القاي رسيدگي اووسيت‌هاي تاس ماهي ايراني *(Acipenser persicus)* با استفاده از فاكتور رشد شبه‌انسولين- يك (IGF-I) در شرايط *in vitro*

برزان بهرامي كمانگر[۱] باقر مجازي اميري[۲] محمدجواد رسايي[۳]
بهروز ابطحي[۴] محمود بهمني[۵]

چكيده

در اين تحقيق، براي بررسي چگونگي دخالت محور رشد در رسيدگي جنسي تاس ماهي ايراني، به بررسي *in vitro* اثر فاكتور رشد شبه انسولين- يك (IGF-I) در القاي رسيدگي اووسيت‌ها و مقايسه آن با اثر هورمون استرويد جنسي DHP، هورمون گنادوتروپين انساني (hCG) و هيپوفيز تاس ماهي ايراني پرداخته شد. همچنين اثر استفاده از اين فاكتور به‌عنوان پيش‌تيمار هورمون‌هاي DHP و hCG در القاي رسيدگي جنسي اووسيت‌هاي تاس ماهي ايراني كه با پديده GVBD همراه است، مورد مطالعه قرار گرفت. اين بررسي‌ها بر روي دو دسته اووسيت تاس ماهي ايراني در دو مرحله رسيدگي جنسي متفاوت با توجه به موقعيت هسته آنها (PI<۰/۰۷ و PI>۰/۱) انجام شد. در هر دو موقعيت هسته‌اي، IGF-I در مقادير استفاده شده GVBD را القا كرد. ميزان القاي GVBD توسط IGF-I در مقادير ۱۰ ng/ml و ۱۰۰ بيش از ميزان القاي آن توسط DHP در مقدار ۱۰ ng/ml در موقعيت غشايي (PI<۰/۰۷) بود. در موقعيت هسته در حال مهاجرت (PI>۰/۱) نيز مقادير ۱۰۰ ng/ml و ۱۰۰۰ IGF-I داراي تأثير بيشتري نسبت به مقادير ۱۰ ng/ml و ۱۰۰ DHP بود. در عين‌حال مقدار ۱۰۰۰ ng/ml DHP در هر دو موقعيت هسته‌اي بيشترين ميزان تاثير در القاي GVBD داشت. مقدار ۱۰ ng/ml IGF-I در موقعيت هسته غشايي و مقادير ۱۰۰ و ۱۰۰۰ آن در موقعيت هسته در حال مهاجرت داراي تأثير بيشتري در القاي GVBD نسبت به مقادير استفاده شده hCG بوده است. هيپوفيز در هر دو موقعيت هسته‌اي داراي تأثير بيشتري نسبت به مقادير استفاده شده IGF-I داشت. پيش‌تيمار كردن اووسيت‌ها با IGF-I در مقادير ۱۰۰ ng/ml و ۱۰۰۰ نسبت به عدم پيش‌تيمار آنها با IGF-I ميزان القاي GVBD را پس از تيمار اووسيت‌ها با DHP در غلظت ۱۰۰ ng/ml در هر دو موقعيت هسته‌اي افزايش داد. اين تأثير در مورد hCG فقط در مرحله هسته در حال مهاجرت با مقدار ۱۰۰۰ ng/ml IGF-I و در مقادير ۱۰۰ IU/ml و ۱۰۰۰ hCG ديده شد (P<۰/۰۵). نتايج اين تحقيق براي اولين بار در يك گونه ماهي غضروفي استخواني نشان داد كه IGF-I در القاي رسيدگي جنسي اووسيت‌ها مؤثر است. همچنين نتايج نشان داد كه IGF-I مي‌تواند به‌طور مستقيم و همچنين در ارتباط با ساير هورمون‌هاي محور رسيدگي جنسي، القاي GVBD را فراهم كند.

واژه‌هاي كليدي: *فاكتور رشد شبه انسولين يك، رسيدگي اووسيت‌ها، تاس‌ماهي ايراني، هورمون الق كننده رسيدگي جنسي و گنادوتروپين.*

۱- استاديار گروه شيلات، دانشكده كشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه كردستان، سنندج، **E-mail:** bbkamangar@yahoo.com
۲- دانشيارگروه شيلات و محيط زيست، دانشكده منابع طبيعي، دانشگاه تهران
۳- استاد گروه بيوتكنولوژي پزشكي، دانشكده علوم پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس
۴- استاديار گروه بيولوژي دريا، دانشكده منابع طبيعي، دانشگاه تربيت مدرس
۵- استاديار گروه فيزيولوژي و بيوشيمي انستيتو تحقيقات بين‌المللي ماهيان خاوياري رشت (دكتر دادمان)

مقدمه

رسيدگي جنسي در ماهيان تحت تاثير شرايط محيطي و تغييرات هورموني ايجاد شده در اثر اين عوامل و همچنين شرايط تغذيه‌اي حاصل مي‌شود. در زمينه تغييرات هورموني ايجادشده در بلوغ و رسيدگي جنسي، دو محور هورموني شامل محور هيپوتالاموس-هيپوفيز-گناد و محور رشد در مهره داران شناسايي شده است. تداخل بين محور رشد و محور رسيدگي جنسي در پستانداران (۱۰) و ماهيان (۳۵ و ۱۳)، به خوبي شناخته شده است. رسيدگي نهايي اووسيت‌ها كه با رفع توقف ميوزي وشكسته شدن هسته اووسيت‌ها[1] (GVBD) همراه است، بر اساس تاثير گنادو تروپين و ترشح آن در هيپوفيز تحت تاثير هورمون رهاكننده گنادوتروپين (GnRH) و تاثيرگذاري آن بر توليد هورمون القا كننده رسيدگي جنسي[2] (MIH) در لايه فوليكولي اووسيت‌ها و نيز تاثير اين هورمون بر غشاي اووسيت‌ها و توليد فاكتور پيش برنده رسيدگي جنسي[3] (MPF) صورت مي گيرد (۲۳،۲٤و۲۲). مطالعات اوليه در مورد رسيدگي نهايي اووسيت‌ها با توجه به محور هيپوتالاموس-هيپوفيز-گناد در گونه‌هاي خاوياري توسط دانشمندان روسي صورت گرفته‌است (٤).

پس از مطالعات كلاسيك دانشمندان روسي درباره رسيدگي نهايي اووسيت‌ها، مطالعات ديگري در زمينه هورمون‌هاي استرويديدي و تعيين تاثير آنها در رسيدگي اووسيت‌هاي ماهيان خاوياري صورت گرفته است (۱۵،۱۷،۱۸،۱۹،۳۲،۳۳،۳۶و۲). با اين وجود تا كنون گزارشي در زمينه تاثير محور رشد در رسيدگي جنسي ماهيان غضروفي استخواني مشاهده نشده‌است.

فاكتور رشد شبه انسولين- يك[4](IGF-I) ، يكي از عوامل مشترك در اين دو محور است كه به‌صورت سيستميك در كبد تحت اثر هورمون رشد (۸،۱۶و۵) و به‌صورت موضعي در بسياري از بافت‌ها و از جمله در گنادها توليد مي‌شود (۱۶،۳۰و۵). شواهدي وجود دارد كه نشان ميدهد گنادوتروپين‌ها (GtH_s) تنها تنظيم‌كننده‌هاي فيزيولوژيك گنادها نيستند، بلكه عوامل رشد مانند IGF-I نيز نقش مهمي در تكامل و رسيدگي جنسي گنادها دارند (۱۴). در چند گونه ماهي استخواني، IGF-I موجب افزايش محتواي گنادوتروپين‌ها و رهاسازي آنها از سلول‌هاي كشت‌شده هيپوفيز شده‌است (۹،۳۵و۱). همچنين IGF-I در سلول‌هاي گرانولوزا موجب تحريك توليد يا تبديل استروييدهاي جنسي شده‌است (۳۴و۱۴).

تا كنون مطالعاتي از تاثير اين عامل در شرايط *in vitro* بر رسيدگي نهايي اووسيت‌ها[5] (FOM) در ماهي سيم سرخ دريايي (*Pagrus major*) (۱۱)، باس مخطط (*Morone saxatilis*) (۳٤) و كپور هندي (*Labeo rohita*) (۳) گزارش شده است. تاس ماهي ايراني (*Acipenser persicus*)، گونه‌اي از ماهيان غضروفي استخواني است كه از نظر تكاملي در سطحي پايين‌تر از ماهيان استخواني قرار دارد. اين گونه، از گونه‌هاي باارزش حفاظتي و تجاري بالاست، كه به‌دليل صيد بي‌رويه جمعيت آن در حال كاهش است. شناخت عوامل موثر در رسيدگي جنسي و تعيين مرحله تاثيرگذاري آنها، مي‌تواند اطلاعات پايه‌اي را براي تعيين بهترين زمان و چگونگي القاي تكثير و در نتيجه، بهبود آن فراهم سازد. در اين تحقيق تلاش شده به سوالات زير پاسخ داده شود:

۱- آيا IGF-I مي‌تواند به تنهايي يا در كنار گنادوتروپين و يا MIH موجب حركت هسته و ايجاد GVBD در اين گونه شود؟

۲- ميزان تاثير IGF-I در مقايسه با عوامل ذكر شده در مراحل مختلف رسيدگي جنسي به چه شكل است؟

۱- Germinal Vesicle BreakDown

۲- Maturation-Inducing Hormone

۳-Maturation Promoting Hoamone

۴- Insulin-Like Growth Factor-I

۵- Final Oocyte Maturation

۶-Polarization Index

بنابراين آزمايشي در دو مرحله ، بر اساس شاخص قطبي شدن هسته[1] (PI)، بر روي اووسيت‌هاي كشت داده شده تاس‌ماهي ايراني در شرايط *in vitro* صورت گرفت و تاثير عوامل مذكور بر حركت هسته و شكسته شدن آن (GVBD) بررسي شد.

مواد و روش‌ها

۱- هورمون و مواد شيميايي

در اين آزمايش از فاكتور رشد شبه‌انسولين-يك نوتركيب انساني (GroPep-Australia Cat. Cod IU100) استفاده شد. ابتدا پپتيد توسط ۱۰۰ µl اسيد كلريدريك ۱۰ mM حل و بعد ٤۰۰ µl BSA (Bovin Serum Albumin, Merck) به نسبت ۱ mg/ml به آن افزوده شد. MIH استفاده شده 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) (Sigma Cat.Cod P6228) ابتدا در الكل اتيليك خالص به ميزان ۱ mg/ml حل و بعد مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به عدم دسترسي و خالص‌سازي گنادوتروپين اختصاصي در ماهيان خاوياري در اين تحقيق از hCG با نام تجاري Pregnyl (شركت دارويخش، ايران) استفاده شد. همچنين از پودر هيپوفيز خشك و استنه شده تاس‌ماهي ايراني استفاده شد. محيط كشت شامل محيط پايه ليبوويتز (L-15 Sigma Cat.Cod L5220) به همراه بافر Hepese (۵ mM)، استرپتومايسين (۱۰۰ mg/L) و پني‌سيلين (۷۰ mg/L) بود. همچنين BSA به ميزان ۱ g/L به محيط كشت افزوده شده و pH و فشار اسمزي محيط كشت و مايع تخمداني قبل و بعد از آزمايش اندازه‌گيري شد. قبل از نمونه‌برداري هيچ‌گونه تزريق هورموني بر روي ماهيان انجام نشد. اووسيت‌ها در پلت‌هاي ٢٤ حفره‌اي (Falkon) كشت شدند.

۲- تهيه بافت و شرح آزمايش

تاس ماهيان مورد نياز از ناحيه دو شيلات ايران واقع در جنوب غربي درياي خزر در ارديبهشت ماه ۸۲ صيد و به انستيتو بين‌المللي تحقيقات ماهيان خاوياري منتقل شدند. ماهيان تا زمان آزمايش در استخر كورانسكي نگهداري و بر اساس شاخص قطبي شدن هسته (٤) به دو گروه ماهيان با اووسيت در موقعيت هسته غشايي(PI<۰/۰۷) و اووسيت در موقعيت هسته در حال مهاجرت (PI>۰/۱) تقسيم شدند. در هر موقعيت هسته، دو قطعه ماهي پس از تعيين زيست‌سنجي (جدول ۱) براي نمونه‌برداري از تخمدان انتخاب شدند. پس از باز كردن محوطه شكمي، حدود ۳۰ گرم بافت تخمدان از قسمت قدامي تخمدان هر ماهي برداشته شده و با توجه به شاخص قطبي شدن هسته به‌صورت جدا در محيط كشت در كنار يخ به آزمايشگاه منتقل شدند. اووسيت‌ها به همراه لايه هاي فوليكولي به دقت از بافت تخمدان جدا شدند و پس از شست‌وشو در محيط كشت ده عدد اووسيت به ازاي هر واحد آزمايشي به درون حفره‌هاي ظرف كشت حاوي ۱ ml محيط كشت قرار داده شدند.

به‌منظور بررسي ميزان و تعيين مرحله تأثيرگذاري IGF-I در دو موقعيت هسته (درحين مهاجرت و موقعيت غشايي) و مقايسه تأثير آن با گنادوتروپين(hCG)وعصاره هيپوفيز و يك (17,20β-diOH-4-Pregnen-3-one) MIH و همچنين بررسي تأثير IGF-I به‌عنوان پيش‌تيمار هورمون‌هاي يادشده در رسيدگي نهايي اووسيت‌ها (FOM) كه همراه با پديده شكسته شدن هسته (GVBD) است، آزمايش‌هايي به شرح زير در دو مرحله انجام شد.

ابتدا تاثير مستقل هر يك از عوامل IGF-I در سه سطح (۱۰،۱۰۰،۱۰۰۰ ng/ml)، DHP در سه سطح (۱۰،۱۰۰،۱۰۰۰ ng/ml)، hCG در سه سطح (IU/ml ۱۰،۱۰۰،۱۰۰۰) و هيپوفيز خشك‌شده در دو سطح (۳۰۰۰ ng/ml ، ٦۰۰۰) به همراه يك شاهد (بدون افزودن هيچ نوع هورمون به محيط كشت) در هر يك از موقعيت‌هاي هسته‌اي بررسي شد. آزمايش براي هر يك از

۱- Polarization Index

موقعيت‌هاي هسته‌اي در قالب طرح بلوك كامل تصادفي با سه تكرار انجام گرفت. مدت زمان انكوباسيون در آزمايش با موقعيت هسته غشايي ٣٠ ساعت و در آزمايش با موقعيت هسته در حال مهاجرت ٤٠ ساعت بود. در مرحله بعد به بررسي اثر IGF-I در سه سطح (ng/ml ١٠٠٠، ١٠٠، ٠) به‌عنوان پيش‌تيمار هورمون‌هايDHP وhCG هر يك در چهار سطح (١٠٠٠،١٠٠،١٠، ٠) به ترتيب برحسب ng/ml و IU/ml ، در دو موقعيت هسته‌اي پرداخته شد. آزمايش در هر موقعيت هسته‌اي در قالب طرح اسپليت – اسپليت – پلات و با سه تكرار انجام گرفت. در هر موقعيت هسته‌اي نخست اووسيت‌ها با IGF-I در غلظت‌هاي يادشده و در واحدهاي جداگانه پيش‌تيمار شدند. پس از گذشت ١٥ و ٢٠ ساعت انكوباسيون به ترتيب در موقعيت هسته غشايي و مهاجر، محيط كشت تعويض و اووسيت‌ها با محيط كشت خالص شست‌وشو شدند و دوباره در حفره‌هاي ظرف كشت مقدار ml ١ محيط كشت تازه افزوده شده و سطوح مختلف DHP و hCG به واحدهاي در نظر گرفته شده اضافه شد. اووسيت‌ها ١٥ و ٢٠ ساعت ديگر به ترتيب در موقعيت هسته غشايي و در حال مهاجرت انكوبه شدند. دماي انكوباسيون در تمامي آزمايش‌ها $^{\circ}$C ٠/٥ ± ١٧ بود. پس از گذشت مدت زمان انكوباسيون، آزمايش با افزودن فرمالين ٤ درصد به حفره‌هاي ظرف كشت متوقف شد. ضمن تهيه برش از اووسيت‌ها درصد GVBD در هر واحد آزمايشي تعيين شد. نتايج در هر مرحله و در هر آزمايش بر اساس روش تجزيه واريانس دوطرفه و مقايسه ميانگين‌ها با آزمون جديد چنددامنه‌اي دانكن انجام گرفت. مقايسه بين تيمارهاي مشابه در دو موقعيت هسته‌اي بر اساس آزمون دو طرفه t – استيودنت انجام پذيرفت.

نتايج

١- اثر مستقل **IGF-I** ، **DHP** ، **hCG** و پودر هيپوفيز بر رسيدگي نهايي اووسيت‌ها در دو موقعيت هسته‌اي

فاكتور رشد شبه‌انسولين - يك و ساير تيمارهاي هورموني استفاده شده در هر دو موقعيت هسته‌اي، تاثير معني‌داري بر ايجاد GVBD داشتند. خلاصه نتايج تجزيه واريانس مربوط به دو موقعيت هسته‌اي در جدول ٢ نشان داده شده است. مقايسه ميانگين‌هاي تأثير تيمارهاي مختلف آزمايشي در هر يك از موقعيت‌هاي هسته‌اي در شكل ١ نشان داده شده است. در هر دو موقعيت هسته‌اي، تأثير تيمارهاي هورموني استفاده‌شده به‌طور معني‌دار از گروه شاهد كه در آن اووسيت‌ها در محيط كشت فاقد هر گونه عامل هورموني بودند، متفاوت است. در هر يك از دو موقعيت هسته‌اي مقدار ng/ml ١٠٠٠ هورمون DHP بيشترين تأثير معني‌دار را در القاي GVBD اووسيت‌ها داشته است. فاكتور رشد شبه‌انسولين - يك در هر دو موقعيت هسته‌اي موجب ايجاد GVBD شد ولي در موقعيت هسته غشايي (PI<٠/٠٧) مقادير ng/ml ١٠ و١٠٠ IGF-I بيشترين تأثير را داشتند، درحالي‌كه در موقعيت هسته در حال مهاجرت (PI>٠/١) مقادير ng/ml ١٠٠ و ١٠٠٠ تأثير بيشتري داشته‌اند. مقايسه ميانگين تأثير مقادير مختلف IGF-I در دو موقعيت هسته‌اي نشان مي‌دهد كه مقدار ng/ml ١٠ IGF-I در مرحله غشايي داراي تأثير بيشتري در ايجاد GVBD نسبت به همين مقدار در موقعيت هسته در حال مهاجرت بوده، درحالي‌كه در مقدار ng/ml ١٠٠٠ IGF-I در موقعيت هسته‌اي در حال مهاجرت IGF-I مؤثرتر بوده است (جدول ٣). اين در حالي است كه بين مقدار ng/ml ١٠٠ در دو موقعيت هسته‌اي تفاوت معني‌داري ديده نمي‌شود. در بين مقادير DHP استفاده‌شده، مقدار ng/ml ١٠٠ به‌طور معني‌داري در موقعيت هسته‌اي غشايي مؤثرتر از موقعيت هسته در حال مهاجرت بوده است، ولي تاثير ساير مقادير در دو موقعيت هسته‌اي تفاوت معني‌داري با همديگر نداشته‌اند (جدول ٣). همچنين hCG در مقادير IU/ml ١٠ و ١٠٠ داراي تأثير بيشتري در موقعيت هسته‌اي غشايي نسبت به موقعيت هسته‌اي در حال مهاجرت بوده است. ميانگين مجموع تأثير مقادير مختلف هر عامل هورموني در دو موقعيت هسته‌اي فقط در مورد hCG به‌طور معني‌دار در موقعيت غشايي بيشتر از موقعيت مهاجر بوده است.

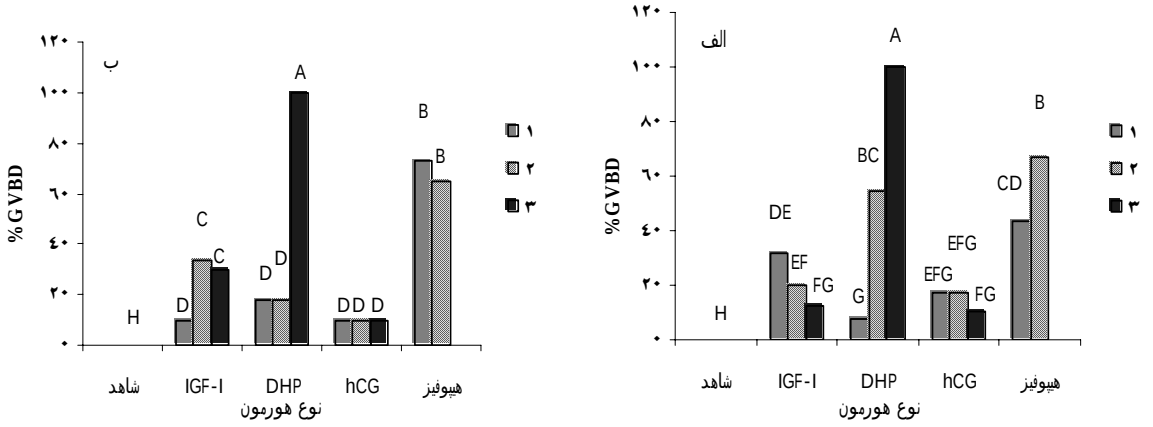
تأثير هيپوفيز خشك در هر دو مقدار به كار رفته و در هر دو موقعيت هسته‌اي نسبت به hCG بيشتر بود.

۲- اثر IGF-I به‌عنوان پيش‌تيمار هورمون‌هاي DHP يا hCG در ايجاد GVBD

پيش‌تيمار اووسيت‌ها با IGF-I در هر دو موقعيت هسته‌اي و در حضور دو نوع هورمون DHP يا hCG بر ميزان رسيدگي نهايي اووسيت‌ها، به‌طور معني‌دار تأثيرگذار بوده است. نتايج تجزيه واريانس در دو آزمايش نشان‌دهنده وجود تفاوت معني‌دار در ميزان رسيدگي نهايي اووسيت‌ها در هر يك از موقعيت‌هاي هسته‌اي در اثر پيش‌تيمار كردن اووسيت‌ها با IGF-I است (جدول ٤). ميانگين‌هاي ميزان GVBD حاصل از پيش‌تيمار اووسيت‌ها با IGF-I در سه سطح ng/ml ۰ ، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ در هر دو موقعيت هسته‌اي داراي تفاوت معني‌دار شد (شكل ۲). بيشترين ميانگين تأثير در هر دو موقعيت هسته‌اي در تيمارهاي حاصل از پيش‌تيمار اووسيت‌ها با IGF-I در مقدار ng/ml ۱۰۰۰ ديده مي‌شود. همچنين ميانگين تيمارهاي حاصل از هر يك از سطوح IGF-I بين دو موقعيت هسته‌اي تفاوت معني‌داري را نشان نداده است (آزمون t- استيودنت در سطح ۵ درصد). ميانگين درصد GVBD تحت تأثير هورمون‌هاي DHP و hCG ، هردو با افزايش سطح IGF-I افزايش يافته‌اند (شكل ۳). در هر دو موقعيت هسته‌اي، تأثير DHP به‌طور معني‌دار نسبت به hCG در سطوح مختلف IGF-I بيش‌تر بوده است.

جدول ۱- مشخصات زيست سنجي ماهيان استفاده شده

سن	وزن كل (Kg)	طول چنگالي (cm)	دور شكم (cm)	طول كل (cm)	PI
١٦	٢٥	١٦٣/٥	٥٩/٥	١٨٢	٠/٠٦٧
١٥	٣٠	١٦١/٥	٧٠	١٧٧/٥	٠/٠٥٥
١٥	١٩	١٤٢/٥	٥٧	١٥٣	٠/١٢
١٥	٢٣	١٤٤/٥	٥١	١٦٦/٥	٠/١٣



شكل ۱- ميانگين تأثير عوامل هورموني در درصد ايجاد **GVBD** در اووسيت‌هاي تاس‌ماهي ايراني. (الف) اووسيت با موقعيت هسته غشايي. (ب) اووسيت با موقعيت هسته در حال مهاجرت. هر عدد ميانگين سه تكرار است. ۱ و ۲ و ۳ نشان دهنده مقدار هورمون است. در مورد **IGF-I** و **DHP** به ترتيب ۱۰ , ۱۰۰ و ۱۰۰۰ **ng/ml** و در مورد **hCG** ,۱۰ , ۱۰۰ و ۱۰۰۰ **IU/ml** و در مورد هيپوفيز۱و۲ به ترتيب معادل ۳۰۰۰ و۶۰۰۰ **ng/ml** است. ميانگين‌هاي موجود در هر شكل كه داراي حروف مشترك‌اند، در سطح ۵ درصد تفاوت معني‌دار ندارند.

مقايسه اثر پيش‌تيمار IGF-I، هورمون و مقدار هورمون در هر دو موقعيت هسته‌اي داراي تفاوت‌هاي معني‌داري بود (شكل‌هاي ٤و٥). در موقعيت هسته غشايي و در حال مهاجرت، افزايش مقدار هورمون DHP موجب افزايش معني‌دار در ميزان GVBD مي‌شود.

جدول ٢- خلاصه نتايج تجزيه واريانس اثر مستقل عوامل هورموني در دو موقعيت هسته‌اي بر درصد **GVBD**

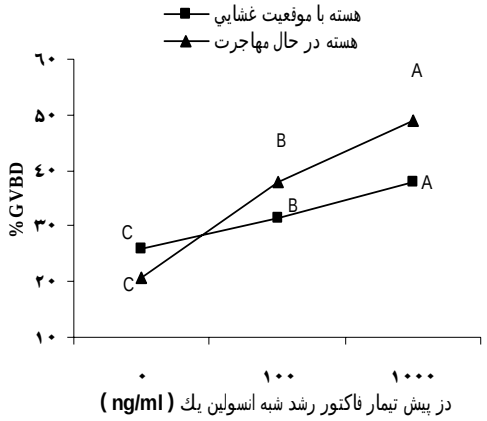
منبع تغييرات	درجه آزادي	ميانگين مربعات	
		PI<٠/٠٧	**PI**>٠/١
تكرار	٢	٠/١٨	٠/٥٨
تيمارهاي هورموني	١١	٦٥/٣٣**	٧١/٦٢**
خطا	٢٢	٢/١٤	١/٧٦

** معني‌دار در سطح ١%

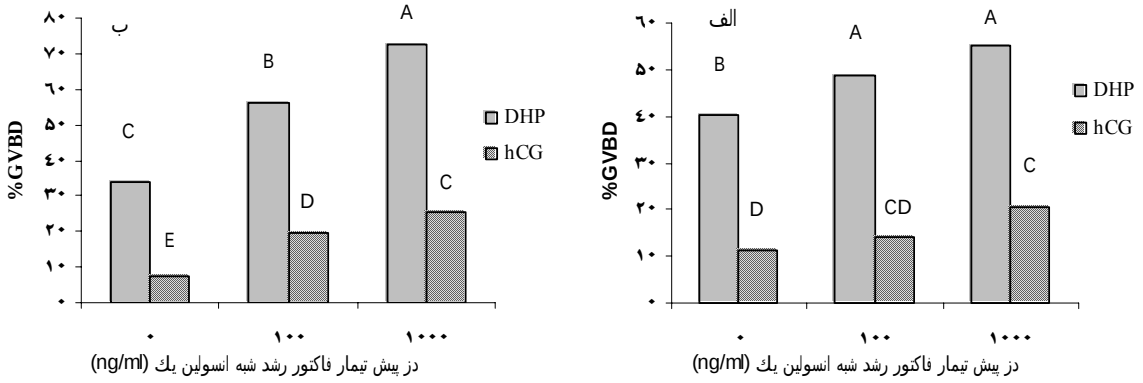
جدول ٣- مقايسه ميانگين‌هاي درصد ايجاد**GVBD** در دو موقعيت هسته اي تحت تأثير مقادير هورمون‌هاي استفاده شده در آزمايش‌هاي اثر مستقل هورمون‌ها

نوع هورمون	مقدار هورمون	ميانگين درصد **GVBD**	
	(ng/ml or IU/ml)	هسته غشايي	هسته در حال مهاجرت
شاهد	٠	٠	٠
IGF-I	١٠	٣١/٤٨ ±٥/٧٩*	١٠ ± ٠
	١٠٠	٢٠/٢٠ ± ٠/٩٥	٣٣/٣٠ ± ٢/١٠
	١٠٠٠	١٢/٢٧ ± ١/٠١	٣٠ ± ٠**
	ميانگين اثر سه مقدار	٢١/٢٧	٢٤/٤٤
DHP	١٠	٧/٤٠ ± ١/٧٥	١٧/٧٠ ± ٢/٧٧
	١٠٠	٥٤/١٠ ± ٥/٨٢*	١٨/١٠ ± ٦/٢١
	١٠٠٠	١٠٠ ± ٠	١٠٠ ± ٠
	ميانگين اثر سه مقدار	٥٣/٨٥	٤٥/٣٠
hCG	١٠	١٦/٩٠ ± ١/٨٥*	١٠ ± ٠
	١٠٠	١٧/٤٠ ± ٣/٠٧*	١٠ ± ٠
	١٠٠٠	١٠/٥٠ ± ٠/ ٢٦	١٠ ± ٠
	ميانگين اثر سه مقدار	١٤/٩٥**	١٠
هيپوفيز خشك شده	٣٠٠٠	٤٣/٣٠ ± ٧/٢١	٧٢/٩٠ ± ٩/٦١
	٦٠٠٠	٦٦/٦٠ ± ١٠/٨٩	٦٤/٩٠ ± ٢/٣٩
	ميانگين اثر دو مقدار	٥٥/٠٠	٦٨/٧٥

آزمون **t**- استيودنت دو طرفه. هر ميانگين **(SEM ±)** حاصل از سه تكرار است. * معني‌دار در سطح ٥%، ** معني‌دار در سطح ١%



شكل ۲- ميانگين ميزان درصد **GVBD** در تيمارهاي پيش‌تيمار شده با سه سطح **IGF-I** در دو موقعيت هسته‌اي غشايي و در حال مهاجرت در سطح ۵ درصد از سه تكرار



شكل ۳- مقايسه تأثير **IGF-I** به‌عنوان پيش‌تيمار دو هورمون **DHP** و **hCG** در ايجاد **GVBD** در اووسيت‌هاي تاس‌ماهي ايراني. (الف) اووسيت با موقعيت هسته غشايي و (ب) اووسيت با موقعيت هسته در حال مهاجرت. ميانگين‌هاي موجود در هر شكل كه داراي حروف مشترك‌اند در سطح ۵ درصد تفاوت معني‌دار ندارند. هر عدد ميانگين سه تكرار است.

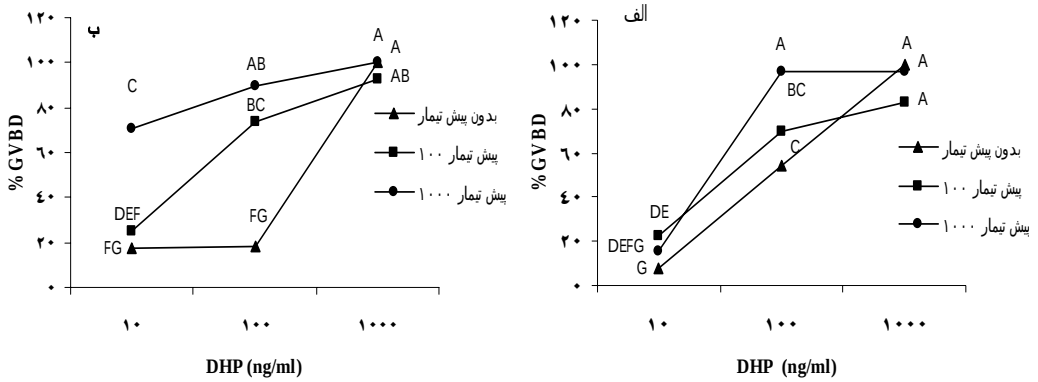
جدول ٤- خلاصه نتايج تجزيه واريانس اثر **IGF-I** به‌عنوان پيش‌تيمار هورمون‌هاي **DHP** يا **hCG** در ايجاد **GVBD** در دو موقعيت هسته‌اي

منبع تغييرات	درجه آزادي	ميانگين مربعات	
		PI<۰/۰۷	**PI>۰/۱**
تكرار	۲	۱/۱۱	۱/۵۱
پيش‌تيمار IGF-I	۲	٤۳/۵۵**	۱۷۹/۵۸**
خطا	٤	۱/۰۰	۳/۷۳
نوع هورمون (hCG و يا DHP)	۱	۳٦٤/۸۱**	٤۸۸/۰۷**
پيش‌تيمار × نوع هورمون	۲	۲/۸۹^{ns}	۷/٦٦**
خطا	٦	۱/۷۵	۰/٦۱
مقدار هورمون‌ها	۳	۲۰۳/٦۹**	۱۱۱/۲۸**
پيش‌تيمار × مقدار هورمون	٦	۱٦/٦۱**	۲۲/۲۵**
نوع هورمون × مقدار هورمون	۳	۱٤۳/۷۵**	۸۱/۲۲**
پيش‌تيمار × نوع هورمون × مقدار هورمون	٦	۵/۵۱*	۱۷/۱۸**
خطا	۳٦	۱/۵۸	۱/٤٤

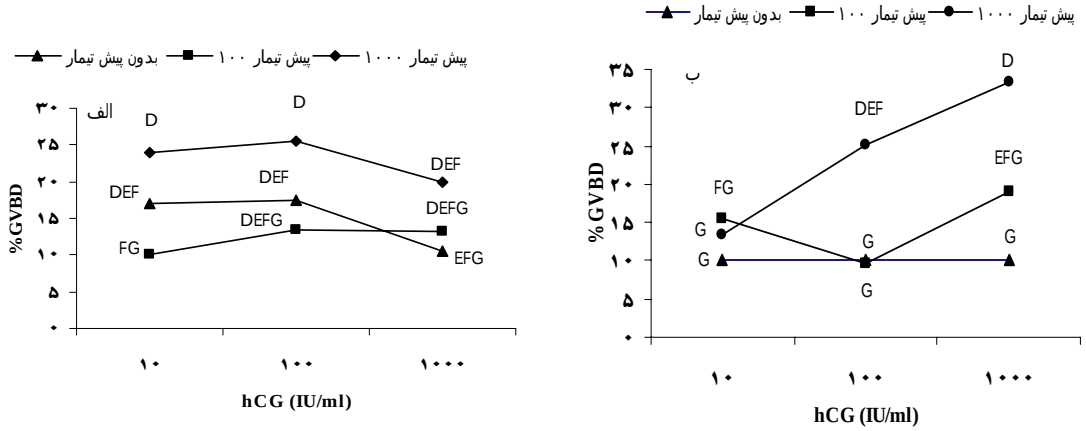
* معني‌دار در سطح ۵%، ** معني‌دار در سطح ۱%، ^{ns} غيرمعني دار

همچنين افزايش مقدار پيش‌تيمار IGF-I، تا غلظت ng/ml ۱۰۰۰، موجب افزايش معني‌دار در تأثير مقادير DHP در مقدار ng/ml ۱۰۰ در موقعيت غشايي و مقادير ng/ml ۱۰ و ۱۰۰ در موقعيت هسته مهاجر نسبت به همان تيمارها بدون پيش‌تيمار كردن با IGF-I مي‌گردد. درحالي‌كه در مقدار ng/ml ۱۰۰ IGF-I اين تفاوت معني‌دار، در غلظت ng/ml ۱۰ DHP در موقعيت غشايي و غلظت ng/ml ۱۰۰ DHP در موقعيت مهاجر نسبت به همان تيمارها بدون پيش‌تيمار كردن با IGF-I ديده مي‌شود (شكل ٤). در مورد hCG در موقعيت غشايي، اگر چه IGF-I موجب افزايش ميزان GVBD در مقادير hCG شده، ولي اين تفاوت‌ها معني‌دار نيستند. در موقعيت هسته در حال مهاجرت مقدار ۱۰۰۰ پيش‌تيمار IGF-I با مقادير ۱۰۰ و ۱۰۰۰ hCG ميزان درصد GVBD را به‌طور معني‌دار افزايش داده است (شكل ۵). به‌علاوه تأثير IGF-I به‌عنوان پيش‌تيمار DHP نسبت به hCG همواره در مقادير ۱۰۰ و ۱۰۰۰ در موقعيت غشايي (شكل‌هاي ٤- الف و ۵- الف) و در حال مهاجرت (شكل‌هاي ٤- ب و ۵- ب) به‌طور معني‌دار بيشتر بوده است.

مقايسه هر دو تيمار مشابه در آزمايش پيش‌تيمار كردن اووسيت‌ها با IGF-I در دو موقعيت هسته‌اي تنها در اووسيت‌هاي پيش‌تيمار شده با IGF-I در مقدار ng/ml ۱۰۰۰ ، و پيش‌تيمار شده با DHP در مقدار ng/ml ۱۰ به‌طور معني‌داري در موقعيت هسته در حال مهاجرت بيش‌تر از هسته غشايي بوده است، ولي در ساير تيمارها تفاوت معني‌داري بين دو موقعيت هسته‌اي مشاهده نمي‌شود (آزمون t- استيودنت در سطح ۵ درصد).



شكل ٤- ميانگين تأثير مقادير **DHP** در سطوح مختلف پيش‌تيمار با **IGF-I** در ايجاد **GVBD** در دو موقعيت هسته‌اي غشايي (الف) و در حال مهاجرت (ب). ميانگين‌هاي موجود در هر شكل كه داراي حروف مشترك‌اند، در سطح ۵% تفاوت معني‌دار ندارند. هرعدد ميانگين سه تكرار است.



شكل ۵- ميانگين تأثير مقادير **hCG** در سطوح مختلف پيش‌تيمار با **IGF-I** در ايجاد **GVBD** در دو موقعيت هسته‌اي غشايي (الف) و در حال مهاجرت (ب). ميانگين‌هاي موجود در هر شكل كه داراي حروف مشترك‌اند، در سطح ۵% تفاوت معني‌دار ندارند. هرعدد ميانگين سه تكرار است.

بحث و نتيجه‌گيري

نتايج اين تحقيق نشان داد كه IGF-I مي‌تواند در شرايط *in vitro* رسيدگي اووسيت‌ها را كه با پديده GVBD همراه است، در تاس ماهي ايراني در دو موقعيت هسته‌اي فراهم سازد. اين نتيجه با نتايج به دست آمده در سيم دريايي قرمز (*Pagus major*)، فوندولوس (*Fundulus hetroclitus*)، باس مخطط (*Morone saxatilis*) و كپورهندي (*Labeo rohita*)، مطابقت دارد(۳،۱۱،۲۵،۳٤). فاكتور رشد شبه انسولين - يك، فعاليت بيولوژيكي خود را از طريق گيرنده‌هاي اختصاصي سطح سلولي اعمال مي‌كند (۵). وجود گيرنده‌هاي IGF-I در لايه‌هاي گرانولوزا وتكا در چند گونه از ماهي‌ها گزارش شده است (۶،۱۴،۲۷). از طرف ديگر، گزارش‌هاي موجود در مورد غلظت پلاسمايي IGF-I در چند گونه ماهي مطالعه شده، غلظت اين هورمون را در دامنه‌اي بين ۱۰-۳۰۰ng/ml تعيين كرده‌اند (۱۲،۲۰،۲۱،۲۸). هچنين در تاس ماهي ايراني دامنه غلظت پلاسمايي اين فاكتور ۱۰-۱۰۰ng/ml تعيين شده است (داده‌ها منتشر نشده، بهرامي كمانگر و همكاران). مقدار

١٠ ng/ml استفاده‌شده اين هورمون در آزمايش اثر مستقل هورمون‌ها در مرحله هسته غشايي داراي تأثير معني‌دار بيشتري نسبت به مرحله هسته در حال مهاجرت بوده، درحالي‌كه در مقدار ١٠٠ ng/ml اين تفاوت معني‌دار نيست. همچنين در مقدار فارماكولوژيك استفاده شده (١٠٠٠ng/ml) تأثير اين عامل در موقعيت هسته در حال مهاجرت به‌طور معني‌دار بيش از هسته غشايي بوده است. اين در حالي است كه مدت زمان انكوباسيون در گروه آزمايشي با موقعيت هسته در حال مهاجرت بيش از گروه آزمايشي با موقعيت هسته غشايي بوده است. بنابراين مي‌توان گفت كه تاثير IGF-I در القاي GVBD در مقادير نزديك به غلظت فيزيولوژيك در موقعيت هسته غشايي بيشتر از موقعيت هسته در حالت مهاجرت بوده است. به عبارت ديگر، مي‌توان چنين اظهار داشت كه تراكم گيرنده‌هاي اختصاصي IGF-I در لايه‌هاي محتمل گرانولوزا و تكاي تاس ماهي ايراني در موقعيت هسته‌اي غشايي بيش از موقعيت هسته در حال مهاجرت است.

در آزمايش اثر مستقل هورمون‌ها، DHP در هر دو موقعيت هسته‌اي داراي اثر وابسته به مقدار بوده، طوري‌كه با افزايش مقدار استفاده شده، ميزان GVBD افزايش يافته است. غلظت فيزيولوژيك پلاسمايي DHP در بيشتر گونه‌هاي ماهيان و از جمله بستر در دامنة ١٠-١ ng/ml تعيين شده است (١٩). مقايسه تأثير اين غلظت DHP با غلظت‌هاي فيزيولوژيك استفاده‌شده IGF-I در هر يك از دو موقعيت هسته‌اي (١٠ ng/ml و١٠٠ در موقعيت هسته غشايي و ١٠٠ ng/ml در موقعيت هسته در حال مهاجرت) نشان‌دهنده مؤثرتر بودن IGF-I در ايجاد GVBD است. نگاتا و همكاران (١٩٩٨) نيز مؤثرتر بودن IGF-I نسبت به DHP را در مقادير فيزيولوژيكي در ماهي *Fundulus hetroclitus* گزارش كرده‌اند (٢٥). از طرف ديگر، مؤثرتر بودن مقدار ١٠٠ ng/ml هورمون DHP در مرحله غشايي نسبت به مرحله هسته در حالت مهاجرت مي‌تواند بيان‌كننده اين مسئله باشد كه پاسخگويي اووسيت‌ها در مرحله غشايي در مقدار مذكور بيشتر است. پاتينو و همكاران (٢٠٠١) در مدل دو مرحله‌اي رسيدگي اووسيت‌ها بيان مي‌دارند كه شروع مهاجرت هسته مقدم بر توليد MIH است، تا زماني كه هسته غشايي نشده است، MIH توليد نمي‌گردد (٢٦). نتايج اين آزمايش نيز نشان مي‌دهد با وجود طولاني‌تر بودن مدت زمان انكوباسيون در آزمايش با موقعيت هسته در حال مهاجرت، حساسيت اووسيت‌ها به DHP (MIH استفاده شده در اين آزمايش) در مرحله هسته غشايي بيشتر از هسته در حالت مهاجرت است. اگر چه ميانگين اثر سه مقدار تفاوت معني‌داري را در دو مرحله نشان نداده و فقط در مقدار ١٠٠ng داراي تفاوت معني‌دار بوده است.

مقايسه تأثير hCG با IGF-I در ايجاد GVBD در آزمايش اثر مستقل هورمون‌ها در مرحله غشايي، تفاوت معني‌داري را نشان نداده است، درحالي‌كه در مرحله هسته در حال مهاجرت تأثير IGF-I در غلظت فيزيولوژيك به‌طور معني‌دار بيش از تأثير hCG بوده است. نتايج كاگاوا و همكاران (١٩٩٤) در ماهي سيم دريايي قرمز نيز تأثير بيشتر IGF-I را نسبت به hCG نشان داده، اگر چه مقدار استفاده شده در مورد hCG به‌مراتب كمتر از مقدار استفاده شده در اين آزمايش بوده است(١١). از طرف ديگر، تأثير بيشتر hCG در مرحله غشايي نسبت به تأثير اين عامل در موقعيت هسته مهاجر را مي‌توان در نتيجه تكامل بيشتر و آمادگي بيشتر اووسيت‌ها براي رفع توقف ميوزي در اين مرحله دانست. در مدل دومرحله‌اي رسيدگي اووسيت‌ها و گنادوتروپين نوع دو در ابتدا حساسيت فوليكول‌ها را به MIH افزايش و بعد با رسيدن هسته به مرحلة غشايي، توليد MIH را افزايش مي‌دهد (٢٦). بنابراين افزايش ميزان GVBD در مرحلة غشايي در تاس ماهي ايراني ناشي از آماده شدن قبلي يا فراهم شدن رسيدگي اووسيت (OMC) است كه در واقع در مرحله اول رسيدگي اووسيت انجام شده و افزودن گنادوتروپين فقط موجب ايجاد MIH در مرحله دوم رسيدگي اووسيت مي‌شود، درحالي‌كه در مرحله هسته در حال مهاجرت گنادوتروپين ابتدا بايد فراهم ساختن OMC و بعد توليد MIH و در نهايت ايجاد GVBD را القا كند. از طرف ديگر، تأثير كمتر hCG نسبت به هيپوفيز خشك‌شده در دو غلظت استفاده‌شده مي‌تواند ناشي از دو مسئله باشد.

hCG گنادوتروپين اختصاصي در تاس ماهي ايراني نيست و طبيعي است كه پودر هيپوفيز خشك‌شده تاس‌ماهي ايراني تأثير بيشتري داشته باشد. از طرف ديگر پودر هيپوفيز خشك‌شده علاوه بر گنادوتروپين، داراي تركيبات هورموني متعدد، از جمله هورمون رشد است. هورمون رشد ارتباط نزديكي با تنظيم و توليد IGF-I دارد (۵). همچنين وجود گيرنده‌هاي هورمون رشد در سطح تخمدان ماهيان مشخص شده است (۱۳). پورتسكي و همكاران (۱۹۹۹) يكي از دلايل تأثير هورمون رشد را در رسيدگي جنسي پستانداران، اثر مستقيم اين هورمون بر افزايش توليد موضعي IGF در تخمدان‌ها مي‌دانند(۲۹). با وجود اين گزارشي از تأثير مستقيم هورمون رشد بر رسيدگي اووسيت‌ها از طريق IGF-I در ماهيان گزارش نشده است.

بررسي نتايج آزمايش‌هاي پيش‌تيمار اووسيت‌ها با IGF-I نشان‌دهنده مؤثر بودن اين عامل در افزايش تأثير هورمون‌هاي DHP و hCG است. اين تأثير در مقادير فيزيولوژيكي يا نزديك به آنها مشاهده شده و در مورد DHP نسبت به hCG به‌مراتب بيشتر است. كاگاوا و همكاران (۱۹۹٤) نشان دادند كه پيش‌تيمار كردن اووسيت‌هاي ماهي سيم دريايي قرمز با IGF-I و تيمار بعدي آنها با DHP، موجب افزايش ميزان GVBD شده است. همچنين تركيب همزمان دو عامل مذكور تأثير معني‌داري در ايجاد GVBD داشته است(۱۱). اين نتيجه در ماهي فوندلوس نيز مشاهده شده است (۲۵). با وجود اين در ماهي باس مخطط افزودن MIH، كه در اين گونه هورمون 17, 20β, 21-trihydoxy-4-Pregnen-3-one است، به محيط كشت حاوي IGF-I نتوانست افزايشي در ميزان GVBD نسبت به IGF-I تنها ايجاد كند (۳٤) . توماس و همكاران (۲۰۰۱) نشان دادند كه IGF-I در قزل‌آلاي دريايي فعاليت گيرنده‌هاي MIH اووسيت‌ها را افزايش مي‌دهد(۳۱). مؤثر بودن غلظت‌هايng/ml ۱۰۰ و ۱۰۰۰ IGF-I به‌عنوان پيش‌تيمار DHP در دو غلظت ng/ml ۱۰ و ۱۰۰ در هر دو موقعيت هسته‌اي نسبت به عدم پيش‌تيمار، مي‌تواند تأييدي بر اين نكته باشد كه IGF-I ممكن است موجب افزايش تراكم گيرنده‌هاي MIH شود و از اين طريق ميزان تأثير DHP را افزايش دهد. همچنين عدم تأثير معني‌دار IGF-I به‌عنوان پيش‌تيمار hCG در موقعيت غشايي و مؤثر بودن آن در موقعيت هسته در حال مهاجرت، نشان‌دهنده نقش بيشتر IGF-I در وقايع مرحله اول رسيدگي اووسيت‌ها در تركيب با hCG است.

تحقيق حاضر اولين گزارش در مورد تأثير فاكتور رشد شبه‌انسولين- يك (IGF-I) در رسيدگي اووسيت‌هاي تاس ماهي ايراني و همچنين در ساير ماهيان غضروفي استخواني است. نتايج اين تحقيق نشان داد كه IGF-I مي‌تواند به دو روش در رسيدگي اووسيت‌هاي تاس ماهي ايراني مؤثر باشد: ۱- اثر مستقل IGF-I در ايجاد GVBD كه مستقل از ساير عوامل هورموني استفاده شده است. اين اثر مي‌تواند ناشي از عمل مستقيم IGF-I بر گيرنده‌هاي اختصاصي در سطح غشاي اووسيت‌ها يا بر گيرنده‌هاي موجود در لايه‌هاي فوليكولي باشد. اگر چه وجود اين گيرنده‌ها در *Xenopus laevis* مطرح شده (۷)، ولي گزارشي از وجود گيرنده‌هاي اختصاصي IGF-I در سطح غشاي اووسيت‌ها در ماهيان گزارش نشده است. ۲- IGF-I مي‌تواند به‌عنوان پيش‌تيمار اثر هورمون‌هاي القاكننده رسيدگي اووسيت‌ها و گنادوتروپين را افزايش دهد.

تشكر و قدرداني

در خاتمه از مهندس رضوان‌ا.. كاظمي و همكاران محترم وي در بخش فيزيولوژي و بيوشيمي انستيتو تحقيقات ماهيان خاوياري به علت همكاري‌هاي ارزنده آنها براي انجام اين مطالعه تشكر و قدرداني مي‌شود. همچنين از مديريت و كاركنان مركز تكثير و پرورش ماهيان خاوياري شهيد بهشتي به دليل تامين مولدين مورد نياز، كمال تشكر وقدرداني را داريم.

منابع

1- Baker D.M., B. Davies, W.W. Dickhoff, & P. Swanson, 2000. Insulin-Like Growth Factor-I increases follicle-stimulating hormone (FSH) content and Gonadotropin-Releasing Hormone-Stimulated FSH release from Coho Salmon pituitary cells in Vitro, Biology of Reproduction, 63**:** 865–871.

2- Barannikova,I.A., L.V. Bayunova, & I.I. Saenko,1997. Dynamics of steroid hormones in sturgeon *(Acipenser gueldenstaedti)* with different characteristics of gonads at the beginning of anadromous migration to the volga, J.Ichthyology, 37: 312-318.

3- Dasgupta S., D. Basu, L. Ravikumar & S. Bhattacharya, 2001. Insulin alone can lead to a withdrawal of meiotic arrest in the carp oocyte, J.Biosci., 26:341-347.

4- Dettlaff, T.A., A.S. Ginsburg, & O.I. Schmalhausen, 1993. Sturgeon fishes developmental biology and aquaculture, Translator: Gause G.G., Springer-Verlag,. 1-45.

5- Duan C., 1997. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish, Amer.Zool., 37:491-503.

6- Gutierrez J., M. Parrizas, N. Carneiro, & J.L. Maestro,1993. Insulin and IGF-I receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive cycles, Fish Physiol. Biochem.,11:247-254.

7- Hainaut P., S.Giorgetti, A.Kowalski, R.Ballotti & E.Van Obberghen, 1991. Antibodies to phosphotyrosine injected in *Xenopus laevis* oocytes modulate maturation induced by insulin/IGF-I, Exp.Cell Res.,197:129-136.

8- Holloway A. C. , M. A.Sheridan, G. Van Der Kraak, & J. F.Leatherland, 1999. Correlations of plasma growth hormone with somatostatin, gonadal steroid hormones and thyroid hormones in rainbow trout during sexual recrudescence, Comp. Biochem. Physiol. Part B 123: 251–260.

9- Huang Y-S, K.Rousseau, N.Le Belle, B.Vidal, E.Burzawa, J. Marchelidon & S.Dufour, 1998. Insulin-like growth factor-I stimulates gonadotrophin production from eel pituitary cells: a possible metabolic signal for induction of puberty, J.Endocrinology, 159: 43-52.

10- Hull. K.L., & S. Harvey, 2001. Growth hormone: roles in female reproduction, J. Endocrinology, 168: 1-23.

11- Kagawa,H., M.Kobayashi, Y.Hasegawa, & K.Aida, 1994. Insulin and insulin-like growth factors I and II induce final maturation of oocytes of red seabream in vitro, Gen.Comp.Endocrinol., 95: 293-300.

12- Larsen, D.A., B.R. Beckman & W.W.Dickhoff, 2001, The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and endocrine physiology of coho salmon (*O.kisutch*), Gen.Comp.Endocrinol.,123: 308-323.

13- Le Gac F., O. Blaise, A.Fostier, P.LeBail, M.Loir, B.Mourot, & C.Weil, 1993.Growth hormone (GH) and reproduction: a review. Fish Physiol. Biochem., 11:219-231.

14- Maestro M.A., J.V.Planas, S.Moriyama, J.Gutierrez, J.Planas, & P.Swanson, 1997.Ovarian receptorsr 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., 106: 189-201.

15- Moberg,G.P., J.G.Watson, S.I. Doroshov, H.Papkoff & Jr.Pavlick, 1995. Physiological evidence for two sturgeon gonadotropins in *Acipenser transmontanus*, Aquacultutre, 135: 27-39.

16- Mommsen, T.P., 1998. Growth and metabolism. In: The physiology of fishes, Edited by D. H. Evans, 2nd ed., CRC press, 65-97.

17- Mojazi Amiri M., M.Maebayashi, A.Hara, S.Adachi, & K.Yamauchi, 1996. Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid,the Bester, J.Fish Biol., 48 :1164-1178.
18- Mojazi Amiri M., M.Maebayashi, S.Adachi, G.P. Moberg, S.I. Doroshov & K.Yamauchi,1999. In vitro steroidogenesis by testicular fragments and ovarian follicles in a hybrid sturgeon, Bester, Fish Physiol.Biochem.,21:1-14.
19- Mojazi Amiri.B., M.Maebayashi, N.Omoto, S.Adachi & K.Yamauchi,2001. In vitro oocyte maturation in a hybrid sturgeon, Bester: changes in germinal vesicle breakdown and 17α20β-dihydroxy-pregnen-3-one production, JAST, 3: 199-208.
20- Moriyama S., H.Shimma, M.Tagawa & H. Kagawa, 1997. Changes in plasma insulin-like growth factor-I levels in the precociously maturing amago Salmon (*O.masou*), Fish Physiol.Biochem., 17: 253-259.
21- Myer K.W., N.D.Davis, W.W.Dickhoff & S.Urawa, 1998. Blood plasma levels of insulin-like growth factor-I in Pacific Salmon in offshore waters in winter, NPAFC,1:129-137.
22- Nagahama,Y., M.Yoshikuni, M.Yamashita, N.Sakai & M.Tanaka, 1993. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish, Fish Physiol. Biochem., 11:3-14.
23- Nagahama,Y.,1995.Teleost oocyte maturation: actuality and potentiality, Abstract/Aaquaculture,135:75-76.
24- Nagahama,Y., 1997. 17α20β-dihydroxy-pregnen-3-one,a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action, Steroids, 62:190-196.
25- Negatu Z., S.M.Hasiao & R.A.Wallace, 1998. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation and steroid production in *Fundulus heteroclitus,* Fish Physiol. Biochem., 19:13-21.
26- Patino R., G.Yoshizaki, P.Thomas & H.Kagawa, 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms,Comp.Biochem.Physiol., Part B, 129: 427-439.
27- Perrot V., E.B.Moiseeva, Y.Gozes, S.J.Chan & B.Funkenstein, 2000. Insulin-like growth factor receptor and their ligands in gonad of a hermaphroditic species, the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*): Expression and cellular localization, Bio.Reprod., 63: 229-241.
28- Pierce A.L., K.D.Shearer, D.M.Baker & W.W.Dickhoff, 2002. An autumn profile of growth regulatory hormones in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), Fish Physiol.Biochem., 25:81-86.
29- Poretsky L., N.A.Cataldo, ZEV Rosenwaks & L.C.Giudice, 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease, Endocrine Reviews, 20: 535-582.
30- Reinecke M., A.Schmid, R. Ermatinger & D.Loffing-Cueni, 1997. Insulin-like growth factor-I in the teleost *Oreochromis mossambicus* ,the Tilapia: gene sequnence, tissue expression and cellular localization, Endocrinology, 138: 3613-3619.
31- Thomas, P., J.Pinter & S. Das, 2001. Upregulation of the maturation-inducing steroid membrane receptor in Spotted Seatrout ovaries by gonadotropin during oocyte maturation and its physiological significance, Biology of Reproduction, 64:21-29.
32- Webb, M.A.H., J.P.Van Eenennaam, S.I. Doroshov & G.P. Moberg, 1999. Prelimary observations on the effects of holding temperature on reproductive performance of female White sturgeon (*Acipenser transmontanus),* Aquaculture, 176: 315-329.
33- Webb, M.A.H., G. W. Feist, J.M. Trant, J.P. Van Eenennaam, M.S. Fitzpatrick, C.B. Scherck & S.I. Doroshov, 2002. Ovarian steroidogenesis in White Sturgeon *(Acipenser trensmontanus)* during oocyte maturation and induced ovulation, Gen. Comp. Endocrinol., 129:27-38.

34- Weber G.M. & C.V.Sullivan, 2000. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro final oocyte maturation and ovarian steroidogenesis in Striped Bass (*Morone saxatilis)*. Biology of Reproduction, 63**:** 1049–1057.

35- Weil, C., F.Carre, O.Blaise, B.Breton & P-Y.Lebail, 1999. Differential effect of insulin-like growth factor-I on *in vitro g*onadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout *(Oncorhynchus mykis*s) at different stages of the reproductive cycle, Endocrinology, 140: 2054-2062.

36- Williot, P., 1997. Effects of incubation media on maturation of isolated ovarian follicles of Siberian sturgeon *(Acipenser baeri)* induction by sturgeon gonadotropic preparation or 17α, 20β-dihydroxyprogesterone. Comp.Biochem.Physiol., Part C,118: 285-293.

Insulin-Like Growth Factor-I can Induce Oocyte Maturation in Persian Sturgeon *(Acipenser Persicus), In vitro*

B. Bahrami Kamangar[1] B. Mojazi Amiri[2] M. Javad Rasaee[3]
B. Abtahi[4] M. Bahmani[5]

Abstract

A comparative study on the effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) with DHP, hCG and acetone dried pituitary in Persian sturgeon (adsP) on *in vitro* germinal vesicle breakdown (GVBD) was examined in oocytes of Persian sturgeon. Moreover, the effect of DHP and hCG in pretreated oocyte with IGF-I was also examined. The study was carried out on two maturational stages of oocytes according to polarization index (PI<0.07 and PI>0.1). The oocytes, used on two germinal vesicle positions, underwent GVBD in response to IGF-I (10, 100, 1000 ng/ml). The rate of GVBD varied on each dose. In oocytes with PI<0.07, IGF-I (10, 100 ng/ml) it was more potent than DHP (10 ng/ml) while in oocytes with PI>0.1, IGF-I (100, 1000 ng/ml) more potent than DHP (10, 100ng/ml) on GVBD induction. IGF-I (10 ng/ml) in PI<0.07 and (100, 1000 ng/ml) in PI>0.1 induced more GVBD than hCG (10, 100, 1000 IU/ml).In two PI's , adsP was more potent than IGF-I. Pretreatment of oocytes (PI<0.07 and PI>0.1) with IGF-I (100, 1000 ng/ml) and then treatment with DHP (100 ng/ml) could increase GVBD as compared to oocytes that were not pretreated. Oocytes pretreated with IGF-I (1000 ng/ml) and then treatd with hCG (100, 1000 IU/ml) underwent GVBD only in PI>0.1 (P<0.05). These results suggest, for the first time in chondrostean fish, that IGF-I is involved in the induction of GVBD of oocytes. IGF-I appears to act directly on oocyte as well as in conjunction with DHP or hCG, to induce GVBD.

Keywords: Insulin-like growth factor-I, Oocyte maturation, Persian sturgeon, Maturation inducing Hormone, Gonadotropin

1-Department of Fisheries Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj.
E-mail: bbkamangar@yahoo.com
2- Department of Fisheries & Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran.
3- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sceinces, Tarbiat Modarres University
4- Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modarres University.
5- Department of Physiology, International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran