نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۹؛ ۱۴(۱):۱۳-۲۱.

بررسی تغییرات سطح سرمی سیتوکین اینترلوکین-۶ یک هفته قبل تا یک هفته بعد از زایمان طبیعی در میش

هادی بیننده[۱]، عبدالناصر محبی[۲*]، فرید براتی[۲]، ناصر شمس اسفندآبادی [۲]

۱. دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۲۰ اسفندماه ۹۷ **پذیرش:** ۱۱ تیرماه ۹۸

چکیده

با توجه به این که ساز و کار زایمان طبیعی یک فرآیند وابسته به واکنش‌های ایمونولوژیک است، ممکن است فاکتورهای التهابی مختلف دخیل در واکنش‌های ایمنی (اینترلوکین- ۶ یک سیتوکین پیش‌التهابی) در زمان‌های نزدیک زایمان تولید شوند. هدف از این پژوهش بررسی تغییرات اینترلوکین-۶ از یک هفته قبل از زایمان تا یک هفته بعد از زمان زایمان طبیعی در میش بود. با این هدف تعداد ۵ رأس میش آبستن نیمه‌ی دوم انتخاب شد. نگه‌داری و وضعیت تغذیه‌ای میش‌های آبستن در شرایط یکسان صورت گرفت. خون‌گیری از طریق ورید وداج میش پس از ضدعفونی موضع با ونوجکت و لوله‌ی خلأدار به میزان ۵ تا ۷ میلی‌لیتر هر ۲۴ ساعت یک بار به مدت یک هفته قبل از زایمان تا یک هفته بعد از زایمان صورت گرفت. نمونه‌ها از طریق لوله‌های استریل به صورت جداگانه پس از اخذ جمع‌آوری شد و برای جداسازی سرم به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های سرمی پس از جداسازی در فریزر آزمایشگاه و در دمای ۷۰ – درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا از اتولیز و تخریب زنجیره‌های ایمنی جلوگیری شود. اینترلوکین-۶ سرم ها با کیت اختصاصی اینترلوکین- ۶ گوسفندی و تست الایزا سنجش شد. نتایج این پژوهش نشان داد که در روزهای مختلف قبل از زایمان و بعد از زایمان و همچنین روز زایمان اینترلوکین-۶ تغییرات ناچیزی داشته است که این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نیست (P =۰/۷۶۲۵). در کل نتایج این پژوهش بیانگر این است که وقوع زایمان بر سطوح سرمی اینترلوکین-۶ تأثیری در دوره‌ی زمانی مورد پژوهش ندارد.

واژگان کلیدی: زایمان طبیعی، میش، سرم، اینترلوکین-۶.

مقدمه

زایمان توسط غدد درون ریز، عوامل هورمونی، عوامل التهابی و همچنین عوامل مکانیکی کنترل می‌شود. بلوغ محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال جنین (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis) و افزایش حجم و کشش رحم به علت رشد جنین موجب تنظیم بیان ژن‌های مختلف در زایمان می‌شود. در طول اکثر بارداری‌ها، میومتر نسبتاً ساکن است و انقباضاتی که رخ می‌دهد ضعیف و هماهنگ هستند. میومتر (Myometrium) در کوتاه‌مدت نسبت به مواد منقبض-کننده‌ی قوی (Uterotonins) پاسخ می‌دهد. بسیاری از این مواد منقبض‌کننده در داخل بافت‌های رحم تولید می‌شوند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان پروستاگلندین‌ها (PGs) و اکسی‌توسین (Oxytocin) را نام برد. تنظیم زایمان یک فرایند چند عاملی است و زمانی که بیان مناسبی از پروتئین‌های مرتبط با انقباض (Contraction-Associated Proteins) و عوامل انقباضی رحم صورت می‌گیرد، زایمان طبیعی رخ می‌دهد. حیوانات آزمایشی مختلف از جمله‌ی گوسفند، جوندگان و پستانداران غیر انسان مورد پژوهش قرار می‌گیرند و از یافته‌های به دست آمده، در پژوهش‌های انسانی استفاده می‌شود. زایمان یک فرایندی است که درآن جنین از محیط زیست داخل رحمی به محیط زیست خارج از رحم منتقل می‌شود. زایمان نتیجه‌ی فعل و انفعالات مادری و فاکتورهای جنینی است (۴).

نوزادان تازه متولد شده استعداد زیادی برای ابتلا به

عفونت دارند که این امر ناشی از اختلال مکانیسم‌های دفاعی نوزاد است. تولید و حفظ پاسخ‌های ایمنی اکتسابی به وسیله شبکه‌ای از ارتباطات متقابل مابین گلیکوپروتئین و فسفولیپیدهای بین سلولی کنترل و تنظیم می‌شود که اصطلاحاً سیتوکین نامیده می‌شوند. توانایی مادر و نوزاد در تولید چنین سیتوکین‌های پیش التهابی امکان مقابله با عفونت‌های بعد از تولد را برای نوزاد فراهم می‌کند در حالی که عدم توانایی در تولید و افزایش سطوح آن‌ها، موجب افزایش بیماری و مرگ و میر و نیز افزایش بروز عفونت زودرس نوزادی، انتروکولیت نکروزان، دیسپلازی برونکوپولمونری و آسیب هیپوکسیک-ایسکمیک مغزی می‌شود (۹). یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌ها اینترلوکین-۶ است که سنتز آن تحت تأثیر سیتوکین‌های دیگر از جمله اینترلوکین ۱ و۲ است (۱۷). این ماده لنفوسیت-های B و T را فعال می‌کند، بلوغ مگاکاریوسیت‌ها را تحریک می‌کند و اثر کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی (cell NK) را زیاد می‌کند و موجب افزایش تولید پروتئین‌های فاز حاد می‌شود. اینترلوکین-۶ محصول سلول‌های Th1 است، همچنین ماست سل‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های اپیتلیال تنفسی و ائوزینوفیل‌ها قادر به تولید آن هستند (۳و۱۵).

اینترلوکین-۶ نقش مهمی طی زایمان طبیعی و زایمان زودرس ایفا می‌کند، بیوسنتز پروستاگلاندین‌ها را تحریک کرده، لذا می‌تواند موجب تحریک انقباضات میومتر رحمی و باز شدن گردن رحم شود. طی فاز بحرانی انتقال (Transition period) از محیط داخل رحمی استریل به محیط خارج رحمی که نوزاد با محرک‌های آنتی ژنیک متعددی در تماس قرار می‌گیرد، نقش سیستم دفاعی بدن نوزاد اهمیت بالایی دارد. سیتوکین از طریق تنظیم عمل‌کردهای بیولوژیک موجب تغییر وضعیت ایمنی جنین و نوزاد از جمله فاگوسیتوز و ظهور مولکول‌های اتصالی روی سطوح سایر سلول‌ها می‌شود (۱۷). با توجه به این که توانایی مادر و به دنبال آن نوزاد در تولید سیتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین-۶ در توانایی نوزاد برای مقابله با عفونت‌های بعد از تولد مهم است و مطالعه‌ای در این زمینه در میش انجام نشده است؛ بنا براین هدف از این پژوهش بررسی تغییرات اینترلوکین-۶ در یک هفته قبل تا یک هفته بعد از زمان زایمان طبیعی در میش است.

مواد و روش کار

تعداد ۵ رأس میش آبستن نژاد بختیاری نیمه‌ی دوم آبستنی از دامداری دانشگاه شهرکرد خریداری شد و به خانه حیوانات کلینیک دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل شد. انتخاب نمونه‌ها به روش تصادفی صورت گرفت و تاریخچه‌ی آن‌ها نیز از نظر سقط و مشکلات زایمانی بررسی شد که نمونه‌های انتخابی، سالم و فاقد موارد ذکر شده بودند. به منظور سازگاری با شرایط جدید و نبود استرس‌های محیطی، میش‌ها به مدت یک هفته در مکان جدید نگه‌داری شدند و شرایط تغذیه‌ای و نگه‌داری آن‌ها نیز مشابه قبل و به روش سنتی بود، همچنین برای تخمین حدودی سن جنین و اطمینان از زنده و سالم بودن آن‌ها، از تمامی میش‌ها سونوگرافی انجام شد. اطلاعات و مشخصات مربوط به دام‌ها شامل: سن، تعداد زایمان، سابقه سقط جنین و شماره دام براساس شماره پلاک گوش، ثبت شد.

از ۵ رأس میش آبستن از ۵ روز قبل از زایمان به فواصل هر ۲۴ ساعت تا ۵ روز بعد از زایمان، خون‌گیری از طریق ورید وداج میش پس از ضدعفونی موضع، با ونوجکت و لوله‌ی خلأدار به میزان ۵ تا ۷ میلی‌لیتر صورت گرفت.

نمونه‌های خون میش‌های مورد پژوهش، درون لوله‌های دربدار و سپس در جا لوله‌ای قرار گرفت و در اسرع وقت برای جداسازی سرم به آزمایشگاه کلینیک دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل شد. نمونه‌گیری در بهمن ماه سال ۱۳۹۵ انجام شد.

لوله‌های حاوی نمونه‌های خون هر گوسفند براساس شماره پلاک گوش مشخص شد و به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از حذف شرایط خلأ، به میزان یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا منعقد شوند و سرم شفاف در قسمت فوقانی قرار گیرد. به منظور جداسازی بهتر سرم و ته نشین‌شدن لخته‌های خونی درون لوله‌ها، از سانتریفیوژ استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه و با سرعت ۲۰۰۰

دور در دقیقه درون دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شد. مقدار ۱ تا ۲ میلی لیتر سرم از هر لوله با سمپلر جدا شد و درون میکروتیوب‌ها ریخته شد. سرم‌های جدا شده در فریزر آزمایشگاه و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا از اتولیز و تخریب زنجیره‌های ایمنی جلوگیری شود و در زمان نیاز استفاده شوند.

نمونه‌های سرمی برای اندازه‌گیری اینترلوکین-۶ با کیت اختصاصی شرکت Abbexa ساخت کشور انگلستان با شماره کاتالوگ L201708A356 بررسی شد.

اساس این کیت مبتنی بر اتصال بین آنزیم و جاذب ایمنی (آنتی بادی) است. آنتی بادی اختصاصی اینترلوکین- ۶ در کف چاهک‌های پلیت قرار گرفته است. محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها به گوده‌ها اضافه می‌شود و با بافر شست وشو می‌شوند. آنتی‌بادی اختصاصی کونژوگه بیوتین اینترلوکین-۶ به عنوان آنتی‌بادی تشخیصی استفاده می‌شود. سوبسترای TMB برای نمایان کردن فعالیت HRP استفاده می‌شود. سوبسترای TMB توسط HRP کاتالیز می‌گردد و یک رنگ آبی ایجاد می‌شود که بعد از اضافه شدن محلول توقف (Stop) زرد می‌شود. شدت رنگ زرد مقدار اینترلوکین-۶ را در پلیت نشان می‌دهد. جذب O.D به صورت اسپکتروفتومتریکالی در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری و غلظت اینترلوکین-۶ محاسبه می‌شود.

کیت براساس روش الایزای ساندویچی طراحی شده-است و محدوده غلظت ۷/۸-۵۰۰ pg/ml را تشخیص داده و حساسیت آن ۴/۶۹pg/ml> است. دقت درون‌سنجی با آزمودن ۵ نمونه سرم با غلظت‌های مختلف اینترلوکین- ۶ در یک کیت به میزان ۲۰ بار انجام شده و CV<۸% است و دقت میان‌سنجی با آزمودن ۵ نمونه سرم با غلظت‌های مختلف اینترلوکین-۶ در سه کیت مختلف و ۸ تکرار در هر کیت انجام گرفته و CV<۱۰% است. کف همه‌ی چاهک‌ها با آنتی بادی اختصاصی اینترلوکین-۶ پوشیده شده است.

برای انجام آزمون، اولین مرحله، تهیه بافر شست وشو به‌منظور شست‌وشوی کیت است. برای انجام این کار باید محلول شست‌وشو را به نسبت ۱ به ۲۵ با آب مقطر، رقیق و آماده کرد. با احتساب این نسبت، میزان ۳۰ میلی‌لیتر از محلول شست‌وشو با ۷۲۰ میلی لیتر آب مقطر رقیق می‌شود. در مرحله بعد، به منظور آماده‌سازی استاندارد، ۱ میکرولیتر رقیق کننده استاندارد داخل لوله استاندارد ریخته و مخلوط می‌شود. ۶ میکروتیوب برداشته و آن‌ها را در کنار هم قرار داده و به هر کدام ۰/۳ میلی‌لیتر رقیق-کننده استاندارد اضافه می‌شود، سپس ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول استاندارد را به میکروتیوب اول اضافه کرده و پس از مخلوط کردن، ۰/۳ میلی‌لیتر از میکروتیوب اول برداشته و به میکروتیوب دوم اضافه کرده و مخلوط می‌شود. این روند تا میکروتیوب ششم ادامه پیدا می‌کند تا محلول استاندارد رقیق‌سازی شود. پس از آن، میکروپلیت را آماده و در جای ثابت و مناسبی قرار داده و دو بار شست‌وشو داده می‌شود. پس از هر مرحله شست‌وشو، میکروپلیت با کاغذ جاذب خشک می‌شود. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد آماده شده، به چاهک‌های استاندارد اضافه کرده (۶ چاهک) و یک چاهک هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شده و ۱۰۰ میکرولیتر از رقیق‌کننده استاندارد داخل آن ریخته می‌شود، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در بقیه چاهک‌ها ریخته می‌شود. قابل ذکر است که از نمونه‌ها رقت تهیه نشد. در هر مرحله پس از اضافه کردن مواد برای واکنش بهتر، پلیت به صورت دستی تکان داده می‌شود. در نهایت روی پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۹۰ دقیقه داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. پس از آن برچسب را از روی پلیت برداشته و پلیت دوبار شست‌وشو داده می‌شود. به منظور آماده‌سازی محلول آنتی‌بادی کونژوگه با بیوتین، باید آنتی‌بادی را به نسبت ۱ به ۱۰۰ با محلول رقیق‌کننده آنتی‌بادی مخلوط شود. پس ۱ میکرولیتر از آنتی‌بادی با ۹۹ میکرولیتر از محلول رقیق‌کننده‌ی آنتی‌بادی مخلوط می‌شود و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول آماده شده، به تمامی چاهک‌ها اضافه می‌شود و روی پلیت را پوشانده و به مدت یک ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. پس از این مدت، برچسب را از روی پلیت برداشته و پلیت سه بار شست‌وشو داده می‌شود. به منظور آماده‌سازی آنزیم Straptavidin-HRP conjugate (SABC)، باید آنزیم با محلول رقیق‌کننده‌ی آنزیم به نسبت ۱ به ۱۰۰ مخلوط شود. در این صورت، ۱ میکرولیتر از آنزیم با ۱۰۰

میکرولیتر از محلول رقیق‌کننده آنزیم مخلوط و پس از آماده‌سازی ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر چاهک ریخته می‌شود و روی پلیت را پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود. در مرحله بعد، برچسب را برداشته و پلیت را پنج بار شست‌وشو داده و پس از خشک کردن، میزان ۹۰ میکرولیتر از سوبسترا را درون هر چاهک ریخته و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. سوبسترای TMB برای نمایش فعالیت آنزیم استفاده شده و با HRP کاتالیز می‌شود تا یک محصول آبی‌رنگ تولید کند؛ سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به هر چاهک اضافه می‌شود و تغییر رنگ چاهک‌ها به رنگ زرد مشاهده می‌شود. در مرحله آخر، جذب نوری میکروپلیت مورد آزمایش برای الایزا با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت می‌شود.

داده‌ها پس از هموژن شدن، مورد آنالیز واریانس یک طرفه با اندازه‌گیری مکرر (Reapeted measure one-way ANOVA) در رویه‌ی GLM (Generalized Linear Model) با نرم‌افزار SAS (Statistical Analysis System) شد. مقادیر بر حسب حداقل مربعات میانگین (Least Square Mean) و خطای معیار (Standard Eror Of Mean) نشان داده شده است. مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

در این پژوهش تغییرات اینترلوکین-۶ در سرم میش از یک هفته قبل از زایمان تا یک هفته بعد از زایمان طبیعی با کیت اختصاصی اینترلوکین-۶ گوسفندی ارزیابی شدند و نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر پس از تجزیه و تحلیل آماری، به صورت جدول میزان تغییرات سطوح سرمی اینترلوکین-۶ در روزهای مختلف قبل از زایمان و بعد از زایمان نشان داده شده است.

جدول ۱- میانگین ± خطای معیار میزان اینترلوکین -۶ در روزهای مختلف نمونه‌گیری (روز صفر = روز زایمان)

روز	میزان اینترلوکین -۶(pg/ml)
-۴	۵۰/۵۵±۹/۱۹
-۳	۲۱/۱۴±۶/۶۲
-۲	۳۲/۶۸±۹/۱۹
-۱	۸/۳۵±۹/۱۹
۰	۵/۸۹±۷/۶۱
+۱	۷/۵±۳/۱۹
+۲	۷/۷۹±۵/۱۹
+۳	۵/۷۹±۶/۶۲
+۴	۶/۰۸±۴/۵۰
+۵	۹/۴۳±۷/۵۰

میانگین سطح سرمی اینترلوکین-۶ میان گوسفندان مورد پژوهش ۵/۶۲±۱۵/۶ و با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ ٪ بین ۲۷/۱- ۴/۱ pg/ml محاسبه شده است.

با توجه به جدول تغییرات میزان اینترلوکین -۶ اگرچه در روزهای مختلف قبل از زایمان و بعد از زایمان و همچنین روز زایمان اینترلوکین-۶ تغییرات ناچیزی داشته است، اما نتایج پژوهش حاضر با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری تغییرات معنی‌داری را نشان نداده است (P =۰/۷۶۲۵).

بنابراین وقوع زایمان بر سطوح سرمی اینترلوکین-۶ در حوالی زایمان تأثیر ندارد.

بحث

اینترلوکین- ۶ از مهم‌ترین سیتوکین‌های پیش‌التهابی سیستم ایمنی ذاتی است. گیرنده‌ی اینترلوکین- ۶ به صورت محلول و غشایی است که به واسطه‌ی فعالیت اینترلوکین- ۶ موجب تحریک سیگنال سلول از طریق فعال‌سازی سیستم gp130 می‌شود. اینترلوکین- ۶ از طریق این گیرنده‌ها در سلول‌های هدف در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک بی‌شماری شرکت می‌کند.

سطح اینترلوکین- ۶ در زمان استرس یا التهاب افزایش می‌یابد. علاوه بر نقش ایمنی و التهاب، عملکردهای چند بعدی و پیچیده‌ای در سیستم‌های مختلف بدن دارد و اختلال در عملکرد و عدم تعادل در تولید این سیتوکین موجب اختلالات مختلفی در بدن می‌شود.

با توجه به این که مکانسیم زایمان طبیعی یک فرآیند وابسته به واکنش‌های ایمونولوژیک است، ممکن است فاکتورهای التهابی مختلف دخیل در واکنش‌های ایمنی (اینترلوکین- ۶ یک سیتوکین پیش‌التهابی) در زمان‌های نزدیک زایمان (قبل و بعد از زایمان) تولید شود.

Bowen و همکاران در سال ۲۰۰۲ تأثیر سیتوکین‌ها را روی جفت و غشاهای اطراف جفتی و فعالیت تنظیمی آن‌ها در حاملگی و زایمان زنان بررسی کردند و بیان کردند که سیتوکین‌ها در فعالیت‌های اتوکرینی و پاراکرینی جفت و غشاها در طول مراحل میانی و اواخر حاملگی و در بسیاری از جنبه‌ها مانند خروج جنین، پارگی غشا و اتساع گردن جنین نقش دارند که بیانگر اهمیت سیتوکین‌ها در تنظیم عملکرد و ارتباط کارکردی بخش‌های مادری-جفتی جنینی در طول بارداری است (۱).

Jolic و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که سایتوکین‌ها در حفظ پاسخ‌های ایمنی اکتسابی در نوزادان نقش دارند. توانایی مادر و نوزاد در تولید سیتوکین‌ها امکان مقابله با عفونت‌های بعد از تولد را برای نوزاد فراهم می‌کند و عدم تولید آن‌ها موجب افزایش بروز عفونت زودرس نوزادی، دیسپلازی برونشی- ریوی و آسیب هیپوکسیک- ایسکمیک مغزی می‌شود (۹).

Mitchell و همکاران در سال ۱۹۹۳ گزارش کردند که اینترلوکین-۶ یک جاذب شیمیایی (chemo-attractant) برای سلول‌های +TCD4، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌هاست که اثر مهارکنندگی روی بعضی عفونت‌ها از جمله جلوگیری از تکثیر ویروس ایدز داشته است (۱۷).

براساس پژوهش‌های Gibb و همکاران در سال ۲۰۰۶ سیتوکین‌ها از سلول‌های التهابی منشأ می‌گیرند که در هنگام زایمان به سرویکس هجوم می‌آورند و نیز در شل شدن سرویکس نیز نقش دارند. برای مثال اینترلوکین ۱و۶ در مایعات سرویکس و واژن (Cervicovaginal) و همچنین در سرویکس انسان در هنگام زایمان تشخیص داده شده‌اند و افزایش معنی‌داری در غلظت اینترلوکین-۶ وجود داشته است (۴).

Steinborn و همکاران در سال ۱۹۹۶ گزارش کردند که غلظت سیتوکین‌های التهابی اینترلوکین- ۶، IL-1β و TNF-α در ترشحات سرویکوواژینال و پرده‌های جنینی در طول زایمان‌های طبیعی در زنان افزایش و در زایمان‌های زودرس توسط عفونت افزایش بیشتری نسبت به زایمان طبیعی نشان می‌دهند (۲۲).

Gunn و همکاران در سال ۱۹۹۶ غلظت IL-1-α و اینترلوکین-۶ را در مایع آمنیوتیک، جفت، پرده‌ی جنین، سیاهرگ ناف و خون مادر در انسان با روش Radioimmunoassay اندازه‌گیری کردند و گزارش کردند که غلظت IL-1-α و اینترلوکین-۶ در مایع آمنیوتیک و پرده جنین و غلظت IL-1-α در خون مادر و جنین پس از شروع زایمان افزایش یافت. غلظت هر دو سیتوکین در جفت بدون تغییر باقی ماند و گزارش کردند که پرده‌ی جنینی یا decidua مادر، منبع اصلی IL-1-α و اینترلوکین- ۶ در طول زایمان طبیعی است (۵).

در پژوهش Sissel-Linda و همکاران در سال ۱۹۹۳، IL-1، اینترلوکین-۶ و فاکتور نکروز توموری (TNF) در زایمان طبیعی انسان بررسی شد و اثبات شد که هر سه نقش مهمی را در شروع زایمان طبیعی ایفا می‌کنند (۲۱).

براساس پژوهش Tabibzadeh و همکاران در سال ۱۹۸۹ و ۱۹۹۱ بافت اندومتر انسان یک محل فعال تولید و عملکرد سیتوکین‌هاست و اینترلوکین-۶ و IFN-β2 توسط سلول‌های استرومال اندومتر انسان تولید می‌شوند و

تحت تأثیر هورمون استروژن هم قرار دارد (۲۳ و ۲۴)؛ همچنین Jacobs و همکاران در سال ۱۹۹۲ روی تولید اینترلوکین- ۶ توسط سلول‌های استرمال و اپیتلیال بافت رحم موش تحقیق کردند و گزارش کردند که اینترلوکین- ۶ در پاسخ به استروئیدهای تخمدان تولید می‌شود که میزان تولید توسط سلول‌های اپتلیال چندین برابر سلول‌های استرومال است (۸).

در پژوهشی که Leung و همکاران در سال ۲۰۰۰ در گاوهای آبستن بر روی بیان ژن mRNA اینترلوکین-۶ در بافت رحمی انجام دادند. ژن mRNA اینترلوکین-۶ در هیچ‌کدام از بافت‌های رحمی مورد مطالعه بیان نشد و گزارش کردند که اینترلوکین-۶ نقش مهمی را در فعالیت رحم در آبستنی ایفا نمی‌کند (۱۴).

Laham و همکاران در سال ۱۹۹۶ غلظت اینترلوکین-۶ را در بافت‌های مرتبط با بارداری (جفت و پرده‌های جنینی) انسان در زایمان زودرس (با تزریق LPS) و زایمان طبیعی بررسی کردند و گزارش کردند که اینترلوکین-۶ به عنوان یک جزء فیزیولوژیکی مایع آمنیوتیک است که توسط بافت‌های جفتی و رحمی تولید می‌شود و در زایمان طبیعی نسبت به زایمان زودرس غلظت بالاتری در مایع آمنوتیک دارد (۱۱).

در پژوهشی که از سوی Wenstrom و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شد، گزارش کردند که افزایش اینترلوکین-۶ در مایع آمنیوتیک زنان در اواخر بارداری نشان از زایمان زودرس است (۲۵).

براساس پژوهش‌های Saito و همکاران در سال۱۹۹۳ حضور سیتوکین‌ها در مایع آمنوتیک در زایمان حتی در حالت عدم حضور عفونت اثبات گردید ولی در حالت عفونت داخل رحمی میزان سیتوکاین‌ها افزایش پیدا می‌کند. سیتوکین اینترلوکین- ۶ و IL-8 در عفونت و درد زایمان در مایع آمنیوتیک افزایش پیدا می‌کند. در این پژوهش اثبات گردید که هم عفونت و هم درد زایمان می‌تواند سبب افزایش سیتوکین‌های التهابی همچون اینترلوکین- ۶ و IL-8 شود و بیشترین میزان مربوط به عفونت داخل رحمی است (۱۹).

Larry و همکاران در سال ۱۹۹۷ تغییرات mRNA گیرنده‌ی اکسی توسین در مغز رت در طول دوره‌ی بارداری و تحت تأثیرات استروژن و اینترلوکین-۶ ارزیابی و گزارش کردند که استروژن و اینترلوکین-۶ به طور هم-زمان موجب افزایش تعداد mRNA گیرنده‌ی اکسی توسین می‌گردد که منقبض‌کننده‌ی رحم است (۱۲).

Laura و همکاران در سال ۲۰۱۵ تولید اینترلوکین- ۶ را از سلول‌های اپیتلیوم خالص‌سازی شده گزارش کردند و در این پژوهش اثبات گردید که آلودگی سلول‌های اپیتلیال کشت شده به صورت خالص توسط E.coli و LPS سبب افزایش تولید اینترلوکین-۶ در محیط کشت می‌گردد (۱۳).

بر اساس پژوهش‌های Chodhuri و همکاران در سال ۱۹۹۳ در رحم موش سوری پیک فعالیت زیستی اینترلوکین-۶ در روزهای ۴ و ۸ باروری کاذب شناسایی گردیده است و نیز بر اساس پژوهش Jscobs و همکاران در سال ۱۹۹۲ و نیز Kever و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند با وجود عدم تشخیص mRNA اینترلوکین-۶ و پروتئین آن در رحم، پس از کشت اپتلیال و استرومای رحم، شاهد افزایش آن بودند. Mathialagan و همکاران در سال 1992 بیان mRNA اینترلوکین-۶ را در بافت‌های رحمی گاو، گوسفند و خوک در روزهای پس از جایگزینی و آبستنی با تست PCR تشخیص دادند و گزارش کردند که اینترلوکین-۶ پاسخ مادری به جنین است که در رحم حضور دارد (۲، ۸، ۱۰ و ۱۶).

در پژوهش Hondo و همکاران در سال ۲۰۰۵ لوکالیزه شدن mRNA گیرنده‌ی اینترلوکین- ۶ در رحم موش‌های باردار و غیر باردار مورد مطالعه قرار گرفت. پیام‌های mRNA اینترلوکین-۶ در اپیتلیوم غده‌ای و لومینال رحم در موش‌های غیر آبستن شناسایی گردید و براین اساس گستره‌ی داده‌ها تغییرات معنی‌داری را نشان داد. در موش‌های آبستن پیام‌های ناچیزی در روز سوم در بافت‌های غده‌ای و لومینال اپیتلیوم شناسایی گردید. افزایش پیام‌های mRNA گیرنده‌ی اینترلوکین-۶ در روز ۴ آبستنی شناسایی گردید و گزارش کردند که وظایف گیرنده اینترلوکین-۶ در اپیتلیوم غده‌ای (Glandular) و لومینال است که در دوره‌ی لانه گزینی تغییرات معنی-داری را نشان می‌دهد (۷).

بر اساس پژوهش Heinrich و همکاران در سال

۲۰۰۳ دو مسیر متفاوت سیگنالی برای اینترلوکین-۶ بیان شده است. اینترلوکین-۶ با اتصال به گیرنده‌ی trimetric که شامل دو قسمت gp130 و یک واحد باند تک‌لایه گیرنده‌ی اینترلوکین-۶ است و از طریق مسیر JAK/STAT عمل می‌کند. مسیر دوم شامل اتصال اینترلوکین-۶ به گیرنده‌ی محلول است و افزایش‌دهنده‌ی همودیمتریزاسیون gp130 می‌گردد. در هر دو روش مذکور فقط gp130 به عنوان واحد فعال مطرح است (۶).

Shuan و همکاران در سال ۱۹۹۴ با بررسی میزان تغییر سطح سرمی اینترلوکین طناب نافی و مادری زنانی که زایمان زودرس بین ۲۰ تا ۳۶ هفته داشتند، همراه با التهاب کوریوآمنیون به این نتیجه رسیدند که سطح سرمی مادری گیرنده IL-2 و سطح سرمی بند ناف اینترلوکین-۶ در مقایسه با گروه‌های بدون التهاب کوریوآمنیون افزایش قابل توجهی دارد (۲۰).

Ruzi و همکاران در سال ۲۰۱۲ در سه ماهه‌ی دوم آبستنی سطح پلاسمایی IL-1، اینترلوکین-۶، IL-10 و پیش‌بینی زایمان را در زنان باردار بررسی کردند. نتایج نشان داد که تشخیص IL-1-Ra زایمان زودرس را پیش-بینی می‌کند و همچنین میان IL-1-Ra و اینترلوکین-۶ و میان IL-1-Ra و IL-10 اثر متقابل معنی‌داری وجود دارد و می‌تواند در پیش بینی زایمان زودرس مؤثر باشد. زمانی که تولید IL-1-Ra افزایش پیدا می‌کند، IL-10 کاهش پیدا می‌کند و احتمال زایمان زودرس افزایش می‌یابد (۱۸).

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر می‌توان گفت که اینترلوکین-۶ در سرم مادری قابل تشخیص است؛ اما تغییرات قابل توجه‌ای را نشان نداد و به عنوان یک مارکر ایمونولوژیک در حوالی زایمان دارای ارزش تشخیصی نیست.

منابع

1- Bowen, J. M; Chamley, L; Keelan J.A. and Mitchell, M.D; Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition; Placenta; 2002; 257–273.

2- Choudhuri, R. and Wood G; Production of interleukin-1 and interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in the uterus of pseudopregnant mice; J Biol Reprod; 1993; 49:596– 603.

3- Cruz, A; Rocha, L.M; Ochoa, S.A; Gonzalez-Pedrajo, B; Espinosa, N; Eslava, C. and Sadowinski-Pine, S; Flagella from five Cronobacter species induce pro-inflammatory cytokines in macrophage derivatives from human monocytes; PLoS One, 2013; 7(12):e52091.

4- Gibb, W; J.Lye, S. and Challis, J; Knobil and Neill's Physiology of Reproduction; Third Edition; The University of Alabama; Birmingham, U.S.A; Academic Press; 2006; 2925-2974.

5- Gunn, L; Hardiman, P; Tharmaratnam, S; Lowe, D. and Chard, T; Measurement of interleukin-1-alpha and interleukin-6 in pregnancy associated tissues; Reprod Fertil Dev; 1996; 8: 1069–1073.

6- Heinrich, P.C; Behrmann, I; Serge, H; Hermanns, H. M; Muller-Newen, G. and Schaper, F; principles of interleukins (IL)-6 type cytokine signalling and its regulation; Biochem J; 2003; 374 (1) 1-20.

7- Hondo, E; Kokubu, K; Kato, K. and Kiso, Y; Localization of Interleukin-6 Receptor mRNA in the pregnant and NON-Pregnant Mouse Uterus; Reprod Fertil Dev; 2005; 55:777-781.

8- Jacobs, A; Sehgal, P. and Julian J; Secretion and hormonal regulation of interleukin-6 production by mouse uterine stromal and polarised epithelial cells cultured in vitro; J Endocrinol; 1992; 131:1037–1046.

9- Jocik, M; Guillois, B; Cauquelin, B; Giroux,

J. D; Bessis, J.L; Morello, R. and Ballet, J; Fetal distress increases interleukin-6 and interleukin-8 and decreases tumor necrosis factor-alpha cord blood levels in noninfected full-term neonates; J Endocrinol; 2000; 107: 420-425.

10- Kover, K; Laing, L. and Andrews, G; Differential expression and regulation of cytokine genes in the mouse uterus; J Endocrinol; 1995; 136:1666–1673.

11- Laham, N; Brennecke, S; Bendtzen, K. and Rice, G.E; Differential release of interleukin-6 from human gestational tissues in association with labour and in vitro endotoxin treatment; J Endocrinol; 1996; 149: 431–439.

12- Larry, J; Oung, Y; Muns, S. and Insel, T.R; Changes in Oxytocin Receptor mRNA in Rat Brain during Pregnancy and the Effects of Estrogen and Interleukin-6; J Neuroendocrinol; 1997; 9: 859-865.

13- Laura L, James, G. and Martin S; Polarized Epithelial Cells Secrete Interleukin-6 Apically in the Bovine Endometrium; Biol Reprod; 2015; 92:151-112.

14- Leung, S; Derecka, K; Mann, G; Flint, A. and Wathes, D; Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows; Reprod; 2000; 119: 25–33.

15- Liu, A; Dwyer, D; Jones, T; Bankova, L; Shen, S; Katz, H; and Gurish, M.F; Mast cells recruited to mesenteric lymph nodes during helminth infection remain hypogranular and produce IL-4 and IL-6; J Immunol; 2013; 190; 1758-1766.

16- Mathialagan, N; Bixby, J. and Roberts, R; Expression of interleukin-6 in porcine, ovine and bovine preimplantation conceptuses; Mol Reprod Dev; 1992; 32: 324– 330.

17- Mitchell, M; Trautman, M. and Dudley, D; Cytokine networking in the placenta; Placenta; 1993; 14: 249-275.

18- Ruzi, C; Jahho, N. and Murphey, C; Second trimester maternal plasma levels of cytokines IL-1Ra, Il-6 and IL-10 and preterm birth; J Neonatal Perinatal Med; 2012; 32:483-490.

19- Saito, S; Kasahara, T; Kato, Y; Ishihara, Y. and Ichijo, M; Elevation of amniotic fluid IL-6 and IL-8 granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition; Cytokine X; 1996; 5:81–88.

20- Shaun, G; Lencki, M; Maciulla, M. and Eglinton, G.S; Maternal and umbilical cord serum interleukin levels preterm abor with clinical chorioamnionitis; J Obstet Gynaecol; 1994; 170: 1345-1351.

21- Sissel-Linda, O; Neville, C. and Solveig T; Tumor necrosis factor interleukin-1 and interleukin-6 in normal human pregnancy; J Obstet Gynaecol; 1993; 397- 404.

22- Steinborn, A; Kuhnert, M. and Halberstadt, E; Immunomodulating cytokines induce term and preterm parturition; J Neonatal Perinatal Med; 1996; 24:381–390.

23- Tabibzadeh, S; Human endometrium: an active site of cytokine production and action; Endocr Rev; 1991; 12: 272–290.

24- Tabibzadeh, S; Santhanam, U. and Sehgal, P; Cytokine induced production of IFN-β/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells; J Immunol; 1989; 142; 3134–3139.

interleukin-6 levels predict preterm delivery; J Obstet Gynaecol; 1998; 178; 546-550.

25- Wenstrom, K; Andrews, W; Hauth, J; Goldenberg, R; DuBard, M. and Cliver, S; Elevated second-trimester amniotic fluid

Vol.14/No.1
Spring-Summer 2020

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2020; 14(1): 13-21.

Study of serum Cytokine IL-6 changes from one week before to one week after parturition in ewe

Binandeh, H.[1]; Mohebbi, A.[2]; Barati, F.[2]; Shams Esfanabadi, N.[2]

1. DVM Graduated student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord-Iran.
2. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord-Iran.

Received: 10 March 2019 ***Accepted:*** 1 July 2019

Summary

Since the natural delivery mechanism is related to the immunologic process, it is possible that level of different inflammatory factors involved in immune responses (IL-6 as Pro-Inflammatory Cytokine) may change in the near-parturition time (before and after parturition). The aim of this study was evaluation of IL-6 level change in ewes, from one week before to one week after parturition. For this purpose, a total 5 pregnant ewes in the second term of their conception were selected. The animals were persevered and fed in the same condition. Blood samples were taken from jugular vein using a venoject and vacuum pipe (5-7cc each 24h, one week before parturition until one week after it). The blood samples were transferred to laboratory and the sera were separated and put in -70ºC, for prevention of autolysis and destruction of immune chains. IL-6 was measured by using the specific kit and by ELISA test (Enzyme-linked immunosorbent assay). Results showed that in the different days before and after parturition the level of IL-6 has slightly changed, however; the change was not significant at the different interval times (P=0.7625). In total results showed that serum level of IL-6 in different times of parturition wasn't affected.

Keywords: Parturition, ewe, serum, IL-6.

* Corresponding Author E-mail: ab-mohebi@sku.ac.ir