

## ИЗПИТВАНЕ НА РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ ВЪРХУ МОРФО - ФУНКЦИОНАЛНОТО СЪСТОЯНИЕ НА ПОЛОВИТЕ ГАМЕТИ ПРИ *IN VITRO* СЪХРАНЕНИЕ

ТАНЯ ТОДОРОВА, ЯНЧО ТОДОРОВ  
Институт по животновъдни науки - Костинброд

През последните десетилетия бяха разработени успешни методи за получаване на ембриони *in vitro*. Въпреки всички модификации при средите и условията за култивиране развитието до бластоцист се движи около 45%. Това се дължи главно на отпадането на голяма част от ембрионите поради блокиране на развитието им в ранните ембрионални стадии. Това налага подобрения в средите за култивиране.

Доказано е, че растежните фактори играят регулаторна роля във функционирането на яйчника (**Echternkamp et al.**, 1994) и матката оказвайки трофичен ефект върху ендометриума и ембрионите. Insulin-like growth factor I (IGF-I) е важен растежен фактор в кръвта и е особено важен за взаимодействието между ендометриума и плода (**Simmen et al.**, 1992, **Velazquez et al.**, 2012). Различни автори посочват, че добавянето на растежни фактори към средите за култивиране стимулират развитието на говежди ембриони *in vitro* (**Larson et al.**, 1992). Изследвания на **Armstrong and Xia** (1993) показват, че IGF-I индуцира митоза в гранулозните клетки, матurationта на ооцитите (**Lorenzo et al.**, 1994) и ембрионалното развитие (**Kaye et al.**, 1992). Insulin-like growth factors (IGFs) имат висок афинитет към разтворимите, свързващи протеини, които могат да регулират свързването към рецепторите и следователно могат да влияят върху биологичната активност на IGFs.

Целта на нашите изследвания бе да се изследва ефектът от добавянето на различни концентрации IGF-I към средата за култивиране върху развитието на *in vitro* матурирани и оплодени (IVM/IVF) ооцити с използване на серум от крави в еструс. развитието на ембрионите бе сравнено с развитието на ембриони, култивирани в среда без протеини за да се отчете ефектът от добавката на серим и IGF-I. Добавянето на IGF-I в TCM 199 без серум и гранулозни клетки бе извършено, за да се отчете дали IGF-I действа синергично с естралния серум и директно върху ембрионите или чрез гранулозните клетки.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

**Получаване на ооцити, матuration, оплождане и култивиране.** Ооцитите бяха аспирирани от фоликули с размер 2-8 mm в диаметър. За матuration ооцитите бяха култивирани в TCM 199, обогатен с L-глута-

мин, NaHCO<sub>3</sub>, Hepes, FSH, и 10% естрален серум. По 30 кумулозно - ооцитни комплекси бяха култивирани в продължение на 20 h при 39°C, и 5% CO<sub>2</sub>:95% въздух. При всички оплождания бе използвана замразена семенна течност от един бик. Мотилните сперматозоиди бяха отделени чрез модифицирана swim-up техника в TLS (Tyrode's lactate solution), обогатен с BSA, содиум пируват и гентамицин. Супернатантата бе отстранена и пелетът ресуспендиран в 100 µl от същата среда. Бе определена концентрацията и сперматозоидите бяха разредени до крайна концентрация от 1.0 x 10<sup>6</sup> сперматозоиди в милилитър. След матurationта ооцитите бяха прехвърлени в FTM (fert-Talp medium), обогатен с 6 mg BSA ml и 10 µg хепарин на милилитър. *In vitro* оплождането бе проведено в продължение на 20-24 h при 39°C в атмосфера от 5% CO<sub>2</sub>:95% въздух. След оплождането кумулозните клетки бяха отстранени и по 30 денудирани ооцити бяха поставени в среда TCM 199 с 0.8-1.2 x 10<sup>6</sup> гранулозни клетки на милилитър и култивирани в продължение на 3 - 12 дни в атмосфера от 5% CO<sub>2</sub> във въздух при 39°C. Ембрионите бяха изследвани на 2-, 3-, 7-, 9- и 12 - ия ден след оплождането, за да се провери степента на делене (2 - ри ден), степента на развитие (7 - ми ден) и бластоцисти (9 - и 12 - ти ден). При всички експерименти ефектът от култивирането върху ранното развитие бе преценен чрез определяне броя на бластомерите на 3 - ия ден. Зона пелуцида на ембрионите бе отстранена чрез третиране с PBS при pH 2.5 за 40—60 s. Бластомерите бяха дисоциирани чрез третиране с 0.25% трипсин в PBS за 10 min и преброени. развитието на ембрионите бе преценено чрез пропорцията на морули и бластоцисти на 7 – ия ден, бластулацията на 9 – ия ден и излюпването на бластоцистите - на 12 – ия ден.

**Първи експеримент.** Зиготите бяха култивирани в TCM 199 плюс 10% (ECS), съдържащ 348 ng ендогенен IGF-I ml<sup>-1</sup> (34.8 ng ml<sup>-1</sup> в култивационните капки) или в TCM 199 без ECS в продължение на 3-12 дни. За преценяване на способността за развитие на ембрионите, 385 зиготи бяха култивирани в продължение на 12 дни с 10% ECS и 267 без ECS при седем повторения.

**Втори експеримент.** При него ооцитите бяха селектирани за IVM/IVF. След оплождането зиготите бяха култивирани в TCM 199 с добавка на 10% ECS, съдържащ както в експеримент 1, 34.8 ng ендогенен IGF-I ml<sup>-1</sup>

с добавен 10 ng човешки рекомбинантен IGF-I ml<sup>-1</sup>, или без добавка на IGF-I. Така общата концентрация на IGF-I беше 44.8 ng ml<sup>-1</sup> и 34.8 ng ml<sup>-1</sup> съответно. Броят на blastomeres на 3 – ия ден бе определен чрез изследване на ооцитите от опитната и от контролната група. Останалите ооцити бяха култивирани в продължение на 12 дни и бе определена степента на развитие. Бяха направени седем повторения.

**Трети експеримент.** Рекомбинантен IGF-I бе добавен в концентрации от 50 и 100 ng ml<sup>-1</sup> в TCM 199, съдържащ 10% ECS (34.8 ng ендogenous IGF-I ml<sup>-1</sup> в капките за култивиране), даващ крайни концентрации от 84.8 и 134.8 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>, съответно. Както при първия експеримент, тези две групи бяха сравнени с ембрионите, култивирани в TCM 199 с добавка на 10% ECS, но без рекомбинантен IGF-I. За определяне на ранното ембрионално развитие групи от ооцити бяха оставени да се развият до ембриони за определяне на броя на blastomeres на ден 3. Останалите ооцити бяха използвани за определяне на развитието до 12 – ия ден. Бяха направени седем повторения.

**Четвърти експеримент.** След оплождането на селектираните ооцити зиготите бяха разделени на случаен принцип в четири групи в зависимост от добавките към TCM199: 10% ECS плюс 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> : без гранулозни клетки (GC) (IGF-I + ECS), 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> плюс 50x10<sup>3</sup> гранулозни клетки, но без ECS (IGF-I + GC), IGF-I без ECS или GC (IGF-I) и 10% ECS плюс GC, но без IGF-I (контрол). Бяха направени пет повторения.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данни за средния процент ембриони, развити до различни стадии при култивиране в TCM 199, обогатен 10% ECS са показани в табл. 1. Нямаше достоверни разлики в степента на развитие на 2 - и 7 - ия ден. Естралният серум имаше достоверен ефект върху броя на blastocysts на 9 - ия ден и излюпените blastocysts на 12 - ия ден съответно.

**Втори експеримент - ефект от среда, обогатена с 10 ng рекомбинантен IGF-I ml<sup>-1</sup>.** Имаше достоверни разлики в степента на делене между групата, третирана с допълнителни 10 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> и контролната група ( $P < 0.05$ ; табл. 2). Между групите на 7 - ия (морула и blastocyst), 9 - ия (blastocyst) или 12 – ия ден (излюпване на blastocysts) нямаше достоверни разлики.

**Трети експеримент - ефект от добавянето на 50 и 100 ng рекомбинантен IGF-I ml<sup>-1</sup>.** Нямаше достоверни разлики в степента на делене на 2 - ия ден (табл. 3) или в пропорциите на blastomeres (2-4, 5-8 и > 8-клетъчни ембриони) на 3 - ия ден между групите с добавени 0, 50 или 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>.

При добавянето на 50 или 100 ng IGF-I към средата за култивиране, степента на формиране на морула и

blastocyst на 7 – ия и 9 - ия ден беше по - висока в сравнение с контролната група култивирана без IGF-I (табл. 3). Подобно на това, когато зиготите бяха култивирани в среда, съдържаща 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>, процентът на излюпените blastocysts на 12- ия ден бе значително по - висок ( $P > 0.01$ ) в сравнение с контролната група.

Пропорцията на ооцитите, достигнали стадий морула и blastocyst на 7 - ия ден не бе различна при ембрионите, култивирани с 50 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> и тези култивирани без добавка на IGF-I. Добавянето на 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> доведе до по - голяма разлика в пропорциите на blastocysts в сравнение с контролната група и в тази група имаше значително повече ранни ( $P < 0.01$ ) и експандирани blastocysts ( $P < 0.05$ ). Спирането на развитието на blastocysts на 9 – ия ден намалаше при добавянето на 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> в средата за култивиране в сравнение с контролната група. Добавянето на 50 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> нямаше достоверен ефект. Добавянето на 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> доведе до по - нисък брой blastocysts в сравнение с контролната група и с групата с добавени 50 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>. Тези разлики не бяха достоверни ( $P < 0.05$ ).

**Четвърти експеримент - ефект на добавянето на 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> едновременно с гранулозни клетки и естрален серум.** На 2 - ия ден от развитието нямаше разлика в степента на делене между четирите групи (табл. 4). На 7 – ия ден групата, култивирана с добавка на IGF-I и ECS, но без гранулозни клетки не се различаваше от контролната група. Обаче групите, култивирани с IGF-I, но без ECS, или без ECS и гранулозни клетки имаха значително по - малко морули и blastocysts на 7 – ия ден и по - малко blastocysts на 9 – ия и 12 – ия ден ( $P < 0.01$ ). На 9 – ия и 12 - ия ден броят на blastocysts и излюпените blastocysts след култивиране в присъствие на ECS плюс IGF-I и само с IGF-I бе значително по - нисък в сравнение с контролната група ( $P < 0.05$ ). При групите, култивирани в присъствие на IGF-I и гранулозни клетки и само с IGF-I, нямаше достоверни разлики при ембрионалното развитие.

Резултатите от тези експерименти доказват, че *in vitro* развитието на ембрионите се подобрява в присъствие на висока концентрация IGF-I с добавка на естрален серум и гранулозни клетки. Добавянето на 10 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> към TCM 199, съдържащ 10% естрален серум, оказва позитивен ефект върху деленето на ембрионите ( $P < 0.05$ ). Разликата в степента на делене, изразена в броя blastomeres (на 3 - ия ден) се наблюдаваше един ден по - късно. Освен това добавянето на 50 или 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> не влияеше върху ранното ембрионално развитие. Тези резултати потвърждават наблюденията на други автори при говежди ембриони (Barnes and First, 1991; Sakagami et al., 2012), но са в конфликт с резултати, получени при мишки. Резултати на други автори, установени при говежди ембриони доказват, че IGF-I няма

Таблица 1. Ефект от добавка на 10% ECS върху степента на развитие на ембрионите  
Table 1. Effect of addition of 10% ECS on the development of embryos

| Серум, %<br>Serum | Ооцити<br>Oocytes <i>n</i> | Разделени<br>ембриони<br>Divided embryos<br>(2 -ри ден) | Морули/<br>Бластоцисти<br>Morula/<br>Blastocyst<br>(7 - ми ден) | Бластоцисти<br>Blastocyst<br>(9 - ти ден) | Излюпени<br>бластоцисти<br>Hatched<br>blastocyst<br>(12 - ти ден) |
|-------------------|----------------------------|---|---|---|---|
| 0                 | 385                        | 79.5%   | 34.2%   | 17.0%                                     | 6.9%  |
| 10                | 267                        | 80.4%   | 38.4%   | 29.0%                                     | 21.5%   |

\* Стойностите в колоните са различни ( $P < 0.01$ )

Таблица 2. Ефект от добавянето на инсулиноподобен растежен фактор I (10 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>) върху степента на развитие на ембрионите

| IGF-I<br>(ng ml <sup>-1</sup> ) | Ооцити<br>Oocytes <i>n</i> | Разделени<br>ембриони<br>Divided embryos<br>(2 -ри ден) | Морули/<br>Бластоцисти<br>Morula/<br>Blastocyst<br>(7 - ми ден) | Бластоцисти<br>Blastocyst<br>(9 - ти ден) | Излюпени<br>бластоцисти<br>Hatched<br>blastocyst<br>(12 - ти ден) |
|---------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|
| 0                               | 234                        | 77.0%   | 37.7%   | 28.9%                                     | 21.0%   |
| 10                              | 285                        | 81.7%   | 37.1%   | 28.4%                                     | 20.8%   |

\* Стойностите в колоните са различни ( $P < 0.05$ )

Таблица 3. Ефект от добавянето на инсулиноподобен растежен фактор I (50 и 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>) върху степента на развитие на ембрионите

| IGF-I<br>(ng ml <sup>-1</sup> ) | Ооцити<br>Oocytes <i>n</i> | Разделени<br>ембриони<br>Divided embryos<br>(2 -ри ден) | Морули/<br>Бластоцисти<br>Morula/<br>Blastocyst<br>(7 - ми ден) | Бластоцисти<br>Blastocyst<br>(9 - ти ден) | Излюпени<br>бластоцисти<br>Hatched<br>blastocyst<br>(12 - ти ден) |
|---------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|
| 0                               | 216                        | 80.1%   | 32.0% a   | 28.0% ac                                  | 21.2% c   |
| 50                              | 254                        | 80.7%   | 36.5%   | 34.5% b                                   | 25.1% a   |
| 100                             | 263                        | 79.3%   | 40.9% d   | 38.2% c                                   | 32.1% bd  |

Стойностите в колоните с различни означения се различават достоверно: ab  $P < 0.05$ ; c,d  $P < 0.01$ .

ефект върху IVM/IVF/IVC ембриони по време на активирането на ембрионалния геном (Barnes and First, 1991). В съгласие с тези факти контролната среда, която не съдържа нито IGF-I нито серум поддържа ранното ембрионално развитие в степен, подобна на тази, наблюдавана при обогатените среди. Докато 10 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> не подобряват развитието на ембрионите, добавянето на 50 и 100 ng ml<sup>-1</sup> увеличи броя на бластоцистите на 7 - ия ден. Тези резултати отговарят на резултати,

получени при мишки от Harvey and Kaye (1992), но са в конфликт с резултати от изследвания, при които не е наблюдаван позитивен ефект при ембриони от говеда на 7 - ия ден след оплождането и при добавяне на IGF-I в концентрация от 50 ng ml<sup>-1</sup> (Herrler et al, 1993). По - ниските резултати на тези автори може би се дължат на по - ниската концентрация на LH в средата за матурация, което води до по - лоши резултати при по - нагаташното развитие (Herrler et al., 1993).

Таблица 4. Ефект от добавянето на гранулозни клетки (GC), естрален серум (ECS) и инсулиноподобен растежен фактор I (100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>) върху степента на развитие на ембрионитеTable 4. The effect of addition of granulosa cells (GC), oestrus cow serum (ECS) and insulin-like growth factor I (100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>) on the development of the embryos

| Група<br>Groups          | Ооцити<br>Oocytes <i>n</i> | Разделени<br>ембриони<br>Divided embryos<br>(2 -ри ден) | Морули/<br>Бластоцисти<br>Morula/ Blastocyst<br>(7 - ми ден) | Бластоцисти<br>Blastocyst<br>(9 - ти ден) | Излюпени<br>бластоцисти<br>Hatched<br>blastocyst<br>(12 - ти ден) |
|--------------------------|----------------------------|---|--|---|---|
| Е С S + G C<br>(контрол) | 137                        | 79.5%   | 35.9% c  | 32.5% a,c                                 | 30.3% a,c   |
| ECS+ IGF-I               | 212                        | 79.6%   | 30.2% c  | 25.5% b'c                                 | 23.8% b   |
| GC+IGF-I                 | 288                        | 79.6%   | 19.6% d  | 12.1% d                                   | 7.2% d  |
| IGF-I                    | 257                        | 79.6%   | 16.1% d  | 8.6% d                                    | 5.0% d  |

Стойностите в колоните с различни означения се различават достоверно: a:b  $P < 0.05$ ; c:d  $P < 0.01$ .

Резултатите от нашите експерименти доказват, че има зависимост между дозата на IGF-I и ембрионалното развитие, след като средата, съдържаща 50 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> доведе до по - нисък процент излюпени бластоцисти на 9 - ия ден в сравнение със средата, съдържаща 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>. Резултатите, получени със 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> са подобни на тези, получени от **Matsui et al.** (1997), но се различават от тези на **Lee and Fukui** (1995), които използват среда без добавка на серум или друг източник на протеини. При третия експеримент ембрионалното развитие в TCM 199 плюс гранулозни клетки бе сравнено с това при TCM 199 плюс гранулозни клетки и с добавен 10% ECS, съдържащ 34.8 ng ендогенен IGF-I ml<sup>-1</sup> и бяха открити значителни разлики до 7 - ия ден включително. При първия и четвъртия експеримент пропорцията на излюпените бластоцисти на 9 - ия и 12 - ия ден бе значително по - ниска при средата, съдържаща гранулозни клетки и 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>. TCM 199 с гранулозни клетки стимулираше развитието до 7 - ия ден, но след това развитието се влошаваше. Гранулозните клетки в TCM 199 без добавка на ECS не образуваха монослой, в сравнение с контролната група с добавен серум. Дали TCM 199 без добавка на серум директно влияеше върху развитието на ембрионите или посредством гранулозните клетки не бе изследвано при тези експерименти. Ембрионалното развитие бе значително по - слабо при среда с добавка само на IGF-I. Тези резултати поткрепят твърдението на някои автори, че между ECS, IGF-I и гранулозните клетки има взаимодействие при *in vitro* развитието на IVM/IVF ембриони (**Thibodeaux et al.**, 1995; **Block et al.**, 2011). Освен това нашите резултати предполагат, че IGF-I влияе върху развитието на ембрионите посредством гранулозните клетки и, че добавката на растежни фактори може да подпомага развитието на ембрионите при липса на серум, но не може да го замести. Големият брой ембриони в средата за култивиране

води до по - добри резултати между преимплантационните ембриони, дължащи се на паракринни фактори, екскретирани от самите ембриони. Резултатите, получени при тези изследвания водят до извода, че високи концентрации на екзогенен IGF-I, добавен към средата за култивиране в присъствието на гранулозни клетки, серум и ендогенен IGF-I ускоряват развитието на ембрионите. Механизмът, чрез който IGF-I оказва митогенен и диференциращ ефект върху *in vitro* култивираните ембриони не е известен. При тези условия за култивиране прилагането на IGF-I във високи концентрации няма негативен ефект, а по - скоро подобрява развитието на ембрионите за сравнително дълъг период от време .

## ЛИТЕРАТУРА

- Armstrong, D. T and Xia**, 1993. Differential mitogenic actions of insulin-like growth factor-I and FSH on bovine cumulus cells and granulosa cells, *Theriogenology*, 39 181 (Abstract).
- Barnes, F.L. and First N. L.**, 1991. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos *Molecular, Reproduction and Development* 29 117-123.
- Block, J., Hansen P. J., Loureiro B., Bonilla L.**, 2011. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*. Dec; 76 (9):1602-9.
- Echternkamp, S. E., H. J. Howard, A. J. Roberts, J. Grizzle, T. Wise**, 1994. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol. Reprod.*, 51:971-981.
- Kaye, P. L, Bell K. L, Beebe L. F, Dungleison G. F, Gardner H. G , Harvey M.B.**, 1992. Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reproduction Fertility and Development* 4, 373-386.

6. **Larson, R. C, Ignatz G. G and Currie W. B.**, 1992. Transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle, *Molecular Reproduction and Development* **33** 432-435.
7. **Lorenzo, P. L., Illera, M. J., Illera, J. C.**, 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I. *J. Reprod. Fertil.*, v.101, p 697-701.
8. **Lee, E. S. Fukui, Y.**, 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 44, p. 71-83.
9. **Matsui, M., Takahashi Y., Hishinuma M., Kanagawa H.**, 1997. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I. IGF-I is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 48, 605–616.
10. **Harvey M. B., Kaye P. L.**, 1992a. Mediation of the actions of insulin and insulin-like growth factor-1 on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 33 270–275.
11. **Harvey M. B., Kaye P. L.**, 1992b. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 31 195–199.
12. **Herrler, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H.**, 1993. Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.37, p. 1213-1224.
13. **Simmen, F. A., Simmen R. C. M., Geisert R. D., Martinat-Botte F., Bazer F.W. & Terqui M.**, 1992. Differential expression, during the estrous cycle and pre- and postimplantation conceptus development, of messenger ribonucleic acids encoding components of the pig uterine insulin-like growth factor system. *Endocrinology*, 130 1547–1556.
14. **Thibodeaux, J. K., Myers M. W., Prough S. G., White K.L.**, 1995. Effect of serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 44 423–432
15. **Velazquez, M. A., Haderl K. G., Herrmann D., Kues W. A., Remy B., Beckers J. F., Niemann H.**, 2012. *In vivo* oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of *in vitro*-formed bovine blastocysts. *Theriogenology* Aug;78(3):517-27.
16. **Sakagami, N., Umeki H., Nishino O., Uchiyama H., Ichikawa K., Takeshita K., Kaneko E., Akiyama K., Kobayashi S., Tamada H.**, 2012. Normal calves produced after transfer of embryos cultured in a chemically defined medium supplemented with epidermal growth factor and insulin-like growth factor I following ovum pick up and *in vitro* fertilization in Japanese black cows. *J. Reprod Dev.* 58 (1):140-6.

#### TESTING GROWTH FACTORS ON THE MORPHO - FUNCTIONAL STATE OF GAMETTES BY *IN VITRO* STORAGE

T. Todorova, I. Todorov  
Institute of Animal Science - Kostinbrod

#### SUMMARY

Aim of our studies was to investigate the effect of the addition of growth factors, in particular IGF-I to the culture medium on the development of (IVM / IVF) oocytes using the ECS. The results show that the *in vitro* development of the embryos is enhanced in presence of high concentration of IGF-I with the addition of oestrus cow serum and granulosa cells.

Addition of 10 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> to the TCM 199 containing 10% oestrus serum had a positive effect on the cleavage of the embryos ( $P < 0.05$ ). There is a correlation between the dose of IGF-I and embryonic development after the medium containing 50 ng IGF-I ml<sup>-1</sup> resulted in a lower percentage of hatched blastocysts at day 9, compared with the medium containing 100 ng IGF-I ml<sup>-1</sup>. These studies lead to the conclusion that the high concentrations of exogenous IGF-I added to the culture medium in the presence of granulosa cells, serum and endogenous IGF-I accelerate the development of the embryos.