

# Stężenie insulinopodobnych czynników wzrostu IGF-I i IGF-II w surowicy źrebnych klaczy w okresie okołomplantacyjnym\*)

LESZEK KRAKOWSKI, ZYGMUNT WRONA,  
KRZYSZTOF KOSTRO\*, BARBARA ZDZISIŃSKA\*\*

Zakład Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,  
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

\*Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych

\*\*Zakład Wirusologii i Immunologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-003 Lublin

Krakowski L., Wrona Z., Kostro K., Zdzisińska B.

## Serum concentration of IGF-I and IGF-II in pregnant mares during a perimplant period

### Summary

In the reproduction of animals and humans, insulin-like factors (IGF-I, IGF-II) play a significant role. Among others, they stimulate growth of the ovarian follicle, embryo development, egg implantation and they inhibit cell apoptosis. In horses the implantation process and placenta development is partly regulated by IGF-I and IGF-II. Research was conducted on 18 mares during early pregnancy. The study has revealed the existence of some differences in the level of IGF-I and IGF-II. A significant increase of IGF-I in comparison to the preovulation period (311 ng/ml) was noted 12 h after ovulation (356 ng/ml), 72 h (328 ng/ml), 7 days (340 ng/ml) and at 35 (344 ng/ml) and at 55 (360 ng/ml) days of gestation. The concentration of IGF-II also increased but only at the 6<sup>th</sup> day after ovulation. The concentration of IGF-II before ovulation was 4.8 ng/ml and up until the 6 days after ovulation it ranged from 8.2 to 9.6 ng/ml. The differences in the levels of IGF-I and IGF-II before and after ovulation and during the pregnancy could result from the activation of an embryo genome and from the preparation of endometrium for implantation.

**Keywords:** mare, ovulation, embryo, IGF-I, IGF-II

Insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF-I i IGF-II; insulin-like growth factors) zaliczane są do peptydów o niskim ciężarze cząsteczkowym, promujących mitozę i różnicowanie w różnych typach komórek (5, 6). Wiążą się one ze specyficznymi receptorami (typu I i II) na powierzchni komórek docelowych oraz z całą rodziną białek wiążących (IGFBPs; insulin-like growth factor binding proteins), które również regulują działanie IGF w poszczególnych tkankach. W rozrodzie ludzi i zwierząt IGF-I i IGF-II odgrywają bardzo znaczącą rolę (11). Badania wykazały, że w *endometrium* macicy, jak i w nabłonku jajowodu występują receptory dla tych czynników, a ekspresja genów dla tych receptorów jest zależna od fazy cyklu rujowego. Wysoka koncentracja receptorów dla IGF-I i IGF-II w nabłonku jajowodu i gruczołów macicy sugeruje, że zadaniem IGF-I i IGF-II jest regulacja aktywności wydzielniczej błony śluzowej w celu zapewnienia korzystnego środowiska dla rozwoju embrionów (11). Doświadczenia z transferem zarodków dowiodły, że brak odpowiedniej synchronizacji środowiska dawcy ma-

cicy i biorcy ogranicza w dużym stopniu możliwość przeżycia zarodków.

U koni proces implantacji oraz tworzenie się łożyska regulowany jest także po części przez IGF-I i IGF-II. Badania Lennarda i wsp. (12) wykazały ekspresję genu dla IGF-II w zarodku, a potem w płodzie i łożysku pomiędzy 14. a 150. dniem ciąży.

Dowiedziano, że IGF-I i IGF-II działają mitogennie na wczesny zarodek, powodując intensywny jego wzrost (1, 5, 6, 18). Stwierdzono także, że ekspresja receptorów dla tych czynników zależy ściśle od stadium, w jakim zarodek się znajduje. Herrler i wsp. (7) w swych badaniach wykryli aktywność IGF-I i kilka innych białek wiążących IGF (BPs-3 binding protein) w przedimplantacyjnym zarodku końskim, a ściśle w jego błonie, płynie pęcherzykowym i kapsule oraz mRNA dla IGFBP-3. Wykazano, że IGFBP-3 jest bardzo ważnym czynnikiem dla prawidłowego rozwoju zarodkowego. Czynniki te wydzielany jest przez zarodek klaczy począwszy już od 10. dnia po zapłodnieniu. Jego działanie opiera się na stymulacji embrionu do syntezy IGF-I, który z kolei jest bezpośrednim stymulatorem i protektorem jego dalszego rozwoju (9).

\*) Badania wykonane w ramach projektu KBN nr 2PO6K 035 29.

Badania wykazały także, że IGF-I posiada również zdolność do wywołania śmierci komórkowej potencjalnie atakujących zarodek komórek układu odpornościowego (10). Stąd też oprócz bezpośredniego wpływu na rozwój embrionu końskiego, IGF-I i IGF-II są także czynnikami o działaniu immunoregulacyjnym. Dotychczas niewiele jest danych dotyczących kształtowania się poziomów IGF-I oraz IGF-II u klaczy w okresie rozwoju wczesnej ciąży.

Celem niniejszych badań było określenie surowiczego stężenia IGF-I i IGF-II u klaczy w okresie okołoinplantacyjnym w aspekcie wykorzystania ich w przyszłości jako wskaźników prawidłowości implantacji.

### Materiał i metody

Badaniem objęto 18 klaczy czystej krwi arabskiej i pełnej angielskiej w wieku 4-10 lat pochodzących ze Stada Ogierów i od hodowców indywidualnych. Masa ciała klaczy wahała się w granicach 400-500 kg, a warunki hodowlane i żywieniowe nie budziły zastrzeżeń. Całość badań przeprowadzono w okresie aktywności płciowej, tj. od kwietnia do końca czerwca.

Wybrane do badań klacze były klinicznie zdrowe i wykazywały regularne cykle rujowe, potwierdzone badaniem ultrasonograficznym (aparatury do USG Aloka SSD 500), przy użyciu sondy rektalnej o częstotliwości 5 MHz. Wszystkie klacze zostały poddane zabiegowi inseminacji nasieniem świeżym rozrzedzonym. Moment inseminacji określono badaniem USG i badaniem palpacyjnym jajników. Pierwsze badania w celu stwierdzenia ciąży wykonane były w 14. dniu po owulacji, a następnie w 21., 35. i 55. dniu.

Materiał do badań stanowiła krew, którą pobrano od klaczy z żyły szyjnej zewnętrznej do jałowych silikonowych probówek typu Vacuette 9 ml (Greiner Labortechnik GmbH, Austria), z przyspieszaczem wykrzepiania. Po odwirowaniu otrzymaną surowicę zlało do jałowych probówek typu Eppendorf 2 ml i zamrożono w temperaturze  $-74^{\circ}\text{C}$ . Krew do badań pobierana była o tej samej porze dnia, tj. o godzinie 7 rano w następujących przedziałach czasowych: tuż przed owulacją i pierwszą inseminacją (próbą - 0), następnie w 12., 24., 72., 96. h i w 6., 7., 10. dniu po owulacji oraz po stwierdzeniu ciąży w 14., 21., 35. i 55.

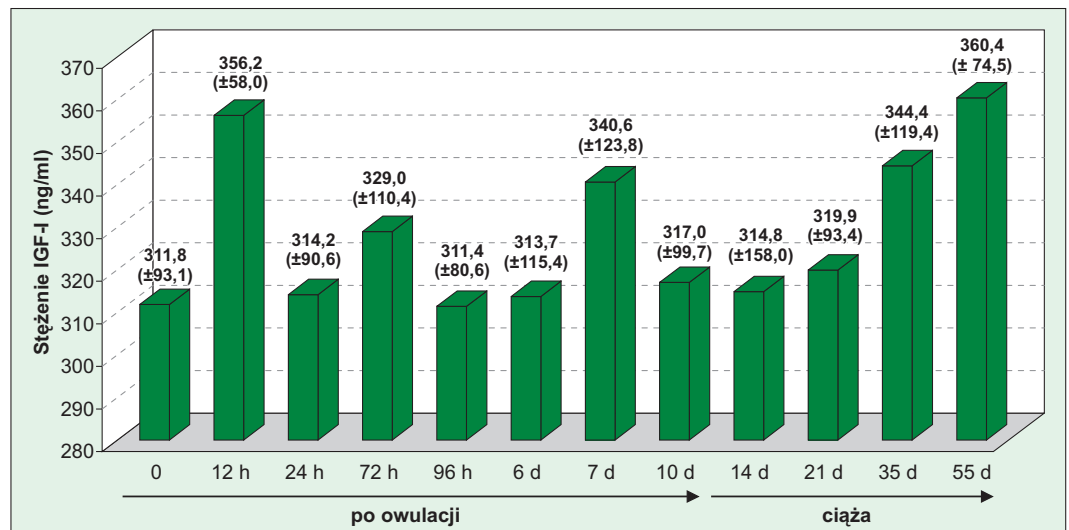
Czynniki IGF-I i IGF-II oznaczono metodą immunoradiometryczną (IRMA) używając gotowego zestawu – IGF-I i IGF-II; Non-extract-

tion IRMA DSL, firmy Diagnostic System Laboratories, Inc, USA. Oznaczenia wykonano zgodnie z załączoną procedurą.

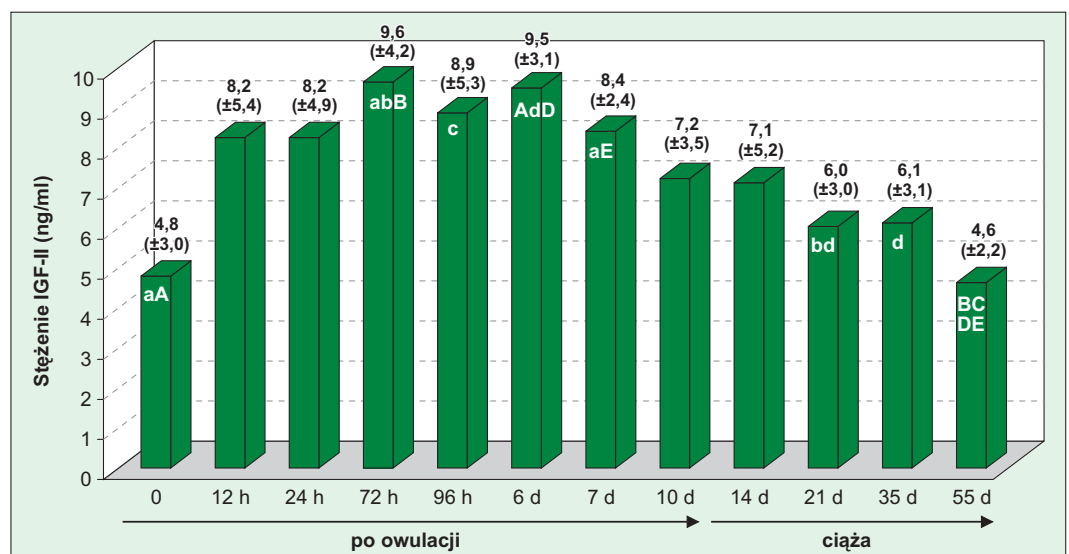
Wyniki badań poddano komputerowej analizie statystycznej testem t-Studenta, wyznaczając średnią ( $\bar{x}$ ), odchylenie standardowe ( $\pm$  SD) oraz istotność różnic na poziomie  $p \leq 0,01$  i  $p \leq 0,05$ .

### Wyniki i omówienie

Średnie wartości koncentracji IGF-I w surowicy badanych klaczy przedstawiono na ryc. 1. Wynika z nich, że w poszczególnych okresach pobrań istniały różnice w stężeniu IGF-I. Na krótko przed owulacją stężenie IGF-I wynosiło 311,8 ng/ml, natomiast w 55. dniu ciąży 360,3 ng/ml. Pierwszy wyraźny wzrost stężenia IGF-I zaobserwowano w 12. godzinie po owulacji, a następnie w 72. godzinie i 7. dniu. Jednak wzrost ten w porównaniu do stężenia przed owulacją nie był statystycznie istotny. Po stwierdzeniu ciąży w 14. dniu poziom IGF-I był porównywalny do stwierdzonego przed owulacją. Począwszy od 14. dnia ciąży obserwowano ponowny, choć statystycznie nieistotny, wyraźny wzrost czynnika IGF-I, który miał



Ryc. 1. Stężenie IGF-I w surowicy klaczy w okresie okołoinplantacyjnym (n = 18) ( $\bar{x} \pm$  SD)



Ryc. 2. Stężenie IGF-II w surowicy klaczy w okresie okołoinplantacyjnym (n = 18) ( $\bar{x} \pm$  SD).  
Objaśnienia: a, b, c, d – istotność różnic pomiędzy poszczególnymi okresami badań przy ( $p \leq 0,05$ ); A, B, C, D – przy ( $p \leq 0,01$ )

miejsce kolejno w 21., 35. i 55. dniu. Nieco inaczej kształtowała się koncentracja IGF-II (ryc. 2). Statystycznie istotny wzrost stężenia IGF-II w porównaniu do stężenia sprzed owulacji stwierdzono także w 12. godzinie po owulacji i wzrastał on z małymi wahaniami do 6. dnia. Natomiast począwszy od 7. dnia stężenie IGF-II stopniowo się obniżało i w 55. dniu ciąży zbliżyło się do stężenia, jakie stwierdzono przed owulacją.

Koncentracja IGF-I we krwi człowieka i zwierząt domowych jest relatywnie stała. Posiada on dość długi okres półtrwania i nie podlega rytmowi dziennemu (2). Liczni autorzy (2, 4, 8, 14, 15) podkreślają jednak, że na stężenie IGF-I we krwi ma wpływ dużo czynników, takich jak: płeć, wiek, masa ciała oraz żywienie. Badania Malinowskiego i wsp. (14) wykazały, że u koni najwyższe stężenie IGF-I notuje się u osobników młodych do 9. miesiąca życia, natomiast u klaczy starszych znacząco się ono obniża. Podobnym czynnikiem różnicującym jest płeć zwierzęcia, gdyż wyższe stężenia IGF-I notowano u ogierów niż u klaczy (2).

W ostatnich latach podkreśla się znaczącą rolę IGF-I i IGF-II w procesach rozrodczych u ludzi i zwierząt. Wiele uwagi poświęcono roli, jaką spełniają te czynniki we wczesnym rozwoju zarodkowym i utrzymaniu ciąży. W opinii wielu autorów wpływają one, między innymi, na szybki rozwój zarodka, hamują proces apoptozy zarodkowej oraz ułatwiają jego implantację (1, 7, 9, 12, 13, 16, 17, 19). Znaczenie obu czynników podkreśla fakt nazwania ich czynnikami przeżycia. Ponadto badania dowiodły, że czynnik IGF-I w znaczący sposób wpływa także na rozwój pęcherzyka jajnikowego i produkcję hormonów steroidowych (1, 3, 9).

Badania własne wykazały, że wzrost stężenia IGF-I i IGF-II przypadał na dość ważne dla rozwoju zarodka okresy. Można zatem domniemywać, że wzrost stężenia IGF-I obserwowany w 12., 72. godzinie i 7. dniu po owulacji mógł mieć związek z aktywacją genomu zarodka i przygotowaniem *endometrium* macicy do dalszego jego rozwoju. W tym ważnym okresie zarodek nabiera zdolności do pełnego kontaktu z otaczającym go środowiskiem jajowodu i macicy. Badania przeprowadzone *in vitro* przez Waltersa i wsp. (18) w sposób jednoznaczny potwierdzają korzystny wpływ czynnika IGF-I na wczesny rozwój embrionu klaczy. Do podobnych wniosków doszli Herrler i wsp. (7). Autorzy ci zauważyli, że zarodki przetrzymywane w płynie do hodowli z dodatkiem IGF-I rozwijały się lepiej i nie obserwowano u nich symptomów apoptozy, w przeciwieństwie do zarodków hodowanych bez dodatku tego czynnika. Ponowny wzrost poziomu IGF-I, który obserwowano w 21., 35. i 55. dniu ciąży, mógł być związany z przygotowaniem *endometrium* do implantacji. Po krótkiej wędrówce zarodka w macicy następuje jego zagnieżdżenie, które ma miejsce już 18. dnia, natomiast początek implantacji 35. dnia. Wynika z tego, że IGF-I jest czynnikiem o bardzo istotnym znaczeniu w procesie implantacji.

Analizując wzrost stężenia IGF-II, który następował do 6. dnia po owulacji, można przypuszczać, że wzrost ten mógł być związany, podobnie jak w przypadku IGF-I, z rozwojem zarodka i zmianami w *endometrium* macicy. Z danych piśmiennictwa wynika, że oddziaływanie i wzrost zawartości obu czynników w okresie embrioge-

nezy jest podporządkowany działaniu estrogenów (1, 9, 12, 17, 18). Pod wpływem tych hormonów blastocysta generuje uwalnianie IGF-I i IGF-II, które w sposób autokryny przyczyniają się do prawidłowego wzrostu zarodka.

Do uzyskanych wyników należy podejść z pewną rezerwą, gdyż jest zbyt mało danych dotyczących kształtowania się surowiczego stężenia IGF-I i IGF-II u klaczy w okresie wczesnej ciąży. Brakuje także danych referencyjnych u koni, ponieważ liczne laboratoria na świecie uzyskiwały zróżnicowane wyniki, używając różnych metod badawczych. W związku z tym interpretacja uzyskanych wyników staje się trudna. Na standaryzację uzyskanych wyników oraz dokładnego określenia roli czynników wzrostu w rozrodzie zwierząt może pozwolić kontynuacja tego rodzaju badań.

## Piśmiennictwo

1. Carneiro G., Lorenzo P., Pimentel C., Pegoraro L., Bertolini M., Ball B., Anderson G., Liu I.: Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol. Reprod.* 2001, 56, 889-905.
2. Champion Z. J., Breier B. H., Ewen W. E., Tobin T. T., Casey P. J.: Blood plasma concentration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in resting standardbred horses. *Vet. J.* 2002, 163, 45-50.
3. Davidson T. R., Chamberlain C. S., Bridges S., Spicer L. J.: Effect of follicle size on in vitro production of steroids and insulin-like growth factor (IGF-I), IGF-II, and the IGF-binding proteins by equine ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 1640-1648.
4. Deichsel K., Aurich J., Parvizi N., Bruckmaier R. M., Aurich C.: LH and IGF-I release during oestrus and early luteal phase in lactating and non-lactating horse mares. *Anim. Reprod. Sci.* 2006, 91, 97-106.
5. Fabian D., Ilkova G., Reháč P., Čížková S., Baran V., Koppel J.: Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 2004, 61, 745-755.
6. Fabian D., Koppel J., Maddox-Hyttel P.: Apoptosis processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 2005, 64, 221-231.
7. Herrler A., Krusche C. A., Beier H. M.: Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 1998, 59, 1302-1310.
8. Hess-Dudan F., Vacher P. Y., Bruckmaier R. M., Weishaupt M. A., Burger D., Blum J. W.: Immunoreactive insulin-like growth factor I and insulin in blood plasma and milk of mares and in blood plasma of foals. *Equine Vet. J.* 1994, 26, 134-139.
9. Hul K. L., Harvey S.: Growth hormone: role in female reproduction. *J. Endocrinol.* 2001, 168, 1-23.
10. Kooijman R.: Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine* 2006, 17, 305-323.
11. Kurpisz M.: Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. *Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań* 2002, s. 152.
12. Lennard S. N., Stewart F., Allen W. R.: Insulin-like growth factor II gene expression in the fetus and placenta of the horse during the first half of gestation. *J. Reprod. Fertil.* 1995, 103, 169-179.
13. Letcher R., Simmen R. C., Bazer F. W., Simmen F. A.: Insulin-like growth factor-I expression during early conceptus development in the pig. *Biol. Reprod.* 1989, 41, 1143-1151.
14. Malinowski K., Christensen R. A., Hafis H. D., Scanes C. G.: Age and breed differences in thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF binding proteins in female horses. *J. Anim. Sci.* 1996, 74, 1936-1942.
15. Ozawa A., Inokuma H., Johke T.: The relationship between plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) level and body weight in the horse. *J. Vet. Med. Sci.* 1995, 57, 1105-1107.
16. Popot M. A., Bobin S., Bonnaire Y., Delahaut P. H., Closset J.: IGF-I plasma concentrations in non-treated horses and horses administered with methionyl equine somatotropin. *Res. Vet. Sci.* 2001, 71, 167-173.
17. Schäfer-Somi: Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 2003, 75, 73-94.
18. Walters K. W., Roser J. F., Anderson G. B.: Maternal-conceptus signalling during early pregnancy in mares: oestrogen and insulin-like growth factor I. *Reprod.* 2001, 121, 331-338.
19. Yimaz A., Davis M. E., Simmen R. C. M.: Analysis of female reproductive traits in Angus beef divergently selected for blood serum insulin-like growth factor I concentration. *Theriogenology* 2006, 65, 1180-1190.

Adres autora: dr hab. Leszek Krakowski, prof. nadzw. AR, ul. Królowej Jadwigi 6/28, 20-282 Lublin; e-mail: Leszek.Krakowski@ar.lublin.pl