دراسة مستوى التعبير الجيني لعامل النمو شبيه الأنسولين من النوع الثاني *igf2* في أنسجة خصى ذكور الجرذان البالغة وغير البالغة

جبار عبطان احمد الساعدي* و حسين خضير عبيس الميالي و آلاء محمد حسون الجسيني*****

***أستاذ علم الغدد الصم والتكاثر،** فرع الفسلجة والأدوية، كلية الطب البيطري، جامعة القادسية، العراق jbr20042002@yahoo.com

****أستاذ علم** فسلجة الحيوان، قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة القادسية، العراق husseinal-mayali@yahoo.com

***مدرس علم فسلجة الحيوان، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة القادسية، العراق alaa.alaa1115@yahoo.com

الخلاصـــــــة

أجريت الدراسة الحالية بهدف تقدير مستويات تعبير الحامض النووي الرايبوزي المراسل لجين عامل النمو شبيه الأنسولين من النوع الثاني *igf2* في أنسجة خصى ذكور الجرذان خلال مرحلتي ما قبل البلوغ وبعده. أخذت نماذج خصى من ثمانية من ذكور جرذان الوستر لكل من الأعمار 25 و 35 و 45 و 55 و65 يوماً لغرض أجراء الدراسة الجزيئية عليها باستخدام تقانة الوقت الحقيقي لتفاعل سلسلة البلمرة الكمية qRT-PCR . أظهرت النتائج زيادة تدريجية في مستوى تعبير جين *igf2* في انسجة الخصى مع تقدم العمر والذي يستمر ليصل إلى أعلى مستوياته في مرحلة ما بعد البلوغ عند عمر (65) يوماً. يستنتج من النتائج الحالية أن لعامل النمو شبيه الانسولين من النوع الثاني دوراً مؤازراً لعملية البلوغ الجنسي في ذكور الجرذان.

الكلمات المفتاحية: عامل النمو شبيه الانسولين من النوع الثاني *igf2*، الخصى، البلوغ الجنسي

***البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث.**

Study of *igf2* gene expression levels in pre- and post-pubertal rat testis

Jabbar A. A. Al-Sa'aidi*; Hussein K.O. Al-Mayali; Alaa M. H. Al-Husseini*****

***Prof. Endocrinol. & Reprod. Physiol., College of Vet. Med., Al-Qadisiya Univ., Iraq. Jbr20042002@yahoo.com**
**** Asst. Prof. Physiol., College of Education, Al-Qadisiya Univ., Iraq. husseinal-mayali@yahoo.com**
***** PhD Student, Physiol., College of Science, Al-Qadisiya Univ., Iraq. alaa.alaa1115@yahoo.com**

Summary

The present study has been conducted to estimate the mRNA expression level of *igf2* gene in pre-and post pubertal male rat testis. Eight testis from eight male rats in each of the following ages: 25, 35, 45, 55, and 56 days, have been obtained for molecular study using qRT-PCR. The results revealed gradual increase of testicular *igf2* expression levels with the progress of age and puberty and continued in rise until reach maximum level in post puberty at 65 day period. It can be concluded that IGF1has an important synergistic role in sexual pubertal processes of male rats.

Key words: *igf21*, testis, sexual puberty.

المقدمة

تصنف عوامل النمو شبيهة الأنسولين Insulin like growth factors (IGFs) بأنها هرمونات متعددة الببتيد Polypeptides تنتمي إلى عائلة الأنسولين والتي تضم الأنسولين Insulin والريلاكسين relaxin (Adhamel *et al.*, 1993) **التي تلعب دوراً** مهماً في تنظيم العمليات الأيضية داخل خلايا الجسم حيث تمتلك نشاطات محفزة للنمو وتأثيرات أيضية مشابهة للأنسولين في العديد من أنواع الخلايا والأنسجة (Nakae, *et al.*, 2001).

يُعد العاملان IGF1 **و** IGF2 الشكلين الرئيسين لهذه الهرمونات وتتشابه هذه العوامل فيما بينها علاوة على تشابهها الكبير مع شكل الأنسولين فقد وجَد العالمان Rinderknecht **و** Humbel**عام** (1978) أن تسلسل الأحماض الأمينية لهذه العوامل مشابهة **بنسبة** 48% لهرمون الأنسولين الأولي البشري Human proinsulin hormones، وهي من أكثر العوامل المدروسة في اللبائن ويُعرف جهاز عوامل النمو شبيهة الأنسولين بجهاز الانقسام الخلويCytokine system لأنها تساهم في نمو الخلايا وتطوّرها وتمايزها فضلاً عن منع الموت المبرمج Apoptosis للخلايا(LeRoith & Yakar, 2007).

يوصف IGF1 **و**IGF2 بأنهما وسائط mediators تتوسط الفعل المحفز لهرمون النمو Growth hormone (GH)**، إذ** يُنتج IGF1 **و**IGF2 الدائر في الدم إبتداءً من الكبد تحت تأثير هرمون النمو الذي تفرزه الغدة النخامية ليرتبط بمستقبلاته في الكبد لتحفيز بناء IGF1 **و** IGF2 وإفرازه وعليه فان IGF1 **و**IGF2 يتوسطان التأثير الصمي لهرمون النمو (LeRoitah *et al.*, 2001). هذا فضلاً عن دورهما بوصفهما محفزات للإنقسام mitogen فإنَّهما يستحثان التمايز الخلوي في أنواع مختلفة من الخلايا (Jones & Clemmons1995).

التعبير الجيني لـIGF2 mRNA مُعقد تساهم فيه **أربع حفازات** Promotors (P1-P4) لانتاج جين IGF2 **بطول** (30Kb) **مُكون من خمس مناطق لـ** IGF2 mRNA غير مترجمة في الطرف 5 **تحتوي على** 9 **أكسونات** (Van *et al.*,1991) وجميعها تشفر لنفس الببتيد الناضج (Horn *et al.*,2002) **،ان الحفازات** (P2-P4) تكون فعالة خلال الحياة الجينية في معظم **الأنسجة** (Ekstrom *et al.*,1995) ومن ضمنها الكبد حيث يكون **الحفاز** P3 انتاجه عالياً في حين ينخفض بعد الولادة **،أما الحفاز** P1 فيعمل (Turned on) بعد الولادة ليساهم في انتاج (50% - 70%)**من** IGF2 **الكلي** (Li *et al.*,1996) . كما يساهم **الحفاز** P4 في الانسان خلال النمو وفي كبد البالغ حيث يساهم في انتاج يتراوح بين (25% - 60%) **من الانتاج الكلي** IGF2 mRNA**،ولن** الانتاج الجيني لـIGF2 يعتمد على هرمون النمو فهو **المنظم** الرئيس لجين *igf2* **في الانسان** (Li *et al.*,1996).

أما في القوارض Rodents **وبعض الأنواع الأخرى لا** يعتمد تنظيم جين *igf2* على هرمون النمو لذلك فيعتقد **أن** وظيفة IGF2 بأنه عامل نمو جنيني لأن حذف جين IGF2 ينتج عنه تدهور في نمو الجنين داخل الرحم وقبل الولادة (Dechiara *et al.*,1990). **إن الحفازات** P1 **و** P2 في الجرذان والفئران تكون مشابهة **للإنسان** في حين تكون **الحفازات** P3 **و**P2 غير فعالة في **معظم** أنسجة البالغ وقليل ما يعرف عن تنظيمها بواسطة عوامل استنساخ جديدة، لذا فان تركيز IGF2 **الدائر بعد الولادة مرتبط بالحفاز المسؤول عن إنتاج** IGF2 mRNA الكبدي حيث انه ينعدم في الجرذان والفئران (Gangji, 1998)

إن توزيع مستقبلاIGFs في الدماغ والنخامية والمناسل والقناة التناسلية (Schneider *et al.*,2003) يُعزز استنتاج حقيقة أن كل مُكوَن من المحور تحت المهاد – **النخامي** – **القندي** Hypothala –pituitary – gonads axis والجهاز التكاثري هي أهداف **فعالة لانبعاث الاشارة من المحور المحرض الجسم** Somatotrophs axis وعليه فإنَّ تشديد عمل IGFs عند العديد من المواقع لا يُمثل فقط التأثير الصمي لـIGFs المعتمد على هرمون النمو (GH-dependent – IGFs) الذي يُنتج بصورة رئيسية من الكبد ليصل إلى أهدافه بواسطة الدم الدائر (Ohlsson *et al.*,2009) كذلك فإنَّه يشتق موضعياً في الأنسجة المختلفة والاعضاء التكاثرية لانواع عّدة (Zakaria *et al.*,2009-) ليبدي تأثيره الغدي الذاتي والغدي المجاور لوظائف أنواع الخلايا الجسمية Somatic cells والجنسية Sex cells (Mazerbourg *et al.*,2003). **ان الإنتاج الموضعي لعوامل النمو** IGFs **في لنسجة** الخصى بواسطة خلايا ليدك وخلايا سرتولي يلعب دوراً مهماً في عملية تكوين النطف وتنظيم الوظيفة الصمية للخصية

(Vannelli *et al*.,1988). كما إن قابلية عمل LH على خلايا ليدك يتطلب وجود IGF1 الموضعي في أنسجة الخصى (Wang & Hardy,2003) حيث يعمل IGF1 على تسهيل تكاثر ونضج خلايا ليدك بالتآزر مع LH ويتقدم الاحداث التي يتوسطها LH خلال البلوغ (Chuzel *et al*.,1996) كما أنه يحور تأثير LH على انتاج التستوستيرون (Zhang *et al*.2001). فضلاً عن تأثير IGF1 على خلايا ليدك فهو ضروري لتنظيم العدد النهائي لخلايا سرتولي وحجم الخصيتين والنتاج اليومي للنطف ، وان العدد الكافي لخلايا سرتولي ضروري لخصوبة الذكور (Jean-Luc *et al*.,2013) .كما لوحظ أن خلايا سرتولي غنية بمستقبلات IGF-IR وتستجيب لتأثير IGF2 المحفز للنشاط الأيضي حيث يسبب اندماج Thymidin [H3] الى DNA في خلايا سرتولي لخصى الجرذان (Zakaria *et al*.,2009) يوماً كما يعمل على زيادة حامض اللبنيك وزيادة بناء البروتينات في خلايا سرتولي في الوسط الزرعي. وفي الفئران غير الناضجة immature يعمل IGF2 المنتج من خلايا سرتولي كمنظم للتعبير الجيني لسليفات النطف وهذا يشير الى دور IGF2 في عملية تكوين النطف (Tsuruta *et al*.,2000).

المواد وطرائق العمل

حيوانات التجربة Experimental animals

تم اختيار الجرذان البيض في هذه الدراسة بوصفها نموذجاً يمثل الحيوانات اللبونة وربيت في ظروف مختبرية مناسبة، إذ كانت درجة الحرارة ما بين 22 و 25 مئوية ومعدل 14ساعة إضاءة الى10 ساعات ظلام طول مدة الدراسة. وغذيت الحيوانات على العليقة الغذائية المختبرية القياسية (نسبة بروتين 19% وطاقة 3000 سعرة حرارية) والماء بصورة حرة *ad Libidum*.

أستخدم في الدراسة 40 جرذاً ذكراً غير ناضجا بعمر(25) يوماً، تمت التضحية بثمانية جرذان منها في الأعمار 25 و 35 و 45 و 55 و 65 يوماً، بعد تخديرها بحقن مزيج من (0.3) مل كيتامين و (0.1) مل زايلازين لكل كغم من وزن الجسم في البريتون، ثم أستؤصلت خصاها لغرض أجراء الدراسة الجزيئية المتمثل بفحص الوقت الحقيقي لتفاعل سلسلة البلمره للأستنساخ العكسي الكمي qRT-OCR لتقديرمستوى تعبير جين عامل النمو شبيه الانسولين من النوع الثاني IGF2.

التحليل الجزيئي Molecular analysis

أ- **المواد المستعملة في الدراسة:** استخدمت عدد قياس الوقت الحقيقي لتفاعل سلسلة البلمرة للأستنساخ العكسي الكمي المجهزة من شركة **Bioneer** بكوريا الجنوبية باستخدام البادئات **Primers** التالية والخاصة بـ **IGF2** و **GAPDH**.

Primer	Sequence		Product size	ACCESSION No.
IGF2	F	TGGCTGAGCAACTTCGATTG	bp77	NM_001082477.2
	R	AACCATGCAAACTGCTCAGG		
GAPDH	F	TGCCACTCAGAAGACTGTGG	85bp	NM_001190162.1
	R	GGATGCAGGGATGATGTTCT		

ب- **فحص تفاعل سلسلة البلمره للأستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي (RT-qPCR):** تم قياس مستوى الحمض النووي المرسال (mRNA) الذي يستنسخ من الخصى للدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجين عامل النمو *igf2* إضافة الى استخدام جين الـ *GapdH* gene كجين محافظ قياسي Housekeeping gene لحساب التعبير الجيني. وتم اجراء هذا الفحص حسب الخطوات الآتية:

1- **لاستخلاص الاحماض النووية الكلي Total RNA extraction :** تم لاستخلاص الحمض النووي الرايبوزي الكلي Total RNA باستخدام عدة الترايزول (Trizol kit) المجهز من قبل شركة بايونير الكورية و حسب تعليمات الشركة المصنعة ، فقد تم صعق الخصى مباشرة بعد استئصالها باستخدام النتروجين السائل ثم وضعت في أنابيب أبندورف epindorf tube حاوي على 0.5 مل من ماء دبك DEPC ثم دورت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقتين, بعدها تم سحب الدبك وبقاء عينات الخصى فقط بعدها أضيف 0.5 مل من Trizol ثم سحقت عينات الأنسجة باستخدام المدقة micropistells ،وبعد هرسها وتجانسها جيداً، أكملت الأنابيب بمللتر واحد من الـ Trizol. بعدها تمت أضافة الكلوروفورم (200) مايكرولتر ورجت الأنابيب بجهاز vortex ثم حفظت في الثلاجة لمدة 5 دقائق بعدها دورت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة ثم نقل الرائق في أبندورف جديد مع إضافة (500) مايكروليتر من

الآيزوبروبانول isopropanol ورجت الأنابيب بجهاز vortex ثم حفظت في الثلاجة لمدة 10 دقائق بعدها دورت النماذج بجهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة وبسرعة 15000 دورة/دقيقة بعدها تم سحب الطافي وبقاء المترسب pellet فقط وأضيف عليه مللتر واحد من الكحول الأثيلي (80%) ورج بجهاز vortex ثم دور الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعه12000 دوره/دقيقه لمدة 5 دقائق وتم التخلص من الطافي وبقاء الراسب pellet ثم جفف الراسب جيدا بقلب الأبندورف على ورق نشاف وتركه بدرجه حراره الغرفة لمدة 10 دقائق .بعدها تم أضافة 50 مايكروليتر من الدبك للراسب ثم نقلت الأنابيب الى حمام مائي بدرجة 70مْ لمدة 10 دقائق.

2- **قياس كمية ونقاوة الحمض النووي الرايبوزي Assessy RNA yield and quailty:** تم الكشف عن الحمض النووي RNA المستخلص من العينات وتحديد تركيز الحمض النووي RNA (ng\ml) باستخدام جهاز UV/VIS Spectrophotometer Nanodrop (OPTIZEN POP. MECASYS Korea) وقياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة 260 و 280 نانومتر ،فضلا عن توثيق وجود الحمض النووي RNA باستخدام الترحيل الكهربائي Electrophoresis.

3- **المعاملة بأنزيم (DNase1) DNase inactivation Treatment: تمت معاملة مستخلص الحمض النووي** RNA **باستخدام** DNase I treatment **وذلك** للتخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم طبقاً للطريقة التي وصفتها تعليمات شركة Promega company, USA.

4- **تصنيع الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين cDNA synthesis :** تم استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي الدي أوكسي رايبوزي المكمل cDNA من عينات الحمض النووي RNA وذلك لاستخدامة في تضخيم الجينات **ومستوى** تعبير جين *igf2* والجين المحافظ *GAPDH* **بفحص** Real-Time PCR، حيث تم استخدام عدة Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزَة من شركة بايونير الكورية. تم اجراء هذا **الخطوة** طبقا لتعليمات الشركة، حيث تم توحيد تراكيز جميع عينات RNA **المعاملة بـ** DNase لنفس التركيز المقاس **باستخدام ماء الـ** DEPC ثم حولت جميع عينات RNA **الى** cDNA بواسطة تحضير تفاعل PreMix reaction للاستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي.

5- **فحص (Quantitative Real-Time PCR (qPCR**: **تم إجراء فحص** qRT-PCR لعينات cDNA **بأستخدام عدة** Accupower Green Star Real-Time PCR kit وجهاز Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block المجهزيّن من شركة بايونير الكورية **وحسب الخطوات التي وصفها** Cheon *et al.* (1999)، و يعتمد هذا الفحص على صبغة سايبر الخضراء Syber Green **في عدّة الكشف** qRT-PCR PreMix والذي صمم لتضخيم الـ PCR **للـ** cDNA لجين*igf2* **باستخدام البادئ** primer وجين *GapdH* كجين محافظ (قياسي) لتقدير كمية عدد النسخ الناتجة من الـ PCR مقارنة بعدد النسخ للمنحني القياسي للجينوم الناتج من qPCR. **ترتبط** صبغة السايبر ألخضراء ألموجودة في الكت الجين المستهدف والجين المحافظ بعدها تم تسجيل الأشارات الومضية (Fluorescent signals) في جهاز الدوار الحراري (Thermocycler Real Time PCR). ينشأ المنحني القياسي الجينومي من جين *GapdH* **للجرذ** (27.9Mbp) *Rattus norvegicus* والذي تم الحصول عليه **من** بنك **الجينات** NCBI-Gene Bank بما يقارب (1×10^{7}~) **نسخة** أستخدمت كمنحني قياسي لـ Genomic DNA .

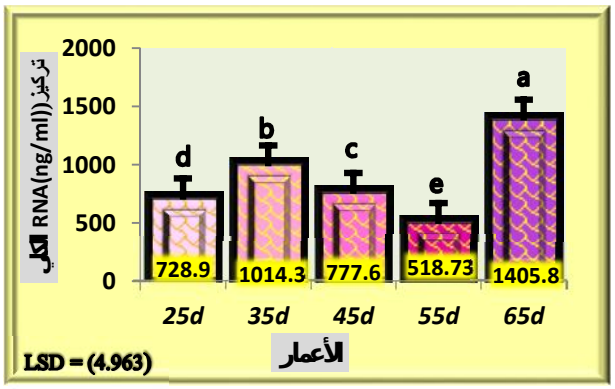
6- **تحليل البيانات data anlysis of Real-Time PCR**: **تم** تحليل البيانات الناتجة **من تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت** الحقيقي الكمي **باستخدام** طريقة Livak and Schmittgen (2001).

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي بهدف معرفة معنوية الفروق بين معدلات المعايير المدروسة وأجريت **المقارنات** باستخدام تحليل التباين في اتجاه واحد (ANOVA1). وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى احتمال (5%) . **وأستخرجت** التحليلات الإحصائية باستخدام برنامج Genstat discovery edition (VSN international) **كما تم اختبار الفروق** المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى احتمالية 0.05.

النتائج Result

تركيز ونقاوة الـ RNA الكلي: أظهرت تراكيز الحامض النووي الرايبوزي الكلي Total RNA **في أنسجة الخصى للأعمار المدروسة** تراكيز عالية وبكميات كافية للبدء بفحص تفاعل **سلسلة البلمرة**. كما أشارت نتائج الدراسة الى أن النسبة بين الكثافة البصرية optical density عند الطوليين الموجبين 260 و280 نانومتر كانت تتراوح ما بين 1.8 و2.1 والتي تشير الى **نقاوة الـ** RNA **في** عينات الأنسجة التي أشتملت عليها الدراسة.**سجلت النتائج** المبينة في **الشكل** (1) زيادة معنوية ($p<0.05$) **في** تركيز RNA **الكلي** (ng/µl) **لأنسجة الخصى خلال مرحلة ماقبل البلوغ خاصةً بالعمر** 35 يوماً مقارنة **بالعمر** 25 يوماً ثم انخفضت هذه الزيادة تدريجياً عند وصول الحيوان الى مرحلة البلوغ عند العمرين 45 و55 **يوماً وكان الانخفاض** أكثر معنوية **بالعمر** 55 يوماً مقارنة بالأعمار الأخرى ثم عادت للزيادة مرة **أخرى عند مرحلة ما بعد البلوغ بالعمر**65 **يوماً** لتسجل أعلى مستوى بين الأعمار.

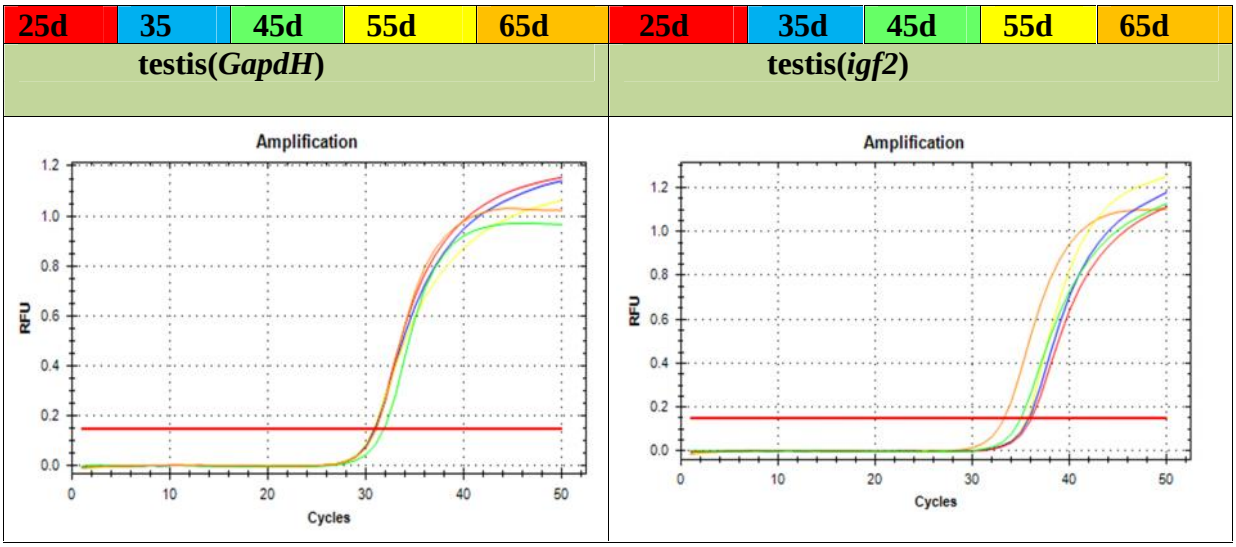


الشكل (1) يبين تركيز RNA **الكلي في أنسجة الخصى لمرحلتي قبل البلوغ وبعده لذكور جرذان الوستر.**

- **الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية($P<0.05$) بين المجاميع العمرية.**

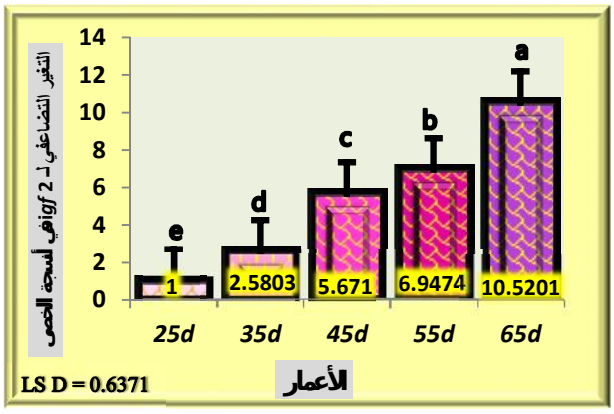
تفاعل سلسلة البلمرة للأستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي (qPCR): تضمن تحليل بيانات فحص تفاعل qPCR **المعتمد** على صبغة سايبر الخضراء SYBR®green قسمين هما:

1. **تقدير كفاءة البادئ Primer efficiency estimation** ، **إذ** تم احتساب نتائج بيانات عدد دورات العتبة threshold cycle (Ct) من مسار التضخيم Ampilification plot في جهاز فحص تفاعل qPCR **خلال الطور** (**الأسي**) **المتسارع** Expotential phase **لإشارات الفلوروسنت** (الومضية) لصبغة سايبر الخضراء المتحدة ببادئ الجين **الذي** أشتملت عليه الدراسة (*igf2*) المتفاعل مع الحامض النووي منقوص الأوكسجين المتمم (cDNA) **للحامض** mRNA **في أنسجة الخصى لذكور الجرذان**. ومن مسار تضخيم دورة العتبة **تم أحتساب المنحدر الخطي** Linear regression بالاعتماد على نقاط البيانات ومنه **تستنتج** كفاءة البادئ من الميل slope **الخطي** (**الشكل**-2).



الشكل (2): منحنيات التغير التضاعفي لجينات *GAPDH* و *igf2* في أنسجة خصى الجرذان لمرحلتي قبل البلوغ و بعده.

2. **الكمية النسبية لتعبير الجينات المستهدفة:** تم احتساب نسبة تعبير الجين الهدف في الدراسة الحالية (*igf2*) في أنسجة الخصى بستخدام معادلة ($2^{\wedge-\Delta\Delta Ct}$) وذلك بتصحيح تعبير الجين الهدف مع تعبير الجين المحافظ كجين تصحيح. وأعتبر تعبير الجين بعمر 25 يوماً ممثلا للسيطرة أو القياسي للأعمار اللاحقة. بعد تصحيح عدد دورات العتبة للجين الهدف بواسطة جين التصحيح لكل الأعمار، تم تصحيح قيمة ΔCt للأعمار 35 و45 و55 و65 يوماً الى قيمة ΔCt للعينة القياسية (عمر 25 يوماً) بعدها تم حساب نسبة التعبير والتي عبر عنها بالتغيير التضاعفي Fold changes. فقد أظهرت النتائج المبينة في الشكل (3) زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى تعبير جين *igf2* في أنسجة خصى ذكور الجرذان واستمرار هذه الزيادة بصورة تدريجية خلال القدم بالنمو والبلوغ لتصل أقصاها في مرحلة ما بعد البلوغ عند عمر (65) يوماً حيث بلغت مستويات التعبير جين *igf2* (2.5803 و5.671 و 6.9474 و 10.5201) ضعف للأعمار(35 و 45و55 و65) يوماً على التوالي مقارنة بعمر (25) يوماً.



الشكل (3): التغير التضاعفي لجين *igf2* في أنسجة خصى ذكور جرذان الويستر لمرحلتي قبل البلوغ وبعده.

- **الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية($P<0.05$) بين المجموعات العمرية**

المناقشة

تركيز RNA الكلي

سجلت نتائج الدراسة الحالية زيادة في مستويات RNA الكلي لأنسجة الخصى خلال المراحل العمرية، إذ كانت تلك الزيادة متقلبة (fluctuated) فقد حصلت زيادة عند العمر 35 يوماً بالمقارنة مع العمر 25 يوماً إنخفضت بعدها تدريجياً عند العمرين 45و55 يوماً ثم عادت لترتفع عند العمر 65 يوماً. أن تلك التقلبات قد تعود إلى مستوى بناء البروتين والحالة التكاثرية داخل النبيب المنوي (Seminiferous tubules) وفي الأنسجة البينية للخصية وبشكل خاص خلايا لايدك وهذا يعكس مستوى نشاط ووظيفة الخصية في عملية تكوين النطف وتصنيع الستيرويدات، حيث يُعّد عامل النمو IGF1 من العوامل التي تلعب دوراً هاماً قبل البلوغ وبعده كما أنَّه يسيطر على أستتباب homeostasis الأنسجة خلال الحياة من خلال تنظيمه لانقسام الخلايا وتمايزها فضلا عن منع الموت المبرمج Apoptosis للخلايا. في خصى اللبائن يعمل عاملا النمو IGF1 و IGF2 على تحفيز تكاثر الخلايا الجرثومية وتمايزها إما بشكل مباشر أو غير مباشر كما يؤثران في بناء الستيرويدات وإفراز بروتينات خلايا سرتولي في الجزء النبيب. إذ يؤثر العامل IGF1 في تكاثر وتمايز خلايا لايدك المنشأة (PLC) والغير ناضجة (ILC) كما يزداد مستوى التعبير الجيني لأنزيمات بناء الستيرويدات كذلك مستقبلات الأندروجين والأستروجين وIGF1R والجزء الخارجي من مستقبلات LHR (Wang *et al*., 2003). كما أن الزيادة الحاصلة في مستوى RNA الكلي في مرحلة قبل البلوغ بعمر (35) يوماً تعود الى مستوى النشاط العالي لأنسجة الخصى قبل دخول الحيوان بمرحلة البلوغ من خلال تهيئة أنزيمات تصنيع الستيرويدات وتهيئة مستقبلات الهرمونات التكاثرية التي تزداد عند البلوغ، كما لوحظت عودة الزيادة مرة أخرى بعد البلوغ بعمر65 يوماً حيث إكتمل النضج الوظيفي لأنسجة الخصى بدليل اكتمال تمايز خلايا لايدك البالغة (Wang *et al*.,2003) وبالتالي انتاجها لكميات كبيرة من الأندروجينات.

الكمية النسبية لتعبير الجين المستهدف *igf2*

أن الارتفاع المعنوي في مستوى تعبير جين *igf2* في أنسجة الخصى مع تقدم العمر يتعارض مع ما أشار إليه Murphy وآخرون(1987) حيث ذكروا عدم وجود IGF2mRNA في خصى الجرذان البالغة كما أشار Voutilainen وآخرون (1988) إلى أنَّ مستويات mRNAIGF2 تنخفض في أنسجة خصى جنين الإنسان مع تقدم عمر الحمل، وإنَّ كلٍ من IGF1 و IGF2 ينتج في خصى الخنزير في المرحلة الجنينية وقبل النضج حيث وجد إنَّ مستويات IGF1mRNA في خصى الخنازير يزداد بشكل ثابت بينما ينخفض IGF2 من اليوم (7) بعد الولادة إلى (25)أسبوعاً ولا يتبع مستوى التستوستيرون في المصل (Ann et al.,1994) . وقد تعود لسبب الزيادة إلى تأثير المحور المحرض للنمو الجسمي في بناء وافراز IGF2 من أنسجة الخصى حيث تنتشر مستقبلات هرمون النمو في أنسجة الخصى التي قد تتحفز بواسطة زيادة الإفراز النبضي لهرمون النمو عند البلوغ إذ تُنتج مستقبلات GHR في خلايا ليدك المنشأة وغير الناضجة والبالغة في الجرذان(Bartke et aL.,2003)،كما أشار Carlsson وآخرون (1990) إلى وجود GHR في عدّة انسجة في الجرذان ومنها أنسجة الخصى التي يزداد عددها مع التقدم بالعمر حيث يقع انتاج عوامل IGFs في المناسل جزئياً تحت سيطرة هرمون النمو ليبدي تأثيره الغدي الذاتي او الغدي المجاور وقد تشير النتائج إلى أنَّ المحور المحرض للنمو الجسمي يؤثر على الوظيفة التكاثرية من خلال عمل IGF1 وIGF2.

كما تعود زيادة مستويات تعبير جين igf2 في أنسجة الخصى الى زيادة إفراز الهرمونات المحرضة للأقناد (LH وFSH) خلال مرحلة البلوغ والناتج من تنشيط محور HPG حيث تمتلك الهرمونات المحرضة للأقناد دوراً مهماً في تنشيط إنتاج IGF2 فقد وجد أنَّ تحفيز خلايا المبيض الحبيبية على بناء IGF2mRNA يتم بواسطة FSH وHCG (المناظر لـ LH) وcAMP (Voutilainen et al.,1998) وقد يعمل LH وFSH بالآلية نفسها في زيادة مستويات IGF2mRNA في أنسجة الخصى.

المصادر

Adams, T.E.; Epa,V.C.; Garrett,T.P. and Ward, C.W.(2000). Structure and function of the type 1insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life. Sci*.;57:1050-1093.

Adham,I.M.; Burkhardt, E.; Benahmed, M.and Engel W. (1993)Cloning of a cDNA for anovel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells.*J.Biol.Chem.;*268: 26668–26672.

Ann,M.C.;Susan,E.S.;James,M.H.and Dnniel,R.H.(1994).Changes in the Messenger Ribonucleic Acid for Insulin-Like Growth Factor-I and -II in the Porcine Testis during and between Two Waves of Testicular Development. *Biol .Repod.;*50: 993-999

Bartke,A.(2003).Can growth hormone(GH)accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocr*.;78:210–216**.**

Carlsson,B.;Billig,H.; Rymo,L.and Isaksson,O.G.P.(1990)Expression of the growth hormone binding protein messenger RNA in the liver and extrahepatic tissues in the rat: co-expression with the growth hormone receptor. *Mol. Cell.Endocr*;73:1-6.

Cheon, M.; Park, D.; Kim, K.; Park, S.D.and Ryu, K. (1999). Homologous up regulation of GnRH receptor mRNA by continuous GnRH in cultured rat pituitary cells. *Endocr*.; 11: 49–55.

Chuzel,F.;Clark,A.M.; Avallet, O.and Saez, J.M**.(**1996).Transcriptional regulation ofthe lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. *Eur.J.Biochem.;* 239:8–16.

DeChiara, T. Efstratiadis, A.; Robertson, E.A.(1990). Growth-deficientphenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disruption by targeting. *Nature.;* 345 :78–80.

Ekström,T.J.; Cui, H.; Nyström, A.; Rutanen, E.M.and Ohlsson, R. (1995).Mono-allelic expression of IGF2 at the human fetal/maternal boundary. *Mol. Reprod. Dev*..; 41: 177–183.

Gangji ,V.; Rydziel, S. and Gabbitas , B. (1998). Insulin-like growth factor II promoter expression in culturesrodent osteoblasts and adult rat bone. *Endocr.;* 139:2287-2292.

Horn,H**.;**Ekström,C.;Ellis,E.;Olivecrona,H.;Einarsson,C; Tally,M. and Ekstrom,T.J. (2002). GH is a regulator of IGF2 promoter-specific transcription in human liver.*J. Endocr.*; 172: 457–465.

Jean-Luc,P.;Pierre,C.;Céline,Z.;Béatrice,C.;Marilena,D.;Florence, A.;Christopher,R.C.; Françoise,U.;Betty,F.; Michel, C.; Mylène ,D.; Pedro,L.H.; François,P.; Marc, G.and Florian,G.(2013).An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation,Testis Size,and FSH Action in Mice.*Mole. Endocr*.; 27(5) 814-27.

Jones, I. J. and Clemmons, D. R.(1995). Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: *Biol. Act. Endocr. Rev. Endocr.Soci*.; 16(1) :3-34.

LeRoitah,D.;Bondy,C.;Yakar,S. and Liu, J.L. (2001) The somatomedin hypothesis. *Endocr. Rev*.; 22:53-74.

LeRoith, D. and Yakar, S. (2007) Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Nat. Clin. Pract. Endocr. Metab.;* 3:302-310**.**

Li, X.; Cui, H.;Sandstedt,B.;Nordlinder,H.;Larsson, E. and Ekström, T.J.(1996). Expression level of IGF2 in the human liver: developmental relationships of the four promoters. *J. Endocr*.;149:117-124.

Livak, K.J.and Schmittgen, T.D.(2001). Analsis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25: 402-410.

Mazerbourg, S.; Bondy, C.A.; Zhou, J. and Monget, P.(2003) The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selectionof ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod. Domes. Anim* .; 38:247–258.

Murphy, L.J.; Bell, G.I,.and Friesen, H.G.(1987). Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocr.*;120:1279–1282.

Nakae, J.; Kido, Y.and Accili, D.(2001).Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr. Rev*.;22:818–835.

Ohlsson, C.; Mohan, S. and Sjogren, K.(2009**)** The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr. Rev*.;30:494– 535.

Rinderknecht, E.and Humbel, R.E(1978) The amino acid sequence ofhuman insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem*.; 253:2769-2776.

Schneider,H.J.;Pagotto,U.andStalla,G.K.(2003)Central effects of the somatotropic system. *Eur .J. Endocr*.; 149:377–392.

Tsuruta,J.K.; Eddy, E.M. andO'Brien, D..A.(2000)Insulin-like growth factor-II/cation-independent mannose 6-phosphate receptor mediates paracrine interaction during spermatogonial development. *Biol. Reprod*.; 63:1006–1013**.**

van, D. M.A.; van, S. F.M.A, Boostma, H.J.; Holthuizen, P.and Sussenbach, J.S.(1991) Initial characterization of the four promoters of the human insulin-like growth factor II gene. *Mole.Cell.Endocr***.;**81: 81–94.

Vannelli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio, M.and Balboni, G.C.(1988). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis:an immunohistochemical study. *Fertil .Steril.;* 49:666–669.

Voutilainen,R. and Miller,W.L.(1988).Developmental and hormonal regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and steroidogenic enzymes in human fetal adrenals and gonads. *DNA* .; 7:9-15.

Wang,G. and Hardy, M.P.(2003).Development of Leydig Cells in the Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) KnockoutMouse: Effects of IGF-1 Replacement and Gonadotropic Stimulation *Biol. Reprod.;*70(3):632-639

Wang,G.; O'shaughnessy,P.J.; Chubb, C.; Robaire, B. andHardy,M.P.(2003)**.** Effects of Insulin-Like Growth Factor I o n Steroidogenic.*Endocr*.; 144: 5058–5064

Zakaria,R.;Rajikin,M.H.;Yaacob,N.S.and Nor, N.M. (2009) Immunolocalization of insulin-like growthfactors and their receptors in the diabetic mouseoviduct and uterine tissues during the preimplantation period. *Acta Histochemica*., 111: 52-60

Zhang,F.P.; Poutanen, M.; Wilbertz, J. and Huhtaniemi, I.(2001) Normal prenatal butarrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LHRKO) mice. *Mol Endocrinol*.; 15:172–183.