Original Article

Immunolocalization of Insulin-Like Growth Factor-I and its Immunoreactivity during Ovary Developmental Stages of Persian Sturgeon, *Acipenser Persicus*

Barzan Bahrami Kamangar, Ph.D.[1]*, Bagher Mojazi Amiri, Ph.D.[2], Mohammad Javad Rasaee, Ph.D.[3], Behrouz Abtahi, Ph.D.[4], Mahmoud Bahmani, Ph.D.[5]

1. Fisheries Science Department, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Fisheries Science Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Medical Biotechnology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Marine Biology Department, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran
5. Physiology Department, International Sturgeon Research Institute, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 416, Fisheries Sciences Department, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran***
Email: bbkamangar@yahoo.com

Received: 4/Aug/2008, Accepted: 3/May/2009

Abstract

Objective: Immunohistochemical localization and immunoreactivity of insulin-like growth factor-I (IGF-I) were investigated during the ovarian developmental stages in Persian sturgeon. In addition, the effects of growth hormone and thyroxine were investigated on IGF-I immunoreactivity *in vitro*.

Materials and Methods: Ovarian samples were taken from two brood stocks (caught from the sea and from a river) during their reproductive migration and at three different developmental stages based on their polarization index (PI). The effects of two hormones on IGF-I immunoreactivity were studied at two ovarian developmental stages (PI > 0.1 and PI < 0.07). In both experiments the immunoperoxidase method was performed in order to detect immunohistochemical localization and immunoreactivity of IGF-I.

Results: Immunohistochemical localizations of IGFI were detected in the follicular layers. There was no significant immunoreactivity difference between the two brood stocks, however in the river brood stock IGF-I immunoreactivity was more intense in the ovaries with PI < 0.07 than of PI > 0.1 ($p < 0.05$). Growth hormone (10 ng/ml) increased IGF-I immunoreactivity in ovarian samples from the river brood stock when their PI was less than 0.07, however thyroxine had not such effect ($p < 0.05$).

Conclusion: Our results showed that IGF-I is present in the ovaries of Persian sturgeon and its reactivity is different among their gonadal development stages. This may support a role for IGF-I during reproductive physiology in female brood stocks of the Persian sturgeon. Moreover, growth hormone is a potential hormone to increase IGF-I immunoreactivity in the ovaries of this species.

Keywords: *Acipenser persicus,* Insulin-Like Growth Factor-I, Ovary, Immunohistochemistry

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 432-441

مکان‌یابی و بررسی شدت واکنش ایمنی فاکتور رشد شبه‌انسولین - ۱ در بافت تخمدان مولدین تاس‌ماهی ایرانی و تاثیر هورمون‌های رشد و تیروکسین بر بیان آن در شرایط *In Vitro*

برزان بهرامی کمانگر .Ph.D[۱*]، باقر مجازی امیری .Ph.D[۲]، محمدجواد رسایی .Ph.D[۳]، بهروز ابطحی .Ph.D[۴]، محمود بهمنی .Ph.D[۵]

۱. دانشگاه کردستان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، سنندج، ایران
۲. دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات و محیط زیست، تهران، ایران
۳. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران
۴. دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی دریا، تهران، ایران
۵. انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، سنندج، صندوق‌پستی: ۴۱۶، دانشگاه کردستان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات
پست الکترونیک: **Email: bbkamangar@yahoo.com**

دریافت مقاله: ۸۷/۵/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۱۳

چکیده

* **هدف:** تعیین مکان و بررسی شدت واکنش ایمنی فاکتور رشد شبه انسولین یک (Insulin-Like Growth Factor-I; IGF-I) به صورت موضعی در بافت تخمدان تاس‌ماهی ایرانی و تعیین اثر هورمون رشد و تیروکسین در شرایط *in vitro* بر میزان شدت واکنش ایمنی *IGF-I* در این بافت.

* **مواد و روش‌ها:** بافت تخمدان با توجه به شاخص قطبی شدن هسته (Polarization Index; PI) از دو گروه از مولدین دریایی و رودخانه‌ای و در سه مرحله رسیدگی جنسی، اخذ و میزان بیان پپتید مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر دو هورمون رشد وتیروکسین بر میزان واکنش ایمنی در این بافت و در دو مرحله رسیدگی در شرایط *in vitro* بررسی شد. مکان و شدت بیان پپتید با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی (ایمونوپراکسیداز) مطالعه گردید.

* **یافته‌ها:** واکنش ایمنی نسبت به IGF-I در لایه‌های فولیکولی مشاهده گردید. بین دو گروه از مولدین تفاوت معنی‌داری از نظر شدت بیان پپتید مشاهده نگردید ولی در مولدین رودخانه‌ای شدت بیان در مرحله با شاخص قطبی شدن کمتر از ۰/۰۷ بیشتر از مرحله با شاخص بیشتر از ۰/۱ بود ($p<0/05$). هورمون رشد در غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر میزان واکنش ایمنی بیشتری را در تخمدان با شاخص PI کمتر از ۰/۰۷ در مولدین رودخانه‌ای نسبت به سایر مراحل به وجود آورد. در عین حال تیروکسین تاثیری در تغییر بیان پپتید نداشت ($p<0/05$).

* **نتیجه‌گیری:** IGF-I در تخمدان به صورت موضعی بیان شده و بیان آن در مراحل مختلف متفاوت می‌باشد، بنابراین IGF-I نقشی در مراحل انتهایی رسیدگی جنسی تاس‌ماهی ایرانی دارد. هورمون رشد توان افزایش بیان پپتید در بافت تخمدان را دارد.

* **کلیدواژگان:** تاس‌ماهی ایرانی، فاکتور رشد شبه انسولین یک، تخمدان، ایمونوهیستوشیمی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ٤، زمستان ٨٨، صفحات: ٤٤١-٤٣٢

مقدمه

فاکتور رشد شبه انسولین یک (Insulin-Like Growth Factor-I; IGF-I) پپتیدی متشکل از ۷۰ اسید آمینه با وزن مولکولی ۷ kDa می‌باشد که از نظر ساختمانی مرتبط با پروانسولین است (۱، ۲). نقش این پروتئین در فرایندهای آنابولیک سلولی جانوران شامل جذب مواد، تقسیم میتوز، رشد و تکامل می‌باشد (۳). مکان اصلی تولید این عامل، کبد بوده که سنتز و رهاسازی آن تحت تاثیر هورمون رشد می‌باشد (۱، ۶-۴). به‌جز منشأ کبدی، IGF-I در بسیاری از بافت‌های ماهیان نیز به طور موضعی و به‌صورت اتوکرین-پاراکرین، ساخته و رهاسازی می‌گردد (۱، ۶، ۷). رونویسی ژن IGF-I در بسیاری از بافت‌ها از جمله کبد، پانکراس، لوله گوارش، کلیه، قسمت قدامی کلیه، آبشش، تخمدان، بیضه، چشم و مغز ماهیان استخوانی مشخص شده‌است. به علاوه واکنش ایمنی نسبت به IGF-I در سلول‌های گرانولوزا در تخمدان و سلول‌های سرتولی و اسپرماتوسیت‌ها در بیضه ماهی تیلاپیا به همراه سایر بافت‌ها مشاهده شده‌است (۷). رونویسی ژن IGF-I در پاسخ به هورمون رشد در بافت کبد ماهیان (۶) و پستانداران (۸، ۹) انجام می‌گیرد ولی در سایر بافت‌های ماهیان به‌جز آبشش‌ها چنین پاسخ‌گویی مشاهده نشده است (۶). با این وجود مطالعات اخیر در قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داده است که در بسیاری از بافت‌ها، از جمله در تخمدان ماهیان استخوانی، بیان ژن IGF-I در پاسخ به تزریق هورمون رشد افزایش می‌یابد (۱۰). همچنین در ماهی تیلاپیا بیان ژن IGF-I در کبد در پاسخ به هورمون T3 در شرایط *in vitro* و *in vivo* به‌طور معنی‌دار افزایش یافته است (۱۱). فاکتور رشد شبه انسولین یک دارای سه ویژگی متمایز است: دارنده اعمالی شبیه به هورمون رشد (فاکتور سولفات و تیمیدین)، در بافت چربی

وعضلات دارنده ویژگی‌های شبیه به انسولین و در محیط کشت دارنده خاصیت میتوژنیک می‌باشد (۱۲).

اعمال تخمدان و بیضه‌ها در ماهیان استخوانی و سایر ماهیان نه تنها توسط گنادوتروپین‌های هیپوفیز (Gonadotropin Hormone-I & II, GtH-I, II) کنترل می‌شود بلکه چندین هورمون دیگر و فاکتورهای رشد - که به شکل اندوکرین، اتوکرین و پاراکرین عمل می‌نمایند - در این ارتباط نقش دارند (۱۳، ۱۴). برخی شواهد دلالت بر وجود احتمال تاثیرگذاری سیستم IGF در فرایندهای رسیدگی جنسی ماهیان دارد. وجود تغییرات IGF-I در گردش، در زمان رسیدگی جنسی ماهیان (۲، ۱۵)، وجود گیرنده‌های IGF-I در تخمدان در طی مراحل مختلف تولیدمثل (۱۳، ۱۶، ۱۷)، توانایی تخمدان ماهیان استخوانی در تولید IGF-I موضعی (۷، ۱۰، ۲۱-۱۸)، تغییر میزان بیان پروتیین‌های اتصالی IGF در مراحل پس از زرده‌سازی و رسیدگی نهایی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲۲) از جمله شواهد این ادعا می‌باشند.

تاس‌ماهی ایرانی، از ماهیان غضروفی- استخوانی و یکی از گونه‌های با ارزش حفاظتی و تجاری بالا در ایران می‌باشد که هرساله به منظور حفظ ذخایر طبیعی آن تکثیر و رها سازی می‌شوند. مطالعات قبلی در تاس‌ماهی ایرانی نشان داده که IGF-I در شرایط *in vitro* توانایی رفع توقف میوزی و القای رسیدگی نهایی اووسیت‌ها را دارد (۲۳). همچنین وجود همبستگی مثبت بین مقادیر سرمی IGF-I و درصد لقاح در این گونه گزارش شده است (۲۴). هدف از انجام این تحقیق پاسخ به سوالات زیر می‌باشد:

- آیا IGF-I در مراحل انتهایی رسیدگی جنسی تاس‌ماهی ایرانی دارای تولید موضعی در بافت تخمدان می‌باشد؟ در چه مکان‌هایی این پپتید وجود دارد؟
- بیان موضعی آن در بافت تخمدان در شرایط *in vitro* تحت تاثیر چه هورمون‌هایی قرار می‌گیرد؟

مواد و روش ها

دو آزمایش به شرح زیر به منظور تعیین مکان و بررسی تغییرات موضعی IGF-I در مراحل انتهایی تکامل تخمدان‌های تاس‌ماهی ایرانی در دو گروه از مولدین دریایی و رودخانه‌ای (آزمایش اول) انجام شد همچنین بررسی تاثیر هورمون‌های رشد و تیروکسین در میزان بیان موضعی پپتید IGF-I در بافت تخمدان در مراحل انتهایی تکامل تخمدانی (آزمایش دوم) در نظر گرفته شد. نحوه رفتار با مولدین مورد استفاده در طی آزمایش بر اساس تصویب کمیته پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

تهیه بافت

صید و نمونه‌برداری از مولدین در طی فصل بهار و هم‌زمان با مهاجرت تخم‌ریزی آنها انجام گرفت. در آزمایش اول از میان مولدین صید شده، تعداد پنج قطعه مولد از صیدگاه کیاشهر واقع در ناحیه ۲ شیلات در دریای خزر (مولدین دریایی) و پنج قطعه مولد از رودخانه سفید رود (مولدین رودخانه‌ای) در فاصله‌ای حدود ۱ کیلومتر از دهانه رودخانه، برای انجام این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. مولدین پس از صید، پلاک‌گذاری شده و به مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری سد سنگر (رشت) منتقل و تا زمان تکثیر در استخر کورانسکی با جریان آب ثابت و دمای ۱±۱۵ درجه سانتی‌گراد، بدون تغذیه نگهداری شدند. از شاخص قطبی شدن هسته (Polarization Index: PI) به عنوان مبنایی برای تعیین مرحله تکاملی تخمدان در هر مولد استفاده شد (۲۵). نمونه‌های اووسیت از بافت تخمدان هر مولد با توجه به شاخص PI در سه مرحله: زمان صید و انتقال مولدین به مرکز تکثیر (PI>۰/۱)، زمان تزریق هیپوفیز (PI<۰/۰۷) و زمان تکثیر، با استفاده از سوند فلزی (۲۵) از بخش میانی تخمدان سمت چپ گرفته شد. در آزمایش دوم بافت تخمدان مورد نیاز از ۴ قطعه در دو موقعیت هسته‌ای PI<۰/۰۷ و ۰/۱ <PI (دو قطعه در هر موقعیت) تهیه گردید. مراحل آماده‌سازی بافت در انستیتو بین‌المللی تحقیقات ماهیان خاویاری (رشت) انجام شد.

مطالعه ایمونوهیستوشیمی

به منظور تعیین مکان و میزان بیان موضعی پپتید IGF-I در بافت تخمدان در هر دو آزمایش، از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بر اساس روش ایمونوپراکسیداز (۱۷، ۲۶) با کمی تغییرات به شرح زیر استفاده گردید. بافت تخمدان بلافاصله پس از نمونه‌برداری به محلول تثبیت کننده بوئن منتقل و پس از ۴۸ ساعت تثبیت، در سری افزایشی رقت‌های اتانول آب‌گیری، در زایلین شفاف‌سازی و در پارافین قالب‌گیری شد. در آزمایش اول از هر مولد و در هر مرحله تعداد ۵ عدد اووسیت مورد بررسی قرار گرفت. برش‌های بافتی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و بر روی لام‌های آغشته به سیلان (Sigma Chemical Co. A3648; USA) قرار داده‌شدند. برش‌های بافتی پس از پارافین‌زدایی در زایلین و آب‌دهی در سری رقت‌های کاهشی الکل، با بافر فسفات نمکی (Phosphate Buffered Saline: PBS) شست‌وشو و به منظور غیرفعال‌سازی فعالیت پراکسیداز بافتی، به مدت ۳۰ ثانیه در محلول پراکسیدهیدروژن ۳ درصد قرارداده‌شدند. پس از شست‌وشوی مجدد در PBS، مکان‌های غیراختصاصی بافت با استفاده از بافر PBS حاوی یک درصد آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin; BSA) و ۲۰ درصد سرم نرمال بز مسدود گردیدند. از آنتی بادی پلی کلونال تهیه شده بر ضد IGF-I نوترکیب انسانی در خرگوش (Novozymes GroPep Co. PABCa, Australia)، به عنوان آنتی بادی اولیه با رقت ۱:۳۰۰ استفاده شد. لام‌ها ابتدا به مدت ۲ ساعت در اتاقک مرطوب با آنتی‌بادی اولیه انکوبه گردیدند و بعد با PBS شست‌وشو داده شدند. هم‌زمان در هر نمونه یک برش به عنوان شاهد منفی جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش مورد استفاده قرارگرفت. در شاهدهای منفی از سرم نرمال خرگوش به جای آنتی‌بادی اول استفاده شد. همچنین از آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه ایمونوگلوبولین G خرگوش در بز متصل به آنزیم پراکسیداز

polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins HRP (Dakocytomation Co. P0448, Denmark)

به عنوان آنتی بادی دوم استفاده شد. لام‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در اتاقک مرطوب با آنتی‌بادی دوم با رقت ۱:۱۰۰ انکوبه و پس از شست‌وشو با PBS، مکان‌های اتصال به آنتی‌ژن با استفاده از سوبسترای ۳ و ′۳- دی‌آمینوبنزیدین تتراهیدروکلرید

(3, 3′- Diaminobenzidine tetrahydochloride: DAB) آشکار گردیدند (DakoCytomation Co., S3000, Denmark). این واکنش در مجاورت پراکسید هیدروژن انجام گرفت. مراحل مطالعه ایمونوهیستوشیمی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

بررسی میزان بیان موضعی IGF-I در اووسیت‌ها در پاسخ به هورمون‌های رشد و تیروکسین (در شرایط *in vitro*)

در این آزمایش پس از جداسازی اووسیت‌ها همراه با لایه‌های فولیکولی آنها، به ازای هر واحد آزمایشی تعداد ۵ عدد اووسیت در هر یک از موقعیت‌های هسته‌ای به پلت‌های ۲۴ حفره‌ای (Falcon Co. 3043, USA)، حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت پایه لیبوویتز (L-15, Sigma Chemical Co. L5220, USA) انتقال داده شد. به محیط کشت پایه، بافر هپس (۵ میلی‌مولار)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و پنی‌سیلین (۷۰ میلی‌گرم در لیتر) افزوده شد (۲۳). تیمارهای هورمونی استفاده شده شامل غلظت‌های ۰/۵ و ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون تیروکسین (Sigma-Aldrich, T- 2376, USA) و غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد نوترکیب انسانی (Norditropin, Novo Nordisk Co. DK-2880, Denmark) بود. غلظت‌های مورد استفاده هورمون تیروکسین براساس غلظت‌های فیزیولوژیک این هورمون در تاس‌ماهی دریاچه‌ای (۲۷) و غلظت هورمون رشد با توجه به غلظت پلاسمایی آن در چند گونه ماهی در زمان رسیدگی جنسی آنها (۵، ۳۰-۲۸) انتخاب شد. هورمون تیروکسین ابتدا در اتانول خالص حل سپس غلظت‌های مورد نظر در آب مقطر تهیه و در حجم‌های برابر به واحدهای در نظر گرفته شده در پلت افزوده گردید. مدت زمان انکوباسیون در هر دو موقعیت هسته‌ای، ۳۶ ساعت و در دمای ۰/۵ ± ۱۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از طی مدت زمان در نظر گرفته شده، اووسیت‌ها بلافاصله به محلول تثبیت کننده بوئن منتقل و پس از ۴۸ ساعت تثبیت، آماده برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی گردیدند. این آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت.

امتیازدهی و روش‌های آماری

در هر دو آزمایش میزان شدت واکنش ایمنی ایجاد شده در نمونه‌های مختلف که نشان دهنده میزان بیان IGF-I در اووسیت‌ها بود، تعیین و برحسب امتیازهای ۰ تا ۵+ با توجه به شدت رنگ ایجاد شده توسط DAB و با استفاده از جدول ۱ - که با اندکی تغییرات برگرفته از برخی مطالعات ایمونوهیستوشیمی است - مشخص گردید (۳۱، ۳۲).

با توجه به توزیع نرمال داده‌های کمی، مقایسه‌های انجام شده در قالب طرح آزمایشی اسپلیت پلات در زمان، طرح پایه به صورت تصادفی انجام شد که عامل اصلی محل صید و عامل فرعی زمان نمونه‌برداری بود. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، انجام پذیرفت. آزمایش دوم نیز در قالب طرح آماری اسپلیت پلات در زمان با سه تکرار انجام گرفت. عامل اصلی دوز هورمون‌های استفاده شده در پنج سطح و عامل فرعی موقعیت هسته در دو سطح (PI < ۰/۰۷، PI > ۰/۱) در نظر گرفته شد. از سه تکرار هر واحد ، تعداد ۶ عدد اووسیت بررسی و میانگین امتیاز به دست آمده به‌عنوان امتیاز آن واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌های آنها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام و تمام مقایسه‌ها آماری در سطح حداقل ۵ درصد انجام گرفت.

جدول ۱: نحوه امتیازدهی بر اساس شدت واکنش ایمنی ایجاد شده در لایه‌های فولیکولی اووسیت‌های تاس ماهی ایرانی (برگرفته شده از منابع ۱۳ و ۲۳ با کمی تغییرات)

توصیف شدت واکنش ایمنی	امتیاز
بدون رنگ	۰
لایه زرد کم‌رنگ و پراکنده	۱+
زرد کم‌رنگ و سرتاسری	۲+
زرد کم‌رنگ با لکه‌های قهوه‌ای پراکنده	۳+
قهوه‌ای	۴+
قهوه‌ای پررنگ	۵+

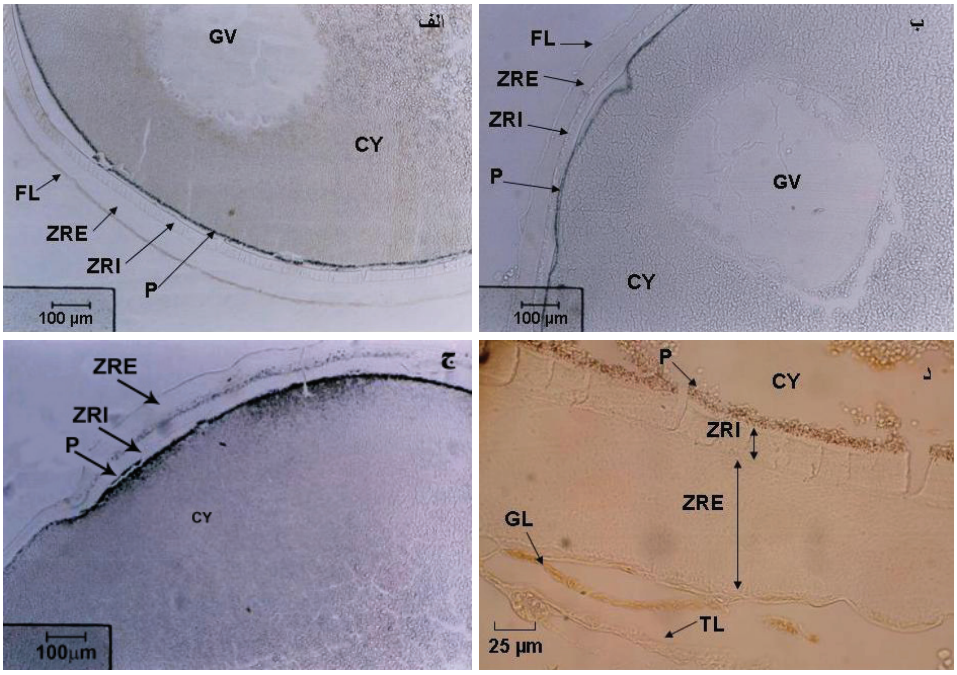
یافته ها

مکان‌های بیان IGF-I

واکنش ایمنی نسبت به IGF-I به طور عمده در سلول‌های سوماتیک لایه‌های فولیکولی مشاهده گردید. اختصاصی بودن واکنش‌ها در مقاطع بافتی تهیه شده، با عدم ایجاد واکنش ایمنی در مقاطع شاهد منفی همان نمونه‌ها اثبات گردید (شکل ۱ب). واکنش ایمنی نسبت به IGF-I در لایه‌های فولیکولی، بیشتر در لایه گرانولوزا اووسیت‌ها مشاهده گردید. همچنین در لایه تکا این واکنش با شدت کمتر و پراکندگی بیشتر مشاهده شد (شکل ۱الف و د). در سیتوپلاسم اووسیت‌های مطالعه شده، واکنش ایمنی در برخی از نمونه‌ها به صورت پراکنده در اطراف هسته نیز مشاهده گردید (شکل ۱ الف) ولی در سایر قسمت‌های سیتوپلاسمی، هیچ واکنش ایمنی مشاهده نشد. در نمونه‌های مرحله سوم نمونه‌برداری (زمان تکثیر) با توجه به اوول شدن اووسیت‌ها و جدا شدن تخمک‌ها از لایه‌های فولیکولی، هیچ گونه واکنش ایمنی در نمونه‌ها مشاهده نگردید (شکل ۱ج). بنابراین مقایسه روند تغییرات واکنش ایمنی تنها در دو مرحله صید و تزریق هیپوفیز صورت گرفت که اووسیت‌ها واجد لایه‌های فولیکولی بودند. از طرف دیگر پراکندگی و شدت واکنش ایمنی ایجاد شده در لایه گرانولوزا که بیشترین میزان شدت واکنش در نمونه‌ها را داشت، در قسمت‌های مختلف هر برش و در طی مراحل نمونه‌برداری نشان داد که دارای پراکندگی غیریک‌نواخت تا کاملا یک‌نواخت بوده است.

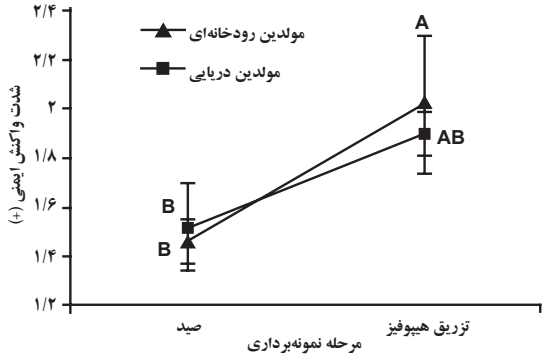
روند تغییرات بیان موضعی IGF-I در تخمدان دو گروه از مولدین و در طی مراحل نمونه‌برداری

نتایج تجزیه واریانس بیان موضعی IGF-I در دو گروه از مولدین و در طی مراحل نمونه‌برداری نشان داد که بین دو گروه مولدین صید شده از دریا و رودخانه تفاوت معنی‌داری از نظر میزان بیان موضعی IGF-I وجود ندارد، ولی بین مراحل نمونه‌برداری صید و تزریق هیپوفیز، تفاوت در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین‌های میزان شدت واکنش ایمنی در دو گروه از مولدین در طی دو مرحله صید و تزریق هیپوفیز، نشان دهنده روند افزایشی بیان IGF-I در لایه‌های فولیکولی در طی این دو مرحله است (نمودار ۱).



شکل ۱: واکنش ایمنی در لایه‌های فولیکولی اووسیت تاس ماهی ایرانی. الف. اووسیت همراه با لایه‌های فولیکولی قبل از تخم‌ریزی. ب. عدم ایجاد واکنش ایمنی در لایه‌های فولیکولی شاهد منفی. ج. تخمک پس از اوولاسیون. د. تفاوت در شدت بیان پپتید در لایه‌های گرانولوزا و تکا. تصاویر الف – ج با بزرگ‌نمایی ۱۰X، تصویر د با بزرگ‌نمایی ۴۰X . FL لایه فولیکولی، ZRI لایه زونارادیاتای داخلی، ZRE لایه زونارادیاتای خارجی، P لایه رنگ‌دانه‌ای، GV هسته، CY سیتوپلاسم، GL لایه گرانولوزا، TL لایه تکا.

میانگین بیان IGF-I موضعی در لایه‌های فولیکولی مولدین صید شده از رودخانه در مرحله تزریق هیپوفیز در سطح ۵ درصد به طور معنی دار بیشتر از مرحله صید است در صورتی که این مقایسه در مولدین صید شده از دریا معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۱).



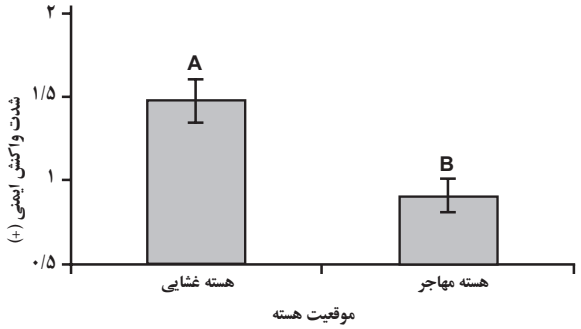
نمودار ۱: روند تغییرات بیان موضعی IGF-I در دو گروه از مولدین صید شده از دریا و رودخانه طی مراحل نمونه‌برداری. در مرحله صید شاخص قطبی شدن هسته (PI> ۰/۱) و در زمان تزریق هیپوفیز (PI< ۰/۰۷). میانگین‌ها (± SEM) که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

تاثیر هورمون‌های رشد و تیروکسین در بیان موضعی IGF-I در کشت اووسیت‌ها

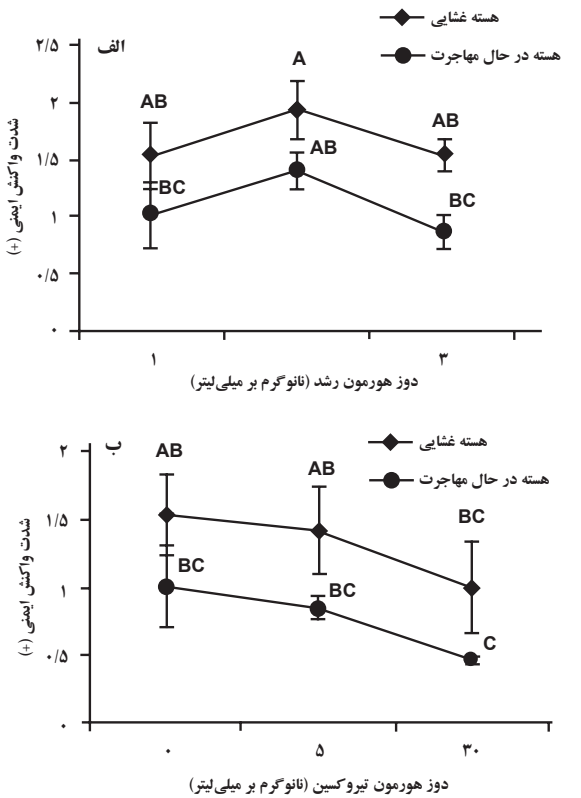
نتایج تجزیه واریانس، آزمایش اثر هورمون‌های رشد و تیروکسین بر میزان بیان IGF-I در لایه‌های فولیکولی اووسیت‌ها با موقعیت هسته‌ای غشایی PI <۰/۰۷ و در حال مهاجرت PI>۰/۱ نشان داد که بین دو موقعیت هسته‌ای، میزان بیان IGF-I دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۱درصد می‌باشد. به طوری که میانگین میزان بیان IGF-I موضعی در اثر تیمارهای اعمال شده در موقعیت هسته غشایی به طور معنی‌دار بیشتر از تاثیر این تیمارها در موقعیت هسته در حال مهاجرت بوده است (نمودار ۲).

همچنین تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین تیمارهای هورمونی استفاده شده مشاهده گردید. بررسی مقایسه میانگین‌های به دست آمده از این آزمایش نشان داد که هورمون رشد در دوز فیزیولوژیک (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) موجب ایجاد واکنش ایمنی بیشتری در لایه‌های فولیکولی نسبت به شاهد و دوز فارماکولوژیک (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در هر دو موقعیت هسته‌ای شده است. اگر چه تفاوت معنی‌دار تنها بین (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) هورمون رشد در موقعیت هسته غشایی نسبت به شاهد و دوز ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر این هورمون در موقعیت هسته در حال مهاجرت دیده می‌شود (نمودار ۳ الف). همچنین هورمون تیروکسین درهر دوز استفاده شده و در هر دو موقعیت هسته‌ای موجب کاهش واکنش ایمنی نسبت به شاهد در لایه‌های فولیکولی شده است (نمودار ۳ ب). با این وجود تنها دوز فارماکولوژیک تیروکسین (۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در موقعیت هسته در حال مهاجرت به طور معنی‌دار، واکنش ایمنی کمتری نسبت به شاهد و دوز فیزیولوژیک (۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در موقعیت هسته غشایی ایجاد نموده است. بین دو هورمون رشد و تیروکسین در دوز فیزیولوژیک، هورمون رشد دارای تاثیر معنی‌دار بیشتری در موقعیت هسته غشایی نسبت به تاثیر هورمون تیروکسین در موقعیت هسته در حال

مهاجرت بود. همچنین دوز فارماکولوژیک هورمون رشد در موقعیت هسته غشایی دارای تاثیر معنی دار بیشتری نسبت به دوز فارماکولوژیک تیروکسین در موقعیت هسته در حال مهاجرت بوده است.



نمودار ۲: میانگین (± SEM) تاثیر هورمون‌های رشد و تیروکسین در دو موقعیت هسته در حال مهاجرت (PI < ۰/۱) و غشایی شدن (PI < ۰/۰۷) بر بیان موضعی IGF-I در لایه‌های فولیکولی اووسیت‌های تاس ماهی ایرانی. میانگین‌ها (± SEM) با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.



نمودار ۳: تاثیر دوزهای مختلف هورمون رشد. الف. تیروکسین، ب. بر بیان موضعی IGF-I در دو موقعیت هسته در حال مهاجرت (PI < ۰/۱) و غشایی شدن (PI < ۰/۰۷). میانگین‌ها (± SEM) با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

بحث

عدم ایجاد واکنش ایمنی در کنترل‌های منفی هر نمونه، نشان دهنده اختصاصی بودن اتصال آنتی IGF-I استفاده شده در بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی به IGF-I موجود در نمونه است. وجود واکنش ایمنی نسبت به IGF-I در لایه‌های فولیکولی به طور عمده در لایه گرانولوزا مشاهده شد. همچنین این واکنش در سلول‌های لایه تکا و در سیتوپلاسم اووسیت‌ها در مجاورت هسته به صورت پراکنده در برخی از نمونه‌ها مشاهده گردید. نتایج به دست آمده از مطالعات بیان موضعی IGF-I در لایه‌های فولیکولی تاس ماهی ایرانی با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی با نتایج به دست آمده در ماهی تیلاپیا (۷، ۲۱)سیم دریایی سر طلایی، *Sparus aurata* (۱۷) و سیم دریایی قرمز (۲۰)، مطابقت دارد. اگر چه در تیلاپیا و سیم دریایی قرمز، این واکنش تنها در لایه گرانولوزا گزارش شده ولی در سیم دریایی سرطلایی این واکنش در هر دو لایه گرانولوزا و تکا مشاهده شده است. همچنین در برخی از پستانداران واکنش ایمنی نسبت به IGF-I در لایه‌های فولیکولی تخمدان، تنها در لایه گرانولوزا گزارش شده است (۳۳). واکنش ایمنی در اووسیت‌های ماهیان نسبت به IGF-I علاوه بر دو لایه فولیکولی، در ماهی سیم دریایی طلایی در سیتوپلاسم اووسیت‌ها نیز به صورت پراکنده گزارش شده است (۱۷). چنین به نظر می‌رسد که لایه گرانولوزا محل اصلی تولید و یا ذخیره IGF-I موضعی در بافت تخمدان تاس ماهی ایرانی باشد. از طرف دیگر، لایه تکا در ماهیان از چندین نوع سلول شامل سلول‌های تولید کننده استروئیدهای جنسی (۳۴)، شبکه مویرگی و بافت همبند تشکیل شده‌اند. بنابراین ممکن است وجود تنوع سلولی در این لایه موجب تفاوت در نتایج بررسی‌های ایمونوهسیتوشیمی گزارش شده در این لایه باشد (۲۵، ۳۴).

نتایج شدت بیان IGF-I در دو گروه از مولدین تاس‌ماهی ایرانی در لایه‌های فولیکولی نشان دهنده روند افزایشی بیان IGF-I، به ویژه در مولدین رودخانه‌ای است. این نتایج با نتایج به دست آمده در برخی از گونه‌های ماهیان هم‌خوانی دارد. در ماهی تیلاپیا واکنش ایمنی نسبت به IGF-I در لایه گرانولوزای اووسیت‌های در حال تکامل به صورت پراکنده گزارش شده در حالی که در اووسیت‌های رسیده، واکنش ایمنی به صورت پایدار در این لایه گزارش شده است (۷). همچنین در ماهی سیم سر طلایی، این واکنش در مرحله قبل از تخم‌ریزی (چند ساعت قبل از تخم‌ریزی) مشاهده شده است (۱۷). از طرف دیگر در ماهی تیلاپیا، میزان بیان mRNA کدکننده IGF-I و میزان واکنش ایمنی نسبت به آن در مراحل مختلف رسیدگی اووسیت‌ها متفاوت گزارش شده است (۲۱). این امر در حالی است که میزان mRNA کدکننده IGF-I، در طی مراحل مختلف تکاملی اووسیت‌های ماهی سیم سر طلایی روند کاهشی را نشان داده است (۱۷). در واقع روند کاهشی در ماهی سیم گزارش شده، نشان دهنده مجموع IGF-I بیان شده در سلول اووسیت به همراه لایه‌های فولیکولی اطراف آن است. ولی همان گونه که در ماهی تیلاپیا نشان داده شده است، الگوی بیان IGF-I در طی مراحل مختلف تکامل اووسیت‌ها و لایه‌های فولیکولی اطراف آن متفاوت بوده است به طوری که در لایه‌های فولیکولی روند افزایشی گزارش شده است (۲۱). در واقع این تفاوت الگو می‌تواند ناشی از تفاوت مرحله تکاملی و نحوه بررسی بخش‌های مختلف اووسیت‌ها یا ناشی از تفاوت فیلوژنتیک بین این گونه‌ها باشد. نتایج به دست آمده در تاس‌ماهی ایرانی مربوط به مرحله پس از زرده‌سازی و آغاز حرکت هسته است. به طوری که با کاهش یافتن شاخص قطبی شدن هسته در مرحله تزریق هیپوفیز

نسبت به مرحله صید در هر دو گروه از مولدین، میزان بیان IGF-I در لایه‌های فولیکولی افزایش یافته است. این افزایش تولید موضعی می‌تواند منجر به رفع توقف میوزی، و شکسته شدن هسته (Germinal Vesicle Break Down; GVBD) گردد. در تاس‌ماهی ایرانی IGF-I در شرایط *in vitro* دارای چنین توانایی به صورت مستقل از هورمون القاکننده رسیدگی جنسی (Maturation Inducing Hormone; MIH) و یا گنادوتروپین بوده است (۲۳). ازطرف دیگر وجود بیان IGF-I موضعی در مرحله صید در هر دو گروه از مولدین (با شاخص قطبی شدن بالاتر از ۰/۱) در این آزمایش، با تاثیری که IGF-I به عنوان پیش تیمار MIH در افزایش میزان GVBD در اووسیت‌ها با موقعیت هسته‌ای در حال مهاجرت، در تاس‌ماهی ایرانی گزارش شده است (۲۳) هم‌خوانی دارد. به عبارتی می‌تواند تاییدی مجدد بر نقش IGF-I در وقایع مرحله اول رسیدگی اووسیت‌ها، به جز تاثیر آن در وقایع مرحله دوم رسیدگی اووسیت‌ها در تاس‌ماهی ایرانی باشد.

نتایج گزارش شده در سیم دریایی نشان داده که IGF-I میزان راه‌های اتصالی در لایه‌های فولیکولی این گونه را افزایش می‌دهد (۳۵). از طرف دیگر در ماهی قزل‌آلای دریایی، نشان‌داده شده‌است که IGF-I فعالیت گیرنده‌های MIH را تحریک می‌نماید(۳۶). این دو واقعه هر دو در مرحله اول رسیدگی اووسیت‌ها در ماهیان رخ می‌دهد (۳۷). بنابراین ممکن است نتایج فوق در تاس ماهی ایرانی نشان دهنده تاثیرگذاری بر یکی از این وقایع باشد. مقایسه بیان موضعی IGF-I در دو دسته از مولدین رودخانه‌ای و دریایی نشان دهنده افزایش معنی‌دار بیان IGF-I در لایه‌های فولیکولی مولدین رودخانه‌ای در مرحله تزریق هیپوفیز نسبت به مرحله صید دارد. این تفاوت در مولدین دریایی مشاهده نگردید. چنین اختلاف زمانی در مورد بیان هورمون رشد نیز، در مولدین ماهی آزاد چام درمرحله قبل از تخم‌ریزی ، در فاصله ۲-۱ روز پس از ورود آنها از دریا به رودخانه مشاهده شده است (۳۸). با توجه به مهاجرت مولدین رودخانه‌ای در جهت خلاف جریان آب به نظر می‌رسد که این گروه از مولدین دارای فعالیت بدنی بیشتری نسبت به مولدین صید شده از دریا باشند. به عبارتی ممکن است که تغییر معنی‌دار میزان بیان IGF-I موضعی در طی مراحل نمونه‌برداری در اثر تاثیر مستقیم فعالیت بدنی مولدین رودخانه‌ای ایجاد شده باشد. همچنین احتمال دیگر این است که افزایش فعالیت بدنی در ترکیب با شرایط محرومیت غذایی، به طور غیرمستقیم موجب افزایش تولید هورمون رشد در این مولدین نسبت به مولدین دریایی شده باشد. تاثیر فعالیت‌های بدنی در بیان سیستم IGF-I در پستانداران (۸، ۴۴-۳۹) و ماهیان (۶) و همچنین تاثیر محرومیت غذایی در بسیاری از گونه‌های ماهیان در افزایش غلظت هورمون رشد در گردش (۲۸، ۴۵، ۴۶) گزارش شده است. نتایج تاثیر هورمون رشد بر بیان IGF-I دراووسیت‌های تاس‌ماهی ایرانی نشان دهنده موثر بودن تاثیر این هورمون بر بیان IGF-I در لایه‌های فولیکولی این گونه دارد. با این وجود به علت عدم امکان تهیه آنتی‌بادی اختصاصی علیه هورمون رشد تاس ماهی ایرانی در این مطالعه، اطلاعاتی در مورد چگونگی تغییرات آن در مراحل بررسی شده به دست نیامد تا بتوان چنین فرضیه‌ای را به طور قاطع تایید یا رد کرد.

نتایج تاثیر هورمون‌های رشد و تیروکسین بر بیان موضعی IGF-I در دو موقعیت هسته‌ای نشان داد که تاثیر این هورمون‌ها در مرحله هسته غشایی به طور معنی‌دار بیشتر ازمرحله هسته در حال مهاجرت است. از طرف دیگر هورمون تیروکسین در هیچ یک از موقعیت‌های هسته‌ای و دوزهای استفاده شده ، دارای تاثیر معنی‌داری در افزایش واکنش ایمنی نسبت به IGF-I نبوده است. هورمون رشد در هر دو موقعیت هسته‌ای در دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش واکنش ایمنی شده است. هر چند که تفاوت معنی‌دار تنها در مقایسه دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هسته غشایی نسبت به شاهد با هسته در حال مهاجرت و دوز ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در موقعیت هسته در حال مهاجرت دیده می‌شود. موثرتر بودن اثر این هورمون در موقعیت هسته غشایی نسبت به موقعیت هسته درحال مهاجرت با نتایج به دست آمده در تغییرات موضعی IGF-I در مولدین هم‌خوانی دارد، به طوری که در هر دو آزمایش با کاهش شاخص رسیدگی جنسی (PI) میزان واکنش ایمنی IGF-I افزایش یافته است. هورمون رشد موجب افزایش واکنش ایمنی IGF-I در بافت تخمدان پستانداران (۴۷، ۴۸) و افزایش بیان mRNA کدکننده IGF-I در این بافت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است (۱۰). همچنین افزایش بیان ژن IGF-I تحت اثر هورمون رشد در بافت بیضه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز گزارش شده است (۱۷). موثر بودن هورمون رشد در بیان IGF-I در بافت تخمدان با توجه به وجود گیرنده‌های هورمون رشد در این بافت در پستانداران (۳۳، ۴۹) و ماهیان (۵۰، ۵۱)، دور از انتظار نمی‌باشد. دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد استفاده شده در این آزمایش تاثیر بیشتری در افزایش واکنش ایمنی IGF-I در لایه‌های فولیکولی داشت. موثرتر بودن این دوز در بیان IGF-I در بافت آبشش و کبد آزاد ماهیان نیز گزارش شده است (۵۲، ۵۳). در واقع این دوز نزدیک به غلظت فیزیولوژیک هورمون رشد در چندین گونه ماهی می‌باشد (۳۰-۲۸). از طرف دیگر با وجود شدت واکنش ایمنی بیشتر در موقعیت هسته غشایی نسبت به هسته مهاجر، تفاوت معنی‌داری بین این دو موقعیت هسته‌ای در دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد مشاهده نمی‌گردد. عدم تفاوت معنی‌دار در این آزمایش و تفاوت معنی‌دار در شدت واکنش ایمنی یاد شده در مولدین رودخانه‌ای می‌تواند بیان کننده این مسأله باشد که عوامل دیگری نیز در کنترل بیان IGF-I در شرایط *in vivo*، به جز هورمون رشد نقش دارند. در پستانداران هورمون‌های دیگری از جمله گنادوتروپین‌ها (۴۸) واستروییدهای جنسی (۴۹) در کنترل بیان IGF-I در بافت تخمدان موثر شناخته شده‌اند. به طوری که بیان شده‌است اثر GH در بیان IGF-I در بافت تخمدان عمومی است در حالی که گنادوتروپین به صورت اختصاصی در بیان IGF-I موضعی در تخمدان نقش دارد (۴۸).

اگر چه مطالعه‌ای در ارتباط با وضعیت هورمون رشد و یا گیرنده‌های مربوط در بافت‌های مختلف در طی آزمایش‌ها انجام شده بر روی تاس‌ماهی ایرانی انجام نگرفت، ولی تفاوت‌های موجود در وضعیت IGF-I و پاسخ‌گویی به هورمون رشد دراین آزمایش‌ها می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که هورمون رشد در بیان موضعی IGF-I موثر است. هر چند که همان گونه که در قبل بیان شد، هورمون رشد نمی‌تواند تنها تنظیم کننده بیان IGF-I موضعی در لایه‌های فولیکولی مولدین باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق برای اولین بار در یک گونه ماهی غضروفی– استخوانی نشان داد که IGF-I به صورت موضعی در لایه‌های فولیکولی اووسیت‌ها در مراحل انتهایی رسیدگی جنسی وجود دارد. روند افزایشی IGF-I موضعی طی مراحل نمونه‌برداری حاکی از این است که IGF-I دارای نقش مهم در رسیدگی نهایی اووسیت‌ها در مراحل انتهایی چرخه تولیدمثل تاس‌ماهی ایرانی می‌باشد. همچنین افزایش معنی‌دار تولید موضعی IGF-I در لایه‌های فولیکولی در مرحله تزریق هیپوفیز نسبت به صید در مولدین رودخانه‌ای می‌تواند نشان دهنده تاثیر مهاجرت رود رو در افزایش بیان موضعی باشد. به علاوه نتایج این تحقیق نشان داد که در مراحل انتهایی رسیدگی جنسی هورمون تیروکسین نقشی در تنظیم بیان IGF-I موضعی ندارد در حالی که هورمون رشد در تولید موضعی IGF-I در لایه های فولیکولی موثر می‌باشد.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های پژوهش از محل اعتبارات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس در قالب پایان نامه دکترا با عنوان «بررسی تاثیر فاکتور رشد شبه انسولین یک در رسیدگی جنسی مولدین ماده تاس ماهی ایرانی» تامین شده است. همچنین انجام پژوهش در بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری و بخش بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است که بدین‌وسیله از مسؤولین محترم آن تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Duan C. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. Am Zool. 1997; 37: 491-503.
2. Moriyama S, Swanson P, Nishii M, Takahashi A, Kawaughi H, Dickhoff W, et al. Development of a homologous radioimmunoassay for Coho Salmon insulin-like growth factor-I. Gen Comp Endocrinol. 1994; 96: 49-161.
3. Upton Z, Yandell CA, Degger BG, Chan SJ, Moriyama S, Francis GL, et al. Evolution of insulin-like growth factor-I (IGF-I) action: in vitro characterization of vertebrate IGF-I proteins. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1998; 121: 35-44.
4. Björnsson BT. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. Fish Physiol Biochem. 1997; 17: 9-24.
5. Holloway AC, Sheridan MA, Van Der Kraak G, Leatherland JF. Correlations of plasma growth hormone with somatostatin, gonadal steroid hormones and thyroid hormones in rainbow trout during sexual recrudescence. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1999; 123: 251-60.
6. Mommsen TP. Growth and metabolism. In: Evans DH (ed). The physiology of fishes. 2nd ed. New York: CRC Press. 1998; 65-97.
7. Reinecke M, Schmid A, Ermatinger R, Loffing-Cueni D. Insulin-like growth factor I in the teleost, Oreochromis mossambicus, the Tilapia: Gene sequnence, tissue expression and cellular localization. Endocrinology. 1997; 138: 3613-9.
8. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. Endocr Rev. 1994; 15: 80-101.
9. LeRoith D, Bondy C, Yaker S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis. Endocr Rev. 2001; 22: 53-74.
10. Biga PR, Schelling GT, Hardy RW, Cain KD, Overturf KO, Ott TL. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Gen Comp Endocrinol. 2004; 135: 324-33.
11. Schmid AC, Lutz L, Kloas W, Reinecke M. Thyroid hormone stimulates hepatic IGF-I mRNA expression in a bony fish, the tilapia, Oreochromis mossambicus, in vitro and in vivo. Gen Comp Endocrinal. 2003; 130: 129-134.
12. Underwood LE, Van wyk JJ. Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW (eds). Williams text book of endocrinology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Company. 1992; 1096-1099.
13. Maestro MA, Planas JV, Moriyama S, Gutierrez J, Planas J, Swanson P. Ovarian receptors insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) and effects of IGF-I on steroid production by isolated follicular layers of the preovulatory coho salmon ovarian follicle. Gen Comp Endocrinol. 1997; 106: 189-201.
14. Van Der Kraak G, Chang JP, Lanz DM. Reproduction. In: Evans DH (ed). The physiology of fishes. 2nd ed. New York: CRC press. 1998; 465-488.
15. Moriyama S, Shimma H, Tagawa M, Kagawa H. Changes in plasma insulin-like growth factor-I levels in the precociously maturing amago salmon, Oncorhynchus masou ishikawai. Fish Physiol Biochm. 1997; 17: 253-295.
16. Guitterez J, Parrizas M, Carneiro N, Maestro JL, Maestro MA, Planas J. Insulin and IGF-receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive cycle. Fish Physiol Biochem. 1993; (11): 247-254.
17. Perrot V, Moiseeva EB, Gozes Y, Chan SJ, Funkenstein B. Insulin- like growth factor receptors and their ligands in gonds of a hermaphroditic species, the gilthead seabream, Sparus aurata: expression and cellular localization. Biol Reprod. 2000; 63: 229-241.
18. Duan C, Duguay SJ, Plisetskaya EM. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon, Oncorhynchus kisutch: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family protein. Fish Physiol Biochem. 1993; 11: 371-399.
19. Duguay SJ, Swanson P, Dickhoff WW. Differential expression and hormonal regulation of alternatively spliced IGF-I mRNA transcript in salmon. J Mol Endocrinol. 1994; 12: 25-37.
20. Kagawa H, Moriyama S, Kawauchi H. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of red sea bream, Pagrus major. Gen Comp Endocrinol. 1995; 99: 307-315.
21. Schmid AC, Naf E, Kloas WMR. Insulin-like growth factor-I and II in the ovary of a bony fish, Oreochromis mossambicus, the tilapia: in situ hybridiza-

tion, immunohistochemical localization, northen blot and cDNA sequences. Mol Cellul Endocrinol. 1999; 156: 141-149.
22. Bahrami Kamangar B, Gabillard JC. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-1, -2, -3, -4, -5, and -6 and IGFBP-related protein 1 during Rainbow Trout postvitellogenesis and oocyte maturation: molecular characterization, expression profiles, and hormonal regulation. Endocrinology. 2005; 147(5): 2399-2410.
23. Bahrami Kamangar B, Mojazi Amiri B, Rasaee MJ, Abtahi B, Bahmani M. Insulin-like growth factor-I can induce oocyte maturation in Persian sturgeon Acipenser persicus, In vitro. Iranian Journal of Natural resources. 2006; 59(1): 165-174.
24. Bahrami Kamangar B, Rasaee MJ, Mojazi Amiri B, Abtahi B, Bahmani M. Correlations between circulating insulin-like growth factor-I and thyroxine and cortisol hormone levels, and some biometrical traits in female brood stocks during the late stages of sex maturation and in juvenile Persian sturgeon Acipenser persicus. Fish Physiol Biochem. 2007; 33: 249-257.
25. Dettlaff TA, Ginsburg AS, OI S. Sturgeon fishes: developmental biology and aquaculture. New York: Springer- Verlag; 1993.
26. Naseri M, Moazzeni SM. Production and application of APAAP complex in immunocytochemical and immunohistochemical staining. Yakhteh. 2007; 9(1): 23-30.
27. Plohman JC, Dick TA, Eales G. Thyroid of lake sturgeon, Acipenser fulvescens, I. Hormon levels in blood and tissues. Gen Comp Endocrinol. 2002; 125: 47-55.
28. Weber GM, Grau EG. Changes in serum concentrations and pituitary content of the two prolactins and growth hormone during the reproductive cycle in female tilapia, Oreochromis mossambicus, compared with changes during fasting. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1999; 124: 323-335.
29. Heath DD, Devlin RH, Heath JW, Sweeting RM, McKeown BA, Iwama GK. Growth and hormonal changes associated with precocious sexual maturation in male chinook salmon Oncorhynchus tshawytscha. J Exp Mar Bio Ecol. 1996;208:239-50.
30. Jeng S, Chen GR, Lai JY HY, Dufour S, CF C. Regulation of pituitary gonadotropin II and growth hormone content by sex steroids and pituitary extract in the aquacultured Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture. 2002; 209: 319-332.
31. Radaelli G, Domeneghini C, Arrighi S, Bosi G, Patruno M, Funkenstein B. Localization of IGF-I, IGF-I receptor, and IGFBP-2 in developing Umbrina cirrosa (Pisces: Osteichthyes). Gen Comp Endocrinol. 2003; 130: 232-244.
32. Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B, Miller K, et al. Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. J Clin Pathol. 2004; 57: 233-237.
33. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks ZEV, Giudice LC. The Insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr Rev. 1999; 20: 535-582.
34. Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int J Dev Biol. 1994; 38: 217-229.
35. Patino R, Kagawa H. Regulation of gap junctions and oocyte maturational competence by gonadotropin and insulin-like growth factor-I in ovarian follicles of red seabream. Gen Comp Endocrinol. 1999; 115: 454-462.
36. Thomas P, Pinter J, Das S. Upregulation of the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries by gonadotropin during oocyte maturation and its physiological significance. Biol Reprod. 2001; 64: 21-29.
37.Patino R, Yoshizaki G, Thomas P, Kagawa H. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2001;129: 427-436.
38. Taniyama S, Kitahashi T, Ando H, Ban M, Ueda H, Urano A. Changes in the levels of mRNAs for GH/PRL/SL family and Pit-1/GHF-1 in the pituitaries of pre- spawning chum salmon. J Mol Endocrinol. 1999; 23: 189-198.
39. DePalo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, Spinella P. Correlations of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I): effects of exercise and abuse by athletes. Clinica chimica acta. 2001; 305: 1-17.
40. Yan Z, Bigga RB, Booth FW. Insulin-like growth factor immunoreactivity increases in muscle after acute eccentric contractions. J Appl Physiol. 1993; 74: 410-414.
41. Yen JK, Aloia JF, Chen M, Ling M, Koo HC, Millard WJ. Effects of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-I in rats. Am J Physiol. 1994; 266: 129-135.
42. De Vol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski J, Bechtel PJ. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. Am J Physiol. 1990; 259: 89-95.
43. Cooper DM. Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats. Am J Physiol. 1997; 273: 1557-1561.
44. Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overlod. J Anat. 1999; 194: 323-334.
45. Duan C, Plisetskaya EM. Natritional regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissue. J Endocrinol. 1993; 139: 243-252.
46. Kakizawa S, Kaneko T, Hasegawa S, Hirano T. Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. Gen Comp Endocrinol. 1995; 98: 137-146.
47. Davoren JB, Hsueh AJ. Growth hormone increases ovarian level of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth factor I in vivo. Endocrinology. 1986; 118: 888-890.
48. Samaras SE, Hagen DR, Bryan KA, Mondschein JS, Canning SF, Hammond JM. Effects of growth hormone and gonadotropin on the insulin-like growth factor system in the porcine ovary. Biol Reprod. 1994; 50: 178-186.
49. Codner E, Cassorla F. Growth hormone and reproductive function. Mol Cell Endocrinol. 2002; 186: 133-136.
50. Yao K, Niu P, LeGac F, LeBail P. Presence of spe-

cific growth hormone binding sites in Rainbow trout, Oncorhynchus mykiss tissues: characterization of the hepatic receptor. Gen Comp Endocrinol. 1991; 81: 72-82.
51. Le Gac F, Blaise O, Fostier A, Le Bail PY, Loir M, Mourat B, et al. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. Fish Physiol Biochem. 1993; 11: 219-232.
52. Sakamoto T, Hirano T. Expression of insulin-like growth factor-I gene in osmoregulatory organs during sea water adaptation of the salmonid fish: possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 1912-1916.
53. Duan C, Duguay SJ, Swanson P, Dikhoff WW, Plisetskaya EM. Tissue-specific expression of insulin-like growth factor I mRNA in salmonids: developmental, hormonal, and nutritional regulation. In: Davey KJ, Tobe SS, Peter DE (editors). Perspective in comparative endocrinology. Canada: Toronto National Research Council of Canada; 1994; 365-372.