



doi 10.33188/vetheder.1640923

Derleme Makalesi / Review Article

Veteriner doğum ve jinekoloji araştırmalarında kullanılan moleküler analizler için doku örnekleme, saklama ve taşıma yöntemleri

Muhammed ALBAYRAK^{1,a}, Ali Reha AĞAOĞLU^{1,b*}

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

id 0009-0006-1758-1042^a; 0000-0002-6545-8800^b

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

16 Şubat 25

16 February 25

Revizyon/Revised:

5 Mart 25

5 March 25

Kabul / Accepted:

19 Mart 25

19 March 25

Anahtar Sözcükler:

DNA

RNA

Doku örnekleme

Doku saklama

Keywords:

DNA

RNA

Tissue sampling

Tissue storage

©2025 The Authors.

Published by Veteriner Hekimler Derneği. This is an open access article under CC-BY-NC license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>)



ÖZET:

Veteriner doğum ve jinekoloji alanında yapılan moleküler çalışmalar hem temel hem de klinik bilimler açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu alanda gerçekleştirilen araştırmalar, fizyolojik süreçlerin moleküler mekanizmalarını aydınlatmak bakımından önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan bu çalışmaların başarısı, doku örneklerinin doğru bir şekilde ve araştırma hipotezine uygun olan fonksiyonel organ bölümünden alınması, muhafazası ve laboratuvara ulaştırılmasına bağlıdır. Alınan doku örneklerinin zarar görmeden muhafaza edilmesi ileride yapılacak olan moleküler analizlerin güvenilirliğini artırmakta ve elde edilen sonuçların doğruluğunu sağlamada belirleyici bir etken olmaktadır. Bu derlemede, veteriner doğum ve jinekoloji alanındaki moleküler çalışmalar için doku örneği alma yöntemleri, dokuların muhafaza yöntemleri, bu örneklerin laboratuvara ulaştırılması sürecine ilişkin bilgiler verilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu süreçte örnek toplama ve taşıma aşamalarında karşılaşılan zorluklar, örneklerin taşınması sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar ve laboratuvar sonuçlarının doğruluğunu sağlamak için alınması gereken önlemler de ele alınmıştır. Sonuç olarak bu makalede, araştırmaların kalitesi ve elde edilecek verilerin doğruluğu için örnek toplama, muhafaza ve taşıma protokollerinin titizlikle uygulanması gerekliliği üzerinde durulmuştur.

Tissue sampling, storage and transport methods for molecular analyses used in veterinary obstetrics and gynecology research

ABSTRACT:

Molecular studies conducted in the field of veterinary obstetrics and gynecology hold significant importance for both basic and clinical sciences. Research in this area plays a crucial role in elucidating the molecular mechanisms underlying physiological processes. The success of these studies depends on the accurate collection of tissue samples from the functionally relevant sections of organs that align with the research hypothesis, as well as on their proper preservation and timely transportation to the laboratory. Preserving tissue samples without any damage not only enhances the reliability of subsequent molecular analyses but also serves as a key factor in ensuring the accuracy of the results obtained. This review aims to provide a comprehensive overview of the methods employed for tissue sample collection, the techniques used for tissue preservation, and the processes involved in transporting these samples to the laboratory for molecular studies in veterinary obstetrics and gynecology. In addition, the review discusses the challenges encountered during the collection and transportation stages, highlights the critical considerations that must be addressed during sample transfer, and outlines the necessary precautions to ensure the precision of laboratory results. In conclusion, this paper emphasizes the imperative need for the rigorous implementation of protocols regarding sample collection, preservation, and transportation to safeguard the quality of the research and the accuracy of the data produced.

How to cite this article: Albayrak M, Ağaoğlu AR. Veteriner doğum ve jinekoloji araştırmalarında kullanılan moleküler analizler için doku örnekleme, saklama ve taşıma yöntemleri. Vet Hekim Der Derg. 2025; 96 (2):153-164.

* Sorumlu Yazar e-posta adresi / Corresponding Author e-mail address: rehaagaoglu@mehmetakif.edu.tr

1. Giriş

Veteriner hekimliğinde klinik ve temel araştırmalarda son yıllarda yoğun bir şekilde moleküler analiz yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Moleküler analizlerde yaşanan gelişmeler kendisini veteriner doğum ve jinekoloji ve reproduksiyon alanında da göstermiştir. Bu bağlamda Web of Science’de “animal reproduction, gene expression, molecular analyses, transcriptional changes” anahtar kelimeleri ile 2020-2024 yıllarını kapsayacak şekilde yapılan literatür taramasında toplam 4365 makaleye rastlanmış olması bu durumu doğrular niteliktedir.

Birçok alanda olduğu gibi veteriner jinekoloji alanında yapılan araştırmalarda kullanılan moleküler yöntemler farklı bilim alanlarında uzmanlık gerektiren ve önemli bir laboratuvar alt yapısına ihtiyaç duyan spesifik çalışma alanlarıdır ve sürecin laboratuvar ve değerlendirme kısmını kapsamaktadır (1). Ancak süreçte en az laboratuvar kısmı kadar önemli olan başka bir aşama daha bulunmaktadır. Örnek toplama olarak isimlendirilebilecek olan bu aşama; çalışmanın klinik veya pratik kısmı içerisinde yer aldığı için doğrudan veteriner doğum ve jinekoloji alanını ilgilendirmektedir. Söz konusu örnekleme yönteminde bir hata olması, laboratuvar sonuçlarının hatalı elde edilmesine ve araştırmanın yanlış sonuçlanmasına yol açacaktır. Bu nedenle moleküler analiz yöntemlerinin kullanılacağı çalışmalarda doku örneği alma aşamasının dikkatli bir şekilde planlanması gerekmektedir (2). Kullanılacak olan moleküler analiz yöntemleri ile deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein varlığının veya miktarının belirlenebilmesi için öncelikle uygun dokudan örnek alınması gerekmektedir. Bu bağlamda yapılacak olan araştırmanın sorusuna uygun olan organın fonksiyonel bölümünden, uygun miktarda, uygun koşullarda örnekleme yapılması ve alınan doku örneklerinin incelenmesi planlanan moleküllerin bozulmadan kalmasını sağlayacak şekilde muhafaza edilmesi yapılacak analizlerin doğruluğu için büyük önem taşımaktadır (3).

Sunulan derlemede, veteriner doğum ve jinekoloji alanında yapılan araştırmalarda kullanılabilecek olan farklı moleküler yöntemlerde kullanmak üzere alınacak doku örneklerinin; nereden ve hangi yöntemlerle alınacağı, analizler yapılana kadar bozulmadan nasıl muhafaza edilecekleri ve laboratuvara nasıl ulaştırılacakları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

2. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Alanında Kullanılan Moleküler Analizler İçin Örneklerin Toplanması

Veteriner doğum ve jinekoloji alanında yapılması planlanan çalışmalar için alınabilecek örnekler; uterus ve ovaryum dokusu, folikül sıvısı, vaginal, servikal veya endometriyal akıntılar, vaginal veya endometriyal sürüntüler, endometriyal biyopsi, yavru zarları, meme tümörü dokusu, kan ve idrar örnekleridir. Bu örnekler, canlı hayvanlardan noninvaziv, minimal invaziv veya invaziv yöntemlerle; kadavradan ise sakrifikasyon (laboratuvar hayvanları) veya mezbaha materyali (çiftlik hayvanları) yoluyla elde edilmektedir. Küçük biyopsiler genellikle minimal invaziv tekniklerle alınırken, daha büyük doku örnekleri rutin cerrahi operasyonlarla veya mezbahada kesim sırasında alınabilmektedir (4). Doku örneklerinin, çalışmanın amacı doğrultusunda örnekleme yapılacak olan organın uygun bir bölgesinden ve yeterli miktarda alınması gerekmektedir (5).

Noninvaziv örnek alma yöntemleri: Endometriyal, servikal veya vaginal akıntı veya sürüntü örneği alma. Doğum sırasında yavru zarlarının alınması (6).

Minimal invaziv örnek alma yöntemleri: Kan örneği alma, endometriyal (7), vaginal, servikal biyopsi alma; (21); folikül sıvısı aspirasyonu (8,9), meme tümörlerinden ince ve kalın iğne aspirasyonu (10,11)

İnvaziv örnek alma yöntemleri: Ovaryum, uterus veya meme tümörü dokusunun intraoperatif alınması.

Sakrifikasyon ile örnek alma yöntemleri: Derin anestezi altında sakrifiye edilen dişi laboratuvar hayvanlarının ovaryum, uterus veya vaginalarından örnek alma (12).

Mezbaha materyalinden örnek alma yöntemleri: Mezbahalarda kesilen dişi hayvanların; ovaryum, uterus veya vaginalarından örnek alma (4).

Noninvaziv örnek alma yöntemleri

Moleküler analizlerde kullanılan noninvaziv örnekleme yöntemleri; cerrahi müdahale gerektirmeden, hayvan sağlığında risk oluşturmada ve stres yaratmadan örnek alınmasını sağlamaktadır. Jinekolojik uygulamalarda endometriyal, servikal veya vaginal akıntı ve sürüntü örneklerinin yanı sıra doğum sırasında yavru zarlarının toplanması bu yöntemlere örnek olarak verilebilir (6). Veteriner jinekoloji alanında bu akıntı ve sürüntülerin makroskopik muayenesi oldukça önemlidir ve moleküler analizlerde kullanılabilir. Örnekler, hayvan türüne ve akıntı miktarına göre mikropipetlere veya uygun tüplere alınabilmektedir. Örnekleme sırasında antiseptik koşulların sağlanması, araştırmacının dikkat etmesi gereken önemli bir husustur.

Özellikle büyük ruminant veya tek tırnaklı hayvanlarda örnekleme öncesi hayvanın güvenli şekilde zapturapt altına alınması, kuyruğun bağlanması, perineal bölgenin temizlenip antiseptisinin sağlanması gerekmektedir. Endometriyal örnek alınırken; fırça, eküvyon çubuğu veya kateter gibi ekipmanlar steril kılıf veya spekulum kullanılarak vulva, vagina ve serviks temas ettirilmeden özenle uygulanmalıdır. Serviks veya vaginal örnek alınırken de benzer sterilite önlemleri alınmalıdır (13).

Alınacak olan örnek akıntı formunda ise, steril numune kaplarına hızla alınmalı, üzerine örneğin bilgilerini içeren bir etiket eklenmeli ve yapılması planlanan analizin gerektirdiği koşullara göre saklanmalıdır. İneklerden servikal sıvı toplanırken ise rektum yoluyla hafif baskı uygulanarak serviksten vaginal açıklığa sıvı akışı sağlanabilmektedir. Bu işlem sırasında piyometra veya mukometra gibi hastalık durumları tespit edilirse bu örnekler analiz için kullanılmamalıdır. Sadece berrak servikal mukusa sahip örnekler toplanmalıdır (14).

Uterus sıvılarının alınmasında Merocel swab yöntemi kullanılabilir. Bu süngerimsi materyal uterus içindeki sıvıyı emmekte ve alınan örnek buz üzerinde soğutulmuş ekstraksiyon tamponu içeren tüplere aktarılmaktadır. Örneklerin en fazla üç saat içinde Spin X Santrifüj tüplerine konulması gereklidir. Bu işlemler sonucunda elde edilen süpernatant -80 °C'de saklanabilmektedir (15,16). Merocel swab alma yöntemi, uterus yıkama yöntemine göre daha çok hayvandan numune alınmasına olanak sağlamakta ve uterus yıkamasıyla sıvı alınamayan durumlar (17) için alternatif sunmaktadır. Merocel swab yöntemi ile alınan uterus sıvısı örnekleri, yapılacak olan proteomik analizler için rahatlıkla kullanılabilir (18).

Sürüntü örneği alma yöntemi uygun maliyetli ve noninvaziv bir yaklaşımdır. Alınan örnekler, koruyucu solüsyon içeren steril tüplere hızla konmakta ve yapılması planlanan analizin gerektirdiği koşullarda saklanmaktadır (19). Vaginal sürüntü örneği ise vaginal spekulum kullanılarak, vaginanın kraniyal kısmından, izotonik sodyum klorür ile ıslatılıp doygunluğu sağlanmış pamuklu eküvyon çubukları ile dairesel hareketlerle alınabilmektedir (20). Servikal sürüntü alınırken eküvyon çubuklarının vagina duvarına değmeden geri çıkartılmasına dikkat edilmelidir (6).

Doğum sırasında yavru zarlarının toplanması için ise, kontaminasyona karşı steril bir çalışma alanı hazırlanmalıdır. Alınacak olan örneklerin dışkı veya diğer vücut sıvılarıyla temasından kaçınılmalıdır. Doğumdan hemen sonra koryon, amniyon ve allantois zarları steril pens veya forsepsler ile alınabilmektedir. Plasentanın fonksiyonel bölgelerinden alınan örnekler, hayvan türüne göre villi koryalis dağılımı açısından farklılık göstermektedir. Kedi ve köpeklerde zoner bant denilen alanlar, ruminantlarda kotiledonlar, domuz ve kısıraklarda ise plasentanın tüm yüzeyine yayılan mikrovilluslar fonksiyonel bağlantı bölgelerini oluşturmaktadır (21).

Minimal invaziv örnek alma yöntemleri

Kan örneği alma (22); endometriyal, vaginal, servikal biyopsi alma (23); folikül sıvısı aspirasyonu (8) gibi yöntemler minimal invaziv örnek alma yöntemleri olarak sınıflandırılmaktadır.

Kan örneği alma: Kan örneklerinin analizinden elde edilen bilgiler moleküler çalışmalarda kullanılabilir. Kan tüplerinde antikoagülan madde ile kanın yeterince karışmaması, yanlış veya gecikmiş ve uygun olmayan sıcaklıklarda yapılan santrifüj işlemleri, kan tüplerinin yetersiz doldurulması, toplanan örneklerin uygun olmayan koşullarda saklanması gibi hatalı işlemler, örneğin bütünlüğü ve kalitesi üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Kan örneklerinin toplanması ve işlenmesi sırasında dikkate alınması gereken çeşitli noktalar vardır (22). Örnek

alınırken; kan alınacak bölgedeki kılların tıraş edilip, derinin %70'lik alkolle silinmesi gerekmektedir. Örnek alacak kişinin kan alma sırasında eldiven kullanması sağlanmalıdır. Arteriyel kan, steril koşullarda doğrudan arterin punksiyonu ile yapılabilir. Bunun için femoral, brakial, radial ve karotis arteri tercih edilebilir. Arteriyel kan yüksek oksijen içeriği ve basıncı nedeniyle hızlı bir şekilde pıhtılaşabileceğinden örnek alma işlemi heparinize edilmiş enjektörler kullanılarak yapılmalıdır (24). Venöz kan örnekleri ise; steril kanül, intravenöz kateter veya vacutainer kullanılarak alınabilmektedir (25).

Kan örneği alırken hayvan türüne göre kan örneği alınacak olan damar farklılık göstermektedir (Tablo 1).

Tablo 1: Hayvan türüne göre kan örneği alınacak venöz damarlar (26,27).

Table 1: Venous vessels for blood sampling according to animal species (26,27).

Hayvan Türü	Örnek Alınacak Damar İsimleri
Büyük ruminant	v. jugularis, v. abdominalis subcutanea, v. coccygea
Küçük ruminant	v. jugularis, v. coccygea
Kedi, köpek	v. cephalica antebrachii, v. saphena, v. jugularis, v. femoralis
Sıçan, fare	v. coccygea
Tek tırnaklı	v. coccygea
Domuz	v. jugularis
Kanatlı	v. jugularis, v. cutanea ulnaris
Tavşan	v. auricularis

Yapılması planlanan çalışmada kullanılacak olan örneğe göre farklı kan alma tüpleri kullanılmalıdır (Tablo 2).

Tablo 2: Çalışmada kullanılacak olan örneğe göre kan alma tüplerinin özellikleri (22).

Table 2: Characteristics of blood collection tubes according to the sample to be used in the stud (22).

Alınacak Örneğe Göre Kullanılacak Tüp Özellikleri
Serum: Sarı kapaklı tüplerin içinde bulunan ayırıcı jel tabakası sayesinde santrifüj sonrasında serum pıttıdan ayrılmaktadır. Kırmızı kapaklı tüplerde de antikoagülan madde bulunmadığından kan pıttılaşmakta ve santrifüj sonrası serum eldesi sağlanabilmektedir. Serum numuneleri için istenilen miktarın yaklaşık iki katı kan alınmalıdır. Serum örnekleri özellikle ELISA ve Western Blot gibi moleküler tekniklerde protein analizi için kullanılabilir. Plazma: İçerisinde antikoagülan madde olarak Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) bulunduran mor kapaklı tüpler ve içerisinde heparin bulunduran yeşil kapaklı tüpler kanın pıttılaşmasını engellemektedir. Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmında bulunan, hücresel bileşenlerinden ayrılmış olan plazma ile DNA ve RNA analizleri yapılabilir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi moleküler tekniklerde plazma kullanılabilir. Fakat heparin PCR için inhibitör özelliğindedir. Bu yüzden antikoagülan olarak kullanılmamalıdır. EDTA, DNAazları inhibe ettiğinden çoğunlukla tüm PCR çeşitlerinde EDTA'lı tam kan tercih edilmektedir. Tam Kan: İçerisinde sodyum sitrat bulunduran mavi kapaklı tüpler ve EDTA bulunduran mor kapaklı tüpler ile kanın pıttılaşması önlenerek elde edilmektedir. Kan içerisinde bulunan şekilli elamanlardan özellikle lökositlerin çekirdek içermesi sebebiyle tam kandan hücresel DNA elde edilebilir. Ayrıca flowsitometri gibi moleküler tekniklerde de tam kan kullanılabilir.

Endometriyal biyopsi: Endometriyal epitelin yanı sıra uterus lumenine en yakın olan stratum compactum gibi daha derin katmanların da endometriyal değişikliklerinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (28). Endometriyal biyopside ince bir kateter yardımıyla uterus lümeninden doku örneği alınabilmektedir. Bazı araştırmacılar tarafından uterus biyopsisinin ineklerde sonraki fertilité üzerinde zararlı bir etkisi olduğu bildirilirken (29), bazı araştırmacılar ise doğru şekilde uygulandığında güvenli bir teknik olduğunu bildirmektedirler (30).

Endometriyal biyopsi sıklıkla kısıraklarda daha nadir olarak da ineklerde kullanılan bir yöntemdir. Kedi, köpek ve laboratuvar hayvanlarında endometriyal biyopsi örneği almak anatomik olarak mümkün değildir. İnek ve kısıraklardan endometriyal örnek alma öncesinde, örnekleme yapılacak olan hayvanların travaya alınması, alt epidural anestezi uygulanması, kuyruğun bağlanması ve vulvanın asepsisinin sağlanması gerekmektedir (31).

Kısrak ve büyük ruminantlarda endometriyal biyopsi almak için kullanılan biyopsi pensleri; uzun saplı, ince uçlu ve uterusun derin kısımlarına ulaşabilecek şekilde tasarlanmış olmalıdır. Bu amaçla biyopsi alınacak olan hayvanın türü ve vücut ölçülerine göre; Kevorkian, Miltex, Tischler, Jackson biyopsi pensleri gibi farklı tip ve boylarda biyopsi forsepsleri kullanılabilir (32,33,34). Örnekleme sırasına; steril biyopsi aletleri steril kılıf içine alınmakta ve rektovaginal yöntem ile vulva, vagina veya servikse değmeden uterusu ulaşması sağlanmaktadır (35). Kısraklarda dorsal ve ineklerde dorsal ve interkornual alandan endometriyal katları içine alacak şekilde örnekleme yapılmalıdır. Sonrasında örnek, yapılacak analiz yöntemine uygun saklama koşullarına alınmalıdır.

Servikal biyopsi: Alınacak olan örneğin boyutu küçük ise lokal anestezi tercih edilirken daha geniş çaplı ve derin dokulardan biyopsi örneği alınacaksa alt epidural anestezi tercih edilmektedir. Yapılacak olan işlem öncesinde perineal bölge öncelikle fiziksel olarak temizlendikten sonra, bölgenin asepsi ve antisepsisi çeşitli antiseptik solüsyonlar ile sağlanarak biyopsi alma işlemi gerçekleştirilmektedir (23).

Vaginal biyopsi: Lidokain ile lokal anestezi veya alt epidural anestezi uygulanarak yapılabilir (36). Örnek toplanmadan önce, perineal bölge ılık suyla yıkanmalı ve tek kullanımlık kağıt havlularla kurulmalıdır. Vulvanın asepsisi povidon iyot veya klorheksidin gibi antiseptik solüsyonlar ile sağlandıktan sonra timsah ağızlı biyopsi pensi ile dorsal vaginal alandan biyopsi örneği alınabilmektedir (31). Alınan örnek, yapılacak olan analiz yöntemine uygun saklama koşullarında saklanmalıdır.

Folikül sıvısı aspirasyonu: Sıklıkla tek tırnaklı ve büyük ruminantlarda kullanılan bir yöntemdir. Ovum pick up (OPU) aparatı olan bir ultrasonografi cihazı eşliğinde ve epidural anestezi uygulanarak örnekleme yapılabilir. OPU aparatı bulunan ultrasonografi probu ile vaginadan görüntülenene foliküllerden aspirasyon yöntemi ile folikül sıvısı toplanabilmektedir. Aspire edilen folikül sıvısı, yapılacak olan analize uygun koşullarda saklanmalıdır (37).

İnce ve kalın iğne aspirasyonu: Köpek veya kedi meme tümörlerinden ince iğne aspirasyon yöntemi ile örnekler alınabilmektedir. Bu yöntemler daha çok genel anestezi altında pre-operatif dönemde tümörün karakterizasyonu için kullanılmaktadır (10,38). Aynı zamanda bu yöntemler ile alınan aspiratlarda moleküler analizler de yapılabilir (11). İnce iğne aspirasyonunda; aspirat alınmadan önce örnek alınacak olan meme tümörünün yüzeyinde bulunan kıllar tıraş edilmeli, derinin antisepsisi sağlanmalıdır. Daha sonra tümörün boyutuna ve hayvan türüne göre değişen büyüklüklerde steril kanül takılı enjektörler yardımı ile içerisinde tümör ve meme hücrelerinin olduğu aspiratlar alınabilmektedir. Alınan aspirat hızlı bir şekilde yapılacak olan analize uygun koşullarda saklanmalıdır (10,39). Kalın iğne biyopsisi veya tru-cut biyopsisi olarak adlandırılan diğer yöntem ise daha çok kadınlarda meme tümörlerinin teşhisinde yaygın olarak kullanılan minimal invaziv bir yöntemdir (40,41). Köpek ve kedilerde de kullanılabilen bir yöntem olan kalın iğne biyopsisi, ince iğne biyopsisine göre daha fazla doku örneği alınmasına olanak vermektedir. Bu nedenle bu yöntemin örnekleme açısından daha uygun olduğu bildirilmektedir (38). Kalın iğne biyopsisi ile alınan biyopsi örneklerinin hızlı bir şekilde yapılması planlanan analize uygun saklama koşullarına alınması gerekmektedir.

İnvaziv örnek alma yöntemleri

Örnek alınacak hayvan türüne göre farklı yöntemler ile ilgili dokulardan örnekler alınabilmektedir. Laboratuvar hayvanlarında genellikle derin anestezi altında sakrifiye edilen hayvanlardan doku örnekleri hızlı bir şekilde alınmaktadır. Çiftlik hayvanlarında mezbahada kesim sırasında, tek tırnaklı ve pet hayvanlarında ise intraoperatif olarak örnekleme yapılabilir (42).

Örnekleme yapılmadan önce alınacak olan örneklerin hızlı bir şekilde uygun saklama koşullarına alınabilmesi için gerekli hazırlık yapılmalıdır. Örneklerin alınacağı kaplar, kasetler etiketlenmeli, fiksasyon solüsyonları veya hızlı dondurma yapılacaksa sıvı azot hazırlanmalıdır (43).

Yapılması planlanan çalışmada incelencek dokunun işlevsel bölümü organ diseke edilerek ortaya çıkartılmalı ve mümkün olduğu kadar büyük örnekler alınmalıdır. Örneğin yapılması planlanan çalışma korpus luteum ile ilgili ise ovaryum üzerindeki korpus luteumlar diseke edilmeli veya çalışma gebelik ile ilgili planlanıyorsa örnekler plasental bölgelerden alınmalı, çevre dokular ve kan damarları uzaklaştırılmalıdır (44).

Sakrifikasyon ile örnek alma yöntemleri

Moleküler çalışmalarda kullanılacak olan deney hayvanlarına, derin anestezi altında uygun yöntemlerle yapılan ötenazi uygulamasına sakrifikasyon adı verilmektedir. Sakrifiye edilen hayvanlardan bir veya daha fazla doku örneği toplanabilmektedir. Sakrifiye edilen deney hayvanından tüm üreme sistemi eksize edilebilmektedir. Bu organlar genellikle moleküler düzeyde doku analizleri ve histopatolojik incelemeler için kullanılabilir. Kolay ve ekonomik bir örnek alma yöntemi olmak ile birlikte tekrarlayan örneklemeler yapmak mümkün değildir (45).

Mezbaha materyalinden örnek alma yöntemleri

Bu yöntem genel olarak kesimhanelerden elde edilen; uterus, ovaryum ve diğer genital organlardan alınan doku örneklerine dayanmaktadır (42). Ovaryumlar üzerindeki fonksiyonel yapılar veya folikül sıvıları incelenmek üzere toplanabilmektedir (4). Örnek alma işlemi steril aletlerle yapılmalı ve kontaminasyon şekillenmemesi için dikkat edilmelidir. Örnekleme öncesinde örnek doku alınacak olan organın çevre dokulardan titizlikle ayrılması gerekmektedir. Elde edilen doku örnekleri yapılması planlanan analiz yöntemine uygun saklama koşullarında saklanmalıdır (46).

Embriyonik veya fetal doku örneği alma yöntemleri

Hayvan türüne göre embriyonik örnek alma yöntemleri değişiklik göstermektedir. Kedi (47), köpek (48) veya küçük ruminantlarda (49) pre-implantasyon dönemindeki embriyolar operatif olarak toplanabiliyorken, büyük ruminant ve tek tırnaklı hayvanlarda servikal yoldan intrauterin yıkama yapılarak toplanabilmekte veya in vitro olarak üretilen embriyolar kullanılabilir (50). Toplanan veya in vitro olarak üretilen embriyolar, total olarak kullanılabildiği gibi embriyo biyopsisi yapılarak; kutup cisimcikleri, blastomerler, trofoektoderm hücreleri veya blastosel sıvısı gibi embriyonik biyopsi örnekleri de analizlerde kullanılabilir (50).

Fetal dönemde hayvan türüne göre farkı yöntemler kullanılarak örneklemeler yapılabilmektedir (51,52,53). Amnion veya allatois gibi yavru sıvılarından alınan örneklerin steril tüplere aktararak yapılması planlanan analize uygun saklama koşullarına alınması gerekmektedir.

3. Uygulanacak Olan Moleküler Analiz Yöntemine Göre Örneklerin Saklama Koşulları

ELISA

ELISA yöntemi ile kan, serum, plazma, doku ve folikül sıvısı gibi örneklerde analiz yapılabilir. Kan örnekleri doğrudan, serum ve plazma örnekleri ise +4°C'de santrifüj edilerek -20°C'de analizler yapılana kadar saklanabilmektedir (54). Diğer doku örneklerinde ise biyomoleküllerin korunması için sıvı azotla şok dondurma yapılması gerekmektedir. Daha sonra doku örnekleri -86°C'de veya sıvı azotta saklanarak moleküllerin stabilitesi sağlanmaktadır (55). Alınan folikül sıvısı örnekleri de -20°C'de saklanabilmektedirler (8,56).

Dondurulmuş örneklerin çözündürülüp yeniden dondurulması protein denatürasyonuna yol açabileceği için analizler için örneklerin uygun porsiyonlara bölünerek dondurulması gerekmektedir (57).

İmmunohistokimya

İmmunohistokimyasal analizler için alınan doku örneklerinin soğuk koşullarda hızla işlenmesi, örneklerin kuruma ve bozulmasını önlemek için büyük önem taşımaktadır. Toplanan doku örneklerinden laboratuvara gönderilmeden önce hızlı bir şekilde uygun kalınlıkta kesitler alınmalıdır. Alınan bu kesitler doku kasetlerine yerleştirilerek hacimlerinin en az 5 katı miktarda %10'luk formol içerisine alınmalı ve laboratuvara bu koşullarda 24 saat içinde ulaştırılmalıdır. Laboratuvara ulaştırılan dokular alkol ile dehidre edilip parafin bloklara gömülmekte ve +4°C'de analizler yapılana kadar saklanabilmektedir (58).

İmmunohistokimyasal analizler için dokuların parafin bloklara gömülereke saklanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem dokuların uzun süre yapılarını kaybetmeden korunmasını sağlamaktadır (59).

Western blot

Western blot doku örneklerinde ilgilenilen proteinlerin tespiti ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılan moleküler bir tekniktir. Alınan kan, sürüntü, serum, plazma veya doku örnekleri uygun örnekleme ortamlarına alınarak, biyomoleküllerin korunması için sıvı azot ile şok dondurma işlemine tabi tutulmaktadırlar. Alınan örneklerin çözündürülüp tekrar dondurulması proteinlerin denatüre olmasına neden olacağı için örneklerin uygun boyutlarda porsiyonlara ayrılarak dondurulması gerekmektedir (60).

Analiz yapılana kadar uzun süre saklanacak protein örneklerinin yapılarının korunması ve enzimatik aktivitelerin durdurulabilmesi için -86°C'de saklanmalıdır (58).

DNA ve RNA analizleri

DNA ve RNA analizleri için alınan doku örneklerinin saklanması dikkat edilmesi gerekli olan en önemli husus nükleik asitlerin bozulmasını önleyici tedbirler almaktır. DNA molekülü görece daha stabildir ve farklı yöntemler ile işlenmiş örneklerden izole edilebilmektedir. DNA analizi yapılması amacıyla alınan örneklerde enzimatik aktiviteleri durdurabilmek için sıvı azotla şok dondurma yapılması ve analizler yapılana kadar doku örneklerinin -86°C'de saklanması önerilmektedir (55, 61). RNA, DNA ile karşılaştırıldığında çok daha kırılgan bir yapıya sahiptir ve çok çabuk bozulabilmektedir. Bu nedenle RNA analizlerinde, RNA stabilizasyon reaktifleri (örn. RNAlater®) kullanılarak RNA kalitesi korunması gerekmektedir. Bu reaktifler saha çalışmaları gibi hızlı işlem gerektiren durumlarda avantaj sağlamaktadır (62). RNAlater® gibi solüsyonlar RNA ve DNA stabilitesini koruyarak uzun süreli saklama imkânı tanımaktadır. Bu tür solüsyonlar, RNA miktarının belirlendiği gen ifadesi analizlerinde tercih edilmektedir. Bu solüsyonlar ile muamele edilen örnekler -20°C veya -86°C'de saklanabilmektedir (63, 64).

Özellikle RNA analizlerinin yapılacağı çalışmalarda, RNA'nın bozulmasını en aza indirmek için dikkat edilmesi gereken diğer bir hususu; örnek alımı ile saklama arasındaki geçen süredir. Bu süre ne kadar uzun olursa enzimatik bozulma da o kadar fazla olmakta ve analiz sonuçları olumsuz etkilenmektedir. Bu nedenle alınan doku örneklerinin en fazla 15 dakika içerisinde saklama için uygun koşullara alınmış olması gerekmektedir. RNA analizi yapılacak olan dokular için ideal olan sıvı azotla hemen şok dondurma işleminin yapılmasıdır (65).

4. Muhafaza Edilen Dokuların Laboratuvara Ulaştırma Koşulları

RNA veya DNA analizleri için kullanılacak olan doku örneklerinin sağlıklı bir şekilde laboratuvara ulaştırılabilmesi için içerisinde -78,5 °C'de kuru buz bulunan termokutular, sıvı azot içeren özel taşıma kapları veya içerisinde RNAlater® gibi stabilizatörler bulunan solüsyonlar kullanılabilmektedir (58). Dokuların laboratuvara taşınması sırasında kullanılan taşıyıcı kap veya kutuların darbe ve kırılmalara karşı dayanıklı, güvenli ve sızdırmaz olmasına dikkat edilmelidir. Laboratuvar uzak bir lokasyonda ise numune taşıma kapları üzerine içinde bulunan maddenin ne olduğu, soğuk zincir ile taşınması gerektiği gibi bilgilerin yazılması gereklidir. Laboratuvarda yapılacak analizler sonucunda elde edilecek verilerin doğru bir şekilde dökümant edilebilmesi için; taşınacak olan her bir doku

örneği doğru bir şekilde etiketlenmeli ve örneklerin alındığı hayvanın türü, doku örneğinin hangi organdan alındığı, örnek alma tarihi gibi bilgileri içeren bir belge hazırlanmalı ve bu belge dokular ile birlikte laboratuvara gönderilmelidir (66). Dondurulmuş doku örnekleri laboratuvara gönderilirken gerekli bilgilerin yazıldığı etiketlerin ıslanarak düşme veya silinme riski bulunmaktadır. Bu nedenle örnek kaplarının üzerine sudan etkilenmeyen silinmeyen mürekkepli kalemler ile gerekli bilgilerin yazılması daha uygun olmaktadır. Örneklerin laboratuvara ulaştırılması sürecinde biyomoleküllerin korunması bakımından taşıma işleminin en kısa sürede ve örneklerin türüne göre; içinde buz konteyneri bulunan termo taşıma çantası (+4, -20 °C), içinde kuru buz bulunan termo taşıma kutusu (-78,5 °C) veya sıvı azot (-196 °C) kullanılarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Eğer alınan doku örnekleri fikse edilmeden laboratuvara ulaştırılacak ise doku 1 saat içinde soğutulmuş bir izotonik solüsyon içerisinde laboratuvara taşınmalıdır.

İmmunohistokimyasal analizler için alınmış doku örnekleri ise %10 formol solüsyonu içine alınarak 24 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.

5. Sonuç

Bu derlemede veteriner doğum ve jinekoloji alanında yapılan araştırmalarda kullanılan moleküler analizler için uygulanacak olan örnek toplama ve saklama yöntemleri ele almıştır. Yapılması planlanan çalışmalarda incelenecek olan biyomoleküller ve kullanılacak olan yöntemlere göre farklı metodolojiler ile doku örneklerinin toplanması ve saklanması gerekmektedir. Örneğin alınan doku örneği; yapılması planlanan analize göre; +4, -20, -86 veya -196 °C'de, RNA later gibi koruyucu çözeltiler içerisinde stabilize edilerek veya %10 formol gibi solüsyonlar içinde fikse edilerek parafin bloklar içerisine alınarak saklanabilmektedir. Doku örneklerinin saklanması için kullanılacak olan bu yöntemlerin hangisinin tercih edilmesi gerektiği alınan doku örneğinin türüne ve yapılması planlanan analiz yöntemine göre değişmektedir.

Sonuç olarak, yapılması planlanan moleküler analizler için en uygun doku örneği saklama yöntemi, çalışmanın amacına, analiz türüne ve laboratuvarın olanaklarına bağlı olarak değişmektedir. Örneklerin doğru alınması, uygun koşullarda saklanması ve hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırılması, moleküler analizlerin güvenilirliğini artırmaktadır. Bu nedenle yapılması planlanan çalışmalarda bu hususların göz önünde tutulması, çalışma plan ve takviminin bu bilgiler doğrultusunda dizayn edilmesi, çalışmanın sağlıklı bir şekilde tamamlanması ve elde edilecek olan verilerin güvenilirliğinin yüksek olması açısından büyük önem taşımaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Finansal Kaynak Beyanı

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Yazar Katkısı Beyanı

Fikir/kavram: Ali Reha AĞAOĞLU

Denetleme/Danışmanlık: Ali Reha AĞAOĞLU

Kaynak taraması: Muhammed ALBAYRAK, Ali Reha AĞAOĞLU

Makalenin yazımı: Muhammed ALBAYRAK, Ali Reha AĞAOĞLU

Eleştirel inceleme: Ali Reha AĞAOĞLU

Etik Onay

Bu makaledeki sunulan verilerin, bilgilerin ve dokümanların akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edildiği, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçlarının bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunulduğuna dair yazarlardan etik beyan alınmıştır

Kaynaklar

1. Holtgrew-Bohling KJ. Laboratory Manual for Laboratory Procedures for Veterinary Technicians [E-Book]. Elsevier Health Sciences; 2024.
2. Abed FM, Dark MJ. Determining the utility of veterinary tissue archives for retrospective DNA analysis. PeerJ. 2016;4:e1996.
3. Nicoletti A, Pregel P, Starvaggi Cucuzza L, Cannizzo FT, Sereno A, Scaglione FE. Coping with tissue sampling in suboptimal conditions: comparison of different tissue preservation methods for histological and molecular analysis. Animals. 2021;11(3):649.
4. Khandoker MAMY, Atiqah NF, Ariani N. Effect of ovarian types and collection techniques on the number of follicles and the quality of cumulus-oocyte-complexes in cow. Bangladesh J Anim Sci. 2016;45(3):10-16.
5. Langbeen A, Jorssen EPA, Franssen E, Rodriguez APA, García MC, Leroy JLMR, et al. Characterization of freshly retrieved preantral follicles using a low-invasive, mechanical isolation method extended to different ruminant species. Zygote. 2015;23(5):683-94.
6. Sun B, Yeh J. Non-invasive and mechanism-based molecular assessment of endometrial receptivity during the window of implantation: current concepts and future prospective testing directions. Front Reprod Health. 2022;4:863173.
7. Fagundes NS, Rezende AL, Alvarenga PB, Magalhães LQ, Santos RM, Headley SA, et al. Proinflammatory gene expression relative to the collection technique of endometrial samples from cows with and without subclinical endometritis. J Dairy Sci. 2019;102(6):5511-7.
8. Niribili R, Jeyakumar S, Kumaresan A, Lavanya M, Sinha MK, Kausik M, et al. Prolonged follicular dominance is associated with dysregulated proteomic profile of the follicular fluid in Bos indicus cows. Theriogenology. 2024;213:34-42.
9. Seneda MM, Zangirolamo AF, Bergamo LZ, Morotti F. Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. Theriogenology. 2020;150:180-5.
10. Hazirolu R, Yardimci B, Aslan S, Yildirim MZ, Yumusak N, Beceriklisoy H, et al. Cytological evaluation of canine mammary tumours with fine needle aspiration biopsy technique. Rev Med Vet. 2010;5:212-8.
11. Sailasuta A, Ketpun D, Piyaviriyakul P, Theerawatanasirikul S, Theewasutrakul P, Rungsipipat A. The relevance of CD117-immunocytochemistry staining patterns to mutational exon-11 in c-kit detected by PCR from fine-needle aspirated canine mast cell tumor cells. Vet Med Int. 2014;2014:787498.
12. Abdel-Tawab TM. Biochemical and molecular studies on tramadol-mediated pituitary-gonadal axis and ovarian dysfunctions in adult female albino rats. EJZ. 2016;174(4083):1-24.
13. Heil BA, Van Heule M, Thompson SK, Kearns TA, Oberhaus EL, King G, et al. Effect of sampling method on detection of the equine uterine microbiome during estrus. Vet Sci. 2023;10(11):644.

14. Huang F, Zhang LL, Niu P, Li XP, Wang XY, Wang J, et al. An observation of the microstructure of cervical mucus in cows during the proestrus, estrus, and metestrus stages and the impact on sperm penetration ability. *Vet Sci*. 2024;11(9):391.
15. Crowley-Nowick PA, Bell MC, Brockwell R, Edwards RP, Chen S, Partridge EE. Rectal immunization for induction of specific antibody in the genital tract of women. *J Clin Immunol*. 1997;17:370-9.
16. Rohan LC, Edwards RP, Kelly LA, Colenello KA, Bowman FP, Crowley-Nowick PA. Optimization of the week-cel collection method for quantitation of cytokines in mucosal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7:45-8.
17. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J*. 2005;46:255-9.
18. Itze-Mayrhofer C, Brem G. Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: female reproductive fluids. *J Proteomics*. 2020;225:103884.
19. De Boer MW, LeBlanc SJ, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S. Invited review: systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014;97:3983-99.
20. Mogheiseh A, Derakhshandeh A, Heidarifar S, Bandariyan E. Direct endoscopic lavage and biopsy sampling and evaluation of uterine microflora in various stages of the canine estrous cycle. *Vet Res Forum*. 2020;11(1):89.
21. Thornton AE. The role of extracellular vesicles in immunomodulation during bovine pregnancy. 2024.
22. Kennedy AD, Ford L, Wittmann B, Conner J, Wulff J, Mitchell M, et al. Global biochemical analysis of plasma, serum and whole blood collected using various anticoagulant additives. *PLoS One*. 2021;16(4):e0249797.
23. Singh R, Ghuman SS, Pathak D, Singh N. The impact of intracervical hyaluronidase enzyme on cervical histomorphology in successfully detorted uterine torsion affected buffaloes. *Buffalo Bull*. 2023;42(3):373-82.
24. Henry RJ, Vaikuntam J, Jones DJ. The influence of midazolam and nitrous oxide on respiratory depression in laboratory rats. *Pediatr Dent*. 1996;18:281-6.
25. Waxman C, Lind T. Blood sample collection and handling. In: *Advanced Monitoring and Procedures for Small Animal Emergency and Critical Care*. 2023. p. 699-715.
26. Kusmeirczyk JV, Kling M, Daclam SM. Rats and mice. *Exotic Animal Laboratory Diagnosis*. 2020;81.
27. Wood RD. Hematology of bovids. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 2022. p. 1004-11.
28. Wagener K, Gabler C, Drillich M. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*. 2017;94:21-30.
29. Bonnett BN, Martin SW, Meek AH. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Prev Vet Med*. 1993;15:205-20.
30. Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee J, Doherty ML. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology*. 2010;73:988-94.
31. Rasmussen CD, Haugaard MM, Petersen MR, Nielsen JM, Pedersen HG, Bojesen AM. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. *Vet Res*. 2013;44:1-8.
32. Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR. Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*. 2011;75:1567-81.
33. Ağaoğlu AR, Korkmaz Ağaoğlu Ö, Aslan S, Kocamüftüoğlu M, Köker A, Çetin Y, et al. The effect of presynch-10 and ovsynch on some endometrial toll- and nod-like receptor gene expressions in repeat breeder cows. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2020;26(1):111-20.
34. Köhne M, Diel E, Packeiser EM, Böttcher D, Tönissen A, Unruh C, et al. Analysis of gene and protein expression in the endometrium for validation of an ex vivo model of the equine uterus using PCR, digital and visual histopathology. *Theriogenology*. 2024;221:38-46.

35. Thavaneetharajah P. Comparison of gene expression levels in embryo, endometrium and corpus luteum of dairy heifers and lactating dairy cows and manipulation of endometrial gene expression in-vitro [dissertation]. University of British Columbia; 2011.
36. Shpigel NY, Adler-Ashkenazy L, Scheinin S, Goshen T, Arazi A, Pasternak Z, et al. Characterization and identification of microbial communities in bovine necrotic vulvovaginitis. *Tierarztl Praxis Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 2017;45(6):34-9.
37. Gebremedhn S, Gad A, Ishak GM, Menjivar NG, Gastal MO, Feugang JM, et al. Dynamics of extracellular vesicle-coupled microRNAs in equine follicular fluid associated with follicle selection and ovulation. *Mol Hum Reprod*. 2023;29(4):gaad009.
38. Pakdeesaneha T, Chankow K, Techarungchaikul S, Thongsima T, Kongtia M, Tharasanitt T. Comparison of fine-needle aspiration and core needle biopsy for the pre-operative diagnosis of canine and feline mammary gland tumours. *Vet Comp Oncol*. 2024;22:566-73.
39. Sontas BH, Yüzbaşıoğlu Öztürk G, Toydemir TFS, Arun SS, Ekici H. Fine-needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumours: a comparison between cytology and histopathology. *Reprod Domest Anim*. 2012;47:1225-30.
40. Kurita T, Tsuchiya S, Watarai Y, Yamamoto Y, Harada OI, Yanagihara K, et al. Roles of fine-needle aspiration and core needle biopsy in the diagnosis of breast cancer. *Breast Cancer*. 2012;19(1):23-9.
41. Vimpeli SM, Saarenmaa I, Huhtala H, Soimakallio S. Large-core needle biopsy versus fine needle aspiration biopsy in solid breast lesions: comparison of costs and diagnostic value. *Acta Radiol*. 2008;49(8):863-9.
42. Karveliëne B, Zilinskas H, Riskeviciene V. Post-mortem examination of sows genital organs culled for reproductive disturbances and immunohistochemical studies on ER α and PR A receptors in the anoestral sows uterus. *Reprod Domest Anim*. 2007;42(3):275-81.
43. D'haeseleer M. Localization and distribution of estrogen receptors and progesterone receptors in the bovine ovary in relation to the cell dynamics [dissertation]. Ghent University; 2006.
44. Hughes CHK, Inskeep EK, Pate JL. Temporal changes in the corpus luteum during early pregnancy reveal regulation of pathways that enhance steroidogenesis and suppress luteolytic mechanisms. *Biol Reprod*. 2020;103(1):70-84.
45. Shomer NH, Allen-Worthington KH, Hickman DL, Jonnalagadda M, Newsome JT, Slate AR, et al. Review of rodent euthanasia methods. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2020;59(3):242-53.
46. Ault-Seay TB, Payton RR, Moorey SE, Pohler KG, Schrick FN, Shepherd EA, et al. Endometrial gene expression in response to lipopolysaccharide between estrous cycle phases and uterine horns in cattle. *Front Anim Sci*. 2022;3:939876.
47. Ciani F, Cocchia N, Rizzo M, Ponzio P, Tortora G, Avallone L, et al. Sex determining of cat embryo and some feline species. *Zygote*. 2008;16:169-77.
48. Graubner FX, Gram A, Kautz E, Bauersachs S, Aslan S, Agaoglu AR, et al. Uterine responses to early pre-attachment embryos in the domestic dog and comparisons with other domestic animal species. *Biol Reprod*. 2017;97(2):197-216.
49. Karakaş Alkan K, Alkan H. In vivo embryo production in sheep and goats. In: Abbas RZ, Khan A, Liu P, Saleemi MK, editors. *Animal Health Perspectives*. Pakistan: Unique Scientific Publishers; 2022. p. 175-9.
50. Herrera C. Clinical application of preimplantation genetic testing in equine, bovine, and human embryos. *J Equine Vet Sci*. 2016;41:29-34.
51. Tal S, Bar-Gal G, Arlt SP. Evaluation of short-term safety of ultrasound-guided fluid sampling in the dog (*Canis lupus familiaris*). *Vet Rec*. 2021;e31.
52. Essawi WM, Mostafa DIA, El Shorbagy AIA. Comparison between biochemical analysis of cattle amniotic fluid and maternal serum components during pregnancy. *World's Vet J*. 2020;10(1):67-73.
53. Ripley AM, Penedo MCT, Grahn RA, Martinez de Andino EV, Wallborn SR, Serafini R, et al. Equine fetal genotyping via aspiration of yolk-sac fluid at 22-28 days of gestation. *Theriogenology*. 2020;142:34-40.

54. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem.* 2014;47:258-66.
55. Fouts AN, Romero A, Nelson J, Hogan M, Nasarabadi S. Ambient biobanking solutions for whole blood sampling, transportation, and extraction. In: *Biochemical Analysis Tools—Methods for Bio-Molecules Studies* [Internet]. IntechOpen; 2020 [cited 2025 Jun 10]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/72922>
56. Patil A, Nazar S, Selvaraju S, Chandrasekaramurthy V, Ravindra JP. Characterization of growth and atresia of buffalo ovarian follicles by follicular fluid hormonal levels and transcripts expression studies. *Int J Vet Sci Biotechnol.* 2021;17(4):1-6.
57. Alinovi CA, Ward MP, Lin TL, Wu CC. Sample handling substantially affects Johne's ELISA. *Prev Vet Med.* 2009;90(3-4):278-83.
58. Verma A. Technology Networks: Immunohistochemistry Techniques, Strengths, Limitations and Applications [Internet]. 2022 [cited 2024 Jul 4]. Available from: <https://www.technologynetworks.com>
59. Valera VA, Walter BA, Linehan WM, Roberts DD, Merino MJ. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples: pitfalls and potentials. *Curr Proteomics.* 2009;6(2):122-39.
60. Cavalcanti E, Scaramuzzi M, Armentano RA. New reliable method for tissue preservation. *Pathol Res Pract.* 2022;234:153910.
61. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:361590.
62. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(12):1929-35.
63. Hatzis C, Sun H, Yao H, Hubbard RE, Meric-Bernstam F, Babiera GV, et al. Effects of tissue handling on RNA integrity and microarray measurements from resected breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(24):1871-83.
64. Mutter GL, Zahrieh D, Liu C, Neuberg D, Finkelstein D, Baker HE, et al. Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics.* 2004;5:88.
65. Sheldon E, Vo KC, McIntire RA, Aghajanova L, Zelenko Z, Irwin JC. Biobanking human endometrial tissue and blood specimens: standard operating procedure and importance to reproductive biology research and diagnostic development. *Fertil Steril.* 2011;95(6):2120-2.e1-12.
66. Cornish NE, Anderson NL, Arambula DG, Arduino MJ, Bryan A, Burton NC, et al. Clinical laboratory biosafety gaps: lessons learned from past outbreaks reveal a path to a safer future. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(3):e00110-20.