شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

صفحات ۳۷۶-۳۶۷

مطالعه ی نقش فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGF-I و IGF-II) و آمینواسیدهای لوسین و لایزین بر روی عملکرد سیستم IGF در سلول‌های کشت داده شده عضله ماهی شانک سرطلایی (*Sparus aurata*)

شیدا عزیزی[۱] محمد علی نعمت اللهی*[۲] باقر مجازی امیری[۳] Joaquim Gutiérrez[۴]

۱. دانشجوی دکترای آبزی پروری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴. استاد دانشکده بیولوژی دانشگاه UB بارسلونا، بارسلون، اسپانیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ تصویب:۱۳۹۵/۲/۸

چکیده

فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGFs)، هورمونهای ضروری در تحریک و بهبود رشد می باشند. مدارک جدید نشان می دهد که اسیدهای امینه نیز کلیدهای تنظیمی در مسیر های متابولیک دخیل در رشد، تولید مثل و پاسخهای ایمنی هستند. لوسین و لایزین دو اسیدآمینه‌ی ضروری هستند که ثابت شده است اضافه نمودن آنها به جیره ی ماهیان رشد آنها را افزایش می دهد. در هر حال اثرات خاص کمبود یک اسید آمینه بر روی فرآیند عضله سازی هنوز به خوبی مشخص نمی باشد. IGF ها (IGF-I و IGF-II) در عضله می توانند بر بیان اعضای سیستم IGF اثر بگذارند. از اینرو پاسخ هر یک در مقابل تجویز IGF ها در روز چهارم کشت سلولی در دو زمان ۶ و ۱۸ ساعت پس از تجویز، بررسی گردید. هر دو IGF بیان IGF-I و IGFBP-5 را افزایش دادند. بیان هر دو از ایزوفرم گیرنده های IGF-I (IGF-IR) در تحریک با IGF-I کاهش نشان داد درحالیکه IGF-II توانست بیان IGF-IRb را افزایش و بیان IGF-IRa را کاهش دهد. تاثیرات گرسنگی دادن سلولها بر عملکرد این سیستم پس از در معرض قرار دادن انها با محیط کشت فاقد لوسین و لایزین در روزهای ۲، ۴ و ۸ نیز بررسی گردید. از بین اسیدهای امینه ی مورد مطالعه لوسین نتوانست تاثیر معنی داری در بیان ژنهای مورد مطالعه بگذارد در حالیکه کمبود لایزین اثرات شدیدی را بر تنظیمات IGF ها از طریق کاهش سطوح mRNAی IGF-I، IGF-II و IGF-IRb اعمال نمود. در مجموع این نتایج اهمیت IGF ها را در بیان هر یک از اجزای سیستم IGF موضعی که به فعالیت اندوکراین/پاراکراین این سیستم مربوط می شود نشان می دهد. همچنین در هنگام فرموله نمودن جیره ماهی شانک سر طلایی متعادل نمودن سطح لایزین در جیره ی این گونه، برای دستیابی به رشد متعادل مهم به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: فاکتورهای رشد شبه انسولین، سیستم IGF، لوسین، لایزین، عضله سازی، *Sparus aurata*

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۲۶۳۲۲۴۵۹۰ + ایمیل: malahi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

پرورش ماهی شانک یکی از مهمترین صنایع آبزی پروری در منطقه مدیترانه است که به طور گسترده ای در مدیترانه جنوبی گسترش دارد و به عنوان یک منبع پروتئینی مهم در رژیم غذایی مردم اروپا وجود دارد. متعادل سازی رشد این ماهی در سالهای اخیر انجام گرفته است (FEAP, 2014).

رشد سلول به فاکتورهای هورمونی و تغذیه ای ارتباط دارد. سیستم IGF شامل فاکتورهای رشد IGF-I و IGF-II و گیرنده های مربوط به آنها و پروتئین های باند شونده (IGFBPs) می باشد. این سیستم به طور گسترده ای در پستانداران مطالعه شده است (Pérez-Sánchez, 2000)، ولی در مورد ماهی مطالعات کمتری وجود دارد (Bower *et al*., 2008).

IGF I و IGFII پلی پپتیدهای ارتقادهنده‌ی رشد هستند که به صورت اولیه در کبد در اثر تحریک هورمون رشد تولید می شوند. اجزاء این سیستم در تکامل، رشد، تمایز و تولید مثل نقش دارند (Beckman, 2011; Reinecke, 2010) اخیراً در زمینه اثرات IGF ها بر بیان IGF-I و IGF-II مطالعاتی صورت گرفته است (Jiménez-Amilburu *et al*., 2013).

تحقیقات زیست شناسی سلولی و مولکولی در ماهیان استخوانی نقش اصلی برای اثرات اسیدهای امینه (تحریک یا گرسنگی) در حوادث سلولی در طول تکامل مایوسیتها را نشان داده است (Bower *et al*., 2012; Lansard *et al*., 2010; Seiliez *et al*., 2012; Vélez *et al*., 2014; Yabu *et al*., 2012).

با وجود اینکه مکانیسم های مولکولی درگیر در تمایز مایوژنیک نسبتاً خوب شناخته شده است، نقش محرکهای خارج سلولی در کنترل تمایز به مقدار زیادی غیر قابل حل مانده است. به طور ویژه در مورد اثرات مواد مغذی در این فرآیندها شناخت کمی وجود دارد. بنابراین مطالعه نقش لوسین و لایزین به عنوان اسید آمینه های ضروری در کنترل رشد می تواند مهم باشد. لوسین به عنوان یک تنظیم کننده سنتز پروتئین عضله به خوبی شناخته شده است (Averous *et al*., 2012). لایزین نیز یکی از مهمترین اسیدهای آمینه ضروری در ماهی می باشد به طوریکه اضافه کردن آن به جیره برخی از گونه های ماهیان، رشد را در آنها افزایش داده است (Gaylord & Barrows, 2009; Kwasek *et al*., 2012; Van Nguyen *et al*., 2014). از اینرو، این مطالعه تعیین اثراتIGF ها (IGF-I و IGF-II) و اثرات خاص فقدان هر یک از اسید آمینه ضروری،(لایزین و لوسین)، به تنهایی را بر روی رشد عضله شامل تکثیر و تمایز سلولی از طریق تغییر در بیان ژنهای سیستم IGF ها شامل: (IGF-I، IGF-II،IGFBP-1، IGFBP-4، IGFBP-5، IGF-I-Ra و IGF-I-Rb) با استفاده از شرایط *in vitro* مورد هدف قرارداده است که بیان ها و اتصالات پروتئین ها را برای اولین بار در این گونه گزارش کرده است.

۲. مواد و روشها

۱.۲. ماهیان مورد مطالعه

تعداد ۵۰ قطعه ماهیان انگشت‌قد شانک سرطلایی به ازای هر کشت سلولی با میانگین وزنی (۵±۱۰) گرم از یک هچری تجاری در شمال اسپانیا تهیه گردید و در آزمایشگاه ماهی دانشکده بیولوژی دانشگاه بارسلونا برای مدت یکماه تحت شرایط، سیستم چرخشی با استفاده از آب دریا ، دمای (۱±۲۱) درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. ماهیان دوبار در روز با غذای تجاری در حد اشتها (Skretting, Burgos, Spain) غذادهی می شدند. ۲۴ ساعت پیش از نمونه برداری غذادهی قطع گردید. تمام مراحل تحت نظر کمیته ی اخلاق و مراقبت از حیوانات دانشگاه بارسلونا انجام شد (permit numbers CEEA 168/14 and DAAM 7749).

۲.۲. کشت سلولی اولیه ی مایوسیتها

سلولهای ست لایتی از ماهیان انگشت قد شانک سر طلایی بر اساس روش (Montserrat *et al*., 2007a) جدا گردیدند. به طور خلاصه، این سلولها از عضلات سفید بالای خط جانبی ماهیان جدا گردیدند. ۵ گرم از عضله در هر یک از ۸ فالکون، حاوی محیط کشت استخراجی قرار داده شد. پس از هضم مکانیکی و چندین بار سانتریفیوژ (۳ بار ۱۲۰۰ دور در دقیقه و

هر بار ۵ دقیقه) ، هضم آنزیمی به وسیله ی کلاژناز برای مدت یکساعت و ۱۰ دقیقه به همراه تکان ملایم انجام گرفت. پس از چندین مرحله شستشو و سانتریفیوژ محلول استوک تریپسین در دو مرحله اضافه گردید و در چند مرحله دوباره سانتریفیوژ انجام گرفت (۱۲۰۰ دور در دقیقه برای بار اول یک دقیقه و ۲ دفعه ی بعدی، هر بار ۲۰ دقیقه) در مرحله ی آخر سلولها فیلتر شده و نهایتاً در ۱۲۰۰ دور برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و پس از شمارش، رقیق سازی سلولها با تراکم۱۰۵*۲-۱,۵ سلول در سانتیمترمربع انجام گرفت که به همراه ۲ میلی لیتر از محیط کشت کامل Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)، ۱۱٪ NaCl ، ۱۰٪ fetal bovine serum (FBS) و ۱٪ محلول آنتی بیوتیک/آنتی مایسین (A/A) به هر چاهک از پلیتهای ۶ خانه ای منتقل و در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در طول دوره کشت هر ۲ تا ۳ روز سلولها شستشو می شدند.

۳.۲. آزمایش انکوبه نمودن سلولها با IGF-I و IGF-II

برای مطالعه اثرات IGF ها، مایوسیتهای ۴ روزه انتخاب گردیدند. بدلیل اینکه در این روز نه تنها سلولها در حال تکثیر شدن هستند بلکه قابلیت شروع تمایز را نیز دارا می باشند (Montserrat *et al*., 2007a; Rius-Francino *et al*., 2011). سپس سلولها برای مدت ۵ ساعت در محیط کشت DMEM حاوی ۰,۰۲٪ FBS و ۱٪ A/A گرسنگی داده شدند. پس از این مدت، سلولها با IGF-I و IGF-II انسانی نوترکیب (Bachem, Weill am Rhein, Germany) در یک غلظت ۱۰۰ nM در DMEM به همراه ۲٪ FBS و ۱٪ A/A انکوبه شدند و گروه کنترل نیز بدون تیمار در نظر گرفته شد. پس از ۶ و ۱۸ ساعت انکوبه نمودن سلولها با این هورمونها، نمونه برداری از سلولها برای انجام آنالیزهای بیان ژن انجام گرفت.

۴.۲. آزمایش فقدان اسیدآمینه های لایزین و لوسین

سه محیط کشت مختلف شامل: کنترل، محیط کشت فاقد لوسین (-Leu) و محیط کشت فاقد لایزین (-Lys) ساخته شد. بدین ترتیب که ابتدا یک محیط کشت پایه با استفاده از DMEM/F12HAM (۳/۱۵ گرم بر لیتر گلوکوز) (D9785, Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Spain) بدون اسید امینه لوسین و لیزین ساخته شد. سپس متناسب با هر تیمار آزمایشی اسید امینه های لایزین، لوسین و یا هر دو به محیط کشتها اضافه گردید سپس ۱۰٪ FBS و ۱٪ A/A نیز به تمامی محیط کشتها اضافه شد. برای آنالیزهای بیان ژن محیط کشت، در روز اول، برای نمونه برداری در روزهای دوم و چهارم و در روز هفتم برای نمونه برداری در روزهشتم با محیط کشتهای ساخته شده برای هر گروه تعویض گردید. وضعیت تکامل کشتها با استفاده از یک میکروسکوپ اینورت (Zeiss, Axiovert 40C Germany) روزانه بررسی می گردید. تمام مواد از Sigma-Aldric (Tres Cantos, Spain) و وسایل پلاستیکی از Nunc (Labclinics, Barcelona, Spain) تهیه گردید.

۵.۲. Real-time quantitative PCR (qPCR)

در روزهای مشخص شده برای هر یک از آزمایشها سلولهای مورد مطالعه از دو چاهک برای هر تیمار با یک میلی لیتر محلول تریزول (Applied Biosystems, Alcobendas, Spain) جمع آوری گشته و RNA بر طبق روش شرکت سازنده استخراج گردید و سپس غلظت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از یک نانودراپ ND2000 (Thermo Scientific, Alcobendas, Spain) تایید گردید. ۵۰۰ نانو گرم از RNA با DNase 1 تیمار گردید و سپس نسخه برداری معکوس از RNA با استفاده از کیت Transcriptor First Strand cDNA synthesis (Roche, Sant Cugat del Valles, Spain) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. بیان تمامی ژنها با استفاده از سیستم CFX384TM Real – Time (Bio-Rad, El Prat de Llobregat, Spain) اندازه گیری گشت. توالیهای هر پرایمر و دمای آنیلینگ برای هر ژن در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار بیان بر اساس روش Pfaffl (Pfaffl, 2001) نسبت به متوسط ژنومتریک ژنهای رفرنس elongation factor 1α (EF1α) و

ribosomal protein S18 (RPS18) که به شکل ثابتی بیان می شدند اندازه گیری شد.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از بسته ی آماری IBM SPSS، نسخه ی ۲۰ (IBM, Chicago, IL, USA) انجام گرفت. ابتدا نرمال بودن داده ها با استفاده از تست Shapiro-Wilk سنجیده شد و همگنی واریانسها با استفاده از آزمون Leven تایید گردید. تفاوت بین تیمارها در هر زمان نسبت به گروه کنترل با استفاده از آنالیز Student's t-test ارزیابی گشت و تفاوت در زمانهای مختلف بر اساس آزمون واریانس یک طرفه One-way ANOVA مورد مطالعه قرار گرفت. در صورت غیر نرمال بودن داده ها از آزمون Mann-Whitney U test استفاده گردید. در تمامی موارد معنی داری در سطح $p<0.05$ مورد توجه قرار گرفت.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در آنالیزهای qPCR. F: forward، R: reverse و Ta: دمای آنیلینگ.

Gene	Primer sequences (5'-3')	Ta (ºC)	Accession No.
EF1a	F: CTTCAACGCTCAGGTCATCAT R: GCACAGCGAAACGACCAAGGGGA	60	AF184170
RPL27	F: AAGAGGAACACAACTCACTGCCCCAC R: GCTTGCCTTTGCCCAGAACTTTGTAG	68	AY188520
RPS18	F: GGGTGTTGGCAGACGTTAC R: CTTCTGCCTGTTGAGGAACCA	60	AM490061.1
IGF-I	F: ACAGAATGTAGGGACGGAGCGAATGGAC R: TTCGGACCATTGTTAGCCTCCTCTCTG	60	AY996779 EF688015 EF688016
IGF-II	F: TGGGATCGTAGAGGAGTGTTGT R: CTGTAGAGAGGTGGCCGACA	60	AY996778
IGFBP-4	F: TCCACAAACCAGAGAAGCAA R: GGGTATGGGGATTGTGAAGA	60	F5T95CD02JMZ9K
IGFBP-5	F: TTTCTCTCTCGGTGTGC R: TCAAGTATCGGCTCCAG	60	AM963285
IGF-IRa	F: AGCATCAAAGACGAACTGG R: CTCCTCGCTGTAGAAGAAGC	55	KT156846
IGF-IRb	F: GCTAATGCGAATGTGTTGG R: CGTCCTTTATGCTGCTGATG	55	KT156847

۳. نتایج

۱.۳. بیان ژنهای سیستم IGF پس از انکوبه نمودن سلولها با IGF-I و IGF-II

پس از تحریک سلولها با IGF-I و IGF-II ، بیان IGF-I به طور معنی داری در هر دو زمان (۶ و ۱۸ ساعت) افزایش نشان داد (شکل ۱). اگرچه سطح mRNAی IGF-II در زمانها و تیمارهای متفاوت کاهش نشان داد ولی نهایتاً تفاوت معنی داری دیده نشد (شکل ۱). در خصوص IGFBP ها اگر چه بیان IGFBP-4 در زمانهای متفاوت تحت تاثیر IGF ها قرار نگرفت (شکل ۱) ولی افزایش معنی داری در سطح بیان IGFBP-5 توسط هر دو فاکتور رشد پس از ۱۸ ساعت مشاهده گردید (شکل ۱). همچنین بیان IGFBP-I و IGFBP-2 در مایوسیتهای ماهی شانک سر طلایی ردیابی نشد. گیرنده های IGF-IRa و IGF-IRb نیز الگوی بیان مشابه ای را در هنگام انکوبه شدن با IGF ها نشان دادند (شکل ۱). بیان هر دو گیرنده پس از ۶ ساعت انکوباسیون با IGF-I و IGF-II کاهش یافت ولی بیان IGF-IRb پس از ۱۸ ساعت تیمار سلولها با IGF-II به طور معنی داری تحریک گردید.

۲.۳. بیان ژنهای سیستم IGF در سلولهای

گرسنگی داده شده با هریک از دو اسید آمینه‌ی لوسین و لایزین به تنهایی

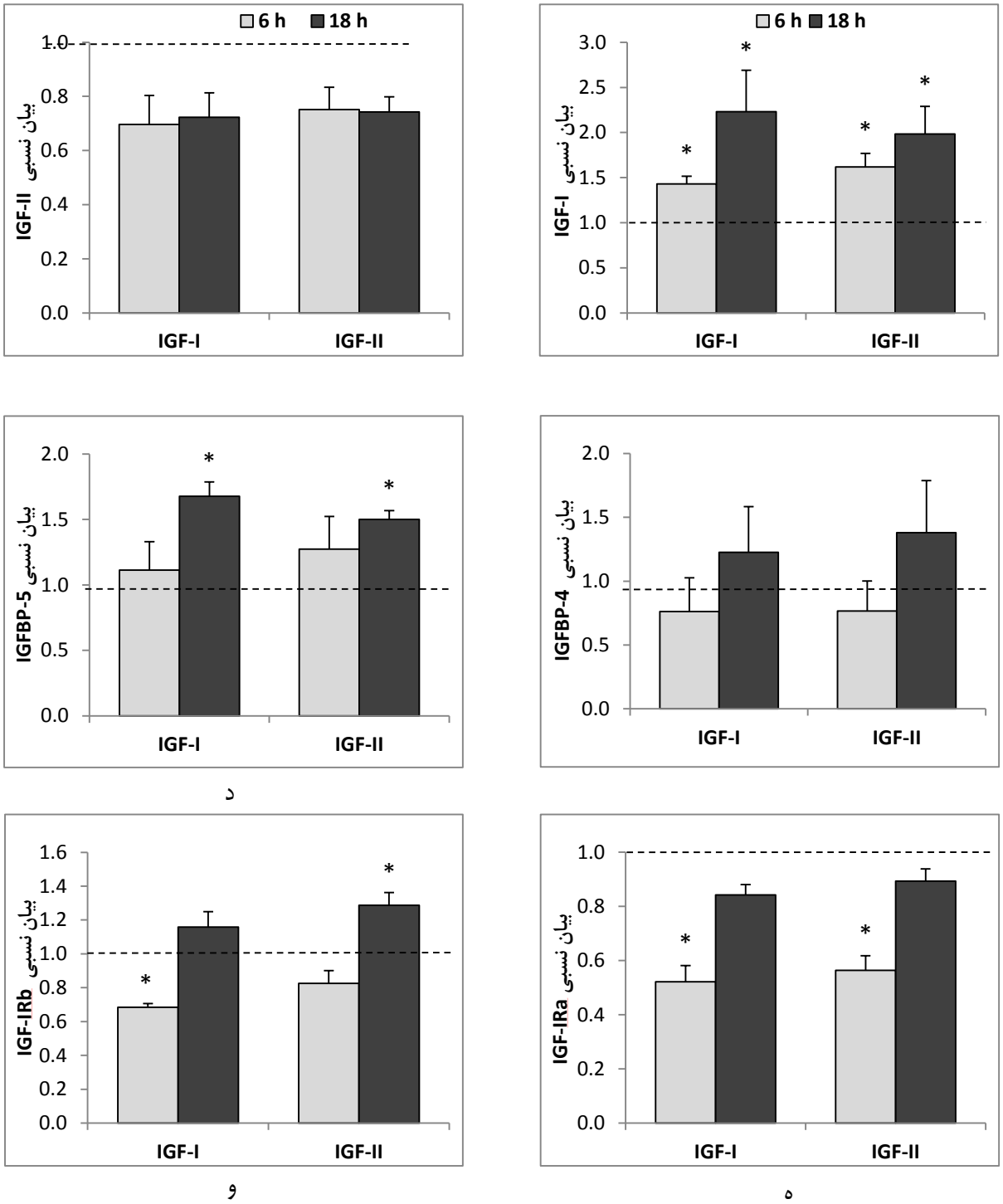
بیان هر یک از اعضای سیستم IGF در طول تکامل سلولهای کشت داده شده در دو وضعیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ابتدا روند بیان در گروه کنترل در طی ۸ روز کشت سلولها و سپس اثرات فقدان هر یک از دو اسید امینه به تنهایی مورد مطالعه قرار گرفت. روند بیان IGF-Iو IGF-II در گروه کنترل برعکس یکدیگر بود بدین شکل که بیان IGF-I پس از ۸ روز کاهش معنی داری را نشان داد در حالیکه این روند در مورد IGF-II با افزایش بیان در روز هشتم همراه بود (شکل۲) علاوه بر این بیان IGF-I کاهش معنی داری را در روز چهارم و هشتم در محیط کشت فاقد لایزین نشان داد که شکل بیان مشابه ای نیز در مورد IGF-II فقط در روز هشتم در محیط کشت مشابه دیده شد.

سطح mRNA ی هر دو IGFBP در گروه کنترل افزایش معنی داری را در روز هشتم کشت سلولها نشان داد در حالیکه هیچکدام از دو اسید امینه نتوانست تاثیر معنی داری را در شکل بیان این دو IGFBP ایجاد نماید (شکل ۲).

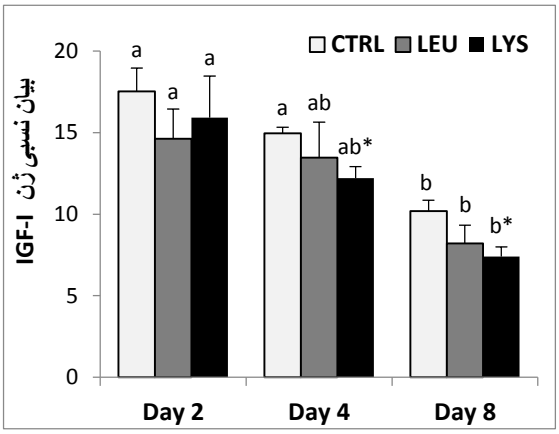
در خصوص گیرنده های IGF-I، هر دو ایزوفرم شکل کاهشی یکسانی را در بیانشان در طول دوره ی کشت سلولی نشان دادند که این روند در مورد IGF-IRa معنی دار بود (شکل ۲) همچنین فقدان اسید امینه لایزین در محیط کشت سلولها، توانست بیان IGF-IRb را در روز هشتم به طور معنی داری کاهش دهد.

۴. بحث و نتیجه گیری

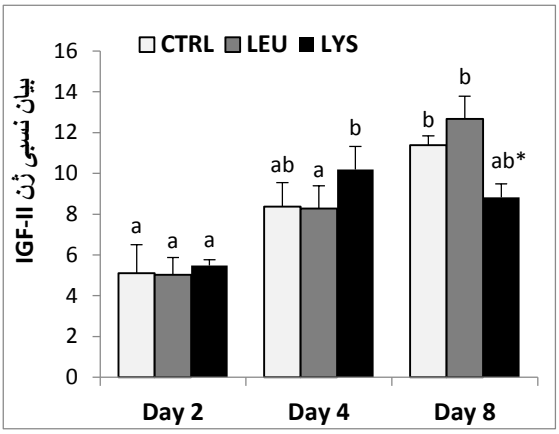
رشد عضله و تکامل بافتها در ماهیان استخوانی مانند پستانداران به وسیله محور هورمون رشد (GH) IGFs/تنظیم می گردد. GH، IGF-I و IGFII در این محور درگیر هستند که اثرات آنها به وسیله گیرنده های مرتبط و پروتئین های باند شونده تنظیم می شود (Fuentes *et al*., 2013; Planas, 2000). در مطالعه حاضر IGF I و IGF-II به تنهایی بیان IGF I را افزایش دادند که تاییدی بر نقش اتوکراین IGF I بوده و نهایتاً رشد را افزایش خواهد داد. Rius-Francino و همکارانش در سال (۲۰۱۱) گزارش نمودند IGF-II در تکثیر سلولی و تنظیمات رشد ماهی شانک سر طلایی در شرایط in vitro نقش مهمی دارد. Jiménez-Amilburu و همکارانش در سال ۲۰۱۳ آنها دریافتند که IGF-I به وسیله IGF-II، GH و یا در ترکیب با آنها (GH IGF I و GH+IGF-II) تحریک می شود. Bower & Johnston در سال (۲۰۱۰) دریافتند تحریک IGF I و IGF-II به همراه اسیدهای آمینه سطح بیان آنها را در کشت سلولی اولیه سلولهای عضله سالمون آتلانتیک افزایش می دهد ولی تحریکات هر یک به تنهایی اثری در بیان این دو فاکتور شبه رشد انسولین نشان نداد. همچنین در مطالعه ی مشابه دیگرسطح mRNAی، IGF-II پس از ۶ و ۱۸ ساعت تیمار سلولهای عضله ماهی شانک سر طلایی با IGF-II تغییر معنی داری نشان نداد (Jiménez-Amilburu *et al*., 2013). مطالعات دیگر نیز تایید می کند که IGF-I و IGF-II به طور متفاوتی با وضعیت تغذیه ای تنظیم می شوند و احتمالاً اثرات متفاوتی بر روی تحریک رشد عضله در طول شرایط آنابولیک دارند (Chauvigné *et al*., 2003; Peterson *et al*., 2004) همانطور که در مطالعه حاضر نیز دیده شد. بیان IGFBP-1 و IGFBP-2 در این مطالعه قابل اندازه گیری نبود و تغییر معنی داری نیز در بیان IGFBP-4 مشاهده نگردید و فقط بیان IGFBP-5 افزایش معنی داری را پس از انکوبه کردن سلولها با IGF ها نشان داد. در خصوص گیرنده ها، IGF-I بیان هر دو گیرنده (IGF-IRa و Rb) را کاهش داد که به نظر می رسد راهی برای کنترل پاسخ به هورمون باشد. جالب توجه است که هر دو گیرنده به نظر می رسد که نقش متفاوتی را در طول پروسه های عضله سازی در ماهی آزاد آتلانتیک بر عهده داشتند به این ترتیب که IGF-IRa بیشتر در طول مرحله تمایز و IGF-IRb در فاز تکثیر سلولی بیان می شوند (Bower & Johnston, 2010). از اینرو با توجه به نقش پیشنهاد شده IGF-II در تکثیر سلولی اثر آن در افزایش بیان IGF-IRb منطقی به نظر می رسد. پروفایل بیان IGF ها در گروه کنترل بر عکس یکدیگر بود. بدین شکل که بیان IGF-I کاهش و بیان IGF-II در طول دوره کشت افزایش نشان دادند.



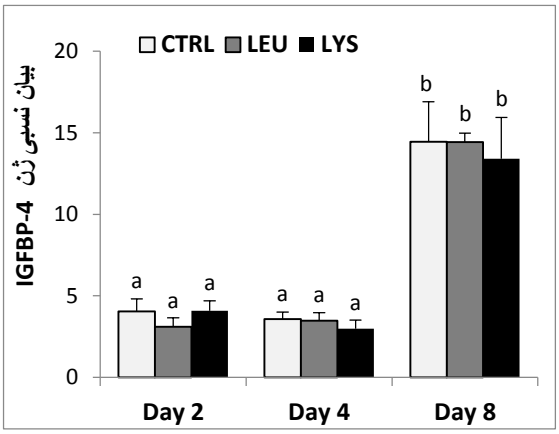
شکل ۱. اثرات IGF-I و IGF-II بر روی بیان ژنهای سیستم IGF در سلولهای عضله ی کشت داده شده ی ماهی شانک سر طلایی. بیان نسبی IGF-I (الف)، IGF-II (ب)، IGFBP-4 (ج)، IGFBP-5 (د)، IGF-IRa (ه) و IGF-IRb (و) بر اساس ژنهای رفرنس EF1α، RPL27 و RPS18 در مایوسیتها و در روز چهارم پس از ۶ و ۱۸ ساعت انکوبه نمودن آنها با IGF-I و IGF-II در غلظت نهایی ۱۰۰ nM نرمال گردید. ستاره ها اختلاف معنی دار را نسبت به گروه کنترل نشان می دهند (p<0.05).



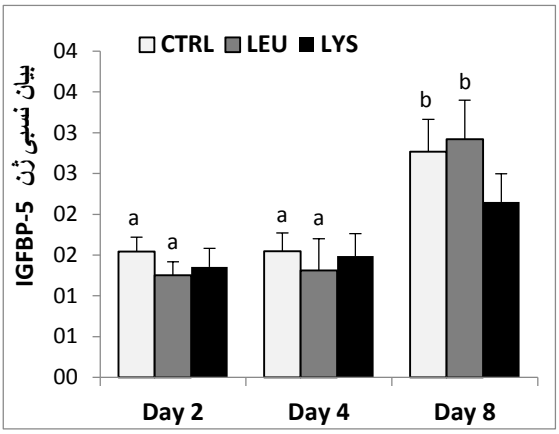
الف



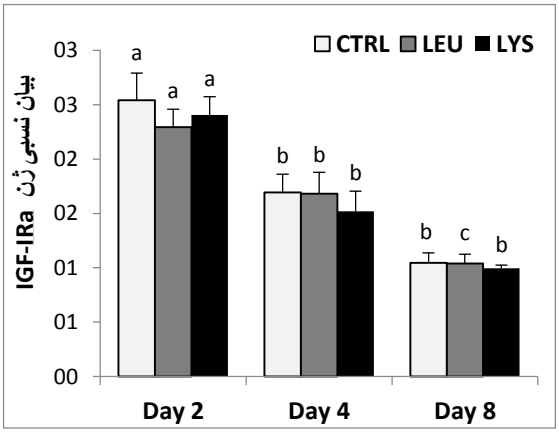
ب



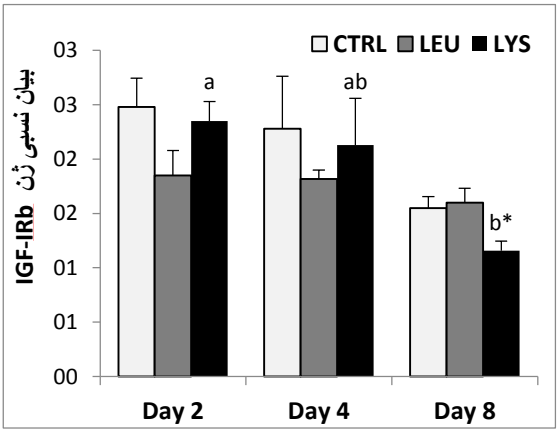
ج



د



ه



و

شکل ۲. اثرات محیط کشت فاقد لوسین و لایزین بر روی بیان ژنهای سیستم IGF در سلولهای عضله ی کشت داده شده ی ماهی شانک سر طلایی. بیان(الف) IGF-I، (ب) IGF-II، (ج) IGFBP-4، (دال) IGFBP-5، (ه) IGF-IRa و (و) IGF-IRb .بر اساس ژنهای رفرنس EF1α و RPS18 در مایوسیتها، در روزهای ۲، ۴ و ۸ پس از انکوبه نمودن آنها در محیط کشتهای کنترل، فاقد لوسین و فاقد لایزین نرمال گردید. ستاره ها اختلاف معنی دار را نسبت به گروه کنترل در هر زمان نشان می دهند ($p<0.05$). حروف مختلف تفاوت معنی دار را برای هر گروه در طول دوره نشان می دهد ($p<0.05$).

پروفایل یکسانی برای بیان IGF ها در گونه ی یکسان توسط Jiménez-Amilburu و همکارانش در سال ۲۰۱۳ گزارش شده بود که در آن سطح بیان IGF-I تا روز چهارم بالا بود و پس از آن تا روز دوازدهم کاهش نشان می داد. از طرف دیگر IGF-II دومین پیک را در روز دهم کشت نشان می داد که عملکرد متفاوت و مکمل هر دو فاکتور رشد را در طول عضله سازی تایید می کند.

پروفایل بیان گیرنده های IGF-I و پروتئین های باند شونده ی آنها در مایوسیتهای در حال رشد ماهی شانک سر طلایی مطالعه نشده است. در خصوص شکل بیان پروتئین های باند شونده، شکل بیان IGFBP-4 و IGFBP-5 در این مطالعه مشابه بود بدین ترتیب که در طول دوره تکامل سلولی افزایش معنی داری را نشان دادند. Bower & Johnston در سال (۲۰۱۰) نیز دریافتند که IGFBP-4 افزایش معنی داری را در طول رشد مایوسیتهای ماهی سالمون آتلانتیک با یک پیک در روز هشتم کشت نشان می دهد. همانگونه که در مدل این تحقیق نیز پیدا شد. در مطالعه اول نیز، زمانی که سلولها با IGF-IIتیمار شدند بیان IGFBP-5و نه IGFBP-4 در مایوسیتهای ماهی شانک سر طلایی افزایش یافت. این پاسخ می تواند توضیح دهد که چرا بیشترین سطح بیان IGFBP-5 در مطالعه حاضر با پیک بیان IGF-II در روز هشتم همراه و یکی شده است.

شکل بیان گیرنده های IGF-I مشابه با پروفایل بیان IGF-I بود که مخصوصاً بیان IGF-IRa در طول مدت کشت کاهش نشان داد. شکل بیان مشابه ای برای IGF-IR1b در تکامل مایوسیتهای ماهی سالمون آتلانتیک دیده شد. اگرچه بیان ایزوفرم های IGF-IR1a و IGF-IR2 افزایش واضحی را نشان دادند (Bower & Johnston, 2010). همانطوریکه مطالعات آزمایش اول نشان داد تیمار سلولهای عضله ماهی شانک سر طلایی با IGF-I کاهش بیان هر دو ایزوفرم گیرنده را باعث گردید در حالیکه IGF-II بیان IGF-IR1b را افزایش داد.

کاهش بیان IGF-I در روز چهارم و هشتم و کاهش بیان IGF-II و IGF-IRb در روز هشتم در محیط کشت فاقد لایزین، می تواند عملکرد سیستم IGF را در این سلولها با مشکلات جدی روبرو کند.

در ماهی اطلاعات در زمینه ی اثرات کمبود اسیدهای آمینه بر روی سیستم IGF بسیار ناچیز است و این تحقیق اولین مطالعه اثرات کمبود لوسین ولایزین را در سلولهای کشت داده شده ماهی بررسی می کند. اغلب مطالعات تا به امروز بر روی اثرات اضافه نمودن و یا کمبود اسیدهای آمینه در شرایط in vivo می باشد که اهمیت حفظ یک سطح مورد نیاز از اسیدهای آمینه مختلف را بسته به گونه برای متعادل نمودن رشد و سلامتی ماهی نشان می دهد (Deng *et al*., 2010; Van Nguyen *et al*., 2014; Yang *et al*., 2011). در هر حال اطلاعات در مورد مسیرها و مکانیسم هایی که این پروسه ها را هدایت می کنند بسیار ناچیز است. اخیراً گزارش شده است که سطح بیان IGF-I و نه IGF-IIدر کبد به صورت خطی با افزایش متیونین جیره در قزل آلای رنگین کمان افزایش می یابد (Rolland *et al*., 2015) و نظر مشابه ای با افزایش لایزین جیره در سالمون آتلانتیک پیدا شده است Hevrøy.(Hevrøy *et al*., 2007) و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ مشاهده نمودند که مصرف بالای لایزین باعث افزایش هفت برابری در بیان IGF-II عضله در سالمون آتلانتیک می شود. برعکس، کاهش مصرف لایزین افزایش پروتئین عضله را کاهش داده و به طور معنی داری بیان IGF-II عضله را کاهش می دهد. این یافته ها به همراه نتایج این تحقیق نشان می دهد که احتمالا لایزین یک تنظیم کننده آنابولیک موضعی تکامل بافت عضله ی ماهی شانک سر طلایی باشد.

ثابت شده است IGF-I و IGF-II در تکثیر و تمایز سلولی درگیر هستد و در نتیجه اثرات بیولوژیکی در رشد عضله دارند به طوریکه نقش IGF-I در تمایز سلولهای عضله و IGF-II به عنوان محرک قویتری در مرحله ی تکثیر سلولی به اثبات رسیده است (Jiménez-Amilburu *et al*., 2013; Rius-Francino *et al*., 2011; Seiliez *et al*., 2011). نکته ی مهمی دیگری را که می توان از این نتایج دریافت آن است که با کاهش معنی دار بیان IGF-I و IGF-II در سلولهای گرسنگی داده شده با لایزین اینطور به نظر می رسد که لایزین می تواند به عنوان یک اسید امینه مهم در طول تکامل سلولهای عضله مطرح باشد.

تمام این موارد اشاره بر آن دارد که احتمالاً پاسخ پروتئین های باند شونده و گیرنده های IGF-I به شرایط قویتر از تحریکات هر یک از دو اسید امینه که در مطالعه ما استفاده گردید (به عنوان مثال کشت سلولها برای مدت زمان بیشتر و یا همراهی برخی از عوامل دیگر مانند هورمونهای رشد شبه انسولین) نیاز دارد.

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات می توان نتیجه گرفت که هر یک از گیرنده ها به طور متفاوتی با IGFs تنظیم می گردند و به نظر می رسد IGF-IRb ترجیحاً مسئول سیگنال IGF-II در عضله ی این گونه باشد. بیان IGF-I و IGFBP-5 در پاسخ به هر دو IGF افزایش نشان داد که در واقع می تواند پاسخی برای افزایش در دسترس قرار دادن این هورمونها باشد. از طرف دیگر فقدان اسید امینه لایزین بر ترکیبات مهم سیستم IGF شامل: IGF-I، IGF-II و IGF-IRb اثر می گذارد. بنابراین در فرموله نمودن جیره ماهی شانک سر طلایی بهتر است نیازمندی به این اسید آمینه بخوبی گنجانده شود.

۵. تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از گروه فیزیولوژی و ایمنولوژی دانشکده ی بیولوژی دانشگاه بارسلونا به دلیل همکاری و حمایتهای بی دریغشان در طول دوره تحقیق تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از اعضاء محترم گروه شیلات دانشگاه تهران برای موافقت با انجام این پژوهش در دانشگاه بارسلونا صمیمانه قدردانی می شود.

References

Averous, J., Gabillard, J.C., Seiliez, I., Dardevet, D., 2012. Leucine limitation regulates myf5 and myoD expression and inhibits myoblast differentiation. *Experimental Cell Research*. 318, 217–27.

Beckman, B.R., 2011. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *General and Comparative Endocrinology* 170, 233–52.

Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010a. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and insulin-like growth factors during myogenesis in Atlantic salmon. *PLoS One* 5.

Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010b. Discovery and characterization of nutritionally regulated genes associated with muscle growth in Atlantic salmon. *Physiological Genomics* 42A, 114–30. doi:10.1152/physiolgenomics.00065.2010

Chauvigné, F., Gabillard, J.C., Weil, C., Rescan, P.Y., 2003. Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology* 132, 209–15.

Deng, D.-F., Dominy, W., Ju, Z.Y., Koshio, S., Murashige, R., Wilson, R.P., 2010. Dietary lysine requirement of juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*). *Aquaculture* 308, 44–48.

Duan, C., Clemmons, D.R., 1998. Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 273, 16836–42.

Duan, C., Ren, H., Gao, S., 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and Comparative Endocrinology* 167, 344–51.

FEAP, Annual Report., 2014. Http://WWW.feap.info/default.asp?SHORTCUT=617.

Gabillard, J.-C., Kamangar, B.B., Montserrat, N., 2006. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology* 191, 15–24.

Gabillard, J.-C., Weil, C., Rescan, P.-Y., Navarro, I., Gutiérrez, J., Le Bail, P.-Y., 2003. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 133, 233–42.

Gaylord, T.G., Barrows, F.T., 2009. Multiple amino acid supplementations to reduce dietary protein in plant-based rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, feeds. *Aquaculture* 287, 180–184.

Hevrøy, E.M., El-Mowafi, A., Taylor, R.G., Olsvik, P.A., Norberg, B., Espe, M., 2007. Lysine intake affects gene expression of anabolic hormones in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *General and Comparative Endocrinology* 152, 39–46. doi:10.1016/j.ygcen.2007.02.015

Jiao, S., Ren, H., Li, Y., Zhou, J., Duan, C., Lu, L., 2013. Differential regulation of IGF-I and IGF-II gene expression in skeletal muscle cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 373, 107–13. doi:10.1007/s11010-012-1479-4

Jiménez-Amilburu, V., Salmerón, C., Codina, M., Navarro, I., Capilla, E., Gutiérrez, J., 2013. Insulin-like growth factors effects on the expression of myogenic regulatory factors in gilthead sea bream muscle cells. *General and*

Comparative Endocrinology 188, 151–8. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.02.033

Johnston, I.A., Cole, N.J., Abercromby, M., Vierira, V.L.A., 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *Journal of Experimental Biology* 201, 623–646.

Kwasek, K., Terova, G., Wojno, M., Dabrowski, K., Wick, M., 2012. The effect of dietary dipeptide lysine–glycine on growth, muscle proteins, and intestine PepT1 gene expression in juvenile yellow perch. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 22, 797–812. doi:10.1007/s11160-012-9266-6

Montserrat, N., Gabillard, J.C., Capilla, E., Navarro, M.I., Gutiérrez, J., 2007a. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 150, 462–72. doi:10.1016/j.ygcen.2006.11.009

Montserrat, N., Gómez-Requeni, P., Bellini, G., Capilla, E., Pérez-Sánchez, J., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2007. Distinct role of insulin and IGF-I and its receptors in white skeletal muscle during the compensatory growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 267, 188–198.

Pérez-Sánchez, J., 2000. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A short review. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 135–144. doi:10.1023/A:1007816015345

Peterson, B.C., Waldbieser, G.C., Bilodeau, L., 2004. IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: *Molecular & Integrative Physiology* 139, 317–23. doi:10.1016/j.cbpb.2004.09.015

Reinecke, M., 2010. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. *Journal of Fish Biology* 76, 1233–54. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02605.x

Ren, H., Yin, P., Duan, C., 2008. IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *Journal of Cell Biology* 182, 979–91. doi:10.1083/jcb.200712110

Rius-Francino, M., Acerete, L., Jiménez-Amilburu, V., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2011. Differential effects on proliferation of GH and IGFs in sea bream (*Sparus aurata*) cultured myocytes. *General and Comparative Endocrinology* 172, 44–9.

Rolland, M., Dalsgaard, J., Holm, J., Gómez-Requeni, P., Skov, P. V, 2015. Dietary methionine level affects growth performance and hepatic gene expression of GH-IGF system and protein turnover regulators in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant protein-based diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 181, 33–41. doi:10.1016/j.cbpb.2014.11.009

Seiliez, I., Gabillard, J.-C., Riflade, M., Sadoul, B., Dias, K., Avérous, J., Tesseraud, S., Skiba, S., Panserat, S., 2012. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* 8, 364–75. doi:10.4161/auto.18863

Seiliez, I., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Polakof, S., 2011. Effect of acute and chronic insulin administrations on major factors involved in the control of muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 172, 363–70.

Van Nguyen, M., Rønnestad, I., Buttle, L., Van Lai, H., Espe, M., 2014. Imbalanced lysine to arginine ratios reduced performance in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed high plant protein diets. *Aquaculture* Nutrition 20, 25–35. doi:10.1111/anu.12043

Vélez, E.J., Lutfi, E., Jiménez-Amilburu, V., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2014. IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *General and Comparative Endocrinology* 205, 296–304. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.05.024

Yabu, T., Imamura, S., Mizusawa, N., Touhata, K., Yamashita, M., 2012. Induction of autophagy by amino acid starvation in fish cells. *Marine Biotechnology* (NY). 14, 491–501. doi: 10.1007/s10126-012-9432-9

Yang, S.-D., Liu, F.-G., Liou, C.-H., 2011. Assessment of dietary lysine requirement for silver perch (*Bidyanus bidyanus*) juveniles. *Aquaculture* 312, 102–108.