



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Muhammed Hasan ŞİRİN^{1,2,a}
Ayhan FİLİZİ^{3b}

¹Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Farmakoloji ve toksikoloji Anabilim Dalı, Siirt

³Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

ORCID^a: 0000-0001-6451-3663

ORCID^b: 0000-0002-2800-6215

*Sorumlu Yazar: Muhammed Hasan ŞİRİN

E-Posta: mhasan.srn@mail.com

Geliş Tarihi: 29.12.2024

Kabul Tarihi: 24.03.2025

16 (2): 43-52, 2025

DOI: 10.38137/vftd.1609269.

Makale atf

Şirin, M.H ve Filazi, A. (2025). Gelişimsel Toksikite Çalışmalarında Cıvciv Embriyo Modeli, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 16 (2), 43-52. DOI: 10.38137/vftd.1609269.

GELİŞİMSEL TOKSİSİTE ÇALIŞMALARINDA CİVCİV EMBRİYO MODELİ

ÖZET. Doğumsal anomalileri ve bu anomalilere neden olan faktörleri inceleyen teratoloji, gelişimsel toksikoloji ile kesişen bir bilim dalıdır. Teratojenlerin fetal gelişim üzerindeki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi özellikle doğum öncesi dönemlerde karşılaşılan çevresel ve kimyasal faktörlerin embriyonik gelişime nasıl etki ettiğini ortaya koymak klinik öncesi araştırmaların temel ön koşullarından biri haline gelmiştir. Tavuk embriyosu, gelişimsel toksisite araştırmaları için uzun zamandır kullanılan bir modeldir. Klinik öncesi araştırmalarda kullanılan yöntemler arasında kolay erişilebilirliği, düşük maliyeti ve etik açıdan daha az sınırlayıcı olması nedeniyle diğer hayvan modellerine kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, embriyonik gelişimin hızla gözlemlenebilmesi, bu modelin önemli bir avantajıdır. Bunun yanında, analizlerin kontrollü bir ortamda gerçekleştirilebilmesi, cıvciv embriyo modelini bilimsel çalışmalarda vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir. İnsan embriyonik gelişimiyle dikkate değer benzerlikler taşıyan cıvciv embriyo modeli, embriyonik gelişim süreçlerini anlamak için güçlü bir araç olmaya devam etmektedir. Bu inceleme, gelişimsel toksisite testinde cıvciv embriyonik modellerinin kullanımını ele alarak avantajlarını ve dezavantajlarını vurgulamayı amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Cıvciv embriyosu, embriyotoksisite, gelişimsel toksikoloji, *in ovo*, Teratojenite.

CHICK EMBRYO MODEL IN DEVELOPMENTAL TOXICITY STUDIES

ABSTRACT. Teratology, which examines congenital anomalies and the factors that cause these anomalies, is a scientific discipline that intersects with developmental toxicology. The evaluation of the potential effects of teratogens on foetal development has become a fundamental prerequisite of preclinical research, particularly in revealing how environmental and chemical factors encountered during the prenatal period affect embryonic development. The chicken embryo model has long been utilized in developmental toxicity research. Among the methods used in preclinical studies, the chicken embryo model offers significant advantages compared to other animal models due to its easy accessibility, low cost, and fewer ethical restrictions. Additionally, the rapid observation of embryonic development represents a key advantage of this model. Moreover, the ability to perform analyses in a controlled environment has established the chicken embryo model as an indispensable tool in scientific studies. With its remarkable similarities to human embryonic development, the chicken embryo model continues to be a powerful tool for understanding embryonic developmental processes. This review aims to emphasize the advantages and limitations of utilizing chicken embryonic models in developmental toxicity testing.

Keywords: Chick embryo, developmental toxicology, embryotoxicity, *in ovo*, Teratogenicity.

GİRİŞ

Embriyotoksosite, kimyasal veya fiziksel ajanların fetüsün normal büyümesi, homeostazı, gelişimi ve farklılaşmasıyla etkileşime girerek neden olduğu morfolojik veya fonksiyonel değişiklikler olarak tanımlanır (Latchoumycandane ve ark., 2018). Bu değişikliklere sebep olan maddelere teratojen maddeler adı verilir (Gomes ve ark., 2021). Teratojenler, kalıcı yapısal veya işlevsel malformasyonlara ya da embriyo veya fetüsün ölümüne yol açan çevresel faktörlerdir. Teratojenler arasında enfeksiyonlar, metabolik bozukluklar, fiziksel etkenler, bazı ilaçlar, kimyasallar ve radyasyon vb. etmenler yer alır (Tantibanchachai, 2014; Paredes-Páliz ve ark., 2024).

Teratojenlerin fetal gelişim üzerindeki potansiyel etkilerinin ve riskinin değerlendirilmesi, klinik öncesi araştırmalar için temel bir ön koşuldur (Acharya ve ark., 2024). Klinik öncesi araştırmalarda kullanılan tavuk embriyonik modelleri, erişilebilirlik, maliyet etkinliği ve omurgalı gelişimiyle biyolojik uyumluluk gibi avantajlar sunar (Smith ve ark., 2012; Acharya ve ark., 2024). Bu modeller; gelişimsel toksisite analizleri, koryoallantoik membran analizleri ve embriyonik kültür teknikleri gibi yöntemler kullanarak maddelerin gelişmekte olan embriyolar üzerindeki etkilerini incelemek için benzersiz bir olanak sağlar ve gelişimsel toksisitenin etkili bir şekilde taranmasına katkıda bulunur (Acharya ve ark., 2024; Fraga ve ark., 2024).

Gelişimsel toksisite tarama süreci, insan embriyolarına olası zararlarını belirlemek için çeşitli maddelerin gebe hayvanlar üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu test yöntemleri arasında, *in vivo* testler gelişimsel toksisiteyi değerlendirmek için altın standart olarak kabul edilir (Acharya ve ark., 2024). Gelişimsel toksisiteyi değerlendirmek amacıyla günümüzde çok çeşitli *in vivo* hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılan deneysel modeller ise fare, sıçan, zebra balığı, tavuk, tavşan ve insan olmayan primat embriyolarıdır (Wachholz ve ark., 2021a).

In vivo deneysel hayvan modellerinde hayvanlar inceleme konusu olan maddeye maruz bırakılır ve yavrularının büyümesi ve gelişimi yakından izlenir. Ancak deneylerde hayvan kullanımı hem etik endişelere yol açmakta hem de maliyetlidir. Bu nedenle, son yıllarda gelişimsel toksisite testleri için *in ovo* yumurta modelleri alternatif bir seçenek olarak popülerlik kazanmıştır. Tavukların üreme döngüsünün kısa olması ve embriyolarının dış ortamda gelişmesi, toksik maddelerin etkilerinin gözlemlenmesini ve incelenmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca tavuk embriyoları insanlarla genetik benzerliklere sahiptir ve bu da onları gelişimsel toksisiteyi incelemek için değerli bir model haline getirmektedir (Acharya ve ark., 2024). Bu nedenle tavuk embriyosu, yaklaşık 200 yıldır gelişimsel çalışmalarda kullanılan klasik bir modeldir. Yüksek görünürlük, embriyoya kolay erişim ve nispeten maternal etkilerden arınmış olması gibi özellikler taşıyan bu model, günümüzde gelişimsel toksikolojik çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Jiang ve ark., 2020). Günümüzde halk sağlığı açısından risk teşkil

eden teratojenik maddelerle ilgili gelişimsel toksisite araştırmalarının yapılması büyük önem taşımaktadır (U.S. Environmental Protection Agency, 1991; Grandjean ve ark., 2019). *In ovo* toksisite modelleri ise bu tür araştırmalar için uygun ve etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Wachholz ve ark., 2021a; Ghimire ve ark., 2022; Acharya ve ark., 2024). Bu derleme, gelişimsel embriyo-toksosite çalışmalarında *in ovo* modellerin kullanımı ile bu modellerin avantajları ve dezavantajlarını kapsamlı bir şekilde ele almayı amaçlamaktadır.

Teratojen ve Doğumsal anomaliler

Teratojen, doğum kusurları ve çevresel (genetik olmayan) faktörlerin neden olduğu malformasyonlara yol açan mekanizmaların incelenmesidir (Kalter, 2003; Brent, 2004). Dölllenmiş bir yumurtanın embriyo ve sonrasında fetüs haline gelmesi için geçirdiği karmaşık süreçler göz önüne alındığında, herhangi bir yavrunun normal olarak doğması oldukça ilginçtir. Doğumların yaklaşık %3'ünde doğum kusurları veya malformasyonlar görülmektedir. Doğum kusurlarının nedenleri genetik, kromozomal veya çevresel (örneğin ilaçlar) olabilir; ancak ne yazık ki günümüzde birçok durumda kusurun nedeni bilinmemektedir (Vargesson ve Fraga, 2017). Doğum kusuruna veya malformasyona yol açabilen herhangi bir ajana "teratojen" denir (Karagiozova, 2017). Pek çok araştırmacı, teratojenleri ve bunların nasıl malformasyonlara yol açtığını incelemek amacıyla, insanlarda da benzer kusurlar gösteren hayvan modellerini kullanmaktadır (Vargesson ve Fraga, 2017).

Bir teratojen, tedavide kullanılan ilaçlar, biyolojik ajanlar, X ışınları ve maternal bazı şartlar gibi embriyonik gelişim sırasında meydana gelen herhangi bir dışsal faktör olabilir (Vargesson ve Fraga, 2017; Wachholz ve ark., 2021a). Alkol, kokain ve nikotin teratojenlere örnektir (Spohr, 2005; Malek, 2012; Chung ve ark., 2021). Eğlence amaçlı kullanılan uyuşturucuların yanı sıra cıva, kurşun ve kadmiyum gibi kimyasallar; valproik asit, retinoik asit, fenitoin, talidomid gibi ilaçlar; radyasyon gibi fiziksel etkenler; ve obezite, preeklampsi ve hipertermi gibi maternal durumlar da teratojenik olabilir (Vargesson ve Fraga, 2017; Wachholz ve ark., 2021a).

Deneysel Teratogenez

Deneysel Teratogenez çalışmaları, talidomidin teratojen olarak keşfedilmesinden sonra öne çıkmıştır. Böylece 1960'lardan itibaren, sadece doğum kusurlarını önlemek için değil, aynı zamanda bir teratojeni hızlı bir şekilde tanımlamak, bunlarla ilişkili malformatif fenotipleri tanımlamak ve bu maruziyetlerle ilgili mekanizmaları araştırmak için daha yoğun çalışmalar yürütülmektedir (Fraga ve ark., 2022).

Günümüzde oldukça popüler olan potansiyel teratojen talidomid nedeniyle 1950'lerin sonu ve 1960'ların başında, 10.000'den fazla çocuğun hamilelik sırasında talidomid kullanımından kaynaklanan nadir ve ciddi malformasyonlarla doğduğu kaydedilmiştir (Vargesson., 2019). O yıllarda talidomidin teratojen etkilerine fareler ve tavşanların yeterince duyarlı olmadığı bilinmediğinden

güvenli kabul edilmiştir. Ancak zamanla kanatlı embriyoları üzerinde yapılan testler, talidomidin oldukça güçlü bir teratojen olduğunu göstermiş ve kanatlı embriyo modeli tür duyarlılığı çalışmalarında önemli bir araç haline gelmiştir (Janer ve ark., 2008; Vargesson, 2015). Bu sebeple, talidomidin yol açtığı yıkıcı sonuçlar göz önünde bulundurularak, son yıllarda klinik öncesi çalışmalarda üreme ve gelişimsel toksisite değerlendirmeleri için birden fazla hayvan türünün kullanılması zorunlu hale gelmiştir (Vargesson, 2013). İlginç bir diğer örnek ise, kemirgenlerin teratojen olan Zika virüs enfeksiyonlarına karşı duyarlı ve doğal bir bağışıklığa sahip olmalarına karşın, kanatlıların bu virüse duyarlı olmasıdır (Grant ve ark., 2016; Thawani ve ark., 2018). Bu örnekler, kanatlı embriyo modelinin önemini ortaya koymakta ve teratojenlerin mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

Tavuk Embriyosu

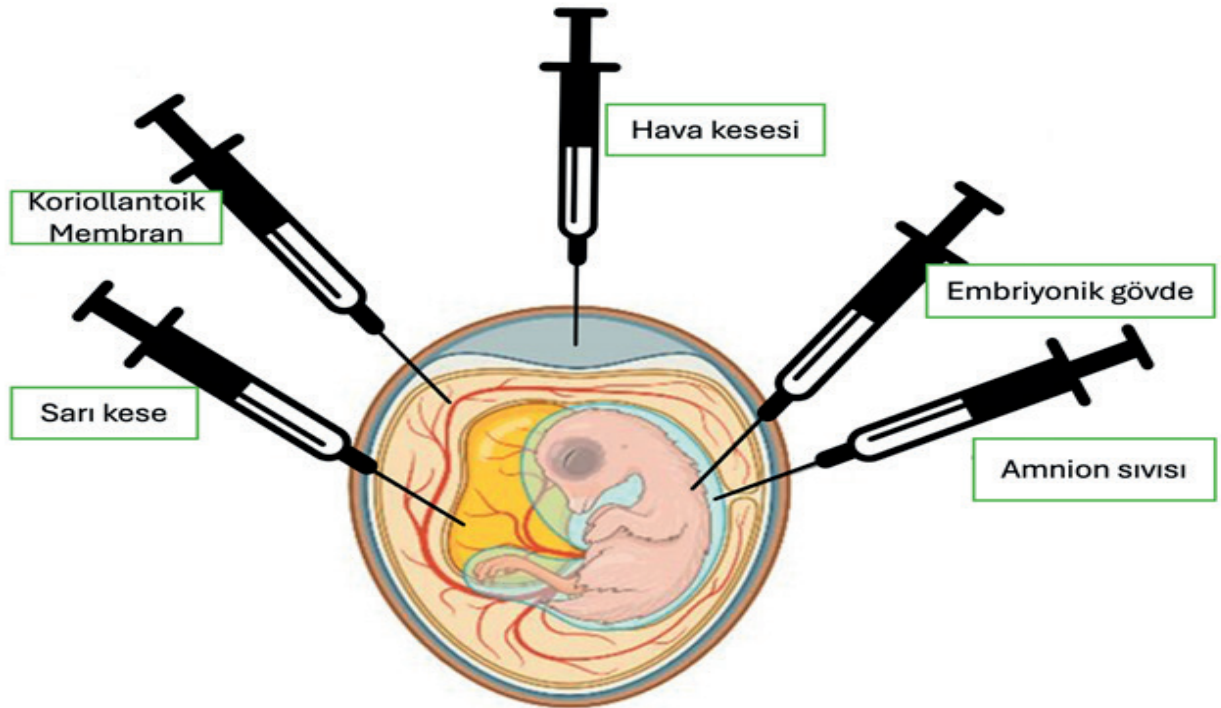
Tavuk embriyosu (*Gallus gallus*) ilk olarak M.Ö 300'lü yıllarda Mısır döneminde incelenmiş olup tarih boyunca bir çok çalışmada deneysel bir model olarak kullanılmıştır (Stern, 2004). Örneğin Yunan bilim adamı Aristoteles ve Leonardo Da Vinci anatomi ve embriyo gelişimini incelemek için tavuk embriyolarından yararlanmışlardır (Wachholz ve ark., 2021a). Günümüzde ise tavuk embriyoları ile yapılan çalışmalar uzuv gelişimi, sinir sistemi gelişimi ve ilaç güvenliği araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ribatti ve Annese, 2023).

Tavuk embriyosu, deneysel model organizma olarak geniş bir kullanım alanına sahip olup, mani-

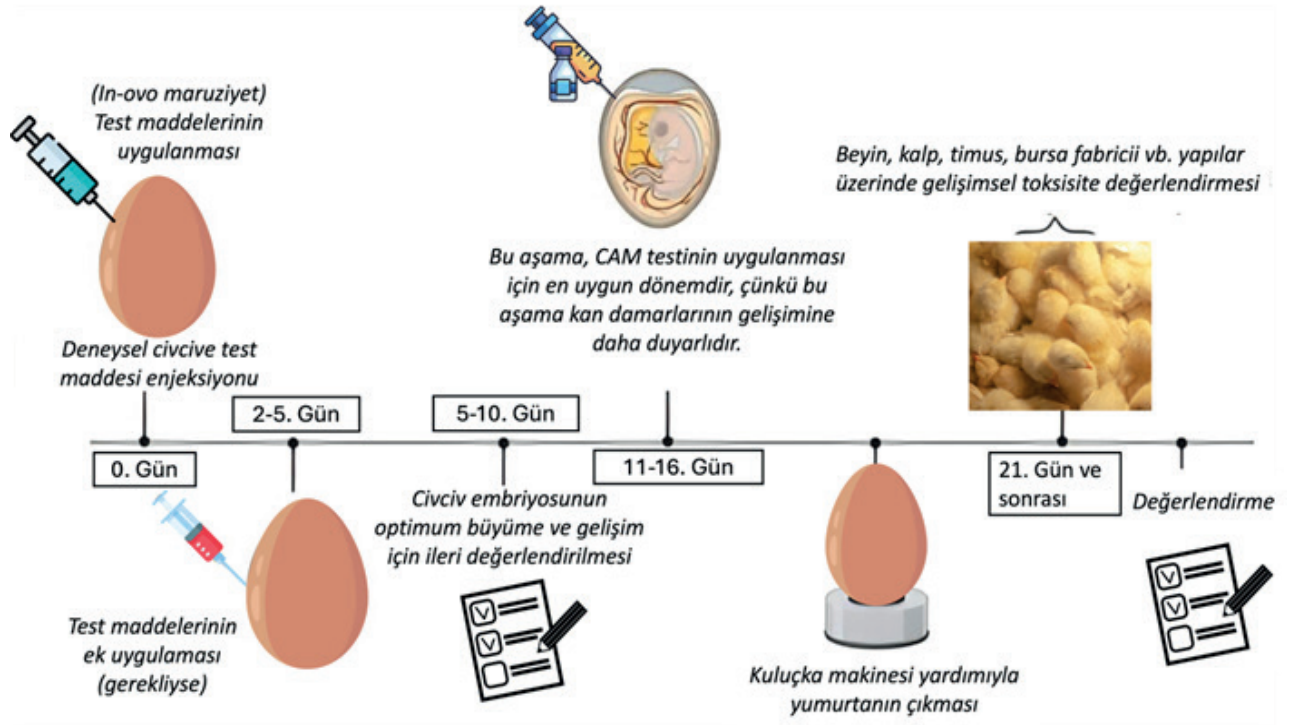
pülasyon ve bakımının kolay olması, büyük boyutlu yapısıyla görselleştirmeye elverişliliği ve tüm gelişim sürecinin rahatlıkla izlenebilmesi gibi avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, düşük maliyetle temin edilebilmesi ve çok sayıda üretilebilmesi, bu embriyoyu bilimsel araştırmalar için cazip bir seçenek haline getirir. Embriyo, annenin vücudundan izole bir halde dışarıya çıkarak yumurta içinde gelişim gösterir, 10. gün itibarıyla morfolojik olarak büyük ölçüde tamamlanmış bir yapıya ulaşır ve yaklaşık 21. günde yumurtadan çıkar. Bu özellikleri, tavuk embriyosunu oldukça uygun bir model organizma yaparken, memelilerden farklı olarak embriyo elde etme sürecinde anneye zarar verme gerekliliğini de ortadan kaldırır. Dolayısıyla, bu model "3R" prensiplerini (hayvan kullanımının azaltılması, koşulların iyileştirilmesi ve yerine başka yöntemlerin ikame edilmesi) destekler (Vargesson ve Fraga, 2017; Davey ve ark., 2018; Wachholz ve ark., 2021a).

Kuluçkadaki Döllenmiş Cıvciv Yumurtalarının Gelişimi

Bir yumurta tavuğun vücudundan çıktığında embriyonik gelişim çoktan başlamış olur. Yumurtanın inkübasyona başladığı günden itibaren, embriyoda vücut eksenleri belirlenir ve organ oluşum bölgeleri tanımlanır (Bellairs ve Osmond, 2014). Gelecekteki embriyonun baştan kuyruğa eksenini işaretleyen ilk görünür işaret, embriyonik diskin kenarından uzanan ince, opak bir hücre bandı olan ilkel çizgidir. Gelişen ilk organ sistemlerinden biri damar sistemidir. Kan adaları kuluçkadan bir gün sonra görülür



Şekil 1. Embriyoya test maddesi uygulanabilecek bazı alanlar (Abdelaziz ve ark., 2024).



Şekil 2. Tavuk embriyonik test modellerinde gelişimsel toksisite testlerinin bazı aşamaları

ve dolaşım yaklaşık bir gün sonra sağlanır. Tüm bu süre boyunca embriyo büyür ve şekil değiştirir. Embriyonun başlıca bölgeleri tanınır hale gelir, örneğin baş, gövde ve kuyruk, ardından kuluçkanın üçüncü ve dördüncü günlerinde uzuvlar, gözler, akciğerler vb. gibi belirli organların oluşumu gerçekleşir. Gelişimin son aşamalarında, civcivin yumurtadan çıktığı on günden yirmi veya yirmi bir güne kadar, iskeletin kemikleşmesi ve tüylerin oluşumu da dahil olmak üzere önemli bir büyüme ve ayrıca farklılaşmış hücre ve dokuların işlenmesi vardır (Bellairs ve Osmond, 2005). Civciv gelişiminin aşamaları, Hamburger ve Hamilton (1951) tarafından 20 güne kadar olan gelişim sürecini kapsayan resimli bir aşama dizisi olarak oluşturulmuş ve civciv gelişimi üzerine çalışan araştırmacılar arasında standart haline gelmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda, tavuk embriyosu gelişimi incelenirken sıklıkla bu aşamalar kullanılmaktadır (Hamburger ve Hamilton, 1951; Ainsworth ve ark., 2010; Fonseca ve ark., 2021).

Tavuk Embriyolarında Farklı *In Ovo* Uygulama Yöntemleri ve Deneyel Toksisite Modeli

Günümüzde *in ovo* enjeksiyonunun yapılabileceği bilinen beş olası yolu vardır; hava kesesi, korioallantoik membran, amniyon sıvısı, yumurta sarısı ve embriyonun gövdesi. Belirtilen uygulama yerleri Şekil 1’de gösterilmektedir (Roto ve ark., 2016; Saeed ve ark., 2019; Tainika ve Bayraktar, 2021).

In ovo teknolojisindeki uygulama yolları besleme ve aşılama gibi işlemlerin yanı sıra, kimyasal maddelerin, terapötik bileşiklerin ve yeni üretilen biyomazemelerin, canlı organizmalarda test edilmesi için zaman alıcı

ve maliyetli süreçlere alternatif olarak kullanılmaktadır. Civciv embriyo modeli, embriyonik gelişimin erken aşamalarında eklenen çeşitli ajanların teratojenitesini veya embriyotoksitesini değerlendirmek için oldukça uygundur (Rashidi ve Sottile, 2009). Günümüzde ise ilaç, zehir vb. kimyasal maddelerin civciv embriyoları üzerindeki etkinliğini belirlemek için *in ovo* maruziyet testleri kullanılmaktadır (Kue ve ark., 2015; Chen ve ark., 2021; Fischer ve ark., 2022). Sözü edilen *in ovo* maruziyet testlerinin şematik gösterimi Şekil 2’de sunulmuştur.

Yumurta Hava Kesesine Enjeksiyon

Tavuk embriyoları üzerinde yürütülen embriyo-toksisite çalışmalarında, test edilecek maddelerin yumurtaya verilmesi amacıyla hava kesesine, embriyonun kaudal bölgesine, albümine ve yumurta sarısına enjeksiyon gibi yöntemler kullanılmıştır. Ancak genellikle hava kesesi enjeksiyon bölgesi olarak tercih edilmektedir; çünkü bu bölgeye uygulama kolaydır, yumurtaların enfeksiyon riskini en aza indirir, verilen solüsyonun hızlı ve homojen bir şekilde yayılmasını sağlar ve diğer enjeksiyon yöntemlerinde görülen yumurta içi basınç artışının embriyo üzerinde oluşturabileceği mekanik hasar riskini ortadan kaldırır. Bu yüzden hava kesesi ideal enjeksiyon bölgesi olarak kabul edilmektedir (Özparlak, 2015).

Bir ilacın veya toksik maddenin hava kesesi aracılığı ile embriyoya uygulanması esasen topikal bir korioallantoik membran (CAM) uygulaması olarak kabul edilebilir çünkü embriyonun 12. gelişim gününe kadar olan dönemde CAM damarlanmış olduğu için biyoaktif bileşikler, toksik maddeler veya ilaçlar pasif transfer yoluyla

Tablo 1. CAM modelinin araştırmalarda kullanılmasının avantajları ve dezavantajları (Nowak-Sliwinska ve ark., 2014).

Avantajları	Dezavantajları
Kullanım kolaylığı.	Denemenin tavuk kökenli olması reaktiflerin bulunabilirliğini sınırlar.
Damarların hızlı büyümesi deneyler için bekleme süresini minimize eder.	CAM'ın kendisi hem morfolojik olarak hem de anjiyogenezis sırasında endotel hücre çoğalma oranındaki kademeli değişim açısından hızlı değişimlere uğramaktadır.
Denemelerin gerçek zamanlı görselleştirilmesi.	Çevresel faktörlere duyarlı bir yöntemdir.
Dolaşım sistemine tam erişilebilirlik (moleküllerin intravasküler olarak iletilmesi için).	Yeni kılcal damarlar ile halihazırda var olanlar arasında ayırım yapmayı zorlaştıran iyi gelişmiş bir damar ağı içerir.
Daha karmaşık sistemlerin kolay bir şekilde modellenmesi.	Memeliler ve kanatlılar arasındaki ilaç metabolizmasındaki farklılıklar olabilir.
Hayvan protokolü için etik onaya gerek yok (ülkelere göre değişiklik gösterebilir).	Kabuk tozu (veya diğer tahriş edici maddeler) anjiyogenezi uyatabilir.
Canlı bir ortam sunar.	Bağıışıklık yetmezliği risk teşkil eder.

hava kesesinden embriyonun etrafındaki kan damarlarına geçebilmektedir (Prelusky ve ark., 1987; Öznurlu, 2003; Ribatti, 2016; Chen ve ark., 2021; Das ve ark., 2021).

Yumurta hava kesesi, yumurtanın üst kısmına yapılan örnek enjeksiyonunun kabuk zarı aracılığıyla hava kesesine ulaşmasını sağlar. Bu işlem için 2 cm uzunluğunda, 0,5 mm çapında bir enjeksiyon iğnesi kullanılır. Kabuk zarı, porlara sahip bir çift lipid tabakasından oluşur; iç ve dış tabakada gözenek çapları sırasıyla 12,6 nm ve 0,53 µm'dir. Bu gözenek boyutları, ilaçların zarlar üzerinden geçiş ve salınım profillerinin değerlendirilmesinde dikkate alınmalıdır. Dolayısıyla, 126 Å'dan küçük molekül boyutuna sahip ilaçlar için kabuk zarı cazip bir uygulama yolu olabilir (Ribeiro ve ark., 2022). Tüm bu avantajlarına rağmen, hava kesesine yapılan enjeksiyonda maddenin tamamının embriyoya ulaşip ulaşmadığının belirlenememesi bu yöntemin önemli bir dezavantajı olarak kabul edilmektedir (Prelusky ve ark., 1987). Ancak bu yöntem, yumurtanın bazı kısımlarına kıyasla daha az etkili bulunsa da embriyotoksitesite araştırmalarında etkin olarak kullanılmaktadır (Budai ve ark., 2001; Özparlak, 2015; Öztürk ve Dayan, 2024; Arslan ve ark., 2025).

Korioallantoik Membran

Koryoallantoik membran (CAM), kuş ve sürüngen yumurtalarında dış koryon ve allantois arasında yer alan çok katmanlı bir yapıdır. Yaklaşık 200 µm kalınlığında olan CAM, üç ana katmandan oluşur: koryonik epitel tabakası, kan ve lenf damarlarını içeren stromal tabaka ve allantoik kese ile temas eden allantoik epitel. Döllenmiş yumurtaların kuluçka sürecinde CAM'ın bu katmanlı yapısında oldukça yoğun bir damar ağı gelişir. Bu damar yapısı, yumurta kabuğunun hemen altında sıkıca birleşerek embriyonik dolaşıma bağlanır ve böylece gaz değişimi ile be-

sin maddelerinin taşınmasını sağlar (Staton ve ark., 2004; Chen ve ark., 2021). Bu zengin damarsal yapısı sayesinde CAM, biyomedikal araştırmalarda hücreler arası etkileşimlerin incelenmesi, belirli bileşiklerin farmakolojik etkilerinin değerlendirilmesi ve ilaçların klinik öncesi etkililik ve toksisite testlerinde oldukça kullanışlı bir model sunar (Chen ve ark., 2021; Dhayer ve ark., 2024). CAM yönteminin deneysel araştırmadaki avantajları ve dezavantajları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Günümüzde CAM'e erişim için farklı teknikler geliştirilmiştir. Örneğin, CAM uygulamaları için embriyonun en az 8-9 günlük olması önerilir. Bu membran, gaz değişimi ve kalsiyum taşınımında önemli bir role sahiptir. CAM'e örnek enjekte etmek için, kabuk zarı genellikle yumurtanın ortasında çizilerek delinmekte ve bu işlemin CAM'e zarar vermeden gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Farklı deneylerde CAM'e erişim sağlamak için kullanılan diğer teknikler arasında 3. gün kabuk zarı kesimi, erken inkübasyon döneminde albumin çıkarma, basınçla CAM'in ters çevrilmesi gibi yöntemler yer alır. Bu yöntemlerden bazıları, yumurta içindeki basıncı değiştirebilmekte ve kabuk zarı ile CAM arasındaki bağlantıyı etkileyebilmektedir (Crespo ve Casar, 2016; Ribeiro ve ark., 2022).

Amniyon Sıvısı İçine Enjeksiyon

Amniyon sıvısına yapılan enjeksiyonların, embriyo gelişimi üzerinde doğrudan etki bakımından en etkili yöntem olduğu bilinmektedir. Bu bölgeye uygulanan enjeksiyonların embriyo tarafından etkin bir şekilde kullanılması, embriyonun bağırsak, bağışıklık sistemi ve diğer organlarının gelişimini doğrudan etkilediği düşünülmektedir (Tatınika ve Bayraktar, 2021). Bu enjeksiyon nispeten kolay olmakla birlikte özen gerektirir; özellikle farklı özelliklere sahip yumurtalar arasında beklenmeyen durumlar oluşabi-

lir. Örneğin, 18 günlük embriyonun amniyonuna ulaşmak için, embriyonun zarar görmeden sadece 0,7 mm çapındaki 22 G iğneyle enjeksiyon yapılabilmiştir. Allantoik sıvı, sarı kese ve amniyon sıvısı içine enjeksiyon yolları, kanatlı hayvan endüstrisinde genellikle aşı ve ilaç uygulamaları için sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak viral aşılarda *in ovo* uygulama bölgesi, yumurtaların virüslere karşı sahip olduğu bağışıklık seviyesini ve dolayısıyla koruma etkinliğini etkileyebilmektedir. Örneğin, allantoik sıvı yoluyla yapılan aşı uygulamalarında, viral enfeksiyonlara karşı koruma düzeyinde azalma görülebilmektedir (Peebles, 2018; Ribeiro ve ark., 2022).

Yumurta Sarı Kesesi İçine Enjeksiyon

Tavuk yumurta sarı kesesi, konakçı bağışıklığında, besin alımında, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında ve gelişmekte olan embriyoların eritropoezinde önemli rol oynar (Wong ve Uni., 2021). *In ovo* sarı kese (SK) enjeksiyonu, özellikle embriyonik gelişim aşamasındaki civcivlerde immün uyarıcı ajanlar, aşılarda, hormonlar gibi bileşiklerin test edilmesinde kullanılan bir *in ovo* uygulama yöntemidir (Tasharofi ve ark., 2018; Nguyen ve ark., 2022; Çakır, 2024). Bu uygulama, özellikle civcivlerde erken ölüm oranlarını azaltmak, performans özelliklerini iyileştirmek ve yumurta sarı kesesi enfeksiyonlarına karşı koruma sağlamak amacıyla kanatlı endüstrisinde oldukça önemlidir. Yapılan bir çalışmada, sitozin-fosfat-guanozin dinükleotid içeren oligodeoksinnükleotidler ve polinükleotid-polisitidilik asit gibi çeşitli immün uyarıcıların embriyonun 18. gününde yumurta sarı kesesine enjekte edilmesiyle *Escherichia coli* kaynaklı yumurta sarı kesesi enfeksiyonlarına karşı başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntem, kuluçkahanelerde enfeksiyon yönetimi için antibiyotiklere alternatif olarak değerlendirilmektedir ve civcivlerde erken ölüm oranlarını azaltma potansiyeline sahiptir (Tasharofi ve ark., 2018; Nguyen ve ark., 2022). Bununla birlikte, *in ovo* SK enjeksiyonları için en uygun enjeksiyon zamanı ve embriyo içerisindeki en etkin enjeksiyon bölgesinin belirlenebilmesi amacıyla daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Tasharofi ve ark., 2018).

Embriyonik Gövde İçine Enjeksiyon

Embriyonik gövde içi enjeksiyon yöntemi; embriyolarda aşılama çalışmaları, deneysel teratolojik araştırmalar ve bazı nanomateryallerin embriyo gövdesine lokal uygulamaları sonucu oluşan toksikolojik ve gelişimsel etkilerinin değerlendirilmesi gibi farklı bilimsel araştırma alanlarında kullanılmaktadır (Peebles, 2018; Ribeiro ve ark., 2022). Örneğin 1997 yılında Meijerhof ve Hulet (1997) 20 G iğne kullanılarak embriyonun hem hava hücresinin hem de gövdesine bakteri karışımı enjekte etmiştir. Hava hücresinin enjeksiyonunun kuluçka kabiliyetini azaltırken, gövdeye enjeksiyonunun kuluçka kabiliyetinin neredeyse tamamen kaybolmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Meijerhof ve Hulet, 1997). Buna karşılık, Dooley ve ark. (2011), L-karnitini yumurtanın amniyon sıvısına veya embriyonun gövdesine enjekte etmiş ve bu uygulamanın

piliçlerin kuluçka çıkış oranı ile kuluçka sonrası yaşama kabiliyeti üzerinde anlamlı bir etki yaratmadığını ortaya koymuşlardır (Dooley ve ark., 2011). Bu bulgular, embriyonik gövdeye enjeksiyonun etkilerinin, enjekte edilen maddenin türü ve uygulama protokolüne bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

In Ovo Uygulamaların Avantajları

In ovo teknolojisi, kuluçka sırasında yumurtalara bir so-lüsyon şeklinde yem katkı maddesinin (amino asitler, hormonlar, vitaminler, karbonhidratlar, mineraller, prebiyotikler, probiyotikler, aşılarda ve nanopartiküller) doğrudan uygulanması olarak tanımlanır (Saeed ve ark., 2019). *In ovo* kavramı, ilk olarak Sharma ve Burmester'in çalışmalarında Amerika Birleşik Devletleri Michigan'da başlatıldı (Sharma ve Burmester, 1982). Sonraki yıllarda *in ovo* uygulamalar üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde uygulamaların kapsamı ve sayısı arttı; yöntem çeşitlendi. Özellikle *in ovo* uygulamaların keşfinden sonraki son 50 yılda, tavuk embriyoları ile yapılan çalışmalar, uzuv ve sinir sistemi gelişimi başta olmak üzere, gelişim biyolojisinin önemli kavramlarına ve ilaç güvenliği konusundaki bilgilere önemli katkılar sağlamıştır (Wachholz ve ark., 2021a).

Embriyolu yumurtaların doğum öncesi farmasötik araştırmalar için kullanılması, tarama denemeleri için anne hayvan kullanımını azaltır ve bireysel olarak fetüslerin gelişim aşamaları üzerinde tam kontrol sağlar. Tavuk embriyonik modelinin memeli deney hayvanı modellerinden farkı embriyonun anne organizma ile ilişkisinin olmamasıdır ki bundan dolayı embriyoyu etkileyen ilacın metabolizması hakkında bilgi sağlanamaz, ancak memelilerde yavru her ne kadar plasenta yolu ile anneye bağlı olsa da memeliler için de çoğunlukla durum böyledir. Bununla birlikte, tavuk kullanımına ilişkin gerekçelerin büyük çoğunluğu, araştırma metodolojilerini azaltma, değiştirme ve iyileştirmeye yönelik 3R kuralı kavramıyla tam olarak uyumlu olduğu bildirilmektedir (Niloofer ve ark., 2024). Öte yandan, bilimsel araştırmalarda tavuk embriyonik modellerinin kullanımıyla ilişkili sayısız avantaj göz önüne alındığında, bu modellerin dikkate değer bir erişilebilirlik derecesi sergilediği, önemli maliyet etkinliği gösterdiği ve omurgalı gelişiminde yer alan karmaşık süreçlerle önemli biyolojik benzerliğe sahip olduğu ortaya çıkmaktadır (Nikolov ve ark., 2014; Acharya ve ark., 2024).

Toksik (Teratojen) maddelerin ve İlaçların Güvenliğinin Değerlendirilmesi ve Anlaşılmasında Tavuk Embriyosu Modeli

Yeni bir ilacın geliştirilmesi farklı adımlar gerektirir ve bunlardan önemli olanlardan biri geliştirme sırasındaki potansiyel teratojenik etkilerin tahminidir. Klinik öncesi çalışmalarda, geliştirilmekte olan ilaçlar gebe hayvanlarda, daha sıklıkla insanlara daha benzer fizyolojiye sahip olan memelilerde test edilmektedir (Beedie ve ark., 2017). Ancak teratojenik maddelerin türlere özgü etki gösterdi-

Tablo 2. Bazı ilaçların/maddelerin teratojen kategorisi ve tavuk embriyolarında oluşturduğu deformiteler hakkında detaylı bilgi (Acharya ve ark., 2024).

İLAC	TERATOJENİN KATEGORİSİ	SEBEP OLDUĞU ANOMALİ VE MALFORMASYONLAR
Talidomid	Anti-anjiyojenik	Uzuv anormallikleri, kraniyofasiyal defektler
Valproik Asit	Epigenetik Değiştirici	Uzuv ve kraniyofasiyal defektler
Alkol	Gelişimsel Toksin	Beyin ve nöral tüp anormallikleri
Retinoik Asit	Retinoid Teratojen	Kraniyofasiyal defektler, uzuv malformasyonları
Kokain	Vazokonstriktör	Kalp damar sorunları
Kadmiyum	Metal Teratojen	Uzuv malformasyonları
Tetrasiklin	Antibiyotik Teratojen	Diş ve iskelet anormallikleri
Sitarabin	Antineoplastik Ajan	Uzuv anormallikleri ve kraniyofasiyal defektler
Varfarin	Antikoagülan	Kalp, damar ve uzuv deformiteleri

ğinin keşfinden bu yana, ilaç geliştirme sürecinde ilacın güvenliğini doğrulamak için kemirgen ve kemirgen olmayan birden fazla türde test yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır (Wachholz ve ark., 2021a). Günümüzde yeni ilaçların geliştirme testleri çoğunlukla kemirgenler ve tavşanlar üzerinde yapılmaktadır. Bununla birlikte, tavuk embriyoları da gelişimsel sorunlara yol açan ilaçların etkilerini ve şüpheli teratojenlerin etki mekanizmalarını anlamada yararlı bir model olarak kanıtlanmıştır, buna örnek olarak talidomid faciası verilebilir (Kemper ve Berger, 1962; Wachholz ve ark., 2021a). Tespit edildiği yıllar büyük bir trajediye sebep olan talidomid'in antianjiyojenik özellikler sergilediği ve tavuk embriyosunda uzuv anormalliklerine neden olduğu gösterilmiştir (Yamamoto ve ark., 2022). Talidomidin yanı sıra bu model kullanılarak incelenen teratojenler arasında, valproik asit, alkol, kokain, nikotin, retinoik asit ve kadmiyum da bulunmaktadır (Pintarasri ve ark., 2023).

Tavuk embriyosu, organogenezisin erken aşamaları da dahil olmak üzere bir ilacın etkilerinin gelişim boyunca analizini sağlar, bu da kemirgenler gibi modellerde zordur (Beedie ve ark., 2017). Aynı şekilde, doz-cevap analizi yapılarak ve gelişim sürecinde maruz kalma zamanlaması değiştirilerek embriyo üzerindeki etkiler gözlemlenebilir. Bu sayede, her etken için embriyonun en hassas gelişim dönemi belirlenebilir. Bu yaklaşım, terato-

jenin risklerini takip etmek ve değerlendirmek için tavuk embriyosunun mükemmel bir deneysel model olarak önemini daha da artırmaktadır (Wachholz ve ark., 2021b). Bu duruma iyi bir örnek olarak, tavuk embriyosunun gelişimi sırasında alkol maruziyetine bakıldığında, araştırmacılar bunun G-proteini aktivasyonunu ve kalsiyuma bağımlı programlanmış hücre ölümü mekanizmasını tetikleyen bir dizi olaya yol açtığını bulmuşlardır. Bu durum, öncelikle beyin ve nöral tüpü etkileyerek Fetal Alkol Sendromu (FAS) vakalarında gözlemlenen kraniyofasiyal deformasyonlar ve malformasyonlar hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Flentke ve Smith., 2018). Tavuk embriyolarında toksisite oluşturan diğer bazı maddelerin teratojen kategorisi ve oluşturdıkları anomali ve malformasyonlar Tablo 2'de gösterilmektedir.

Son olarak tavuk embriyosuna yapılan *in ovo* uygulamalar, teratojenlere maruz kalmanın neden olduğu doğumsal anomalileri önlemeye yönelik tedavileri incelemek ve geliştirmek amacıyla da kullanılmaktadır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, civeiv embriyo modeli günümüzde deneysel teratogenez modellerine etkili bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Gelişimsel toksisite çalışmalarında yeni yöntemlerin ve yaklaşımların uygulanması, çeşitli kimyasalların ve bileşiklerin embriyonik gelişim üzerindeki

etkilerine ilişkin bilgi birikimimizi artırmak adına önemli bir potansiyel sunmaktadır. İnsan gelişim süreçlerine olan benzerliği ve maliyet etkinliği sayesinde, civciv embriyo modeli geleneksel hayvan test yöntemlerine önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Bu metodolojilerin gelecekteki uygulama potansiyeli umut vericidir. Ayrıca, *in ovo* modeller birçok maddenin embriyotoksik dozlarını ve bu dozların yol açabileceği malformasyonları öngörme konusunda etkili olmuştur. 1960'larda büyük bir trajediye neden olan talidomid gibi bir teratojenin potansiyel embriyotoksik etkilerinin *in ovo* çalışmalarla ortaya konması, bu modelin gelişimsel toksisite çalışmalarındaki kritik rolünü açıkça göstermektedir. Bununla birlikte, gelişimsel toksisite çalışmalarında kullanılan tavuk embriyoları ile insan embriyoları arasında metabolik ve fizyolojik farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle, civciv embriyo modelinin sunduğu sınırlamaları kabul etmek ve bu doğrultuda değerlendirme yapmak önemlidir. Bu bağlamda, araştırmacılar bu model aracılığıyla elde edilen bulguları insan verileriyle doğrulamaya devam etmeli ve kapsamlı risk değerlendirmesi sağlamak için diğer deneysel modellerin bulgularını entegre etmelidir. Bu yaklaşım, gelişimsel toksisite çalışmalarının daha güvenilir ve geçerli sonuçlar sunmasını sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Abdelaziz, K., Helmy, Y. A., Yitbarek, A., Hodgins, D. C., Sharafeldin, T. A. & Selim, M. S. (2024). Advances in poultry vaccines: leveraging biotechnology for improving vaccine development, stability, and delivery. *Vaccines*, 12(2), 134.
- Acharya, B., Dey, S., Sahu, P. K., Behera, A., Chowdhury, B. & Behera, S. (2024). Perspectives on chick embryo models in developmental and reproductive toxicity screening. *Reproductive Toxicology*, 126, 108583.
- Ainsworth, S. J., Stanley, R. L. & Evans, D. J. (2010). Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy*, 216(1), 3-15.
- Arslan, M. S., Öztürk, S., Kök, R. R., Beşoluk, K., & Dayan, M. O. (2025). Determination of embryotoxic dose limit of doxycycline and its effects on some long bones by *in ovo* model. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 54(2), e70030.
- Beedie, S. L., Diamond, A. J., Fraga, L. R., Figg, W. D. & Vargesson, N. (2017). Vertebrate embryos as tools for anti-angiogenic drug screening and function. *Reproductive Toxicology*, 70, 49-59.
- Bellairs, R. & Osmond, M. (2005). *Atlas of chick development*. Elsevier.
- Bellairs, R. & Osmond, M. (2014). Chapter 3 - Early Stages. In: *Atlas of Chick Development* (Third Edition). Eds: Bellairs R, Osmond M. Boston: Academic Press, p. 15-28.
- Budai, P., Fejes, S., Várnagy, L., Somlyay, I. M., & Takács, I. (2001). Teratogenicity test of dimethoate containing insecticide formulation and heavy elements (Cu, Cd) in chicken embryos after administration as single compounds or in combination. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 66(2b), 885-889.
- Brent, R. L. (2004). Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors. *Pediatrics*, 113, Supplement 3, 957-968.
- Chen, L., Wang, S., Feng, Y., Zhang, J., Du, Y., Zhang, J., Van Ongeval, C., Ni, Y. & Li, Y. (2021). Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imaging-navigated biomedical research. *Cells*, 10(2), 463.
- Chung, D. D., Pinson, M. R., Bhenderu, L. S., Lai, M. S., Patel, R. A. & Miranda, R. C. (2021). Toxic and teratogenic effects of prenatal alcohol exposure on fetal development, adolescence, and adulthood. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8785.
- Crespo, P. & Casar, B. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* model to study metastasis. *Bio-protocol*, 6(20), e1962-e.
- Çakır, E. B. (2024). *In ovo* injection of testosterone to yolk sac modulates early posthatching development and physiology of male chick in broilers. *Poultry Science*, 103(3), 103389.
- Das, R., Mishra, P. & Jha R. (2021). *In ovo* feeding as a tool for improving performance and gut health of poultry: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 754246.
- Davey, M. G., Towers, M., Vargesson, N. & Tickle, C. (2018). The chick limb: embryology, genetics and teratology. *International Journal of Developmental Biology*, 62(1-2-3), 85-95.
- Dhayer, M., Jordao, A., Dekiok, S., Cleret, D., Germain, N. & Marchetti, P. (2024). Implementing Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) Assays for Validating Biomaterials in Tissue Engineering: Rationale and Methods. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 112(11), e35496.
- Dooley, M., Peebles, E., Zhai, W., Mejia, L., Zumwalt, C. & Corzo, A. (2011). Effects of L-carnitine via *in ovo* injection with or without L-carnitine feed supplementation on broiler hatchability and posthatch performance. *Journal of Applied Poultry Research*, 20(4), 491-497.
- Fischer, D., Fluegen, G., Garcia, P., Ghaffari-Tabrizi-Wizsy, N., Gribaldo, L., Huang, R. Y. J., Rasche, V., Ribatti, D., Rousset, X. & Pinto, M. T. (2022). The CAM model—Q&A with experts. *Cancers*, 15(1), 191.
- Flentke, G. R. & Smith, S. M. (2018). The avian embryo

- as a model for fetal alcohol spectrum disorder. *Biochemistry and Cell Biology*, 96(2), 98-106.
- Fonseca, B. B., da Silva, M. V. & de Moraes Ribeiro, L. N. (2021). The chicken embryo as an in vivo experimental model for drug testing: Advantages and limitations. *Lab Animal*, 50(6), 138-139.
- Fraga, L. R., de Oliveira, M. R., Wermann, K. M. & Vargesson, N. (2024). Assessment of the Teratogenic Effect of Drugs on the Chicken Embryo. In: *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*. Eds: Springer, p. 251-60.
- Fraga, L. R., Vianna, F. S. L., Del Campo, M., Sanseverino, M. T. V. & Schuler-Faccini, L. (2022). Teratogenesis: Experimental Models, Mechanisms and Clinical Findings in Humans. *Frontiers Media SA*, 13, 901400.
- Ghimire, S., Zhang, X., Zhang, J., & Wu, C. (2022). Use of chicken embryo model in toxicity studies of endocrine-disrupting chemicals and nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 35(4), 550-568.
- Gomes, J. A., Olstad, E. W., Kowalski, T. W., Gervin, K., Vianna, F. S. L., Schüler-Faccini, L. & Nordeng, H. M. E. (2021). Genetic susceptibility to drug teratogenicity: A systematic literature review. *Frontiers in Genetics*, 12, 645555.
- Grandjean, P., Abdennebi-Najar, L., Barouki, R., Cranor, C. F., Etzel, R. A., Gee, D., ... & Weihe, P. (2019). Timescales of developmental toxicity impacting on research and needs for intervention. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 125, 70-80.
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M. C., Sánchez-Seco, M. P., Evans, M. J. & Best, S. M. (2016). Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 882-890.
- Hamburger, V. & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88(1), 49-92.
- Janer, G., Slob, W., Hakkert, B. C., Vermeire, T. & Piersma, A. H. (2008). A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: what is the added value of the rabbit as an additional test species? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(2), 206-217.
- Jiang, Q., Xu, X., Zhang, C., Luo, J., Lv, N., Shi, L., Ji, A., Gao, M., Chen, F. & Cui, L. (2020). In ovo very early-in-life exposure to diesel exhaust induced cardiopulmonary toxicity in a hatchling chick model. *Environmental Pollution*, 264, 114718.
- Kalter, H. (2003). Teratology in the 20th century Environmental causes of Congenital malformations in humans and how their environmental causes were established. *Neurotoxicology and Teratology*, 25(2), 131-282.
- Karagiozova, D. (2017). Teratogenic agents and related conditions. *Texila Int J Med*, 5(1), 12.
- Kemper, F. & Berger, H. (1962). Changes in the blood of chicks under the influence of thalidomide. *Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin*, 136, 86-96.
- Kue, C. S., Tan, K. Y., LaM, M. L. & Lee, H. B. (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Experimental Animals*, 64(2), 129-138.
- Latchoumycandane, C., Jenardhanan, P. & Mathur, P. P. (2018). Environmental impact on gametogenesis and embryogenesis: an overview. 2nd edition, Volume 3.
- Malek, A. (2012). Effects of prenatal cocaine exposure on human pregnancy and postpartum. *Pharmaceut Anal Acta*, 3, 191. 10.4172/2153-2435.1000191
- Meijerhof, R., Hulet, R. (1997). In ovo injection of competitive exclusion culture in broiler hatching eggs. *Journal of Applied Poultry Research*, 6(3), 260-266.
- Nguyen, T. T. T., Shahin, K., Allan, B., Sarfraz, M., Wheler, C., Gerdts, V., Köster, W. & Dar, A. (2022). Enhancement of protective efficacy of innate immunostimulant based formulations against yolk sac infection in young chicks. *Poultry Science*, 101(11), 102119.
- Nikolov, B., Georgieva, A., Manov, V. & Kril, A. (2014). In ovo tests for carcinogenicity, mutagenicity and embryotoxicity. Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. Vol. LX (1).
- Nilooofar, A., Marek, B., Krzysztof, K. & Katarzyna, S. (2024). Emerging in ovo technologies in poultry production and the re-discovered chicken model in preclinical research. *Physical Sciences Reviews*, 9(2), 843-859.
- Nowak-Sliwinska, P., Segura, T. & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17, 779-804.
- Öznurlu, Y. (2003). Yumurtaya verilen Aflatoxin B1'in, etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. *SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.
- Özparlak, H. (2015). Tavuk Embriyolarının Embriyotoksisite Ve Teratojenite Testlerinde Kullanımı. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 40, 13-22.
- Öztürk, S. & Dayan, M. O. (2024). The embryotoxic and teratogenic effects of metamizole sodium. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 53(5), e13101.
- Paredes-Páliz, K., Armendáriz-Ramos, J., Salazar A. U. & Torres A. R. I. (2024). The most common teratogens as factors of mutability: A literature review. *Salud Ciencia Y Tecnología*, 4, 1098.
- Peebles, E. (2018). In ovo applications in poultry: a review. *Poultry Science*, 97(7), 2322-2338.

- Pintarasri, S., Plakornkul, V., Viravud, Y., Payuhakrit, W. & Rungruang, T. (2023). Folic Acid Attenuates MSG-Induced Teratogenicity during A 2-Month Pregnancy by Preventing Neural Crest Cell Destruction and Malformation in Chick Embryo Models. *Trends in Sciences*, 20(7), 6656.
- Prelusky, D. B., Hamilton R. M., Foster, B. C., Trenholm, L. H. & Thompson, B. K. (1987). Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 70(6), 1049-1055.
- Rashidi, H. & Sottile, V. (2009). The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *Bioessays*, 31(4), 459-465.
- Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of Development*, 141, 70-77.
- Ribatti, D. & Annese, T. (2023). Chick embryo in experimental embryology and more. *Pathology-Research and Practice*, 245, 154478.
- Ribeiro, L., Schlemper, A., Da Silva, M. & Fonseca, B. (2022). Chicken embryo: a useful animal model for drug testing? *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 26, 13.
- Roto, S. M., Kwon Y. M. & Rieke, S. C. (2016). Applications of in ovo technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 63.
- Saeed, M., Babazadeh, D., Naveed, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Arain, M. A., Tiwari, R., Sachan, S., Karthik, K. & Dhama, K. (2019). In ovo delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in poultry: current knowledge. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8), 3727-3739.
- Sharma, J. & Burmester, B. (1982). Resistance of Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. *Avian Diseases*, 134-149.
- Smith, S. M., Flentke, G. R. & Garic, A. (2012). Avian models in teratology and developmental toxicology. *Developmental Toxicology: Methods and Protocols*, 85-103.
- Spohr, H. (2005). Teratogene Effekte von Nikotin, Drogen und Alkohol. *Die Gynäkologie*, 38(1), 25-32.
- Staton, C. A., Stribbling, S. M., Tazzyman, S. Hughes, R., Brown, N. J. & Lewis, C. E. (2004). Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, 85(5), 233-248.
- Stern, C. D. (2004). The chick embryo-past, present and future as a model system in developmental biology. *Mech Dev*, 121(9), 1011-1013.
- Tainika, B. & Bayraktar, Ö. H. (2021). In ovo feeding technology: embryonic development, hatchability and hatching quality of broiler chicks. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 45(5), 781-795.
- Tantibanchachai, C. (2014). *Teratogens*. Embryo Project Encyclopedia.
- Tasharofi, S., Mohammadi, F., Amiri, N. & Nazem, M. (2018). Effects of intra-yolk-sac injection of dextrose and albumin on performance, jejunum morphology, liver and pectoral muscle glycogen and some serum metabolites of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(4), 917-923.
- Thawani, A., Sirohi, D., Kuhn, R. J. & Fekete, D. M. (2018). Zika virus can strongly infect and disrupt secondary organizers in the ventricular zone of the embryonic chicken brain. *Cell Reports*, 23(3), 692-700.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1991). Guidelines for developmental toxicity risk assessment. *Federal Register*, 56(234), 63798-63826.
- Vargesson, N. (2013). Thalidomide embryopathy: an enigmatic challenge. *International Scholarly Research Notices*, 1, 241016.
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 105(2), 140-156.
- Vargesson, N. (2019). The teratogenic effects of thalidomide on limbs. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 44(1), 88-95.
- Vargesson, N. & Fraga, L. (2017). Teratogenesis. eLS, 1-7.
- Wachholz, G. E., Rengel, B. D., Vargesson, N. & Fraga, L. R. (2021a). From the farm to the lab: how chicken embryos contribute to the field of teratology. *Frontiers in Genetics*, 12, 666726.
- Wachholz, G. E., Varela, A. P. M., Teixeira, T. F., de Matos, S. M. S., Rigon da Luz Sister, P., Vianna, F. S. L., de Souza, D. O. G., Roche, P. M., Schuler-Faccini, L. & Fraga, L. R. (2021b). Zika virus-induced brain malformations in chicken embryos. *Birth Defects Research*, 113(1), 22-31.
- Wong, E. A. & Uni, Z. (2021). Centennial Review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poultry Science*, 100(3), 100821.
- Yamamoto, J., Ito, T., Yamaguchi, Y. & Handa, H. (2022). Discovery of CRBN as a target of thalidomide: a breakthrough for progress in the development of protein degraders. *Chemical Society Reviews*, 51(15), 6234-6250.