Summer (2023) 12(45): 45-55
DOI: 10.30473/eab.2023.68036.1911
Received: 28 May 2023 Accepted: 4 Nov 2023

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

The presence of Interleukin 35 in seminal plasma: is it a significant issue in male infertility?

Sanaz Alaee[1], Mahmoud Sadeghi Ataabadi[2], Hamideh Homayoun[3], Bahia Namavar Jahromi[4], Elham Hosseini[5*]

[1]Department of Reproductive Biology, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran; and Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[2]Department of Reproductive Biology, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[3]Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[4]Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, and Infertility Research Center, Zeynab Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[5]Department of Obstetrics and Gynecology, Mousavi Hospital, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Correspondence
Elham Hosseini
Email: elhamhosseinid@gmail.com

How to cite
Alaee, S., Sadeghi Ataabadi, M., Homayoun, H., Namavar Jahromi, B. & Elham Hosseini, E. (2023). The presence of Interleukin 35 in seminal plasma: is it a significant issue in male infertility?. *Experimental Animal Biology, 12*(45), 45-55.

ABSTRACT
Approximately half of infertility in couples can be attributed to male factors, which may occur in a wide range of causes. Examining seminal plasma parameters is the initial and simplest approach in male infertility evaluation and provides valuable information about fertility status. In this study, the presence and relationship between the concentration of interleukin 35 (IL-35) in seminal plasma and standard parameters of sperm in infertile men were investigated. Semen analysis was performed on semen samples of men referred to the Infertility Center of Shiraz University of Medical Sciences. Semen samples were analyzed in accordance with the laboratory guidelines of the World Health Organization and were divided into three groups including 21 normozoospermic, 21 asthenoteratozoospermic, and 15 azoospermic samples. The seminal concentration level of IL-35 was analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Results showed that IL-35 was detectable with different levels in the seminal plasma of studied groups, however, its concentration did not show a statistically significant difference ($p>0.05$). The correlation analysis between IL-35 concentration and sperm standard parameters showed that there is a significant negative correlation between IL-35 concentration and the normal sperm morphology percentage ($r=0.317$, $p=0.04$), while no significant correlation was observed with sperm count ($r=-0.27$, $p=0.08$) and sperm motility ($r=-0.27$, $p=0.08$). Despite the presence of IL-35 in semen, even in normozoospermic male patients, its role and functional significance have not been determined. The existence of a negative relationship between the IL-35 concentration and the normal sperm morphology percentage can indicate its importance in male infertility status.

KEYWORDS
Interleukin 35, Seminal plasma, Sperm quality.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.).

سال دوازدهم، شماره اول، پیاپی چهل و پنجم، تابستان ۱۴۰۲ (۵۵-۴۵)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳
DOI: 10.30473/eab.2023.68036.1911

نشریه علمی
زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

وجود اینترلوکین ۳۵ در پلاسمای منی: آیا مسئله مهمی در ناباروری مردان محسوب می شود؟

ساناز علائی[۱]، محمود صادقی عطاآبادی[۲]، حمیده همایون[۳]، بهیه نام آور جهرمی[۴]، الهام حسینی[۵*]

[۱]گروه بیولوژی تولیدمثل، دانشکده علوم و فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران؛ و مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
[۲]گروه بیولوژی تولیدمثل، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
[۳]گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
[۴]گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران؛ و مرکز تحقیقات ناباروی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
[۵]گروه زنان و زایمان، بیمارستان موسوی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

نویسنده مسئول:
الهام حسینی
رایانامه: elhamhosseinid@gmail.com

چکیده

علت حدوداً نیمی از ناباروری‌ها در زوجین مربوط به فاکتورهای مردانه است که می‌تواند به دلایل گوناگونی رخ دهد. بررسی متغیرهای پلاسمای منی اولین و ساده‌ترین روش بررسی ناباروری در مردان است و اطلاعات ارزنده‌ای از وضعیت باروری فرد در اختیار قرار می‌دهد. در این مطالعه، حضور و ارتباط میان میزان غلظت اینترلوکین ۳۵ (IL-35) مایع منی با متغیرهای استاندارد اسپرم در مردان نابارور بررسی گردید. تجزیه و تحلیل مایع منی روی نمونه‌های منی مردان مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری حضرت زینب(س) دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گردید. نمونه‌های منی بر اساس دستورالعمل آزمایشگاهی سازمان بهداشت جهانی بررسی و به سه گروه تقسیم‌بندی شدند که شامل ۲۱ نمونه نرمال، ۲۱ نمونه آستنوتراتوزواسپرمی و ۱۵ نمونه آزواسپرمی بودند. حضور و سطح غلظت IL-35 پلاسمای منی در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. بررسی IL-35 بیانگر حضور این اینترلوکین در مایع منی هر سه گروه مورد مطالعه است، اما غلظت آن از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نشان نداد ($p>0.05$). تجزیه و تحلیل همبستگی و ارتباط میان غلظت IL-35 با متغیرهای استاندارد اسپرم نشان داد که بین غلظت IL-35 با درصد مورفولوژی نرمال اسپرم همبستگی منفی معناداری وجود دارد ($r=-۰/۳۱۷$، $p=۰/۰۴$)، درحالیکه همبستگی معنادار با تعداد اسپرم ($r=-۰/۲۷$، $p=۰/۰۸$) و حرکت اسپرم ($r=-۰/۲۷$، $p=۰/۰۸$) مشاهده نشد. با وجود اثبات حضور IL-35 در مایع منی حتی در مردان با متغیرهای نرمال، نقش و اهمیت عملکردی آن هنوز مشخص نشده است. وجود رابطه منفی بین غلظت IL-35 با درصد مورفولوژی نرمال اسپرم می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت آن در توانایی باروری مردان باشد.

واژه‌های کلیدی

اینترلوکین ۳۵، پلاسمای منی، کیفیت اسپرم.

استناد به این مقاله:
علائی، ساناز، صادقی عطاآبادی، محمود، همایون، حمیده، نام آور جهرمی، بهیه و حسینی، الهام (۱۴۰۲). وجود اینترلوکین ۳۵ در پلاسمای منی: آیا مسئله مهمی در ناباروری مردان محسوب می شود؟. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی, ۱۲(۴۵)، ۵۵-۴۵.

مقدمه

ناباروری و مشکلات فردی و اجتماعی ناشی از آن به عنوان یکی از مسائل مهم بسیاری از زوج‌ها محسوب می‌شود. ناباروری در مردان می‌تواند به دلایل گوناگونی رخ دهد. بررسی متغیرهای مایع منی اولین، ارزانترین و ساده ترین روش بررسی ناباروری در مردان است (Rahbar & Abbasi, 2020; Sharkey *et al*., 2017). متاسفانه در برخی از مردان علل ناباروری ناشناخته است،که صرفا بازتابی از عدم شناخت کافی از مکانیسم‌های دخیل در روند اسپرم‌زائی می‌باشد (Karavolos *et al*., 2020; Ko *et al*., 2014). آنالیز مایع منی شامل ارزیابی تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم می‌باشد که به طور وسیعی به عنوان ارزیابی اولیه در بررسی ناباروری مردان و تعیین کیفیت مایع منی مورد استفاده قرار گرفته و اطلاعات ارزنده‌ای از وضعیت باروری فرد در اختیار قرار می‌دهد (Ferlin & Foresta, 2020). تست‌های دیگری نیز وجود دارند که با بررسی مستقیم و غیرمستقیم اسپرم، کیفیت و عملکرد آن را ارزیابی می‌نمایند؛ اما تست‌هایی که بصورت غیرمستقیم کیفیت اسپرم را بررسی می‌کنند به دلیل عدم استفاده از سلول اسپرم و عدم آسیب به آن حائز اهمیت می‌باشند. با این وجود در برخی مواقع، نتایج این تست‌ها با نتایج قدرت باروری طبیعی فرد همخوانی ندارد، زیرا این ارزیابی‌ها نمی‌توانند به طور کامل نشان دهنده عملکرد اسپرم و قدرت آن در باروری تخمک باشند (Keel, 2004; Wang & Swerdloff, 2014).

فاکتورهای متعددی در فرآیند اسپرماتوژنز دخیل هستند که کمبود یا افزایش آن‌ها می‌تواند بر روند اسپرماتوژنز تاثیرگذار باشد. بسیاری از عوامل درون و خارج از بیضه‌ای می‌توانند سبب تغییر در متغیرهای نرمال اسپرم گردند. علیرغم تلاش‌های متعدد محققان برای شناسایی علل زمینه‌ای ناباروری مردان، حدود ۷۰ درصد موارد ناشناخته باقی مانده‌اند (Babakhanzadeh *et al*., 2020; Kumar & Singh, 2022). اگرچه هورمون‌های محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی برای اسپرم‌زائی ضروری هستند اما فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها نیز نقش بسزایی در مکانیسم‌های موضعی کنترل عملکرد بیضه و تولید اسپرم دارند (Salas-Huetos & Aston). در بسیاری از مطالعات ارتباط میان فاکتورهای موجود در پلاسمای منی با کیفیت و کمیت منی نشان داده شده است (Emokpae & Moronkeji, 2020). سیتوکین‌ها واسطه‌های مهم ایمنی هستند و می‌توانند در فرآیندهای متعددی در دستگاه تناسلی مردان مانند تعدیل‌کننده ایمنی غدد جنسی مردانه نقش داشته باشند. از طرفی ایمنی سلولی از طریق سیتوکین‌ها نیز نقش مهمی در ناباروری مردان دارد (Archana *et al*., 2019). مکانیسم‌های دفاعی بیضه دو جنبه دارند: محافظت از آنتی‌ژن‌های خودی[1] (اتوآنتی ژن) در برابر پاسخ‌های مضر ایمنی و مقابله با عوامل بیماری‌زای میکروبی مهاجم. بیضه پستانداران یک اندام با ویژگی ممتاز[2] تحمل ایمنی است که می تواند هر دو اتو و آلوآنتی ژن[3] را بدون برانگیختن پاسخ ایمنی، تحمل کند (Zhao *et al*., 2014). سیتوکین‌ها که اصولا پاسخ‌های ایمنی و التهاب را تنظیم می‌کنند، پروتئین‌های محلولی هستند که بوسیله سلول‌های سیستم ایمنی ترشح می شوند. آنها همچنین به عنوان یک فاکتور رشد و تمایزی عمل می‌کنند که به هماهنگ و موزون کردن ارتباطات سلولی در شرایط عملکردی فیزیولوژیک کمک می‌کنند (Sharkey *et al*., 2017). منی انسان از سلول‌های مختلف (اسپرم، اپیتلیال و لکوسیت‌ها) و پلاسمای منی تشکیل شده است. پلاسمای منی شامل محصولات پروتئینی و غیرپروتئینی تولید شده توسط سلول‌های سرتولی، مجاری و غدد ضمیمه تولیدمثلی می‌باشد. این پلاسما دارای انواع مختلف سیتوکین و فاکتورهای رشد مانند TNF-alpha و اینترلوکین ها، TGF و ... می‌باشد. رابطه میان سیتوکین‌ها و تولیدمثل انسان به خاطر دخالت آنها در فیزیولوژی تولیدمثل و عملکرد غدد موضوع بسیاری از مطالعات بوده است (Syriou *et al*., 2018). سیتوکین‌ها بوسیله تعداد زیادی از سلول‌ها در مسیر سیستم تولیدمثلی مرد مانند سلول‌های بیضه، اپیدیدیم و یا توسط سلول‌های ایمنی که حتی در غیاب التهاب نیز حضور دارند، تولید و ترشح می شوند و به صورت موضعی اثرات خود را اعمال نمایند. همچنین اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز منبع تولید و ترشح چندین سیتوکین پیش التهابی است. اینترلوکین‌ها و TNF-α بعنوان فاکتور رشد در سلول‌های سرتولی و زایا شناسایی شده‌اند (Syriou *et al*., 2018). سیتوکین‌ها رشد و تمایز سلول‌ها در قسمت‌های اندوکرین و توبولار بیضه را تنظیم می‌کنند و به طور بالقوه جمعیت‌های سلولی دخیل در اسپرم‌زائی را تحت تاثیر قرار داده و بر مراحل پس از اتمام میوز و اسپرمیوژنز، حرکت، زنده‌مانی و قدرت نفوذ اسپرم به تخمک تاثیر دارند (Sharkey *et al*., 2017). علاوه بر این، سیتوکین‌های پلاسمای منی، پس از نزدیکی بر دستگاه تولید مثلی زن تاثیر گذاشته و با ایجاد تغییراتی سیستم ایمنی را برای وفق دادن با بارداری و تحمل نسبت به آنتی‌ژن‌های پدری که در جنین بیان می‌شوند آماده می‌نمایند (Robertson & Sharkey, 2016; Sharkey *et al*.,

1. Autoantigen
2. Immune privileged organ
3. Alloantigen

2017). افزایش میزان IL-6 در افراد مبتلا به الیگواسپرمی، افزایش غلظت IL-8 و IL-10 در افراد آستنوزواسپرمی و افزایش IL-6 و IL-10 و TNF-α و IFN-c در مردان دارای آزواسپرمی انسدادی نشان داده شده است (Seshadri *et al*., 2009). بنابراین بررسی حضور و عملکرد این فاکتورها در مایع منی افراد بارور و نابارور ممکن است در مدیریت ناباروری مردان مفید واقع گردد.

اینترلوکین ۳۵ (IL-35)[1] سایتوکاینی است که از سلول‌های سلول‌های Treg[2] ترشح شده و در بسیاری از بیماری‌های التهابی، خودایمنی، بدخیمی‌ها و بیماری‌های عفونی نقش ضدالتهابی و تعدیل کننده سیستم ایمنی داشته و همچنین در پاتوژنز برخی از بیماری‌ها نیز نقش دارد (Bello *et al*., 2018; Cao *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2019). IL-35 بخشی از خانواده اینترلوکین است که این خانواده شامل IL-12، IL-23، IL-27 و IL-35 هستند. IL-35 دارای اثر سرکوب‌کننده ایمنی بر Th17 است که از طریق تحریک انجام می‌شود و تمایز سلولی Th17 را مهار می‌کند. تحت تأثیر IL-35، سلول‌های $CD4^{+}CD25^{+}T$ سایتوکاین IL-10 و سلول‌های $CD4^{+}CD25^{-}T$ اینترفرون گاما[3] تولید می‌کنند. بنابراین، IL-35 یک سایتوکین ضدالتهابی است که پاسخ ایمنی را مهار می‌کند (Collison *et al*., 2010; Vignali & Kuchroo, 2012). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که IL-35 در بیضه بیان می‌شود و در ایجاد حفظ ایمنی در بیضه جهت جلوگیری از آسیب به اسپرم‌ها و عملکرد اسپرم‌زائی نقش دارد (Terayama *et al*., 2014). همچنین مطالعه دیگری روی مردان دارای سرطان پروستات انجام گردید که نشان داد که میزان اینترلوکین ۳۵ در پلاسمای خون با سرطان پروستات ارتباط دارد و می‌تواند به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی دهنده مستقل که بیانگر پیشرفت و متاستاز سرطان پروستات باشد بکار رود (Zhou *et al*., 2017). در مطالعه بر روی بیماران مبتلا به عفونت پروستات مزمن نشان داده شد که نسبت سایتوکاین‌های پیش–التهابی و ضد–التهابی در مایع منی ممکن است در نتیجه التهاب ناشی از پروستاتیت نامتعادل شود که می‌تواند تأثیر منفی بر کیفیت و عملکرد اسپرم داشته باشد (Babinets *et al*., 2020).

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با حضور اینترلوکین ۳۵ در پلاسمای منی بیماران با متغیرهای اسپرم نرمال و غیرنرمال انجام نگردیده است هدف از این مطالعه بررسی حضور احتمالی و میزان غلظت اینترلوکین ۳۵ در مایع منی مردان دارای آنالیز اسپرم نرمال و غیرنرمال و رابطه آن با پاتولوژی‌های مختلف مایع منی شامل آستنوتراتوزوسپرمی و آزواسپرم در مقایسه با نورمواسپرمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد IR.SUMS.REC.1396.S959 تصویب گردیده است.

انتخاب بیماران

نمونه‌های انزالی از ۵۷ مرد که به مرکز درمان ناباروری بیمارستان حضرت زینب (س) شیراز مراجعه نمودند پس از اخذ رضایت نامه کتبی جمع‌آوری گردید. سپس پرسشنامه‌ای در اختیار افراد قرار داده شد تا تنها از نمونه منی افرادی که مطابق با معیارهای ورود و خروج به مطالعه بودند استفاده گردد. افراد دارای سن بالاتر از ۴۵ سال، سابقه مصرف سیگار، مواد مخدر و الکل، داشتن شغل‌هایی که می‌تواند کیفیت اسپرم را تحت تاثیر قرار دهد (از طریق مواجهه با گرمای بسیار زیاد مانند نانواها یا مواد توکسیک مانند صنایع رنگ، پمپ بنزین، کار در هوای آلوده و یا کشاورزانی که در معرض سموم شیمیایی هستند) از مطالعه خارج شدند. همچنین افراد دارای سابقه داشتن واریکوسل یا هرگونه انسداد مجاری تولیدمثلی از مطالعه حذف شدند.

نمونه ها به روش خود انزالی[4] بعد از ۴۸ تا۷۲ ساعت پرهیز از رابطه جنسی[5] در ظرف دهانه گشاد استریل جمع آوری و پس از تحویل به آزمایشگاه، درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. حدود ۳۰ دقیقه پس از مایع‌شدن[6] نمونه‌های منی بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی جهت بررسی آزمایشگاهی و پردازش مایع منی انسان (Organization, 2021) مورد ارزیابی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفتند.

ارزیابی ماکروسکوپی: ابتدا اندازه گیری حجم، تعیین pH و ویسکوزیته مایع منی انجام و ثبت گردید.

ارزیابی متغیرهای استاندارد اسپرم (میکروسکوپی): شامل تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم.

1. Interleukin 35
2. T regulatory
3. Gamma interferon
4. Masturbation
5. Abstinence Sexual
6. Liquefaction

به طور خلاصه، جهت بررسی تحرک اسپرم مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایع منی بر روی لام گذاشته شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰ حرکت اسپرم‌ها درجه‌بندی شد. شمارش تعداد اسپرم‌ها و تعیین غلظت آن با استفاده از لام نئوبار[1] انجام شد. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم از رنگ آمیزی پاپانیکولا[2] استفاده شد. به طور خلاصه، پس از تثبیت اسمیر مایع منی خشک شده در هوا با اتانول ۹۵ درصد (v/v)، لام ها به طور متوالی در اتانول (۸۰ درصد، ۵۰ درصد)، هماتوکسیلین هریس، اتانول اسیدی، اتانول (۵۰ درصد، ۸۰ درصد)، رنگ orange G-6، اتانول (۹۵ درصد، ۹۵ درصد)، رنگ سبز EA-50 و اتانول (۹۵ درصد، ۱۰۰ درصد) غوطه ور شدند. به منظور دستیابی به خطای نمونه گیری قابل قبول، حداقل ۴۰۰ اسپرم در دو تکرار (۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید) ارزیابی شدند. نمونه های نرمال بر اساس استاندارد WHO دارای تعداد اسپرم بیش از ۱۶ میلیون در میلی‌لیتر، مورفولوژی بیش از ۴ درصد طبیعی و حرکت بیش از ۴۲ درصد طبیعی هستند. تراتوزواسپرمی به نمونه‌های با مورفولوژی طبیعی اسپرم کمتر از ۴ درصد، و آستنواسپرمی[3] به نمونه‌های با تحرک پیشرونده و تحرک غیرپیشرونده کمتر از ۴۲ درصد اطلاق می‌شود.

نمونه ها بر اساس دستورالعمل WHO به سه گروه تقسیم‌بندی شدند که شامل ۲۱ نمونه نرمال، ۲۱ نمونه آستنوتراتوزواسپرمی[4] (درصد کل اسپرم‌های متحرک یا پیشرونده و مورفولوژی کمتر از حد نرمال) و ۱۵ نمونه آزواسپرمی[5] (عدم وجود اسپرم در انزال) بودند. سپس یک سی‌سی از مایع منی جهت بررسی میزان IL-35 در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

روش انجام تکنیک الایزا (ELISA)[6]

جهت بررسی حضور و میزان غلظت IL-35 به روش الایزا از کیت (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai Korain Biotech Co, China) استفاده گردید. این کیت بر اساس فناوری ساندویچ آنتی‌بادی دوگانه بیوتین برای سنجش اینترلوکین انسانی ۳۵ استفاده می‌کند. چاهک‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال IL-35 پوشانده شده که جهت به دام انداختن آنتی‌بادی اختصاصی استفاده می‌شود. سپس آنتی‌ژن نشاندار به آنزیم به محیط اضافه شده و از طریق بازوی دیگر آنتی‌بادی به آن متصل می‌شود. در نتیجه آنتی‌بادی اختصاصی در بین دو آنتی‌ژن ساندویچ می‌شود.

در ابتدا نمونه‌ها و استانداردها با توجه به پروتکل کارخانه سازنده آماده شدند. استانداردها با غلظت به ترتیب ۲۴، ۱۲، ۶، ۳ و ۱/۵ نانوگرم/ میلی‌لیتر تهیه شدند. سپس در چاهک‌های مربوط به نمونه‌های استاندارد، ۵۰ میکرولیتر استاندارد آماده شده در چاهک‌های مربوط به نمونه‌های مورد آزمایش ۴۰ میکرولیتر از محلول نمونه اضافه گردید. به چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اینترلوکین ۳۵ افزوده شده روی چاهک‌ها بسته شد و ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس هر چاهک با محلول شستشو (۵ مرتبه)، شستشو داده شد.

جذب نوری (OD)[7] چاهک‌ها پس از اضافه کردن محلول توقف در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه Multiskan spectrum ELISA-Reader اندازه‌گیری شده، سپس با توجه به غلظت استانداردها و مقادیر OD مربوطه، معادله رگرسیون خطی منحنی استاندارد محاسبه گردید. سپس با توجه به مقدار OD نمونه ها غلظت نمونه مربوطه محاسبه شد. حساسیت تست ۰/۰۴۷ نانوگرم/ میلی‌لیتر بوده و محدوده سنجش تست اینترلوکین بین ۰/۱ تا ۴۰ نانوگرم/میلی لیتر بود.

آنالیز داده‌ها

داده‌های حاصل از با استفاده از آزمون آماری Independent Samples T-Test از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ آنالیز شدند. نمایش داده‌ها به صورت mean± SEM ارائه شده و معنی‌دار بودن نتایج در سطح (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شده است. برای بررسی ارتباطات بین متغیرها از Pearson correlation استفاده شد. برای تخمین دقت پیش‌بینی اینترلوکین ۳۵ جهت متغییرهای معنی‌دار از نمودار مشخصه عملکرد (ROC)[8] که با نرم‌افزار SPSS ترسیم شد، استفاده گردید. توانایی پیش‌بینی‌کننده با محاسبه نواحی زیر منحنی ROC (ROCAUC)[9] و فواصل اطمینان ۹۵ درصد (CIs)[10] مقایسه شد.

1. Neubauer
2. Papanicolaou
3. Asthenozoospermia
4. Asthenoteratozoospermia
5. Azoospermia
6. Enzyme-linked immuno_sorbent assay
7. Absorbance
8. Receiver operating characteristics
9. Area Under ROC curve
10. Confidence Interval

یافته‌های پژوهش

مقایسه متغیرهای اسپرم

میانگین سن و متغیرهای اسپرم در گروه‌های مورد بررسی که شامل گروه کنترل (نورمواسپرم)، گروه آستنوتراتواسپرم و گروه آزواسپرم می‌باشد، در جدول ۱ نشان داده شده است. متغیر سن بیماران در گروه‌های مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. همان طور که انتظار می‌رفت گروه کنترل و آستنوتراتوزواسپرم از نظر تعداد اسپرم (p=۰/۰۰۰۱)، درصد حرکت کلی (p=۰/۰۰۰۱) و درصد مورفولوژی نرمال اسپرم (p=۰/۰۰۰۱) اختلاف آماری معنی‌دار نشان دادند (جدول ۱). متغییرهایی که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نشان دادند در شکل ۱ نمایش داده شده‌اند.

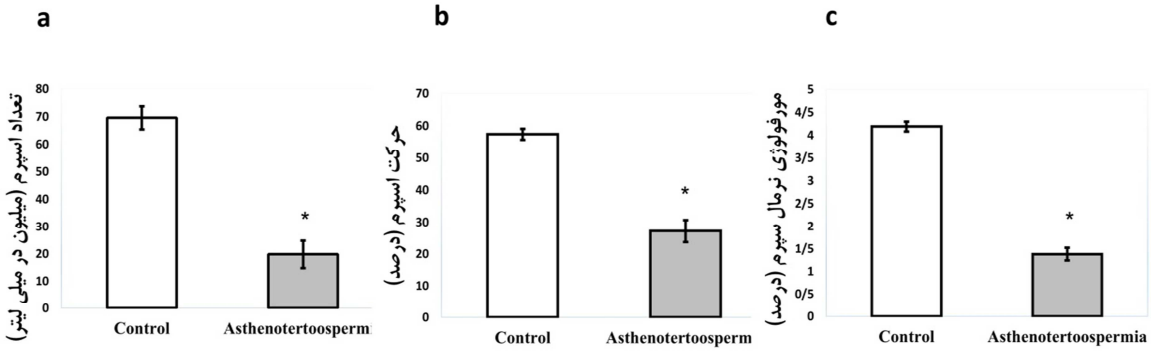
حضور اینترلوکین ۳۵ در مایع منی

همان‌طور که بررسی سطح اینترلوکین ۳۵ به روش الایزا در شکل ۲ نشان می‌دهد، نتایج بیانگر حضور این اینترلوکین در مایع منی است، ولی سطح آن در گروه های مورد مطالعه از نظر آماری تفاوت معنی دار نشان نداده است (P>۰/۰۵).

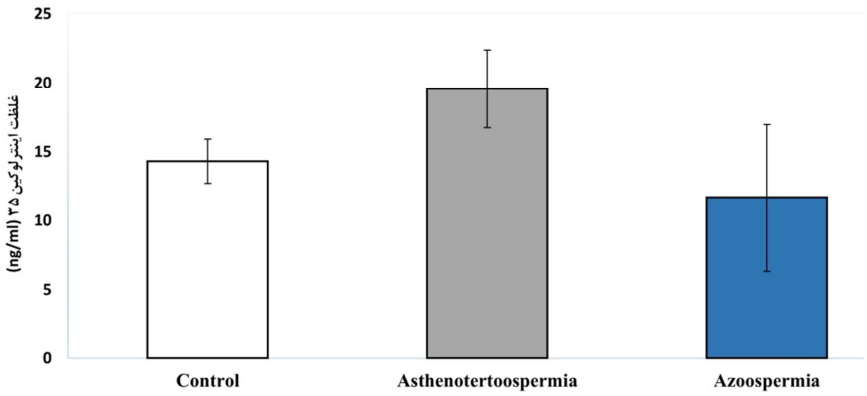
جدول ۱. میانگین متغیرهای اسپرم در گروه‌های مورد بررسی

گروه	سن	حجم (ml)	تعداد ($\times10^6$/ml)	حرکت (درصد)	شکل (درصد نرمال)	pH
کنترل	۳۵/۰۵±۱/۰۵	۴/۱۹±۰/۳۷	۶۹/۵۷±۴/۱۹	۵۷/۳۸±۱/۷۴	۴/۱۹±۰/۱۱	۷/۴±۰/۰۴
آستنوتراتواسپرمی	۳۴/۵۲±۱/۲۷	۳/۷۸±۰/۴۴	۱۹/۸۳±۵/۰۵*	۲۷/۱۹±۳/۵۰*	۱/۳۸±۰/۱۴*	۷/۳۷±۰/۰۴
آزواسپرمی	۳۳/۰۷±۱/۰۷	۳/۶۰±۰/۳۸	–	–	–	۷/۵±۰/۰۳

* تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل (p<۰/۰۵).



شکل ۱. مقایسه متغییرهای تعداد اسپرم (a)، حرکت اسپرم (b) و مورفولوژی نرمال اسپرم در دو گروه کنترل و آستنوتراتواسپرم



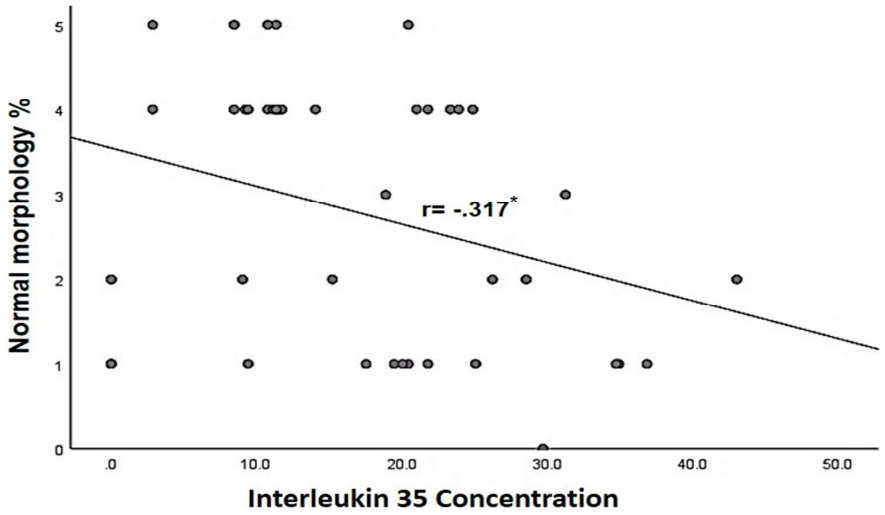
شکل ۲. مقایسه سطح غلظت اینترلوکین ۳۵ در پلاسمای منی در گروه های مورد مطالعه (کنترل، آستنوتراتواسپرمی و آزواسپرمی)

رابطه غلظت اینترلوکین ۳۵ در مایع منی با درصد مورفولوژی نرمال اسپرم

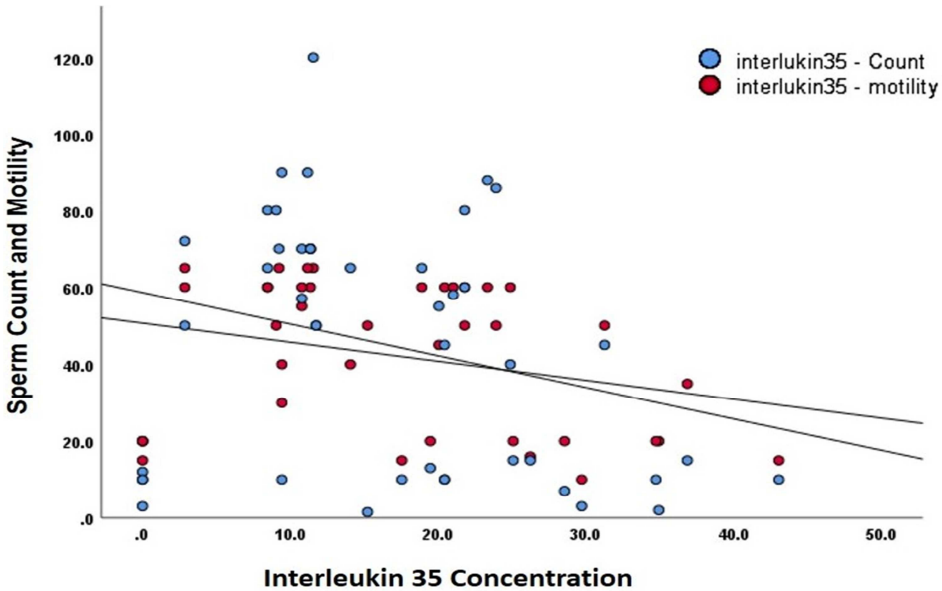
تجزیه و تحلیل همبستگی و ارتباط بین غلظت IL-35 با متغیرهای استاندارد اسپرم نشان داد که بین غلظت IL-35 با درصد مورفولوژی نرمال اسپرم همبستگی منفی معناداری وجود دارد (r= -۰/۳۱۷، p= ۰/۰۴) (شکل ۳)، در حالی که همبستگی معناداری بین غلظت IL-35 با تعداد اسپرم (r= -۰/۲۷، p= ۰/۰۸) و حرکت اسپرم (r= -۰/۲۷، p= ۰/۰۸) (شکل ۴) مشاهده نشد.

به منظور ارزیابی توانایی پیش‌بینی‌کننده اینترلوکین ۳۵ در پلاسمای منی با درصد مورفولوژی نرمال از منحنی ROC استفاده گردید. جهت ارزیابی، درصد مورفولوژی نرمال بزرگتر یا مساوی ۴ درصد اسپرم، به عنوان گروه مثبت و درصد مورفولوژی نرمال کمتر از ۴ درصد اسپرم، به عنوان گروه منفی در نظر گرفته شدند.

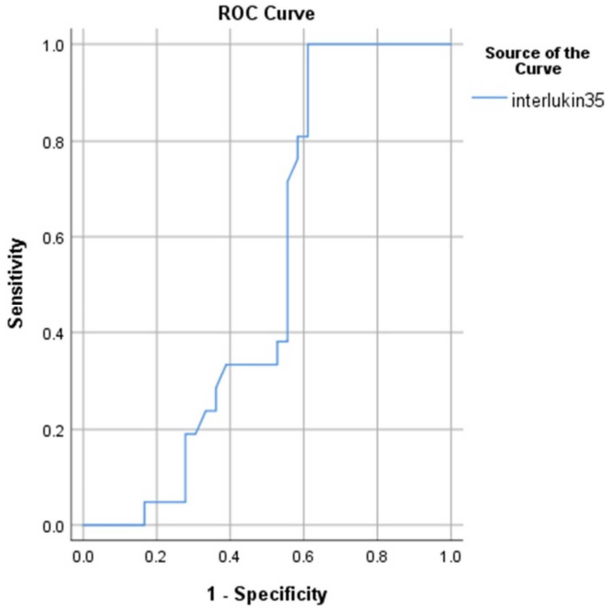
آنالیز منحنی ROC (شکل ۵) نشان داد که غلظت اینترلوکین ۳۵ با AUC برابر با ۰/۵۲ توانایی پیش بینی مورفولوژی نرمال اسپرم را ندارد.



شکل ۳. تجزیه و تحلیل همبستگی و ارتباط بین غلظت IL-35 با درصد مورفولوژی نرمال اسپرم



شکل ٤. تجزیه و تحلیل همبستگی و ارتباط بین غلظت IL-35 با درصد مورفولوژی نرمال اسپرم



شکل ۵. توانایی پیش‌بینی‌کننده اینترلوکین ۳۵ در پلاسمای منی با درصد مورفولوژی نرمال

بحث

بررسی IL-35 به روش الایزا بیانگر حضور این اینترلوکین در مایع منی است. ولی این مطالعه نشان داد که سطوح غلظت آن در مایع منی در افراد با متغیرهای نرمال اسپرم، آستنوتراتواسپرمی و آزواسپرمی تفاوت معنی‌دار ندارد. اگرچه رابطه منفی در سطح معنادار بین غلظت اینترلوکین ۳۵ با مورفولوژی اسپرم مشاهده گردید؛ ولی بین غلظت اینترلوکین ۳۵ با تعداد اسپرم و درصد حرکت آن رابطه معنادار وجود ندارد.

ناباروری در مردان در برخی از موارد بدون وجود علائم می‌باشد و تا زمان بروز ناباروری تشخیص داده نمی‌شود. اگرچه علت دقیق بروز برخی از عوامل ناباروری در مردان هنوز به طور کامل شناخته نشده است، برخی مطالعات نشان داده‌اند که فاکتورهای ایمونولوژیکی، التهابی، عدم عملکرد صحیح بیضه‌ها و مواد شیمیایی و سمی می‌توانند سبب اختلال در باروری فرد شوند. در سال‌های اخیر نقش پاسخ التهابی در پاتوژنز ناباروری مردان توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده است و این پاسخ به عوامل عفونی و عوامل غیر عفونی تقسیم می‌شود. عوامل غیرعفونی پاسخ‌های التهابی ناشی از بیماری‌های خودایمنی مانند ارکیت هستند. واکنش‌های التهابی اغلب بدون علامت هستند و از نظر بالینی به سختی قابل تشخیص هستند (Rong *et al.*, 2023). سیتوکین‌ها سیگنال دهی درون سلولی را با اتصال به گیرنده‌های سلولی هدف تحریک می‌کنند و بر بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیکی در سلول‌ها تأثیر می‌گذارند، مانند تنظیم عملکردهای فیزیولوژیکی، پاسخ‌های التهابی و ترمیم بافت. تأثیر سیتوکین‌ها بر تولید مثل انسان توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده است زیرا می‌توانند بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی و تنظیم تولیدمثل تأثیر بگذارند. قبلاً نشان داده شده بود که اینترلوکین‌ها نقش عمده‌ای در ناباروری مردان دارند (Bukharin *et al.*, 2022; Rong *et al.*, 2023). اهمیت و ارتباط تنگاتنگ فاکتورهای ایمونولوژیک با باروری مردان و نقش سایتوکاین‌های التهابی مانند TNFα, IL6, IL-1β و IL-8 در ایجاد ناباروری در مطالعات زیادی مشخص گردیده است (Camejo *et al.*, 2001; Dehghan Marvast *et al.*, 2016; Djourabchi Borojerdi *et al.*, 2020; Gruschwitz *et al.*, 1996; Havrylyuk *et al.*, 2015; Oyetunji *et al.*, 2021). سیتوکین‌ها رشد و تمایز سلول‌ها در بیضه‌ها را تنظیم کرده و بر تمامی مراحل اسپرم‌زایی و همچنین پتانسیل لقاح اسپرم با تخمک تاثیر می‌گذارند (Ganaiem *et al.*, 2009). همچنین در برخی از مطالعات ارتباط میان حضور گیرنده‌های سایتوکاین‌ها روی اسپرم با کاهش متغیرهای نرمال اسپرم نشان داده شده است (Djourabchi Borojerdi *et al.*, 2020; Yoshida *et al.*, 2004). اخیرا در مطالعه‌ای نشان داده شده است که حتی سطح سرمی سایتوکاین‌ها نیز می‌تواند بین افراد بارور و نابارور تمایز ایجاد کند؛ بطوریکه سطح سرمی IL-38 به طور قابل توجهی در مردان نابارور پایین‌تر و سطح سرمی IL-41 بالاتر می‌باشد. محققان این مطالعه نشان دادند که IL-38 و IL-41 ممکن است نشانگرهای زیستی جدیدی برای تشخیص ناباروری در مردان باشند (Rong *et al.*, 2023).

منشا ترشح سیتوکین‌ها و تنظیم ترشح آنها در دستگاه تناسلی مردان هنوز بطور کامل مشخص نشده است. منابع اصلی سیتوکین‌های موجود در دستگاه تناسلی مردان بیضه‌ها و ماکروفاژهای بیضه هستند، ولی برخی از سیتوکین‌ها مانند IL-1 و IL-6 توسط سلول‌های سوماتیک بیضه مانند سلول‌های لیدیگ و سرتولی نیز تولید می‌شوند. این سایتوکاین‌ها می توانند بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی تولید مثل و باروری تأثیر بگذارند.

IL-35 یک سایتوکین ضدالتهابی است که پاسخ ایمنی را مهار می‌کند. مشخص گردیده است که در بافت بیضه در حفظ ایمنی و پیشگیری از آسیب به اسپرم‌ها و پیشبرد فرآیند اسپرم‌زائی نقش دارد (Terayama *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای که توسط بابینتس و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام گرفت نشان داده شد که

در بیماران دچار عفونت مزمن پروستات که همزمان نابارور بودند، سطح غلظت IL-35 به طور معنی‌دار کاهش یافته است. این پژوهشگران چنین نتیجه گرفتند که اختلال در تولید و ترشح سیتوکاین‌ها در مردان مبتلا به پروستاتیت مزمن با ایجاد ناباروری همراه است و شاخص نسبت سطح IL-17/IL-35 در مایع منی را می‌توان به عنوان نشانگر ناباروری در این افراد استفاده کرد (Babinets *et al*., 2020). در مطالعه دیگر سطح سرمی IL-35 در بیماران نابارور مبتلا به عفونت پروستات که بر اساس متغیرهای اسپرم تقسیم‌بندی شده بودند (الیگوزواسپرمی، استنوزواسپرمی و تراتوزواسپرمی) نسبت به گروه سالم به طور معنی‌داری کاهش نشان داد (Al-hadrawi *et al*., 2022). بطور کلی این مطالعات نشان دادند که در شرایط وجود عفونت در دستگاه تناسلی مردان، سطوح پایین‌تر IL-35 با ایجاد ناباروری مرتبط است. نتایج جالب برخی مطالعات نشان داده‌اند که پلاسمای منی ممکن است از طریق تغییر در تولید و ترشح سایتوکاین‌ها از جمله IL-35 در جنس ماده، تأثیر مثبتی بر نتایج باروری داشته باشد (Azad *et al*., 2017). مایع منی باعث تحریک سنتز فاکتور محرک کلنی ۲ (CSF2)، (IL6)، CXCL8 و سایر سایتوکاین‌ها در سلول‌های اپیتلیال سرویکس در دستگاه تناسلی زنان شود (Robertson & Sharkey, 2016). از طرف دیگر مشخص شده است که سطح IL-35 در زنان باردار به طور قابل توجهی بالاتر از زنان غیرباردار است، که نشان دهنده این است که افزایش IL-35 در طی دوران بارداری محافظت ایمنی برای جنین نیمه آلوژن ایجاد می‌کند تا پاسخ ایمنی مادر را سرکوب نماید (Yue *et al*., 2015).

بنابراین سایتوکاین‌های مایع منی با باروری و سلامت باروری مرتبط هستند، اما کاربرد بالینی آنها به دلیل نبود داده‌های مرجع محدوده غلظت سیتوکین‌های مربوطه در مردان سالم فعلا امکان‌پذیر نبوده است. غلظت سیتوکین‌ها و کموکاین‌های شناسایی‌شده در مایع منی بین مطالعات و گروه‌های مختلف بسیار متغیر است و ظرفیت فعلی برای تعریف محدوده مرجع برای غلظت سیتوکین در مردان بارور را محدود می‌کند. عدم استانداردسازی در روش‌های مورد استفاده برای پردازش و ذخیره مایع منی، و تنوع در روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی سیتوکین‌ها، عواملی هستند که باعث ناهمگنی ارزیابی‌ها گردیده‌اند. جهت کاربرد بالینی بررسی سیتوکین‌های مایع منی نیاز به استانداردسازی و اعتبارسنجی روش‌ها دارد تا بتوان محدوده‌های مرجع برای مردان بارور سالم را تعریف کرد (Lyons *et al*., 2023).

اگرچه مطالعات متعددی به بررسی عملکرد سایتوکاین‌های مختلف انجام شده است، اطلاعات محدودی در مورد عملکرد این اجزای مهم سیستم ایمنی در بیضه‌ها و ارتباط آنها با باروری در دسترس است (Gong *et al*., 2020). بررسی‌های آزمایشگاهی، مدل موشی، و مطالعات بالینی به ما کمک می‌کند تا نقش حیاتی آنها را در این اندام‌های دارای ایمنی ویژه بیاموزیم.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

بطورکلی با وجود اثبات حضور IL-35 در مایع منی حتی در مردان با متغیرهای نرمال، نقش و اهمیت عملکردی آن هنوز مشخص نشده است. بنابراین لازم است بررسی این اینترلوکین روی نمونه‌های بیشتر و یا در سایر اختلالات اسپرم انجام گیرد. رابطه این اینترلوکین با کیفیت اسپرم‌ها در سطح DNA ممکن است بتواند به انتخاب اسپرم‌های بهتر در فرآیند لقاح آزمایشگاهی هم کمک کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز تایید شده است (کد: IR.SUMS.REC/1396.S959). همچنین، پژوهش حاضر با حمایت مادی معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گردیده است (کد طرح: ۱۳۲۸۱). نویسندگان مقاله حاضر در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Al-hadrawi, K. K., ALGarawy, R. T., & Darweesh, M. F. (2022). The Impact of IL-35, Bacterial Prostatitis in Development Male Infertility in Najaf Province Patients. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine, 89*(1), 4278-4283.

Archana, S. S., Selvaraju, S ,.Binsila, B. K., Arangasamy, A., & Krawetz, S. A. (2019). Immune regulatory molecules as modifiers of semen and fertility: A review. *Molecular reproduction and development, 86*(11), 1485-1504.

Azad, M., Keshtgar, S., Jahromi, B. N., Kanannejad, Z., & Gharesi-Fard, B. (2017, Dec). 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. https://doi.org/10.5653/cerm.2017.44.4.214

Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., & Khodadadian, A. (2020). Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *Int J Gen Med, 13*, 29-41. https://doi.org/10.2147/ijgm.S241099

Babinets, L. S., Migenko, B. O., Borovyk, I. O., Halabitska, I. M., Lobanets, N. V., & Onyskiv, O. O. (2020). The role of cytocin imbalance in the development of man infertility. *Wiad Lek, 73*(3), 525-528.

Bello, R. O., Chin, V. K., Abd Rachman Isnadi, M. F., Abd Majid, R., Atmadini Abdullah, M., Lee, T. Y. ,Amiruddin Zakaria, Z., Hussain, M. K., & Basir, R. (2018). The role, involvement and function (s) of interleukin-35 and interleukin-37 in disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(4), 1149.

Bukharin, O., Kuzmin, M., Perunova ,N., Nikiforov, I., Chainikova, I., & Ivanova, E. (2022). Diagnostic cytokine marker of male infertility-interleukin 4. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika, 67*(3), 151-157.

Camejo, M., Segnini, A., & Proverbio, F. (2001). Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. *Archives of andrology, 47*(2), 97-101.

Cao, W., Wang, X., Chen, T., Zhu, H., Xu, W., Zhao, S., Cheng, X., & Xia, L. (2015). The expression of notch/notch ligand, IL-35, IL-17, and Th17/Treg in preeclampsia. *Disease markers, 2015*.

Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomin, P. R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C. J., & Brown, S. A. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology, 11*(12), 1093-1101.

Dehghan Marvast, L., Aflatoonian, A., Talebi, A., Ghasemzadeh, J., & Pacey, A. (2016). Semen inflammatory markers and Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples. *Andrologia,* ۴۸(۷), ۷۲۹-۷۳۶.

Djourabchi Borojerdi, A. S., Welchowski, T., Peng, W., Buchen, A., Novak, N., Haidl, G., Duan, Y. G., & Allam, J. P. (2020). Human spermatozoa of male patients with subfertility express the interleukin-6 receptor. *Andrologia, 52*(4), e1351 .۱

Emokpae, M. A., & Moronkeji, M. A. (2020). Association of copper-to zinc ratio with sperm concentration among males investigated for infertility. *J Infertil Reprod Biol, 8*(3), 49-52.

Ferlin, A., & Foresta, C. (2020). Infertility: Practical Clinical Issues for Routine Investigation of the Male Partner. *Journal of Clinical Medicine, 9*(6), 1644.

Ganaiem, M., AbuElhija, M., Lunenfeld, E., Cherniy, N., Weisze, N., Itach, S. B.-S., Breitbart, H., Apte, R., & Huleihel, M. (2009). Effect of interleukin-1 receptor antagonist gene deletion on male mouse fertility. *Endocrinology, 150*(1), 295-303.

Gong, J., Zeng, Q., Yu, D., & Duan, Y.-G. (2020). T lymphocytes and testicular immunity: a new insight into immune regulation in testes. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(1), 57.

Gruschwitz, M. S., Brezinschek, R., & Brezinschek, H. P. (1996). Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males. *Journal of Andrology, 17*(2), 158-163.

Havrylyuk, A., Chopyak, V., Boyko, Y., Kril, I., & Kurpisz, M. (.(۲۰۱۵Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Central-European journal of immunology, 40*(3), 337.

Karavolos, S., Panagiotopoulou, N., Alahwany, H., & Martins da Silva, S. (2020). An update on the management of male infertility. *The Obstetrician & Gynaecologist, 22*(4), 267-274.

Keel, B. A. (2004). How reliable are results from the semen analysis? *Fertility and sterility, 82*(1), 41-44.

Ko, E. Y., Sabanegh Jr, E. S., & Agarwal, A. (2014). Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and sterility, 102*(6), 1518-1527.

Kumar, N., & Singh, A. K. (2022, 2022/01/10). Impact of environmental factors on human semen quality and male fertility: a narrative review. *Environmental Sciences Europe, 34*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s12302-021-00585-w

Lyons, H. E., Arman, B. M., Robertson, S. A., & Sharkey, D. J. (2023). Immune regulatory cytokines in seminal plasma of healthy men: A scoping review and analysis of variance. *Andrology*.

Organization, W. H. (2021 .(*WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health Organization.

Oyetunji, O. A., Samson, A. O., Adekemi, A. T., & Feyisike, J. O. (2021). Attenuating effect of polyalthia longifolia on cadmium sulfate-induced testicular toxicity. *Journal of Infertility and Reproductive Biology, 9*(2), 52-58.

Rahbar, A., & Abbasi, M. (2020). A Brief Clinical Overview of Etiological Factors in Infertility. *Journal of Infertility and Reproductive Biology, 8*, 6-8.

Robertson, S. A., & Sharkey, D. J. (2016). Seminal fluid and fertility in women. *Fertility and sterility, 106*(3), 511-519.

Rong, C., Weng, L., Li, M., Zhou, L., & Li, Y. (2023). Serum interleukin-38 and-41 levels as candidate biomarkers in male infertility. *Immunology Letters, 255*, 47-53.

Salas-Huetos, A., & Aston, K. I. Defining new genetic etiologies of male infertility: progress and future prospects.

Seshadri, S., Bates, M., Vince, G., & Jones, D. L. (2009). The role of cytokine expression in different subgroups of subfertile men. *American Journal of Reproductive Immunology, 62*(5), 275-282.

Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Briggs, N. E., Dekker, G. A., & Robertson, S. A. (2017). Seminal plasma pro-inflammatory cytokines interferon-γ (IFNG) and CXC motif chemokine ligand 8 (CXCL8) fluctuate over time within men. *Human Reproduction, 32*(7), 1373-1381.

Syriou, V., Papanikolaou, D., Kozyraki, A., & Goulis, D. G. (2018). Cytokines and male infertility. *European Cytokine Network, 29*(3), 73-82.

Terayama, H., Yoshimoto, T., Hirai, S., Naito, M., Qu, N., Hatayama, N., Hayashi, S., Mitobe, K., Furusawa, J.-i., & Mizoguchi, I. (2014). Contribution of IL-12/IL-35 common subunit p35 to maintaining the testicular immune privilege. *PLoS One, 9*(4), e96120.

Vignali, D. A., & Kuchroo ,V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology, 13*(8), 722-728.

Wang, C., & Swerdloff, R. S. (2014). Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and sterility, 102*(6), 1502-1507.

Yoshida, S., Harada, T., Iwabe, T., Taniguchi, F., Mitsunari, M., Yamauchi, N., Deura, I., Horie, S., & Terakawa, N. (2004). A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis. *Human Reproduction, 19*(8), 1821-1825.

Yue, C.-y., Zhang, B., & Ying, C.-m. (2015). Elevated serum level of IL-35 associated with the maintenance of maternal-fetal immune tolerance in normal pregnancy. *PLoS One, 10*(6), e0128219.

Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., Si, C., & Xiong, H. (2019). Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. *Immunology, 157*(1), 13-20.

Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., & Han, D. (2014, Sep). Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol, 11*(5), 428-437. https://doi.org/10.1038/cmi.2014.38

Zhou, C., Zhang, J., Chen, Y., Wang, H., & Hou, J. (2017). Interleukin-35 as a predictor of prostate cancer in patients undergoing initial prostate biopsy. *OncoTargets and therapy, 10*, 3485.