

## دراسة مستوى التعبير الجيني لعامل النمو شبيه الأنسولين من النوع الثاني IGF2 في أنسجة خصى ذكور الجرذان البالغة وغير البالغة

جبار عباس احمد الساعدي  
كلية الطب البيطري، جامعة القادسية  
[jbr20042002@yahoo.com](mailto:jbr20042002@yahoo.com)

حسين خضير عبيس الميالي  
كلية التربية، جامعة القادسية  
[husseinal-mavali@yahoo.com](mailto:husseinal-mavali@yahoo.com)

آلاء محمد حسون الحسيني  
كلية العلوم، جامعة القادسية  
[alaa.alaa1115@yahoo.com](mailto:alaa.alaa1115@yahoo.com)

### الخلاصة

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 و 65 يوماً لغرض إجراء الدراسة الجزيئية عليها باستخدام تقانة الوقت الحقيقي لتفاعل سلسلة البلمرة الكمية qRT-PCR. أظهرت النتائج زيادة تدريجية في مستوى تعبير جين IGF2 في أنسجة 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 الأنسولين من النوع الثاني أثراً مهماً في عملية البلوغ الجنسي لذكور الجرذان.

**الكلمات المفتاحية:** عامل النمو شبيه الأنسولين من النوع الثاني IGF2، الخصى، البلوغ الجنسي

### Abstract

The present study has been conducted to evaluate the mRNA expression level of IGF2 gene in pre-and post pubertal male rat testis. Eight testis from of 25, 35, 45, 55, and 65 days aged male rats have been obtained for molecular quantification of testicular IGF2 gene using qRT-PCR. The results revealed gradual increase of testicular IGF2 expression levels with the progress of age. During post-pubertal stage, the expression levels continued in rise until reaching the maximum level at 65 days old. In conclusion, IGF2 has an important role in sexual puberty of male rats.

**Key words:** IGF2, testis, sexual puberty.

### المقدمة

تصنف عوامل النمو شبيهة الأنسولين (IGFs) Insulin like growth factors بأنها هرمونات متعددة الببتيد Polypeptides تنتمي إلى عائلة الأنسولين التي تضم الأنسولين والريلاكسين relaxin (Adhamel *et al.*, 1993) التي تؤثر تأثيراً مهماً في تنظيم العمليات الأيضية داخل خلايا الجسم حيث تمتلك نشاطات محفزة للنمو وتأثيرات أفضية مشابهة للأنسولين في العديد من أنواع الخلايا والأنسجة (Nakae *et al.*, 2001). يُعد العاملان IGF1 و IGF2 الشكلين الرئيسيين لهذه الهرمونات وتتشابه هذه العوامل فيما بينها علاوة على تشابهها الكبير مع شكل الأنسولين فقد وجد العالمان Rinderknecht and Humbel (1978) أن تسلسل الأحماض الأمينية لهذه العوامل مشابهة بنسبة 48% مع الأنسولين الأولي Proinsulin hormones، ويُعرف جهاز عوامل النمو شبيهة الأنسولين بجهاز الانقسام الخلوي Cytokine system لأنها تساهم في نمو الخلايا وتطورها وتمايزها فضلاً عن منع الموت المبرمج Apoptosis للخلايا (Le Roith and Yakar, 2007).

يتوسط IGF1 و IGF2 الفعل المحفز لهرمون النمو (GH) Growth hormone، إذ يُنتج IGF1 و IGF2 الدائر في الدم ابتداءً من الكبد تحت تأثير هرمون النمو الذي تفرزه الغدة النخامية ليرتبط بمستقبلاته في الكبد لتحفيز بناء IGF1 و IGF2 وإفرازهما (Le Roith *et al.*, 2001). هذا فضلاً عن دورهما في تحفيز

الانقسامات mitogen فإنهما يستحثان التمايز الخلوي في أنواع مختلفة من الخلايا (Jones and Clemmons, 1995).

يعد التعبير الجيني لـ IGF2 mRNA بأنه مُعقد تساهم فيه أربع حفازات (P1-P4) Promotors لإنتاج جين IGF2 بطول 30Kb مكون 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)، إنَّ 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، أمَّا الحفاز P1 فيحصل له تشغيل (Turn on) بعد الولادة ليساهم في إنتاج ٥٠% - ٧٠% من IGF2 الكلي (Li et al., 1996). ويساهم الحفاز P4 في الكبد للشخص البالغ بانتاج يتراوح بين ٢٥% و ٦٠% من الانتاج الكلي لـ IGF2 mRNA، وإنَّ الانتاج الجيني لـ IGF2 يعتمد على هرمون النمو بوصفه منظماً رئيساً له في الانسان (Li et al., 1996). أمَّا في القوارض فلا يعتمد تنظيم جين IGF2 على هرمون النمو لذلك يعتقد أنَّ وظيفة IGF2 على أنه عاملاً للنمو الجنيني، إذ وجد أن حذف جين IGF2 ينتج عنه تدهور في نمو الجنين داخل الرحم وقيل الولادة (Dechiara et al., 1990). إنَّ 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 تنظيمهما 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 مستقبلات IGFs في الدماغ والنخامية والمناسل والقناة التناسلية (Schneider et al., 2003) يؤكد أن محور تحت المهاد - النخامي - القند Hypothalamic-pituitary-gonads axis وأعضاء الجهاز التنكاثري هي أهداف فعالة لاشارات المحور المحرض الجسم Somatotrophs axis وعليه فإنَّ عمل IGFs لا يقتصر فقط على التأثير الصمي المعتمد على هرمون النمو (GH-dependent-IGFs) الذي يُنتج بصورة رئيسة في الكبد ويصل هدفه بواسطة الدم (Ohlsson et al., 2009)، بل إنَّه كذلك يشتق موضعياً في الأنسجة المختلفة والاعضاء التنكاثرية (Zakaria et al., 2009) ليؤدي تأثيره الغدي الذاتي Autocrine أو الغدي المجاور Paracrine لوظائف أنواع الخلايا الجسمية Somatic cells والجنسية Sex cells (Mazerbourg et al., 2003). ان لعوامل النمو IGFs، المنتجة موضعياً في انسجة الخصى بواسطة خلايا لايدك وخلايا سرتولي، دوراً مهماً في عملية تكوين النطف وتنظيم الوظيفة الصمية للخصية (Vannelli et al., 1988). وكذلك وجد أنَّ عمل LH على خلايا لايدك يتطلب وجود IGF1 الموضعي في أنسجة الخصى (Wang and Hardy, 2003)، إذ يعمل IGF1 على تنشيط تكاثر ونضج خلايا لايدك بالتأزر مع LH خلال البلوغ (Chuzel et al., 1996)، فضلاً عن تفعيل أثر LH لإنتاج التستوستيرون (Zhang et al., 2001). وكذلك يؤثر IGF1 في تنظيم العدد النهائي لخلايا سرتولي وحجم الخصيتين والنتاج اليومي للنطف التي تعد أساسية في خصوبة الذكور (Jean-Luc et al., 2013)، فقد وجدت أعداد كبيرة من مستقبلات IGF1 في خلايا سرتولي فضلاً عن استجابتها العالية لتأثير IGF2 المحفز للنشاط الأيضي في خصى الجرذان (Zakaria et al., 2009)، إذ تعمل على زيادة بناء البروتينات في خلايا سرتولي في الوسط الزراعي. وفي الفئران غير الناضجة يعمل IGF2 المنتج من خلايا سرتولي على تنظيم تعبير جينات سلفيات النطف الذي ينعكس على عملية تكوين النطف (Tsuruta et al., 2000).

## المواد وطرائق العمل

### حيوانات التجربة Experimental animals

أجريت الدراسة الحالية في البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري بجامعة القادسية وللفترة (2013/4/16 - 2014/5/1) تم اختيار الجرذان البيض في هذه الدراسة بوصفها نموذجاً يمثل الحيوانات اللبونة وريبت في ظروف مختبرية مناسبة، إذ كانت درجة الحرارة ما بين 22 و 25 مئوية ومعدل 14 ساعة إضاءة الي 10 ساعات ظلام طول مدة الدراسة. وغذيت الحيوانات على العليقة الغذائية المختبرية القياسية (نسبة بروتين 19% وطاقة 3000 سعرة حرارية) والماء بصورة حرة *ad Libidum*.

أُستخدِم في الدراسة 40 جرذاً نكراً غير ناضجٍ 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 أُستوصلت خصاها لغرض إجراء الدراسة الجزيئية المتمثل بفحص الوقت الحقيقي لتفاعل سلسلة البلمرة للأستتساخ العكسي الكمي qRT-PCR لتقدير مستوى 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 للأستتساخ العكسي الكمي المجهزة من شركة Bioneer بكوريا الجنوبية باستخدام البادئات Primers التالية والخاصة بـ IGF2 و GAPDH.

البادئات	تتابع القواعد النروجينية	حجم الناتج	رقم التسلسل
IGF2	F TGGCTGAGCAACTTCGATTG	bp <sup>77</sup>	NM_001082477.2
	R AACCATGCAAAGCTGCTCAGG		
GAPDH	F TGCCACTCAGAAGACTGTGG	85bp	NM_001190162.1
	R GGATGCAGGGATGATGTTCT		

ب- فحص تفاعل سلسلة البلمرة للأستتساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي (RT-qPCR): تم قياس مستوى الحمض النووي المرسل messenger ribonucleic acid (mRNA) الذي يستسخ من الخصى للدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجين عامل النمو IGF2 فضلاً عن استخدام جين *Gapdh gene* كجين محافظ قياسي Housekeeping gene لحساب التعبير الجيني. وتم إجراء هذا الفحص حسب الخطوات الآتية:

1- استخلاص الاحماض النووية الكلي Total RNA extraction: تم استخلاص الحمض النووي الرايبوزي الكلي Total RNA باستخدام عدة الترايزول (Trizol kit) المجهز من قبل شركة بايونير الكورية و حسب تعليمات الشركة المصنعة ، إذ تم صعق الخصى مباشرة بعد استئصالها باستخدام التروجين السائل ثم وضعت في أنابيب أبندورف epindorf tube حاوي على 0.5 مل من ماء ديك DEPC ثم دورت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقتين، بعدها تم سحب الدبك وبقاء عينات الخصى فقط بعدها أُضيف 0.5 مل من Trizol ثم سحقت عينات الأنسجة باستخدام المدقة micropistells، وبعد هرسها وتجانسها جيداً، أكملت الأنابيب بملتر واحد من الـ Trizol. بعدها تمت إضافة الكلوروفورم (200) مايكروتر ورجت الأنابيب بجهاز vortex ثم حفظت في الثلجة لمدة 5 دقائق بعدها دورت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة ثم نقل الرائق في أبندورف جديد مع إضافة (500) مايكروتر من الأيزوبروبانول isopropanol ورجت الأنابيب بجهاز vortex ثم حفظت في الثلجة 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 ملتر واحد من الكحول الأثيلي (80%) ورج بجهاز vortex ثم دور

الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعه ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق وتم التخلص من الطافي وبقاء الراسب pellet ثم جفف الراسب جيدا بقلب الأبندورف على ورق نشاف وتركه بدرجه حراره الغرفة لمدة ١٠ دقائق ,بعدها تم إضافة ٥٠ مايكروليتر من الدبك للراسب ثم نقلت الأنابيب الى حمام مائي بدرجة ٧٠ م لمدة ١٠ دقائق.

٢- قياس كمية ونقاوة الحمض النووي الرايبوزي **Assessy RNA yield and quality**: 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 ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر ،فضلا عن توثيق وجود الحمض النووي RNA باستخدام الترحيل الكهربائي Electrophoresis.

٣- المعاملة بأنزيم **DNase inactivation Treatment (DNase1)**: 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.

٤- تصنيع الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين المكمل **cDNA synthesis** : تم استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي الذي أوكسي رايبوزي المكمل cDNA من عينات الحمض النووي الرايبوزي المرسل mRNA وذلك لاستخدامه في تضخيم الجينات ومستوى تعبير جين *igf2* والجين المحافظ *GapdH* بفحص Real-Time PCR, حيث تم استخدام عدة Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزة من شركة بايونير الكورية. تم اجراء هذه الخطوة طبقا لتعليمات الشركة، حيث تم توحيد تراكيز جميع عينات RNA المعاملة بـ DNase للتركيز المقاس نفسه باستخدام ماء الـ DEPC ثم حولت جميع عينات RNA الى cDNA بواسطة تحضير تفاعل PreMix reaction للاستساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي.

٥- فحص **Quantitative Real-Time PCR (qPCR)**: تم إجراء فحص qRT-PCR لعينات cDNA باستخدام عدة Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative PCR kit وجهاز Accupower Green Star Real-Time PCR kit Thermal Block المجهزين من شركة بايونير الكورية وحسب الخطوات التي وصفها Cheon *et al.* (١٩٩٩)، و يعتمد هذا الفحص على صبغة سايبيرالخضراء Syber Green في عدة الكشف qRT-PCR PreMix الذي صمم لتضخيم الـ PCR لـ 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 السايبير الخضراء الموجودة 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 *Rattus norvegicus* (27.9Mbp) الذي تم الحصول عليه من بنك الجينات NCBI-Gene Bank بما يقارب ( $\sim 1 \times 10^7$ ) نسخة أستخدمت كمنحني قياسي لـ Genomic DNA .

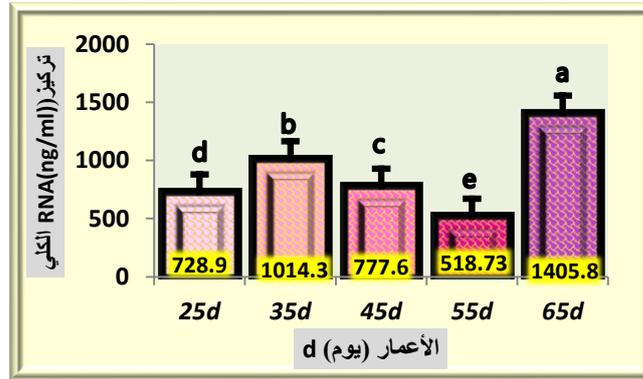
٦- تحليل البيانات **data analysis of Real-Time PCR**: تم تحليل البيانات الناتجة من تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي باستخدام طريقة Livak and Schmittgen (٢٠٠١).

## 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) وقد 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 الريبوزي الكلي Total RNA في أنسجة الخصى للأعمار المدروسة تراكيز عالية وبكميات كافية للبدء بفحص تفاعل سلسلة البلمرة. وقد أشارت نتائج الدراسة الى أن النسبة بين الكثافة البصرية optical density عند الطولين الموجيين 260 و280 نانومتر كانت تتراوح ما بين 1.8 و2.1 التي 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 ما قبل البلوغ خاصةً بالعمر 35 يوماً مقارنةً 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 قياساً بالأعمار الأخرى ثم عادت للزيادة مرة أخرى عند مرحلة ما بعد البلوغ بالعمر 65 يوماً لتسجل أعلى مستوى بين الأعمار.



الشكل (1) تركيز RNA الكلي في أنسجة الخصى لمرحتي قبل البلوغ وبعده لذكور جردان الوستر.

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

تفاعل سلسلة البلمرة لأستنساخ العكسي في الوقت الحقيقي الكمي (qPCR): تضمن تحليل بيانات فحص تفاعل qPCR المعتمد على صبغة سايبير 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 Amplification plot في جهاز فحص

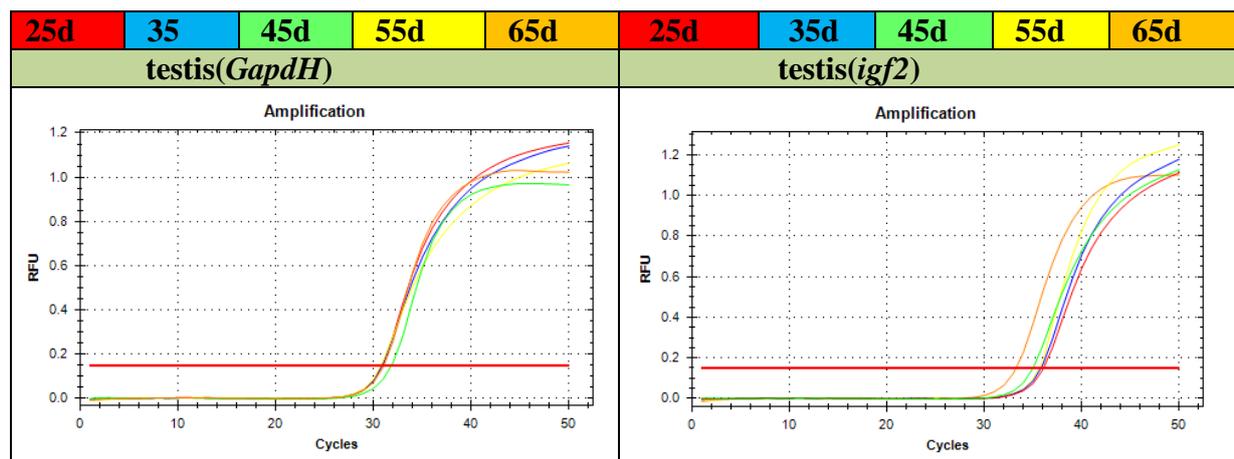
تفاعل qPCR خلال الطور (الأسّي) المتسارع Exponential phase لإشارات الفلوروسنت

(الومضية) لصبغة سايبير الخضراء المتحددة ببادئ الجين الذي أشتملت عليه الدراسة (IGF2) المتفاعل

مع الحامض النووي منقوص الأوكسجين المتمم (cDNA) للحامض mRNA في أنسجة الخصى

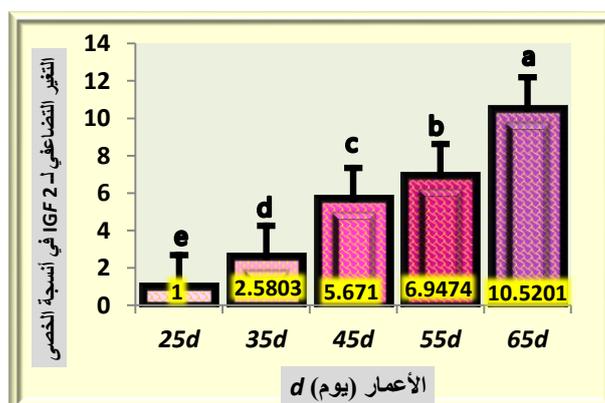
لذكور الجردان. ومن مسار تضخيم دورة العتبة تم احتساب المنحدر الخطي Linear regression

بالاعتماد على نقاط البيانات ومنه استنتجت كفاءة البادئ من الميل slope الخطي (الشكل-2).



الشكل (٢): منحنيات التغير التضاعفي لجينات GAPDH و IGF2 في أنسجة خصى الجرذان لمرحلتي قبل البلوغ و بعده.

٢. الكمية النسبية لتعبير الجينات المستهدفة: تم احتساب نسبة تعبير الجين الهدف في الدراسة الحالية (IGF2) في أنسجة الخصى باستخدام معادلة ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) وذلك بتصحيح تعبير الجين الهدف مع تعبير الجين المحافظ كجين تصحيح. وعُدَّ تعبير الجين بعمر ٢٥ يوماً ممثلاً للسيطرة أو القياسي للأعمار اللاحقة. بعد تصحيح عدد دورات العتبة للجين الهدف بواسطة جين التصحيح لكل الأعمار، تم تصحيح قيمة  $\Delta Ct$  للأعمار ٣٥ و ٤٥ و ٥٥ و ٦٥ يوماً إلى قيمة  $\Delta Ct$  للعينة القياسية (عمر ٢٥ يوماً) بعدها تم حساب نسبة التعبير التي عبر عنها بالتغيير التضاعفي Fold changes. وقد أظهرت النتائج المبينة في الشكل (٣) زيادة معنوية ( $P < 0.05$ ) في مستوى تعبير جين IGF2 في أنسجة خصى ذكور الجرذان واستمرار هذه الزيادة بصورة تدريجية خلال التقدم بالنمو والبلوغ لتصل أقصاها في مرحلة ما بعد البلوغ عند عمر (65) يوماً حيث بلغت مستويات التعبير جين IGF2 (2.5803 و 5.671 و 6.9474 و 10.5201) ضعف للأعمار (35 و 45 و 55 و 65) يوماً على التوالي مقارنة بعمر (25) يوماً.



الشكل (٣): التغير التضاعفي لجين IGF2 في أنسجة خصى ذكور جرذان الوستر لمرحلتي قبل البلوغ و بعده.

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

## المناقشة

سجلت نتائج الدراسة الحالية زيادة في مستويات RNA الكلي لأنسجة الخصى خلال المراحل العمرية، إذ حصلت الزيادة إبتداءً من العمر 35 يوماً بالمقارنة مع العمر ٢٥ يوماً، إنخفضت بعدها تدريجياً عند العمرين 45 و55 يوماً ثم عادت لترتفع عند العمر 65 يوماً. إنَّ الزيادة الكبيرة الحاصلة بعد البلوغ الجنسي ربما تعود إلى مستوى بناء البروتين والحالة التكاثرية داخل النبيب المنوي (Seminiferous tubule) وفي الأنسجة البينية للخصية وبشكل خاص خلايا لايدك نتيجةً لمستوى النشاط التكاثري الناتج من زيادة وظيفة الخصية في عملية تكوين النطف وتصنيع الستيرويدات، حيث يُعد عامل النمو IGF1 من العوامل التي تلعب دوراً هاماً قبل البلوغ وبعده في خصى اللبائن، إذ يعمل عاملاً للنمو 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. فقد وجد أن عامل النمو شبيه الأنسولين-١ (IGF1) يزيد من تكاثر وتمايز خلايا لايدك المنشأة progenitor leydig cell (PLC) وغير الناضجة immature leydig cell (ILC) فضلا عن زيادة مستوى تعبير جينات الأنزيمات المشاركة في بناء الستيرويدات كذلك مستقبلات الأندروجين والأستروجين و IGF1R والجزء الخارجي من مستقبلات الهرمون المصفر LHR Luteinizing hormone receptor (Wang et al., 2003). وكذلك 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، و لوحظت عودة الزيادة مرة أخرى بعد البلوغ بعمر 65 يوماً حيث إكتمل النضج الوظيفي لأنسجة الخصى بدليل اكتمال تمايز خلايا لايدك البالغة (Wang et al., 2003) ومن ثمَّ انتاجها لكميات كبيرة من الأندروجينات.

إنَّ الارتفاع المعنوي في مستوى تعبير جين IGF2 في أنسجة الخصى مع تقدم العمر يتعارض مع ما أشار إليه (1987) Murphy et al. حيث أشاروا الى عدم وجود IGF2 mRNA في خصى الجرذان البالغة. و أشار (1988) Voutilainen et al. إلى أنَّ مستويات IGF2 mRNA تنخفض في أنسجة خصى جنين الإنسان مع تقدم عمر الحمل، وإنَّ كلِّ من IGF1 و IGF2 ينتج في خصى الخنزير في المرحلة الجنينية وقبل النضج حيث وجد أنَّ مستويات IGF1 mRNA في خصى الخنازير يزداد بشكل ثابت في حين ينخفض IGF2 من اليوم (7) بعد الولادة إلى (25)أسبوعاً ولا يتبع مستوى التستوستيرون في المصل (Ann et al., 1994). وقد تعود أسباب الزيادة إلى تأثير المحور المحرض للنمو الجسمي في بناء وإفراز 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 هرمون النمو GHR في خلايا لايدك المنشأة وغير الناضجة والبالغة في الجرذان (Bartke et al., 2003)، كما أشار (1990) Carlsson et al. إلى وجود GHR في عدَّة أنسجة لدى الجرذان ومنها أنسجة الخصى التي يزداد عددها مع التقدم بالعمر حيث يقع انتاج عوامل IGFs في المناسل جزئياً تحت سيطرة هرمون النمو ليبيدي تأثيره الغدي الذاتي او الغدي المجاور وقد تشير النتائج إلى أنَّ المحور المحرض للنمو الجسمي يؤثر في الوظيفة التكاثرية من خلال عمل IGF1 و IGF2.

ويمكن أن تعود زيادة مستويات تعبير جين IGF2 في أنسجة الخصى الى زيادة إفراز الهرمونات المحرصة للأقناده (FSH و LH) خلال مرحلة البلوغ والناتج من تنشيط محور HPG حيث إنَّ للهرمونات

المحرضة للأقناده أثراً مهماً في تنشيط إنتاج IGF2 فقد وجد أنّ تحفيز خلايا المبيض الحبيبية على بناء IGF2 mRNA يتم بواسطة FSH وHCG (المناظر لـ LH) و cAMP (Voutilainen *et al.*, 1998) وعليه قد يعمل الهرمونين LH و FSH بالآلية نفسها لزيادة 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-1 insulin-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. Reprod.*, 50: 993-999.
- Bartke, A. (2003). Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocrinol.*, 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 Endocrinol.*, 73: 1-6.
- Cheon, M.; Park, D.; Kim, K.; Park, S.D.and Ryu, K. (1999). Homologous upregulation of GnRH receptor mRNA by continuous GnRH in cultured rat pituitary cells. *Endocrine*, 11: 49–55.
- Chuzel, F.; Clark, A.M.; Avallet, O.; and Saez, J.M. (1996). Transcriptional regulation of the lutropin/human chorio-gonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. *Eur. J. Biochem.*, 239: 8–16.
- DeChiara, T.; Efstratiadis, A.; and Robertson, E.A. (1990). Growth-deficient phenotype 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.; Rydzziel, S.; and Gabbitas, B. (1998). Insulin-like growth factor II promoter expression in cultures rodent 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. *Mol. 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.
- Le Roith, D.; Bondy, C.; Yakar, S.; and Liu, J.L. (2001). The somatomedin hypothesis. *Endocr. Rev.*, 22: 53-74.

- Le Roith, 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). Analysis 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 selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod. Domest. 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 of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.*, 253: 2769-2776.
- Schneider, H.J.; Pagotto, U.; and Stalla, G.K. (2003). Central effects of the somatotrophic system. *Eur. J. Endocr.*, 149: 377-392.
- Tsuruta, J.K.; Eddy, E.M.; and O'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.; Van, S.F.; Boostma, H.J.; Holthuisen, P.; and Sussenbach, J.S. (1991). Initial characterization of the four promoters of the human insulin-like growth factor II gene. *Mol. Cell. Endocr.*, 81: 81-94.
- Vannelli, B.G.; 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-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol. Reprod.*, 70(3): 632-639.
- Wang, G.; O'shaughnessy, P.J.; Chubb, C.; Robaire, B.; and Hardy, M.P. (2003). Effects of Insulin-Like Growth Factor I on Steroidogenesis. *Endocr.*, 144: 5058-5064.
- Zakaria, R.; Rajikin, M.H.; Yaacob, N.S.; and Nor, N.M. (2009). Immunolocalization of insulin-like growth factors and their receptors in the diabetic mouse oviduct 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 but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LHRKO) mice. *Mol. Endocrinol.*, 15: 172-183.