

Yengeç ve Yumurta: Kanser Araştırmalarında Cıvciv Embriyosu Kullanımının Tarihçesi

The Crab and the Egg: A History of Cancer Research Using Chick Embryos

Öz

Amaç: Cıvciv embriyoları uzun zamandır embriyo gelişimine dair araştırmalarda bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Bir tür hastalık olarak kanser de uzun zamandır bilinmekle birlikte, onkogenез ve embriyogenезin bir arada incelenmesi daha çok son bir asırda söz konusu olmuştur. Onkogenезin anlaşılmasında cıvciv embriyoları uygun bir model sağlamaktadır. Çalışmamızda geçmişte birbirinden bağımsız çalışılmış olan onkogenез ve embriyogenез hadiselerinin birlikte ele alınma sürecini incelemek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Cıvciv embriyolojisi ve kanser araştırmaları tarihiyle ilgili çalışmalara ve cıvciv modellerinin kanser araştırmalarında kullanılabilirliğiyle ilgili güncel derlemelere yönelik kapsamlı bir literatür taramasından elde edilen bulgular değerlendirilmiştir.

Bulgular: Antikiteden itibaren gerek gelişim biyolojisi gerekse kanserin klinik ve etiyolojik özellikleri birer inceleme alanı olmuştur. Her iki alan da farklı dönemlerde geçerli farklı teorilere göre ve birbirinden bağımsız ele alınmıştır. Mikroskobun kullanılmaya başlaması, ardından tekniklerin ve teknolojinin giderek gelişmesi ve hücresel patolojinin yaygın bir biçimde benimsenmesi onkogenез ve embriyogenезin birlikte ele alınması için uygun zemin oluşturmuştur. Yirminci yüzyıl başlarında cıvciv embriyolarına kanser nakli deneyleri başlamış ve aynı yüzyılın sonlarında çeşitli sinyal yolları keşfedilmiştir. Cıvciv embriyolarının kullanımı devam etmekle birlikte, bu süreçte farklı modeller de ortaya çıkmıştır.

Tartışma ve Sonuç: Embriyogenез ve onkogenезin moleküler düzeyde benzer sinyal yolları içermesi gelişim biyolojisi ve kanser biyolojisi alanlarını birbirine yaklaştırmaktadır. Cıvciv embriyo modelleri her iki alan için de kullanışlı bir çalışma modeli teşkil etmektedir. Kök hücre ve gen manipülasyonu boyutları da eklenerek, bu modellerin kullanılmaya devam etmesi beklenmektedir.

Anahtar Sözcükler: cıvciv embriyolojisi tarihi; kanser araştırmaları; sinyal yolları

Abstract

Aim: Chick embryos have long been used as a source in research on embryonic development. Although cancer has also long been known as a nosological entity, the joint investigation of embryogenesis and oncogenesis has mostly occurred during the last one hundred years. Chick embryos provide a suitable model for understanding oncogenesis. In this study, we aimed to investigate the historical process that has led to joint studies of embryogenesis and oncogenesis, which were previously studied separately.

Materials and Methods: We evaluated findings that resulted from an extensive literature review of studies on the history of chick embryology and cancer research and recent reviews on the usability of chick models in cancer research.

Results: Both developmental biology and clinical and etiological characteristics of cancer have been an area of study since antiquity. The two fields were worked on separately and in line with different theories prevailing at different periods of time. The introduction of the microscope, the subsequent progressive advance in techniques and technology, and the widespread adoption of cellular pathology paved the way for joint studies of embryogenesis and oncogenesis. The early 20th century saw the first experiments of cancer transplantation in chick embryos, and various signaling pathways were discovered toward the end of the same century. While the use of chick embryos continues, other models were also introduced during this period.

Discussion and Conclusion: Given the similarities in molecular signal pathways involved in embryogenesis and oncogenesis, developmental biology and cancer biology are closely linked to each other. Chick embryo models constitute a useful study model in both fields. It is expected that these models will continue to be used, being enhanced by stem cell and gene manipulation research.

Keywords: cancer research; history of chick embryology; signal pathways

Serap Uslu¹ (müteveffa),
Mahmut Alpertunga Kara²

¹ İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

² İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı

Geliş/Received : 12.05.2020
Kabul/Accepted: 26.06.2020

DOI: 10.21673/anadoluklin.737042

Yazışma yazarı/Corresponding author
Mahmut Alpertunga Kara

Ünalan Mah., Ünalan Sok., İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi—Kuzey Kampüs, 34700 İstanbul, Türkiye
E-posta: alpertunga.kara@medeniyet.edu.tr

ORCID

Serap Uslu: 0000-0002-6613-527X
M. Alpertunga Kara: 0000-0002-2031-3042

GİRİŞ

Dünyada ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer alan kanser, önemi giderek artan bir sağlık problemidir. İstatistiklere göre 2012 yılında dünyada 14,1 milyon yeni kanser vakası kaydedilmiş, kanser nedenli 8,2 milyon ölüm gerçekleşmiştir. Türkiye’de ise sebebi bilinen ölümler arasında ilk sırada kardiyovasküler hastalıkların, ikinci sırada ise kanserlerin geldiği görülmektedir (1). Bu bakımdan kanser araştırmalarının önemli ve öncelikli bir alan olduğu söylenebilir. Güncel çalışmalarda onkolojik ve embriyolojik gelişim süreçlerinin moleküler orijinler açısından büyük benzerlikler gösterdiği, her iki süreçte de kök hücre proliferasyon ve diferansiyasyonun temel rol oynadığı görülmektedir. Embriyogenez ve organogenez süreçlerinde işlev gören sinyal moleküllerinin ve büyüme faktörlerinin embriyonik dönem sonrasında faaliyetini sürdürdüğü, ancak iletimde meydana gelen bazı aksaklıklar sebebiyle işleyişin bozulduğu ve bunun onkogeneze sonuçlandığı düşünülmektedir (2–5). Bununla birlikte embriyo ve tümör hücrelerinin hücre göçünde benzer mekanizmalar kullandıkları bilinmektedir (6,7). Bu ortak mekanizmalar sebebiyle embriyogenez ve onkogeneze süreçleri birlikte ele alınabilir. Dolayısıyla embriyolar üzerinde yapılan çalışmalar kanser araştırmalarının önemli kollarından biridir.

Civciv embriyoları uzun zamandır insanın dikkatini çekmiş olup kanser de uzun zamandır bilinmektedir. Ancak bu ikisinin birlikte ele alınması ancak yakın bir dönemde, kanser çalışmaları belli bir safhaya geldikten sonra mümkün olmuştur. Bu çalışmada, embriyogenez ve onkogeneze hadiselerinin açıklanmasında ortak bir yöntem olarak civciv embriyo modellerinin kullanılması suretiyle bu önceden ayrı iki alanın bir araya geliş sürecini ortaya koymak amaçlanmıştır.

GEREK VE YÖNTEMLER

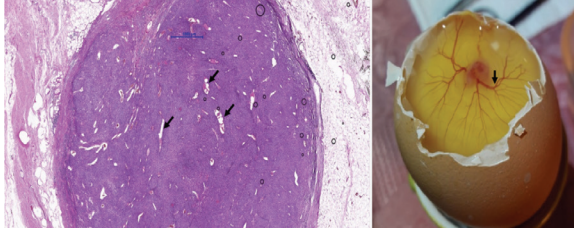
Kapsamlı bir literatür taraması gerçekleştirilmiş ve tarihte kanser ve civciv embriyolojisine dair araştırmalardan, kanserle ilişkili olarak civcivler üzerinde yapılan çalışmalardan, ilgili sinyal yollarının gelişimine yönelik incelemelerden ve de civciv modellerinin kanser araştırmalarında kullanılabilirliğine dair güncel derlemelerden elde edilen bulgular, sebep–sonuç ilişkileri üzerinde durularak, birlikte değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Kanser incelemeleri

Kanser çok eski bir hastalıktır; tarih öncesi çağlara ait fosillerde dahi kanser örnekleri görülebilmektedir. Mesela Jura Devri’ne ait bir dinazor (*Allosaurus fragilis*) fosilinde kondrosarkom bulunmuştur. Ancak eski insanlarda kansere nadir rastlanmaktadır. Neandertallere ait binlerce kemik arasında, yaklaşık 35.000 yıl önceye ait tek bir örnek (menenjiyom) bulunabilmiştir. Keza binlerce antik Mısır mumyası arasından sadece kırk kadarında neoplazi örneklerine rastlanmıştır (8). Eski tıbbi metinler de konu hakkında pek aydınlatıcı değildir. Modernite öncesi tıp sistemlerinde “sağlık” ve “hastalık” anlayışları kadar hastalıkların tasnifi de günümüzdekinden farklıdır; dolayısıyla bugün anladığımız şekilde bir kanser kavramı bulunmadığı için, tarihi kayıtlarda hastalığın izini sürmek zordur. Ancak “kötü şişlik”ler veya “yara”lar hakkında yazılanlardan hareketle dolaylı bilgiler elde edilebilir (9). Antik Mısır’dan Ebers papirüsünde, açık bir lipom tanımı bulunmaktadır. Edwin Smith papirüsünde göğüs bölgesinde kanser veya enfeksiyon olabilecek bazı lezyonlar tasvir edilmektedir. Kahun papirüsünde tarif edilen vajinal akıntı ise, enfekte uterus kansere veya rektovajinal fistülün eşlik ettiği invaziv rektal karsinoma benzerdir (10) Metinlerde bahsi geçen lezyonlar daha çok deri, meme ve genital organlarda görülmüş şişlik ve yaralardır. Tedavide eksizyon ve koterizasyon gibi cerrahi usuller yahut yakıcı (İng. *caustic*) merhemler ve arsenik macunu gibi ilaçlar kullanılmıştır (9,11). Bunların yanında, bazı Sümer metinlerinde “kötü türde,” “yayılabilen” ve “ölüme sebep olan” bazı ülserlerden ve Hint medeniyetine ait *Sushruta Samhita* adlı eserde (MS 2. yy.) enfeksiyona veya maligniteye bağlı olabilecek birtakım şişliklerden bahsedilmektedir. Eski Çin medeniyetine ait tıp klasiklerinde ise kanser teşhisine dair ifadeler rastlanmamaktadır (8).

Humoral patoloji döneminde ilgili bilgiler artmıştır; antik Yunan’a ait kayıtlar, daha öncelilere göre bir nebze daha açıktır. Kapsamı ve mahiyeti net olmamakla birlikte, “kanseri” kavramının ortaya çıkışı bu dönemde rastlar. Hipokrat (MÖ 460–370) iyi ve kötü huylu tümörlerin farklarından bahsetmiştir. Kötü huylu tümörleri çevreleyen damarların yengeç kısıcaqlarına benzediğini düşündüğü için, bu tür lezyonları Yunan-



Görsel 1. Leyomyosarkomda ve Hamburger–Hamilton (HH) sınıflamasına göre evre HH20'de bir civciv embriyosunda anjiyogenez (oklar)

ca “yengeç” anlamına gelen (Latin harfleriyle) *karkinos* sözcüğüyle adlandırmıştır (8). Sonrasında Latince de ise aynı anlama gelen *cancer* sözcüğü kullanılmıştır (9). Kanser ismini “kitle ve etrafındaki damarlar” görüntüsünden almış olması ilginçtir. Tümör etrafında yeni damarların oluşması kanserin seyrinde kritik bir safhanın işaretidir: Yeni damarlar hem kitlenin beslenmesini hem de yayılmasını kolaylaştırır. Ayrıca, yeni damar oluşmasını uyaran kimyasal faktörler kanser biyolojisinde olduğu gibi normal embriyonik gelişim süreçlerinde de çok etkilidir. Onkogenез ve embriyogenez hadiselerini bağlayan bu halkanın varlığı tarihte çok sonra anlaşılacaktır. Bu nokta bir yana, isimlendirmede isabetli bir seçim yapılmış olduğu görülmektedir.

Hipokrat Külliyyatı'nda vücut yüzeyinde görünür olmayan, “gizli” kanserleri tedaviye çalışılmaması tavsiye edilmektedir. Bunların tedavisi halinde hastanın hayatta kalma süresi kılacaktır (10). Galen (MS ~150) neoplastik lezyonlardan “doğal olmayan büyümeler” olarak bahsetmektedir. Bunları kara safra ile ilişkilendirmekte ve cerrahi tedavi tavsiye etmemektedir (9). İslam Medeniyeti dönemi otoritelerinden Ebu Bekir Razî (865–925) nazal polipler ile kanser arasındaki farktan, kanserin aşırı bitkinliğe yol açan, tedavi edilemeyen bir hastalık olduğundan bahsetmekte, Ebu'l-Kâsım Zehravî (ö. 1013) de ilerlemiş kanser vakalarında tedavinin mümkün olmadığını bildirmektedir (9,10,12). İbn Sina'ya (980–1037) göre kanser, kara safradan kaynaklanan ve başlangıçtan itibaren sert vasıf gösteren bazı şişliklerdir. Etraflarında yengeç kısaçları gibi damarlar bulunur. Bunlar başlangıçta gizli olsa da giderek aşikar bir biçimde büyür ve dokular içinde kök salarak yıkıcı etki gösterir. Erken evrede sarı arsenikle tedavi edilmeleri mümkün olabilir; ileri evrede ise tedavi pek mümkün değildir ve lezyona hiç

dokunulmaması sağkalım açısından daha iyi sonuç verir (10,13,14).

Rönesans'la birlikte diğer alanlarda olduğu gibi kanser konusunda da gelişmeler hızlanmıştır. Paracelsus (1493–1541) madencilerde akciğer kanserinden bahsetmektedir. Ambroise Paré (1510–1590) bazı yüzeysel kanserlerin geniş eksizyonla tedavisini tavsiye etmiş ve meme kanseri tedavisinde cıva kullanmayı denemiştir (16). Giovanni Battista Morgagni'nin (1682–1771) otopsi uyguladığı ve patolojik bulgularla klinik tablo arasında ilişki kurmaya çalıştığı yedi yüz kadar vakanın on yedisi, farenks, larenks, kolon, pankreas, kemik, mide, meme vd. kanser vakalarıdır (16). Beri yanda Boerhaave (18. yy.), kanseri lokal iritasyonla açıklamıştır (9).

Sistemik kanser çalışmalarına ise ancak 19. asırda başlanmıştır. Marie François-Xavier Bichat (1771–1802) postmortem diseksiyon bulgularına dayanarak yirmi kadar doku tipi tanımlamıştır. Morgagni hastalıkların sebeplerini organlarda ararken, Bichat doku seviyesinde açıklamalar getirmiştir. Pek çok tümörü incelemiş ve bunların dokuların hatalı şekillenmesiyle ortaya çıktığını ileri sürmüş, kanserlerde stroma ve parankim farkına dikkat çekmiş, bütün kanserlerin bağ dokudan köken aldığı fikrini ortaya atmıştır (8,9,17,18). Akciğer tüberkülozu ile akciğer kanserinin iki farklı hastalık olduğunu açıklayan René Laennec (1781–1826) ise, homolog (mevcut dokuyla analog) ve heterolog tümörler arasında ayırım yapmıştır (9,18). Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşebileceğini ileri süren Laennec'e göre, kanserlerle normal dokular arasında benzerlik bulunmaktadır (8).

On dokuzuncu yy. başında yaygın kanaat, kanserin vücudun geneliyle ilgili bir hastalık, kitlelerin ise sadece lokal birer tezahür olduğu şeklindeydi. Hastalığın tabiatının daha iyi anlaşılması, hücresel düzeyde çalışmaların ardından gerçekleşmiştir. Patolojiyi hücre seviyesine indiren ilk kişi, Johannes Müller, modern kanser çalışmalarının öncüsü sayılabilir. Mikroskobun rutin kullanıma girmesiyle birlikte kanser çalışmaları hızlanmıştır ve kanser dokularını mikroskopla inceleyen Müller, mikroskobik patolojinin kurucusudur (8,17,19). *Ueber den feineren Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste* (Tr. Kanser ve Onunla Karıştırılabilecek Morbid Kitlelerin Tabiatı ve Yapısal Karakteristikleri Üzerine) adlı eserinde (1838), tümörleri

kimyasal ve hücrel özelliklerine göre sınıflandırmış, kanser hücrelerinin başka hücrelerden ayırıcı, kendilerine has mikroskobik özellikleri olduğunu tespit etmiş ve epitelyal tümörlerle bağ doku tümörlerini mikroskobik olarak birbirinden ayırmıştır. Kanserli dokuların Laennec'in bahsettiği şekilde heterolog olmadığını, kanser hücrelerinin köken aldıkları dokunun hücrelerine benzediğini, dahası tümör dokularının embriyonik tabiatlı olduğunu ileri sürmüştür: Kanser hücreleri embriyonik dönemden itibaren mevcut olmakla birlikte kendilerini zaman içinde göstermektedir ve kökenleri bütün vücutta normal doku elemanları arasında dağılmış bulunan amorf embriyonel blastemadır. Embriyoloji alanında da çalışmaları bulunan Müller, kendi ismiyle de anılan kanalı (Mülleryan/paramezonefrik kanal) bulmuştur (8,9,18,19).

Johannes Müller'nın öğrencilerinden biri olan Rudolf Virchow (1821–1902), bilhassa 1858 tarihli eseriyle (*Die Cellular pathology*), hücrel patolojinin yerleşmesinde merkezî bir rol oynamıştır (17,20). Virchow mikroskobik bulgularla klinik tablo arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Ona göre patolojik ve normal süreçler birbirine benzemektedir; ancak patolojik olanlar zaman, yer ve büyüklük gibi özellikler bakımından ayrılmaktadır. Homolog tümörler genel olarak benign ve normal dokuda bulunan hücrelerin sayı ve büyüklüğünün artmasıyla karakterizedir. Heterolog tümörler ise genellikle maligndir ve normal dokuda bulunmayan yeni hücre tiplerinin gelişmesiyle karakterizedir (8,18,20). Virchow sarkom, miyom, fibrom gibi tümörleri yeniden tarif etmiş, yanı sıra miyosarkom ve gliyom gibi yeni tümörler bildirmiştir. Kanserinin sebebi konusunda lokal iritasyon savını desteklemiştir. Bütün tümörlerin bağ dokudan, bağ dokuda bulunan farklılaşmamış hücrelerden geliştiğini savunmuş, embriyonik vasıftaki bu hücrelerin multipotent olup farklı tip kanserlere dönüşebildiğini öne sürmüştür (9). Öte yandan o dönemin araştırmacıları Virchow'un bu görüşlerine karşı çıkmıştır. Bunda Carl Thiersch ve Wilhelm Waldeyer tarafından epitelyal kanserlerin bağ dokudan değil epitelyal hücrelerden kaynaklandığının gösterilmesi de etkili olmuştur (8). Julius Cohnheim (1839–1884) ise 1875'te bazı tümörlerin embriyonik kalıntılardan geliştiğini ileri sürmüştür: Tümörlerin kökeni embriyonik gelişme sırasında hatalı yerleşim gösteren hücre yuvaları veya embriyonik karakterini

koruyan hücrelerdir. Tüm vücutta bulunan bu hücrelerin neoplazi potansiyeli vardır (8,21).

Kanser konusunda tarih öncesinden 20. yüzyıla kadarki gelişmeleri gözden geçirdikten sonra, uzunca bir süre bundan bağımsız bir seyir göstermiş olan civciv embriyolarına dair çalışmaları ayrıca incelemek gerekmektedir. Bu iki sürecin yollarının kesişmesi, ancak her ikisi de belli bir safhaya geldikten sonra gerçekleşmiştir.

Civciv embriyosu incelemeleri

Antik Mısırlıların MÖ 3000 civarında, yapay kuluçka uyguladıkları yumurtalarda embriyo gelişimini gözlemledikleri düşünülmektedir (22). Antik Yunan'dan Hipokrat Külliyyatı'nda civciv embriyolarından bahsedilmekte, kuşun yumurta sarısından meydana geldiği, yumurta beyazının ise gıda olduğu ifade edilmektedir (23,24). Civciv embriyoları hakkında ayrıntılı tasvirleri bulunan Aristoteles (23), eseri *Historia Animalium*'da (MÖ 330) embriyonun morfolojik değişikliklerini kronolojik olarak aktarmaktadır (7,22). Epigenez tezinin öncüsü sayılabilecek olan Aristoteles, döllenmiş yumurtaları farklı evrelerde açmış, embriyoların tedrici surette geliştiğini ileri sürmüş ve bu fikirleriyle 17. yüzyıla kadar etkili olmuştur (24). Erişkin insanın minyatür bir suretinin döllenme anında mevcut olduğunu ve bundan sonraki gelişmenin sadece büyümekten ibaret olduğunu iddia eden preformasyon tezi taraftarları ile gelişmenin safhalar halinde olduğunu ve karmaşıklığın giderek arttığını savunan epigenez tezi taraftarları arasındaki tartışma, 19. yüzyıla kadar devam etmiştir (25).

Albertus Magnus 13. yüzyılda yaptığı civciv embriyosu çalışmalarında 3. günde kalbi, 10. gün dolaylarında ise diğer organları belirlemiştir (24). On altıncı yüzyıl sonu ile 17. yüzyıl başında yayımlanan eserleriyle Hieronymus Fabricius, çok sistematik olmamakla birlikte, embriyo gelişmesinin safhalarına dair ilk ayrıntılı tasvirleri, mükemmel gravürlerle birlikte sunmuştur (22). On yedinci yüzyıl ortalarında William Harvey civciv embriyolarının gelişimiyle ilgilenmiş ve epigenez fikrini desteklemiştir. Mikroskop kullanan Marcello Malpighi'nin 1762 yılında yayımlanan kitabı *De Ovo Incubato*'da blastoderm, nöral oluk, somitler ve en erken kan damarları gösterilmiştir (24). Alman bilim adamı Beguelin 1750'li yıllarda açık yumurta

kullanılan birtakım kültür teknikleri serdetmiş, böylece embriyonun gelişme sürecini izlemek mümkün hale gelmiştir. On dokuzuncu yüzyılda Karl Ernst von Baer ve Heinz Christian Pander, Beguelin tarafından geliştirilen teknikleri kullanarak embriyoyu oluşturan katmanları; ektoderm, mezoderm ve endodermi tanımlamışlardır. Bu yüzyılda mikroskopların gelişimi kadar boyama ve kesit alma tekniklerinin ilerlemesi de gözlemsel çalışmalara hız kazandırmıştır. Mathias-Marie Duval 1889'da ilk tamamlanmış civciv morfoloji atlasını (*Atlas d'embryologie*) yayımlamıştır (7,24).

On dokuzuncu yüzyıl sonlarında Wilhelm Roux ve takipçileri gelişmeyi engelleyen deneysel müdahalelerle gelişim süreçlerinin sadece gözlem yapmaya göre daha iyi anlaşılabileceğini fark etmişlerdir. Rawles, Fell, Rudnick, Graper, Wetzel, Adelman, Pannett gibi araştırmacıların embriyo ve hücre kültürünü ve civciv embriyosunu incelemek için kullanılan mikrocerrahi ve haritalama yöntemlerini mükemmelleştirilmesiyle, civciv embriyoları deneysel embriyoloji için uygun modeller arasına girmiştir (25). Yirminci yüzyılla birlikte civciv embriyoları üzerinde, ilkel çizginin anterior ucunun yok edilmesiyle veya mezoblastın engellenmesiyle kan adacığının oluşumunun önlenmesi gibi deneysel mahiyette çalışmalar başlamıştır (24). 1912 yılında McWhorter ve Whipple ilkel çizgi aşamasında *in vitro* embriyo kültürünü ilk kez başarmış olduklarını bilim dünyasına bildirmiştir (22). 1920'lerde civciv embriyosunun manipülasyonu daha da gelişmiş, koryoallantoik membran (KAM) kültür yöntemleri kullanılmaya başlamıştır. Ek olarak Honor Fell ve Julian Huxley tarafından göz, kulak ve metanefroz gibi organların kültürleri yapılmıştır. Waddington 1930'da civcivlerde embriyoların *in vitro* olarak yetiştirilmesiyle hipoblastın primitif çizginin yönünü etkilediğini göstermiştir (24). Erken safhadaki embriyoların yeterliliği ve bunların parçaları, sol-sağ mekanizmaları, asimetri ve hücre katmanları arasındaki etkileşimler, hücre hareketlerinin yönü ve sinir sistemi ve plakların indüksiyonu üzerine araştırmalar yapmıştır. Sonraki yıllarda öğrencisi Michael Abercrombie, izole hücrelerin davranış kuralları, temas engelleme ve diğer prensiplerin keşfi ile modern hücre biyolojisinin temellerini atmıştır (25). Viktor Hamburger ve Howard Hamilton 1951'de embriyoların gelişme aşamalarını tanımlamışlardır. Civciv embri-

yolarını inkübasyonun ilk birkaç saatinden başlayarak somit sayısına ve inkübasyon süresine göre evrelemiş ve hangi evrede hangi gelişme basamaklarının tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Bu evreleme günümüzde de embriyo model çalışmalarında temel olarak kullanılmaktadır (7,22,26,27). Viroloji, immünoloji ve kanser araştırmaları, bu çalışmaların en çok katkıda bulunduğu alanlardandır. 1940'lardan 1970'lerin ortalarına dek deneysel embriyolojinin ivme kaybetmesinin ardından, civciv embriyolarında ilk hücresele onkogen 1976 yılında Bishop ve Varmus tarafından keşfedilmiştir (25).

Civciv embriyoları embriyoloji incelemeleri için kullanılmalarının yanında, tümör davranışının incelenilebileceği uygun bir *in vivo* model olarak kanser araştırmaları için de faydalıdır. Ayrıca, belirtildiği üzere, embriyogenez ve onkogenездеki ortak sinyal yolları iki alanı yakından ilişkili kılmaktadır.

Civciv embriyolarında kanser araştırmaları

Embriyogenezde hücre sağkalım ve göçünü belirleyen mekanizmalarla kanser oluşum ve metastazında rol oynayan mekanizmalar arasında kesişme söz konusudur ve embriyolojik süreçlerin aydınlatılması kanser süreçlerinin anlaşılmasına da katkıda bulunmaktadır. Böylece her iki alanda da civciv modellerinden faydalanmak mümkündür. Civciv embriyoları, kanser biyolojisini *in vivo* olarak çalışmakla ilgili birtakım sorunları aşmak için kullanılabilen, moleküler analiz için uygun bir biyolojik zemin teşkil etmektedir. Yeni kültür tekniklerinin geliştirilmesi, görüntüleme sistemlerinin ileri teknolojiyle birleştirilmesi kanser çalışmalarında civciv embriyolarının kullanımını artırmıştır (7). Civciv embriyoları, diğer hayvan modellerine göre daha hızlı, kolay ve ucuz bir model sağlar. Bazı bilim insanlarının memeli tümör transplantasyon çalışmalarına şüpheyle yaklaşmalarına rağmen, sinir sistemi ve damar gelişiminin insana çok yakın olması nedeniyle civciv embriyoları gelişimsel biyolojide ve kanser çalışmalarında sıkça kullanılan bir model olarak karşımıza çıkmaktadır (28). Koryoallantoik membranın kolay manipüle edilebilir olması, yumurta kabuğu altındaki embriyonik dokulara kolayca ulaşılabilmesi ve ksenogreftlenmiş tümör hücrelerinin embriyo tarafından kolay kabul edilmesi, civciv embriyolarını kanser araştırmalarında kullanılmaya uygun

kılmaktadır (7). Tümör büyümesi ve metastaz gelişimi, anjiyogeneze bağımlı hastalıklarda en dramatik ve ölümcül klinik problemlerdendir. Bir tümörün sürekli olarak büyüebilmesi için yeni kılcal kan damarlarının oluşumunu teşvik etmesi gerekir. Ayrıca, yeni kan damarları bir tümör içinde bulunan tümör hücrelerinin dolaşıma girmek ve uzak bölgelere metastaz yapmak için kullandıkları yollardandır (29). Civciv embriyolarında anjiyogenezin hızlı olması bu modelin kanser çalışmalarında tercih edilmesinin sebeplerinden biridir (7) (Görsel 1). Bu kolaylıklarına karşılık, civciv embriyo modellerinin en önemli limitasyonlarından biri ise embriyonun immün sistem gelişiminin 7-10 gün gibi kısıtlı bir zaman diliminde olmasıdır. Hızlı gelişen agresif tümörler için bu zaman yeterli olmakta ve çalışmalar yapılabilir. Ancak bu modeller yavaş büyüyen tümörler için uygun değildir. Diğer bir limitasyon ise civciv embriyolarının organlarında gelişecek mikrometastazların belirlenmesi konusundadır (28).

Kanser araştırmalarında civciv embriyosu kullanımı 20. yy. başında başlamıştır. Tümörlerin nakledilebilirliği üzerinde çalışan Francis Peyton Rous, 1910-11 yıllarındaki çalışmalarıyla, filtre edilmiş tümör ekstraktı verdiği civcivlerde ve civciv embriyolarında sarkom geliştirmeyi başarmıştır. Tümörün etkeni olan virüs sonradan "Rous sarkom virüsü" olarak adlandırılmıştır. Rous çalışmalarına James Murphy ile birlikte devam ederek, doku transplantasyonu yöntemini kullanmıştır. Gelişmekte olan civciv embriyosu immün-yetmezdir ve bu nedenle heterolog dokuları reddemez, bu bakımdan doku transplantasyonu yoluyla yapılacak kanser araştırmalarına elverişli bir kültür ortamı sağlar. Özellikle KAM tümör anjiyogenezi ve metastaz çalışmaları için uygun bir model sağlamaktadır. Murphy 1913 yılında gelişmekte olan civciv embriyolarına Jensen rat sarkomu inoküle ettiğini ve hızlı büyüyen tümörler oluşturduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmalardan sonra pek çok araştırmacı kanser araştırmalarında deneysel model olarak civciv embriyolarını kullanmaya başlamıştır (7,28,30-34).

Willier (1924), Burnett (1933) ve Taylor ve ark.'ın (1948) katkılarıyla doku greftleme ve tümör implantasyonu teknikleri geliştirilmiştir (35). 1940'ların sonunda civciv embriyosu kullanılan metastatik kanser çalışmalarına girilmiştir. 1949'da Friedgood, civciv

embriyolarına intravenöz aşılama ile heterolog tümör nakline dair metastaz analizleri yapmıştır. 1952 yılında Kautz, Sommers, Sullivan ve Warren embriyolarında kanser hücresi transplantasyonu çalışmaları gerçekleştirmiştir. 1952'de Karnofsky ve ark., immün yetmezliği olan civciv embriyolarının heterolog tümör büyümesi için kan damarları ve bağ doku hücreleri sağlayabileceğini ileri sürmüştür. 1956'da Dagg ve ark. metastaz paternleri üzerinde çalışmıştır. 1958'de Harris insan tümörleri nakledilmiş embriyoları metastaz varlığı ve kemoterapötik ajanlara cevap bakımından değerlendirmiştir. 1964 yılına gelindiğinde Clarkson, Katz ve Dann metastaz ve transplantasyon çalışmaları yapmış, civcivlerde p388 fare lösemisini incelemişlerdir. Metastaz ve transplantasyon çalışmaları sonraki yıllarda da devam etmiştir (28,35).

Easty 1974 yılında civciv embriyolarında koryoallantoik membran deneylerinde tümör istilasını göstermiştir (6). 1976'da Michael Bishop, Harold Varmus ve ark. onkogenlerin mutasyonla proto-onkogenlere uyarıldığını göstermişlerdir. Bu çalışmalara ilaveten civciv tümör gelişiminin, tümör hücre invazyonunun ve de metastaz ve anjiyogenez sebeplerinin açıklanmasında kullanılmıştır (7). 1980'de Ossowski ve Reich metastaz çalışmaları için tümörlerin plazminojen aktivatörü salgılamasına dayanan bir deneysel model ortaya ileri sürmüştür (36). 1982'de Chambers ve ark. civciv embriyolarında sürüngen tümörü metastazlarını tespit etmek için yeni bir teknik geliştirmişlerdir (37). 1987'de Uchida, Sasaki, Tanaka ve ark. kanser hücresi transplantasyonu yapılmış civciv embriyoları üzerinde kemosensitif analizlere girişmiştir. Fibrosarkom, osteosarkom, Ewing sarkomu, gastrik ve prostatik kanserler gibi metastaz yeteneği yüksek kanser türlerinin yanında, orta ve düşük derecede metastatik çeşitli osteosarkom ve gastrik kanser tipleri de civciv embriyolarında çalışılabilir (28).

Deneysel modeller

Kanser metastazının çalışılabilirliği farklı modeller bulunmaktadır. Hücre kültürleri; *D. Melanogaster*, zebra balığı ve civciv embriyo modelleri; çeşitli deney hayvanları ile oluşturulan öteki modeller, bunlara örnek gösterilebilir. Bütün bu modellerin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır; her yönden kullanılabilir tek bir model mevcut değildir. Deney hayvanı mo-

dellerinin bağışıklık sistemi cevabının çalışılabilmesi ve homolog organların bulunması gibi avantajlarına karşılık, pahalı ve zaman alıcı olmaları gibi dezavantajları söz konusudur. Diğer *in vivo* modellerden *D. Melanogaster* modelinde anjiyogenez çalışılmamaktadır ve zebra balığına ise kullanılabilir antikör sayısı sınırlıdır. Ancak zebra balığı modelleri yüksek sayıda hayvan kullanılarak istatistiksel açıdan daha güvenilir sonuçlar elde etmeye imkan tanır ve ayrıca moleküler yolları çalışmada daha avantajlıdır. Cıvciv embriyo modelleri içinse, embriyonun hızlı gelişmesine bağlı zaman kısıtlılığı, yani çalışılabilir sürenin kısa olması aleyhte bir faktördür. Cıvciv embriyo KAM çalışmalarında mevcut damarlar anjiyogenez takibini zorlaştırabilir ve KAM çevre şartlarına karşı hassas olduğu için dikkatli çalışmak gerekir. Buna mukabil cıvciv embriyo modellerinin ucuzluk, basitlik, manipülasyon kolaylığı ve hızlı vaskülarizasyon gibi avantajları bulunmaktadır. Doku nakli için cerrahi prosedür uygulanması veya steril çalışmak gerekmez. Embriyo hayatta kalma oranları yüksektir. Tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek olan bu modeller geniş ölçekli taramalar için uygundur. Cıvciv embriyo KAM modellerinde, tümör tarafından uyarılmış anjiyogenez, kanser hücrelerinin sistemik dolaşımında sağkalımı ve hedef organlara taşınması, ekstrasvazasyon ve kolonizasyon çalışılabilir. KAM modelleri bağışıklığın gelişmemiş olmasından dolayı, tümör anjiyogenez çalışmalarında tercih edilmektedir (29,38,39). Hücrelerin göç dinamiklerinin *in vivo* görüntülenmesinde ağırlıklı olarak cıvciv, *Drosophila* ve *Xenopus* gibi şeffaf embriyonik dokuları olan türler kullanılmaktadır. Günümüzde bu görüntülemeler konfokal ve multifoton mikroskopi gibi ileri teknolojik yöntemlerle yapılmaktadır (6).

Cıvciv embriyolarıyla çalışmanın önemli bir avantajı, tümör ksenograft çalışmalarında kullanılan eski modellerden olan bu modeller hakkında uzun zamana dayanan bir bilgi birikiminin olmasıdır. Ayrıca, transgenik müdahaleler de dahil olmak üzere, genetik çalışmaların ilerlemesi de kullanılabilirliklerini artırmaktadır (7,39). 1980'lerden beri genetiği değiştirilmiş tavuklar elde etmek için çalışmalar yapılmaktadır. Viral vektörlerle başlayan çalışmaları cıvciv zigotuna mikroenjeksiyon tekniği izlemiştir. Transgenik tavuklar olgunluk çağına erişebilmekte ve modifikasyonu

sonraki nesle geçirebilmektedir. Son yıllarda *CRISPR/Cas9* (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease-9*; Tr. düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri/*CRISPR*-ilişkili nükleaz-9) tekniği ile cıvciv embriyolarında gen düzenlemesi yapılabilmektedir. Genetiği değiştirilmiş cıvcivler gelişme biyolojisi, immünoloji, fizyoloji gibi alanlardaki araştırmalar için kullanılmakta olup belirli patojenlere dirençli cıvcivler geliştirmek için çalışmalar başlamış bulunmaktadır (40). Genetiği değiştirilmiş fare modelleri de kanser araştırmalarında kullanılabilir. Bu modellerin mikroçevre bakımından kullanışlı oldukları kabul edilmektedir. Diğer taraftan invaziv özellikler ve hücre-hücre etkileşimleri gibi tümör biyolojisinin daha dinamik yönleri bakımından ise bu modellerin birtakım limitasyonları bulunmaktadır. Bunları aşmak için gelişim biyolojisi tekniklerinden yararlanılabilir. *Cre* rekombinaz veya indüklenmiş plüripotent kök hücre temelli uygulamalarda olduğu gibi, hücre kökenini veya akıbetini takip veya hücre yeniden programlama ile ilgili yöntemler hem embriyogenez hem de kanser gelişimi üzerinde çalışmak için kullanılabilir (41). Mikroçip destekli sistemler ve üç boyutlu biyobasım gibi metodların yanında, büyük veri kullanımı da gündemdedir. Özellikle tümörlerle ilişkili yollara dair verilerin birleştirilmesiyle önemli analizlerin yapılabileceği düşünülmektedir (38).

Ortak sinyal yolları

John Saunders 1948'de cıvciv ekstremite gelişimiyle ilgili kritik sinyal bölgelerini göstermiş, daha sonra 1993'te Riddle ve ark., yine ekstremite gelişimiyle ilgili *sonic hedgehog* sinyal molekülünü bulmuştur. Bu sinyal yolağı embriyo gelişimi açısından önemli olduğu gibi, kanser gelişimiyle de ilişkilidir (25,42-44). Genlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi, hücre sinyal yollarının tanımlanmasının ve düzenlenmesinin önünü açmıştır. Bu çalışmalar sayesinde kanser biyolojisi, gelişim biyolojisi, immünoloji ve diğer alanlarda aynı tip moleküllerin hücre-hücre iletişimine aracılık ettiği ortaya konmuştur (4).

Sinyal mekanizmalarının keşfine dair tarihî süreç incelendiğinde *Notch* reseptörlerinin ilk kez 1919'da *D. Melanogaster*'de gözlemlendiği görülmektedir (45). Sınırlı büyüme faktörü (SBF) 1951'de Levi-Montalcini'nin

civciv embriyosuna fare sarkomu nakli içerikli çalışmasıyla bulunmuştur. SBF morfolojik farklılaşmayı uyarır, nöronal gen ifadesini düzenler ve olgun nöronların fonksiyonunda önemli rol oynar. Kansere hücrelerinde de SBF reseptörleri bulunabilmektedir ve SBF'nin tümör gelişiminde rolünün olabileceği düşünülmektedir (46). 1965 yılında Marshall Urist kemik oluşumunu doğrudan indükleyen yeteneği olan proteinleri tanımlamaya yönelik çalışmalar yapmış ve kemik morfojenetik proteinlerini (KMP) karakterize etmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda KMP'lerin 20 farklı tipi olduğu tespit edilmiştir (47). 1970 ve 1980'lerde yapılan çalışmalar büyüme faktörlerinin keşfinde bir altın çağ başlatmıştır. Serumda, kanda, hücrelerde ve doku sıvılarında bulunan büyüme faktörleri keşfedilmiştir. KMP'lerin yanı sıra, insülin benzeri büyüme faktörleri, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PKBF), hematopoietik sitokinler, interferonlar, interlökinler ve kemokinler bu dönemde bilim dünyasına kazandırılmıştır. 1975'te Gospodarowicz fibroblastlar ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde mitozu uyaran fibroblast büyüme faktörlerini (FBF) keşfetmiş, 1984'te Shing ve ark. bu maddeyi izole etmiş ve 1985'te civciv KAM çalışmasıyla damar büyümesini uyardığını göstermiştir. 1980 ve 1990'larda yapılan çalışmalarla, tümör hücrelerinin FBF ürettikleri anlaşılmış, transgenik fare ve civciv çalışmalarıyla tümör-FBF-anjiyogenez ilişkisi gösterilmiştir. 1984 yılında Moses ve ark. dönüştürücü büyüme faktörü- β 'nin (DBF- β) hücre proliferasyonunu baskılayabileceğini göstermiş ve aynı yıl Frolik ve ark. tarafından ilk reseptör bağlanma deneyinin sonuçları yayımlanmıştır. 1985 yılında Derynck ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda DBF- β 'nin aynı hücrelerde çok fonksiyonlu olabileceği gösterilmiştir (48-50). DBF- β , epitelyal-mezenkimal dönüşüm ve dolayısıyla hem doku ve organ gelişimi hem de kanser gelişimi üzerindeki etkisi bakımından araştırılan faktörlerden biridir (51). Busch ve ark. 2013'te civciv embriyosunda melanom hücre transplantasyonu yaparak invazyonun DBF- β uygulamasıyla güçlendirilebildiğini göstermiştir (52). 1980'lerin başında Christiane Nüsslein-Volhard ve Eric F. Wieschaus embriyonik gelişimi kontrol eden pek çok geni tanımlamışlardır. Aynı zamanda *D. Melanogaster* genlerinin klonlanması, bu genlerin ve ürünlerinin moleküler yapısının bulunmasını sağla-

mıştır. Bu çalışmalar sonucunda *toll-like* reseptör ve *hedgehog* sinyal yolları keşfedilmiştir. Genetik biliminde görülen bu gelişmeler, *Wnt* sinyal yolağının *D. Melanogaster*'de ve farelerde proto-onkogen olarak keşfedilmesini sağlamıştır (4). 1989'da Ferrara ve Henzel tarafından vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEBF) izole edilmiş, 1996'da yine Ferrara tarafından molekülün embriyonik anjiyogenezdeki rolü ortaya konmuş, 2000'li yıllarda ise tümör büyümesi ve damar çoğalması ile VEBF arasındaki ilişki gösterilmiştir (48).

Embriyogenezde rol oynayan *Wnt*, *hedgehog* ve *Notch* yolları gibi gelişimsel sinyal yollarının erişkinlerde tekrar aktive olması tümör biyolojisinde rol oynamaktadır. Embriyogenezde rol oynayan epitelyal-mezenkimal dönüşüm ile ilgili yollar kanser hücreleri tarafından metastazı kolaylaştıracak şekilde kullanılabilir. *Wnt* yolağı embriyogenezde çoğalma ve göç süreçleriyle ilgilidir. Erişkinlerde ise, bazı dokularda kök hücre fonksiyonunun, gen ifadesinin ve kalsiyum akımının düzenlenmesi üzerindeki etkileriyle, homeostazın sürdürülmesine katkıda bulunduğu gibi tümör gelişimde de etkili olabilir. *Hedgehog* yolağı embriyogenezde sinir sistemi ve ekstremite gelişimiyle, kanserlerde ise bazal hücreli karsinom, medulloblastoma ve pankreas kanseriyle ilişkilidir. *Notch* yolağı embriyogenezde merkezî sinir sistemi, pankreas, kemik ve kalp gelişiminde, erişkinlerde ise lenfositik lösemi ve hepatoselüler karsinom gelişiminde rol oynar. FBF, DBF- β ve KMP gibi başka yolların da kanser invazyonu ve metastazı ile ilişkili oldukları bilinmektedir (41). Anjiyogenik dönüşüm (*angiogenic switch*) kavramı tümör damarlanmasının arttığı ve büyümenin hızlandığı bir geçişi ifade eder. FBF, VEBF, PKBF ve DBF- β gibi anjiyogenezi uyaran faktörlerin üretimindeki artış bu dönüşümde rol oynamaktadır (29,48). Yolların ortak olması, embriyolardan elde edilen bilgiler ışığında kanserin anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine imkan sağlamaktadır. Böylece kanser transplantasyon çalışmaları yanında, embriyolojik çalışmalarla da kansere dair önemli bilgiler edinilebilmektedir. Civciv embriyo modelleri hem tümör nakline hem de sinyal yollarına yönelik çalışmalar için uygun bir zemin sağlamaktadır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Antikiteden itibaren hem kanser hem civciv embriyoları hakkında bilinenler giderek artmakla birlikte, her iki alan için de gelişmelerin hızlanması 19. yüzyılda, hücrelerin organizmalar için öneminin anlaşılmasından sonra olmuştur. Yirminci yüzyıl itibarıyla civciv embriyoları kanser araştırmalarında kullanılan kaynaklardan biri haline gelmiştir. Yeni ve etkili kanser tedavileri için; kanser gelişim süreçlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması, gelişim basamaklarının ve gelişimde etkili olan sinyal mekanizmalarının tam olarak anlaşılması gerekmektedir. Söz konusu çalışmaların yapılabileceği farklı modeller mevcuttur ve her birinin farklı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Civciv embriyolarının ucuz ve kolay temini, gelişim süreçlerinin insandakilere benzer özellikler göstermesi, manipülasyon kolaylığı ve de tekrarlanabilir deneyler için uygun olması, civciv embriyo modellerinin tercih edilebilir seçenekler arasında yer almasını sağlamaktadır. Yakın gelecekte tümör davranışlarının açıklanmasına ve de hücre çoğalma, göç ve farklılaşmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda kök hücre ve transgenik yöntem kullanımının artacağı anlaşılmaktadır. Civciv embriyo modellerinin de bu tür çalışmalarda kullanılması mümkündür. Civciv embriyo modelleri araştırmacılara *in ovo* hücre kültürü yapma imkanı vermektedir. Yumurta kabuğu açılarak embriyonun gelişimi gözlenebilir, *Cre* teknolojisiyle işaretlenmiş hücreler embriyoya transfer edilerek davranışları incelenebilir, böylece embriyo kendi ortamında gelişirken, embriyonik hücrelerde, erişkin hücrelerinde ve kanser hücrelerinde gerçekleşen dönüşümler takip ve mukayese edilebilir. Buna göre, civciv embriyolarının kanser araştırmaları için önemini koruyacağı görülmektedir.

Teşekkür

Pek çok konuda olduğu gibi, bu yazı için de Serap Uslu'ya teşekkür borçluyum. Bu vesileyle kendisine tekrar rahmet diliyorum. MAK.

Çıkar Çatışması ve Finansman Bildirimi

Yazarlar bildirecek bir çıkar çatışmaları olmadığını beyan eder. Yazarlar bu çalışma için hiçbir finansal destek almadıklarını da beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Türkiye İstatistik Kurumu. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2014. Erişim: www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855 (erişildi: 16.01.2017).
2. Salomon DS, Lewis MT. Embryogenesis and oncogenesis: Dr Jekyll and Mr Hyde. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9(2):105–7.
3. Bizzarri M, Cucina A, Biava PM, Proietti S, D'Anselmi F, Dinicola S, ve ark. Embryonic morphogenetic field induces phenotypic reversion in cancer cells. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12:243–53.
4. Hynes NE, Ingham PW, Lim WA, Marshall CJ, Massagué J, Pawson T. Signalling change: signal transduction through the decades. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14:393–8.
5. Sanz-Ezquerro JJ, Münsterberg AE, Stricker S. Editorial: signaling pathways in embryonic development. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:76.
6. Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol*. 2004;48:441–9.
7. Kain KH, Miller JW, Jones-Paris CR, Thomason RT, Lewis JD, Bader DM, ve ark. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev Dyn*. 2014;243(2):216–28.
8. Tu SM. *Origin of Cancers*. New York: Springer; 2010.
9. Ackerknecht EH. Historical notes on cancer. *Med Hist*. 1958;2(2):114–9.
10. Weiss L. Early concepts of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2000;19:205–17.
11. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011;117:1097–102.
12. Tibi S. Al-Razi and Islamic medicine in the 9th century. *J R Soc Med*. 2006;99:206–7.
13. Eltorai I. Avicenna's view on cancer from his canon. *Am J Chinese Med*. 1979;7(3):276–84.
14. Riddle JM. Ancient and medieval chemotherapy for cancer. *Isis*. 1985;76(3):319–30.
15. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer*. 2011;117:2811–20.
16. Hajdu SI. A note from history: the first printed case reports of cancer. *Cancer*. 2010;116:2493–8.
17. Haggard HW, Smith GM. Johannes Müller and the modern conception of cancer. *Yale J Biol Med*. 1938;10(5):419–36.
18. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 3. *Cancer*. 2012;118:1155–68.
19. Haggard HW. The conception of cancer before and after

- Johannes Müller. *Bull N Y Acad Med.* 1938;14(4):183–97.
20. Weiss L. Concepts of metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19:219–34.
 21. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 4. *Cancer.* 2012;118:4914–28.
 22. Stern CD, Bachvarova R. Early chick embryos in vitro. *Int J Dev Biol.* 1997;41(2):379–87.
 23. Cohen MR, Drabkin IE. A source book in Greek science. New York: McGraw-Hill; 1948.
 24. Wolpert L. Much more from the chicken's egg than breakfast—a wonderful model system. *Mech Dev.* 2004;121:1015–7.
 25. Stern CD. The chick: a great model system becomes even greater. *Dev Cell.* 2005;8:9–17.
 26. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 1951;88:49–92.
 27. Hamburger V. The stage series of the chick embryo. *Dev Dyn.* 1992;195:273–5.
 28. Endo Y. The history of the development of chick embryo tumor xenograft models. *Enzymes.* 2019;46:11–22.
 29. Tufan AC, Satiroglu-Tufan NL. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5:249–66.
 30. Weiss RA, Vogt PK. 100 years of Rous sarcoma virus. *J Exp Med.* 2011;208(12):2351–5.
 31. Rous P, Murphy JB, Tytler WH. Transplantable tumors of the fowl: a neglected material for cancer research. *JAMA.* 1912;58(22):1682–3.
 32. Rous P, Murphy JB. On the causation by filterable agents of three distinct chicken tumors. *J Exp Med.* 1914;19(1):52–68.
 33. Rous P, Murphy JB. On immunity to transplantable chicken tumors. *J Exp Med.* 1914;20(4):419–32.
 34. Murphy JB. Transplantability of tissues to the embryo of foreign species: its bearing on questions of tissue specificity and tumor immunity. *J Exp Med.* 1913;17(4):482–93.
 35. Cimpean AM, Ribatti D, Raica M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis.* 2008;11:311–9.
 36. Ossowski L, Reich E. Experimental model for quantitative study of metastasis. *Cancer Res.* 1980;40(7):2300–9.
 37. Chambers AF, Shafir R, Ling V. A model system for studying metastasis using the embryonic chick. *Cancer Res.* 1982;42(10):4018–25.
 38. van Marion DMS, Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Walenkamp AME. Studying cancer metastasis: existing models, challenges and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:107–17.
 39. Ribatti D. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis. Berlin: Springer; 2010.
 40. Sid H, Schusser B. Applications of gene editing in chickens: a new era is on the horizon. *Front Genet.* 2018;9:456.
 41. Aiello NM, Stanger BZ. Echoes of the embryo: using the developmental biology toolkit to study cancer. *Dis Model Mech.* 2016;9:105–14.
 42. Davey MG, Towers M, Vargesson N, Tickle C. The chick limb: embryology, genetics and teratology. *Int J Dev Biol.* 2018;62:85–95.
 43. Suzuki T. How is digit identity determined during limb development? *Dev Growth Differ.* 2013;55:130–8.
 44. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018;18(1):8–20.
 45. Artavanis-Tsakonas S. The molecular biology of the Notch locus and the fine tuning of differentiation in *Drosophila*. *Trends Genet.* 1988;4(4):95–100.
 46. Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, Micera A. Nerve growth factor: role in growth, differentiation and controlling cancer cell development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35:116.
 47. Presciutti S, Boden S. BMP and beyond: a 25-year historical review of translational spine research at Emory University. *Spine Surg Relat Res.* 2018;2(1):1–10.
 48. Ribatti D. History of Research on Tumor Angiogenesis. Berlin: Springer; 2009.
 49. Sporn MB. TGF-beta: 20 years and counting. *Microbes Infect.* 1999;1(15):1251–3.
 50. Sporn MB. The early history of TGF- β , and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(1–2):3–7.
 51. Nawshad A, LaGamba D, Polad A, Hay ED. Transforming growth factor- β signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(1–2):11–23.
 52. Busch C, Krochmann J, Drews U. The chick embryo as an experimental system for melanoma cell invasion. *PLoS One.* 2013;8(1):e53970.