

Turkish Veterinary Journal

Sivas Cumhuriyet University Faculty of Veterinary Medicine



1. Buzagıların
Konjenital Fleksural
Deformiteleri

2. Çeltik Samanı
Çeşitlerinin Besin
Madde Bileşimleri

3. Steviosidin sığır
parainfluenza-3 virusun in
vitro replikasyonuna etkisi

4. Protein
Kodlanmayan
Bölgelerin (Utr) Rolü

5. Kısıraklarda Embriyo
Migrasyonu



Aims and Scope

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), aims to publish articles (original research article, short communication, letters to editor, review article, and case report) on Veterinary basic sciences, clinic or preclinical sciences, zootechnics, animal nutrition, food hygiene and technology both in Turkish or English. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J) is an international, double peer reviewing scientific journal that publishes by Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine. Manuscript will be publish should not published before in elsewhere and should be based on the research (except review articles). Turk Vet J is published three in a year and an open access scientific journal. Special issues may be publishes by the decision of the journal administration. The journal accepts English or Turkish manuscripts. Turk Vet J doesn't asks fee for the processing the article.

Amaç ve Kapsam

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Türkçe veya İngilizce olarak, temel bilimler, klinik ve klinik öncesi bilimler, zootekni, hayvan besleme ile gıda hijyeni ve teknolojisi alanlarında makaleleri (araştırma makalesi, kısa bildiri, editöre mektup, derleme ve vaka takdimi türlerinde) yayımlamayı amaçlar. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi tarafından yayımlanan, uluslararası, çift hakemli bilimsel bir dergidir. Dergiye, ulusal ya da uluslararası ilgi ve uygulama içiren ve yeni bilgiler barındıran makaleler sunulabilir. Yayımlanacak makalelerin, daha önceden yayımlanmamış ve araştırma sonuçlarına dayalı olması gerekmektedir (derleme makaleleri hariç). Turk Vet J açık erişim sağlamak üzere yılda üç defa online olarak yayınlanır. Dergi yönetiminin kararları doğrultusunda özel ya da ek sayılar yayımlanabilir. Turk Vet J Türkçe ve İngilizce yayınları kabul eder. Turk Vet J makale işlem ücreti (değerlendirme ücreti veya basım ücreti) ve makalelere erişim için herhangi bir ücret talep etmez.

Owner / Sahibi

Prof. Dr. Barış Atalay USLU

Editors / Editörler

Doç. Dr. Mehmet Buğra KIVRAK (Editor in Chief / Baş Editör)

Editorial Board / Editörler Kurulu

Doç. Dr. Uğur AYDOĞDU

Doç. Dr. Tuğba DEMİR

Doç. Dr. Tunahan SANCAK

Doç. Dr. Mehmet EKİCİ

Dr. Öğr. Üyesi Mahmut MOĞULKOÇ

Doç. Dr. Abdurrahman TAKCI

+90 346 487 3545

<http://dergipark.gov.tr/turkvetj>, turkvetj@cumhuriyet.edu.tr,

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 58140, Sivas; Türkiye

eISSN: 2667-8292

CONTENTS / İÇİNDEKİLER

Turk Vet J 6(1)

Research Article / Araştırma Makalesi

Yeni Doğan Buzağıların Konjenital Fleksural Deformiteleri

Congenital Flexural Deformities of Newborn Calves

1-6

İbrahim Yurdakul, Mustafa Yalçın

Farklı Bitki Boylarına Sahip Çeltik Samanı Çeşitlerinin Besin Madde Bileşimleri ve Nispi Yem Değerlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Nutrient Composition and Relative Feed Value of Straw from Different Rice Varieties with Varying Plant Heights

7-11

Ayşe Gizem Bölükbaş, Bora Bölükbaş, Muhammed Waęas, Mustafa Salman, İsmail Kaya

Steviosidin sığır parainfluenza-3 virusun in vitro replikasyonuna etkisi

Effect of stevioside on in vitro replication of bovine parainfluenza-3 virus

12-16

Çağla YILMAZ, Semra GÜMÜŞOVA

Review / Derleme

Protein Kodlanmayan Bölgelerin (Utr) Rolü ve Bu Bölgelerin Haritalanmasında

Kullanılan Başlıca Yöntemler

Assays Used in The Analysis of Untranslated Regions of Viruses

17-22

Seda Gözel, Cüneyt Tamer

Kısırlarda Embriyo Migrasyonu

Embryo Migration in Mares

23-30

Buşra Özmen, İbrahim Doğan



Congenital Flexural Deformities of Newborn Calves

İbrahim Yurdakul^{1,a,*}, Mustafa Yalçın^{1,b}

¹Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye.

*Corresponding author

Research Article

History

Received: 08/01/2024

Accepted: 13/03/2024

ABSTRACT

In this study; The diagnosis, treatment method and results of calves of different ages, breeds and genders brought to Sivas Cumhuriyet University Faculty of Veterinary Medicine Animal Hospital Surgery Clinic with complaints of inability to step on the ground and bad leg posture due to musculoskeletal system anomalies were evaluated. The material of the study consisted of a total of 18 calves of different breeds, ages and genders. As a result of clinical and radiographic examinations, 13 calves were diagnosed with bouletur (72,22%), 3 calves with arqr (16,66%) and 2 calves with arthrogyposis (11,11%). When the calves were evaluated in terms of race, there were 8 Montofon calves (44,44%), 7 Simmental calves (38,88%) and 3 Montofon mixed breed calves (16,66%). According to gender, 12 calves were determined to be male and 6 calves were female. According to race, the most cases were found in Montofon (n=8, 44.44%) race; This was followed by Simmental (n=7, 38,88%) and Montofon hybrid (n=3, 16,66%). According to gender, it was determined that the cases were more common in males (n=12, 66,66%) than in females (n=6, 33,34%). In the treatment of calves with anomalies related to the musculoskeletal system, PVC supported bandage was applied to 12 bouletur cases as a conservative method, and "Z" tenotomy was performed operatively in 1 bouletur and 3 arqr cases. Arthrogyposis cases could not be treated because complete ankylosis occurred in the joints.

In conclusion; Early diagnosis of flexor tendon contractures in newborn calves gives positive results in treatment. It has been understood that PVC-supported bandage alone will be sufficient in mild and moderate bouletur cases that are diagnosed early and treatment is started, and that PVC-supported bandage will give successful results in the treatment of advanced bouletur and moderate arqr cases following the operation.

Keywords: Arqr, Bouletur, Arthrogyposis, Tendo Contractil.

Yeni Doğan Buzağların Konjenital Fleksural Deformiteleri

Süreç

Geliş: 08/01/2024

Kabul: 13/03/2024

Copyright



This work is licensed under
Creative Commons Attribution 4.0
International License

Öz

Bu çalışmada; Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Cerrahi Kliniğine kas ve iskelet sistemi anomalisine bağlı olarak yere basamama ve bozuk bacak duruş şikâyeti ile getirilen farklı yaş, ırk ve cinsiyetteki buzağların tanısı, buzağlara uygulanan tedavi şekli ve sonuçları değerlendirildi. Çalışmanın materyalini farklı ırk, yaş ve cinsiyette toplam 18 adet buzağı oluşturdu. Yapılan Klinik ve radyografik muayeneler neticesinde 13 buzağıya bouletur (%72,22), 3 buzağıya arqr (%16,66) ve 2 buzağıya arthrogyposis (%11,11) tanısı konuldu. Buzağlar ırk yönünden değerlendirildiğinde Montofon ırkı buzağlar 8 adet (%44,44), Simental ırkı buzağlar 7 adet (%38,88) ve Montofon melez ırkı buzağlar 3 adet (%16,66) olarak tespit edildi. Cinsiyete göre ise 12 buzağın erkek, 6 buzağın dişi olduğu belirlendi. İrklara göre olgulara en fazla Montofon (n=8, %44,44) ırkında rastlandı; bunu Simental (n=7, %38,88), Montofon melez (n=3, %16,66) ırkı izledi. Cinsiyete göre ise olguların erkeklerde (n=12, %66,66) dişilere oranla (n=6, %33,34) daha fazla şekillendiği belirlendi. Kas ve iskelet sistemine yönelik anomali buzağların Sağaltımında konservatif yöntem olarak bouletur olgularının 12 sine PVC destekli bandaj uygulandı, operatif olarak 1 adet bouletur ve 3 adet arqr olgularına "Z" tenotomi yapıldı. arthrogyposis olgularına ise eklemlerde tam ankiloz şekillendiğinden tedavi edilemedi.

Sonuç olarak; yeni doğan buzağlarda fleksor tendo kontraktillerinin erken teşhis edilmesi tedavide olumlu sonuçlar vermektedir. Erken teşhis edilen ve tedaviye başlanılan hafif ve orta dereceli bouletur olgularında PVC destekli bandajın tek başına yeterli olacağı, ileri dercede bouletur ve orta dereceli arqr olgularında ise operasyonu takiben PVC destekli bandajın sağaltımda başarılı sonuçlar vereceği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arqr, Bouletur, Arthrogyposis, Tendo Kontraktürü.

^a ibrahimyurdakul5858@hotmail.com ^b 0000-0002-5696-5069

^b mustafayalcin@cumhuriyet.edu.tr

^b 0000-0002-5479-1165

How to Cite: Yurdakul İ, Yalçın M (2024) Congenital Flexural Deformities of Newborn Calves, Turkish Veterinary Journal, 6(1): 1-6

Giriş

Ülkemizdeki büyükbaş hayvancılık işletmelerinin en sık karşılaştığı problemlerin başında buzağı ölümleri gelmektedir. Güncel çalışmalarda dünya geneli buzağı ölüm oranlarının %8,7-67 arasında olduğu (De Amicis I, 2017),

ülkemizdeki buzağı ölüm oranının ise %10-15 civarında olduğu belirtilmektedir (Yurdakul ve ark. 2021).

Ciddi ekonomik kayıplara neden olan buzağı hastalıkları arasında göbük bölgesi lezyonları, artrit, ekstremitte kırıkları

ve konjenital anomaliler yer almaktadır (Belge ve ark., 2000; Arıcan ve ark., 2014; Goodarzi ve ark., 2015).

Doğumdan sonra hayvanlarda görülen her türlü yapı ve fonksiyon bozukluğu konjenital anomali olarak tanımlanır (Abdel-Hakim ve Aref 2012). Konjenital anomalilerin sebebi kesin olarak bilinmemekle birlikte yaygın olarak; embriyogenezis veya fütal gelişmenin çeşitli evrelerinde genetik, çevresel veya genetik-çevre etkileşimlerine bağlı olarak oluşabileceği belirtilmektedir (Phaneendra ve ark. 2015; Yurdakul ve ark. 2020). Konjenital anomaliler sayıca az görülmesine rağmen önemli ekonomik kayıplara yol açması ve genetik olarak yeni nesillere aktarılması nedeniyle büyük önem taşımaktadırlar (Belge ve ark. 2000). Konjenital anomaliler çoğunlukla kas iskelet ve sindirim sisteminde görülmektedir. Kas iskelet sisteminde görülen anomalilerden tendo kısalığı olarak da bilinen arqur, bouletur ve arthrogryposis yeni doğan buzağılarda çok sık görülmektedir.

Arqur; hayvanın yere bastığı sırada carpus eklemi arkasında oluşan değişik dereceli açılı ile seyreden diz büküklüğüdür. Bouletur topuk eklemi arkasında değişen dereceli açılı ile seyreden falankların birinin ya da tümünün geriye doğru ters yönde bir pozisyon almasıdır (Arıcan M. 2017). Arthrogryposis, ise bir veya birkaç ekstremitenin eklemlerindeki kontraktür ile karakterizedir (Ümit ve ark. 1988). Bouletur yeni doğan buzağılarda en çok görülen ekstremite hastalıklarından biridir. Falankların birinin ya da tümünün Flexor yöndeki bükülme durumuna göre 3 derecede sınıflandırılır (Gençcelep ve ark.2017).

Arqur ve bouletur konjenital ve edinsel olarak şekillense; konjenital olarak tendo kontraktiline bağlı daha sık şekillenir (Samsar ve Akın 2006). Etiyolojik nedenleri arasında özellikle; gebelik sırasında yavrunun fütustaki pozisyonu ve bu pozisyondaki duruş bozukluğunun ekstensor, flexor kaslar üzerindeki dengesizliği önemli yer tutmaktadır (Samsar ve Akın 2006)

Bu çalışmada, Yeni doğan buzağılarda yere basamama veya bozuk bacak duruş şikâyeti ile hayvan hastanesi cerrahi kliniğine getirilen buzağılarda tendo kısalığı olarak da bilinen arqur, bouletur ve arthrogryposis vakalarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışma materyalini Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Cerrahi kliniğine yere basamama veya bozuk bacak duruş şikâyeti ile getirilen farklı yaş, ırk ve cinsiyette toplam 18 adet buzağı oluşturdu. Hasta sahiplerinden hastalıkların oluşumu hakkında bilgi alınarak elde edilen klinik bulgulara göre buzağı hakkındaki bilgiler kayıt altına alındı.

Hasta sahibinden alınan anamnez doğrultusunda Ekstremitte veya ekstremiteelerde şekillenen anomaliler klinik olarak muayene edildi. Klinik muayenede; Her olgunun vücut ısısı, nabız ve solunum yönünden genel

muayenesi yapıldı. Anomali tespit edilen her bir olgunun ilgili ekstremitte veya ekstremitelelerinin röntgeni çekildi. Çekilen röntgen neticesinde bouletur, arqur ve arthrogryposis olgularının derecelendirilmeleri yapıldı.

Klinik ve radyolojik muayene bulgularına göre konservatif sağaltım olarak ekstremiteelerde gözlenen hafif ve orta derecedeki fleksor tendo kontraktürlerinin sağaltımında genel olarak polivinil klorür (PVC) destekli bandajlar uygulandı. Bandajlar 10 gün süre ile yerinde kaldı ve 10. günün sonunda hayvanın yere basışına göre gerek görülen olgularda PVC destekli bandaj yenilendi. İleri dereceli bouletur ve Orta dereceli arqur olgularına ise operasyon yapıldı. Operasyona alına olguların anestezisi, Xylazine hydrochloride'in (Rompun, Bayer, 0,2 mg/kg mg/ml) intramusküler enjeksiyonundan sonra kontraktür tespit edilen flexor tendo bölgesinin lokal olarak lidokain HCl (Adokain, Sanovel, 20 mg/ml) enjeksiyonu ile lokal infiltrasyon anestezisi sağlanarak operasyona alındı.

Operasyon Tekniği

Bouletur tanısı konulan 1 adet ve arqur tanısı konulan 3 adet olguda kontraktürlü tendonun bulunduğu deri üzerine 5-7 cm uzunluğunda ensizyon yapılarak deri altı bağ dokuları ve konjunktif dokular küt diseksiyonla ayırt edildi; daha sonra kontraktürlü tendo açığa çıkartılarak bir pens üzerine alındı. Operasyonda "Z" tenotomi yöntemi tercih edilerek kontraktür olan tendo "Z" tarzında ensize edilerek ikiye ayrıldı. Serbest hale gelen tendo uçları emilen dikiş materyali ile birbirine sıkıca tutturuldu. "Z" tenotomisinden sonra tendovagina sürekli dikiş ile kapatıldı. Deri altı bağ dokusuna sürekli dikiş uygulandı. Deri emilemeyen dikiş materyali ile basit ayrı dikişle kapatıldı. Operasyondan sonra ilgili ekstremite PVC destekli bandaja alınarak bandajın 1 ay kalması sağlandı.

Postoperatif Bakım

Hayvan sahiplerine operasyon sonrası 3 gün süreyle 1 ml/10 kg metamizol (Difaljin, CEVA-DİF), 7 gün süreyle 4 ml /50 kg parenteral olarak penisilin+streptomisin (Reptopen S, CEVA-DİF) uygulamalarının yapılması, ayrıca destekleyici amaçla vitamin (A,D,E Vitamin) enjeksiyonları önerildi. Postoperatif olarak 10. günde deri dikişleri alındı ve ilgili bacak tekrar bandaja alındı. Olguların durumu hakkında postoperatif 1 ay süreyle hasta sahiplerinden bilgiler alındı.

Bulgular ve Tartışma

Bulgular

Cerrahi Kliniğine yaşları 1-30 gün arasında değişen farklı ırk ve cinsiyette yere basamama veya bozuk bacak duruş şikâyeti ile toplam 18 adet buzağı getirildi. Yapılan klinik ve radyografik muayeneler neticesinde 13 buzağıya bouletur (%72,22) (Resim 1A, 2A), 3 buzağıya arqur (%16,66) ve 2 buzağıya arthrogryposis (%11,11) (Resim 3A), tanısı konuldu. Kas ve iskelet sistemindeki anomaliye göre buzağılar ırk yönünden değerlendirildiğinde Montofon ırkı buzağılar 8 adet (%44,44), Simental ırkı buzağılar 7 adet (%38,88) ve

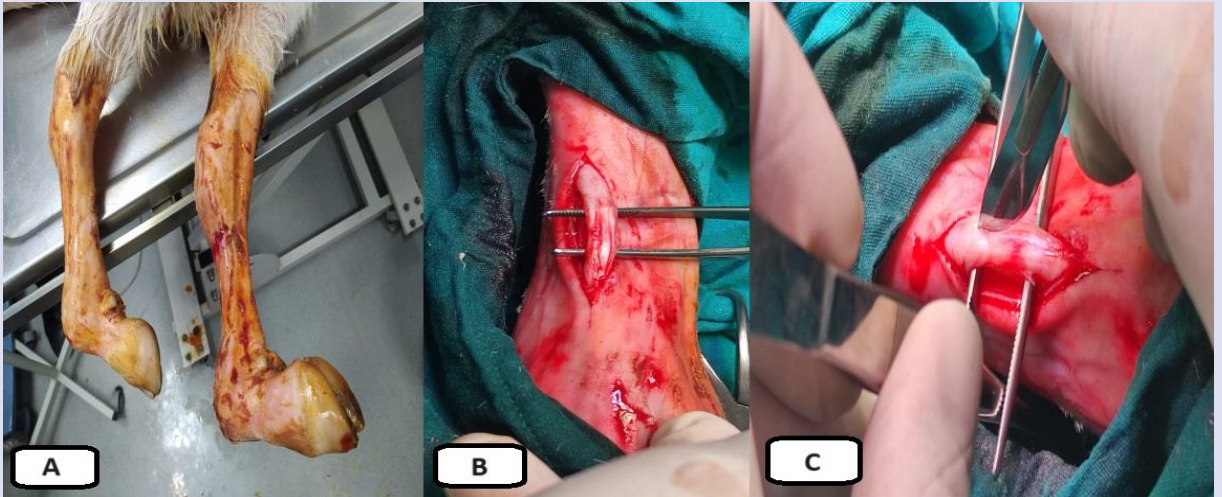
Montofon melez ırkı buzağlar 3 adet (%16,66) olarak tespit edildi. Cinsiyete göre ise 12 buzağın erkek, 6 buzağın dişi olduğu belirlendi. Irklara göre olgulara en fazla Montofon (n=8, %44,44) ırkında rastlandı; bunu

Simental (n=7, %38,88), Montofon melez (n=3, %16,66) ırkı izledi. Cinsiyete göre ise olguların erkeklerde (n=12, %66,66) dişilere oranla (n=6, %33,34) daha fazla şekillendiği belirlendi (Çizelge 1).



Resim 1: A- Simental ırkı bir olguda görülen bouletur (kırmızı oklar) olgusu. B- Olgunun PVC ile alınan destekli bandaj uygulaması görüntüsü.

Figure 1: A- Bouletur (red arrows) case seen in a Simmental breed case. B- Image of the patient applying a supported bandage taken with PVC.



Resim 2: Bilateral ileri dereceli bouletur şikâyetiyle gelen bir olgunun, Z Tenetomi pre-operatif (A) ve operasyon (B-C) görüntüsü.

Figure 2: Z Tenetomy pre-operative (A) and operation (B-C) images of a patient presenting with bilateral advanced bouleture complaint.



Resim 3: Artrogripozis olgusu klinik (A) ve radyografik görüntüsü (B).
Figure 3: Clinical (A) and radiographic appearance (B) of arthrogyryposis case.

Çizelge 1. Konjenital tendo kontraktür olgularının ırk ve cinsiyete göre dağılımı, klinik bulguları ve uygulanan tedavi şekli.
Table 1. Distribution of congenital tendon contracture cases according to race and gender, clinical findings and type of treatment applied.

No	İrk	Cinsiyet	Hastalık	Kontraktürlü Bölge	Derecesi	Tedavi
1	Montofon	Erkek	Bouletur	Sağ Topuk	Orta	PVC Bandaj
2	Montofon	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Orta	PVC Bandaj
3	Montofon	Dişi	Bouletur	Sağ Topuk	Hafif	PVC Bandaj
4	Simental	Dişi	Bouletur	Sağ Sol Bilek	İleri	Z Tenetomi+ PVC Bandaj
5	Montofon M.	Erkek	Bouletur	Sol Topuk	Hafif	PVC Bandaj
6	Montofon	Dişi	Argur	Sağ Sol Carpal	Orta	Z Tenetomi+ PVC Bandaj
7	Simental	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Hafif	PVC Bandaj
8	Montofon M.	Erkek	Arqur	Sağ Sol Carpal	Orta	Z Tenetomi+ PVC Bandaj
9	Montofon	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Hafif	PVC Bandaj
10	Simental	Dişi	Artrogripozis	Sağ Sol Carpal ve Bilek	İleri	Operasyonu Edilemedi
11	Montofon	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Hafif	PVC Bandaj
12	Montofon M.	Erkek	Arqur	Sağ Sol Carpal	Orta	Z Tenetomi+ PVC Bandaj
13	Simental	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Hafif	PVC Bandaj
14	Simental	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Hafif	PVC Bandaj
15	Montofon	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Orta	PVC Bandaj
16	Simental	Dişi	Artrogripozis	Sol Topuk	Hafif	Operasyon Yapılmadı
17	Simental	Erkek	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Hafif	PVC Bandaj
18	Montofon	Dişi	Bouletur	Sağ Sol Bilek	Hafif	PVC Bandaj

Klinik ve radyolojik muayeneleri neticesinde olguları sınıflandırdığımızda 13 adet bouletur olgusunun 9'u hafif 3'ü orta, 1'i ileri derecede, 3 adet arqur olgusunun orta derecede ve 2 adet artrogripozis olgusunun ise hafif ve ileri derecede olduğu tespit edildi (Çizelge 1).

Sağaltımda konservatif yöntem olarak 12 adet bouletur olgusuna (n:12) PVC destekli bandaj (Resim 1B) uygulandı, operatif olarak 1 adet bouletur ve 3 adet arqur olgularına ise "Z" tenotomi yapıldı (Resim 2B-2C) ve sonrasında 30 gün süre ile PVC destekli bandaj uygulandı. Bandajlar 10 günde bir açılarak dikiş hattı temizlendi ve tekrar bandaj yenilendi. Artrogripozis

olgularında eklemlerde tam ankiloz şekillendiği görüldü (Resim 3B) ve hayvan sahipleri önerilen operasyonu kabul etmediği için herhangi bir tedavi yöntemi uygulanmadı.

Tartışma

Konjenital anomaliler bütün hayvan türlerinde görülmekle birlikte buzağı, kuzu ve oğlaklarda daha sık görülmektedir. Konjenital anomalilerin çoğunlukla kas-iskelet ve sindirim sisteminde şekillendiği ve bu anomaliler arasında en sık olarak arthrogyryposis, hydrocephalus, kist dermoid, atresia ani et recti, arqur, bouleture, hernia umbilicalis, konjenital damak yarığı şeklinde sıralandığı

belirtilmektedir (Yurdakul ve ark. 2020; Sağlam ve ark. 2023).

Karabulut ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmada yeni doğan buzağılarda rastlanılan anomaliler içerisinde bouletur olgularının önemli oranda yer tuttuğunu bildirmektedirler. Yapılan bu çalışmada tendo kontraktürüne bağlı konjenital anomaliler içerisinde en çok bouletur olgularının %72,22 oranında ilk sırada görüldüğü tespit edilmiştir.

Buzağılardaki konjenital anomali olguları üzerine yapılan çalışmalarda ırklar arasında önemli bir farkın bulunmadığı bildirilirken (Sağlam ve ark, 2023), Karabulut ve ark. (2001), Han ve Durmuş (2005); yaptıkları benzer çalışmalarda konjenital anomalilerin Montofon ırkı buzağılarda daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise ekstremiteye bağlı konjenital anomalilerin en çok Montofon ırkında görülmesi ekstremite anomalilerine Montofon ırkının daha yatkın olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Buzağılarda kas ve iskelet sistemine yönelik anomali olguları üzerine yapılan çalışmalarda (Oğurtan ve ark. 1997; Belge ve ark. 2000, Chakraborty ve ark. 2023) anomalilerin erkeklerde dişilere oranla daha fazla görüldüğü bildirilmektedir. Sunulan bu çalışmada erkek buzağılarda (n:12), bouletur, arqur ve artrogripozis gibi kas ve iskelet sistemine yönelik anomalilerinin dışı buzağılardan (n:6) daha çok görülmesinin sebebi olarak; ilk defa kızgınlığa gelmiş olan dişi hayvanların iri yapılı erkek hayvanlar tarafından gebe bırakılması, gebelik döneminde fütustaki erkek buzağuların dişi buzağılara göre daha fazla kilo alması fötüs ile anne arasında bir ağırlık eşitsizliğine yol açar ve bu durum; fötüsün rahim içindeki olağan hareketliliğini sınırlayarak kas ve iskelet sistemine yönelik anomalilere yol açabileceği ve bu nedenle kas ve iskelet sistemine yönelik anomaliler üzerinde cinsiyetin etkili olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Konjenital fleksor tendo kontraktillerine bağlı anomaliler hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç derecede sınıflandırılır (Sağlam K, 2021, Vijay ve ark. 2021). Yeni doğan buzağuların fleksor tendo kontraktürü üzerine yapılan çalışmalarda araştırmacıların çoğu hafif formun daha çok görüldüğünü bildirmektedirler (Nuh ve ark. 2021, Sağlam 2021). Sunulan bu çalışmada; bouletur olguların 9'u hafif 3'ü orta, 1'i ileri derecede; arqur olgularının 3'ü orta ve artrogripozis olgularının ise 1'i hafif ve 1'inin ileri derecede olduğu görüldü. Bilateral şekillenen hafif bouletur olgularında buzağuların sümbük uçları ile yürüdüğü ve yürüme esnasında topuğun yerden yukarıda olduğu tespit edildi. Orta dereceli olgularda buzağuların, sümbüğün sırt kısmında dik durabildiği ve yardım almadan ayakta durabildiği, şiddetli olgularda ise buzağının yan pozisyonda veya karın üstü pozisyonda yattığı ve genellikle ayakta durmakta ve yürümekte zorluk çektiği görüldü.

Ektremiteelerde gözlenen hafif derecedeki bouletur ve arqur olgularında PVC destekli ya da alçılı bandajlar uygulanarak sağaltımın yapılabileceği, bandajlarla iyileşemeyecek kadar ciddi olgularda ise tendolarda

yapılacak operasyonlarla sağaltımın gerçekleştirilebileceği bildirilmektedir. (Han ve ark. 2005). Hafif derecedeki bouletur ve arqur olgularında buzağı ayakta duruyorsa herhangi bir spesifik tedaviye ihtiyaç duyulmadan iyileşmenin kendiliğinden sağlanacağı belirtilmektedir (Anderson ve ark. 2008). Sunulan bu çalışmada bouleture gözlenen olguların 12 si PVC destekli bandaj uygulamaları ile sağaltımları gerçekleştirilirken, ileri derece bouleturlu bir buzağının ve 3 adet arqur olgularının ise sağaltımı operasyonu takiben PVC destekli bandaj uygulamaları ile gerçekleştirildi.

PVC destekli bandajların uzun süre kalması sonucu; bandaj uygulanan bölgede kan dolaşımının az olması; kaslarda atrofi ve ilgili ekstremiteelerin sağlıklı ekstremitelere göre daha yavaş gelişim gösterdiği bilinmektedir. Sağaltım süreci boyunca bouletur olgularında belirtilen bu komplikasyon durumları ile karşılaşılmaş ancak arqur olgularının post operatif ikinci kontrollerinde (20. gün) 2 olguda ilgili kaslarda PVC destekli bandaja bağlı hafif zayıflık ve güçsüzlük tespit edildi. Operasyon bölgesinin kontrollerinde ise 1 olguda ensizyon hattı üzerinde hafif enfeksiyon tespit edilirken diğer 2 olguda ise herhangi enfeksiyon belirtilerine rastlanmadı.

Sonuç

Sonuç olarak; yeni doğan buzağılarda fleksor tendo kontraktillerinin erken teşhis edilmesi tedavide olumlu sonuçlar vermektedir. Erken teşhis ve tedaviye başlanılan hafif ve orta dereceli bouletur olgularında PVC destekli bandajın tek başına yeterli olacağı, orta dereceli arqur ve ileri derece bouletur olgularında ise operasyonu takiben PVC destekli bandajın sağaltımda başarılı sonuçlar vereceği anlaşılmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Kaynaklar

- Abdel-Hakim, MAH., & Aref, N.M. (2012). Prospective study on ano-rectal anomalies in neonatal farm animals. *J Vet Adv*; 2: 595-604.
- Anderson, D.E., Desrochers, A., & Jean, G.S. (2008). Management of tendon disorders in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 24: 551-566. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.07.008.
- Arcan, M. (2017) Sığır Cerrahi Atlası; Damla ofset A.Ş. Konya. 196-208
- Arcan, M., Erol, H., Esin, E., & Parlak, K. (2014). A retrospective study of fractures in neonatal calves: 181 cases (2002-2012). *Pak Vet J*, 34, 247-250.
- Belge, A., Gönenci, R., Biricik, H.S., & Ormanlı, S. (2000). Buzağılarda doğumsal anomali olguları. *YYU Vet Fak Derg*, 11:23-26.

- Chakraborty, S., Akter, A., Rahman, S., Yesmin, N., Juyena, N.S., & Alam, M. (2023). Congenital digital flexural deformity (knuckling): Epidemiology, the association of trace elements and surgical treatment in neonatal bovine calves. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 10(1): 88–95. doi: 10.5455/javar.2023.j656
- De Amicis, I. (2017). Prevalence, causes, resolution and consequences of bovine dystocia in Italy. *Theriogenology*, 107, 104-108. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.001
- Gençcelep, M., Kuşcu, Y., & Sancak, T. (2017). Congenital tarsocrural subluxation and flexor tendon contracture in a calf. *Van Vet J*, 28 (3), 173-175
- Goodarzi, M., Khamesipour, F., Mahallati, S.A., Karimi, M., Azizi, D., & Azizi, S. (2015). Study on prevalence of bacterial causes in calves arthritis. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science*, 10, 6.
- Han, M.C., & Durmuş, A.S. (2005). Buzağılarda bazı konjenital anomali olguları. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*. 175-177.
- Karabulut, E., Ünsaldı, S., & Durgun, T. (2001). 1991-2000 yılları arasında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniği'ne getirilen buzağılardaki doğumsal anomali olguları. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 15(2): 367-374.
- Kılıç, N., & Tekin, S. (2021). A survey on the diagnosis, prognosis and treatment of congenital flexural deformities in calves. *F.U. Vet. J. Health Sci.* 35 (3): 127-130.
- Oğurtan, Z., Alkan, F., & Koç, Y. (1997). Ruminantlarda konjenital anomaliler. *Türk Vet. Hek. Derg.* 9(4): 24-28.
- Phaneendra, M.S.S.V., Lakshmi, N.D., Kumar, K.M., & Reddy, K.S. (2015). Surgical management of congenital atresia ani (imperforate anus) leading to recto-vaginal fistula in a cow calf. *Int J Sci Environ Tech*, 4:1110-1113.
- Sağlam, K. (2021). Management of congenital flexural tendon contractures with stretching in calves. *J Hellenic Vet Med Soc.* 72(3): 3134-38. doi.org/10.12681/jhvms.28503
- Sağlam, K., Göl, M., Önyay, T., İnal, K.M., Özbakır, B.D., Bağatır, E., & Özak, A. (2023). Congenital anomaly cases in calves. *Med. Weter.* 79(2), 77-82. doi: 10.21521/mw.6715
- Samsar, E., & Akın, F. (2006). Özel Cerrahi Medipres Yayıncılık. 332-337.
- Milli, Ü.H., Hazıroğlu, R.M., & Hazıroğlu, R. (1988). Bir buzağıda artrogripozis, dudak, damak, kalp defektleri ve diğer malformasyonlar. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 35(2- 3)246-252. doi: 10.1501/Vetfak_0000001152
- Vijay, A., Rajkumar, R., Hamsa, Yamini S., Ponnu Swamy, K.K., Venkatesakumar, E., & Venkatesan, M. (2022). Surgical correction of contracted flexor tendon in a two week old Punganur calf. *The Pharma Innovation Journal.* 11(12): 3554-3556.
- Yurdakul, İ., Yalçın, M., & Karataş, Ö. (2020). Bir buzağıda çoklu konjenital anomali olgusu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 17(3): 342-345. doi: 10.32707/ercivet.828882.
- Yurdakul, İ., Kulualp, K., & Yalçın, M. (2021). Buzağılarda tespit edilen cerrahi hastalıkların değerlendirilmesi: 350 olgulu retrospektif bir çalışma *Türk Vet J.* 3 (1): 21-25. doi: 10.51755/turkvetj.884768.



Comparison of Nutrient Composition and Relative Feed Value of Straw from Different Rice Varieties with Varying Plant Heights

Ayşe Gizem Bölükbaş^{1,a}, Bora Bölükbaş^{1,b,*}, Muhammed Waqas^{1,c}, Mustafa Salman^{1,d}, İsmail Kaya^{1,e}

¹ Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye

*Corresponding author

Research Article

History

Received: 26/04/2024
Accepted: 10/06/2024

This study was supported by The Coordination Unit of Scientific Research Projects, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye (PYO.VET.1908.22.003).

ABSTRACT

The objective of this study was to determine and compare the nutrient composition and relative feed value of straw from rice varieties with different plant heights. Straw from three commonly cultivated varieties in Turkey, Vasco (short-stemmed), Cammeo (medium-stemmed), and Efe (long-stemmed), was used (n=4). The results showed that the nutrient content and feed value of rice straw varied significantly among varieties. The highest crude ash (CA) content and the lowest crude protein (CP) content were found in the Efe variety (P<0.001), while the lowest CA and the highest CP content were observed in the Vasco variety (P<0.001). The NDF and ADF contents of the Vasco variety were lower than those of the Cammeo and Efe varieties (P<0.001). In terms of relative feed value, the Vasco variety (75.05) stood out, while the Cammeo variety had the lowest value (61.71) (P<0.001). In conclusion, the short-stemmed Vasco variety was found to have superior nutrient content and feed value compared to the other straw varieties. In light of these findings, it is suggested that rice straw can be a better alternative to wheat straw used in ruminant rations in cases of good quality roughage deficiency, but the variety of rice straw to be used is important.

Keywords: Alternative forage rice straw, ruminant, wheat straw, variety, vasco

Farklı Bitki Boylarına Sahip Çeltik Samanı Çeşitlerinin Besin Madde Bileşimleri ve Nispi Yem Değerlerinin Karşılaştırılması

Süreç

Geliş: 26/04/2024
Kabul: 10/06/2024

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu tarafından desteklenmiştir, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye (PYO.VET.1908.22.003).

Copyright



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Öz

Bu çalışmada farklı bitki boyuna sahip çeltik çeşitlerine ait samanların besin madde bileşimleri ve nispi yem değerlerinin belirlenerek karşılaştırılması amaçlandı. Araştırmada Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen Vasco (kısa saplı), Cammeo (orta saplı) ve (uzun saplı) isimli varyetelerden elde edilen samanlar kullanıldı (n=4). Sonuçlar, çeltik samanları arasında besin madde içeriğinin ve yem değerinin varyeteye göre önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Samanlar arasında en yüksek ham kül (HK) ve en düşük ham protein (HP) içeriği Efe çeşidinde bulunurken, en düşük HK ve en yüksek HP içeriği Vasco çeşidinde tespit edildi (P<0.001). Vasco çeşidinin NDF ve ADF içerikleri, Cammeo ve Efe çeşidine kıyasla daha düşük bulundu (P<0,001). Nispi yem değeri açısından da Vasco çeşidi (75.05) öne çıkarken, Cammeo çeşidi en düşük değeri (61.71) gösterdi (P<0.001). Sonuç olarak çeltik samanları arasında kısa boylu varyete olan Vasco'nun besin madde içeriği ve yem değeri açısından diğer saman çeşitlerine göre daha iyi olduğu tespit edildi. Bu bulgular ışığında çeltik samanının, iyi kaliteli kaba yem eksikliği durumunda ruminant rasyonlarında kullanılan buğday samanından daha iyi bir alternatif olduğunu ancak kullanılacak çeltik samanının varyetesinin önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alternatif kaba yem, buğday samanı, çeltik samanı, ruminant, varyete, vasco

^a aysegizemazel@gmail.com
^c 20282125@stu.omu.edu.tr
^e ismail.kaya@omu.edu.tr

^{iD} 0000-0001-9550-2449
^{iD} 0000-0002-9972-8426
^{iD} 0000-0002-2570-0877

^b bora.bolukbas@omu.edu.tr
^d msalman@omu.edu.tr

^{iD} 0000-0002-0732-0192
^{iD} 0000-0003-0828-5998,

How to Cite: Bolukbas AG, Bolukbas B, Waqas M, Salman M, Kaya İ (2024) Comparison of Nutrient Composition and Relative Feed Value of Straw from Different Rice Varieties with Varying Plant Heights, Turkish Veterinary Journal, 6(1): 7-11

Giriş

Çeltik, buğdaygiller (Gramineae) familyasından, Oryza sativa L. cinsine ait tek yıllık bir bitki türüdür. Çeltik üretiminin bir yan ürünü olarak, hasattan sonra tarlada kalan çeltik samanı dünya genelinde en fazla üretilen yıllık ürün kalıntısı olarak bilinmektedir (Zhao ve ark., 2019). Çeltik samanı, çeltik ekiminin yoğun olduğu Asya ülkelerinde, iyi kaliteli kaba yem eksikliği nedeniyle

ruminant beslemede kısmen kullanılmaktadır. Ancak, çeltik samanı diğer buğdaygil samanları gibi, yapısal hücre duvarı komponentlerini (selüloz, hemiselüloz, lignin) yüksek oranda içermesi sebebiyle rumende yavaş ve sınırlı düzeyde parçalanmaktadır (Bölükbaş & İsmail, 2018). Ayrıca oldukça düşük protein ve enerji içeriği, çeltik samanının ruminant beslemede kullanımını

sınırlamaktadır. Türkiye’de ise buğdaygil samanlarından buğday, arpa, yulaf samanları aynı amaç doğrultusunda ruminant rasyonlarına katılırken çeltik samanı kullanımı yaygın değildir (Bölükbaş & İsmail, 2018). Bunun başlıca ana sebepleri, ülkemizde çeltik üretiminin diğer tahıl ürünlerine göre daha az olması, pazarının oluşturulamaması ve çeltik samanının yetiştiriciler tarafından yeterince tanınmamasıdır. Bu durum, çeltik samanlarının tarlada yakılarak kaynak israfına ve çevre kirliliğine yol açmaktadır.

Son yıllarda çeltik üretiminde dane verimini ve randımanını yükseltmek, kök boğazı, çeltik yanıklığı gibi hastalıklara direnci artırmak ve yetiştirilen bölge şartlarına uyum sağlamak için yapılan ıslah çalışmalarıyla birçok yeni çeltik varyetesi geliştirilmiştir. Dünyada yetiştirilen 40.000’in üzerinde çeltik çeşidi bulunmaktadır (TRA, 2020). Çevresel koşullar ve genetik çeşitliliğe bağlı olarak, bu varyetelerin samanları besin madde içeriği açısından farklılık gösterebilmektedir (Van Soest, 2006). Chowdhury ve ark. (1995), yedi farklı çeltik çeşidine ait samanların (BR3, BR11, pasam, mala, maloti, nizershail ve chandrashail) bazı besin maddelerinde (ham protein, ham yağ), hücre duvarı komponentlerinde ve sindirilebilirliklerinde anlamlı değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak Rahman ve ark. (2010) altı farklı çeltik varyetesine ait samanların (Pajam, Nijershail, Kablabadam, BR 11, BINA 5 ve BRRI 29) organik madde sindirilebilirliklerinde ve ham protein düzeylerinde anlamlı farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar gibi literatürde birçok çeltik varyetesine ait samanların araştırıldığı görülmektedir (Abou-El-Enin ve ark., 1999; Vadiveloo, 2003). Bununla birlikte Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan çeltik varyetelerine ait samanların besin madde kompozisyonlarının ve nispi yem değerlerinin karşılaştırmalı olarak araştırıldığı sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (Akay, 2022).

Bu çalışmada, farklı morfolojik özelliklere sahip çeltik çeşitlerinin samanları kimyasal kompozisyonları açısından farklılık gösterebilir hipotezi doğrultusunda, Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen farklı sap boyutlarına sahip kısa saplı (Vasco), orta saplı (Cammeo) ve uzun saplı (Efe) çeltik çeşitlerinin besin madde bileşimlerinin ve nispi yem değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Yem materyali

Araştırmada; Samsun ilinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından tescil edilmiş, Vasco (kısa boylu varyete), Cammeo (orta boylu varyete), Efe (uzun boylu varyete) çeşitlerinden her bir saman çeşidi için dört farklı numune (n=4) Samsun ili Bafra ilçesindeki çeltik yetiştiricilerinin arazilerinden temin edildi. Çalışmada kullanılan saman çeşitlerinin bazı morfolojik özellikleri aşağıda verilmiştir.

Vasco

Bitki boyu 70-80 cm’dir. Düşük sayıda yaprak içermektedir. Yaprakları dik ve yeşil renklidir. Salkımlar yarı düşük yapıdadır. Çeltik taneleri sarı renkli ve uzundur. Çeltik

bindane ağırlığı 33 g’dır. Olgunlaşma süresi 140-145’gündür.

Cammeo

Bitki boyu 85-90 cm’dir. Bol yapraklıdır. Yaprakları yarı dik ve yeşil renklidir. Salkımlar düşük yapıdadır. Çeltik taneleri sarı renkli ve uzundur. Çeltik bindane ağırlığı 42g’dır. Olgunlaşma süresi 130-135’gündür.

Efe

Bitki boyu 100-110 cm’dir. Orta düzeyde yaprak içermektedir. Yapraklar yarı dik ve yeşil renktedir. Salkımlar yarı dik yapıdadır. Çeltik taneleri sarı renkli ve uzundur. Çeltik bindane ağırlığı 36-37 g’dır. Olgunlaşma süresi 120-125’gündür.

Çizelge 1. Vasco, Cammeo ve Efe çeltik çeşitlerine ait samanların besin madde bileşimleri (% KM)

Table 1. Nutrient compositions of straws of Vasco, Cammeo and Efe rice varieties (% Dry Matter)

	Vasco	Cammeo	Efe	P
Kuru Madde	93,98±0,518	95,54±0,515	95,19±0,274	0.084
Ham Kül	10±0,241 ^c	13,88±0,273 ^b	15,97±0,052 ^a	<0.001
Organik Madde	83,98±0,635 ^a	81,65±0,257 ^b	79,22±0,244 ^c	<0.001
Ham Protein	8,14±0,261 ^a	3,98±0,058 ^b	3,1±0,066 ^c	<0.001
NDF	67,13±0,452 ^b	71,93±0,56 ^a	68,59±0,779 ^b	0,001
ADF	44,61±0,781 ^b	52,89±0,649 ^a	51,36±0,285 ^a	<0.001
ADL	11,54±0,518	12,08±0,413	12,4±0,245	0.361

Çizelge 2. Vasco, Cammeo ve Efe çeltik çeşitlerinin samanlarına ait kuru madde sindirimi, kuru madde tüketimi ve nispi yem değerleri

Table 2. Dry matter digestibility, dry matter consumption and relative feed values of straws of Vasco, Cammeo and Efe rice varieties

	Vasco	Cammeo	Efe	P
KMS, %	54,15±0,608 ^a	47,7±0,505 ^b	48,89±0,222 ^b	<0.001
KMT,%	1,79±0,012 ^a	1,67±0,013 ^b	1,75±0,02 ^a	0,001
NYD	75,05±1,086 ^a	61,71±0,949 ^c	66,33±0,858 ^b	<0.001

Kimyasal Analizler

Arazilerden toplanan saman numuneleri öncelikle 4 cm elekli patozda (Akarsan Y10, Türkiye) parçalandı; daha sonra 1 mm elek çapına sahip değirmende (Labor teknik, HD-702, Türkiye) öğütülerek analizlere hazır hale getirildi. Yemlerin kuru madde (KM) içerikleri 105oC’de 4 saat etüvde (Memert, UNB400, Germany) kurutulularak, ham kül (HK) içeriği ise 550oC’de 4 saat kül fırınında (Carbolite, ELF 11/14B, UK) yakılarak saptandı (AOAC,1995). Azot (N) içeriğinin saptanmasında Kjeldahl

metodundan yararlanıldı (AOAC,1995). Ham protein ise $N \times 6.25$ formülü ile hesaplandı. Yemlerin hücre duvarı bileşenlerini oluşturan nötr deterjan lif (NDF), asit deterjan lif (ADF) ve asit deterjan lignin (ADL) içerikleri ise Van Soest ve ark. (1991) tarafından bildirilen yöntemlere göre ANKOM 200 Fiber Analyzer (Ankom 200, Ankom Technology Corporation, USA) cihazı kullanılarak analiz edildi.

Nispi Yem Değerinin Hesaplanması

Nispi yem değeri (NYD) tam çiçeklenme evresindeki yoncanın ADF (%41) ve NDF (%53) içerikleri temel alınarak hesaplanmakta ve diğer yemler için de referans olarak kabul edilmektedir. İndekste 100 değeri altında kalan yemler düşük kaliteli olarak değerlendirilirken, değer arttıkça yem kalitesi de yükselmektedir. Bu sınıflandırmaya göre, nispi yem değeri 150'nin üzerindeyse en iyi kalite, 125 ile 150 arasındaysa 1. kalite, 103 ile 124 arasındaysa 2. kalite, 87 ile 102 arasındaysa 3. kalite, 75 ile 86 arasındaysa 4. kalite, ve 75'in altındaysa 5. kalite olarak sınıflanır. Nispi yem değeri için gerekli formüller Van Dyke ve Anderson (2000)'den uyarlanarak aşağıda belirtilmiştir.

-Nispi yem değerini hesaplamak için öncelikle samanların ADF değeri kullanılarak kuru madde sindirimi (KMS) belirlendi.

$$\%KMS = 88.9 - (0,779 \times \%ADF)$$

-Kuru madde tüketimi (KMT) NDF değerinden hesaplandı.

$$\%KMT = 120 / NDF$$

-Nispi yem değerini (NYD) hesaplamak için KMS ve KMT değerleri aşağıdaki formülde yerine konuldu.

$$NYD = (\%KMS) \times (\%KMT) \times (0,775)$$

İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen verilerin istatistikleri SPSS 14.01 (IBM, USA) istatistik paket programı kullanılmıştır. Kolmogorov-Smirnov testine göre verilerin normal dağılımı ve Levene Testi ile de varyansların homojenliği tespit edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi, gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için de Duncan Testi kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bulgular

Araştırmada kullanılan çeltik samanı çeşitlerinin besin madde kompozisyonları Tablo 1.'de sunulmuştur. Çeltik samanları arasında en yüksek HK içeriği ve en düşük HP içeriği Efe çeşidinde tespit edildi ($P < 0.001$). En düşük HK ve en yüksek HP içeriği ise Vasco çeşidinde gözlemlendi ($P < 0.001$). Vasco çeşidinin NDF ve ADF içerikleri, Cammeo ve Efe çeşidine kıyasla daha düşük bulundu ($P \leq 0,001$). Tüm çeşitlerin ADL ve kuru madde içerikleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($P = 0,835$).

Değerlendirilen çeltik samanı çeşitlerinin KMS oranları %47.7-54.15 arasında değişim gösterdi. Samanlar arasında ADF oranı en düşük olan Vasco çeşidinin en yüksek KMS değerine sahip olduğu gözlemlenirken ($P < 0.001$), Cammeo ve Efe çeşitlerinin KMS değerleri benzerlik gösterdi. KMT değeri bakımından ise Cammeo çeşidinin Efe ve Vasco çeşitlerine kıyasla daha

düşük olduğu KMT değerine sahip olduğu gözlemlendi ($P = 0,001$).

Samanlara ait NYD değerleri 61.71- 75.05 aralığında olarak bulunmuş olup, en yüksek Vasco çeşidinde (75.05) en düşük Cammeo çeşidinde (61.71) tespit edildi ($P < 0.001$).

Tartışma

Dünyanın farklı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan birçok çeltik varyetesi bulunmaktadır. Bu varyetelere ait samanların kimyasal kompozisyonlarında farklılıklar gözlemlenmektedir. Çalışmada Efe ve Cammeo çeşitlerine ait samanların ham protein (HP) değerleri literatürdeki birçok çalışmada bildirilen çeltik samanı varyetelerinin HP değerleri ile (%3-6) uyumluluk göstermektedir (Ağbagla-Dohnani ve ark., 2001; Syahnar ve ark., 2018; Vadiveloo ve Fadel, 2009). Diğer yandan kısa boylu çeşit olan Vasco'nun HP değeri (%8.14) literatürde yer alan klasik çeltik samanlarına ait HP değerlerine kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu bulgular Akay (2022)'in Vasco gibi İtalyan kökenli kısa boylu varyetelerin HP değerlerinin Cammeo ve Efe çeşitlerine kıyasla daha yüksek olduğunu gösteren çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir. Vasco gibi kısa boylu varyetelerin yetiştiriciliğinde daha yüksek oranda azot uygulamaları yapılmaktadır. Azot, bitkiler için temel bir besin maddesidir ve protein sentezinde önemli bir rol oynar. Daha fazla azot, bitkilerin daha fazla protein üretmesine ve dolayısıyla daha yüksek HP değerlerine sahip olmasına neden olabilir. Vasco'nun yüksek HP değeri, yetiştirilirken aldığı yüksek azot miktarıyla ilişkili olabilir.

Vasco, Cammeo ve Efe samanların HK içerikleri sırasıyla %10.0, %13.88 ve %15.97 olarak bulunmuştur. Bu değerler, Kaliforniya çeşitleri için ortalama %18.6 (Abou-El-Enin ve ark., 1999) ve Asya çeşitleri (Nakashima ve Ørskov, 1990; Vadiveloo ve Phang, 1996) için ortalama %16.6 olarak bildirilen HK değerlerine kıyasla daha düşüktür. Bu durum Avrupa çeşitlerinin daha düşük silika içeriğine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Van Soest, 2006). Ayrıca çalışmada en düşük HK içeriği Vasco çeşidinde tespit edilmiştir. Çeltik samanlarında silika sap kısımlarına kıyasla yapraklarda daha yüksek oranda bulunmaktadır (Ağbagla-Dohnani ve ark., 2003). Kısa varyeteler uzun varyetelere kıyasla daha az yapraklılıkla karakterizedir. Bu sebeple çalışmada en kısa çeşit olan Vasco'nun HK içeriğinin diğer varyetelerden daha düşük olması, yaprak oranının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ağbagla-Dohnani ve ark. (2001) 15 farklı Avrupa çeşit çeltik samanı karşılaştırdığı çalışmada NDF içeriklerinin %76.3 ile %81.4 arasında, ADF içeriklerinin ise %44.5 ile %53.1 arasında tespit etmişlerdir. Çalışmamızdaki çeşitlerin ADF değerleri bu çalışmayla benzerlik gösterirken NDF değerleri daha düşük seyretmiştir. Ayrıca Vasco, Cammeo ve Efe çeşitlerinin NDF ve ADF içerikleri Akay (2022)'in aynı çeşitler için bildirdiği değerlerden daha yüksek seyretmiştir. Diğer yandan çalışmamızda çeşitlere ait NDF ve ADF içerikleri Ravi ve ark. (2019)'nın Hindistan orjinli 15 farklı

çeltik samanı çeşidinde tespit ettikleri değerlerle benzerlik göstermektedir.

Sunulan çalışmada Vasco, Cammeo ve Efe çeltik samanlarının ADL içerikleri Agbagla-Dohnani ve ark. (2001)'nin 15 farklı Avrupa çeşit çeltik samanlarında tespit ettikleri ADL içerikleriyle benzerlik göstermektedir. Ancak literatürdeki verilerin büyük çoğunluğunu oluşturan Güney Asya ve Uzakdoğu çeşitleriyle yapılan çalışmalarda çeltik samanının kuru maddede lignin içeriğinin <%8 olduğunu bildirilmektedir (Vadiveloo ve Phang, 1996; Jahromi ve ark., 2010; Ravi ve ark., 2019). Bu bulgular Van Soest (2006)'in Avrupa çeşitlerinin daha yüksek lignin içerdiği bulgusunu desteklemektedir.

Çeltik samanı yüksek NDF ve ADF içeriğine sahip olduğu için nispi yem değeri (NYD) oldukça düşüktür. Akay (2022) Vasco, Cammeo ve Efe çeşitlerine ait samanların NYD değerlerini sırasıyla 77.86, 78.97 ve 81.35 olarak bildirmiş ve bu NYD değerlerine göre çeltik samanlarını 4. kalite olarak sınıflandırmıştır. Ancak sunulan çalışmada Cammeo ve Efe çeşitlerinin nispi yem değerleri Akay (2022) 'nin bildirdiğinden daha düşük, Vasco çeşidi için benzerlik göstermiş olup çalışmadaki bulgular doğrultusunda bu çeşitlere ait samanlarının 5. sınıf yem değerinde olduğu değerlendirilmiştir. Bu farklılık çeltik samanının yem değeri üzerine etkili olan çok sayıda değişkenden kaynaklanmış olabilir. Örneğin, azot uygulamaları, ekim yoğunluğu ve hasat zamanlaması gibi agronomik yöntemler doğrudan bitkinin besin kompozisyonunu ve dolayısıyla samanın yem değerini etkileyebilir. Aynı zamanda, çevresel faktörler olan toprak türü, su kaynağı ve iklim koşulları gibi unsurlar da çeşitlerin gelişimi üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Bununla birlikte diğer buğdaygil samanları ile yapılan çalışmada Yavuz (2005) buğday samanının NYD değerini 48.6 olarak bildirmiştir. Bu çalışma değerlendirildiğinde çeltik samanlarının buğday samanı ile kıyaslandığında daha yüksek NYD değerine sahip olduğu gözlenmektedir.

Sonuç

Bu çalışma, Vasco, Cammeo ve Efe gibi farklı çeltik çeşitlerinin saman kalitesindeki farklılıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, çeşitler arasında besin madde kompozisyonu ve nispi yem değeri (NYD) açısından önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Özellikle Vasco çeşidi, yüksek HP içeriği ve düşük lif oranları ile dikkat çekmiş, bu da onun daha yüksek NYD değerine sahip olmasını sağlamıştır. Bu bulgular, çeltik samanının ruminant rasyonlarında kullanım potansiyelini artırmak için çeşit seçiminin önemini vurgulamaktadır.

Araştırma, çeltik samanının genel olarak düşük kaliteli yem olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur; ancak, ıslah çalışmaları ve çevresel faktörlerin etkin yönetimi ile bu durumun iyileştirilebileceği belirtilmiştir. Bu çalışma, çeltik samanının kullanımını artırarak kaynak israfını önlemek ve çevre kirliliğini azaltmak amacıyla çeşitli çeltik çeşitlerinin detaylı incelenmesinin gerekliliğini önermektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, çeltik samanının buğday samanı gibi diğer tahıl samanlarına kıyasla genellikle daha yüksek protein içeriği ve düşük lif

içerikleri sunabileceğini göstermiştir. Bu yaklaşım, Türkiye gibi kaliteli kaba yem eksikliğinin yaşandığı koşullarda, çeltik samanının ruminant beslemede diğer buğdaygil samanları yerine kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Çıkar Çatışması

Yazlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Kaynaklar

- Abou-El-Enin O, Fadel J, Mackill D. 1999. Differences in chemical composition and fibre digestion of rice straw with, and without, anhydrous ammonia from 53 rice varieties. *Animal feed science and technology*. 79(1-2):129-136. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00271-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00271-5).
- Agbagla-Dohnani A, Nozière P, Clément G, Doreau M. 2001. In sacco degradability, chemical and morphological composition of 15 varieties of european rice straw. *Animal feed science and technology*. 94(1-2):15-27. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00296-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00296-6).
- Agbagla-Dohnani A, Nozière P, Gaillard-martinie B, Puard M, Doreau M. 2003. Effect of silica content on rice straw ruminal degradation. *The Journal of Agricultural Science*. 140(2):183-192. <https://doi.org/10.1017/S0021859603003034>.
- Akay H. 2022. Grain and straw yield of paddy cultivars and feed quality traits of paddy straw. *Gesunde Pflanzen*. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10343-022-00630-5>.
- AOAC, 1995. Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists 16th.edition pp. 66-88. Washington-DC. USA.
- Bölükbaş B, İsmail K. 2018. Çeltik samanının besin madde bileşimi ve yem değerini artırma yöntemleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 58(2):99-107.
- Chowdhury S, Majid M, Huque K, Islam M, Rahman M. 1995. Effect of variety on yield and nutritive value of rice straw. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 8(4):329-335. <https://doi.org/10.5713/ajas.1995.329>
- Nakashima Y, Ørskov E. 1990. Rumen degradation of straw 9. Effect of cellulase and ammonia treatment on different varieties of rice straws and their botanical fractions. *Animal Science*. 50(2):309-317. <https://doi.org/10.1017/S0003356100004761>
- Rahman M, Alam M, Amin M, Das N. 2010. Comparative study of the nutritive values of the different varieties of rice straw. *Bangladesh Journal of Animal Science*. 39(1-2):75-82.
- Ravi D, IV SR, Jyothi B, Sharada P, Venkateswarlu G, RK RC, Prasad K, Blümmel M. 2019. Investigation of fifteen popular and widely grown indian rice varieties for variations in straw fodder traits and grain-straw relationships. *Field Crops Research*. 241:107566. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.107566>
- Syahniar TM, Ridla M, Jayanegara A, Samsudin AA. 2018. Effects of glycerol and chestnut tannin addition in cassava leaves (*manihot esculenta crantz*) on silage quality and in vitro rumen fermentation profiles. *Journal*

- of Applied Animal Research. 46(1):1207-1213. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1485568>
- TRA, 2020. The rice association: types of rices <http://www.riceassociation.org.uk>. Erişim tarihi: 20.10.2023
- Vadiveloo J. 2003. The effect of agronomic improvement and urea treatment on the nutritional value of malaysian rice straw varieties. *Animal feed science and technology*. 108(1-4):133-146. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00170-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00170-6).
- Vadiveloo J, Fadel J. 2009. The response of rice straw varieties to urea treatment. *Animal Feed Science and Technology*. 151(3-4):291-298. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.03.003>
- Vadiveloo J, Phang O. 1996. Differences in the nutritive value of two rice straw varieties as influenced by season and location. *Animal feed science and technology*. 61(1-4):247-258. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00944-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00944-2).
- Van Dyke N, Anderson P. 2000. Interpreting a forage analysis. Alabama cooperative extension. Circular anr-890. Van soest, pj, jb robertson and ba lewis. 1991. Method for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nostarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 74:3583-3597.
- Van Soest P. 2006. Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality. *Animal Feed Science and Technology*. 130(3-4):137-171. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.01.023>
- Van Soest Pv, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*. 74(10):3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Zhao J, Dong Z, Li J, Chen L, Bai Y, Jia Y, Shao T. 2019. Effects of lactic acid bacteria and molasses on fermentation dynamics, structural and nonstructural carbohydrate composition and in vitro ruminal fermentation of rice straw silage. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 32(6):783. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0543>



Effect of stevioside on in vitro replication of bovine parainfluenza-3 virus

Çağla YILMAZ^{1,a}, Semra GÜMÜŞOVA^{1,b,*}

¹Department of Veterinary Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye

*Corresponding author

Research Article

History

Received: 29/04/2024

Accepted: 10/06/2024

This study summarized from the author's master's thesis. This study was supported by Ondokuz Mayıs University with the project number PYO.VET.1904.21.033.

ABSTRACT

In this study, the antiviral effect of stevioside contained in stevia, a popular plant of recent years, which has previously been shown to be antiviral on human viruses, on BPIV-3 was investigated for the first time. With the new data obtained, it was revealed whether stevioside could be an option in the fight against BPIV-3 infection, which causes significant losses in terms of the national economy and cannot be controlled by vaccination. For this purpose, the nontitotoxic dose of stevioside in MDBK cell culture was determined by cytotoxicity test and the antiviral effect of stevioside on BPIV-3 was determined by titration test in BPIV-3 titers treated and untreated with stevia. According to our results, it was determined that stevia showed an antiviral effect by decreasing the titer of BPIV-3 produced in MDBK cell culture from 10-3.7/0.1ml to 10-1/0.1ml and 100/0.1ml, respectively, when applied at 10µmol/L and 5000 µmol/L, which was measured as noncytotoxic dose.

Keywords: Antiviral effect, BPIV-3, Cytotoxicity, Stevioside

Steviosidin sığır parainfluenza-3 virusun in vitro replikasyonuna etkisi

Süreç

Geliş: 29/04/2024

Kabul: 10/06/2024

Bu çalışma yazarın yüksek lisans tezinden elde edilmiştir. Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.033 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Copyright



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Öz

Bu çalışma ile daha önce insan virusları üzerinde antiviral etkinliği gösterilmiş olan son yılların popüler bitkisi stevianın içeriğindeki steviosidin BPIV-3 üzerindeki antiviral etkisi ilk kez araştırıldı. Ülke ekonomisi açısından önemli kayıplar oluşturan ve aşı ile istenilen kontrolün sağlanamadığı BPIV-3 enfeksiyonu ile mücadelede steviosidin bir seçenek olup olamayacağı elde edilen yeni verilerle ortaya koyuldu. Bu amaçla steviosidin MDBK hücre kültüründeki nonsitotoksik dozu sitotoksikite testi ile belirlendikten sonra BPIV-3 üzerindeki antiviral etkisi stevia ile muamele edilen ve edilmeyen BPIV-3 titreleri titrasyon testi ile belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, stevianın 10 µmol/L ve nonsitotoksik doz olarak ölçülen 5000 µmol/L oranlarında uygulandığında, MDBK hücre kültüründe üretilen BPIV-3'ün titresini 10-3.7/0.1 ml'ten sırasıyla 10-1/0.1 ml ve 100/0.1 ml'ye düşürerek antiviral etki gösterdiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Antiviral Etki, BPIV-3, Sitotoksikite, Stevia

^a yilmazcagla94@hotmail.com

^b 0000-0002-7646-9142

gumusova@omu.edu.tr

000-001-8574-521X

How to Cite: Yılmaz C, Gumusova S (2024) Effect of stevioside on in vitro replication of bovine parainfluenza-3 virus, Turkish Veterinary Journal, 6(1): 12-16

Giriş

Tıbbi bitki olarak kabul edilen *Stevia rebaudiana*, Asteraceae ailesine ait çok yıllık küçük bir çalıdır. Paraguay'ın kuzeydoğusundaki Amambay bölgesine özgü olmakla birlikte 2012 yılından beri Antalya, Adana, Rize, Burhaniye, Söke, Yalova, Hatay ve İzmir' de üretimi

yapılmaktadır. Son yıllarda adını sıklıkla duyduğumuz doğal tatlandırıcı bir bitki olan stevia yüksek oranda fenol, flavonoid ve antioksidan aktivite içerir (Taleie ve ark., 2012). Stevianın antibakteriyel, antiseptik, antihipertansif, antifungal, antienflamatuar ve antitümöral etkinliği olduğu

son yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Mathur ve ark., 2017; Momtazi-Borojeni ve ark., 2017; Ranjan ve ark., 2011; Verma ve ark., 2019). Yapılan bilimsel çalışmalarla, stevianın virus replikasyonunu önlediğini ve virus adsorpsiyonu, penetrasyonu ve hücreler arasındaki yayılımı engelleyerek antiviral aktivite gösterdiği de bildirilmiştir. (Ceole Ligia ve ark., 2018; Kedik ve ark., 2009; Sharma ve ark., 2021; Takahashi ve ark., 2001).

Siğir parainfluenza virusu tip 3 (BPIV-3), siğir herpesvirus tip-1 (BHV-1), bovine respiratuar sinsityal virus (BRSV) ve bovine viral diyare virusu (BVDV) gibi patojenlerle birlikte siğirlerin solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRDC) içerisinde yer alan önemli bir viral etkindir (Fulton ve ark., 2017). Son klasifikasyonda Bovine respirovirus olarak isimlendirilen bovine parainfluenza 3 virusu (BPIV-3), Paramyxoviridae ailesinin Orthoparamyxovirinae alt ailesinin Respirovirus cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Yapılan araştırmalar ile BPIV-3 enfeksiyonunun tüm dünyada ve ülkemizdeki varlığı birçok kez ortaya koyulmuş ve siğirlerde enfeksiyonunun varlığı ile ilgili ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan araştırmalarda ise %18-91.1 arasında değişen oranlarda seroprevalansın olduğu belirlenmiştir (Gay & Barnouin, 2019; Gümüşova ve ark., 2007; Gür, 2019; Leal ve ark., 2019; Yazıcı ve ark., 2019). Ülkemiz besi ve süt siğiri yetiştiriciliği için büyük bir öneme sahip olan BPIV-3, ülke ekonomisi üzerinde oluşturacağı potansiyel risk nedeniyle büyük bir tehdit unsurudur (Gumusova ve ark., 2007). Yapılan literatür taramalarında, stevianın BPIV-3 üzerindeki antiviral etkinliğini gösteren bir araştırmaya rastlanılmaması sebebiyle yaptığımız çalışmada, siğirlerde önemli solunum sistemi semptomları ve ekonomik kayıplara sebep olan BPIV-3 üzerinde steviosidin antiviral etkisi, ticari olarak saflaştırılmış stevia preparatı kullanılarak in vitro ortamda araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Yapılan çalışma, in vitro deney ortamında gerçekleştirilmesi sebebiyle hayvan deneyleri yerel etik kurul (HADYEK) iznine tabii değildir.

Hücre kültürü ve Virus İzolasyonu

BPIV-3'ün izolasyonu, titrasyonu ve steviada sitotoksikite testleri için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattı ve Bovine parainfluenza virus 3 Genotip C (BPIV-3c) (MH357343) kullanıldı. MDBK hücre süspansiyonu hazırlamada ve virus inokulasyonunda kullanılacak MDBK hücrelerini üretmek için MDBK hücre stoklarının koyulduğu hücre kültürü flaskları (25 ve 75 cm²) içerisine hücrenin üretileceği flask hacminin %10'u oranında MEM hücre üretme vasatı (%10 fetal dana serumu ve %1 antibiyotik solüsyonu) ilave edildi ve hücreler 37°C'lik etüve koyularak her gün hücre kültürü mikroskopunda (Olympus, CKX41, Japonya) kontrol edildi. Flask tabanının yaklaşık %80'ini kaplayan hücrelere adsorpsiyonlu yöntemle DKID50 değeri 10-3.5/0.1ml olan BPIV-3 inokulasyonu yapıldı.

Stevianın Non-sitotoksik Dozunun Hesaplanması

Stevia ekstraktı SigmaAldrich (Cat. No: 06295001-500MG, USA) firmasından temin edildi ve Stevianın MDBK hücrelerindeki sitotoksik etkisi, Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda araştırıldı. Bu bağlamda 96 kuyucuklu mikroyuvalara mililitresinde 1×10⁶ MDBK hücresi içeren hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından MEM vasatı içerisinde hazırlanan, stok stevianın farklı konsantrasyonundan (10, 20, 50, 100, 200 ve 5000 µmol/L) 50 µl, kontrol için hazırlanan kuyucuklara ise 50 µl hücre üretme vasatı ilave edilerek pleyletler 37°C'lik etüvede 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda etüveden alınan kuyucukların içerisindeki stevia, pipet yardımı ile hücreye zarar vermeden alınıp, CCK-8 solüsyonundan 10 µl eklendi ve 37°C de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında pleyletler optik yoğunluğu (OD) 450 nanometre (nm) olan mikroyuvala okuyucuda (Tecan Infinite F50) okundu. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve stevianın non sitotoksik dozu "[((OD test-OD blank)/(OD kontrol-OD blank))×100]" formülüne göre hesaplandı.

Mikrotitrasyon testi

Nonsitotoksik dozda stevia uygulanan ve uygulanmayan BPIV-3'ün doku kültürü enfektif dozunun (DKID50) hesaplanması için mikrotitrasyon testi yapıldı (Frey & Liess, 1971). Bu amaçla virusun log₁₀ tabanına göre hesaplanarak bir seri sulandırması yapıp her sulandırma için mikrotitrasyon pleyletinin 4 gözüne 100'er µl koyuldu. Aynı işlem non toksik konsantrasyonlarda (10 ve 5000 µmol/L) stevia ile 24 saat inkübe edilen BPIV-3 içinde tekrarlandı. Takiben sulandırmaların üzerine ml'inde 300.000 (3×10⁵) canlı hücre bulunan hücre süspansiyonundan 50 µl ilave edildi. Hücre kontrol olacak 4 göze 100 µl vasat ve 50 µl hücre süspansiyonu, virus kontrol olacak 4 göze ise 100 µl virus ve 50 µl hücre süspansiyonundan koyuldu. Mikrotitrasyon pleyleti 37°C'lik etüve kaldırıldı. Mikrotitrasyon pleyletleri mikroskop altında CPE oluşumları yönünden her gün gözlemlendi ve virus kontrolün 4 gözünde de CPE oluştuğunda test sonuçları değerlendirildi. Sonuçlar Spearman-Kärber metoduna göre hesaplandı (Thrusfield, 2005).

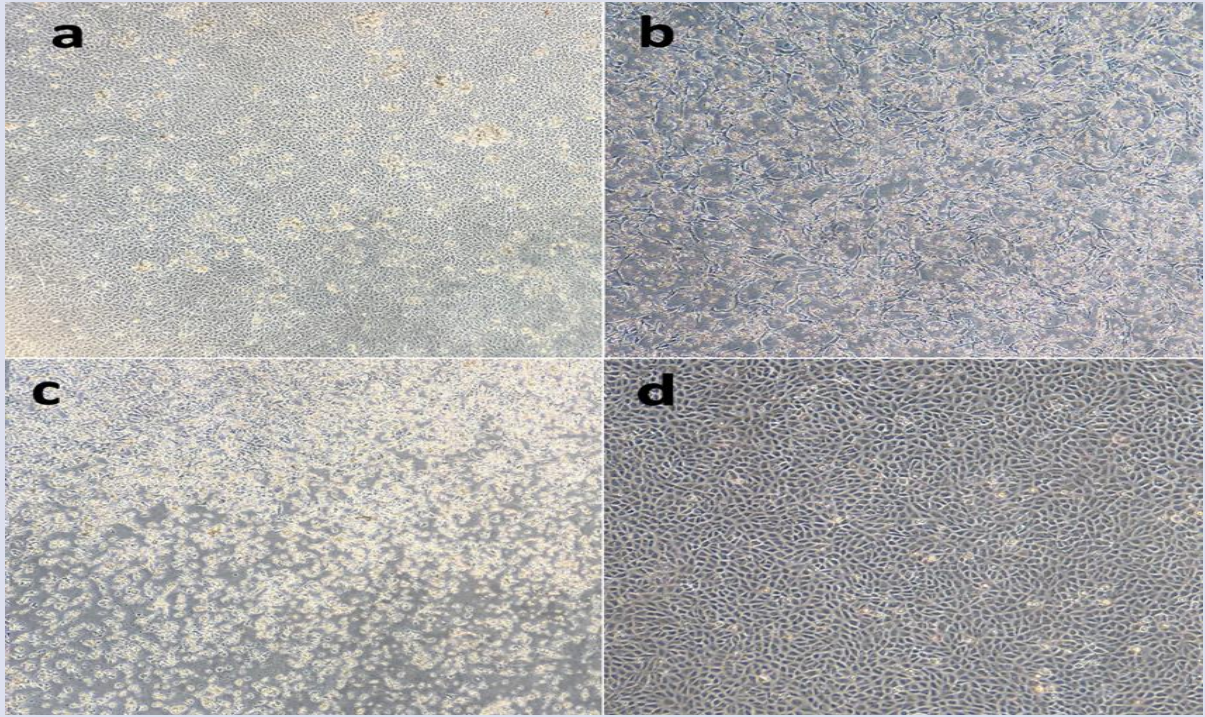
İstatistiksel Analiz

Sitotoksikite denemelerinden (üç tekrar) elde edilen verilerin ortalaması alındı. Ayrıca kontroller ve stevianın farklı dozlarının uygulandığı BPIV-3'lerin viral yük farklılıkları ise titre olarak ifade edildi.

Bulgular ve Tartışma

BPIV-3 İnokulasyonu

MDBK hücrelerine adsorpsiyonlu yöntemle inokulasyonu yapılan BPIV-3, hücre kültürü mikroskopunda kontrol edildi ve 24, 48 ve 72. saatteki görüntüleri fotoğraflandı. Fotoğraflar Resim 1'de gösterildi.

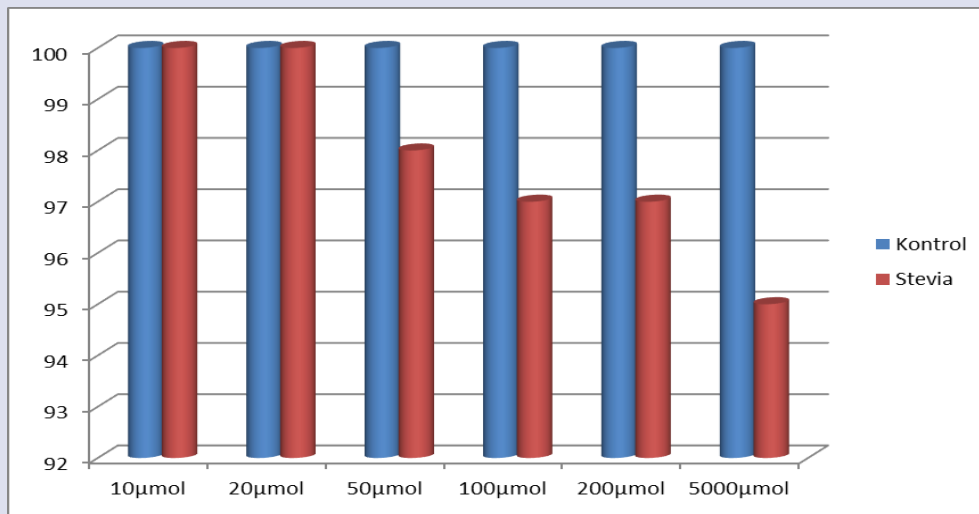


Resim 1. BPIV-3'ün MDBK hücre kültüründe (a) 24., (b) 48., (c) 72. saat görüntüsü ve MDBK hücre kontrol (d) (40X Büyütme)
Figure 1. (a) 24th, (b) 48th, (c) 72nd hour image of BPIV-3 in MDBK cell culture and MDBK cell control (d) (40X Magnification)

Stevianın Sitotoksikite Testi Sonuçları

Stevianın MDBK hücrelerindeki (WST-8) canlılık testi Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich) kullanılarak sitotoksik etkisi belirlendi. Bu amaçla BPIV-3'ün önce 10, 20, 50, 100, 200, 5000 μmol konsantrasyonlardaki sitotoksitesini ölçüldü ve % 97 oranıyla yaklaşık hücre kontrol düzeyinde bir canlılıkla hücre için non sitotoksik olduğu saptandı. Maksimum doz için 5000 μmol den başlayarak saf steviaya kadar farklı sulandırmalarla

yapılan canlılık testlerinde 5000 μmol sulandırmada % 95 oranında canlılık saptanırken 5000 μmol 'den sonraki sulandırmalarda stevianın yüksek konsantrasyonda hücre yüzeyine çökmesi dolayısıyla sitotoksitesini ölçülemedi ve bu nedenle maksimum ve minimum nonsitotoksik doz olan 10 ve 5000 μmol sulandırma basamaklarındaki canlılıklar canlı hücre sayımı ile doğrulanarak antiviral etkinlik için nonsitotoksik doz olarak seçildi. Test sonucundaki hücre sağ kalım oranları Resim 2'de gösterildi.



Resim 2. Stevianın MDBK hücre kültüründe yapılan sitotoksikite testi sağ kalım oranları
Figure 2. Survival rates of stevia cytotoxicity test performed in MDBK cell culture

Mikrotitrasyon Testi Sonuçları

Farklı stevia konsantrasyonları ile muamele edilen ve edilmeyen BPIV -3'ün mikrotitrasyon testi sonunda, stevia uygulanmayan BPIV-3'ün enfeksiyözite gücü 10^{-3.7} /0.1 ml olarak saptanırken farklı konsantrasyonlarda (10-5000 µmol/L) steviosid uygulanan BPIV-3'ün enfeksiyözite gücünün ise 10 µmol/L steviosid uygulanan BPIV-3'de 10⁻¹/0.1 ml' ye düştüğü, 5000 µmol/L stevia uygulanan BPIV-3'de ise virus üremesinin tamamen ortadan kalkarak virusun inaktive olduğu belirlendi (Çizelge 1).

Çizelge 1. BPIV-3'ün MDBK hücre kültüründe stevia uygulanmadan ve farklı dozlarda stevia uygulaması sonrası enfeksiyözite gücü sonuçları

Table 1. Infectious potency results of BPIV-3 in MDBK cell culture without stevia application and after different doses of stevia application

UYGULAMALAR	DKID ₅₀ DEĞERLERİ
BPIV-3	10 ^{-3.7} /0.1 ml
BPIV-3 + 10 µmol/L stevia	10 ⁻¹ /0.1 ml
BPIV-3 + 5000 µmol/L stevia	10 ⁰ /0.1 ml

Stevia, insan sağlığı için birçok faydası kanıtlanmış olan, birincil ve ikincil metabolitler içeren bir bitkidir. Stevianın antihipertansif, antidiyabetik, antioksidan, antienflamatuar, antihiperlipidemik, antionkojenik, antimikrobiyal ve antiviral etkileri birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, stevianın sağlıklı ve kalorisiz olması nedeniyle şeker yerine tatlandırıcı olarak kullanılabilineceği, bitkinin doğal olması sebebiyle zararsız olduğu ve sentetik bileşikler gibi toksik etkiye sahip olmadığı için de birçok hastalığın tedavisi veya önlenmesi için potansiyel bir bitki olabileceği bildirilmiştir (Latarissa ve ark., 2020). Behl ve ark. (2021) yılında yayınladığı derlemede birçok fitokimyasalın viruslarla mücadele etme potansiyeli olduğunu bildirmiştir. Bugün, özellikle koronavirus pandemisi gibi son dramatik olayların ışığında, yeni antiviral ajanlara yönelik kritik bir ihtiyaç oluşmuş ve antiviral aktiviteye sahip yeni terapötik ürünlere olan talep artmıştır. Bu sebeple, yeni potansiyel antiviral ajanların keşfedilmesi ve geliştirilmesi için bitkilerin bu amaçla sistematik olarak araştırılması önemlidir. Stevianın antiviral etkinliğine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Stevia ile yapılan in vitro bir çalışmada, S. rebaudiana'nın yapraklarından elde edilen iki ham polisakkarit olan, 'crude fraction' (SFW) ve 'homojen alkali fraksiyon' (SSFK) nın, Herpes simpleksvirus-1'e (HSV-1) karşı antiviral etki gösterdiği ortaya koyulmuştur. Yapılan çalışmada polisakkarit SFW'nin %50 sitotoksik konsantrasyonu (CC50) 275 g/ml'den ve SSFK'nin 1000 g/ml'den yüksek olduğu bulunmuştur. Ortalama %50 etkili konsantrasyon (EC50) değerleri sırasıyla SFW için 0.3 g/ml ve SSFK için 18.8 g/ml olarak tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, stevianın vero hücre kültürlerinde üretilen HSV-1'in

replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2013). Rotavirus üzerinde stevianın antiviral etkisine bakılan başka bir çalışmada ise stevia ve Sophora flavescens (SV) özlerinin domuzlarda rotavirus üzerinde antiviral etkiye sahip olduğu ve oral yolla verilen SV'nin stevianın bağırsak lümeninde emilimini artırarak rotavirus replikasyonunu inhibe edebildiği ve stevianın, rotavirusun hücresele reseptörlere bağlanmasını inhibe ettiğini in vitro olarak göstermiştir (Alfajaro ve ark., 2014). Stevia ile yapılan bir diğer çalışmada, 2000 µg/ml dozunda stevia ekstraktının domuzların viral ensefalomyelitisi virusunun üremesini 0.5 µg/ml, enfeksiyöz rinotraheitis (IRT) virusunu 0.25 µg/ml ve koronavirus 0.33 µg/ml DKID50' ye, 4000 µg/ml dozda stevia ekstraktının ise, domuzların viral ensefalomyelitisi virusunu 0.75 µg, IRT virusunu 0.5 µg ve koronavirusu 0.66 µg DKID50 ye düşürerek antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (Kedik ve ark., 2009). Sharma ve ark. (2021) tarafından zika virus üzerinde stevianın etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada pentagalloyl glikoz ve steviosid gibi doğal sakkaritlerin yüksek afiniteyle etkileşime girerek konakçı hücreye virus girişini inhibe ettiği ayrıca, Parishin A ve steviosid bileşiklerinin Zika virüsüne karşı potansiyel ilaç olarak kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Stevia rebaudiana bitkisinden elde edilen steviosid gibi birçok fitokimyasalın antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada MDBK hücrelerinde stevianın minimum ve maksimum non sitotoksik dozları olarak ölçülen 10 µmol/L ve 5000 µmol/L dozlarında kullanıldığında, MDBK hücre kültüründe üretilen BPIV-3'ün titresini 10^{-3.7}/0.1 ml den sırasıyla 10⁻¹/0.1 ml ve 10⁰/0.1 ml' ye düşürerek antiviral etki gösterdiği ve. Kedik ve ark. (2009) ve Sharma ve ark. (2021) tarafından yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile benzer olduğu ortaya koyulmuştur. Yaptığımız çalışma ile BPIV-3 virusuna karşı da stevianın potansiyel ilaç olarak kullanılabilineceği ve ileri araştırmalar gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç

Bu çalışma ile BPIV-3 üzerinde antiviral ajan olduğu gösterilen stevianın MDBK hücrelerindeki ölçülebilen maksimum nontoksik dozunun 5000 µmol olduğu ve in vitro şartlarda BPIV-3'ün üremesini durdurarak antiviral etki gösterdiği belirlendi. Bu verilerden yola çıkarak, BPIV-3'ün neden olduğu enfeksiyonun tedavisinde stevianın bir seçenek olarak değerlendirilebileceği, ancak bu konuda hayvan deneylerinin yer aldığı kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, ülke ekonomisi için önemli yeri olan ve sığır yetiştiriciliği için ekonomik önem taşıyan diğer viral hastalıklar için de benzer çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Kaynakça

- Alfajaro M, Rho C, Kim J, Park Jun-G, Kim Deok-S, Hosmillo M, et al. (2014). Anti- rotavirus effects by combination therapy of stevioside and Sophora flavescens extract. *Research in Veterinary Science*, 96 (3), 567- 575.
- Behl T, Rocchetti G, Chadha S, Zengin G, Bungau S Kumar A et al.(2021). Phytochemicals from Plant Foods as Potential Source of Antiviral Agents: An Overview, *Pharmaceuticals*, 14 (4), 381. Ceole Ligia F, Companhoni P, Lopes S, Oliveira B, Gonçalves C, Filho D, (2018). Anti-herpes activity of polysaccharide fractions from Stevia rebaudiana leaves. *Natural Product Research*, 34 (11), 1558-1562.
- Frey HR, Liess B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 18 (1), 61-71.
- Fulton RW, Neill, JD, Saliki JT, Landis C, Burge LJ, Payton ME, (2017). Genomic and antigenic characterization of bovine parainfluenza-3 viruses in the United States including modified live virus vaccine (MLV) strains and field strains from cattle. *Virus Research*, 235, 77–81.
- Gay E, Barnouin J, (2009). A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France. *Preventive Veterinary Medicine*, 89, 265-271.
- Gümüşova S, Yazıcı Z, Albayrak H, Cakiroglu D (2007). Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases. *Acta Veterinaria*, 57, 11-16.
- Gür S. (2019). Sığır, Koyun ve Keçilerin Bovine Parainfluenza 3 Virus Enfeksiyonuna Duyarlılıklarının Saha Şartlarında Serolojik Olarak Karşılaştırılması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 30, 7- 13.
- Kedik SA., Yartsev EI, Stanishevskaya IE. (2009). Antiviral activity of dried extract of Stevia. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43, 198 -199.
- Latarissa IR, Barliana, MI, Lestari K, (2020). A Comprehensive Review of Stevia rebaudiana Bertoni effects on Human Health and Its Mechanism. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 10 (2), 91-95.
- Leal E, Liu C, Zhao Z, Deng Y, Villanov F, Liang L, Li J, Li S (2019). Cuilsolation of a Divergent Strain of Bovine Para influenza Virus Type 3 (BPIV3) Infecting Cattle in China. *Viruses*, 11 (6), 489.
- Mathur S, Neha BPS, Singh, Shekhawat G (2017). Critical Review on Steviol Glycosides: Pharmacological, Toxicological and Therapeutic Aspects of High Potency Zero Caloric Sweetener *International Journal of Pharmacology*, 13, 7, 916- 928.
- Momtazi-Borojeni AA, Esmaeili SA, Abdollahi E, Sahebkar A (2017). A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from Stevia rebaudiana. *Current Pharmaceutical Design*, 23 (11), 1616-1622.
- Oliveiraa B, Cordeirob MC, Alvesa G, Coelec F, Tania U, Iacomini M (2013). Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1!6)-b-D-galactan core from Steviarebaudiana leaves. *Carbohydrate Polymers*, 94 (1), 179–184
- Ranjan R, Jaiswal J, Jena, J (2011). Stevia as a natural sweetener. *International Journal of Pharmacology*, 1 (4), 1199-1202.
- Sharma, N, Kumar P, Giri R (2021). Polysaccharides like pentagalloylglucose, parishin a and stevioside inhibits the viral entry by binding the Zika virus envelope protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (16): 6008-6020.
- Takahashi K, Matsuda M, Ohashi H, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, Mori S, Sato N, Okutani K, Shigeta S (2001). Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. *Antiviral Research*, 49: 15 -24.
- Taleie N, Hamidoghli Y, Rabiei B, Hamidoghli S (2012). Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of Stevia rebaudiana Bertoni *The International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4 (6): 298-302.
- Thrusfield M (2005). *Veterinary epidemiology*. 2nd Edition, Blackwell Science, Oxford, 117-198.
- Verma MK, Kumar N, Rishikant A (2019). Review on the pharmacological properties and medicinal use of Stevia rebaudiana. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 8 (1), 371- 374.
- Yazıcı Z, Gumusova S, Tamer C, Muftuoglu B, Ozan E, Arslan S, Bas O (2017). The first serological report for genotype C bovine parainfluenza 3 virus in ruminant species of mid-northern Turkey: traces from the past. *Tropical Biomedicine*, 36(3), 803–80



Assays Used in The Analysis of Untranslated Regions of Viruses

Seda Gözel^{1,a,*}, Cüneyt Tamer^{1,b}

¹ Department of Veterinary Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye

*Corresponding author

Review Article

History

Received: 10/01/2024

Accepted: 26/02/2024

Acknowledgement

The study was presented in the form of an abstract in the 12th International Istanbul Scientific Research Congress On Health Sciences.

ABSTRACT

Untranslated regions (UTRs) of virus genomes are known to play crucial roles in the post-transcriptional regulation of gene expression, including modulation of the transport of mRNAs out of the nucleus and of translation efficiency, subcellular localisation and stability. Extensive research on the molecular profiling of various diseases has revealed that the significance of untranslated regions of messenger RNAs (mRNAs) in disease progression and susceptibility is greater than previously understood. Therefore, the methods utilised in mapping and detecting these regions have aroused significant interest. Inevitably, further research is needed to acquire a more comprehensive understanding of the mutations in these regions and their potential effects on the progression of the disease. In this review, we focused on highlighting the methodologies used for detection of untranslated regions. These tests are mainly Primer Extension Assay, S1 Nuclease Assay, RNase Protection Assay, and Rapid Amplification of cDNA Ends Assay. These assays serve the purpose of mapping the 5' and 3' termini of an RNA and quantifying the amount of RNA by extending a primer using reverse transcriptase.

Keywords: 5' UTR, 3' UTR, RACE

Protein Kodlanmayan Bölgelerin (Utr) Rolü ve Bu Bölgelerin Haritalanmasında Kullanılan Başlıca Yöntemler

Süreç

Geliş: 10/01/2024

Kabul: 26/02/2024

Teşekkür

Bu çalışma 12. Uluslararası İstanbul Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırmalar Kongresi'nde özet olarak sunulmuştur.

Copyright



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Öz

Virüs genomlarının protein kodlanmayan bölgelerinin (UTR'ler), mRNA'ların çekirdek dışına taşınmasından transkripsiyonun etkili geçmesine kadar ki süreçte ve gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Birçok viral hastalığın moleküler profilinin ortaya çıkarılması, mRNA'ların protein kodlanmayan bölgelerinin predispozisyon ve patogeneizde düşünülenden daha önemli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bu bölgelerin haritalanması ve tespitinde seçilecek yöntemler önem kazanmaya devam etmektedir. UTR'de meydana gelen mutasyonlar ve bunların hastalık oluşumuna etkileri hakkında daha detaylı bilgi edinilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, protein kodlanmayan bölgeler ve bu bölgeleri haritalandırmak için kullanılan testler anlatılmaktadır. Bu testler Primer Extension Testi, S1 Nuclease Testi, RNase Protection Testi ve Rapid Amplification of cDNA Ends Test'i içermektedir. Bu testler, bir RNA'nın 5' ve 3' terminalini haritalamak ve ters transkriptaz kullanarak bir primeri uzatarak belirli bir RNA miktarını ölçmek için kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: 5' UTR, 3' UTR, RACE

^a seda.gozel@omu.edu.tr

^b 0000-0003-2976-5245

^a cuneyt.tamer@omu.edu.tr

^b 0000-0003-3240-8425

How to Cite: Gozel S, Tamer C (2024) Assays Used in The Analysis of Untranslated Regions of Viruses, Turkish Veterinary Journal, 6(1): 17-22

Giriş

5' ve 3' protein kodlanmayan bölgeler (UTR'ler), hücrel homeostazın sürdürülmesi için gerekli olan transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinin önemli noktalarında görev almaktadır. Bu süreçler, belirli düzenleyici unsurların mutasyonu veya yanlış ifade edilmesi sebebiyle ters gittiğinde, gen ekspresyonunun sonraki aşamalarında değişimlere yol açmaktadır (Schuster ve Hsieh, 2019). Transkripsiyon sonrası süreçler, protein ekspresyonundaki varyasyonun yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (Schwanhäusser ve ark.,2011).

5' ve 3' protein kodlanmayan bölgeler (UTR'ler), kritik transkripsiyon sonrası gen düzenleme süreçlerini kontrol eden mRNA alanlarıdır. Transkribe edilen, ancak nadiren translasyona uğrayan bölgeler olarak, 5' ve 3' UTR'ler, pre-mRNA işleme, mRNA stabilitesi ve translasyon başlatma ile ilgili sayısız düzenleyici unsur içerir.UTR'lerin gen ekspresyonunu düzenlemedeki önemi, UTR'yi değiştiren mutasyonların ciddi patolojiye yol açabileceğinin bulunmasıyla vurgulanmaktadır (Matoulova ve ark., 2012).

5' ve 3' UTR'lerin nükleotid kalıpları veya motifleri spesifik RNA-bağlayıcı proteinlerle etkileşime girebilir. Bununla birlikte, DNA aracılı düzenleyici sinyallerin aksine, aktivitelerine esasen birincil yapıları aracılık eder. 5' UTR'lerin ortalama uzunluğu çeşitli taksonomik sınıflarda kabaca sabittir ve 100 ila 200 nükleotid arasında değişirken, 3' UTR'lerin ortalama uzunluğu çok daha değişkendir; bitki ve mantarlarda yaklaşık 200 nükleotidden insan ve diğer omurgalılarda 800 nükleotide kadar değişir. Hem 5' hem de 3' UTR'lerin uzunluğunun bir tür içinde bir düzine nükleotitten birkaç bine kadar çok değişkenlik göstermesi dikkat çekicidir (Pesole ve ark., 2001).

Bir mRNA'nın UTR'lerine karşılık gelen genomik bölge, 5' UTR'de 3' UTR'den daha sık olmak üzere intronlar içerebilir. Bunların doku, gelişim aşaması veya hastalık durumuna göre bol miktarda değiştiği ve gen ifadesi modelini önemli ölçüde etkileyebildiği gösterilmiştir (Grabowski ve Black, 2001).

5' ve 3' UTR dizilerinin baz bileşimi de farklıdır; 5' UTR dizilerinin G+C içeriği 3' UTR dizilerinden daha fazladır. Bu fark, G+C içeriği 5'UTR için yaklaşık %60 ve 3' UTR için %45 olan sıcakkanlı omurgalılarının mRNA'larında daha belirgindir (Pesole ve ark., 1997).

Tüm mRNA boyunca bulunan özellikler çeviri verimliliğini etkileyebilir. 5' UTR'nin yapısal özellikleri mRNA translasyonunun kontrolünde önemli bir role sahiptir. Hepsisi güçlü ve hassas bir şekilde düzenlenmesi gereken büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri veya proto-onkogenler gibi gelişimsel süreçlerde yer alan proteinleri kodlayan haberci RNA'lar genellikle 5' UTR'leri ortalamadan daha uzundur. 3' UTR, sıra ve boyut olarak değişkendir; durdurma kodunu ile poli(A) kuyruğu arasında uzanır. Daha da önemlisi, 3' UTR dizisi, mRNA dönüşümünü, stabilitesini ve lokalizasyonunu belirleyen birkaç düzenleyici motifi barındırır; bu nedenle, transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinin birçok yönünü düzenlemektedir (Kozak, 1987).

Temel olarak, 3' UTR'ler hücrelerde iki önemli işlevi yerine getirir: Birincisi, 3' UTR'ler, ortak transkripsiyonel mRNA'nın işlenme aşamasında bölünme ve poliadenilasyon oluşumunu sağlar. İkincisi ise 3' UTR'ler, hücrelerin çeşitli transkripsiyon sonrası mekanizmalar yoluyla bir mRNA'nın sonraki aşamalarda kaderini belirler. Bu süreci cis-etikili elemanlar ve mRNA stabilitesini ve translasyon etkinliğini modüle edebilen RNA bağlayıcı proteinler ile ortak bir şekilde yürütmektedir. Bölünme ve poliadenilasyon, birincil transkriptlerin olgun mRNA'ların elde edilmesi ve protein ekspresyonu için temel adımlardır (Mitschka ve ark., 2021).

5' UTR , mRNA'ya ribozomların bağlanması ve translasyonu düzenleyen mekanizmalarla ilgili birçok süreçte kritik bir role sahiptir. 5' UTR ile translasyon kontrolü, doğrudan indüksiyonla veya RNA bağlayıcı proteinlere (RBP'ler) bağlanma yeteneğini yok ederek kaynaklanabilir. Bazı RBP'lerin 5' UTR'lere veya 3' UTR'lere bağlanarak pozisyona bağlı bir şekilde UTR dizileri üzerinde farklı şekilde hareket edebileceğine dair kanıtlar vardır. Bu mekanizmanın örnekleri metazoan demir düzenleyici proteinlerdir (IRP'ler). Bunlar 5' UTR'lerle

etkileşime girdiklerinde mRNA translasyonunu inhibe ederken, 3'UTR dizisine bağlandıklarında mRNA'nın stabilitesini artırarak onu degradasyona daha az duyarlı hale getirirler (Kühn, 2015).

Mikrodizilerin ortaya çıkışı ve güçlü biyoinformatik analiz, yalnızca yeni genlerin keşfedilmesine yol açmamış, aynı zamanda mevcut genlerin analizi için araçlar da sağlamıştır. Bu derlemedeki amacımız ise yukarıda anlatılmış olan protein kodlanmayan bölgelerin haritalandırılmasında kullanılan testler hakkında kısaca bilgi vermektir.

Primer Extension Testi

Primer extension analizi ilk olarak P.K. Ghosh ve S.M. Weissman tarafından keşfedilmiştir. Yeni bir gen için başlangıç bölgesini belirlemek amacıyla kullanılabilecek bir yöntem olarak önermişlerdir (Ghosh ve ark., 1978).

Primer extension analizi, RNA transkriptlerinin 5' uçlarını haritalamak, RNA seviyelerini ölçmek ve az yoğunlukta olan RNA türlerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Yöntem, RNA'ya bağımlı DNA polimeraz olarak da bilinen ters transkriptazı kullanır. Tüm DNA polimerazları gibi, bu enzim de hem kopyalanacak bir şablona hem de genişletilecek bir primere ihtiyaç duymaktadır (Shumaker ve ark., 1996).

Primer extension testi, RNA yapısını ve ekspresyonunu analiz etmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikle RNA analizi dört temel adımı içerir; (1) ilgilenilen transkriptleri tamamlayıcı radyoaktif olarak işaretlenmiş bir primerin seçilmesi ve hazırlanması, (2) bu primerin RNA'ların tamamlayıcı bölgesine hibritlenmesi, (3) RNA'yı şablon olarak kullanarak reverse transkriptaz ile katalize edilen primerin uzatılması ve (4) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve ardından otoradyografi kullanılarak uzatılmış DNA ürünlerinin analizi. Primerin 5' ucundan şablonun sonuna kadar olan nükleotit sayısı, bir jel üzerindeki genişletilmiş DNA'ların göç hızından belirlenebilir. Primer, bu RNA transkriptlerinin yoğunluğunun doğru bir şekilde ölçülmesini sağlamak için tamamlayıcı RNA'dan fazla olmaktadır (Boorstein ve Craig, 1989).

Primer extension testindeki en büyük zorluk, ters transkriptazın duraklamasına veya sonlanmasına neden olan RNA bölgeleriyle karşılaşılmasıdır. Ortaya çıkan "kısa duraklar", jel üzerinde orta büyüklükte bantlar olarak ortaya çıkar hem yorumlamayı güçleştirir hem de tamamen uzatılmış primerin verimini azaltır. Bu tür sonlandırma bölgelerine, geniş G-C bakımından zengin RNA uzantıları veya RNA içindeki ikincil yapılar neden olabilir (Carey ve ark., 2013).

S1 Nükleaz Testi

Aspergillus oryzae'den izole edilen S1 nükleaz, tek sarmallı nükleik asitleri 5'-fosfat ve 3'-hidroksil grupları ile mono ve oligonükleotitlere spesifik olarak hidrolize eden bir endodeoksiribonükleaz ve bir endoribonükleazdır. Baz çiftli DNA ve RNA sarmallarının fosfodiester bağları, tek sarmallı nükleik asitlere göre daha yavaş parçalanır (Berk, 1989).

Temel S1 nükleaz haritalama tekniği, bir RNA ile etiketli bir DNA probunun o RNA türüyle hibridize edilmesinden ve hibridize olmayan bölgeleri parçalamak için S1 nükleazın kullanılmasından oluşmaktadır. S1 nükleaz, eşleşmemiş DNA ve RNA'yı parçalayarak, transkripsiyonel başlangıç bölgesinden ilk ekzon bölgesine kadar RNA'nın uzunluğuna karşılık gelen bir parça ortaya çıkaracaktır (Smith, 1993).

Bu teknik, RNA transkriptlerini ölçmek ve haritalamak için kullanılır. Özellikle intronları ve kopyalanan gen bölgelerinin 5' ve 3' uçlarını haritalayabilir. mRNA miktarını ölçebildiğinden dolayı hücredeki genin transkripsiyon seviyesini belirleyebilir. Bunun dışında çift sarmallı RNA'nın varlığını algılayabildiği için RNA girişimini de belirleyebilir (Clark ve Pazdernik, 2013).

Testin mantığı şu şekildedir: Toplam hücresel RNA gibi karmaşık bir RNA numunesi, kodlama dizisinin tümünü veya bir kısmını içeren, radyoaktif olarak işaretlenmiş, saflaştırılmış bir DNA parçasına hibridize edilir. Hibridizasyonun özgülüğünden dolayı, DNA "probu" kompleks karışımda yalnızca tamamlayıcı RNA'ya hibritlenir. Hibridizasyonun ardından reaksiyon ürünleri, hibrit yapıları stabilize eden tuz ve sıcaklık koşulları altında nükleaz S1 ile parçalanır. S1 hem bir ribonükleaz hem de bir deoksiribonükleaz olduğu için hibritleşmemiş RNA da parçalanır. S1 dirençli RNA etiketli DNA hibritleri daha sonra etanol çöktürmesi ile geri kazanılır (Smith, 1993).

Reaksiyon sonunda, kalan DNA-RNA hibritleri daha sonra jel elektroforezi ile ayrılır ve otoradyografi ile görselleştirilir. Yöntem, RNA'ları ölçmek, intronların konumlarını haritalamak ve klonlanmış DNA şablonları üzerindeki mRNA'ların 5' ve 3' uçlarının konumlarını belirlemek için kullanılabilir (Green ve Sambrook, 2021).

S1 nükleaz bazen RNA/DNA hibridinin uçlarını hafifçe bozabilir veya tek sarmallı bölgeleri tam olarak parçalamayabilir. Sonuç olarak, S1 nükleaz yöntemi, primer extension testi kadar doğru sonuç vermeyebilir. Bununla birlikte, primer extension testi bir transkriptin 3' ucunu tespit edemez ve bunun için en iyi yol S1 nükleaz haritalamasıdır.

RNASE Protection Testi

RNase Protection testi, 1980'lerin başında, belirli bir nükleotitte başlatılan mRNA transkriptlerinin nicelleştirilmesinin tespiti için geliştirilmiştir. Metodun daha sonraki yıllarda transkripsiyon başlangıç yerlerini tanımlamak için de yararlı olduğu kanıtlanmış ve ayrıca RNA 3' uçlarının tasviri için de kullanılabilirliği tespit edilmiştir (Gilman, 1993).

RNase protection testi (RPA) sadece düşük yoğunlukta ve dokuya özgü mRNA ekspresyonunun kantitasyonu için değil, aynı zamanda ekzon – intron sınırlarının haritalanması, transkripsiyon başlatma ve sonlandırma yerlerinin tespiti için de kullanılan bir yöntemdir. RPA nispeten basit, yüksek oranda tekrarlanabilir ve son derece hassastır. En önemlisi, hedef mRNA seviyelerinin tespiti ve miktarının belirlenmesi için en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. RPA'nın bir diğer önemli

avantajı, çoklu mRNA transkriptlerini aynı anda saptama ve nicelendirme kapasitesi olmasıdır. Aynı numunede birkaç mRNA'nın eşzamanlı ölçümü, gelişimsel olarak düzenlenen gen ekspresyonu çalışmaları ve koordineli hücre içi sinyal yollarının transkripsiyonel kontrolünün anlaşılması için yararlı bir araç sağlamaktadır (Emery, 2007).

RNase (RPA), spesifik hücresel mRNA'ların hızlı tespiti, haritalanması ve miktarının belirlenmesi için önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır. Bu teknik, ribonükleazların, aynı kökenli hedef mRNA'ya hibridize edilmiş bir radyo-etiketli antisens RNA probunu bozulmamış halde korurken, bir hücresel mRNA havuzundan hibritleşmemiş tek sarmallı RNA'yı indirgeme yeteneğine bağlıdır (Belin, 1996).

İlgili geni veya bunun bir kısmını içeren bir DNA segmenti, antisens RNA'nın sentezine yol açan bir plazmid vektörünün klonlama bölgesine klonlanır. Plazmid, bir restriksiyon enzimi ile ayrılır ve lineerleştirilmiş plazmid daha sonra uygun bakteriyofaj polimeraz ile kopyalanır. Dahil edilmemiş radyoetiket, amonyum asetat varlığında tekrarlanan etanol çöktürmesi ile RNA probundan çıkarılır. Antisens radyoetiketli RNA probunun fazlası daha sonra hücresel mRNA'ya hibridize edilir. Hibritleşmemiş RNA, serbest probu çıkarmak için bir RNase A ve T1 karışımı ile parçalandıktan sonra, radyo-etiketli RNA:RNA hibriti, denatüre edici poli-akrilamid jel elektroforezi ve otoradyografi ile tespit edilir (Carey ve ark.,2013).

Bu tekniğin, parvovirüsler tarafından üretilen çeşitli alternatif olarak eklenmiş RNA'ları haritalamak ve ölçmek, alternatif ekleme ve alternatif poliadenilasyon arasındaki bağlantıları anlamak için kolay bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Enfeksiyon sırasında parvovirüsler tarafından üretilen pre-mRNA'ların alternatif eklenmesi ve poliadenilasyonunun incelenmesi için RPA'lar kullanılmaktadır (Venkatesh ve ark., 2012).

RNase protection prosedürü, primer extension testine bir alternatif olarak önerilmektedir. Primer extension ve RNase protection testi farklı prensiplere dayandığından ve farklı tipte deneySEL ürünlere duyarlı olduğundan, bir transkripsiyon başlangıç yerinin belgelenmesi için genel-likle her ikisinin de kullanılması önerilmektedir. RNase protection testi, primer extension testinden daha fazla zaman alır, ancak 5' Rapid Amplification of cDNA Ends testi (RACE) haricinde, genellikle başlangıç yeri lokalizasyonu için en hassas yöntemdir (Ma ve ark., 1996).

RNase protection testi prosedürünün birincil dezavantajı, hibridizasyon ve parçalama koşullarının ampirik olarak belirlenmesi gerektiğinden, yeni bir gen için tahlilin oluşturulmasının zor olabilmesidir. Ayrıca radyo-etiketli prob, istenmeyen RNase'a dirençli ürünler üretebilen kararlı ikincil yapıların oluşumuna karşı hassastır. Son olarak, yüksek spesifik aktiviteye sahip radyoaktif işaretli prob, hızla radyolize maruz kalma eğiliminde olduklarından yalnızca birkaç gün kullanılabilir. Bunun aksine, primer extension testi için işaretlenmiş oligonükleotit primerleri genellikle bir aya kadar kullanılabilir (Zhao ve ark., 2020).

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Testi

RACE testini 1988 yılında Frohman ve arkadaşları geliştirmiştir. Bir cDNA molekülündeki tek bir kısa sekans ile bunun bilinmeyen 3' veya 5' ucu arasındaki bölgenin amplifikasyonu ve klonlanmasını sağlayan bu tekniğin bir uygulamasını tasarlamışlardır. Burada, "cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu" (RACE) olarak adlandırılan bu stratejinin faydasını, erken fare embriyosunda düşük yoğunlukta eksprese edilen int-2 geninin transkriptlerini temsil eden klonları elde etmek için kullanarak göstermişlerdir (Zhang ve Frohman, 1997).

RACE, sırasıyla mRNA ve cDNA ile başlayan transkriptlerin uçlarını çoğaltmak için öncelikle RT-PZR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) reaksiyonlarını kullanır. RACE gerçekleştirmek için ilgili mRNA'nın kısmi veya tam dizisi bilinmelidir. Bu, amplifikasyonlar için kullanılacak Gene Spesifik Primerleri (GSP'ler) oluşturmak için gereklidir. Mesajın bilinmeyen ucundan 3' ucunun bilinen bölgesine uzanan ikinci bir primer seti, poli (A) kuyruğu (veya ekli bir homopolimer) tarafından sağlanırken, 5' sonu ekli homopolimer kuyruğu için kullanılır. "Klasik" ve "yeni" RACE arasındaki ilk ve belki de en önemli fark burada yatmaktadır. Klasik RACE'de, homopolimer, mRNA ters kopyalanırdıktan sonra eklenirken, "yeni" RACE'de homopolimer, ters transkriptaz reaksiyonundan önce eklenir. Bu basit fark, tam uzunlukta olmayan ürünlerin amplifikasyonunu ortadan kaldırır ve bu da transkripsiyon başlangıç yerlerini belirleme yeteneğini büyük ölçüde geliştirir. mRNA, cDNA'ya ters transkribe edildikten sonra, 5' ve 3' uçları, gene özgü primerler ve RNA oligonükleotid dizisinden (eklenmiş homopolimer) türetilen primerler kullanılarak iki nested PZR kullanılarak amplifiye edilir. Ardışık nested PZR kullanılması istenmeyen ürünlerin amplifikasyonunu azaltmak için önemlidir, çünkü her reaksiyonda primerlerden sadece biri ilgilenilen gene özgüdür ve diğeri başlangıç karışımında bulunan tüm cDNA'lara bağlanır (Yeku ve Frohman, 2011).

Başlangıç mRNA karışımı, shrimp alkaline fosfat (SAP) ile defosforile edilir. Bu, bozulmuş ve kapaksız mRNA'ları defosforile ederek, metillenmiş "G" başlıkları bozulmamış tam uzunluktaki mRNA'ları bırakır. Metillenmiş "G" başlığı daha sonra tütün asidi pirofosfat (TAP) ile çıkarılır. TAP ile yapılan işlem, mRNA'nın fosforile edilmiş 5' ucunu açığa çıkarır ve onu bağlayıcıya veya homopolimere ligasyon için hazırlar. Doğrusallaştırılmış bir plazmidin in vitro transkripsiyonu ile hazırlanan kısa bir sentetik RNA, T4 RNA ligaz kullanılarak kapaksız 5' ve 3' uca bağlanır. Bozulmuş veya diğer tam uzunlukta olmayan mRNA, fosforile edilmedikleri için sentetik oligonükleotid ile bağlanmayacaktır. mRNA-RNA oligonükleotid hibritleri daha sonra bir GSP kullanılarak ters kopyalanır. Önceki adımdan üretilen tam uzunluktaki cDNA daha sonra 5' ve 3' uçlarında tam uzunluktaki cDNA uçlarını çoğaltmak için kullanılabilen spesifik diziler içerir. Tam uzunluktaki cDNA ürününü yüksek özgüllükle çoğaltmak için iki Nested PZR kullanılır (Frohman, 1990).

Klasik RACE; 3' uç kısmi cDNA klonları oluşturmak için, mRNA, 17 nt oligo (dT) ve ardından birçok raporda bir "anchor" primeri olarak gösterilen özgün bir 35 bazlı oligonükleotid dizisi içeren bir "hibrit" primer kullanılarak ters transkripsiyona tabi tutulur. Daha sonra amplifikasyon, artık her bir cDNA'ya 3' ucunda bağlanan bu sekansın (Qo) bir kısmını içeren bir primer ve ilgili genden türetilen bir primer (GSP1) kullanılarak gerçekleştirilir (Fromont-Racine ve ark., 1993). Daha sonra spesifik olmayan ürünlerin amplifikasyonunu bastırmak için "nested" primerler (Qr ve GSP2) kullanılarak ikinci bir amplifikasyon döngüsü gerçekleştirilir. 5' uçlu kısmi cDNA klonları üretmek, birinci sarmal ürünleri oluşturmak için gene özgü bir primer kullanılarak ters transkripsiyon gerçekleştirilir. Ardından, terminal deoksiniükleotidiltransferaz (TdT) ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) kullanılarak bir poli (A) kuyruğu eklenir. Amplifikasyon daha sonra, cDNA'nın ikinci sarmalını, Qo primerini ve ters transkripsiyon için kullanılan yukarıda gene spesifik bir primeri oluşturmak için hibrit primer QT kullanılarak gerçekleştirilir. Son olarak, özgüllüğü artırmak için nested primerler (Qr ve GSP2) kullanılarak ikinci bir PZR döngüsü seti gerçekleştirilir (Frohman, 1994).

Yeni RACE, "anchor" primerinin ters transkripsiyon adımından önce mRNA'nın 5' ucu-na bağlanmasıyla Klasik RACE'den ayrılır; dolayısıyla anchor sekansı, ancak ve ancak ters transkripsiyon ilgili mRNA'nın tüm uzunluğu boyunca ilerlerse birinci sarmal cDNA'ya dahil olur. Yeni RACE'e başlamadan önce, mRNA, buzağı bağırsak fosfat (Crf) kullanılarak bir fosforilasyon adımına tabi tutulur. Bu adım aslında uçlarında metil-G başlıkları bulunan tam uzunluktaki mRNA'lara hiçbir şey yapmaz; ancak uçlarında kapaksız olan bozulmuş mRNA'ları defosforile eder. Bu, sonraki ligasyon adımı sırasında bozulmuş RNA'yı biyolojik olarak inert hale getirir, çünkü reaksiyonu yürütmek için fosfat grubu gereklidir. Tam uzunluktaki mRNA'lar daha sonra tütün asidi pirofosfat (TAP) kullanılarak açılır ve bu da onları aktif ve fosforile edilmiş bir 5' ucuyla bırakır. T4 RNA Ligaz kullanılarak, bu mRNA daha sonra lineerleştirilmiş bir plazmidin in vitro transkripsiyonu ile üretilmiş kısa, sentetik bir RNA oligo'ya bağlanır. RNA oligo-mRNA hibritleri daha sonra birinci iplikçikli cDNA'yı yaratmak için gene özgü bir primer veya rastgele primerler kullanılarak ters kopyalanır. Son olarak, 5' cDNA ucu, ilave gen-spesifik primerler ve RNA oligo dizisinden türetilen primerler kullanılarak iki nested PZR ile amplifiye edilir (Volloch ve ark., 2011).

Yeni RACE yaklaşımı ayrıca 3' cDNA uçları oluşturmak için kullanılabilir ve özellikle poliadenile olmayan RNA'lar için yararlıdır. Kısaca, sitoplazmik RNA fosforile edilir ve yukarıda açıklandığı gibi kısa, sentetik bir RNA oligo'ya bağlanır. Oligonun RNA'nın 5' ucuna bağlanması yukarıda vurgulanmış olmasına rağmen, RNA oligoları aslında sitoplazmik RNA'ların her iki ucuna da bağlanır. Ters transkripsiyon adımı için, RNA oligo dizisinden türetilen bir primer kullanılır. Sitoplazmik RNA'ların 3' ucuna bağlanan RNA oligolarının ters transkripsiyonu, 3' ucuna eklenmiş RNA oligo dizisine sahip cDNA'ların yaratılmasıyla

sonuçlanır. 5'ten 3' yönüne yönlendirilmiş gene özgü primerler ve Yeni RACE primerleri, 3'ü çoğaltmak için nested PZR kullanılabilir (Tessier ve ark., 1986, Liu ve Gorovsky 1993).

RACE klonlaması birkaç nedenden dolayı avantajlıdır. İlk olarak, cDNA kitaplıklarının taranması, tek tek cDNA klonlarının elde edilmesi ve eksik dizinin mevcut olup olmadığının saptanması için klonların analiz edilmesi haftalar alır; bu metot kullanılarak, bu tür bilgiler birkaç gün içinde üretilebilir. Sonuç olarak, tam uzunluktaki cDNA'lar üretilip gözlemlenene kadar RNA hazırlama veya ters transkripsiyon koşullarını değiştirmek pratik hale gelir. Ek olarak, genellikle bir ila birkaç cDNA klonunun geri kazanıldığı kitaplık ekranlarının aksine, RACE kullanılarak esasen sınırsız sayıda bağımsız klon üretilebilir (Wang ve Young, 2003).

Sonuç

Sonuç olarak, mRNA'ların protein kodlanmayan bölgeleri gen düzenlemesinin birçok noktasında önemli rollere sahiptir. Belirli bir genin düzenlenmesinde rol oynayan faktörlerin anlaşılması, moleküler tedaviler tasarlanırken veya bir genin ekspresyonunu belirlerken büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple bu bölgelerin haritalandırılması, tespit edilmesinde kullanılan yöntemler gün geçtikçe daha da önem kazanmaya devam etmektedir. Dolayısıyla yukarıda bahsedilen testler bu bölgelerde meydana gelen mutasyonlar ve hastalığın oluşumu üzerine etkilerini belirlemek için kullanılacak metotlardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Kaynaklar

Bartlett & D. Stirling (Eds.). PCR Protocols, Humana Press., Totowa, NJ. 105-115.

Belin, D. (1996). The RNase protection assay. In Basic DNA and RNA Protocols, Springer, 131-136.

Berk, A. J. (1989). Characterization of RNA molecules by S1 nuclease analysis. In Methods in Enzymology, Academic Press, 334-347. doi: 10.1016/0076-6879(89)80110-7.

Boorstein, W. R., Craig, E. A. (1989). Primer extension analysis of RNA. In Methods in Enzymology, Academic Press, 347-369. doi: 10.1016/0076-6879(89)80111-9.

Carey, M. F., Peterson, C. L., Smale, S. T. (2013). The primer extension assay, Cold Spring Harb Protoc, 164-173. doi:10.1101/pdb.prot071902.

Clark, D. P., Pazdernik, N. J. (2013). Chapter 19 - Analysis of Gene Expression. In D. P. Clark, N. J. Pazdernik (Eds.), Molecular Biology (Second Edition), 581-614, Academic Press, Boston.

Emery, P. (2007). RNase Protection Assay. In E. Rosato (Ed.), Circadian Rhythms: Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 343-348.

Frohman, M. A. (1990). RACE: rapid amplification of cDNA ends. PCR protocols. A guide to methods and applications, 28.

Fromont-Racine, M., Bertrand, E., Pictet, R., Grange, T. (1993). A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. Nucleic Acids Res 21, 1683-1684. doi:10.1093/nar/21.7.1683.

Ghosh, P., Reddy, V., Swinscoe, J., Lebowitz, P., Weissman, S. (1978). Heterogeneity and 5'-terminal structures of the late RNAs of simian virus. Journal of molecular biology, 126(4), 813-846. doi:10.1016/0022-2836(78)90022-0.

Gilman, M. (1993). Ribonuclease protection assay. Current protocols in molecular biology, 24(1), 4.7. 1-4.7. 8. doi:10.1002/0471142727.mb0407s24.

Grabowski PJ, Black DL. (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. Prog Neu-robiol, 65, 289-308. doi:10.1016/S0301-0082(01)00007-7.

Green, M. R., Sambrook, J. (2021). Mapping RNA with Nuclease S1. Cold Spring Harb Pro-toc, 2021(5). doi:10.1101/pdb.prot101824.

Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic acids research, 15(20), 8125-8148. doi:10.1093/nar/15.20.8125.

Kühn, L. C. (2015). Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. Metallomics, 7(2), 232-243. doi:10.1039/c4mt00164h.

Liu, X., Gorovsky, M. A. (1993). Mapping the 5' and 3' ends of Tetrahymena thermophila mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE). Nucleic Acids Res, 21, 4954-4960. doi:10.1093/nar/21.21.4954.

Ma, Y. J., Dissen, G. A., Rage, F., Ojeda, S. R. (1996). RNase protection assay. Methods, 10(3), 273-278. doi:10.1006/meth.1996.0102

Matoulikova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. RNA Bio-logy, 9(5), 563-576. doi:10.4161/rna.20231.

Mitschka, S., Fansler, M. M., & Mayr, C. (2021). Chapter Eighteen - Generation of 3'UTR knockout cell lines by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. In B. Tian (Ed.), Methods in Enzymology, Vol. 655, pp. 427-457. doi:10.1016/bs.mie.2021.03.014.

Tessier, D. C., Brousseau, R., Vernet, T. (1986). Ligation of single-stranded oligodeoxyribo-nucleotides by T4 RNA ligase. Anal Biochem, 158, 171-178. doi:10.1016/0003-2697(86)90606-8.

Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. Gene, 276, 73-81. doi:10.1016/S0378-1119(01)00674-6.

Pesole G, Liuni S, Grillo G, Saccone C. (1997). Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Gene, 205, 95-102. doi:10.1016/S0378-1119(97)00407-1.

Schuster, S. L., Hsieh, A. C. (2019). The Untranslated Regions of mRNAs in Cancer. Trends in cancer, 5(4), 245-262. doi:10.1016/j.trecan.2019.02.011.

- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., ... & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337-342. doi:10.1038/nature10098.
- Shumaker, J. M., Metspalu, A., Caskey, C. T. (1996). Mutation detection by solid phase primer extension. *Human mutation*, 7(4), 346-354. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:4<3C346::AID-HUMU9%3E3.0.CO;2-6.
- Smith, D. R. (1993). *S1 Nuclease Protection Mapping. Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ., 363-372.
- Venkatesh, L. K., Fasina, O., Pintel, D. J. (2012). RNAse mapping and quantitation of RNA isoforms. *RNA Abundance Analysis*, Springer, 121-129.
- Volloch, V., Schweitzer, B., Zhang, X., Rits, S. (1991). Identification of negative-strand complements to cytochrome oxidase subunit III RNA in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10671-10675. doi:10.1073/pnas.88.23.10671.
- Yeku, O., Frohman, M. A. (2011). Rapid amplification of cDNA ends (RACE). In *RNA*, Springer, 107-122.
- Zhao, J., Tang, J., Elfman, J., Li, H. (2020). RNase Protection Assay. In *Chimeric RNA*, Springer, 109-116.
- Zhang, Y., Frohman, M. A. (1997). Using rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain full-length cDNAs. In *cDNA library protocols*, Springer, 61-87.
- Wang, X., Scott Young, W. (2003). Rapid Amplification of cDNA Ends. In J. M. S.



Embryo Migration in Mares

Buşra ÖZMEN^{1,a}, İbrahim DOĞAN^{1,b,*}

¹Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Uludag University, Bursa, Türkiye

*Corresponding author

Review Article

History

Received: 29/04/2024

Accepted: 10/06/2024

ABSTRACT

A number of complex interrelated biological mechanisms exist between the equine embryo and the uterus. In mares, fertilization occurs between the ampulla and isthmus sections of the oviduct, and 5-6 days after ovulation, the embryo crosses the oviduct and comes to the uterus. Prostaglandin E2 and prostaglandin F2 α secreted by the embryo allow the passage of the embryo through the uterotubular junction. The embryonic vesicle is mobile in the uterine lumen from days 9 to 14, and from days 15 to 17 it is fixed in the caudal of the flexure zone between the corpus and any uterine horn, and immediately after which orientation is formed. It provides an operational solution to physicians in the migration of the horse embryo in the uterine lumen and further elucidation of the fixation processes, in cases of twin embryos, which is a chaotic problem in pregnant mares, and in the supervision of reproduction such as intrauterine device applications.

Keywords: Mare, Embryo migration, Mobility, Fixation, Uterus

Kısraklarda Embriyo Migrasyonu

Süreç

Geliş: 29/04/2024

Kabul: 10/06/2024

Copyright



This work is licensed under
Creative Commons Attribution 4.0
International License

ÖZ

At embriyosu ile uterus arasında birbirile ilişkili bir dizi karmaşık biyolojik mekanizma mevcuttur. Kısraklarda fertilizasyon oviduktun ampulla ile istmus bölümleri arasında meydana gelir ve ovulasyondan 5-6 gün sonra embriyo ovidukt kanalını geçerek uterusu gelir. Embriyo tarafından salgılanan prostaglandin E2 ve prostaglandin F2 α uterotubuler kavşaktan embriyonun geçişine izin verir. Embryonik vezikül uterus lümeninde 9-14. günler arasında mobildir ve 15-17. günler arasında korpus ile herhangi bir kornu uteri arasındaki fleksür bölgesinin kaudalinde sabitlenir ve hemen sonra oryantasyon şekillenir. At embriyosunun uterus lümeninde migrasyonu ve fiksasyon süreçlerinin daha fazla aydınlatılması, gebe kısraklarda kaotik bir sorun olan ikiz embriyo olgularında ve intrauterin cihaz uygulamaları gibi üremenin denetlenmesi konularında hekimlere operasyonel bir çözüm sunar.

Anahtar Kelimeler: Kısrak, Embriyo migrasyonu, Mobilite, Fiksasyon, Uterus

^a busraozmen094@gmail.com

^b 0009-0004-2970-7277

^b idogan@uludag.edu.tr

^b 0000-0003-1976-1814

How to Cite: Özmen B, Doğan İ (2024) Embryo Migration in Mares, Turkish Veterinary Journal, 6(1): 23-30

Giriş

Kısrakların üreme sistemi, yaşamları boyunca fizyolojik ve endokrinolojik olarak ritmik değişikliklere uğrar ve bu da onları diğer türler arasında benzersiz kılar. Kısraklarda embriyo migrasyonu ve ikiz embriyolar uzun yıllar boyunca birçok araştırmacının dikkatini çeksede bu alandaki birçok konu 1980'lere kadar belirsizliğini korumuştur. Transrektal ultrasonografiyle 1980'lerden sonra kısrakların genital organlarının gerçek zamanlı görüntülenmesi bu alanda pek çok dinamiğin anlaşılmasını sağlasa da (Betteridge, 2000) çoğu fenomen hala aydınlatılamamıştır. Ancak yapılan birçok araştırma sonucunda, günümüzde kısraklarda reproduksiyon artık daha iyi kontrol edilebilmektedir (Ginther, 2021a).

Kısraklarda üremeyi kontrol etmeye yönelik girişimler üreme sezonunun başında veya üreme sezonunda yapılabilir. Üremenin denetlenmesinde hem aşım sezonuna giriş süresini hemde gebelik başına düşen aşım

sayısını azaltmak ve ayrıca embriyo transferinde alıcı ve verici hayvanları senkronize etmek gibi birçok farklı amaç bulunsa da gösteri ve yarış atları için en önemli hedef östrusların baskılanmasıdır (Gradil ve ark., 2021). Bu hedef gerek yarış öncesi gerek yarış esnasında koordinasyonu sağlamak gerekse ovulasyon kaynaklı ağrıyla oluşabilecek topallıkları engellemek amacıyla son derece önemlidir. Bu nedenlerle kullanılan intrauterin cihazlar ve uterus bilyeleri uzun yıllar araştırma konusu olmuştur. Ancak bu uygulamaların temel prensibi, kısraklara özgü bir fenomen olan ve fiksasyona kadar devam eden embriyo hareketliliğini ve sinyallerini taklit etmeleridir (Piotrowska-Tomala ve ark., 2024). Bunlara ek olarak at yetiştiriciliğinde ikiz embriyolar da istenmeyen bir durumdur çünkü hem kısrakta hem de doğan taylarda pek çok soruna neden olur (Ginther, 2022). Bu yüzden kısraklarda ikizliği azaltmak veya önlemek için çeşitli yetiştirme stratejileri geliştirilmiştir (McKinnon ve ark.,

1988). Bu derleme kapsamında kısırlıklarda erken embriyo gelişimi ve hareketliliği, fiksasyon fizyolojisi, ikiz embriyolar konularına değinilecek, ardından ikiz embriyoların manipülasyonu ve östrusun ertelenmesinde intrauterin cihazlar hakkında kısaca bilgi verilecektir.

Embriyonun ovidukt-uterus migrasyonu

Atlarda ovulasyon ve fertilize olan ve olmayan oositlerin taşınması, diğer evcil türlerle karşılaştırıldığında dikkat çeken bazı farklılıklar içerir. Kısırlıklarda ovulasyonu tetikleyen kesin bir hormonal uyarı yoktur. Atlarda preovulatör folikülün çapı 39-45 mm'dir (Pierson ve Ginther, 1985) ve her bir ovaryumdaki ortalama antral folikül sayısı 6,5'tir (Hinrichs, 1991). Diğer türlerden farklı olarak kısırak, belirgin bir luteinize edici hormon (LH) piki yaşamaz (Eser ve ark., 2023); bunun yerine LH konsantrasyonu östrus sırasında pulsatif olarak yükselir ve ovulasyondan 8-10 gün sonra zirveye ulaşır (Aurich, 2011).

Kısırak oositinin ovulasyon sırasındaki maturasyon aşaması uzun yıllar belirsizliğini korumuş ve kısırakların preovulatör foliküllerindeki oositlerin çoğunluğunun metafaz-II aşamasında olduğunun ve primer oositlerin ovule olduğunun belirlenmesiyle durum netlik kazanmıştır (Palmer ve ark., 1987). Kısırlıklarda ovulasyon (0 gün), östrus bitiminden yaklaşık 1-2 gün önce spontan olarak meydana gelir (Aurich, 2011) ve fertilizasyon, canlı bir oosit ve spermatozoonların bulunduğu oviduktun ampulla ile istmusun birleşme yerinde şekillenir (Varışlı, 2023). Kısırak oositlerinin bölünme süreci diğer evcil memelilere benzerdir (Hunter, 1991). Fertilizasyondan sonra at zigotunun ilk bölünmesi ovulasyondan yaklaşık 20 saat sonra gerçekleşir (Meira ve ark., 2012). Sonraki hücre bölünmeleri her 12 saatte bir meydana gelir (Antczak ve Allen, 2021; Özdaş, 2023) ve kısırak embriyosu ovulasyondan 2 ve 3 gün sonra sırasıyla 4-8 ve 8-16 hücre aşamasındadır (Hunter, 1991; Betteridge, 2000). Gebeliğin yaklaşık 4. gününde 12-32 hücreli evreye, 5. veya 6. günde ise kompakt morula veya erken blastosist evresine ulaşır (Antczak ve Allen, 2021; Özdaş, 2023). Morula uterus yıkantı solüsyonlarında gözlenen 32 hücreli embriyo aşamasıdır (Allen ve Wilsher, 2020; Nieto-Olmedo ve ark., 2020).

Kompakt morula veya erken blastosist evresindeki embriyonun oviduktan uterusu göçü gebeliğin 5-6. günler arasında gerçekleşir (Antczak ve Allen, 2021; Hunter, 1991). Kısırak embriyosu ovulasyondan 4 gün sonra hem prostaglandin F2 α (PGF2 α) hem de prostaglandin E2'yi (PGE2) pulsatif olarak salgılar ve bunlar kasları peristaltik olarak uyararak, embriyonun uterotubuler kavşaktan geçişine hem sinyal hem de izin verir ve aynı zamanda önceki östrus döngülerinden dejenere olmuş oositleri de hareket ettirir (Antczak ve Allen, 2021; Budik ve ark., 2021). Böylece, ovulasyon sonrası 4. günden itibaren, at embriyosu kendi ileri geçişinin itici gücü haline gelir ve bu kendiliğinden güdümlü hareketlilik, embriyo uterusu girdikten sonra da hız kesmeden devam eder (Smits ve ark., 2018). Genellikle 6 günlük at embriyoları geç morula veya blastosel boşluğunun geliştiği erken blastosist evresindedir

(Betteridge, 2000). Blastosel boşluğu veya yolk kesesi sıvıyla doludur ve bu yapının sürekli gelişimi, ovulasyondan 9-10 gün sonra ultrasonografi ile gebeliğin erken bir zamanda saptanmasına olanak tanır (Ginther, 2021a,b).

Embriyonik kapsül

Embriyo, gebeliğin yaklaşık 21. gününe kadar trofoblastik veya endometriyal proteolitik enzimlerin dejenerasyonuna katkıda bulunduğu kapsülle sarılıdır. At embriyosunun uterus lümeninde hareketini sürdürebilmesi için esas olan küresel şeklidir ve bu, kapsül ile sağlanır (Jones ve ark., 2020), aksi takdirde embriyonun uterusu yaşama ve hareket etme şansı yoktur (Aurich, 2015). Küresel blastosisti tamamen çevreleyen, zona pellusida (ZP) ile trofoblastik hücreler arasında bulunan ve embriyonun 6. günde uterusu girmesinden hemen sonra oluşmaya başlayan embriyonik kapsül, trofoblast hücreleri tarafından salgılanan yarı saydam bir membrandır (Meira ve ark., 2012). Ayrıca embriyonik kapsül hem embriyonun parçalanmasını hem de endometriyal epitel ile doğrudan teması sayesinde konseptusun uzamasını önler (Geisert ve ark., 2017). Başlangıçta 3 μ m kalınlığında, sert yapıyı önleyen (müsinöz) bir glikoprotein tabakası olan kapsül, daha sonra önemli ölçüde elastikiyet ve esneklik kazanarak embriyonun mobilitesini ve fiksasyonu destekleyen bir ambalaj halini alır. Kapsülün yapısında bu dönüşüm gerçekleşmezse mobilitenin oluşması olası değildir. Esnek ve elastik bir yapıya sahip olan kapsül, embriyonun uterus lümeni boyunca hareket etmesini ve aynı zamanda gebeliğin anne tarafından tanınmasını sağlar (Ginther, 2021a).

Gebeliğin Maternal Kabulü

Kısırta gebeliğin oluşması ve devamı için uterus ile embriyo arasındaki ilişkinin kesintisiz ve tam olması gereklidir. Kısırlıklarda ilk maternal tanınma ovulasyondan 48 saat sonra gerçekleşir ve gebeliğe özgü bir protein olarak tespit edilmiş erken gebelik faktörü (EGF) olarak tanımlanan immünsüpresif bir ajanın üretimi ile ilişkilidir (Hunter, 1991).

Kısırlıklarda ovulasyondan 5-6 gün sonra fertilize oositin ovidukt kanalını geçerek uterusu gelmesi ikinci maternal tanınma olarak kabul edilir (McKinnon ve ark., 1988). Bu dikkat çekici olgunun açıklaması genellikle kısırakların fertil/fertil olmayan oositleri aktif olarak ayırt edebildiği anlamına gelir. Bu iki tip oositin taşınmasının altında yatan mekanizmalar; fertil/fertil olmayan oositlerin zona pellusidalarının farklı yüzey özellikleri sergilemesidir, bu da oviduktta taşınmaları sırasında ayrılmalarına neden olur veya embriyo tarafından salgılanan hücresel maddeler veya metabolitler unfertilize oositlerin göçüne yol açar (Hunter, 1991).

Gebe olmayan kısırlıklarda siklusun 13. gününde uterusu salgılanan PGF2 α , sistemik dolaşım yoluyla ovaryuma giderek korpus luteumun (KL) regresyonuna neden olur (Aurich, 2011; Eser ve ark., 2023). Aksine gebelik boyunca PGF2 α sentezi azalır veya kısıtlanır ve böylece KL'dan progesteron (P4) sentezi devam eder (Ginther, 2021a,b). Üçüncü maternal tanınma, uterusu girdikten sonra, sürekli olarak genişleyen ve hala küresel olan embriyonun, miyometriyumun peristaltik

kontraksiyonlarını uyararak için PGF2 α ve PGE2'nin sürekli pulsatil salınımları tarafından yönlendirilerek sonraki 10 gün boyunca tüm uterus lümeni içinde hareket etmeye devam etmesi olarak kabul edilir (Ginther, 2021b). Dahası, embriyonik vezikülün uterus boyunca mobilitesi, endometriyal hücrelere PGF2 α üretimini azaltan sinyal göndererek KL'un prematür regresyonunu önlemektedir. Ancak herhangi bir nedenle mobilite engellenirse KL'un erken luteolizi nedeniyle embriyonun kaybıyla sonuçlanır (McDowell ve ark., 1988). Diğer taraftan, şimdiye kadar hücrel mesajların kısırlarda gebeliğin tanınmasına nasıl yol açtığı belli değildir (Meira ve ark., 2012). Öte yandan, kısırlarda erken gebelik döneminde hem uterusun hem de embriyonun KL'un ömrünü ve salgı fonksiyonunu sağladığı görülmüştür (Silva ve ark., 2005). Embriyo ile anne arasındaki etkileşim ovulasyonu izleyen ilk haftalar boyunca endometrial oksitosin reseptörlerinin düşük konsantrasyonuna ve dolayısıyla uterusun PGF2 α 'nın düşük sentezine bağlıdır. Gebe kısırların uterus lümeninde PGF2 α konsantrasyonları azalmış olsa da bu dönemde hem endometriyum hem de konseptus, PGF2 α sentezler (Stout ve Allen, 2001). Konseptus tarafından üretilen PGF2 α sistemik dolaşıma girmez, uterus lümeni içinde kalır ve bu da embriyo mobilitesi için gerekli olan lokal uterus kontraksiyonlarını uyarır (Gastal ve ark., 1998). Hem konseptus hem de endometriyum PGE2'yi sentezler (Ginther, 2021a) ve konseptus tarafından fazla miktarda sentezlenen PGE2 ovulasyondan sonra 10-16. günler arasında miyometriyal kontraksiyonları indükler (Castro ve ark., 2022). Prostaglandin E2 sentezinin embriyonik diskin karşı kutbu ile sınırlı olduğu ve diskin kutbunda biriken PGE2'nin PGF2 α 'ya dönüştüğü ve bu dönüşümün embriyo hareketinin yönünü etkileyebileceği öne sürülmüştür (Budik ve ark., 2021). Ayrıca genç mobil at embriyosu tarafından salgılanan östrojenler, siklik KL'un ömrünü veya üretkenliğini etkilemez. Östrojen, oksitosin, PGF2 α ve PGE2'nin hepsi miyometriyal kontraksiyonları ve ardından embriyo mobilitesini tetiklemede önemlidir, ancak bunlar gebeliğin anne tarafından tanınması için gerekli sinyaller gibi görünmemektedir (Katila, 2011). Kısırlarda gebeliğin 16-22. günleri arasında iki tür at interferon delta1 ve delta2 (EqIFN- δ 1 ve EqIFN- δ 2) geni tanımlanmıştır. Bu durum, attaki konseptus-anne etkileşimlerinde IFN δ 'nın rol oynadığını düşündürür, ancak bu ifade, gebeliğin anne tarafından fark edildiği zamanın ötesinde ortaya çıkar (Cochet ve ark., 2009). Bu nedenle, kısırta "gebeliğin maternal tanınması" olarak adlandırılan sinyalin başlatılmasında, biyokimyasal metabolitlerden ziyade embriyonik kapsül ile endometriyum arasındaki yani embriyonun trofoblast hücreleri ile endometriyum arasındaki bir tür fiziksel etkileşimin rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, atlarda "gebeliğin maternal tanınması"nın mekanizması ve etki şekli henüz kanıtlanmamıştır ve şu anda önemli bir araştırma konusudur (Smits et al. 2018).

Embriyonun Ultrasonografik Muayenesi

Kısırların genital organlarının ultrasonografik cihazlarla görüntülenmesi, gebeliğin erken dönemleri

hakkındaki bilgilerimizi güncellemiş, arttırmış ve aynı zamanda ikiz veziküllerin tanısında ve manipülasyonunda çok faydalı olmuştur (Ginther, 2021a). Kısırlarda içi sıvıyla dolu embriyonik vezikülün küresel şeklinin ve boyutunun diğer türlere göre daha büyük olması nedeniyle ultrasonografik görüntüleme ile gebelik ruminantlara göre daha erken teşhis edilir (Meira ve ark., 2012). At embriyosu ultrasonografik olarak, embriyonik vezikülün 2-3 mm çapında olduğu ve ekojenik bir kapsülle çevrelenmiş küresel şekilde gebeliğin 9. gününden itibaren görüntülenir (Ginther, 2021b) ve 9-10. günler arasında genellikle korpus uteride bulunur (Ginther, 1983). Görüntülediği ilk günden fiksasyona kadar, vezikül küresel şeklini korur ve günde ortalama 3,2 mm büyür (Meira ve ark., 2012). Ayrıca gebe ve gebe olmayan kısırlarda uterusun tonusu siklusun 10. gününde artmaya başlarken (Bonafos ve ark., 1994), gebe olmayan kısırlarda siklusun 13. gününde luteolizis nedeniyle azalmaya başlar. Öte yandan, gebe kısırlarda maksimum embriyo hareketliliği boyunca ve fiksasyondan birkaç gün sonra da tonus artmaya devam eder (Ginther, 2021a,b). Embriyo 12. günde 9 mm çapındadır ve kornu uterilere girişi daha fazladır, fiksasyona kadar devam eden maksimum mobilite evresi başlar. Hareketliliğin bitmesinden hemen sonra vezikül küresel şeklini kaybeder ve vezikülün bulunduğu uterusun dorsalinde kalınlaşma oluşur (Aurich ve Budik, 2015; Ginther, 1983).

Embriyonik Vezikülün Fiksasyonu ve Oryantasyonua

Embriyonik vezikülün uterus lümenine sabitlenene (fiksasyona) kadar hareketliliği, tek tırnaklılara özgü bir paradokstur (McKinnon ve ark., 1988); atlar, midilliler ve eşekler arasında ve hatta at embriyosu taşıyan katırlarda bile benzerdir (Ginther, 2021a,b). Embriyo hareketliliği genç (ortalama 6 yaş) kısırlarda yaşlı (15 \geq yaş) kısırlara göre daha fazladır (Ferreira ve ark., 2019) ve benzer durum genç ve yaşlı midilli kısırlar arasında da gözlenir (Carnevale ve Ginther, 1992). Embriyo uterus lümeninde ileri-geri salınımlar ve kısa turlar sergiler ve en sık görülen pozisyon değişiklikleri korpus uteride kraniyal yönde ve kornu uteride kaudal yöndedir (Ginther, 1983). Embriyonun hareket yönüne nasıl karar verdiği bilinmemektedir ancak uterus çapının artması bir seçenek gibi görünmüştür (Ginther, 2021a,b). Hareketliliğe neden olan mekanizma hala bir sırdır, ancak vezikülün küresel şekli ve esnekliği ile endometriyal kıvrımların longitudinal olması hareketliliğe neden olan fiziksel faktörler olarak tanımlanmıştır (Derar ve Ali, 2016). Mobil embriyonun önemli bir işlevi, uterus boyunca metabolitlerin uterusun emilmesi-verilmesi yoluyla embriyonun büyümesini ve gelişmesini destekleyecek uterus ortamını yaratmaktır (Ginther, 2021a).

Ferlilizasyon hangi taraftan olursa olsun at embriyosu, uterus lümeninde sürekli hareket eder ve ovulasyondan 15-17 gün sonra genellikle korpus ile kornu uteri arasındaki fleksürün kaudalinde ya da daha düşük oranda (%7) korpus uteride sabitlenir (Aurich ve

Budik, 2015; Ginther, 2022). Embriyonik vezikülün uterus lümeninde mobilitesini kaybetmesi sabitlenme (fiksasyon) olarak tanımlanır (Ginther, 2021a,b). Konseptus tarafından üretilen fibrinojen spesifik endometrial integrinlere bağlandığında, vezikülün endometriuma yapışmasıyla fiksasyon meydana gelir (Grant ve ark., 2020). Vezikülün sabitlenmesi midillilerde yaklaşık 15. günde, kısrağlar ve eşeklerde ise 16. günde gerçekleşir (Ginther, 2021a,b).

At embriyosunun bir kornudan diğer kornu uteriye hareket sayısı saatte 0,5-0,9 kez (günde 12-22 kez) (Ginther, 1983) veya mobilite evresinde yaklaşık 100 kezdir (Leith ve Ginther, 1984). Bu dönemde embriyonik vezikülün çapı ortalama 22 mm'dir (Ginther, 2021a), fiksasyondan önce 2-4 saatten daha kısa aralıklarla uterus içinde hareket eder (Ginther, 1983), 17. günden sonra transuterin göç artık tespit edilmez (McKinnon ve ark., 1988) ve fiksasyon şekillenir. Vezikül, ovulasyondan 16-17 gün sonra uterus tonusunun daha fazla artması, uterus duvarının kalınlaşması ve hızlı büyümesi sonucunda sabitlenir (Ginther, 1983). Aynı zamanda uterus tonusunun daha da artması, vezikülün şeklini değiştirir. Öte yandan vezikülün anormal fiksasyonu veya korpus-kornu uteriler arasında endometriyal kistler gibi dejeneratif lezyonlar gebeliğin devamını olumsuz yönde etkileyebilir (Ferreira ve ark., 2008). Mobil vezikül, fiksasyon bölgesindeki konumunu 2 saat boyunca değiştirmese embriyonun sabitlendiği ve hareketliliğinin sona erdiği kabul edilir (Wilsher ve ark., 2020).

Mobil embriyo, kornu uterilere kıyasla zamanının %50'sinden fazlasını korpus uteride geçirir (Griffin ve ark., 1993). Embriyonun çapı, hareket şekli ve uterusun kontraksiyonları postpartum ve barren (bir önceki sezon gebe kalmamış) kısrağlar arasında benzerdir (Ginther, 1984). Bunun bir istisnası, doğumdan sonra kornu uteriler arasındaki boyut farkının fiksasyonun yönünü belirlemesidir. Postpartum ovulasyon sonrasında kornu uteriler arasında genellikle bir önceki gebeliğin oluşmadığı tarafta fiksasyon meydana gelir ve belirleyici faktör, kornu uterinin diğerine göre daha küçük ve daha kavisli olmasıdır (Griffin ve Ginther, 1991; Ginther, 2021a).

Fiksasyondan bir gün önce vezikül, diğer kornu uteriye göre gelecekte sabitleneceği kornu uteriye daha sık girer ve hareketliliği daha fazla artar. Mobilite aşamasının bitiminden kısa bir süre sonra (15-17. günler arasında), dorsal uterus duvarı genişlemeye ve yolk kesesine doğru ilerlemeye başlar ve artan uterus tonusu bu süreci hızlandırır (Ginther, 2021b). Mobilite fazının sona ermesinden hemen sonra embriyonik vezikülün rotasyonu olarak tanımlanan oryantasyon meydana gelir (Silva ve Ginther, 2005). Böylece embriyonik vezikül, embriyonun bulunduğu kutup mezometrial bağlantının tersi olacak şekilde döndürülür veya yönlendirilir ya da embriyo, yolk kesesinin ventraline doğru hareket eder (Ginther, 2022). Bu durum, endometriyumun dorsal 1/4'ünün daha yoğun bir hipertrofinde ve giderek artan uterus tonusuna neden olur (Derar ve Ali, 2016). Uterus

tonusunun artması, duvarının aşırı kalınlaşması ve veziküle uygulanan basınç, vezikülün dönmeye neden olur; sonunda vezikül yolk kesesinin en kalın kısmı olan ventrale konumlanır (Ginther, 2022).

Mobil embriyo, uterus kontraktilesinin (Griffin ve Ginther, 1991), tonusunun (Bonafos ve ark., 1994), vaskülaritesinin (Silva ve ark., 2005) ve endometriyal ödemin (Griffin ve ark., 1993) artmasına neden olur. Vaskülarite dışındaki (Silva ve ark., 2005) bu uterus fonksiyonları yalnızca embriyonun bulunduğu kornu uteride görülür (Ginther, 2021a). Uterus kontraksiyonları, embriyonun uterotubal kavşaktan korpus uteriye doğru hareket ettiği 6-9. günler arasında artar (Ginther, 1983) ve geçici kontraksiyonlar embriyonun korpus uteriye doğru ilerlemesini sağlar. Uterus kontraksiyonlarının ve tonusunun 10-11. günler arasında artışı, embriyonun korpus uteriden kornu uterilere daha sık girmesine neden olur (Ginther, 2021a,b). Uterus kontraksiyonları 11. veya 12. günde zirveye ulaşır ve 15. güne kadar hem kontraksiyonlar hem de embriyo hareketliliği maksimum düzeyde devam eder ve fiksasyon gününde hem mobilite hem de kontraksiyonlar azalır (Griffin ve Ginther, 1991). Sabitlenmiş embriyonun oryantasyonunda rol oynayan kontraksiyonlar (Ginther, 1998), fiksasyondan sonra birkaç gün daha azalarak devam eder (Griffin ve Ginther, 1991). Sabitlemenin gerçekleşmesi için uterus tonusu gereklidir (Ginther, 2021b). Embriyo korpus uteriye girdikten bir gün sonra kornu uterilerde tonus artmaya başlar ve fiksasyon sonrasında da tonus artışı devam eder (Bonafos ve ark., 1994), bu da embriyonun sabitlendiği alandan ayrılmasını engeller (Ginther, 2021a,b). Fiksasyonun olduğu gün embriyonun bulunduğu tarafta uterus arterinde kan akımı (Ginther, 1984) ve endometriyumda vasküler perfüzyon (Silva ve ark., 2005) daha fazladır ki bu değişiklikler sayesinde Doppler ultrason ile 7-8 gün içerisinde gebelik tanısı konulabilmektedir. Sonuç olarak, embriyo mobilitesi, uterus kontraksiyonlarına, vezikülün küresel şekline, kapsül kaynaklı vezikülün şişkinliğine, yapışmamasına ve uterus kıvrımlarının longitudinal olmasına bağlıdır (Nieto-Olmedo ve ark., 2020).

İkiz Embriyolar

At yetiştiriciliğinde ikizlik genellikle abort, güç doğum, tayların ölü doğması veya yaşama şansının düşük olması, gelişme geriliği ve enfeksiyonlara daha duyarlı olması gibi birçok nedenden dolayı istenmeyen bir durumdur (Crabtree, 2018). İkiz gebelikler, kısrağlarda nonenfeksiyöz abortların nedenleri arasında endometritten sonra ikinci sırada yer alır (McKinnon ve ark., 1988). Kısrağlarda ikiz embriyo oluşumu, ovulasyon oranı, ovulatör model, reproduktif durum, yaş, mevsim, östrus döngüsünün hormonal manipülasyonu ve aygırın etkisi gibi birçok faktöre bağlıdır (Özdaş, 2023; Tan ve Krekeler, 2014). Çoğu türde ikiz embriyolar doğal iki mekanizmanın biri ile gerçekleşir; fertilize bir oositin daha sonraki gelişim aşamalarında kendiliğinden bölünmesi ya da eşzamanlı iki ovulasyonun meydana

gelmesidir (McKinnon ve ark., 1988). Kısırlarda ikizlik genellikle dizigotik olduğundan birinci seçenek göz ardı edilebilir (Crabtree, 2018). Kısırlarda spontan çift ovulasyonlar meydana gelebilir ve olgu iki fenomenle açıklanmıştır; bir günden daha kısa bir sürede her iki ovaryumda senkronize iki ovulasyonun ya da aynı östrus periyodunda 2 ila 10 gün arayla asenkron ovulasyonların meydana gelmesidir (Aurich, 2011). İkinci durumda, P4 konsantrasyonu ikinci ovulasyona kadar yükselmez ve buna bağlı olarak ikinci ovulasyon vaktinde steroidin negatif baskısı henüz oluşmamaktadır. (Okada ve ark., 2020, 2022). Majör foliküler dalgada 28 mm üzerinde iki adet dominant folikülün varlığında çift ovulasyon görülme oranı %40'tır (Aurich, 2011). Ayrıca ovulasyondan sonra bütün oositler, fertilizasyon gününden mobilite ve fiksasyon tamamlanincaya kadar benzer embriyo gelişimi ve gebelik şansına sahiptir (Ginther, 1998).

Kısırlarda ikizlik insidansı kalıtsaldır ve ırklara göre değişkenlik gösterir. Üstelik çift ovulasyon veya ikiz gebelik bazı aile soylarında daha yaygındır. Spontan çift ovulasyon oranı farklı at ırklarında %2-25 arasında değişir (Lebedeva ve Solodova, 2021). Çift ovulasyonların Safkan İngiliz ve İrlanda yük atlarında, Arap ve midillilere göre daha yüksek oranda rastlanması bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Tan ve Krekeler, 2014). Ayrıca Barren ve maiden (ilk kez çiftleştirilen) kısırlarda çift ovulasyon ve ikiz gebelik oranları, laktasyondaki kısırlara göre daha yüksektir ve bu durum, laktasyonun hipotalamik-hipofiz eksenine negatif feedback etkisinden kaynaklanır (Ginther, 2021a). İnsan koryonik gonadotropini (hCG) gibi ovulasyon indüksiyon ajanlarının kullanımı, uygulanan dozlara ve uygulama sürelerine bağlı olarak ikizlik insidansını etkileyebilir (Allen ve Wilsher, 2020). Ayrıca üreme sezonunun sonuna doğru çift ovulasyon ve ikizlik insidansı artar (Özdaş, 2023; Tan ve Krekeler, 2014).

Kısırlarda ortalama ikiz gebelik oranı %3,6 olup, bunların %85'i üçüncü trimesterde abortla, %5'i ise ölü doğumla sonuçlanır (Whitwell, 2011). İkiz embriyo taşıyan kısırların %60'ında tek tayın doğumu gerçekleşirken %31'inde her iki embriyonun kaybı ve sadece %9'unda ikiz tay doğumu gözlenir (McKinnon ve ark., 1988). Bu aynı zamanda kısırların ikiz embriyolardan birinin kaybına veya ölümüne yol açan doğal bir biyolojik mekanizmaya sahip olduğunu da gösterir (Ginther, 2022).

Kısırlarda doğal embriyo indirgeme mekanizmasının fiksasyonun başlangıcı (16-17. gün) ile embriyonik evrenin (40. gün) sonu arasında gerçekleştiğini göstermektedir (Ginther, 2021a). Kısırlarda doğal embriyo indirgeme mekanizmasının nasıl oluştuğu tam olarak bilinmese de veziküllerin uterusu sabitlenmesiyle ilişkili olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (McKinnon ve ark., 1988). Kornu uterusunun kaudaline aynı anda iki vezikül sabitlenirse, veziküllerden biri beslenme rekabeti nedeniyle redüksiyona uğrayacak, diğer embriyo ise gelişimini sürdürecektir. Öte yandan, veziküllerin fiksasyonu her iki kornu-uterinin kaudalinde birbirinden

ayrı gerçekleşirse, doğal redüksiyon nadirdir (Ginther, 2021a). Bu durum at sahipleri ve hekimler açısından endişe yaratmaktadır. Dolayısıyla ikiz embriyo taşıyan kısırlarda üremenin kontrolüne farklı bir stratejik yaklaşımı gerektirir.

İkiz embriyo gelişen kısırların yetiştirme programından çıkarılmasını önlemek için bazı manipülatif yaklaşımlar önerilmiştir. Diğer seçeneklerle karşılaştırıldığında embriyolardan birinin manuel olarak redüksiyonu günümüzde hekimlerin en çok tercih ettiği yöntemdir (Tan ve Krekeler, 2014). Bu yöntem, parmak/başparmak (Schnobrich ve ark., 2013), transüder ile kompresyonu veya ülkemizdeki tabiri ile 'ikizlik sıkma/ezme' olarak da adlandırılır ve bu uygulamanın gebeliğin 30. gününden önce yapılması gerekir (Lebedeva ve Solodova, 2021; Sielhorst ve ark., 2024).

Ultrasonografik görüntüleme, hekimlerin manuel redüksiyon uygulamasını kolaylaştırmıştır; iki vezikülden birinin işaret parmağı ile başparmak arasına sıkıştırılarak veya transüder ile üzerine baskı uygulanarak erken indirgenmesini sağlayan bir yöntemdir. Ultrason rehberliğinde manuel redüksiyon işleminden önce diğerine göre daha küçük olan vezikül tespit edilir ve daha sonra vezikül kornu uterusunun ucuna doğru yönlendirilerek başparmak ve işaret parmakları ile vezikül üzerine baskı uygulanarak ezilir ve hemen sonra patlama hissi algılanır ya da transüder ile embriyolar birbirinden ayrıştırılır ve daha sonra embriyoya baskı uygulanarak patlatılır ancak bu işlem klinik tecrübe gerektirir (Schnobrich ve ark., 2013; Sielhorst ve ark., 2024).

Eliminasyon metodunda embriyoların birinin veya ikisinin birden yok edilmesi için kısırağa abort yaptırılması, embriyonun aspire edilmesi, kısırağın aç bırakılarak bir veya iki embriyonun rezorbe olmalarının sağlanması, operasyonla abdominal duvardan uterusu ulaşılarak küçük olan embriyonun dışarıya alınması, hormon uygulaması gibi birçok farklı metod bulunmaktadır (Whitwell, 2011). Bu uygulamalardan hangisinin tercih edileceği ise hekimin tecrübesi, kısırağın ve embriyoların durumuna göre değişiklik göstermektedir.

Intrauterin Cihazlar

Embriyo migrasyonu kısırlara özgü bir fenomendir ve bu da gebeliğin şekillendiğini anneye bildirerek lüteolizisi engeller. Bu dönemde embriyo, kapsülünden kaynaklanan yuvarlak yapısını korur. Embriyonun şeklini ve uterus içindeki hareketliliğini taklit etme prensibiyle çalışan uterus bilyeleri ve intrauterin cihazlar kısırlarda östrusu baskılayabilmektedir (Gradil ve ark., 2021). Hem embriyonun yuvarlak şeklini hem hareketliliği taklit ederek endometriyum ile temas halinde olan bu cihazlar PGF2α salınımını engelleyebilmekte ve östrusu baskılayabilmektedir. Ancak yapılan çalışmalar özellikle uterus bilyelerinin kısırlarda piyometra insidansını yükselttiğini ve sadece sağlıklı uterusu olan kısırlara

uygulanması gerektiğini ortaya koymuştur (Piotrowska-Tomala ve ark., 2024). Bu nedenle cihazların kullanımı kısıtlı kalmıştır.

Sonuç

Embriyo-uterus arasındaki dinamik ilişki, kısıraklarda erken gebelik sırasında benzersiz ve spesifik özellikler gösterir. Küresel kısarak embriyosu uterusu girdikten sonra oluşmaya başlayan aselüler bir kapsül ile kuşatılır. Embriyo ve uterus tarafından sentezlenen prostaglandinler (PGF2 α , PGE2) sayesinde uterus kontraksiyonları, embriyoyu fiksasyona kadar tüm uterus boyunca hareket ettirir ve bu sırada uterusu kontraksiyon, tonus, ödem ve vaskülaritede bir dizi değişiklikler gözlenir. Embriyo herhangi bir kornu uterusun kaudalindeki fleksürde sabitlenir. Sonuç olarak ultrasonografik görüntüleme, uterus-konseptus arasındaki fizyolojik ilişki düzeyinde birçok konunun daha da netleşmesine olanak sağlamış ve ikiz embriyo manipülasyonu, intrauterin cihaz araştırmaları gibi birçok uygulamaya fırsat yaratmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Kaynaklar

- Allen (Twink), W. R., & Wilsher, S. (2020). Historical aspects of equine embryo transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 102987. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102987>
- Antczak, D. F., & Allen (Twink), W. R. (2021). Placentation in equids. İçinde Rodney D. Geisert & Thomas Spencer (Eds.), *Placentation in Mammals* (ss. 91-128). Division of Animal Sciences, University of Missouri.
- Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.005>
- Betteridge, K. J. (2000). Comparative aspects of equine embryonic development. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 691-702. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00075-0)
- Bonafos, L. D., Carnevale, E. M., Smith, C. A., & Ginther, O. J. (1994). Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. *Theriogenology*, 42(8), 1247-1255. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90244-D](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90244-D)
- Budik, S., Walter, I., Leitner, M.-C., Ertl, R., & Aurich, C. (2021). Expression of enzymes associated with prostaglandin synthesis in equine conceptuses. *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ani11041180>
- Carnevale, E. M., & Ginther, O. J. (1992). Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, 37(5), 1101-1115. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90108-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90108-4)
- Castro, T., Jacob, J. C., Domingues, R. R., & Ginther, O. J. (2022). Local embryo-mediated changes in endometrial gene expression during embryo mobility in mares. *Theriogenology*, 182, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.01.032>
- Cochet, M., Vaiman, D., & Lefèvre, F. (2009). Novel interferon delta genes in mammals: cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. *Gene*, 433(1-2), 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.026>
- Crabtree, J. R. (2018). Management of twins in horses. *In Practice*, 40(2), 66-74. <https://doi.org/10.1136/inp.k181>
- Derar, D.R., & Ali, A. (2016). Conceptual Orientation: A unique phenomenon of the equine pregnancy. *Anatomy & Physiology*, 06(02). <https://doi.org/10.4172/2161-0940.1000200>
- Eser, A., Ak, K., & Mersin, S. (2023). Kısıraklarda reproduktif siklus. İçinde M. K. Soylu, K. Ak, E. Akçay, A. Baran, M. Evecen, & M. B. Tırpan (Eds.), *Hayvanlarda Reproduksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri* (ss. 575-577). Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.
- Ferreira, J. C., Linhares Boakari, Y., Sousa Rocha, N., Saules Ignácio, F., Barbosa da Costa, G., & de Meira, C. (2019). Luteal vascularity and embryo dynamics in mares during early gestation: Effect of age and endometrial degeneration. *Reproduction in Domestic Animal*, 54(3), 571-579. <https://doi.org/10.1111/rda.13396>
- Gastal, M. O., Gastal, E. L., Torres, C. A. A., & Ginther, O. J. (1998). Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology*, 50(7), 989-999. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00202-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00202-7)
- Geisert, R. D., Whyte, J. J., Meyer, A. E., Mathew, D. J., Juárez, M. R., Lucy, M. C., Prather, R. S., & Spencer, T. E. (2017). Rapid conceptus elongation in the pig: An interleukin 1 beta 2 and estrogen-regulated phenomenon. *Molecular Reproduction and Development*, 84(9), 760-774. <https://doi.org/10.1002/mrd.22813>
- Ginther, O. J. (1983). Effect of reproductive status on twinning and on side of ovulation and embryo attachment in mares. *Theriogenology*, 20(4), 383-395. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90199-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90199-1)
- Ginther, O. J. (1984). Mobility of twin embryonic vesicles in mares. *Theriogenology*, 22(1), 83-95. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90476-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90476-X)
- Ginther, O. J. (1998). Equine pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 44, 73-104.
- Ginther, O. J. (2021a). Equine embryo mobility. A friend of theriogenologists. *Journal of Equine Veterinary*

- Science, 106, 103747. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103747>
- Ginther, O. J. (2021b). Equine embryo mobility. A game changer. *Theriogenology*, 174, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.006>
- Ginther, O. J. (2022). The dynamic equine embryo from postfixation (Day 17) to the end of the embryo stage (Day 40). *Journal of Equine Veterinary Science*, 108, 103808. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103808>
- Gradil, C., Joone, C., Haire, T., Fowler, B., Zinchuk, J., Davies, C. J., & Ball, B. (2021). An intrauterine device with potential to control fertility in feral equids. *Animal Reproduction Science*, 231, 106795. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106795>
- Grant, D. M., Macedo, A., Toms, D., & Klein, C. (2020). Fibrinogen in equine pregnancy as a mediator of cell adhesion, an epigenetic and functional investigation. *Biology of Reproduction*, 102(1), 170-184. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz157>
- Griffin, P. G., Carnevale, E. M., & Ginther, O. J. (1993). Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. *Animal Reproduction Science*, 31(3-4), 311-329. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90015-J](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90015-J)
- Griffin, P. G., & Ginther, O. J. (1991). Uterine morphology and function in postpartum mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 11(6), 330-339. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(06\)81262-1](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(06)81262-1)
- Hinrichs, K. (1991). The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology*, 36(2), 157-168. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90375-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90375-n)
- Hunter, H. F. (1991). Fertilization in the pig and horse. İçinde Dunbar B.S. & O'Rand M.G. (Eds.), *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization* (ss. 329-346). Springer Science+Business Media, LLC.
- Jones, C. J. P., Aplin, J. D., Allen, W. R. T., & Wilsher, S. (2020). The influences of cycle stage and pregnancy upon cell glycosylation in the endometrium of the mare. *Theriogenology*, 154, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.007>
- Katila, T. (2011). Maternal recognition of pregnancy in the horse. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 27(3), 261-264. <https://doi.org/10.21836/PEM20110309>
- Lebedeva, FL. F., & Solodova, E. V. (2021). Technological approaches to the problem of double ovulation and twin pregnancies in mares. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*.
- Leith, G. S., & Ginther, O. J. (1984). Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, 22(4), 401-408. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(84\)90460-6](https://doi.org/10.1016/0093-691x(84)90460-6)
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., & Pickett, B. W. (1988). *Equine Reproductive Ultrasonography*. İçinde *Animal Reproduction Laboratory Bulletin No.04* (ss. 11-20). Colorado State University.
- Meira, C., Ferreira, J. C., Silva, E. S. M., & Ignácio, F. S. (2012). Developmental aspects of early pregnancy in mares. *Animal Reproduction*, 9(3), 166-172.
- Nieto-Olmedo, P., Martín-Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G., Ortiz-Rodríguez, J. M., Peña, F. J., & Ortega-Ferrusola, C. (2020). Power Doppler can detect the presence of 7–8 day conceptuses prior to flushing in an equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 145, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.015>
- Okada, C. T. C., Kaps, M., Reichart, U., Walter, I., Gautier, C., Aurich, J., & Aurich, C. (2022). Low plasma progesterone concentration during the early luteal phase delays endometrial development and the beginning of placentation in mares. *Animal Reproduction Science*, 247, 107149. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107149>
- Okada, C. T. C., Kaps, M., Scarlet, D., Handschuh, S., Gautier, C., Melchert, M., Aurich, J., & Aurich, C. (2020). Low plasma progestin concentration during the early postovulatory phase impairs equine conceptus development in the late preimplantation phase. *Reproduction, Fertility and Development*, 32, 1156-1167.
- Özdaş, Ö. B. (2023). Atlarda embriyo transferi. İçinde M. K. Soylu, K. Ak, E. Akçay, A. Baran, M. Evecen, & M. B. Tirpan (Eds.), *Hayvanlarda Reprodüksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri* (ss. 596-599). Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.
- Palmer, E., Duchamp, G., Bezaud, J., Magistrini, M., King, W. A., Bousquet, D., & Betteridge, K. J. (1987). Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35, 689-690.
- Pierson, R. A., & Ginther, O. J. (1985). Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. *Theriogenology*, 24(3), 359-368. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(85\)90228-6](https://doi.org/10.1016/0093-691x(85)90228-6)
- Piotrowska-Tomala, K. K., Jonczyk, A. W., Szóstek-Mioduchowska, A., Hojo, T., Żebrowska, E., Katila, T., Ferreira-Dias, G., & Skarzynski, D. J. (2024). Intrauterine devices influence prostaglandin secretion by equine uterus: in vitro and in vivo studies. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03889-0>
- Schnobrich, M. R., Riddle, W. T., Stromberg, A. J., & LeBlanc, M. M. (2013). Factors affecting live foal rates of Thoroughbred mares that undergo manual twin elimination. *Equine Veterinary Journal*, 45(6), 676-680. <https://doi.org/10.1111/evj.12074>
- Sielhorst, J., Baade, S., Neudeck, K., Tönissen, A., Rohn, K., Hollinshead, F., & Sieme, H. (2024). Success rates and factors influencing pregnancy outcome after 464 transvaginal ultrasound-guided twin reductions in the mare. *Equine Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1111/evj.14071>
- Silva, L. A., Gastal, E. L., Beg, M. A., & Ginther, O. J. (2005). Changes in vascular perfusion of the

- endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biology of Reproduction*, 72(3), 755-761. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036384>
- Smits, K., Willems, S., Van Steendam, K., Van De Velde, M., De Lange, V., Ververs, C., Roels, K., Govaere, J., Van Nieuwerburgh, F., Peelman, L., Deforce, D., & Van Soom, A. (2018). Proteins involved in embryo-maternal interaction around the signalling of maternal recognition of pregnancy in the horse. *Scientific Reports*, 8(1), 5249. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23537-6>
- Stout, T. A., & Allen, W. R. (2001). Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(5), 771-775.
- Tan, D. K. S., & Krekeler, N. (2014). Success rates of various techniques for reduction of twin pregnancy in mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245(1), 70-78. <https://doi.org/10.2460/javma.245.1.70>
- Varışlı, Ö. (2023). Kısıraklarda reproduktif anatomi. İçinde M. K. Soylu, K. Ak, E. Akçay, A. Baran, M. Evecen, & M. B. Tırpan (Eds.), *Hayvanlarda Reprodüksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri* (ss. 570-572). Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.
- Whitwell, K. E. (2011). Abortion and stillbirths: A pathologist overview. İçinde A. O. McKinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala, & D. D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction (second, C. 2, ss. 2339-2349)*.
- Wilsher, S., Rigali, F., Kovacsy, S., & Allen, W. T. (2020). Puncture of the equine embryonic capsule and its repair in vivo and in vitro. *Journal of Equine Veterinary Science*, 93, 103194. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103194>