Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2023 / Vol 25 / No 1

OPEN ACCESS

Original Paper

Comparative Study of Toll-Like Receptor Immunological Function in Fallopian Tube Epithelial Cell-Line OE-E6/E7 in the Presence of Specific Ligands and Sperm under In-Vitro Conditions

Fatemehsadat Amjadi (Ph.D)[1,2], Ensieh Salehi (Ph.D)[3], Zahra Zandieh (Ph.D)*[1,2]

1 Ph.D of Reproductive Biology, Reproductive Sciences and Technology Research Center, Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 2 Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 3 Ph.D of Reproductive Biology, Assistant Professor, Fertility and Infertility Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

Abstract

Background and Objective: Toll-like receptors (TLRs) located in the fallopian tube epithelial cells play a crucial role in the immunological response to sperm and pathogens. The present study aimed to compare the function and response of TLR3, TLR4, and TLR5 receptors in the presence of sperm under both physiological and pathological conditions in vitro.

Methods: In this descriptive laboratory study, OE-E6/E7 cells were cultured with fresh sperm samples obtained from normozoospermic individuals (n=10) and specific ligands for TLR3, TLR4, and TLR5 receptors in three groups consisting of sperm, specific ligands, and sperm + specific ligands. A control group was also included without adding sperm or ligand. The concentrations of IL-6 and IL-8 secreted from OE-E6/E7 cells in all four groups were determined using the ELISA method.

Results: Exposure of sperm and specific ligands to TLR3, TLR4, and TLR5 receptors in fallopian tube epithelial cells led to a significant increase in the concentration of IL-6 and IL-8 cytokines. There was no significant difference in the secretion of these cytokines from OE-E6/E7 cells between the two groups of ligand and ligand + sperm.

Conclusion: The response of fallopian tube epithelial cells to sperm exposure through TLRs leads to an increase in cytokine secretion. However, simultaneous exposure of sperm and TLR-specific ligands does not result in a cumulative increase in cytokine secretion. Therefore, it is plausible that the TLR signaling pathway may be regulated negatively by some other factors. Further studies are required to investigate this issue.

Keywords: Fallopian tube, Spermatozoa, Toll-like receptors.

***Corresponding Author:** Zahra Zandieh (Ph.D), E-mail: zandieh.z@iums.ac.ir

Received 18 Sep 2022
Final Revised 24 Oct 2022
Accepted 7 Nov 2022
Published Online 21 Jun 2023

Cite this article as: Amjadi F, Salehi E, Zandieh Z. [Comparative Study of Toll-Like Receptor Immunological Function in Fallopian Tube Epithelial Cell-Line OE-E6/E7 in the Presence of Specific Ligands and Sperm under In-Vitro Conditions]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 25(1): 92-98. [Article in Persian]

© The author(s)
Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

بهار ۱۴۰۲ / دوره ۲۵ / شماره ۱ (پی در پی ۸۵)

تحقیقی

میزان عملکرد ایمونولوژیکی گیرنده‌های شبه تال در سلول‌های اپیتلیال لوله رحمی رده OE-E6/E7 در مواجهه با لیگاندهای اختصاصی و اسپرم در شرایط برون تنی

دکتر فاطمه السادات امجدی[۱و۲]، دکتر انسیه صالحی[۳]، دکتر زهرا زندیه*[۱و۲]

[۱] دکتری تخصصی بیولوژی تولیدمثل، مرکز تحقیقات علوم تکنولوژی باروری، دپارتمان آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. [۲] استادیار، گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. [۳] دکتری تخصصی بیولوژی تولیدمثل، استادیار، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *گیرنده‌های شبه تال در سلول‌های اپیتلیال لوله رحمی در واکنش‌های ایمنی با اسپرم و پاتوژن‌ها نقش دارند. این مطالعه به منظور مقایسه عملکرد و پاسخ گیرنده‌های شبه تال TLR3, 4,5 در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک در حضور اسپرم در شرایط in vitro انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی سلول‌های OE-E6/E7 همراه با نمونه اسپرم تازه به‌دست آمده از افراد نورموزواسپرمی (N=10) و لیگاندهای اختصاصی گیرنده‌های شبه تال TLR3, 4,5 در سه گروه اسپرم، لیگاندهای اختصاصی و اسپرم + لیگاندهای اختصاصی کشت داده شدند. رده سلولی بدون افزودن اسپرم و لیگاند به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. غلظت سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 ترشح شده از سلول‌های OE-E6/E7 در هر چهار گروه با کمک الایزا تعیین گردید.*

یافته‌ها: *مواجهه اسپرم و لیگاندهای اختصاصی با گیرنده‌های شبه تال TLR3, 4,5 در سلول‌های اپیتلیال لوله رحمی منجر به افزایش آماری معنی‌داری در سطح سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 گردید. بین دو گروه لیگاند و لیگاند+اسپرم تفاوت آماری معنی‌داری در میزان تولید این سایتوکاین‌ها از سلول‌های OE-E6 / E7 مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *سلول‌های اپیتلیال لوله رحمی در مواجهه با اسپرم از طریق گیرنده‌های شبه تال پاسخ می‌دهند که این پاسخ به صورت افزایش ترشح سایتوکاین‌ها دیده می‌شود. از آنجا که مواجهه همزمان آنها با اسپرم و لیگاندهای اختصاصی گیرنده‌های شبه تال باعث افزایش تجمعی در ترشح سایتوکاین‌ها نمی‌شود؛ بنابراین احتمالاً مسیر TLRs توسط فاکتورهای دیگری دچار تنظیم منفی می‌شود. برای روشن شدن این موضوع نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه وجود دارد.*

واژه‌های کلیدی: *لوله فالوپ ، اسپرم ، گیرنده‌های شبه تال*

* نویسنده مسؤول: دکتر زهرا زندیه، پست الکترونیکی zandieh.z@iums.ac.ir

نشانی: تهران، بزرگراه همت، جنب برج میلاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تلفن ۸۸۶۲۲۶۸۹-۰۲۱، نمابر ۸۸۶۲۲۶۱۵

وصول ۱۴۰۱/۶/۲۷ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۸/۲ پذیرش ۱۴۰۱/۸/۱۶ انتشار ۱۴۰۲/۳/۳۱

مقدمه

از نظر عملکردی، لوله‌های رحمی محیط مناسبی جهت بلوغ تخمک، ظرفیت‌یابی اسپرم، لقاح، انتقال گامت‌ها، جنین و نهایتاً رشد و تکوین اولیه جنین فراهم می‌کنند.[۱] رحم و لوله‌های رحمی در هنگام مقاربت، در دوران بارداری و پس از زایمان ممکن است در معرض عفونت‌های صعودی قرار گیرند. بنابراین، در این شرایط سلول‌های اپیتلیالی و فیبروبلاست‌های استرومایی رحم و لوله‌های رحمی فاکتورهای مختلفی مانند سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و کموکاین‌ها را ترشح نموده تا پاسخ‌های التهابی علیه تهاجم عوامل میکروبی و پاتوژن‌ها را آغاز کنند.[۱] پاسخ‌های التهابی شدید می‌تواند منجر به عوارض بارداری و حتی ناباروری شود.[۲]

از سویی دیگر، اخیراً نشان داده شده است که بعد از مقاربت، بیان ژن‌های دخیل در مسیر سایتوکاین‌ها افزایش می‌یابد[۳] و تحت تاثیر اسپرم‌ها و تعامل آنها با سلول‌های اپیتلیالی دستگاه تناسلی مونث بیان سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد افزایش یافته و حالتی التهابی ایجاد می‌شود.[۴]

گیرنده‌های شبه تال (TLRs) گروهی از پروتئین‌های غشایی منفرد و با نقش غیرکاتالیزوری در سیستم ایمنی ذاتی هستند که برای شناسایی مولکول‌های اختصاصی تولید شده توسط میکروب‌ها و عوامل بیماری‌زا (پاتوژن‌ها) حیاتی هستند. تا به امروز، سیزده عضو از خانواده TLR شناسایی شده‌اند. TLRs 1-10 در ژنوم انسان یافت می‌شود و TLRs 11-13 در موش مشاهده می‌شود. در ساختار

پروتئینی گیرنده‌های TLR، در قسمت N ترمینال خارج سلولی، تکرارهای غنی از لوسین وجود دارد که به الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن‌ها و نه میزبان، متصل می‌شوند. این تعامل مولکولی به میزبان اجازه می‌دهد تا اجزای خودی و اتولوگ را از اجزای بیگانه تشخیص دهد.[۵] فعالسازی مسیر سیگنالینگ TLR منجر به التهاب، به‌کارگیری فراخوانی سلول‌های ایمنی، ترشح فاکتورهای ضدمیکروبی به منظور حذف پاتوژن‌ها و متعاقباً القای پاسخ‌های ایمنی اکتسابی می‌شود. علاوه بر این، TLRs در تعامل ایمنی بین اسپرم و لوله‌های فالوپ دخیل بوده و با فرایندهای تخمک گذاری، ظرفیت‌یابی اسپرم، لقاح و بارداری مرتبط هستند. به عنوان مثال در گاو نشان داده شده است که التهاب القایی توسط اسپرم از طریق مسیر سیگنالینگ TLR2/ 4 میانجیگری می‌شود.[۶] در مطالعه قبلی ما نشان داده شد که مواجهه اسپرم دارای آسیب DNA با سلول‌های لوله فالوپ باعث تنظیم افزایشی کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های التهابی از طریق فعالسازی مسیر TLR می‌شود.[۷]

از آنجایی که رسپتورهای شبه تال هم در شرایط فیزیولوژیک و در تعامل مابین اسپرم و سلول‌های لوله فالوپ و هم در شرایط پاتولوژیک و شناخت پاتوژن‌های آسیب زننده به دستگاه تولید مثلی مونث نقش ایفا کرده و باعث القای پاسخ‌های التهابی می‌شوند؛ مطالعه حاضر بر آن است که با شبیه‌سازی شرایط عفونی در داخل لوله‌های رحمی به عنوان حالتی پاتولوژیک (با افزودن لیگاندهای اختصاصی TLRs) و مقایسه آن با حالت فیزیولوژیک لوله‌های رحمی در شرایط in vitro به مقایسه عملکرد رسپتورهای شبه تال و میزان پاسخ التهابی ایجاد شده در حضور اسپرم بپردازد و به این سوال پاسخ دهد که حضور اسپرم در شرایط مختلف (فیزیولوژیک و پاتولوژیک) در داخل لوله‌های رحمی باعث ایجاد چه میزانی از پاسخ التهابی ناشی از تحریک گیرنده‌های شبه تال در سلول‌های اپیتلیال لوله رحم می‌شود؟

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی نمونه سیمن تازه ۱۰ مرد مراجعه کننده نورموزواسپرمی به درمانگاه نازایی بیمارستان ولیعصر تهران برای اهدا جنین و یا تعیین جنسیت که حداقل صاحب یک فرزند بودند؛ طی سال ۱۳۹۹ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان (IR.ACECR.ROYAN.REC.EC/91/1084) قرار گرفت. از تمامی مردان رضایت‌نامه کتبی شرکت آگاهانه در مطالعه اخذ شد.

کشت رده سلولی OE-E6/E7 : رده سلولی نامیرای لوله فالوپ انسانی در محیط DMEM-F12 (Gibco, England) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. محیط DMEM-F12 غنی شده با سرم گاوی (FBS) ۱۰ درصد، ال- گلوتامین یک درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین یک درصد بوده و سلول‌ها تا زمان کانفلوئنت شدن در داخل این محیط کشت نگهداری شدند.

آماده سازی اسپرم: پس از انجام آنالیز اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO2010، نمونه‌ها با روش گرادیانت شستشو داده شدند. بدین منظور از کیت گرادیانت cook استفاده شد. در داخل یک لوله فالکون ۱۴cc، ابتدا ۱/۵cc از گرادیانت ۸۰ درصد و سپس ۱/۵cc از گرادیانت ۴۰ درصد ریخته و میزان ۲-۱ cc نمونه اسپرم به آرامی بر روی آن اضافه شد. نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با دور 600g سانتریفیوژ شده و پلت حاوی اسپرم‌های زنده و متحرک که در انتهای لوله قرار گرفته به آرامی جدا و به داخل یک لوله 5cc ریخته شد. در این مرحله با استفاده از محیط Ham's F10 به علاوه ۱۰ درصد آلبومین انسانی، پلت سلولی دو بار به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm شستشو داده شده و در مرحله آخر، میزان ۰/۵ cc از محیط شستشو به آرامی بر روی پلت ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور قرار گرفت تا اسپرم‌ها به طور کامل swim up کنند.

هم کشتی اسپرم با OE-E6/E7: سلول‌ها پس از رسیدن به مرحله کانفلوئنسی در فلاسک‌های T75، تریپسینه شده و و در داخل دیش‌های ۱۲ چاهکی پاساژ داده شدند. زمانی که سلول‌ها حدود ۷۰ درصد confluent شدند؛ تعداد ۱۵۰۰-۱۰۰۰ عدد اسپرم آماده شده انتخاب و به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت سلول‌ها قرار گرفتند. در این مرحله برای بررسی عملکرد رسپتورهای شبه تال در مجاورت لیگاند و اسپرم ۴ گروه زیر تعریف شدند و تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد.

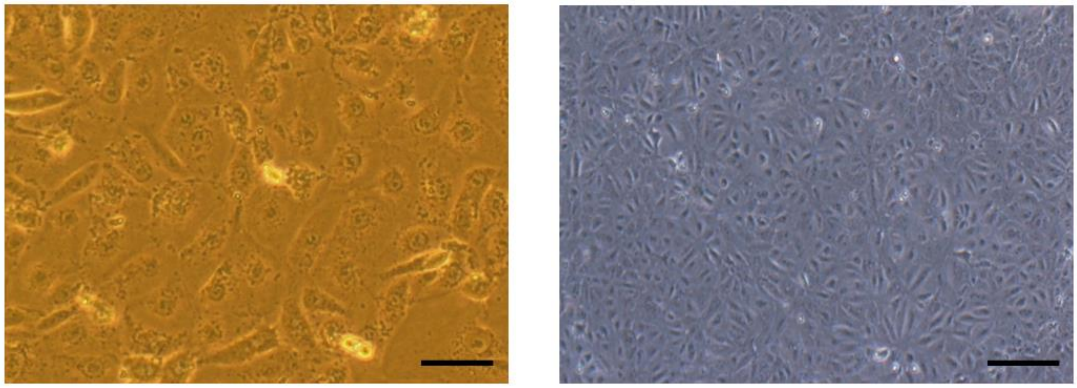
گروه اول: سلول‌هایOE-E6/E7 بدون هیچگونه تیمار به عنوان گروه کنترل.

گروه دوم: اسپرم نرمال در مجاورت رده سلولی OE-E6/E7.

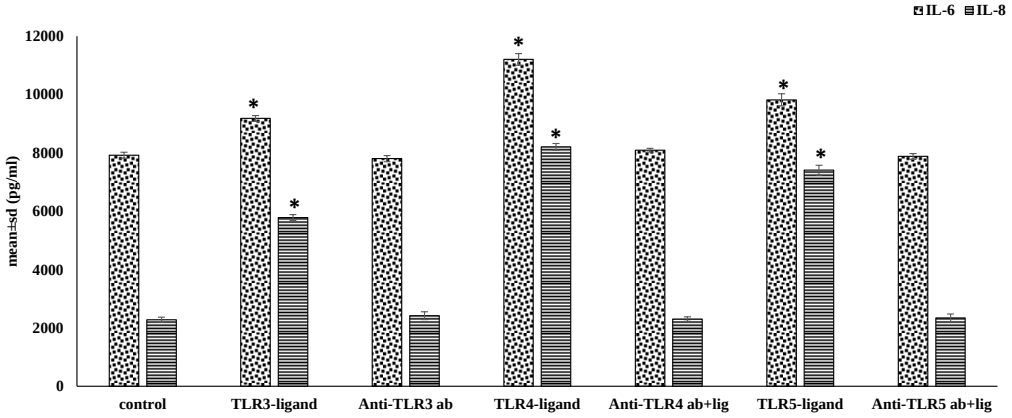
گروه سوم: لیگاند TLR (TLR3 , TLR4 و TLR5 به صورت جداگانه) در مجاورت رده سلولیOE-E6/E7.

گروه چهارم: لیگاند TLR (TLR3 , TLR4 و TLR5 به صورت جداگانه) + اسپرم نرمال در مجاورت رده سلولی OE-E6/E7.

ارزیابی عملکرد رسپتورهای شبه تال در مجاورت لیگاند TLR3، TLR4و TLR5 در رده سلولی OE-E6/E7: ابتدا سلول‌ها در دیش ۱۲ چاهکی کشت داده شدند. سپس لیگاند TLR3 poly I:C (catalog#tlr1-pic)، به میزان ۲۵ µg/ml در سه چاهک اضافه شد. در گروه بعدی برای اطمینان از این موضوع که افزایش سایتوکاین‌ها در نتیجه فعالیت لیگاند مربوطه است؛ از TLR3 anti-functional antibody در سه چاهک استفاده شد که سلول‌ها به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی تیمار شده و سپس در مجاورت لیگاند TLR3 قرار گرفتند. این فرایند در مورد لیگاند TLR 4 (catalog#tlr4-pic) LPS، به میزان ۱ µg/ml و لیگاند TLR5، purified flagellin



شکل ۱: سلول‌های اپی تلیال لوله فالوپ (رده) در محیط کشت، در مقیاس خطی ۴۰ میکرومتر (بالا) و ۱۰۰ میکرومتر (پایین).



نمودار ۱ : مقایسه کمی غلظت پروتئینی سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 در رده سلولی لوله فالوپ در مواجهه با لیگاندهای TLR3، TLR4 و TLR5 بین گروه‌های کنترل، لیگاند و آنتی‌بادی. میزان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 در مواجهه با لیگاندهای اختصاصی در هر سه مورد افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و آنتی‌بادی نشان داد و استفاده از آنتی‌بادی باعث کاهش در میزان تولید سایتوکاین در حضور لیگاند گردید. میزان بیان در دو گروه کنترل و آنتی‌بادی تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشت.

(catalog#tlr-pic)، به میزان ۱۰۰ ng/ml نیزانجام شد.

اندازه گیری سایتوکین ها با الایزا: ۲۴ ساعت پس از تیمار، مایع رویی سلول‌ها در هر چهار گروه جمع‌آوری شد و پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مایع رویی جداسازی و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام تست الایزا نگهداری شد. تست الایزا برای دو سایتوکاین IL-6 و IL-8 توسط کیت‌های تجاری IL-6 (AviBion) و IL-8 (eBioscience, Vienna, Austria) انجام شد. در این روش برای تعیین غلظت سایتوکاین‌ها از Biotinylated anti human IL-6 antibody و Biotinylated anti human IL-8 antibody استفاده شد.

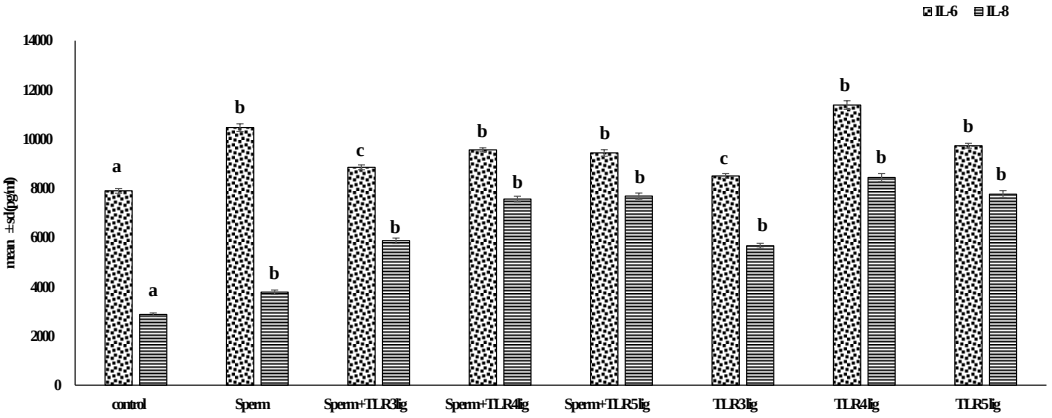
آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون آماری تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و Tukey's multiple comparison test استفاده گردید. داده‌ها به صورت میانگین و خطای استاندارد نشان داده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

شکل یک، رده سلولی نامیرای لوله فالوپ انسانی در محیط Hams F10 را در دو مقیاس ۴۰ و ۱۰۰ میکرون نشان می‌دهد.

ارزیابی عملکرد رسپتورهای شبه تال در مجاورت لیگاند TLR3، TLR4و TLR5 در رده سلولی OE-E6/E7: نمودار یک عملکرد TLR3، TLR4 و TLR5 را در مقابل لیگاندهایشان نشان می‌دهد. در هر سه گیرنده شبه تال، تحریک با لیگاند مربوطه باعث افزایش آماری معنی‌داری در تولید IL-6 و IL-8 شد. همچنین استفاده همزمان از functional blocking antibody و لیگاند باعث کاهش آماری معنی‌داری در میزان تولید سایتوکاین‌ها گردید. تولید سایتوکاین‌ها در دو گروه کنترل و آنتی‌بادی تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

ارزیابی عملکرد TLR3 , TLR4 و TLR5 در مواجهه با لیگاند، اسپرم و اسپرم نرمال+ لیگاند در رده سلولی OE-E6/E7: نمودار ۲ میزان تولید IL-6 و IL-8 توسط سلول‌هایOE-E6/E7 را در چهار گروه لیگاند، اسپرم+لیگاند، اسپرم و کنترل نشان می‌دهد. سنجش میزان تولید سایتوکاین IL-6 با تکنیک ELISA نشان داد که در هر سه گروه



نمودار ۲ : مقایسه کمی غلظت پروتئینی سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 در رده سلولی لوله فالوپ در مواجهه با گروه‌های کنترل، اسپرم، اسپرم + لیگاند و لیگاند. میزان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 در گروه‌های لیگاند (لیگاند TLR3، TLR4 و TLR5)، لیگاندهای TLR+اسپرم و اسپرم افزایش آماری معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. میزان تولید IL-6 در دو گروه لیگاند و لیگاند+اسپرم تنها در مورد لیگاند TLR3 تفاوت آماری معنی‌داری با گروه اسپرم نشان داد (P<۰/۰۵). میزان بیان IL-8 بین دو گروه لیگاند و لیگاند+اسپرم تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشت. در حالی که میزان بیان آن در گروه اسپرم در مقایسه با دیگر گروه‌ها کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). ستون‌های نشان داده شده با حروف متفاوت a ، b و c نسبت به هم تفاوت آماری معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). در موارد نشان داده شده با حروف یکسان تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد.

لیگاند (استفاده از لیگاند TLR3، لیگاند TLR4 و لیگاند TLR5)، اسپرم+ لیگاند و اسپرم افزایش آماری معنی‌داری در تولید IL-6 نسبت به گروه کنترل دیده شد؛ اما میزان تولید IL-6 در گروه‌های لیگاند و لیگاند+اسپرم و اسپرم در TLR4 و TLR5 تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در مورد لیگاند TLR3، تولید IL-6 در دو گروه لیگاند و اسپرم+ لیگاند با گروه اسپرم تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

در رابطه با IL-8 نیز در تمامی گروه‌ها میزان تولید سایتوکاین بیشتر از گروه کنترل بود. در گروه لیگاند و لیگاند+اسپرم تفاوت آماری معنی‌داری در میزان تولید این سایتوکاین مشاهده نشد؛ اما در گروه اسپرم میزان تولید سایتوکاین کمتر ازدو گروه لیگاند و اسپرم+ لیگاند بود (P<۰/۰۵).

بحث

نتایج مطالعه حاضر با استفاده از مدل هم کشتی ساده سلول‌های نامیرای لوله فالوپ با لیگاندهای اختصاصی رسپتورهای شبه تال، اسپرم تازه و ترکیب اسپرم و لیگاندهای اختصاصی TLRs نشان داد که حضور اسپرم و لیگاندهای اختصاصی TLRs میزان تولید سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8، به عنوان شاخصی از عملکرد ایمونولوژیکی رسپتورهای شبه تال را افزایش می‌دهد؛ اما میزان تولید این مارکرهای التهابی بین گروه‌های لیگاند و لیگاند + اسپرم تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

شواهد روزافزونی وجود دارد که لوله‌های فالوپ مجهز به سیستم ایمنی ذاتی کارآمدی است که قادر به شناسایی، تمایز و واکنش به سیگنال‌های صادره از پاتوژن‌ها، عوامل میکروبی و اسپرم است.[۱] ایمنی ذاتی از طریق رسپتورهای شبه تال به سیگنال‌های دریافتی از این عوامل پاسخ داده و با فعالسازی مسیرهای سیگنالینگ باعث ترشح طیف وسیعی از واسطه‌های ایمونولوژیکی همچون اینترفرون، TNF، IL-6، IL-8، GMCSF MCP-1 و TNF-α از سلول‌های اپیتلیال لوله فالوپ انسان می‌شود.[۸] در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است که تعامل بین اسپرم و سلول‌های اپیتلیال لوله‌های فالوپ بر تحرک و عملکرد اسپرم اثر داشته و به‌واسطه مسیر سیگنالینگ TLRs منجر به تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی می‌شود.[۹] تغییر بیان سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و فاکتورهای رشد در سلول‌های OE-E6/E7 توسط اسپرم انسانی نیز نشان داده شده است.[۱۰] Ezz و همکاران در یک مطالعه in vitro از طریق هم کشتی سلول‌های اپیتلیال اندومتر گاوی با اسپرم نشان دادند که اسپرم با به‌کار گرفتن سیگنالینگ TLR2/4 در مسیر وابسته به MyD88 باعث فعال شدن اجزا پایین دست p38MAPK و JNK شده و فعال شدن این اجزا به نوبه خود باعث القای تولید TNFA، IL-1B، IL-8 و پروستاگلندین E می‌شود.[۶] ما در مطالعه قبلی به کمک PCR array نشان دادیم که هم کشتی اسپرم دارای آسیب بالای DNA با رده سلولی OE-E6/E7 به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش بیان TLR–1، TLR–2، TLR–6، MYD88، TIRAP، IRAKS، TRAF6، MAPKS، NF-KB، G-CSF، GM-CSF، CXCL8، CXCL10، CCL2، IL–6، IL–1 و TNFα می‌شود.[۷] در توافق با داده‌های قبلی، مطالعه حاضر نیز نشان داد که سطح تولید سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 در رده سلولی OE-E6/E7 در مواجهه با اسپرم نرمال به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل است. سایتوکاین‌ها نقش مهمی را در دستگاه تولید مثلی مونث ایفا می‌کنند. برای مثال IL-6 می‌تواند باعث القای ظرفیت‌یابی اسپرم، واکنش آکروزومی و افزایش فعالیت فاکتورهای مرتبط با لانه‌گزینی

گردد و نیز در رشد جنین در دوره پیش از لانه‌گزینی ایفای نقش کند.[۱۱و۱۲] سایتوکاین IL-8 نیز از اجزای فعال فیزیولوژی لوله فالوپ است که به میزان زیادی در اواخر فاز پرولیفراتیو و نزدیک به زمان تخمک‌گذاری در لایه اپیتلیال لوله فالوپ یافت می‌شود.[۱۲]

از سویی دیگر، ترشح سایتوکاین‌ها در هنگام هجوم پاتوژن‌ها به سیستم تناسلی مونث نیز افزایش می‌یابند تا سریعاً وارد عمل شده و از آسیب به سد اپی تلیالی توسط میکروارگانیسم‌ها و ایجاد التهاب مزمن بافتی جلوگیری شود. این ارگانیسم‌های پاتوژن توسط TLR ها در دستگاه تناسلی مونث شناسایی می‌شوند.[۱۳] مکانیسم شناسایی پاتوژن‌ها از طریق این رسپتورها، در کنترل و درمان بیماری‌های عفونی منتقل شونده جنسی بسیار موثر است. در مطالعه هم کشتی حاضر، مواجهه رده سلولی OE-E6/E7 با لیگاندهای اختصاصی TLRs منجر به افزایش ترشح سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 در مقایسه با گروه کنترل شد. در همین راستا، در مطالعه‌ای استفاده از لیگاند اختصاصی TLR3 (poly I:C) باعث تولید IL-6، IL-8، TNF-α، IFN-β و نیز فاکتورهای آنتی میکروبیال نظیر HBD2 در سلول‌های اپیتلیال لوله فالوپ شد و استفاده از anti-TLR3 antibody از تولید سایتوکاین و فاکتورهای آنتی میکروبیال جلوگیری کرد.[۱۴] در مرحله آخر مطالعه حاضر، اسپرم به همراه لیگاند در مجاورت رده سلولی قرار داده شدند. نتایج به‌دست آمده برخلاف انتظار ما مبنی بر تولید بیشتر سایتوکاین‌ها در این حالت در مقایسه با گروه لیگاند یا گروه اسپرم به تنهایی بود و نتایج افزایش معنی‌داری در تولید IL-8 توسط سلول‌های OE-E6/E7 در گروه اسپرم+لیگاند نسبت به گروه لیگاند به تنهایی و یا در تولید IL-6 در گروه اسپرم+لیگاند نسبت به اسپرم به تنهایی را نشان نداد. یکی از عواملی که می‌تواند در جلوگیری از تولید بیش از حد سایتوکاین‌های التهابی و فعال شدن TLR ها دخالت داشته باشد؛ تنظیم کننده‌های منفی مسیر سیگنالینگ TLR ها هستند.[۱۵] فعالیت کنترل نشده TLR ها می‌تواند از طریق تولید بیش از حد واسطه‌های التهابی باعث بیماری‌های شدیدی نظیر عفونت، آترواسکلروز و لوپوس سیستماتیک شود.[۱۶] برای کنترل مسیر سیگنالیگ و جلوگیری از ایجاد بیش از حد التهاب، تنظیم کننده‌های منفی TLR ها وارد عمل می‌شوند. تعداد زیادی از این تنظیم کننده منفی مانند RP105، A20، microRNA-19a، β-arrestin 2 و RNF182 توسط محققین شناسایی شده‌اند.[۱۷] این تنظیم کننده‌ها فعالیت خود را با جلوگیری یا تعدیل عملکرد اجزای مسیر سیگنالینگ TLR، دخالت در شناسایی لیگاند و کاهش بیان TLR ها انجام می‌دهند.[۱۶] علاوه بر تنظیم کننده‌های منفی، فاکتورهای ضدالتهابی نیز در طول پاسخ‌های ایمنی به صورت غیرمستقیم تولید می‌شوند که می‌توانند مسیر TLR ها را در جهت منفی تنظیم کنند. از جمله این فاکتورهای ضدالتهابی IL-10 و TGF-β هستند. TGF-β دارای اثرات سرکوب ایمنی متعددی در ایمنی ذاتی و اکتسابی است.[۱۸] این فاکتور ضدالتهابی از انتقال پیام در مسیر سیگنالینگ وابسته به MYD-88 ممانعت به عمل می‌آورد و در حقیقت باعث از بین رفتن پروتئین MYD88 می‌شود.[۱۹] TGF-β از فاکتورهای ضدالتهابی مهم در لوله فالوپ و نیز از فاکتورهای موجود در پلاسمای اسپرم است که نقش سرکوب کننده ایمنی در دستگاه تولیدمثلی زنان را در هنگام ورود اسپرم به عهده دارد[۲۰] و می‌تواند در تنظیم منفی دخالت داشته باشد؛ اما تائید این موضوع نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که حضور اسپرم و پاتوژن‌ها به تنهایی باعث افزایش تولید فاکتورهای التهابی در لوله می‌شود؛ اما حضور همزمان لیگاندها (نماینده پاتوژن‌ها) و اسپرم احتمالاً به علت حضور مکانیسم‌های تنظیم کننده منفی تولید فاکتورهای التهابی را به صورت هم‌افزایی افزایش نخواهد داد. برای فهم بهتر این موضوع و این که با چه مکانیسمی حضور اسپرم+ لیگاند علیرغم انتظار، سبب تولید بیش از حد سایتوکاین‌های التهابی نمی‌شود؛ نیاز به تحقیقات بیشتری به خصوص بر روی مسیرهای تنظیم کننده منفی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی (کد ۳-۴۵۷) پژوهشگاه رویان بود و با حمایت مالی آن مرکز به انجام رسید. بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر مهدی مهدی‌زاده که نظرات ایشان در انجام مطالعه بسیار یاری‌رسان بود؛ سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از سرکار خانم ارغوان جانان کارشناس آزمایشگاه کشت سلول پژوهشگاه رویان تشکر می‌نماییم. بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

References

1. Marey MA, Aboul Ezz M, Akthar I, Yousef MS, Imakawa K, Shimada M, et al. Sensing sperm via maternal immune system: a potential mechanism for controlling microenvironment for fertility in the cow. J Anim Sci. 2020 Aug; 98(Suppl 1): S88-S95. doi: 10.1093/jas/skaa147

2. Mårdh PA. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. Curr Opin Infect Dis. 2004 Feb; 17(1): 49-52. doi: 10.1097/00001432-200402000-00010

3. Ajdary M, Zandieh Z, Amjadi FS, Keyhanfar F, Mehdizadeh M, Aflatoonian R. Interaction of sperm with endometrium can regulate genes involved in endometrial receptivity pathway in mice: An experimental study. Int J Reprod Biomed. 2020 Oct; 18(10): 815-24. doi: 10.18502/ijrm.v13i10.7765

4. Robertson SA, Sharkey DJ. Seminal fluid and fertility in women. Fertil Steril. 2016 Sep; 106(3): 511-19. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1101

5. Zheng W, Xu Q, Zhang Y, Xiaofei E, Gao W, Zhang M, et al. Toll-like receptor-mediated innate immunity against herpesviridae infection: a current perspective on viral infection signaling pathways. Virol J. 2020; 17(1): 192. doi: 10.1186/s12985-020-01463-2

6. Ezz MA, Marey MA, Elweza AE, Kawai T, Heppelmann M, Pfarrer C, et al. TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro. PLoS One. 2019 Apr; 14(4): e0214516. doi: 10.1371/journal.pone.0214516.

7. Zandieh Z, Ashrafi M, Aflatoonian K, Aflatoonian R. Human sperm DNA damage has an effect on immunological interaction between spermatozoa and fallopian tube. Andrology. 2019 Mar; 7(2): 228-34. doi: 10.1111/andr.12574

8. Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. Hum Repord. 2005 Jun; 20(6): 1439-46. doi: 10.1093/humrep/deh806

9. Zhu X, Shi D, Li X, Gong W, Wu F, Guo X, et al. TLR signalling affects sperm mitochondrial function and motility via phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3α. Cell Signal. 2016 Mar; 28(3): 148-56. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.12.002

10. Mousavi SO, Mohammadi R, Amjadi F, Zandieh Z, Aghajanpour S, Aflatoonian K, et al. Immunological response of fallopian tube epithelial cells to spermatozoa through modulating cytokines and chemokines. J Reprod Immunol. 2021 Aug; 146: 103327. doi: 10.1016/j.jri.2021.103327

11. Govahi A, Zahra Z, Fatemehsadat A, Azin A, Reza A. P-099 MYD88 dependent pathway through TLR 1,2 and 6 activation play a role in interaction of high DNA fragmented human sperm with fallopian tube epithelial cells. Human Reproduction. 2021 Jul; 36(Suppl 1): deab130.098. doi: 10.1093/humrep/deab130.098

12. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev. 2005 Aug; 206: 306-35. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x

13. Nasu K, Narahara H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. Mediators Inflamm. 2010; 2010: 976024. doi: 10.1155/2010/976024

14. Zandieh Z, Amjadi F, Vakilian H, Aflatoonian K, Amirchaghmaghi E, Fazeli A, et al. Sex hormones alter the response of Toll-like receptor 3 to its specific ligand in fallopian tube epithelial cells. Clin Exp Reprod Med. 2018 Dec; 45(4): 154-62. doi: 10.5653/cerm.2018.45.4.154

15. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annu Rev Biochem. 2007; 76: 447-80. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060605.122847

16. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat Rev Immunol. 2005 Jun; (6): 446-58. doi: 10.1038/nri1630

17. Bale S, Varga J, Bhattacharyya S. Role of RP105 and A20 in negative regulation of Toll-like receptor activity in fibrosis: potential targets for therapeutic intervention. AIMS Allergy and Immunology. 2021; 5(2): 102-26. doi: 10.3934/Allergy.2021009

18. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. Immunity. 2006 Sep; 25(3): 455-71. doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.011

19. Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. J Biol Chem. 2005 Feb; 280(7): 5491-95. doi: 10.1074/jbc.C400503200

20. Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. J Anim Sci. 2007 Mar; 85(13 Suppl): E36-44. doi: 10.2527/jas.2006-578