلولی توسط آنزیم کلاژناز، سلولهای لوتئینیزه گرانولوزا از

1- Time Course Studies
2- Time Points Studies

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- اثر مهاری IL-6 بر ترشح استرادیول و پروژسترون در حضور و عدم حضور FSH

غلظت IL-6 (Pg/ml)	اثر مهاری بر روی استرادیول (٪)		اثر مهاری بر روی پروژسترون (٪)	
	FSH (IU/ml ۹۶)	بدون حضور FSH	FSH (IU/ml ۹۶)	بدون حضور FSH
۸	۲۳/۷	۱۰/۸	۲۶	۱۵/۳
۱۶	۴۲/۲	۱۴/۸	۳۹/۵	۱۳/۸
۳۲	۴۹/۱	۲۴/۵	۵۳	۱۳/۶
۶۴	۵۸/۶	۳۹/۱	۵۷/۵	۱۱/۶
۱۲۸	۶۵/۱	۴۲/۹	۶۵	۱۵/۵
ارزش P	p<۰/۰۵	p<۰/۰۵	p<۰/۰۵	p>۰/۰۵

سلولهای خونی جدا گردید. برای جداسازی و جلوگیری از آلودگی سلولهای گرانولوزا با لکوسیت ها در طول کشت سلولی از ذرات مغناطیسی حاوی آنتی بادی اختصاصی برای این سلولها استفاده شد هیچ اثر تخریبی توسط پرکول بر روی فعالیت GC دیده نشد. روشهای مشابه ای مانند، استفاده از سانتریفوژ و آنزیم تریپسین (۱۵) و یا سانتریفوژ و آنزیم هیالورونیداز (۱۶) نیز بکار برده میشود.

در این مطالعه طی اولین روز کشت، GC غلظت های پایه استرادیول را با انحراف وسیع ترشح نمودند که با یافته های Wood و همکاران (۱۷) و Foldesi و همکاران (۱۶) مطابقت داشت. Foldesi و همکاران (۱۶) GC انسان را بدون حضور گنادوتروپین ها و آندروژن ها کشت داده و نشان دادند که ترشح غلظت پایه استرادیول پس از ۳ روز در محیط کشت به کمتر از ۵۰٪ میزان اولیه و پس از ٦ روز در کشت به ۵٪ میزان اولیه کاهش می یابد. آنها نتیجه گرفتند که GC به خودی خود بدون حضور آندروژنها و گنادوتروپینها در تمام طول کشت توانایی ترشح استرادیول را دارند. به منظور جلوگیری از کاهش ترشح پایه استرادیول توسط GC، به محیط کشت آندروژنهای پیش ساز هورمون استرادیول افزوده شد. علاوه بر این ترشح استرادیول پایه توسط GC انسان تا ۹٦ ساعت بعد از کشت کاهش معنی داری نداشت که بیان کننده فعالیت بالای آنزیم آروماتاز در تبدیل آندروژن ها به استرادیول می باشد. این یافته تائید کننده نتایج Foldesi و همکاران (۱٦) و Bernhisel و همکاران (۱۸) می باشد. آنها گزارش نمودند که GC در عدم حضور گنادوتروپین ها و حضور آندروژن ها تا ۹ روز در محیط کشت توانایی تولید استرادیول را دارند. البته این یافته ها با نتایج Wood و همکاران (۱۷) که گزارش نمودند کاهش محسوس تولید استرادیول پایه در محیط کشت حتی در حضور آندرستندیون مطابقت نمی کند. یافته ما درباره تولید پروژسترون توسط GC انسان بدون حضور FSH با گزارش Schipper و همکاران (۱۹) مطابقت دارد. در این مطالعهFSH در حضور آندروژن ها سبب افزایش ترشح استرادیول و پروژسترون توسط GC انسان می شود که با یافته های Mason و همکاران (۲۰) و Bergh وهمکاران (۲۱) مطابقت می کند. در این مطالعه و دیگر مطالعات (۱٦ و ۲۱،۲۰) میزان ترشح استرادیول و پروژسترون توسط GC از بیماری به بیمار دیگر متفاوت می باشد که علت این اختلاف احتمالاً مربوط به تفاوت های موجود در تکامل GC در پاسخ به FSH می باشد. آندروژن ها بطور مستقیم سبب تشدید استروئیدوژنز وابسته به FSH در فولیکول های درحال رشد می شوند، که این توانایی در پریمات ها قبل از تخمک گذاری از بین

Archive of SID
www.SID.ir

می رود (۲۲). اخیراً در پریمات ها گیرنده آندروژنها را در GC فولیکول آنترال اولیه و قبل آنترال یافته اند که میزان آن قبل از تخمک گذاری کاهش می یابد (۲۳). ازآنجا که در سیکل های تحریک تخمک گذاری، فولیکول ها در مراحل مختلف تکاملی قرار دارند بنابراین GC بدست آمده نیز در مراحل مختلف تکاملی می باشند نسبت این تیپ های سلولی با مراحل تکاملی مختلف در کشت سلولی گرانولوزا، بیان کننده پاسخ آنها به FSH می باشد (۲٤).

اثرات IL-6 بر روی ترشح استروئیدها به دنبال تحریک با FSH بیان کننده این موضوع می باشد که IL-6 می تواند بعنوان یک تنظیم کننده اتوکراین و پاراکراین، استروئیدوژنز تخمدان عمل نماید. در حقیقت GC به میزان محسوسی تولید IL-6 می کند (۱۳). و این سیتوکاین در محیط *In vitro* توانایی مهار فرآیندهای تکاملی ناشی از گنادوتروپین ها را دارد. با توجه به توانایی تولید IL-6 توسط لنفوسیت ها و ماکروفاژها، سعی گردید تا حدامکان سلولهای GC کاملاً عاری از لنفوسیت و ماکروفاژ شوند تا نتایج حاصل معتبر و قابل اعتماد باشد البته در صورت وجود لنفوسیت ها،این سلولها به ظرف کشت نچسبیده و احتمالاً ۲٤ ساعت پس از انکوباسیون از محیط کشت خارج می شوند. ماکروفاژها نیز پس از ۲٤ ساعت در عدم حضور سیتوکاین هایی مانند IL-1β ، INFα، GM-CSF و INFγ دچار آپوپتوزیس می شوند. (۲۵). بعلاوه Machelon و همکاران (۲٦) در مطالعات خود بر روی GC انسان نشان دادند که سطح نسخه برداری IL-6 در کشت GC در حضور و عدم حضور سلولهای ایمنی مشابه یکدیگر بوده و نتیجه گرفتند که بیوسنتز IL-6 بوسیله ماکروفاژها ناچیز می باشد. در نتیجه در مطالعه ما بیواکتیویته IL-6 در ترشحات کشت سلولی با منشاءWBC منتفی یا بسیار ناچیز می باشد (۱۳).

بر اساس یافته های ما IL-6 تاثیر معنی داری بر روی ترشح پایه پروژسترون توسط GC انسان نداشته ولی سبب مهار معنی دار ترشح تحریکی (با حضور FSH) پروژسترون توسط GC انسان می شود. این یافته با گزارشات Pitzel (۲۷) و Gorospe (۱۱،۲۸) مطابقت دارد. Pitzel و همکاران (۲۷) با بررسی اثرات IL-6 بر روی GC خوک نشان دادند که IL-6 هیچ اثری بر روی ترشح پایه پروژسترون ندارد همچنین Gorospe و همکاران (۱۱،۲۸) گزارش نمودند که IL-6 سبب مهار ترشح پروژسترون تحریک شده توسط FSH می گردد. در صورتیکه بر ترشح پایه پروژسترون اثری ندارد. با استفاده از سیستم پرفوزیون تخمدانی در محیط *In vitro*، Mikuni (۲۹) نشان داد IL-6 با غلظت ۱۰۰ ng/ml بر روی ترشح پروژسترون اثری ندارد که بسیار بالاتر از غلظت استفاده شده در مطالعه ما می باشد و در این غلظت بالا تخمک گذاری مهار میشود. همچنین Keck و همکاران (۱٤) نشان دادند که IL-6 ترشح پروژسترون تحریک شده توسط HCG را در GC انسان مهار می کند. آنها پس از کشت با مقایسه شمارش سلولی بین گروه کنترل (GC کشت داده شده بدون IL-6) و مطالعه (GC کشت داده شده در حضور IL-6) پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو نتیجه گرفتند که اثر مهاری ترشح پروژسترون اختصاصاً به IL-6 مربوط بوده و با خاصیت سیتوتوکسیتی IL-6 ارتباطی ندارد.

بررسی اثرات IL-6 بر روی ترشح پایه و تحریکی استرادیول در حضور FSH توسط GC انسان نشان داد که IL-6 دارای اثرات مهاری معنی داری بر ترشح پایه و تحریکی استرادیول بصورت وابسته به غلظت می باشد که با نتایج Alpizar و همکاران (۱۲) مطابقت دارد. این پژوهشگران نشان دادند، ترشح استرادیول تحریک شده توسط FSH بوسیله GC گاو بصورت وابسته به دوز مهار می شود. همچنین این نتایج با مطالعات انجام شده

Archive of SID
www.SID.ir

توسط Gorospe و همکاران (۱۱،۲۸) و Hughes (۳۰) بر روی GC موش صحرایی و نیز مطالعه Breard و همکاران (۱۳) بر روی GC خرگوش مطابقت می کند. اگر چه یافته های ما در تأیید گزارش Machelon و همکاران (۲٦) نمی باشد، زیرا در مطالعه فوق افزودن rh IL-6 ۱۰-۲۰۰ IU/ml به GC انسان، در شرایطی که تولید IL-6 آندوژن بسیار کم می باشد هیچ اثری بر روی ترشح پروژسترون توسط GC و یا روی فعالیت سیستم آروماتاز تحریک شده توسط FSH نمی گذارد در نتیجه تفسیر تفاوت بین یافته های ما و Machelon (۲٦) مشکل می باشد. زیرا مدل تجربی ما تقریباً مشابه آنها بود. Machelon (۲٦) و همکاران اشاره نمودند که عدم اثر IL-6 بر روی GC می تواند به دلیل عدم وجود گیرنده IL-6 را روی GC باشد اگر چه Keck (۱٤) و همکاران گیرنده IL-6 بر روی GC تا ۱۳ روز بعد از کشت را بوسیله RT-PCR نشان دادند. احتمال دیگر تفاوت بین یافته های ما بدلیل تفاوت در روش بررسی و یا تفاوت در فعالیت اختصاصی IL-6 مورد استفاده و یا تفاوت در پاسخ سلولی به سیتوکاین ها در سلولهای بیماران مورد مطالعه باشد. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان میدهد که IL-6 با منشاء موضعی از ماکروفاژهای تخمدان، سلولهای سوماتیک و گرانولوزای تخمدان ممکن است تنظیم کننده داخلی تمایز سلولهای گرانولوزای لوتئینیزه شده و ترشح هورمونها توسط این سلولها باشد. مطالعات سینتیک نشان داد که اثر مهاری IL-6 بر روی استروئیدوژنز GC تحریک شده با FSH وابسته به زمان می باشد. اختلالات غلظتی IL-6 در تخمدان ممکن است سبب اختلال در ترشح پروژسترون و استرادیول شده و نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماریهای تخمدانی و ناباروری زنان بازی نماید. بطور طبیعی مقدار IL-6 در مایع فولیکولی کمتر از ۵۰ IU/ml بوده که این مقدار ناشی از سلولهای فولیکولی مقیم شامل ماکروفاژها و GC می باشند. هر چند تولید IL-6 ممکن است بدلیل فاکتورهای متفاوتی از جمله عفونت، صدمه، تومورهای بدخیم و اختلالات عملکردی تخمدان افزایش یابد معمولاً افزایش زیاد IL-6 سرم با تخریب بافتی همراه می باشد (۸). افزایش IL-6 در زنان با تحریک بیش از حد تخمک گذاری (۳۲،۳۱) ، اندومتریوز و سرطان اپی تلیال تخمدان دیده می شود (۳۳، ۳٤). بر اساس نتایج موجود IL-6 سبب مهار ترشح استرادیول و پروژسترون تحریکی توسط FSH در دستگاه تناسلی زنان شده و ممکن است سبب اختلالات هورمونهای مؤثر در فرایند تولید مثل شود.

بطور کلی سلولهای گرانولوزا در محیط کشت قادر به ترشح پایه پروژسترون و استرادیول بوده و میزان ترشح این هورمون ها توسط FSH افزایش می یابد این افزایش توسط IL-6 بصورت وابسته به دوز مهار می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری پرسنل درمانی، پرستاری، و آزمایشگاهی مرکز درمان ناباروری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز درمان ناباروری دانشگاه کیل آلمان تشکر و قدردانی می نماید.

References

1) Armstrong D.T., Goff A.K., Dorrington J.H. Regulation of follicular estrogen biosynthesis. In Midgley, A.R. Jr and Sadler, W.A. Jr (eds) Ovarian Follicular Development and Function. Raven Press, New York. 1997; pp:169-182

2) Erickson G.F. Normal regulation of ovarian androgen production,. Semin. Reprod. Endocrinol. 1993; 11: 307-312.

3) Karnitis VJ., Townson DH., Friedman C.I. et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone stimulates multiple follicular growth, but minimal estrogen production in gonadotropin-releasing

Archive of SID
www.SID.ir

hormone antagonist-treated monkeys: examining the role of luteinizing hormone in follicular development and steroidogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 1994; 79(1):91-7.
4) Hillier S.G., Whitelaw P.F., Smyth C.D. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. Mol Cell Endocrinol. 1994;100(1-2):51-4.
5) Smyth C.D., Miro F., Howles C.M., et al. Effect of luteinizing hormone on follicle stimulating hormone-activated paracrine signalling in rat ovary. Hum Reprod. 1995; 10(1):33-9.
6) Spangelo B.L., Isakson P.C., MacLeod R.M. Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide. Endocrinol. 1990; 127(1):403-9.
7) Spangelo B.L., MacLeod R.M., Isakson P.C. Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro. Endocrinol. 1990; 126(1):582-6.
8) Van Snick J. Interleukin-6: an overview. Annu Rev Immunol. 1990; 8:253-78.
9) Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood. 1989; 74(1):1-10.
10) Watson J.M., Sensintaffar J.L., Berek J.S., et al. Constitutive production of interleukin 6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. Cancer Res. 1990; 50(21):6959-65.
11) Gorospe W.C., Spangelo B.L. Interleukin-6 production by rat granulosa cells in vitro: effects of cytokines, follicle-stimulating hormone, and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. Biol Reprod. 1993; 48(3):538-43.
12) Alpizar E., Spicer L.J. Effects of interleukin-6 on proliferation and follicle-stimulating hormone-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. Biol Reprod. 1994; 50(1):38-43.
13) Breard E., Benhaim A., Feral C., et al. Rabbit ovarian production of interleukin-6 and its potential effects on gonadotropin-induced progesterone secretion in granulosa and theca cells. J Endocrinol. 1998; 159(3):479-87.
14) Keck C., Rajabi Z., Pfeifer K., et al. Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptors in human granulosa lutein cells. Mol Hum Reprod. 1998; 4 (11): 1071-6.
15) Figenschau Y., Sundsfjord J.A., Yousef M.I., et al. A simplified serum-free method for preparation and cultivation of human granulosa-luteal cells. Hum Reprod. 1997; 12(3):523-31.
16) Foldesi I., Breckwoldt M., Neulen J. production by luteinized human granulosa cells: evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. Hum Reprod. 1998; 13(6):1455-60.
17) Wood A.M., Lambert A., Hooper M.A., et al. Exogenous steroids and the control of oestradiol secretion by human granulosa-lutein cells by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. Hum Reprod. 1994; 9(1):19-23.
18) Bernhisel M.A., Holman J.F., Haney A.F., et al. Estrogen and progesterone production by granulosa cell monolayers derived from in vitro fertilization procedures: lack of evidence for modulation by androgen. J Clin Endocrinol Metab. 1987; 64(6):1251-6.
19) Schipper I., Fauser B.C., Van Gaver E.B., et al. Development of a human granulosa cell culture model with follicle stimulating hormone responsiveness. Hum Reprod. 1993; 8(9):1380-6.
20) Mason H.D., Mannaerts B., de Leeuw R., et al. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on cultured human granulosa cells: comparison with urinary gonadotrophins and actions in preovulatory follicles. Hum Reprod. 1993; 8(11):1823-7.
21) Bergh C., Selleskog U., Hillensjo T. Recombinant human gonadotropins stimulate steroid and inhibin production in human granulosa cells. Eur J Endocrinol. 1997; 136(6):617-23.
22) Harlow C.R., Shaw H.J., Hillier S.G. Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity. Endocrinol. 1988; 122(6): 2780-7.
23) Hillier S.G., Tetsuka M., Fraser H.M. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. Hum Reprod. 1997; 12(1): 107-11.
24) Whitman G.F., Luciano A.A., Maier D.B. Human chorionic gonadotropin localization and morphometric characterization of human granulosa-luteal cells obtained during in vitro fertilization cycles. Fertil Steril. 1989; 51(3):475-9.
25) Mangan D.F., Wahl S.M. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. J Immunol. 1991;15; 147(10):3408-12.
26) Machelon V., Emilie D., Lefevre A., et al. Interleukin-6 biosynthesis in human preovulatory

Archive of SID

www.SID.ir

follicles: some of its potential roles at ovulation. J Clin Endocrinol Metab. 1994; 79(2):633-42.
27) Pitzel L., Jarry H., Wuttke W. Effects and interactions of prostaglandin F2 alpha, oxytocin, and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells. Endocrinol. 1993; 132(2):751-6.
28) Gorospe W.C., Hughes F.M., Spangelo B.L. Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells in vitro. Endocrinol. 1992; 130(3): 1750-2.
29) Mikuni M. Effect of interleukin-2 and interleukin-6 on ovary in the ovulatory period--establishment of the new ovarian perfusion system and influence of interleukins on ovulation rate and steroid secretion. Hokkaido Igaku Zasshi. 1995; 70(4):561-72.
30) Hughes F.M., Fong Y.Y. Gorospe W.C. Interleukin-6 stimulates apoptosis in FSH-stimulated rat granulosa cells in vitro: development of an in vitro model. Endocrine. 1994; 2: 997-1002
31) Loret de Mola J.R., Flores J.P., Baumgardner G.P. et al. Elevated interleukin-6 levels in the ovarian hyperstimulation syndrome: ovarian immunohistochemical localization of interleukin-6 signal. Obstet Gynecol. 1996; 87(4):581-7.
32) Chen C.D., Chen H.F., Lu H.F. et al. Value of serum and follicular fluid cytokine profile in the prediction of moderate to severe ovarian hyperstimulation syndrome. Hum Reprod. 2000; 15(5):1037-42.
33) Garrido N., Navarro J., Remohi J., et al. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. Hum Reprod Update. 2000; Feb;6(1):67-74.
۳٤) نوری م. غفاری م. سلماسی ع. و همکاران. بررسی سطح سرمی و مایع فولیکولی IL-6 و هورمونهای جنسی در بیماران IVF-ET و ارتباط این فاکتورها با اندومتریوز و میزان حاملگی. فصلنامه باروری و ناباروری شماره ٤، پاییز، ۷۹ صفحات: ٦۲-٥٥.

Archive of SID

www.SID.ir