

De Ovo Çalışmalar

De Ovo Studies

 Fatih ÇÖLLÜ^a,
 Arzu İLBAY GÜRGEN^b,
 Mesut METE^b

^aManisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü,
Manisa, Türkiye
^bManisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Beyin ve Sinir Cerrahisi ABD,
Manisa, Türkiye

Yazışma Adresi/Correspondence:
Mesut METE
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Beyin ve Sinir Cerrahisi ABD,
Manisa, Türkiye
dr.mmte@hotmail.com

ÖZET De ovo teknik, kuluçka döneminde veya kuluçkadan hemen önceki dönemde kanatlı yumurtalarına çeşitli besin maddeleri, aşı, hormon, uyarıcı ve sıvı solüsyonların enjeksiyonu esasına dayanan biyoteknolojik bir uygulamadır. Nöroşirürji pratiğinde özellikle nöral tüp defekti konusunda yapılan araştırmalar civciv embriyolarında omurilik gelişim modeli kullanılarak yapılmaktadır. İn ovo tekniği, hava boşluğu, allantoik kese, amniyotik sıvı, embriyonik vücut ve yumurta sarısı olmak üzere farklı bölgelere uygulanabilir. Embriyo gelişiminin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için sıcaklık, nem ve hareket gibi dış ortam şartlarına ihtiyaç vardır. Embriyonun tavuk olmadan yapay yollarla büyütülebilmesi için, ticari olarak üretilen inkübatörler bu şartları sağlamalıdır.

Anahtar Kelimeler: Civciv embriyosu; embryo araştırması; inkübatörler

ABSTRACT De ovo technique is a biotechnological application based on the injection of various nutrients, vaccines, hormones, stimulants and liquid solutions into poultry eggs during or just before hatching. In neurosurgery practice, research on neural tube defects is carried out using the spinal cord development model in chick embryos. The in ovo technique can be applied to different areas such as the air cavity, allantoic sac, amniotic fluid, embryonic body. In order for healthy embryo development, external environmental conditions such as temperature, humidity and movement are needed so, commercially produced incubators must meet these requirements.

Keywords: Chick embryo; embryo research; incubators

De ovo teknik, kuluçka döneminde veya kuluçkadan hemen önceki dönemde kanatlı yumurtalarına çeşitli besin maddeleri, aşı, hormon, uyarıcı ve sıvı solüsyonların enjeksiyonu esasına dayanan biyoteknolojik bir uygulamadır. Sert bir kabukla çevrelenen kanatlı yumurtaları, normal koşullarda dış çevreden herhangi bir besin maddesi alamamakta ve aynı zamanda çevreye hiçbir atık madde vermemektedir. Dolayısıyla embriyo gelişimi için gerekli enerji kaynaklarını oluşturmaya maddelerin yumurtanın oluşum aşamasında yumurta içerisinde birikmesi gerekmektedir. Kanatlı yumurtalarına kuluçka döneminde veya kuluçkadan hemen önceki dönemde, de ovo tekniği ile ileriki dönemlerde ciddi sorunlar oluşturabilecek ilaçların, aşıların, hormonal sisteme ve cinsiyet gelişimine direkt etki eden maddelerin, bazı uyarıcıların enjeksiyon çalışmaları yapılmaktadır.¹⁻⁵ Nöroşirürji pratiğinde özellikle nöral tüp defekti konusunda yapılan araştırmalar civciv embriyolarında omurilik gelişim modeli kullanılarak yapılmaktadır.⁶⁻⁸ İn ovo tekniğin patenti ilk olarak 1985 yılında Embrex tarafından alınmıştır. İlk bilimsel araştırma ise Sharma ve Burmester'in, Beyaz Leghornlar'da Marek hastalığına karşı in ovo aşılama tekniğini kullandıkları çalışmaları olmuştur.⁵

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:
Çöllü F, İlbay Gürgen A, Mete M. De ovo çalışmaları. Demirçivi Özer F, editör. Nöroşirürjide Klinik Dışı Araştırma Yöntemleri. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2023. p.99-103.

IN OVO ENJEKSİYON BÖLGELERİ VE ZAMANI

Kuluçkanın geç döneminde özellikle aşı uygulamaları için kullanılmakta olan in ovo tekniği, hava boşluğu, allantoik kese, amniyotik sıvı, embriyonik vücut ve yumurta sarısı olmak üzere beş temel alana uygulanabilir.⁹ İn ovo teknikte ırk, yumurtaların depolama yası, enjeksiyon bölgesi, iğne tipi ve kalınlığı, enjeksiyon iğnesinin uzunluğu, embriyonun gelişim aşaması ve hatta küçük etkiye sahip olsa da yumurtanın şekil ve büyüklüğü enjekte edilen maddelerin etkinliği açısından önem arz etmektedir.^{4,5,10} Her bir bölge embriyoya giden belli bir yolu temsil etmektedir. Dolayısıyla belirli tip aşı ve antijenler, besin maddesi, hormon ve solüsyonlar embriyo tarafından absorpsiyonu göz önüne alınarak farklı bölgelerden enjekte edilmektedir.⁵ Enjeksiyon işlemi sıklıkla hava boşluğuna yapılmasına rağmen uygun enjeksiyon yeri üzerine farklı öneriler de bulunmaktadır. Uni ve Ferket in ovo beslemenin etkinliğinin amniyotik kesede daha yüksek olduğunu belirtirken, Sivek ve ark. hava boşluğunu, Ohta ve Kidd ise sarı kese bölgesini tercih etmişlerdir.¹¹⁻¹³ Buna karşılık, Ebrahimi ve ark. in ovo enjeksiyon bölgesi olarak kuluçka öncesi ve embriyonik gelişimin başlangıcında amniyotik kesenin, embriyonik gelişimin daha sonraki aşamalarında ise genellikle sarı kesesinin daha uygun olacağını belirtmişlerdir.¹⁴ İdeal enjeksiyon zamanı incelenecek organa göre Hamburger Hamilton evrelemesine göre planlanmalıdır.

CİVCİV EMBRİYONİK GELİŞİMİ

Ortalama olarak normal kuluçka dönemi uzunluğu süresi 22 gün olup, bu sürenin bir günü tavuk vücudunda 21 günü ise kuluçkada geçmektedir. Embriyonik gelişimin ihtiyaç duyduğu ideal sıcaklık 37.5°C olup 23.9°C üzerindeki sıcaklıklarda da embryo gelişebilir. Yumurtlama sonrasında embriyonik gelişmeyi tam olarak durdurmak için 15.6-18.3°C'ler arasında bir çevre sıcaklığı sağlanmalıdır.^{15,16} Hamburger ve Hamilton 1951 yılında civciv embriyosunun tüm gelişim safhalarını inceleyerek 46 evreye ayırmıştır.¹⁷ Buna göre; 8. evrede nöral plak gelişmiş ve açıktır; 13. evreye gelindiğinde nöralasyona denk düşecek şekilde nöral tüp kapanmaktadır (Resim 1).

Evre 1 (Çizgi öncesi): İlkel çizginin görünmeye başlaması. Hücrelerin blastodermin arka yarısına doğru toplanması sonucu oluşan embriyonik katlantı görülebilir.

Evre 2 (İlk çizgi) (6-7 saat): Geçici bir evre olup primitif çizginin kısa ve koni şeklinde kalınlaşmanın uzun olarak (0.3-0.5 mm)pellusid alanın arka sınırında görüldüğü evredir. Genellikle inkübasyondan 6-7 saat sonra ortaya çıkar.

Evre 3 (Ara çizgi) (12-13 saat):Primitif çizgi, posterior kenardan pellusid alanının merkezine doğru uzanmıştır. Çizgi, boyuna göre rölatif olarak daha geniş ve etrafına göre parlaktır. İlkel oluk henüz oluşmamıştır.

Evre 4 (Kesin Çizgi) (18-19 saat): Primitif çizgi oluşabileceği maksimum uzunluk olan 1.88 mm ulaşmıştır. Primitif oluk, Primitif çekirdek ve Hensen's nodu oluşmuştur. Pellusida alanı armut görünümünü almıştır.

Evre 5 (Baş oluşum başlangıcı) (19-22 saat): Hensen's Nodu'nun ön köşesinden öne doğru uzanan, yoğunlaşan mezodermin bir çubuğu şeklinde notokord veya baş oluşumu görülmeye başlar. Başa ait katlantı henüz görünmemektedir. Bu aşamada notokord uzunluğu artar.

Evre 6 (Baş kıvrımı) (23-25 saat): Notokorda doğru olan blastodermin kesin katlantısı embriyonun ön ucunda belirginleşmiştir.Geçiş dönemi olup henüz somitler görülmeye başlamamıştır.

Evre 7 (Bir somit) (23-26 saat): Bu dönem gerçekte 2 somitlidir. Birinci somit henüz açık bir biçimde görülmez. Nöral katlantılar baş bölgesinde görülür hale gelmiştir.

Evre 8 (Dört somit) (26-29 saat): Nöral katlantılar orta beyin seviyesinde birleşirler. Bu dönemde 4 somit vardır. Blastodermin posterior yarısında kan adacıkları görülmeye başlar.

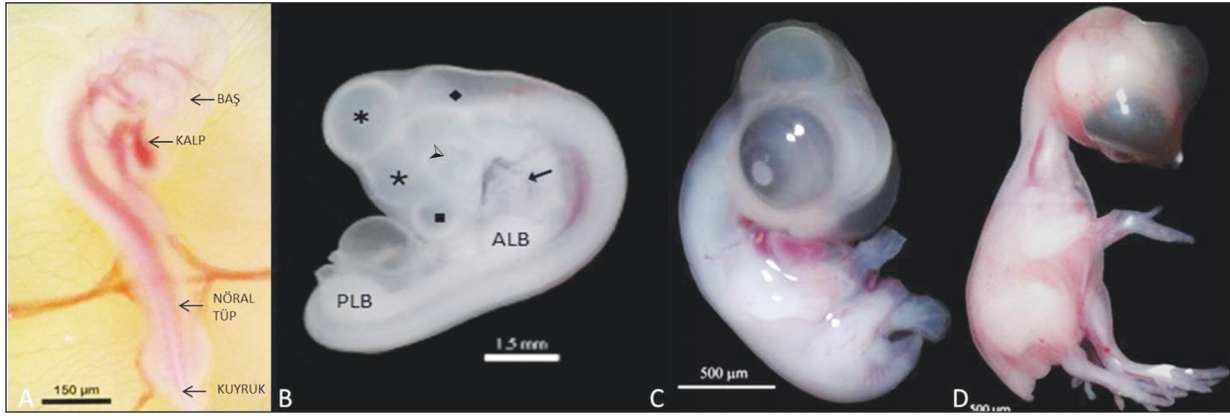
Evre 9 (Yedi somit) (29-33 saat): Primer optik kesecikler oluşmaya başlar. Kalbin odacıkları birleşmeye başlar.

Evre 10 (On somit) (33-38 saat): Somit sayısı 10'a ulaşmıştır. Birinci somit dağınık olarak yerleşim gösterir ve bundan sonraki evrelerde sayıya dahil edilmeyecektir. Kranial katlantının ilk işareti ortaya çıkar. Üç adet beyin keseciği açık şekilde görülür hale gelir. Optik kesecikler net değildir. Kalp hafif sağa doğru yerleşimlidir.

Evre 11 (Onüç somit) (40-45 saat): Hafif bir kranial katlantı vardır. Arka beyin 5 nöromere ayrılmıştır. Ön nöropor kapanmaya başlamıştır. Optik kesecikler belirginleşir. Kalp sağa yerleşmiştir.

Evre 12 (Onaltı somit) (45-49 saat): Kafa sola doğru dönmüştür. Ön nöroporun kapanması ile nöral tüp kapanması tamamlanır. Telensefalon görülmeye başlamıştır. Primer optik kesecikler ve optik sak oldukça iyi şekilde görülür. Kulak çekirdeği derindedir ve geniş şekilde açıktır. Kalp hafif bir S şekli alır. Amnionun baştaki katlantısı ön beyin bölgesinin girişini kaplar.

Evre 13 ve sonrasında Evre 46'ya kadar uzanan süreçte embriyo gelişimi tamamlanır.



RESİM 1: Cıvciv embriyosunun değişik evreleri. **A:** 3 günlük embriyo görünümü. **B:** Embriyoda Mesencephalon (*), Metencephalon (◆), Diencephalon (★), Telencephalon (■), Kalp (→), Göz (➤). ALB: Ön Uzun Tomurcuğu, PLB: Arka Uzun Tomurcuğu görülmektedir. **C:** 7 günlük embriyo görünümü; **D:** 10 günlük embriyo görünümü. (Resimler yazarın 6. ve 18. referans numaralı çalışmalarından alınmıştır).

KULUÇKA VE EMBRİYO ELDE ETME TEKNİĞİ

Bilimsel deneylerin tekrarlanabilir olması, anneden veya çevreden bulaşabilecek virüs ve bakteri gibi etkenlerin deneyi etki etmemesi için özel olarak üretilen spesifik patojen free (SPF) yumurtaların kullanımı önemlidir. Bu tip yumurtalar özel temiz odalarda üretilmekte olup, aşı üretiminde de rutin olarak kullanılmaktadır. Embriyo deneylerinde de herhangi bir olası bulaşın deneysel sonuçları etkilememesi için SPF yumurtalar tercih edilmelidir.

Dölllenmiş piliç yumurtasında embriyo gelişiminin devam edebilmesi için sıcaklık, nem ve hareket gibi belirli dış ortam şartlarına ihtiyaç vardır. Metabolizmanın devamlılığı için sıcaklık, yumurtanın kurumaması için nem ve embriyonun yumurta kabuğuna yapışmaması için ise yumurtanın ilk hafta en az 2 saat arayla 45° yana çevrilmesi önemlidir. Embriyonun tavuk olmadan yapay yollarla büyütülebilmesi için, ticari olarak üretilen inkübatörler bu şartları sağlamalıdır. İlk üretilen inkübatörler (Resim 2A) mekanik termostatlara yönetilen sabit sıcaklık mekanizması

ve su havuzuyla standart bir nem sağlarken, modern inkübatörler (Resim 2B) dijital ve çok hassas sıcaklık kontrolü, peristaltik su pompası ile desteklenen ve isteğe bağlı değiştirilebilen nem ayarı ve otomatik hareket ettirme mekanizmaları sayesinde oldukça kontrollü bir inkübasyon ortamı sağlayabilmektedir. Ortamın tam kontrollü olması elde edilen verilerin geçerliliği ve deneylerin tekrarlanabilirliği açısından avantaj sağlamaktadır.

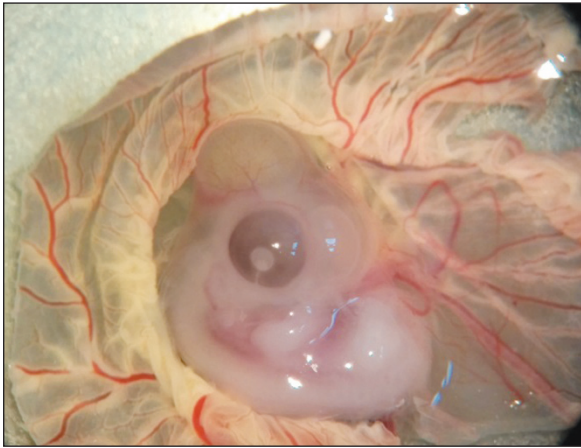
Deneylerimizde inkübatör olarak Brinsea Octagon Advance 40 modeli kullanılmaktadır.^{6,8,18-20} Yumurtalar alınmadan 1 gün önce cihazın iç kısmı %70 alkolle dezenfekte edilmeli ve cihaz çalıştırılmalıdır. Daha sonra yumurtalar üretim merkezinden alınarak hızla laboratuvara getirilmelidir. Yumurtalar üretim merkezinde genellikle +4°C de saklanmaktadır ve bu nedenle yumurtalar inkübatöre yerleştirilmeden önce oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek yumurta sıcaklığının ortam ısısına gelmesi beklenir ve 2 saatin sonunda yumurtalar cihaza yerleştirilerek inkübasyon başlatılır. İnkübasyon koşulları olarak Brinsea tarafından önerilen +37,5°C ve %45 nem ve 2 saatte bir yu-



RESİM 2: İlk üretilen inkübatör (A) ve modern inkübatör (B). (Prof. Dr. Beyhan Gürcü'nün izniyle kullanılmıştır).



RESİM 3: Uygulama için açılmış pencere, embriyo ve koryoallantoik membranın görüntüsü (Prof. Dr. Beyhan Gürcü'nün izniyle kullanılmıştır).



RESİM 4: Diseksiyonla çıkartılmış 6 günlük piliç embriyosu (Prof. Dr. Beyhan Gürcü'nün izniyle kullanılmıştır).

murtayı çevirme özelliği tercih edilebilir.¹⁹ Yumurtanın kurumaması için nem miktarı önemli olup, inkübatör içerisindeki hazneye mutlaka su doldurulmalı ve su seviyesi periyodik olarak kontrol edilmelidir. Brinsea Octagon Advance gibi dijital ayarlı nem ölçer ve peristaltik su pompasına sahip olan inkübatörlerde ise nem oranı cihaz

tarafından otomatik yönetilir ve inkübasyon sırasında takibe ihtiyaç yoktur.

Yumurta içerisine *in ovo* enjeksiyon yapılabilmesi için yumurta kabuğunda daire şeklinde bir pencere açılması gerekmektedir. Pencerenin açılması sırasında yumurta kabuğunun çatlaması veya yumurtaya mikrobiyal kontaminantların girmesi ihtimali vardır. Mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi için uygulama öncesinde yumurtanın %70 alkolle dezenfekte edilmesi gerekmektedir. Dezenfeksiyon işleminden sonra yumurta içerisindeki hava boşluğuna yakın kabuk kısmına ipek yapışkan bant yapıştırılır ve bu yöntemle pencere açılması sırasında yumurtanın çatlaması engellenebilir. Pencerenin açılması sırasında albüminin dökülme olasılığı veya makas ucunun embriyoya hasar vermesi ihtimalinden dolayı hava boşluğuna yakın kısımdan delik açılması tercih edilmektedir. Daha sonra bant kısımdan yumurtada steril makas ucuyla küçük bir delik açılır ve bu delikten başlayarak yumurta kabuğu dikkatli bir şekilde daire şeklinde kesilir.^{6,20} Embriyo yumurtada sürekli yukarı konumlanır ve hemen görüş alanına girer (Resim 3).

Pencere açıldıktan sonra embriyoya ve embriyo dışı yapılara ulaşmak oldukça kolaydır. Bu yapılara çok ince insülin enjektörü yardımıyla, yapılara zarar vermeden enjeksiyon yapmak mümkündür. Embriyo gelişimine olan etkisinin incelenmesi için uygulanacak kimyasallar, koryoallantoik membran altına ve kan damarlarına yakın bir kısma, yaklaşık 3 mm derinliğe enjekte edilmelidir. Bu yöntemle, embriyo yumurtadaki besini tüketirken uygulanan kimyasalı da dolaşım yoluyla vücuduna almaktadır. Bu yolla uygulanan etken madde embriyoya sistemik olarak ulaşmakta ve gelişime pozitif veya negatif yönde etki edebilmektedir. Uygulama sonrası açılan pencere tekrar kapatılır ve üzerinde tekrar yapışkan bant yapıştırılır.⁶ Uygulama ve ardından inkübasyona devam edilir ve deneyin tasarımına göre belirlenen zamanda yumurta açılır ve embriyonun zarar görmeden kolayca çıkarılabilmesi için koryoallantoik membran etrafından kesi yapılarak embriyo diseksiyonla çıkartılır ve serum fizyolojik içerisine alınır (Resim 4).

KAYNAKLAR

- Vieira SL. Chicken embryo utilization of egg micronutrients. *Braz J Poultry Sci.* 2007;9:1-8.
- Hassanzadeh M, Fard BMH, Tooluo A. Evaluation of the immunogenicity of immune complex infectious bursal vaccine delivered in ovo embryonated eggs or subcutaneously to day-old chickens. *Int J Poultry Sci.* 2006;5(1):70-4. doi: 10.3923/ijps.2006.70.74.
- Fazli N, Hassanabadi A, Mottaghtalab M, Hajati H. Manipulation of broiler chickens sex differentiation by in ovo injection of aromatase inhibitors, and garlic and tomato extracts. *Poult Sci.* 2015;94(11):2778-83. doi: 10.3382/ps/pev236.
- Abdulqader AF, Olgun O, Yıldız AÖ. In ovo besleme. *Hayvansal Üretim.* 2017;58(2):58-65. doi: 10.29185/hayuretim.338989.
- Yiğit AÜ. Broilerlerde in ovo teknik ve ticari uygulamaları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi.* 2016;11(1):157-68.
- Mete M, Gurcu B, Collu F, Unsal UU, Duransoy YK, Tuğlu Mİ, et al. Effects of lacosamide "a novel antiepileptic drug" in the early stages of chicken embryo development. *Childs Nerv Syst.* 2016;32(9):1715-9. doi: 10.1007/s00381-016-3181-4.
- Ozer FD, Demirel A, Yılmaz Dilsiz O, Aydın M, Özdemir N, Uyanıkgil Y, et al. Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo. *Childs Nerv Syst.* 2012;28(7):969-76. doi: 10.1007/s00381-012-1758-0.
- Gürcü B, Mete TO, Çöllü F, Aydemir I, Tuğlu Mİ. The effects of lacosamide in the early stages of neural tube development in chick embryos. *Celal Bayar University Journal of Science.* 2018;14(1):51-5. doi: 10.18466/cbayarfb.342317.
- Tainika B, Bayraktar ÖH. In ovo feeding technology: embryonic development, hatchability and hatching quality of broiler chicks. *Turk J Vet Anim Sci.* 2021;45:781-95. doi: 10.3906/vet-2006-20.
- Islam AMF, Groves PJ, Walkden Brown SW, Arzey KE, Burgess SK. Comparison of protective efficacy of manual and automated in ovo vaccination against Marek's disease in broiler chickens. *Proc Aust Poultry Sci Sym Book.* 2003;197-201.
- Uni Z, Ferket PR. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. US 6,592,878. Washington, DC, USA: United States Patent; 2003. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a8/e2/6e/afc2cb87ff06a1/US6592878.pdf>
- Siwek M, Slawinska A, Stadnicka K, Bogucka J, Dunislawaska A, Bednarczyk M. Prebiotics and synbiotics-in ovo delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):402. doi: 10.1186/s12917-018-1738-z.
- Ohta Y, Kidd MT. Optimum site for in ovo amino acid injection in broiler breeder eggs. *Poult Sci.* 2001;80(10):1425-9. doi: 10.1093/ps/80.10.1425.
- Ebrahimi MR, Jafari Ahangari Y, Zamiri MJ, Akhlaghi A, Atashi H. Does preincubational in ovo injection of buffers or antioxidants improve the quality and hatchability in long-term stored eggs? *Poult Sci.* 2012;91(11):2970-6. doi: 10.3382/ps.2012-02246.
- Khajali F. Managing broiler production challenges at high altitude. *Vet Med Sci.* 2022;8(4):1519-27. doi: 10.1002/vms3.784.
- Erensayın C. Cıvıv embriyosunun gelişimi. *C.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi.* 1989;5(1):339-55.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn.* 1992;195(4):231-72. doi: 10.1002/aja.1001950404.
- Mete M, Aydemir I, Ünsal ÜÜ, Özbilgin K, Tuğlu Mİ, Gürcü B. Effects of alcohol during secondary neurulation in chick embryos. *İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast Dergisi.* 2017;7(3):227-35. doi: 10.5222/buchd.2017.227.
- Çöllü F, Gürcü B. Development of embryonic chick liver and distribution of eNOS, iNOS, laminin α1. *Celal Bayar University Journal of Science.* 2017;13(2):311-8. doi: 10.18466/cbayarfb.305213.
- Uçar E, Çöllü F, Gürcü B. The effect of nitric oxide synthase inhibition in developing chick embryo lungs. *Cell Tiss Biol.* 2022;16:352-63. doi: 10.1134/s1990519x22040101.