

**Table 3. Amplitudes (mV) in the first and second recordings of the electrocardiogram of the healthy Brown Swiss cows.**

|                |     | P      |        | QRS    |        | T      |        |
|----------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                |     | a      | b      | a      | b      | a      | b      |
| I              | x   | 0.06   | 0.09   | 0.27   | 0.33*  | 0.21   | 0.33   |
|                | s.e | 0.0055 | 0.0053 | 0.0187 | 0.0242 | 0.0153 | 0.0242 |
| II             | x   | 0.13   | 0.07** | 0.36   | 0.20** | 0.26   | 0.20** |
|                | s.e | 0.0163 | 0.0121 | 0.0314 | 0.0373 | 0.0229 | 0.0373 |
| III            | x   | 0.08   | 0.10   | 0.36   | 0.41   | 0.23   | 0.41   |
|                | s.e | 0.0113 | 0.0162 | 0.2620 | 0.0276 | 0.1480 | 0.276  |
| aVR            | x   | 0.06   | 0.05   | 0.27   | 0.36** | 0.15   | 0.36** |
|                | s.e | 0.0184 | 0.0580 | 0.0157 | 0.0205 | 0.0150 | 0.0205 |
| aVL            | x   | 0.09   | 0.06*  | 0.33   | 0.31   | 0.23   | 0.35*  |
|                | s.e | 0.0146 | 0.0067 | 0.0187 | 0.0141 | 0.0156 | 0.0141 |
| aVF            | x   | 0.90   | 0.06*  | 0.33   | 0.31   | 0.26   | 0.31*  |
|                | s.e | 0.0079 | 0.0077 | 0.0264 | 0.0273 | 0.0182 | 0.0273 |
| V <sub>1</sub> | x   | 0.09   | 0.08   | 0.28   | 0.35*  | 0.19   | 0.35   |
|                | s.e | 0.0072 | 0.0058 | 0.0257 | 0.0248 | 0.0119 | 0.0248 |
| V <sub>2</sub> | x   | 0.10   | 0.08   | 0.32   | 0.38   | 0.23   | 0.38   |
|                | s.e | 0.0147 | 0.0138 | 0.0220 | 0.0234 | 0.0103 | 0.0234 |
| V <sub>3</sub> | x   | 0.04   | 0.03   | 0.31   | 0.38*  | 0.17   | 0.38*  |
|                | s.e | 0.138  | 0.0040 | 0.0194 | 0.0219 | 0.0121 | 0.0219 |
| V <sub>4</sub> | x   | 0.03   | 0.03   | 0.34   | 0.41*  | 0.23   | 0.41*  |
|                | s.e | 0.0042 | 0.0048 | 0.0177 | 0.0177 | 0.0113 | 0.0177 |

\* : P < 0.05

\*\* : P < 0.01

a : The first recording.

b : The second recording.

## İN VİTRO DÖLLENMİŞ FARE OVUMLARININ GELİŞMESİ ÜZERİNDE EDTA'NIN ETKİSİ

Tevfik Tekeli<sup>1</sup>

### The effect of EDTA on the development of mouse eggs fertilized in vitro

**Summary :** The present study was undertaken to whether EDTA exerts beneficial effect on the development of mouse embryos derived from eggs fertilized in vitro. Superovulated eggs were collected from ddY females and were inseminated with epididymal sperm obtained from ddY males. At 6 hours after insemination the fertilized eggs were transferred to the Whitten's medium with or without EDTA and then cultured for 24 to 120 hours. The development of embryos beyond the 2-cell stage at 48 hours was significantly enhanced by the presence of 10 mM EDTA. Fifty seven per cent of embryos cultured for 96 hours in the medium containing EDTA developed morulae stage. Only 13% of embryos cultured for 96 hours in the medium without EDTA developed into morulae stage. On the other hand, 27% of embryos cultured in the medium with EDTA developed into blastocyst stage. As a conclusion, the development of in vitro fertilized mouse embryos beyond the 2 cell stages in Whitten's medium was enhanced by the pres-

ence of EDTA.

**Özet :** Sunulan çalışmada, in vitro döllenmiş fare ovumlarının gelişmeleri üzerinde gelişme vasatına ilave edilen EDTA'nın etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, ddY ırkı dişi farelerden süperovulasyon ile elde edilen ovumlar yine aynı ırktan erkeklerin epididimlerinden elde edilen spermatozoitlerle in vitro olarak döllendi. Ovum ve spermatozoitlerin fertilizasyon vasatı içerisinde ilk 6 saatlik inkübasyonlarını takiben fertilize ovumlar EDTA'lı ve EDTA'sız Whitten's vasatına nakledilerek 24-120 saat süre ile inkübe edildi ve gelişmeleri izlendi. Embriyoların EDTA ihtiva eden gelişme vasatı içerisinde 48 saat inkübasyonu sonucunda ileri aşamalara ulaşma oranında artış sağlandı. EDTA'lı vasat içerisinde 96 saat süre ile inkübe edilen embriyoların % 57'sinin EDTA'sız vasat içerisinde inkübe edilen embriyoların ise aynı süre inkübasyonu müteakiben yalnızca %13'ünün morula aşamasına ulaştıkları görüldü. Ayrıca bir başka denemede EDTA'lı vasat içerisinde

120 saat süre ile inkübe edilerek gelişmeleri izlenen embriyoların % 27'si blastosist aşamasına ulaştı. Sonuç olarak, gelişme vasatına ilave edilen EDTA'nın in vitro fertilizasyon sonucu elde edilen fare ovumlarının ileri gelişme aşamalarına ulaşmaları üzerinde olumlu etkisinin bulunduğu kanısına varıldı.

### Giriş

Gerek in vivo gerekse in vitro fertilizasyondan sonra elde edilen fare embriyoları kültür vasatı içerisinde 1-2 hücreli dönemden daha ileri aşamalara ya ulaşmamakta ya da bu oran çok düşük kalmaktadır. Miyamoto ve Chang (3), epididimisten elde ettikleri spermatozoitler ile in vitro olarak döledikleri ovumları 24 saat süre ile inkübe ederek % 64'ünün bölündüğünü göstermişler, daha uzun süre inkübasyonlarını takiben de % 10'unu blastosist aşamasına kadar geliştirmeyi başarmışlardır.

Bazı araştırmacılar (1,2) bunun nedenini inceleyerek fertilize ovumların blastosist aşamasına ulaşmalarını sağlamak ve oranlarını yükseltmek amacıyla kültür için nakledildikleri gelişme vasatına EDTA'nın az miktarda ilave edilmesinin etkinliğini ortaya koymuşlardır. Abramczuk ve ark (1), vasata 10 mM EDTA ilavesi ile embriyoların blastosist aşamasına ulaşma oranının % 15-30 dan % 70'e yükseldiğini göstermişlerdir. Hoshi ve Toyoda (2)'da in vitro döledikleri fare ovumlarında bu oranın % 27-31'den % 90'a ulaştığını bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada, gelişme vasatı ( Whitten's)na ilave edilen EDTA'nın in vitro olarak dölenen fare ovumlarının iki hücreli dönemden sonraki aşamalara ulaşması üzerine etkisi araştırıldı.

### Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak ddY ırkından seksüel olgunluğa ulaşmış dişilerle aynı ırktan tecrübeli ve yaşlı erkek fareler kullanıldı. Farelere kullanılmadan önce 10 saat karanlık ve 14 saat aydınlık ışık periyodu uygulandı.

Spermatozoitlerin elde edilmesi ve kapa sitasyonlarının sağlanması amacıyla, dişi farelerden ovumların elde edilmesinden yaklaşık 2 saat kadar önce erkek farelere laparotomi yapılarak cauda epididim testis ve epididimisin diğer kısımlarından kesilerek ayrıldı, üzeri % 5 CO<sub>2</sub> ile dengelenmiş parafin ile kaplanmış 0.4 ml THY (5) vasatı içerisine konuldu. Cauda epididimis bir makas yardımı ile çok sayıda küçük parçalara ayrılarak spermatozoitlerin vasat içerisinde yayılmaları sağlandı. Spermatozoitler 1.5-2.0 saat süre ile 37°C deki % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

Ovum elde etmek amacıyla kullanılan dişi farelere süperovulasyon oluşturmak için 48 saat ara ile önce 7.5 IU PMSG ve sonra 7.5 IU HCG hormonu periton için yolla enjekte edildi. Ovumlar HCG enjeksiyonundan 14-16 saat sonra stereo mikroskop altında oviductun genişlemiş ve daha belirgin hale gelmiş olan ampulla kısmının iğne yardımıyla delinmesiyle elde edildi. Cumulus oophorus kümesi ile birlikte bulunan ovumlar üzeri % 5 CO<sub>2</sub> ile dengelenmiş sıvı parafinle kaplanmış 0.4 ml THY (5) vasatı içerisine kondu.

Ovum ve spermatozoitlerin birarada inkübasyona bırakılarak fertilizasyonlarının sağlanması amacıyla önceden hazırlanmış olan spermatozoit suspansiyonundan 5-10 ml bir pipet yardımıyla alınarak ovumların bulunduğu petri içerisindeki vasata ilave edildi. Ovum ve spermatozoitler 37 °C deki % 5

CO<sub>2</sub>'li etüvde 6 saat süre ile inkübe edildikten sonra karşılaştırma yapabilmek için fertilize ovumlar 10 mM EDTA ilave edilen ve edilmeyen Whitten's vasatına nakledilerek tekrar 24-120 saat inkübasyona bırakıldı ve gelişmeleri izlendi

### Bulgular

Elde edilen bulgular Tablo 1,2 ve 3'te sunulmuştur.

**Tablo 1. Gelişme vasatı içerisinde 120 saat süre ile inkübe edilen in vitro döllenmiş fare ovumlarının blastosist aşamasına kadar gelişmeleri üzerine EDTA'nın etkisi.**

| Gelişme vasatı | Deneme no. | Embriyo Sayısı | 48. saatte Dölenen Embriyo (%) | 96. saatte morula (%) | 120. saatte blastosist (%) |
|----------------|------------|----------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| EDTA'lı        | 1          | 57             | 25(44)                         | 10(40)                | 3(12)                      |
|                | 2          | 99             | 60(61)                         | 34(57)                | 20(33)                     |
| Toplam         |            | 156            | 85(54)                         | 44(52)                | 23(27)                     |

**Tablo 2. İn vitro olarak döllenmiş fare ovumlarının 24 ve 48. saatlerde EDTA'lı ve EDTA'sız gelişme vasatı için gelişme durumları.**

| Gelişme vasatı | Deneme no. | Embriyo Sayısı | 24. saatte 2-hücreli aşamada (%) | 48. saatte 4-hücreli aşamada (%) |
|----------------|------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| EDTA'lı        | 2          | 99             | 60(61)                           | 21(35)                           |
|                | 3          | 39             | 11(28)                           | 1(9)                             |
| Toplam         |            | 138            | 71(51)                           | 22(31)                           |
| EDTA'sız       | 2          | 32             | 10(31)                           | 1(10)                            |
|                | 3          | 30             | 21(70)                           | 0(0)                             |
| Toplam         |            | 62             | 31(50)                           | 1(3)                             |

**Tablo 3. EDTA'lı ve EDTA'sız gelişme vasatları içerisinde inkübasyonları gerçekleştirilen 2. denemede 96. saatte morula aşamasına ulaşan embriyolar.**

| Gelişme vasatı | Deneme no. | Embriyo sayısı | 96. saatte morula (%) |
|----------------|------------|----------------|-----------------------|
| EDTA'lı        | 2          | 99             | 34(57)                |
| EDTA'sız       | 2          | 32             | 2(13)                 |

Tablo 1'de görüldüğü gibi, 1 ve 2. denemelerde EDTA ilave edilmiş gelişme vasatı içerisinde inkübe edilen toplam 156 adet fertilize ovumun ilk 48 saatlik inkübasyonu sonucunda 85 adedi (%54) döllenmiş, 120. saate kadar olan inkübasyonlarını takiben de 23 adedi (%27) blastosist aşamasına ulaşmıştır.

EDTA'lı ve EDTA'sız gelişme vasatı içerisinde ovumların inkübe edildiği 2. ve 3. denemelerde 24 ve 48. saatlerde 2 ve

4- hücreli aşamaya ulaşan embriyoların sayısı ve % oranları tablo 2' de sunulmuştur. Tablodan da izlendiği gibi EDTA'lı gelişme vasatı içerisinde inkübe edilen toplam 138 adet fertilize ovumun 71 adedi (%51) bölünmüş ve 48. saatte bunların 22 adedi (%31) 4-hücreli aşamaya ulaşmıştır. EDTA ilave edilmeyen grupta ise inkübe edilen toplam 62 adet fertilize ovumun 31 adedi (%50) 24. saatte 2 hücreli aşamaya ulaşmış ve bunların ancak 1 tanesi (%3) 48. saatte 4 hücreli aşamaya kadar gelişebilmiştir.

Tablo 3'te ise, yalnızca 2. denemede EDTA'lı ve EDTA'sız gelişme vasatı içerisinde inkübe edilen ve 96 saatlik inkübasyon sonucu morula aşamasına ulaşan embriyoların adet ve oranları gösterilmiştir. EDTA'lı gelişme vasatı içerisinde inkübe edilen embriyoların % 57'si, EDTA'sız gelişme vasatı içerisinde inkübe edilen embriyoların ise ancak % 13'ü morula aşamasına kadar geliştirilebilmiştir.

### Tartışma ve Sonuç

Miyamoto ve Chang (3), epididimisten elde ettikleri spermatozoilerle in vitro olarak döledikleri fare ovumlarını 24 saat süre inkübe ederek % 64'ünün bölündüğünü göstermişler, 96 saatlik inkübasyon sonucunda bölünen embriyoların ancak % 10'unu blastosist aşamasına kadar geliştirmeyi başarabilmişlerdir. Çalışmada 2. ve 3. denemelerde epididimisten elde edilen spermatozoilerle gerçekleştirilen in vitro fertilizasyondan sonra EDTA'sız gelişme vasatı içerisinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında fertilize ovumların % 50'sinin bölündüğü saptanmıştır. Denemeler için oranlar ayrı ayrı değerlendirildiklerinde bu oranlar 2. denemede % 31, 3. denemede ise %70 olarak saptanmıştır ( Tablo 2). Ancak EDTA ilave edilmeyen denemelerde embriyoların blastosist aşamasına kadar gelişmeleri izlenememiştir. Yalnızca 48. saatte yapılan kontrollerde embriyoların %3'nün 4-hücreli aşamaya kadar geliştiği tesbit edilmiştir (Tablo 2). Tablo 3'te görüldüğü gibi, 2. denemede 96. saatte EDTA'sız grupta toplam 32 adet embriyonun 2'si (%13) morula aşamasına ulaşmıştır. Bu oran, Miyamoto ve Chang (3)'ün normal gelişme vasatı içerisinde embriyoların inkübe edilmelerini takiben 96. saatte morula aşamasında elde edilen % 11'lik orana yakın bulunmuştur.

Normal gelişme vasatı içerisinde, tek ya da 2-hücreli aşamadan ileri safhalardaki embriyoların düşük oranda bulunmasının nedenini açıklamaya çalışan araştırmacılar (1,2), bu safhadaki embriyoların blastosist aşamasına ulaşmasını sağlamak ve oranlarını yükseltmek için vasata az miktarda EDTA'nın ilavesinin etkinliğini ortaya koymuşlardır. Abramczuk (1), in vivo olarak döllenmiş ovumların EDTA ilave edilmiş vasatta %70'inin, EDTA'sız vasatta ise % 15-30'unun blastosist aşamasına ulaştığını göstermiştir. Hoshi ve Toyoda (2)'da in

vitro döledikleri ovumların EDTA'sız gelişme vasatında % 27-31'inin, EDTA ilave edilmiş vasat içerisinde ise % 90'dan fazlasının blastosist aşamasına ulaştığını belirtmektedirler. Yapılan tüm bu çalışmalar, gerek in vitro gerekse in vivo olarak dölenen ovumların, 2-hücreli bölünme aşamasından sonra gelişme vasatına EDTA ilavesiyle blastosist aşamasına ulaşan embriyoların oranlarının yükseldiğini göstermektedir. Sunulan çalışmada Tablo 1'de de görüldüğü üzere gelişme vasatına EDTA ilave edilerek uzun süre inkübe edilen 1 ve 2. denemelerdeki toplam embriyoların % 23'ünde blastosist aşamasında embriyolar elde edilmiştir. Bu oran araştırmacılar ( 1,2)'ın elde ettiği blastosist aşamasına ulaşan embriyo oranlarından daha düşük olarak bulunmuştur. EDTA'sız gelişme vasatları içerisinde embriyoların 120. saate kadar inkübasyonları gerçekleştirilemediğinden blastosist aşamasına ulaşma oranları bakımından EDTA'lı ve EDTA'sız gelişme vasatları içinde inkübe edilen embriyolar arasında herhangi bir mukayese olanağı sağlanamamıştır. Ancak Tablo 3'te görüldüğü gibi, 2. denemede EDTA ilave edilmiş vasat içerisinde 96 saatlik inkübasyon sonucunda morula aşamasına ulaşan embriyoların oranı (%57) EDTA ilave edilmemiş gruptaki embriyoların oranına (%13) kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca embriyoların kısa süreli olarak inkübe edildikleri 2. ve 3.denemede ise (Tablo 2) 48. saatte, EDTA'lı vasat içerisinde toplam embriyoların % 31'nin, EDTA'sız vasat içerisinde ise % 3'nün bir ileri yani 4-hücreli aşamaya ulaştıkları gözlenmiş ve EDTA'lı vasat içerisinde inkübasyon sonucu elde edilen 4-hücreli embriyoların oranının EDTA'sız grupta elde edilen orandan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak diğer araştırmacılar (1,2)'ında belirttikleri gibi bu çalışmada da in vitro olarak döllenmiş ovumların EDTA ilave edilmiş ve edilmemiş gelişme vasatında uzun süreli inkübasyonlarını takiben, bölünme aşamasından sonraki ileri aşamalara ulaşmaları bakımından, EDTA'lı grupta önemli bir artış sağlanmış ve vasata EDTA ilavesinin 2-hücreli safhadaki embriyoların daha ileri aşamalara kadar gelişmelerinde olumlu etki yaptığı kanısına varılmıştır.

### Kaynaklar

1. Abramczuk, J., Solter, D., and Koprowski, H. (1977). The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Develop. Biol.*, 61, 378-383.
2. Hoshi, M. and Toyoda, Y. (1985). Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. *Jpn.J. Zotech. Sci.*, 56, 931-937.
3. Miyamoto, H. and Chang, M.C. (1972). Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 30, 135-137.
4. Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 16, 4, 152-157.
5. Whitten, W.K. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Advan. Biosci.*, 6, 129-139.