

**KAN PIHTILAŞMA FAKTÖRLERİNDEN FAKTÖR VIII'in  
ANJİYOGENEZE POZİTİF ETKİSİNİN KORİYOALLANTOYİK  
MEMBRAN MODELİNDE GÖSTERİLMESİ**

**DEMONSTRATION OF THE POSITIVE EFFECT OF FACTOR  
VIII, ONE OF THE BLOOD COAGULATION FACTORS, ON THE  
ANGIOGENESIS, IN A CHORIOALLANTOIC MEMBRANE  
MODEL**

**BÜŞRA EYLÜL DİKBAŞ**

**PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

*CANIM BABAMA...*

## ÖZET

# KAN PIHTILAŞMA FAKTÖRLERİNDEN FAKTÖR VIII'in ANJİYOGENEZE POZİTİF ETKİSİNİN KORİYOALLANTOYİK MEMBRAN MODELİNDE GÖSTERİLMESİ

**Büşra Eylül DİKBAŞ**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**

**Eylül 2023, 58 sayfa**

Doku mühendisliği günümüzde pek çok disiplinle beraber sağlık alanında sıklıkla kullanılan bir yaklaşım haline gelmiştir. Bu alanlardan biri olan damar doku mühendisliğinde damar endoteline etki eden maddeler de inceleme konusu olabilmektedir. Bu maddelerden biri olarak düşünülen Faktör VIII (FVIII), koagülasyonda intrinsik yolağın önemli bir parçası olan ve eksikliğinde X'e bağlı resesif aktarılan hemofili A hastalığına yol açan bir pıhtılaşma proteindir. Literatürde FVIII'in ekstra koagülatif doğasına odaklanan çalışmalar mevcuttur. Sunulan bu tez çalışmasında FVIII'in olası pro-anjiyojenik rolü anjiyogenez çalışmalarında kullanımı uygun olan koryoallantoyik membran (CAM) modelinde incelenmiştir. Ayrıca sodyum aljinat/jelatin hidrojel yardımıyla FVIII'in yavaş salımının etkisi de değerlendirilmiştir. Bunun için dört deney grubu belirlenmiş olup, uygulamalardan 72 saat sonra fotoğraflar çekilip damarlanmadaki morfolojik değişimler Image J programıyla değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** CAM modeli, anjiyogenez, FVIII, hidrojel, sodyum aljinat

## **ABSTRACT**

### **DEMONSTRATION OF THE POSITIVE EFFECT OF FACTOR VIII, ONE OF THE BLOOD COAGULATION FACTORS, ON THE ANGIOGENESIS, IN A CHORIOALLANTOIC MEMBRANE MODEL**

**Büşra Eylül DİKBAŞ**

**Master's of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**

**September 2023, 58 pages**

Tissue engineering has become an approach that is frequently used in the field of health along with many disciplines today. In vascular tissue engineering, which is one of these areas, substances that affect the vascular endothelium can also be the subject of investigation. Factor VIII (FVIII), considered as one of these substances, is a coagulation protein that is an important part of the intrinsic pathway in coagulation and in its deficiency causes X-linked recessive inherited hemophilia A. There are studies in the literature focusing on the extra-coagulative nature of FVIII. In this thesis presented, the possible pro-angiogenic role of FVIII was investigated in the chorioallantoic membrane (CAM) model, which is suitable for use in angiogenesis studies. The effect of slow release of FVIII with the help of sodium alginate/gelatin hydrogel was also evaluated. For this, four experimental groups were determined, photographs were taken 72 hours after

the applications and the morphological changes in vascularization were evaluated with the Image J program.

**Keywords:** CAM model, angiogenesis, FVIII, hydrogel, sodium alginate

## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman destek olan, her ne olursa olsun beni geri çevirmeyen, bana sabreden ve hep anlayışla yaklaşan, öğrencisi olarak kabul eden ve hem bilimsel katkılarıyla hem de daima sevgisiyle hayatıma yaptığı katkılarından dolayı, her zaman saygı duyduğum ve saygımın sonsuz olduğu danışmanım sayın **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her koşulda bıkmadan bana doğruyu gösteren, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bilimsel tavrını hep örnek aldığım ve çok sevdiğim hocam sayın **Dr. Öğretim Üyesi Esin AKBAY ÇETİN**'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvarını kullanmama izin veren, takıldığım noktalarda her zaman bilgilerini paylaşan ve samimi bir çalışma ortamı sağlayan hocam sayın **Prof. Dr. Murat DEMİRBİLEK**'e çok teşekkür ederim.

Fikirleri, yardımları, tecrübeleriyle ve pozitiflikleriyle çalışmalarım süresince beni hep destekleyen sayın hocalarım **Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR, Dr. Öğretim Üyesi Handan SEVİM AKAN, Doç. Dr. Hanife Güler DÖNMEZ ve Doç. Dr. Sırma ÇAPAR DİNÇER**'e çok teşekkür ederim.

Yol arkadaşlarım sevgili **Buse BEKAR ve İbrahim KAMACI**'ya yardım ve destekleri için ve de kaliteli ve keyifli bir çalışma ortamı sundukları için çok teşekkür ederim.

Desteğini her zaman hissettiğim kuzuşum **Rüya OYTUN**'a ve daima yanımda olan annem **Melike DİKBAŞ**, teyzem **Figen Fatma TURANKÖK** ve pamuğum **Fehime TURANKÖK**'e çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Dolaşım Sistemi Fizyolojisi ve Anjiyogenez.....	2
2.1.1. Anjiyogenez Mekanizması.....	5
2.1.2. Anjiyogenezi Tetikleyen Moleküller.....	5
2.1.3. Literatürde Kullanılan Anjiyogenez Modelleri.....	7
2.1.3.1. <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , <i>in ovo</i> ve <i>ex ovo</i> Modeller.....	7
2.1.3.1.1. Koriyoallantoyik Membran (CAM) Modeli.....	9
2.2. FVIII.....	10
2.2.1. FVIII ve Endotel Hücresi.....	10
2.2.2. FVIII ve Anjiyogenez.....	11
2.3 DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	11
2.3.1. Damar Doku Mühendisliği.....	11
2.3.1.1. Damar Doku Mühendisliğinde Kullanılan Yapı İskeleleri.....	12
2.3.2. Hidrojeller.....	13
2.3.2.1. Enjekte Edilebilir Hidrojeller ve Damar Doku Mühendisliğinde Kullanımları.....	13

2.3.2.2. Sodyum Aljinat ve Jelatin.....	14
2.3.2.3. Hidrojellerin Sentez Yöntemleri.....	16
2.3.2.3.1. Fiziksel Çapraz Bağlanma.....	16
2.3.2.3.2. Kimyasal Çapraz Bağlanma.....	16
2.4. KONTROLLÜ SALIM SİSTEMLERİ.....	16
2.4.1. Kontrollü Salım Sistemleri ve Salım Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması.....	16
2.4.1.1. Osmosis Kontrollü Sistemler.....	17
2.4.1.2. Şişme Kontrollü Sistemler.....	17
2.4.1.3. Difüzyon Kontrollü Sistemler.....	18
2.4.1.4. Polimer Erozyonu ve Degredasyonu Kontrollü Sistemler.....	18
2.4.1.5. Dış Etkenlerle Kontrollü Sistemler.....	19
2.4.1.6. İyon Değişimi Kontrollü Sistemler.....	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	21
3.1. Hidrojellerin Hazırlanması.....	21
3.1.1. Hidrojellerin Karakterizasyonu.....	22
3.1.1.1. Faz Ayrımı Çalışmaları.....	22
3.1.1.2. Şişme ve Degredasyon Çalışmaları.....	22
3.1.1.3. Hidrojellerin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	23
3.1.2. FVIII Yüklü Hidrojellerin Hazırlanması ve FVIII'in Salım Çalışmaları.....	24
3.2. Koriyoallantoyik Membran (CAM) Modeli.....	25
3.3. İstatistiksel Analiz.....	26
4. SONUÇLAR.....	27
4.1. Hidrojeller.....	27
4.1.1. Hidrojellerin Karakterizasyonu.....	27
4.1.1.1. Makroskobik İzlenimler.....	27



4.1.1.2. Faz Ayrımı Çalışmaları.....	27
4.1.1.3. Şişme ve Degredasyon Çalışmaları.....	28
4.1.1.4. Hidrojellerin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30
4.1.2. FVIII'in Salım Çalışmaları.....	30
4.2. Koriyoallantoyik Membran (CAM) Modeli.....	32
5. TARTIŞMA.....	35
6. KAYNAKLAR.....	38
EKLER.....	46
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pulmoner ve sistemik dolaşımın şematik olarak özetlenmesi [4] .....	2
Şekil 2.2. Arterler ve venlerin ince yapısı [5].....	3
Şekil 2.3. Anjiyogenez basamakları [7].....	4
Şekil 2.4. Anjiyogenez tipleri [9].....	6
Şekil 2.5. Bazı anjiyogenez modelleri [11].....	8
Şekil 2.6. Cıvcıv embriyosu ve koriyoallantoyik membran (CAM) şematik görünümü [16].....	9
Şekil 2.7. Doku mühendisliği ürünü vasküler yapıların olması beklenen özellikleri [26].....	12
Şekil 2.8. Hidrojellerin vasküler dokudaki rolleri [31].....	14
Şekil 2.9. Sodyum aljinat monomerlerinin düzenlenişleri [34].....	15
Şekil 3.1. Faz ayrımı testi için ependorf tüplerde hazırlanan jeller.....	22
Şekil 3.2. Şişme ve degradasyon çalışmaları için hazırlanan tüpler.....	23
Şekil 3.3. Silikon kalıp.....	23
Şekil 3.4. Salım çalışması için hazırlanan tüpler.....	24
Şekil 3.5. A: CAM deneyi için masa hazırlığı, B: Yumurtaların inkübasyondaki görüntüsü.....	25
Şekil 3.6. Yumurta kabuğu açma ve genişletme.....	26
Şekil 4.1. Metilen mavisi içeren jellerin makroskobik görüntüleri.....	27
Şekil 4.2. Faz ayrımı sonrası elde edilen grafik .....	28
Şekil 4.3. Jellerin bir saat boyunca PBS'de bekledikten sonraki şişme grafikleri.....	28
Şekil 4.4. Tüm hidrojel gruplarının beş gün boyunca degradasyon grafikleri.....	29
Şekil 4.5. Jelin viskozite (A) ve artan frekansa karşı kompleks viskozite (B) grafikleri (Cihaz: Malvern Kinexus Pro+, Japonya).....	30

Şekil 4.6. Salım çalışması sonucu elde edilen grafik .....	31
Şekil 4.7. Deney gruplarının uygulama öncesi (1) ve uygulama sonrası (2) fotoğrafları. A; Negatif kontrol, B; Boş hidrojel, C; FVIII, D; FVIII yüklü hidrojel.....	33
Şekil 4.8. Image J ile damarların sayılması.....	34
Şekil 4.9. Deney gruplarının yüzde (%) damarlanma sayısı. Grupların hepsinde damarlanma artışı görülmüştür. Ancak boş hidrojel grubundaki artış istatistiksel anlamlı değilken, diğer gruplardaki artış anlamlı görülmüştür.	
**P<0.05.....	34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Literatürdeki anjiyogenez modelleri; avantajları ve dezavantajları [10].....	7
Çizelge 3.1. Hidrojelin formülasyonunu belirlemek için denenen aljinat-jelatin-çapraz bağlayıcı miktarları.....	21
Çizelge 3.2. Çalışmada belirlenen deney grupları.....	26

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad Derece
cm	Santimetre
g	Gram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
rad /s	Radyan / saniye
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
%	Yüzde
w / v	Ağırlık / hacim

### Kısaltmalar

AV	Atriyoventriküler Nod
CAM	Koriyoallantoyik Membran
$\text{CaCO}_3$	Kalsiyum Karbonat
CD	Farklılaşma Kümesi
CS/HA/Hep	Kitosan / Hidroksiapatit / Heparin
E	Embriyonik gün
ESM	Ekstraselüler Matriks
EDC/NHS	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid/N-
hidroksisuksinimid	

EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EPC	Endotelial Öncü Hücre
FGF-2	Fibroblast Büyüme Faktörü 2
FVIII	Faktör VIII
GDL	Glukonolakton
HCl	Hidroksiklorik Asit
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
INF- $\alpha$ / $\beta$	İnterferon alfa / beta
KGf	Keratinosit Büyüme Faktörü
m RNA	Mesajcı RNA
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolium
Bromid	
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PLLA	Poli (L-laktik asit)
PNIPAAm	Poli(N-İzopropilakrilamid)
RNA	Ribonükleik Asit
TEVG	Doku Mühendisliği Ürünü Vasküler Greft
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TSP 1/2	Trombospondin 1/2
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Epidermal Büyüme Faktörü
vWF	von Willebrand Faktör

# 1. GİRİŞ

Anjiyogenez; yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu, menstüriyal döngü ve embriyo gelişimi gibi pek çok fizyolojik süreçte rol oynayan bir mekanizmadır [1]. Bu sürecin işleyişinde ilk olarak bir anjiyogenik uyaran varlığında anjiyogenezle ilişkili büyüme faktörleri endotel hücrelerin yüzeyinde yer alan reseptörlere bağlanarak endotel hücrelerin geçirgenliğini artırıp çoğalmaya başlamasını sağlar. Endotel hücrelerin komşu hücre stromalarına invaze olabilmesi için matriks metalloproteinazlar tarafından ekstraselüler matriks degrades olmaya başlar. Böylece endotel hücreleri önceden varolan kapiller duvarından göç ederek lümen oluşumunu tetikler. İntegrinler aracılığıyla endotel hücrelerinin ekstraselüler matrikse bağlanması ve tüp formasyonu sağlanır. Son olarak perisitler ve düz kas hücreleri yardımıyla damar stabilizasyonu sağlanır. Anjiyogenik süreci yöneten pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin bir denge halinde olmasıyla fizyolojik anjiyogenez yönetilmektedir.

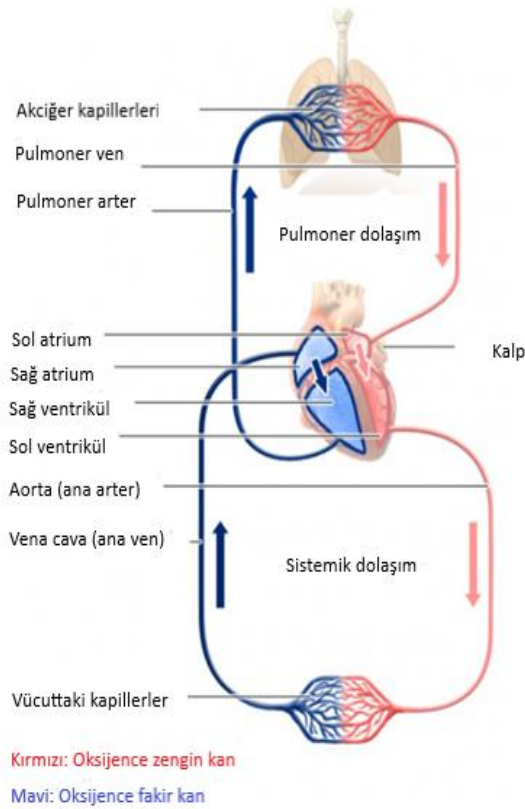
Anjiyogenezi indükleyen moleküllerin tanımlanması kanser ve retinopatiler gibi patolojilerin tedavisinde önemli olduğu kadar geliştirilen biyomateryallerin konak dokuya entegre olabilmesi ve terapötik etkilerini gösterebilmeleri için de önemli olmaktadır [2]. Bu nedenle son yıllarda anjiyogenezi yöneten faktörlerle ve endotel hücrelerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Örneğin bir yayında, koagülasyon kaskadında bir kan pıhtılaşma proteini olan FVIII'in taşıyıcısı von Willebrand faktör'ün anjiyogenez regülatörü ve belirteci olduğu, ancak FVIII ile ilgili bir bilgi olmadığı belirtilmektedir [3]. Buradan yola çıkılarak sunulan tez kapsamında, FVIII'in olası pro-anjiyogenik rolüne odaklanılmıştır. Bunun için anjiyogenez çalışmalarında kullanımı uygun olan ve literatürde sıklıkla tercih edilen koriyoallantoyik membran (CAM) modeli kullanılmıştır. Çalışmanın hipotezi doğrultusunda embriyo varlığı kontrol edilen yumurtalara belirlenen dozda FVIII uygulanmış ve damarlanmadaki artış negatif kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca FVIII, sodyum aljinat/jelatin hidrojellere yüklenerek yavaş salımının etkisi araştırılmıştır.



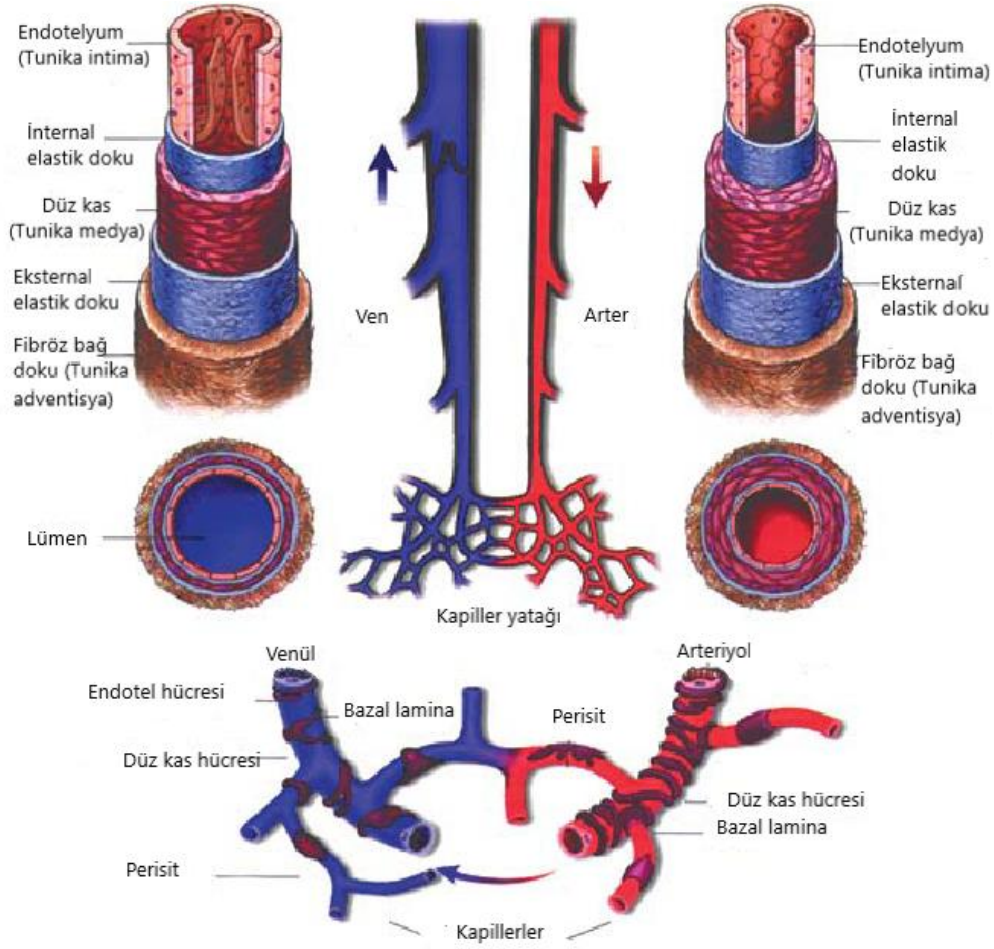
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Dolaşım Sistemi Fizyolojisi ve Anjiyogenez

Dolaşım sisteminin ana görevi oksijeni, besin maddelerini ve hormonları dokulara, organlara ve kaslara taşımak ve metabolik atıkları uzaklaştırmaktır. İki temel dolaşım vardır; pulmoner dolaşım ve sistemik dolaşım (Şekil 2.1). Pulmoner dolaşımında, *Vena cava*'dan kalbin sağ atriumuna gelen oksijenden fakir kan sağ ventriküle geçer ve buradan pulmoner arter ile akciğere taşınır. Akciğerde oksijenlendirilen temiz kan pulmoner ven ile kalbin sol atriumuna gelir ve buradan sol ventriküle geçer. Sistemik dolaşımında, sol ventrikülün kasılmasıyla *Aorta* vasıtasıyla tüm vücuda taşınır. Oksijeni azalan kan tekrar *Vena cava*'da birleşir ve pulmoner dolaşıma girer [4]. Dolaşım sisteminin ana elemanları kalp, kan damarları ve kandır.



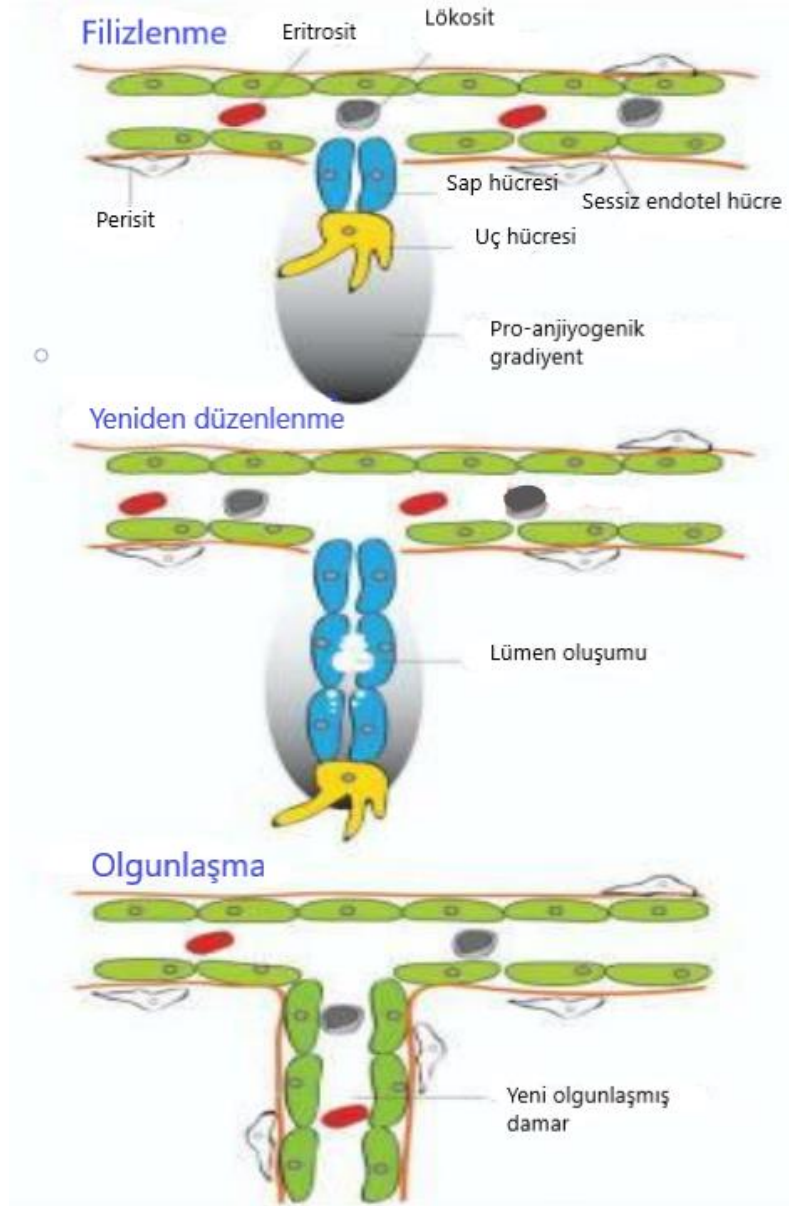
Şekil 2.1. Pulmoner ve sistemik dolaşımın şematik olarak özetlenmesi [4]



Şekil 2.2. Arterler ve venlerin ince yapısı [5]

Kan damarları ise üç ana tipte toplanmaktadır (Şekil 2.2). Arterler kanı kalpten vücuda taşıyan damarlardır. Kalpten çıkan yüksek basınçlı kan akımına dayanabilmek için kalın duvarlı ve dar lümenlidir. Ana arter yapısı aortadır. Periferde ilerledikçe arterler incelik alır ve arteriyoller adını alır. Arter duvarı üç tabakaya ayrılır: Tunika eksterna, Tunika medya, Tunika intima (dıştan içe doğru). Arterlere kıyasla venler, nispeten ince bir duvara ve daha büyük bir lümenine sahiptir. Duvarların yapısı arterlerinkine benzer, ancak damarların Tunika medyasında önemli ölçüde daha az miktarda kas bulunur. Genişleyebilir duvarları vardır ve büyük miktarda kan barındırabilirler. Çoğu periferik damar, Tunika interna'nın damarın lümenine çıkıntıları olan valf (kapakçık) adı verilen yapılara sahiptir. Valfler, kanın akış yönü tersine döndüğünde kapanarak kanın damarlardan geri akışını engeller. Göğüs ve karın damarlarında kapakçıklar yoktur. Venüller ise iki veya daha fazla kılcal damar birleştiğinde oluşur. Düz endotel hücreleri ve ince bir Tunika eksterna ile kaplıdırlar. Kapillerler ise kılcal

damarlar olarak da bilinirler. Kılcal damarların geçirgenliği, evre dokulara ve damar duvarındaki bitişik endotel hucresleri arasındaki bağlantıların tipine bağlı olarak değişir [6].



şekil 2.3. Anjiyogenez basamakları [7]

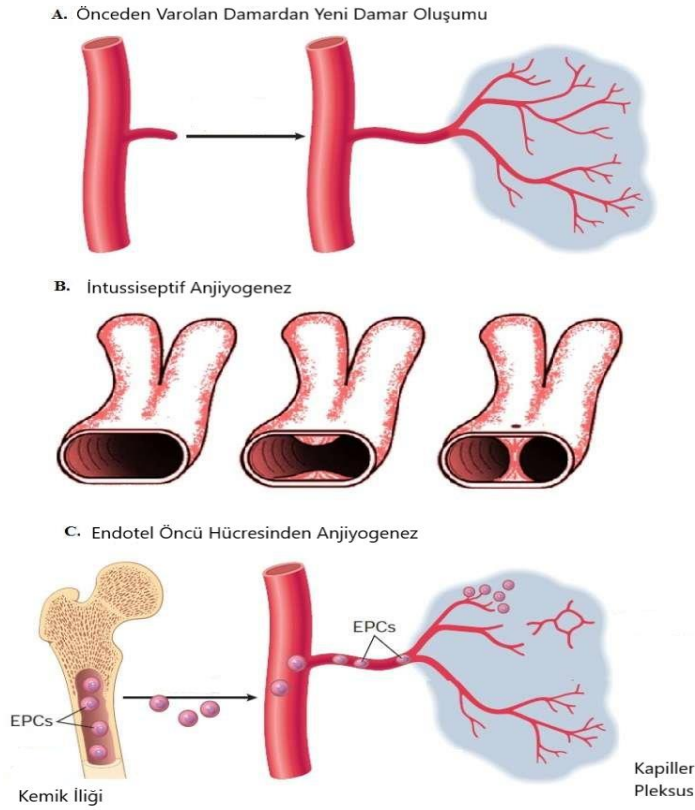
### **2.1.1 Anjiyogenez Mekanizması**

Anjiyogenez, var olan damarlardan yeni damarların oluşmasıdır. Temelde dört basamak ile ifade edilebilir (Şekil 2.3). İlk basamak olan filizlenme, endotel hücrelerin mikroçevrelerinden pro-anjiyogenik uyarılar alması ile çoğalmaya başlamalarıdır. Filizlenme sırasında iki farklı hücre tipi bulunur; göç etme yeteneğine sahip uç hücreleri ile çoğalarak damarın uzamasına yardımcı olan sap hücreleri. Bu sırada endoteli çevreleyen perisitler, çoğalarak intersitisyuma göç ederler ve matriks metalloproteinazları ifade ederek endotel hücrelerin bazal membranlarını parçalar. Fibroblast hücreleri ise büyüyen filiz için hücre dışı matriks oluşturur. Varolan damardan dışarıya doğru göç eden endotel hücreler pinositik vakuoller oluşturarak çevre endotel hücrelerle etkileşir ve sonuçta bir lümen oluştururlar. Fibroblastlar tübül oluşumunu indükleyen sinyaller sağlayarak süreci devam ettirir. Normal koşullar altında anjiyogenez başladıktan sonra bu kez anjiyogenezi inhibe edici sinyaller görülür. Damar stabilizasyonunu hızlandıran sinyaller arasında anjiyojenik sinyal molekülleri, VEGF, PDGF, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 ve kan akışı yer almaktadır. Stabilizasyon aşamasında endotel proliferatif özelliğini kaybeder ve hücreler arasında sıkı bağlantılar yeniden kurularak ekstraselüler matrikse bağlanır. Perisitler damar duvarını çevreler [7].

### **2.1.2 Anjiyogenezi Tetikleyen Moleküller**

Damar oluşumu anjiyogenezis olarak adlandırılır (Şekil 2.4). Damar oluşması ve yıkımı dinamik bir süreçtir. Dolaşım sistemine genel olarak bakıldığında, damarlanmanın embiyonik dönemden itibaren sürekli olduğu görülür. Bu süreç; büyüme faktörleri, sitokinler ve pro-anjiyojenik/anti-anjiyojenik sinyallerin dengelenmesiyle yürütülmektedir. Örneğin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), anjiyopietin gibi büyüme faktörleri pro-anjiyogenik etkiye sahiptir. Trombospondin 1/2 (TSP 1/2), anjiyostatin gibi moleküller ise anti-anjiyogeniktir. Pro- anjiyogenik ve anti-anjiyogenik molekülleri bir tablo halinde örnekleyen 2020 yılındaki bir makaleye göre pro-anjiyogenik moleküller; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici

büyüme faktörü (TGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve anjiyopietin 1/2 olarak belirtilirken, anti-anjiyogenik olanlar; trombospondin 1/2, anjiyostatin ve interferon  $\alpha$  ve  $\beta$  (INF  $\alpha/\beta$ ) olarak belirtilmiştir [8]. Rejeneratif tıp alanında, endotel hücrelerin oluşması ve anjiyogenesis; geliştirilen sistemlerin, materyallerin alıcı dokularıyla iletişime geçmesi, kaynaşması, beslenmesi (kanlanması) ve böylece nekroze olmaması bakımından oldukça önemlidir. Bu nedenle vasküler ağın kurulabilmesi amacıyla pek çok biyomateryal, anjiyogenik molekül ve bunların alıcıyla uyumu araştırılmaktadır. Bu bağlamda, doku mühendisliği çalışmalarında anjiyogenesis önemli bir başlık olarak görülmektedir. Anjiyogenesis; var olan damarlardan yeni damarların oluşması anlamına gelmektedir [8].



Şekil 2.4. Anjiyogenez tipleri [9]

## 2.1.3 Literatürde Kullanılan Anjiyogenez Modelleri

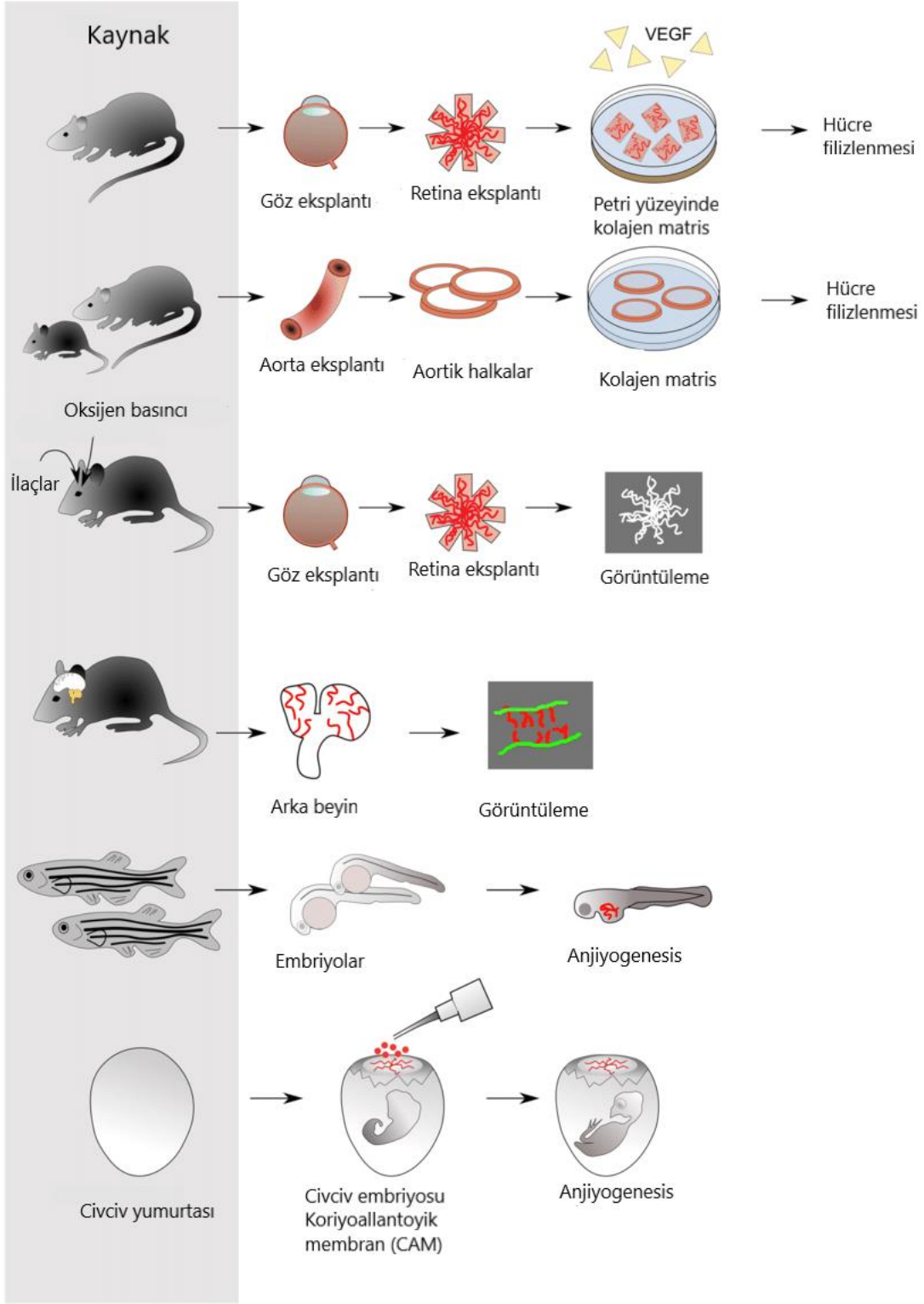
### 2.1.3.1 *in vitro*, *in vivo*, *in ovo* ve *ex ovo* Modeller

Literatürde anjiyogenezin fizyolojik doğasının araştırıldığı çok sayıda anjiyogenez modeli bulunmaktadır. Bu modeller çizelge 2.1’de özetlenebilir:

	Model	Teknik	Bilimsel veri	Avantajları	Dezavantajları
<i>in vivo</i>	Matrigel pıhtı assay	Immünohistokimya	Yeni oluşan kan damarlarının sayımı	Doku rejenerasyonu çalışması için ideal model	Pahalı ve zaman alıcı
	CAM assay	Immünohistokimya	Yeni kan damarları oluşumu	Anjiyojenik cevabın değerlendirilmesi	Zarın oksijen yoğunluğuna duyarlılığı
	Korneal anjiyogenez assay	Mikroskopik gözlem ve immünohistokimya	Damar uzunluğu ve vasküler filizlenmeler	Kornea önceden var olan damar sisteminden yoksun olduğu için güvenilir bir yöntem	Geniş çaplı çalışmalar için uygun değil
<i>ex vivo</i>	Rodent mezenterik anjiyogenez assay	Immünohistokimya	Damarlanan bölge yüzdesi	Oldukça ince doku olduğundan kolay gözlenebilirlik ve yüksek hassaslık	Anjiyogenez sayımında zorluk
	Rat aortik yay assay	Mikroskopik gözlem	Anjiyojenik filizlenmeler ve damar uzunluğu	<i>in vivo</i> ortam taklidi	Damar büyümesi çevre dokudan etkilenir
	Civciv aortik yay assay	Mikroskopik gözlem	Hücreli çoğalma, göç, tüp oluşumu ve damar dallanması	Daha az pahalı ve daha az deneysel süre	Damar büyümesi çevre dokudan etkilenir
	Rodent kulak anjiyogenez assay	Biyotinile lektin ile intravasküler boyama	Damar büyümesi ve dallanması	<i>in vivo</i> ortam taklidi ve kolay gözlem	Damar büyümesi konak hücre etkileşimlerinden etkilenir
	Fare fetal metatarsal anjiyogenez assay	Immünohistokimya	Damar filizlenmesi, anjiyogenezi etkileyen moleküller	<i>in vivo</i> filizlenmeleri daha iyi temsil eder ve mikrovasküler hücreleri kullanır	Fenotipi etkileyen biyomekanik kuvvet eksikliği ve özel teknik gerektirir

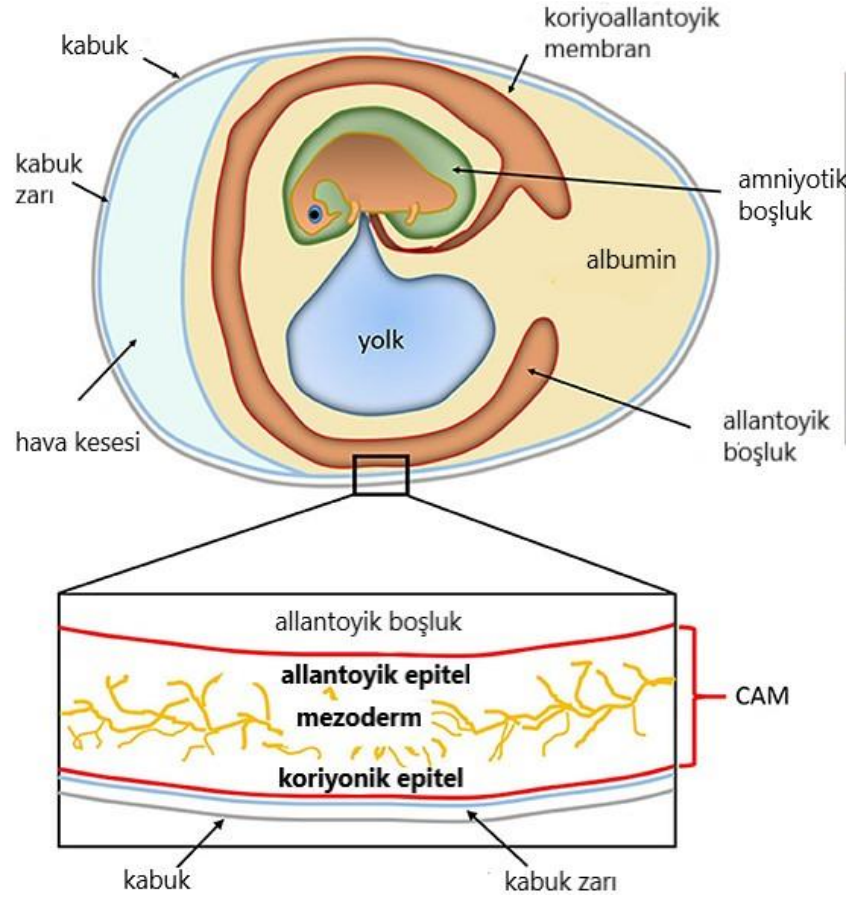
Çizelge 2.1. Literatürdeki anjiyogenez modelleri; avantaj ve dezavantajları [10].





Şekil 2.5. Bazı anjiyenez modelleri [11]

### 2.1.3.1.1 Koriyoallantoyik Membran (CAM) Modeli



Şekil 2.6. Civciv emriyosu ve koriyoallantoyik membran (CAM) şematik görünümü [16]

CAM, memelilerdeki plasentaya benzer şekilde, kuşlar ve sürüngenler gibi amniyotların döllenmiş yumurtalarında bulunan beslenme, gaz değişimi ve boşaltım için kullanılan oldukça damarlı bir zarıdır. CAM, her biri kendi özel işlevini yerine getiren koryonik epitel, mezoderm epiteli ve allantoik epitel olmak üzere üç katmandan oluşur (Şekil 2.6) [12]. Mezodermden türetilen allantoik membran, ilkel kan damarlarının ve vaskülarizasyonun üçüncü günden itibaren geliştiği, koryonik epitel ve allantoik epitelyumun dördüncü günde çift katmanlı koryoallantoik zarı oluşturmak üzere birleşmesi sonucunda geliştiği bölgedir [13]. 1951'de Hamburger ve Hamilton tarafından, Yirmi bir günlük civciv gelişimi kırk altı farklı aşamaya bölünerek, büyüyen civciv embriyosunun gelişimi karakterize edilmiştir [14]. CAM, gelişimin son on beş-on altı günü boyunca büyür ve civciv embriyosunun hemen yan tarafında, embriyonun kabuğu kırdığı ve yumurtanın çatladığı yirmi birinci güne kadar genişler. Yaklaşık on ikinci güne kadar civciv



embriyosunun büyümesi ve CAM vaskülarizasyonu hızlandırılmış gelişimden geçmektedir. Bu nedenle, bu zamana kadar uygulanan herhangi bir pro-anjiyojenik veya anti-anjiyojenik faktörün etkinliği artacağı belirtilmiştir. Sonuç olarak, herhangi bir yeni kan damarı oluşumunun doğal olarak büyüyen koryoallantoik membrandan değil, tedaviden kaynaklanma olasılığının daha yüksek olduğu on birinci günü izleyen günlerde anjiyojenik deneylerin yapılması tavsiye edilmektedir. On sekizinci güne kadar tam gelişmiş bir bağışıklık sisteminin yokluğunda, CAM bu noktaya kadar allojenik veya bağışıklık yetersizliği olan hücresiz matris veya doku aşısını barındırabilir. Bu nedenle, bir anjiyojenik yanıtı doğru bir şekilde değerlendirmek ve bağışıklık reaksiyonlarından kaçınmak için CAM en iyi şekilde, sınırlı bir zaman aralığında kullanılmaktadır [15].

## **2.2. FVIII**

Faktör VIII (FVIII), anti-hemofilik faktör olarak da bilinen temel bir kan pıhtılaşma proteindir. İnsanlarda, faktör VIII, *F8* geni tarafından kodlanır. X kromozomunun uzun kolunun terminaline yakın bir yerde bulunan büyük bir gendir [17]. Bu gendeki kusurlar, resesif X'e bağlı bir pıhtılaşma bozukluğu olan hemofili A'ya neden olur. Faktör VIII, karaciğer sinüzoidal hücrelerinde ve endotel hücrelerde üretilir. Bu protein, kan damarlarında hasar oluşturan bir yaralanma meydana gelene kadar von Willebrand faktörü ile kompleks halinde inaktif formda kan dolaşımında dolaşır. Yaralanmaya yanıt olarak, faktör VIII aktive edilir ve von Willebrand faktöründen ayrılır. Aktif protein (FVIIIa), trombositlerin fosfolipid membranına bağlanır ve faktör IX için kofaktör olarak görev yapar. Böylece faktör IX'i aktifleştirerek (IXa) faktör IXa'nın aktivitesini 100.000 kattan fazla artırır [18]. Plazmadaki FVIII, kovalent olmayan bağlanma ile von Willebrand faktör tarafından korunmadığı sürece proteolize edilmektedir ve/veya pinositoza uğramaktadır [19].

### **2.2.1 FVIII ve Endotel Hücresi**

FVIII'in karaciğer, dalak, böbrek ve lenf dokusu gibi dokularda sentezlendiği gösterilmiş olsa da; endotel hücreleri FVIII üretiminin tek kanıtı olarak elde

edilmiştir. FVIII protein aktivitesi, hem kültür ortamında hem de kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri, intestinal mikrovasküler endotel hücreleri, dermal mikrovasküler endotel hücreleri, akciğer mikrovasküler endotel hücreleri ve pulmoner arter endotel hücrelerinin hücre lizatlarından salındığı ölçülmüştür. Pozitif FVIII mRNA ekspresyonu intestinal mikrovasküler endotel hücreleri haricinde sayılan diğer tüm endotel hücrelerinde raporlanmıştır [20]. Ancak bununla birlikte endotel hücrelerinde FVIII sentezinin ve depolanmasının doğasının halen belirsizliğini koruduğu bildirilmektedir. Yapılan bir başka çalışmaya göre FVIII'in ekstrahepatik kaynağı olarak lenfatik endotel hücreler gösterilmiştir. Lenfatik endotel hücrelerin yanısıra, fenestrelili endotel hücrelerin ve lökosit trafiğinin olduğu venüllerin FVIII ürettiği ancak vWF sentezleyen kapiller kan damarlarının FVIII'in kaynağı olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca incelenen endotel hücreler arasında yalnızca aktif lenfosit ekstravazasyon bölgeleri olan postkapiller yüksek endotelyal venüllerin FVIII ve taşıyıcısı olan vWF'yi birlikte eksprese ettiği belirtilmiştir [21].

### **2.2.2 FVIII ve Anjiyogenez**

FVIII'in anjiyojenik doğası henüz tam olarak bilinmemektedir, ancak literatürdeki birçok makalede bu eksikliğe vurgu yapıp ekstra koagülatif özellikleri araştırılmaktadır. Örneğin bir çalışmada; belirgin neoanjiyogenez ve anormal vasküler yapı, özellikle hemofili A hastalarının artropatik eklemlerinde gözlenmiştir. Vasküler yeniden şekillenme belirteçleri ( $\alpha$ -düz kas aktini, endoglin [CD105] ve VEGF), eklem kanaması olaylarından sonra güçlü bir şekilde ifade edilmektedir ve bilinmeyen bir mekanizma veya mekanizmalar tarafından FVIII sinyalinin hedefleri olarak kabul edilir [22].

## **2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ**

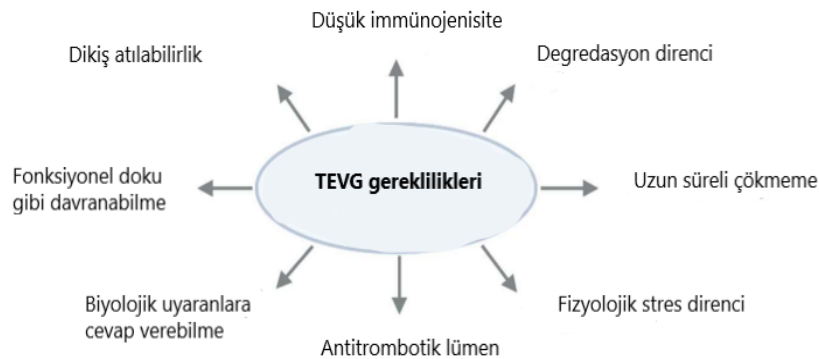
### **2.3.1 Damar Doku Mühendisliği**

Kan damarları bir kondüit görevi görerek, dokulara besin ve oksijen taşıırken aynı zamanda metabolik atıkları da uzaklaştırmaktadır. Aynı zamanda basınç ve gerilime maruz kalmaktadır. Bu koşullarda trombozu önlemek ve kan akımını düzenlemektedir. Buna göre, boyutları açısından mikrodamarlar (1 mm'den dar),

küçük damarlar (1-6 mm arasında) ve geniş damarlar (6 mm'den geniş) olarak sınıflandırılabilir [23]. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanında başarıya ulaşılmasının önemli adımlarından biri damar dokusunun oluşturulması ve diğer yapılarla anastomozunun sağlanmasıdır. Bu amaçla pek çok araştırmacı sentetik veya doğal yapılarla vasküler yapıyı oluşturmak için birtakım teknikler kullanmaktadırlar. Pek çok doku iskelesi ve biyomateryal, anjiyogenezi indüklemek için doku mühendisliği alanında kullanılmaktadır. Örneğin VEGF gibi çeşitli faktörler iskelelere bağlanarak, kontrollü salımlarıyla uygulandıkları alanda anjiyogenezi uyarmak için kullanılmaktadırlar. Bu materyaller içerisinde daha az invaziv olmasıyla ve boşluklara uygulanabilirliğiyle enjekte edilebilir hidrojeller ümit verici olarak görülmektedir [24].

### 2.3.1.1 Damar Doku Mühendisliğinde Kullanılan Yapı İskeleleri

Sadece damar dokusu için değil, biyomühendisliğin diğer alanlarında da doku iskelelerinde ESM yapısı taklit edilmeye çalışılmaktadır. Çünkü ESM; hücrelere yapısal desteğin yanında hücre yaşamını ve göçünü, dolayısıyla hücre davranışını yönlendirmektedir [25]. Doku iskelesi ayrıca, non-trombojenik ve non-immünojenik olmalıdır ve içinde büyüyen hücrelere uyum sağlamak için uygun bir elastikiyete ve gözenek boyutuna sahip olmalıdır. Ayrıca yapı iskelelerinin hücre büyümesini, farklılaşmasını ve doku yenilenme süreçlerini desteklemesi gerekmektedir. İdeal bir iskele biyolojik olarak parçalanabilir ve implante edilen hücrelerin doğal damarlarla *in vivo* olarak bütünleşmesini sağlamaktadır (Şekil 2.7) [26].



Şekil 2.7. Doku mühendisliği ürünü vasküler yapıların olması beklenen özellikleri [26]

Biyomühendislikte kullanılan yapı iskeleleri temelde doğal polimerlerden elde edilen ve sentetik polimerlerden elde edilen yapı iskeleleri olarak sınıflandırılabilir. Hayvansal kaynaklardan elde edilen doğal polimerler, ESM bileşenleri açısından uyuma sahiptir ve çoğunlukla hücre dostu olmaktadır ve biyouyumlu olarak görülmektedir. Ancak, bu polimerlerin mekanik yük taşıma özellikleri ve biyobozunma profili her zaman uygun olmayabilmektedir. Doğal polimerlere örnek olarak kolajen, fibrin, elastin, jelatin, kitosan, hyaluronik asit, ipek fibroini örnek verilebilir [23]. Doğal polimerlerin mekanik destek bakımından sınırlı olması araştırmacıları biyouyumlu olabilen sentetik materyalleri araştırmaya itmiştir. Poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA) ve polikaprolakton (PCL) en yaygın kullanılan sentetik polimerlerdir [24]. Bunlar dışında, hücreleştirilmiş (deselülerize) yapı iskeleleri ve kompozit (hibrit) yapı iskelelerinden söz edilebilir. Hücreleştirme ve dokuya özgü hücre dışı zar üretiminin gelişimi ilk olarak 1979 ve 1980'de bildirilmiştir. Bununla birlikte, ESM materyallerinin diğer mezenterik dokuların çıkarılmasıyla korunmasının ilk örneği 1995 yılında Badyak ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bu gelişme, 2000'li yılların başında deri, vasküler doku, kalp kapakçıkları ve mesane gibi dokular için dokuya özgü ESM'nin doğuşunu beraberinde getirmiştir [25]. Kompozit (hibrit) yapı iskeleleri ise doğal veya sentetik polimerlerin kullanımının avantaj ve dezavantajlarını dengelemek doğrultusunda ortaya çıkmıştır.

### **2.3.2. Hidrojeller**

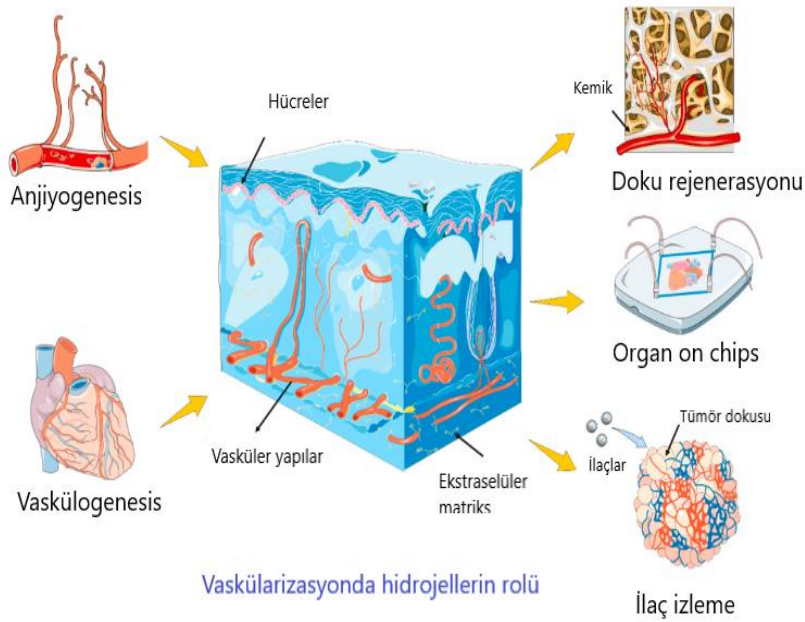
#### **2.3.2.1. Enjekte Edilebilir Hidrojeller ve Damar Doku Mühendisliğinde Kullanımları**

Doku mühendisliğinin amaçlarından biri uygun biyolojik ve mekanik yapıda yapı iskeleleri oluşturmaktır. Bu açıdan bakıldığında hidrojeller gerek mekanik dayanımları gerekse biyolojik aktiviteleri destekleyebilmeleri bakımından öne çıkmaktadırlar [26].

Hidrojeller üç boyutlu yapıya sahip fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanabilen ağsı polimerik yapılardır ve doğal ya da sentetik polimerler içerirler ve içerdikleri fonksiyonel gruplar ile hidrofilik karakter kazanırlar. Yüksek su tutma kapasitesi,

porozite, yumuşaklık ve esneklik gibi özelliklere sahip olup su ve diğer vücut sıvılarına afinite gösterirler [27]. Enjekte edilebilir hidrojeller ise, vücutta enjekte edilebilmek için uygun fizikokimyasal özelliklerdedirler ve bu nedenle ilaç taşınımında, doku mühendisliğinde ve dermal kapatıcı olarak ilgi görmektedirler [27]. Enjekte edilebilir bir hidrojel için en önemli faktörlerden biri polimer çözeltisinin viskozitesidir çünkü minimal invaziv işlemler için bu özellik önemlidir [27].

Damar doku mühendisliğinde enjekte edilebilir hidrojeller (Şekil 2.8), minimal invaziv olmasıyla tercih edilmektedir. Bir çalışmada, CS/HA/Hep hidrojellerin anjiyogenezi tetiklediği gösterilmiştir [28]. Bir başka çalışmada, puerarin/kitosan hidrojellerin miyokard enfarktüsü sonrasında pro-anjiyogenik etki ederek doku rejenerasyonu sağladığı belirtilmiştir [29]. Bir başka çalışmada ise nanokompozit hidrojellerin damar rejenerasyonunu artırdığı bildirilmiştir [30].

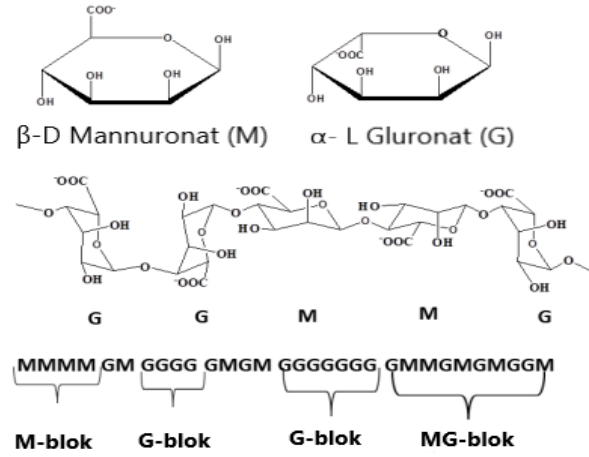


Şekil 2.8. Hidrojellerin vasküler dokudaki rolleri [31]

### 2.3.2.2. Sodyum Aljinat ve Jelatin

Sodyum aljinat doku mühendisliğinde, ilaç taşınımında, protein moleküllerinin taşınımında sıklıkla kullanılan ve hidrojel yapımında da tercih edilen doğal bir

polimerdir. Temel olarak kahverenkli alglerden veya bakteriyel kaynaklardan elde edilmektedir [32].



Şekil 2.9. Sodyum aljinat monomerlerinin düzenlenişleri [34]

Aljinat suda çözünebilir lineer polisakkarit olan (1,4)-bağlı  $\beta$ -D-mannuronat (M) ve  $\alpha$ -L-guluronat (G) kalıntılarının düzensiz bloklarını içeren lineer bir kopolimer ailesidir [32,33]. Monomerlerinin spesifik özelliklerinden dolayı G bloklarının ve M bloklarının düzenlenişi çeşitli olabilmektedir. Monomerlerinin organizasyonu homojen (çoklu G blokları veya çoklu M blokları) veya heterojen (düzensiz G ve M blokları) halde bulunabilmektedir (Şekil 2.9) [33]. Bu durum polimerin fiziksel özelliklerini ve aljinatın çeşitli iki değerlikli katyonlara olan afinitesini etkilemektedir [32]. Düşük M:G oranına sahip aljinatlar, güçlü ancak kırılabilir yapıdadır ve farmasötik ve biyomedikal alanda geniş oranda kullanılmaktadır [32]. Aljinik asit, seyreltik HCl kullanılarak alglerden ekstrakte edilmektedir. Sonrasında filtrat ekstratına NaCl eklenerek sodyum aljinatı çökeltir. Asidik işlemler, saflaştırma ve liyofilizasyon sonrasında sodyum aljinat tozu elde edildiği bildirilmiştir. Sodyum aljinatın temel özelliklerinden birinin, gluronik asit kalıntılarının çeşitli iki değerlikli katyonlarla etkileşerek hidrojel oluşturma yeteneği olduğu belirtilmiştir [33].

Jelatin hayvansal kökenli olup kemik, deri, tendon, ligament ve kıkırdak gibi bağ dokusu kaynaklarından elde edilmektedir ve kolajenin kısmi hidroliziyle meydana

gelmektedir [35]. Suda çözünebilir yapıdadır, karsinogenik ve toksik olmadığı; aynı zamanda biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olduğu belirtilmektedir [36]. Ayrıca immünojenik olmaması ile ve hücre yapışmasını artırma kapasitesiyle tıp alanında da hidrojenlerin sentezi için kullanıldığı ifade edilmiştir [35].

### **2.3.2.3. Hidrojellerin Sentez Yöntemleri**

Hidrojeller çoğunlukla fiziksel veya kimyasal çapraz bağlama ile sentezlenmektedirler [37]. Fiziksel çapraz bağlanma örneğin H bağı, iyonik bağ veya Van der Waals kuvvetlerini içeren elektrostatik etkileşimler olabilirken, kimyasal çapraz bağlanmaya örnek olarak Schiff baz reaksiyonu, Michael tip reaksiyon, enzim ilişkili reaksiyonlar veya 'click' kimya verilebilir [28].

#### **2.3.2.3.1. Fiziksel Çapraz Bağlanma**

Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller jel haline içsel moleküler kuvvetlerinin değişmesi ile ulaşırlar. Bu değişimler polimerlerin içsel düzenlenişleriyle veya çevresel uyarılarla meydana gelebilmektedir [38]. Sıcaklık ve pH kaynaklı ya da iyonik etkileşimler ile olabildiği gibi, konakçı molekül etkileşimleri, zıt kiralitedeki moleküler etkileşimler ve komplementer bağlanma gibi yöntemleri içermektedir [38].

#### **2.3.2.3.2. Kimyasal Çapraz Bağlanma**

Kimyasal bağlı hidrojellerde sıvı fazdan jel fazına geçiş olarak tanımlanabilen sol-jel oluşumu, polimer ağında yeni kovalent bağların oluşumuyla meydana gelmektedir [38]. Kimyasal çapraz bağlanma teknikleri 'click' kimya, Schiff baz reaksiyonu, fotopolimerizasyon, Michael tip reaksiyon, Tiyol temelli Michael tip reaksiyon ve enzim ilişkili reaksiyonlar olarak örneklenebilmektedir [37,38].

## **2.4. KONTROLLÜ SALIM SİSTEMLERİ**

### **2.4.1 Kontrollü Salım Sistemleri ve Salım Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması**

Kontrollü salım sistemleri geleneksel ilaçları daha etkili bir terapötik pencereye taşıyan akıllı ilaç taşıma sistemleridir. Daha az etkin madde ile dolayısıyla daha az yan etki ile hedefe yönelik taşıma sağlamaktadırlar. Kontrollü salım

sistemlerinin kullanım alanları ziraat, eczacılık, biyomühendislik, tıp, veterinerliğe kadar uzanmaktadır. Birinci nesil kontrollü salım teknolojileri 1950'lerde geliştirilmeye başlanmıştır ve 1952'de Smith Klein Beecham, ilaç salım kinetiğini kontrol edebilen ve 12 saatlik etkinlik elde edebilen ilk sürekli salım formülasyonunu tanıtmıştır [39].

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi, ilaçları geçirgenliklerine (bağırsak) ve çözünürlüklerine göre dört tipe ayırır. Sınıf I ilaçlar, yüksek geçirgenliğe ve yüksek çözünürlüğe sahiptir ve iyi emilir; emilim oranları atılımdan daha fazladır. Sınıf II ilaçlar yüksek geçirgenliğe ancak düşük çözünürlüğe sahiptir ve biyoyararlanımları çözülme hızları ile sınırlıdır. Sınıf III ilaçlar, düşük geçirgenliğe ancak ilacın hızla çözüldüğü yerlerde yüksek çözünürlüğe sahiptir; yine de soğurma, nüfuz etme hızıyla sınırlıdır. Formülasyon geçirgenliği veya mide-bağırsak süresini değiştirmiyorsa, sınıf I kriterleri uygulanabilir. Sınıf IV ilaçlar, düşük geçirgenliğe ve düşük çözünürlüğe sahiptir ve bağırsak yoluyla zayıf bir şekilde emilir; bu nedenle, yüksek değişkenlik ile zayıf biyoyararlanıma sahiptirler [40].

Kontrollü salım sistemleri günümüzde çok çeşitlenmiştir. En genel olarak salım şekillerine göre sınıflandırabiliriz:

#### **2.4.1.1 Osmosis Kontrollü Sistemler**

Osmoz, çözücünün yarı geçirgen zar boyunca daha düşük bir çözünen konsantrasyonundan daha yüksek bir çözünen konsantrasyonuna doğru hareket etme sürecini ifade eder [41]. Temel bir ozmotik pompanın basit tasarımında, yarı geçirgen bir zar içinde bir konsantre ilaç çözeltisi çekirdeği bulunur. Yarı geçirgen zar yoluyla çekirdeğe ozmotik olarak yürütülen su akışı, ilaç moleküllerini cihazın bir deliğinden diğer tarafa geçirmiş olur [42].

#### **2.4.1.2 Şişme Kontrollü Sistemler**

Şişme, çevreleyen sulu fazdan suyun emilmesi nedeniyle bir polimerik ortamın hacim artışı anlamına gelir [42]. Sulu bir çözeltide, su matrise nüfuz eder ve polimerin camsı geçiş sıcaklığı ortam sıcaklığının altına düşürülür. Bu, matrisi şişkin ve kauçuksu hale getirir, bu da şişmiş kauçuksu polimer matristen yavaş



ilaç difüzyonu ile sonuçlanır [41]. Sentetik ve doğal hidrojeller, ağırlıklarının birçok katı suyu emebilir [42].

#### **2.4.1.3 Difüzyon Kontrollü Sistemler**

Difüzyon, moleküllerin bir konsantrasyon gradienti boyunca taşınmasını ifade eder [42]. Difüzyon kontrollü salım sistemlerinde ilaçlar, suda çözünmeyen inert polimerik membranlar (rezervuar sistemleri) veya polimerik matrisler (monolitik sistemler) içinde tutulur ve difüzyon yoluyla salınır. İlaç salımı, Fick'in difüzyon yasalarına tabidir. Difüzyon kontrollü sistemlerde hız sınırlayıcı adım, ilaçların difüzyonudur [41].

Membran kontrollü sistemlerde ilaç, çekirdekte bir rezervuar olarak bulunur ve ince bir polimerik zarla kaplanır. Membran gözenekli veya gözeneksiz olabilir. İlaçların salınması, zardan difüzyonla gerçekleşir ve salınma hızı, zar kalınlığı, gözeneklilik ve ilaçların fizikokimyasal özellikleri (bölünme katsayısı, moleküler boyut ve yayılma, protein bağlama ve dozaj) tarafından yönetilir [41]. Matris kontrollü salım sistemlerinin basit tasarımında, polimer matrisi başlangıçta ilaçla homojen bir şekilde yüklenir ve hem ilaç deposu hem de hız kontrol basamağı olarak hizmet eder. Matris sistemleri levhalar, silindirler ve çubuklar gibi farklı geometrik yapılarda veya daha ayrıntılı tasarımlarda olabilir. Basit matris sistemlerinin imal edilmesi kolaydır, ancak genellikle azalan bir doz hızından muzdariptirler [42].

#### **2.4.1.4 Polimer Erozyonu ve Degredasyonu Kontrollü Sistemler**

Yüzey erozyonunda, polimerin kimyasal bağlarının bozunması, polimer matrisine su difüzyonundan daha hızlıdır ve bu nedenle erozyon, matrisin dış yüzeyinde sınırlıdır. Matris aşınırken, matrise dahil edilen ilaç eş zamanlı olarak salınır, yani yüzey erozyonu, ilacın fizikokimyasal özelliklerinden bağımsız olarak ilaç salımını kontrol eder. Bu nedenle, bu mekanizmanın avantajı, salım sisteminin erozyon özelliklerini uyarlayarak salım hızını değiştirmenin fizibilitesidir. Tipik olarak, kontrollü ilaç salımı için yüzey erozyon kontrollü mekanizma tercih edilir, çünkü ideal olarak doğrusal, sıfır dereceli salım kinetiğine izin verirken, kütle aşındırıcı matrislerden ilaç salım doğrusal olmayan kinetiğe uyar. Bu mekanizmanın zorluğu, dağıtım sisteminin özelliklerini ayarlamaktır, böylece ilacın difüzyonu

erozyon hızını aşmaz, aksi takdirde salım mekanizması yüzey erozyon kontrollüden difüzyon kontrollüye değişir [43].

Bozunma, kimyasal bağların bölünmesi olarak tanımlanır ve ilaç salımı, kütle aşındıran polimerler ve hidrojeller dahil olmak üzere ilaç dağıtım sistemlerinden bozunma ile kontrol edilebilir. Bununla birlikte, bozunma kontrollü salım genellikle difüzyon kontrollü salım ile bağlantılıdır ve bu nedenle tipik olarak tüm ilaç salım süreci boyunca tek salım mekanizması değildir. Örneğin, kütle aşındıran dağıtım sistemlerinden ilaç salımı tipik olarak üç faz gösterir: matris yüzeyinden hızlı ilaç difüzyonuna bağlı patlama fazı, difüzyonel salım fazı ve bozunma ve erozyon nedeniyle matrisin çökmesinden sonraki son hızlı salım fazı [43]. Biyobozunur proteinlerde (örneğin kollajen ve jelatin) ve polisakkaritlerde (kitosan ve aljinatlar gibi), bozunma genellikle enzimler tarafından gerçekleştirilir. Erozyon, polimerin yüzeyinden veya kütesinden veya ikisinin bir kombinasyonundan kaynaklanabilir. Aşınabilir cihazlar birden fazla mekanizma tarafından kontrol edilebilir (su ve ilaç difüzyonu, şişme, kimyasal bozunma veya polimerin çözünmesi gibi) ve bu işlemler arasındaki etkileşim sıfır dereceli salım kinetiğini oluşturabilir [42]. Örneğin, çapraz bağlı hidrojellerde, çapraz bağların bozunması ağ boyutunu büyütür ve böylece özellikle makromoleküllerin salınım hızını artırır, ilaç salınımını difüzyon veya şişme kontrollü salımdan bozunma kontrollü salıma değiştirir. Benzer şekilde, bozunma nedeniyle polimer ağının gevşemesi hem su alımını hem de polimer şişmesini arttırdığından, sonuç olarak ilaç salım hızı artar [43].

#### **2.4.1.5 Dış Etkenler ile Kontrollü Sistemler**

Bu sistemlerde ilaç salımı sıcaklık, pH, iyonik kuvvet, elektrik alanı, elektromanyetik radyasyon veya UV ışığı gibi dış uyaranlar tarafından kontrol edilir. Bu tür dış uyaranlara yanıt veren hidrojeller, değişkenin belirli bir kritik nokta etrafında dar bir şekilde değişmesi üzerine şiddetli konformasyonel değişikliklere uğrar. Polimere bağlı olarak, sistem bu çevresel faktörlerin herhangi birindeki bir değişiklik üzerine büzülebilir veya şişebilir. Duyarlı veya "akıllı" olarak da adlandırılan bu polimerlerin çoğu için, yapısal değişiklikler tersine çevrilebilir ve dış ortamdaki ek değişikliklerle tekrarlanabilir. İlaç dağıtımında uygulama bulan en ünlü ve üzerinde çalışılan duyarlı polimerlerden biri, vücut sıcaklığına yakın,

32°C'de suda düşük kritik çözelti sıcaklığı nedeniyle poli(N-izopropil akrilamid) olmuştur [42]. Uygulamalara örnek olarak plazma glikoz seviyesi verilebilir. Glikoz molekülüne yanıt veren insülin salınımında, glikoz veya yan ürünleri bir taşıma sisteminden insülin salınımını tetikler. Öte yandan poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm), +32°C'de hidrofilitikten hidrofobikliğe keskin bir değişim gösterdiğinden ve bu değişiklik ilaç salımını tetiklemek için kullanılabilirdiğinden, sıcaklığa duyarlı iyi bilinen bir polimer olarak gösterilmiştir [43].

#### **2.4.1.6 İyon Değişimi Kontrollü Sistemler**

İyon değişimi kontrollü ilaç salımı, karşı iyonların, taşıyıcının yüklü fonksiyonel gruplarına bağlı ilaç salımına dayanır. Bu değiş tokuşun hızı ve sonuç olarak ilaç salımının hızı ve kapsamı, karşı iyonların konsantrasyonuna ve bunların yüklü gruplara olan afinitesine bağlıdır [43].

### 3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Hidrojellerin Hazırlanması

Hidrojellerin hazırlanmasında sodyum aljinat (71238, Sigma Aldrich), jelatin tip B (G9391, Sigma Aldrich), glukonolakton (G2164, Sigma Aldrich) ve toz halde  $\text{CaCO}_3$  (239216, Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

%4'lük sodyum aljinat çözeltisi (w/v) ve %0,5'lik jelatin çözeltisi (w/v) distile su ile manyetik karıştırıcıda hazırlandı. Jelatin çözeltisinin pH'ı pH 7.4'e gelene kadar NaOH (%1, w/v) eklenerek nötrale edildi. Aljinat-jelatin hidrojeller 1:5 oranında olmak üzere çapraz bağlayıcıların (glukonolakton ve  $\text{CaCO}_3$ ) eklenmesiyle hazırlanmıştır [44]. Çizelge 3.1'de aljinat-jelatin hidrojel formülasyonları verilmiştir:

Gruplar	%4'lük Aljinat (w/v), ml	%0,5'lik Jelatin (w/v), ml	Glukonolakton (GDL), g	$\text{CaCO}_3$ , g
A	2	1	0,012	0,0024
B	2	1	0,024	0,0048
C	2	1	0,048	0,0096
D	4	1	0,024	0,0048
E	4	1	0,048	0,0096
F	4	1	0,096	0,0192

Çizelge 3.1. Hidrojelin formülasyonunu belirlemek için denenen aljinat-jelatin-çapraz bağlayıcı miktarları

### 3.1.1. Hidrojellerin Karakterizasyonu

#### 3.1.1.1. Faz ayrımı çalışmaları

Jellerin faz ayrımı gravimetrik olarak belirlendi (n=2). Jeller ependorf tüplerinde, toplam hacim 1 ml olacak şekilde hazırlandı (Şekil 3.1). İlk ağırlıkları tartıldı ve 10000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvı faz kibarca uzaklaştırıldı ve ependorflar tekrar tartıldı, makroskobik fotoğrafları çekildi [44].



Şekil 3.1. Faz ayrımı testi için ependorf tüplerde hazırlanan jeller

#### 3.1.1.2. Şişme ve Degredasyon Çalışmaları

Şişme ve değredasyon çalışmaları gravimetrik metotla çalışıldı. Beş mililitrelik tüplerde, 500 µl hacimde jeller hazırlandı (Şekil 3.2) ve tüp içerisindeki jeller tüpler ile birlikte tartıldı (n=3). Jellerin üzerlerine 3 ml PBS eklendi ve 37°C etüvde inkübe edildi. Bir saat sonra jellerin üzerindeki sıvı faz kibarca atıldı ve tüpler tartıldı. Tartım sonuçları "Formül 1" kullanılarak hesaplandı ve şişme verisi (%) olarak verildi [45].

**Formül 1:** Şişme (%) = 1 saat sonraki ağırlık/ilk ağırlık x100

Jellerin beş günlük, *in vitro* değredasyon çalışmaları yapıldı. Beş mililitrelik tüplerde, 500µl hacimde jeller hazırlandı (Şekil 3.2) ve tüp içerisindeki jeller tüpler ile birlikte tartıldı (n=3). Jellerin üzerlerine 3 ml PBS eklendi ve 37°C etüvde inkübe edildi. Beş gün boyunca jellerin üzerindeki sıvı faz kibarca atıldı ve jeller tartıldı. Tartım sonuçları "Formül 2" kullanılarak hesaplandı ve değredasyon sonuçları (%) değredasyon olarak verildi [45].

**Formül 2:** Belirlenen gün sonrası jellerin ağırlığı/1 saat inkübasyon sonrası ağırlık x100



Şekil 3.2. Şişme ve degradasyon çalışmaları için hazırlanan tüpler

### 3.1.1.3. Hidrojellerin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan jelin reolojik davranışı reometre cihazı (Malvern Kinexus Pro+, Japonya) ile belirlenmiştir. İki cm, düz, paralel plak geometri kullanılmıştır. Plakalar arası boşluk 1mm olarak belirlenmiştir. Her bir ölçümden önce “zero gap” kalibrasyonu yapılmıştır. Çalışmalar 37°C’de yapılmıştır. Jelin viskozitesi kayma hızı 0.1-100 s<sup>-1</sup> aralığında, 1 rad / s sabit frekansta belirlenmiştir. Jelin enjekte edilebilirliğini sorgulamak için artan frekansa (0,1–100 rad / s) karşı jelin viskozitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışmada kullanılmak üzere reoloji için seçilen formülasyon ilk gruptaki A jeli olmuştur. Totalde 5 ml A jeli silikon kalıba (Şekil 3.3) hazırlanıp artan frekansta vizkozite değerlendirmesi için Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi’ne (HÜNİTEK) gönderilmiştir.



Şekil 3.3. Silikon kalıp

### 3.1.2. FVIII Yüklü Hidrojellerin Hazırlanması ve FVIII Salım Çalışmaları

FVIII'in sodyum aljinat/jelatin hidrojelden salımının değerlendirilmesi üç tekrarlı çalışılmıştır ve izlenen adımlar şöyledir:

- Cam tüplerin içerisine 66 µl sodyum aljinat eklenmiştir.
- Cam tüpe sırayla 34 µl jelatin, 0,012 g GDL ve 0,0024 g CaCO<sub>3</sub> eklenip vorteksenerek, çapraz bağlayıcı maddeler hazırlanmıştır.
- Ardından laminar flowda sodyum aljinat içeren tüplere 40 µl FVIII (REFACTO® AF) eklenmiş ve seri halde vorteksenerek homojen hale gelmesi sağlanmıştır.
- Sodyum aljinat + FVIII karışımını içeren tüplere, çapraz bağlayıcılar eklenmiş ve tekrar vorteksenerek homojen hale gelmesi sağlanmıştır.
- Hazırlanan karışım 30 dakika boyunca 37°C etüvde bekletilmiştir.
- Sonrasında her tüpe 2 ml PBS eklenip üstleri parafilmle kapatılmıştır (Şekil 3.4) ve tekrar etüve kaldırılmıştır.
- 24., 48. ve 72. saatlerde 200 µl'lik örnekler alınıp ependorflara konmuştur ve örnek alımı sonrası 200 µl taze PBS eklenerek etüve kaldırılmıştır. Alınan örnekler analize kadar -80°C' bekletilmiştir.



Şekil 3.4. Salım çalışması için hazırlanan tüpler

### 3.2. Koriyoallantoyik Membran (CAM) Modeli

Tarım Bakanlığı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden alınan Atak cinsi embriyolu yumurtalar sabit 38°C ve otoklavlanmış distile suyla sağlanan % 70-82 nem aralığındaki ve her set öncesi %1'lik zefiranla steril edilen inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılan cerrahi aletler de otoklavlanarak steril edilmiştir. Deney sırasında kullanılacak malzemeler hazırlanmıştır (Şekil 3.5A). Alınan yumurtalar önceden UV ile steril edilen yumurta kartonlarında inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5B).

Embriyonik gelişimin üçüncü gününde steril enjektör yardımıyla 2-3 ml albumin alınıp, alınma yeri parafilmle kapatılmıştır. Embriyonik gelişimin dördüncü gününde ışık kaynağına tutularak embriyo varlığı kontrol edilen yumurtalarda steril bistüri ile kabuk üzerinde yaklaşık 2x3 mm'lik pencere açılmıştır (Şekil 3.6) ve açılan bölge parafilmle kapatılarak inkübatörde gelişmeye devam ettirilmiştir. Canlı olmayan embriyolar imha edilmiştir. Çizelge 3.2'de belirtilen deney gruplarına göre uygulamalar yapılmıştır. Uygulamalar sırasında fotoğraflar çekilmiş ve sıfırinci saat olarak verisi olarak belirlenmiştir. Uygulamadan 72 saat sonra koriyoallantoyik membran tekrar fotoğraflanarak Image J programı ile değerlendirilmek üzere bilgisayara aktarılmıştır.

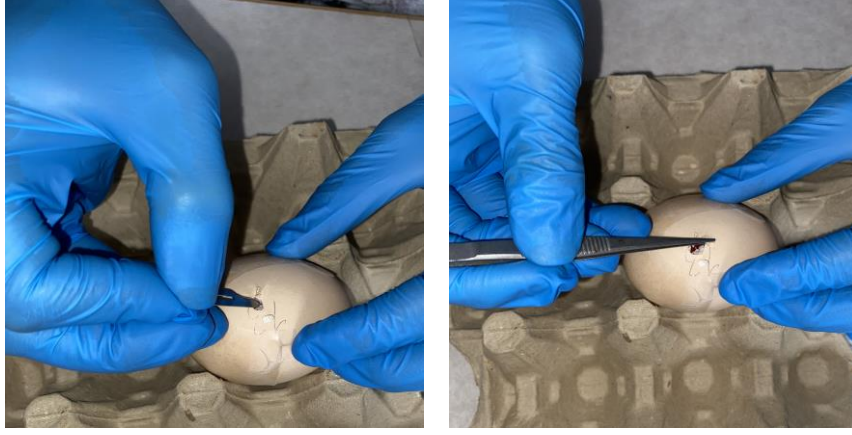


A

B

Şekil 3.5. A: CAM deneyi için masa hazırlığı, B: Yumurtaların inkübasyondaki görüntüsü





Şekil 3.6. Yumurta kabuğu açma ve genişletme

Negatif kontrol grubu (n=6)	-
Boş hidrojel grubu (n=6)	50 µl
FVIII grubu (n=6)	20 µl
FVIII yüklü hidrojel grubu (n=6)	50 µl

Çizelge 3.2. Çalışmada belirlenen deney grupları

Çalışmada deneysel olarak FVIII için ilk doz 40 µl olarak belirlenmiştir; ancak 40 µl uygulanan embriyolarda canlılık sağlanamamıştır. Sonrasında 5, 10 ve 20 µl denenmiş ve deneylere 20 µl FVIII ile devam edilmiştir.

### 3.3. İstatistiksel Analizler

FVIII salım çalışmalarında ve vaskülerizasyonda gruplar arası farkların belirlenmesinde t testi ile çalışılarak p-değerleri 0,05'den az olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

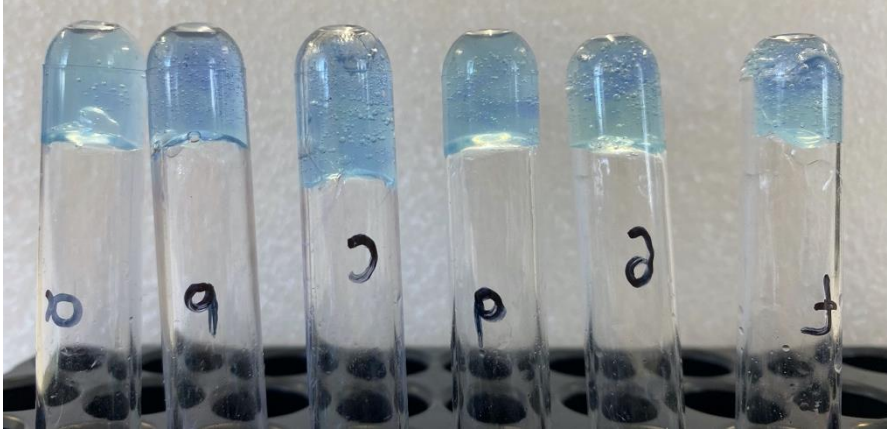
## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Hidrojeller

#### 4.1.1. Hidrojellerin Karakterizasyonu

##### 4.1.1.1. Makroskobik İzlenimler

Jellerin homojenliğinin değerlendirilmesi için hidrojel formülasyonlarına 20 µl metilen mavisi eklendi ve jeller hazırlandı (Şekil 4.1). Makroskobik izlenimler sonucunda, A grubu dışında diğer gruplarda polimerce zengin ve polimerce fakir alanların oluştuğu ve jellerin homojen olmadığı saptandı.

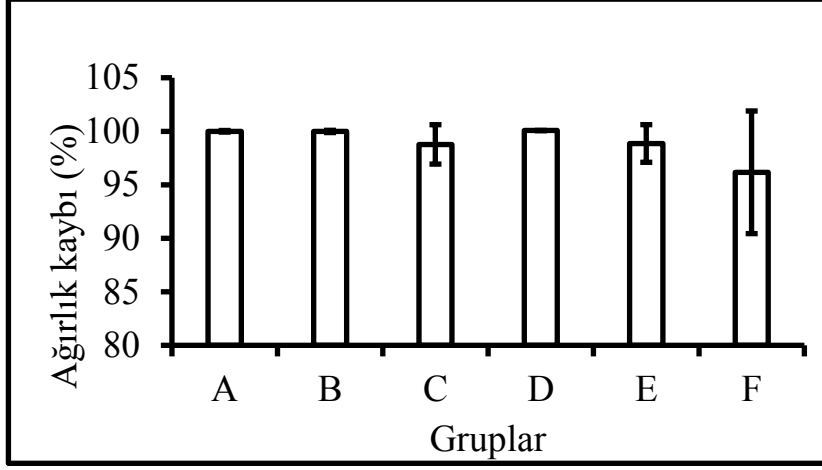


Şekil 4.1. Metilen mavisi içeren jellerin makroskobik görüntüleri

##### 4.1.1.2. Faz Ayrımı Çalışmaları

Jellerin faz ayrılması gravimetrik ve görsel incelemeler ile belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, faz ayrımının F grubunda en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Aynı zamanda standart sapmanın F grubunda çok yüksek olduğu saptanmıştır.

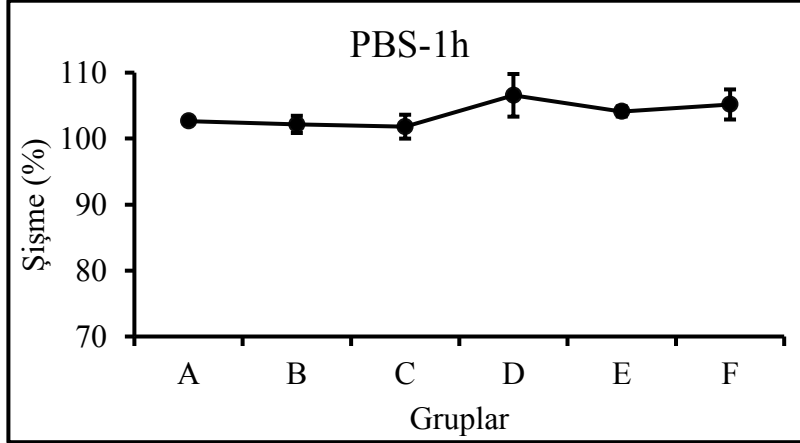
Sonuçlar incelendiğinde jellerde jelatin ve çapraz bağlayıcı konsatrasyonu arttıkça bir miktar faz ayrımı olduğu görüldü. Bu sonuçlar homojenite sonuçları ile örtüşmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.2. Faz ayrımı sonrası elde edilen grafik

#### 4.1.1.3. Şişme ve Degredasyon Çalışmaları

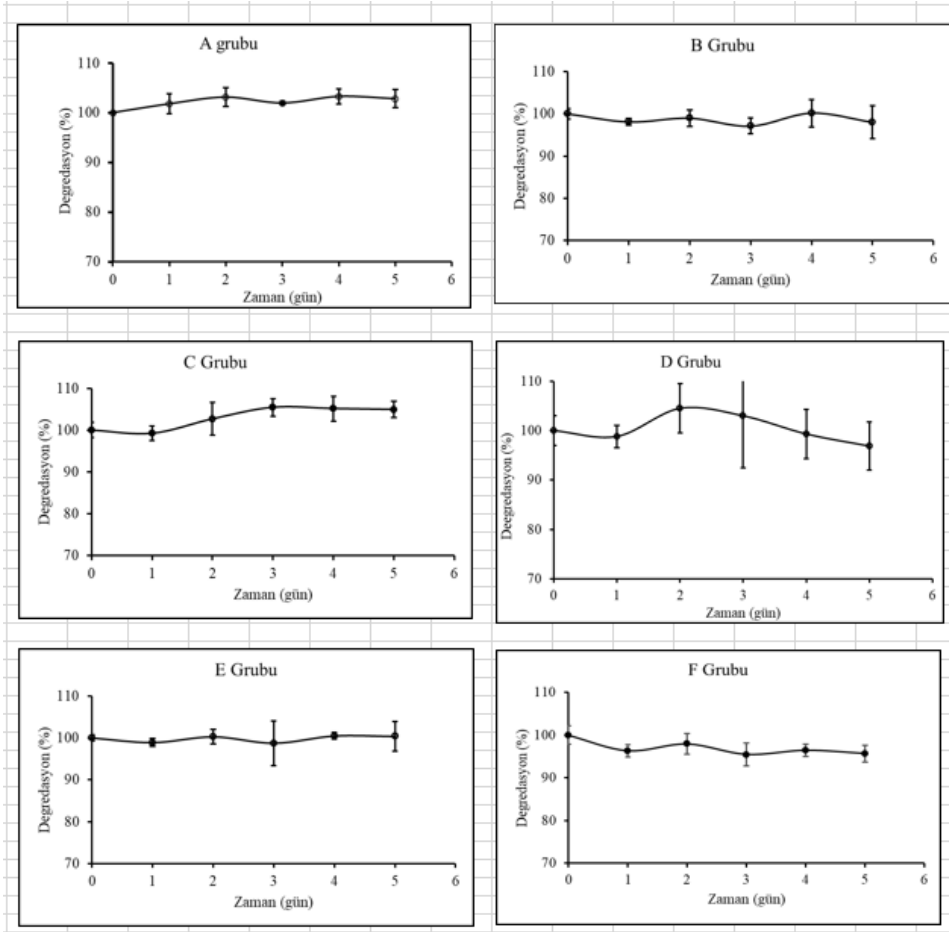
Şişme ve degradasyon çalışmaları gravimetrik yöntemle yapılmıştır. Çalışmalarda ilk ölçüm sonuçları normalize edilmiştir ve %100 olarak kabul edilmiştir. Günlere göre yapılan çalışmalar ilk ölçümler dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Jellerin şişme özellikleri incelendiğinde D grubunun (%106,6  $\pm$  3,2) en yüksek şişme oranına sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte grupların tamamında anlamlı bir şişme görülmemiştir ( $P > 0.05$ ).



Şekil 4.3. Jellerin bir saat boyunca PBS'de bekledikten sonraki şişme grafikleri

Jellerin beş günlük degradasyon süreleri incelenmiştir (Şekil 4.4). Grupların beşinci gün degradasyonları karşılaştırıldığında F grubunun yaklaşık %5 ağırlık kaybettiği ve bu degradasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ). Diğer grupların anlamlı bir ağırlık kaybının olmadığı saptanmıştır.

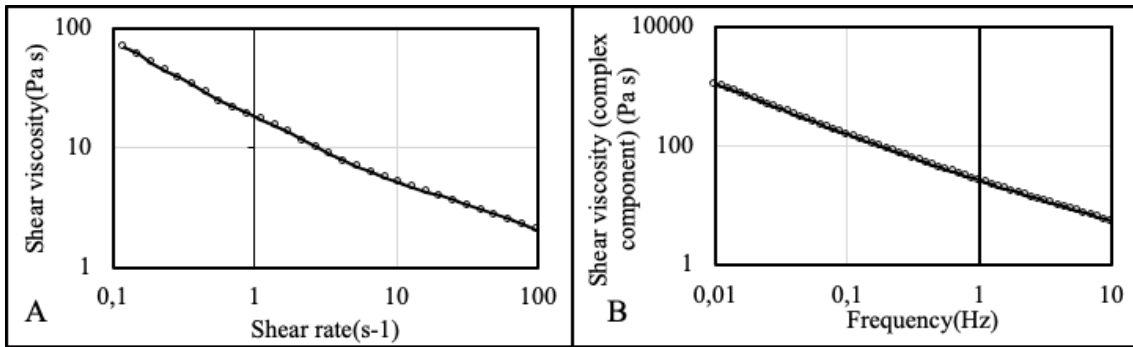
A, B, C grup formülasyonlarında aljinat/jelatin oranı 2:1 iken (w/w), D, E, F gruplarında aljinat/jelatin oranı 4:1'dir (w/w) (Çizelge 3.1). Aynı zamanda çapraz bağlayıcı konsantrasyonu en düşük grup A grubu iken en yüksek çapraz bağlayıcıya sahip grup F grubudur. Bu bağlamda şişme ve degradasyon sonuçları irdelendiğinde jellerdeki aljinat ve çapraz bağlayıcı oranı arttıkça jellerin daha kırılğan, şişmeye ve degradasyona daha yatkın olduğu görülmektedir. Faz ayrımı çalışmaları sonuçları da paralel bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.4. Tüm hidrojel gruplarının beş gün boyunca degradasyon grafikleri

#### 4.1.1.4. Hidrojellerin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan hidrojin viskoelastik özellikleri, enjekte edilebilirliğini ve viskozitesini değerlendirmek için yapılmıştır. 1 rad / s sabit frekansta yapılan viskozite çalışmasında jelin viskozite değerinin kayma hızı ( $0.1-100 \text{ s}^{-1}$ ) arttıkça azaldığı görülmüştür. Düşük kayma hızında kompozit hidrojin yüksek viskozite değeri, polimer zincirlerinin ağsı yapısı ve iyonik çapraz bağlanmadan meydana gelmektedir. Kayma hızının arttıkça, uygulanan kuvvet polimer zincirlerinde stese neden olmuş ve fibriller ağ açılmıştır. Bu azalma jelin pseudoplastik özelliği sergilediğini göstermektedir [46]. Jelin artan frekansa karşı kompleks viskozitesi belirlenmiştir. Grafik incelendiğinde artan frekansa karşı jelin kompleks viskozitesinin bariz şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu durum artan strese karşı iyonik çapraz bağlı da olsa jelin fibrillerinin daha akışkan hale geldiğini göstermektedir. Bu durum bir jelin enjekte edilebilirliği ile paraleldir [47]. Uri Soiberman ve meslektaşları hazırladıkları hidrojin enjekte edilebilirliğini artan artan frekansa karşı kompleks viskozitesi üzerinden incelemiştir ve artan frekansa karşı hazırdıkları jelin viskozitesinin azaldığını saptamıştır [48].

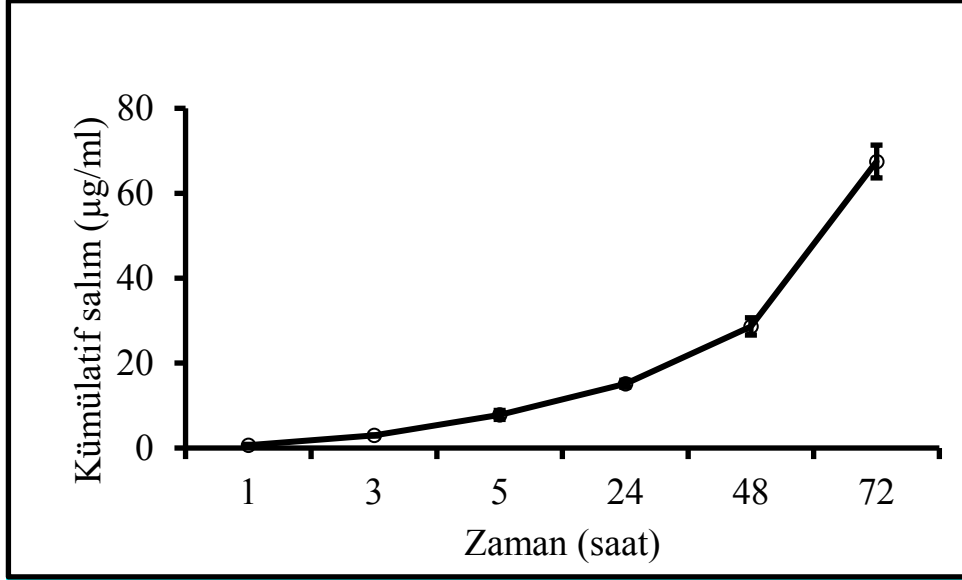


Şekil 4.5. Jelin viskozite (A) ve artan frekansa karşı kompleks viskozite (B) grafikleri (Cihaz: Malvern Kinexus Pro+, Japonya).

#### 4.1.2. FVIII Salım Çalışmaları

Anjiyogenez çalışmalarında hidrojinler hedef bölgeye enjekte edilebilir veya implante edilebilir. Hidrojellerin anjiyogeneze etkisinde iki yoldan bahsedilebilir. Birinci yolda hidrojele büyüme faktörü gibi anjiyogenezi indükleyen bir aracı molekül yüklenebilir ve bu aracı molekülün anjiyogenezi indüklemesi sağlanabilir.

İkinci yolda ise hidrojel endotel ve endotel öncül hücrelerinin üzerinde kültüre olabileceği bir matriks olarak kullanılabilir [50]. Lie ve arkadaşları enjekte edilebilir, heparin ve VEGF yüklü jelatin hidrojelin etkinliğini farelerde test etmiş ve hazırladıkları hidrojelin anjiyogenezi uyardığını saptamışlardır [51].



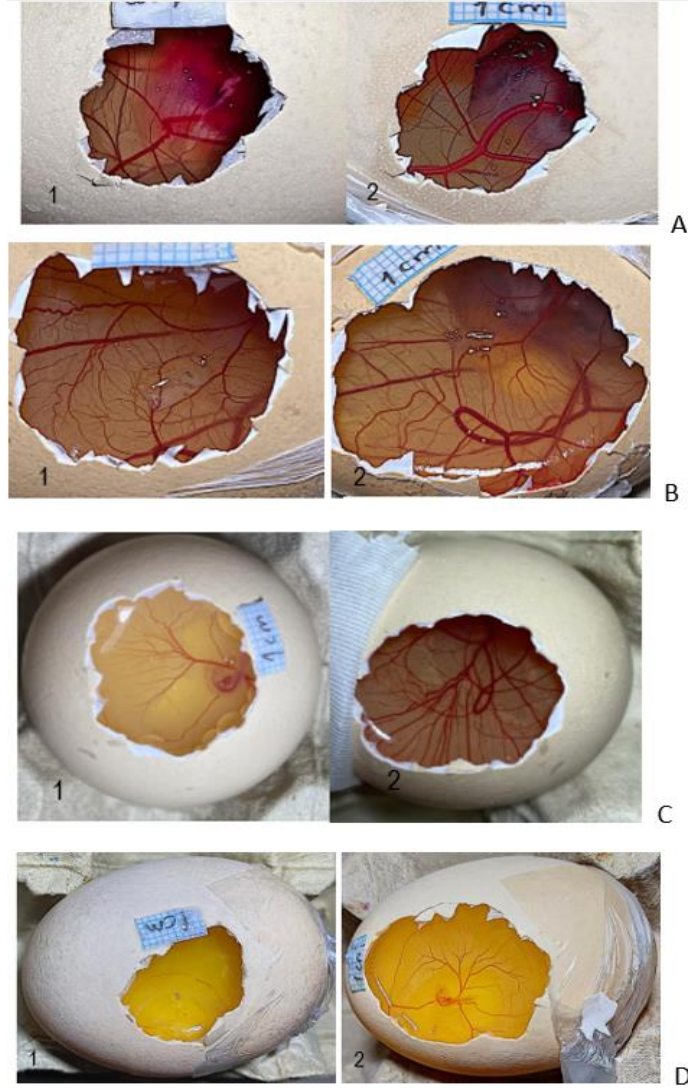
Şekil 4.6. Salım çalışması sonucu elde edilen grafik

Tez kapsamında hazırlanan jelatin-aljinat hidrojellere FVIII yüklenmiş ve 72 saatlik salım profili üç tekrarlı çalışılarak belirlenmiştir. Şekil 4.6'da hidrojelden salınan FVIII'in kümülatif salım profili verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde hidrojelden ani bir salımın olmadığı, zamana bağlı olarak salımın arttığı görülmüştür ( $P<0.05$ ). Bir saatte  $0,67\pm 0,19$  µg/ml; 24 saate  $15,1\pm 0,82$  µg/ml ve 72 saate  $67,47\pm 3,9$  µg/ml FVIII'in salındığı görülmüştür. Özellikle beş saatten sonra salım hızının arttığı belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında; Mi Sun Kim ve arkadaşları ürettikleri adipik dehidrazid ile çapraz bağlı, FGF-2 ve PDGF-BB yüklü hyaluronik asit-kolajen hidrojelden ilk 24 saatte hızlı salımın gerçekleştiğini saptamışlardır [52]. K.W. Lee ve meslektaşları anjiyogenesiste kullanılmak üzere hazırladıkları VEGF yüklü aljinat-kitosan hidrojelin beş gün içerisinde VEGF'nin %90'ını saldıgını belirlemişlerdir [51]. Zhe Li ve arkadaşları ise anjiyogeneze kullanılmak üzere hazırladıkları EDC/NHS aktivasyonu ile çapraz bağlı jelatin hidrojelin, yüklenen VEGF'in %81'ini 24 saat içerisinde saldıgını görmüşlerdir [54].

## 4.2. Koriyoallantoyik Membran (CAM) Modeli

Yapılan çalışmada negatif kontrol grubu, boş hidrojel grubu, FVIII grubu ve FVIII yüklü hidrojel grubu olarak gruplar belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Başlangıçta tüm yumurtaların damarlanma sayıları sayılmış ve normalizasyon için başlangıç sayıları %100 kabul edilmiştir. Negatif kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmamış ve hiçbir madde verilmemiştir.

Yapılan çalışmada yumurtalara etken madde uygulanmadan önce damarlar sayılmış ve %100 kabul edilmiştir. Daha sonra aktif maddeler uygulanmış ve yumurtalar 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra damarlanma tekrar sayılmıştır. Damarlanmadaki sayısal değişimler; dallanma sayıları ve damar kavşak noktaları dikkate alınarak Image J programındaki "cell counter" eklentisiyle manuel olarak sayılmıştır (Şekil 4.8). İstatistiksel analizler t test kullanılarak yapılmıştır.

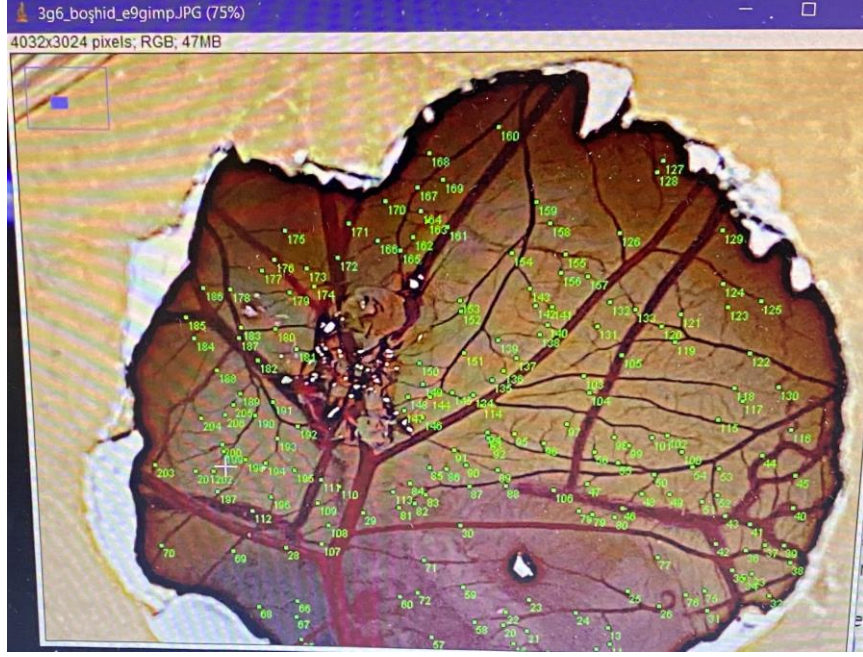


Şekil 4.7. Deney gruplarının uygulama öncesi (1) ve uygulama sonrası (2) fotoğrafları. A; Negatif kontrol, B; Boş hidrojel, C; FVIII, D; FVIII yüklü hidrojel.

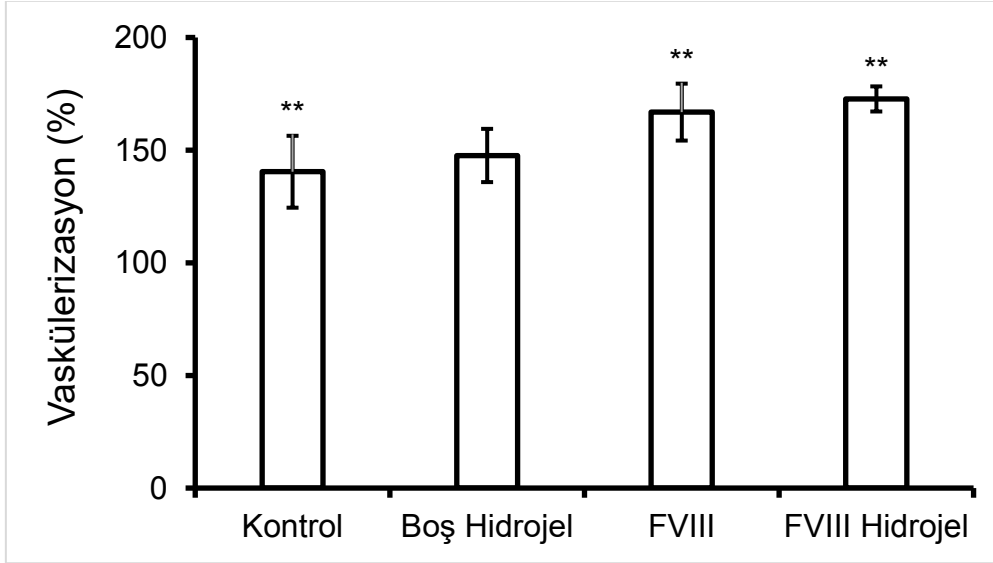
Vaskülerizasyon sonuçları incelendiğinde kontrol grubu (Şekil 4.7A) ile karşılaştırıldığında grupların tamamında vaskülerizasyonun arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte boş hidrojel grubundaki (Şekil 4.7B) vaskülerizasyon artışının anlamlı olmadığı ( $P>0.05$ ), diğer gruplardaki artışın kontrol grubuna göre anlamlı olduğu saptanmıştır ( $P<0.05$ ).

FVIII yüklü hidrojel grubunda vaskülerizasyonun boş hidrojel ve serbest FVIII grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.7C ve Şekil 4.7D). FVIII yüklü hidrojel grubundaki yükseklik serbest hidrojel grubuna göre anlamlı bulunmazken ( $P>0.05$ ), boş hidrojel grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ).





Şekil 4.8. Image J ile damarların sayılması



Şekil 4.9. Deney gruplarının yüzde (%) damarlanma sayısı. Grupların hepsinde damarlanma artışı görülmüştür. Ancak boş hidrojel grubundaki artış istatistiksel anlamlı değilken, diğer gruplardaki artış anlamlı görülmüştür.

\*\*; P<0.05

## 5.TARTIŞMA

FVIII koagülasyonda intrinsik yolağın önemli bir parçası olan bir pıhtılaşma faktörüdür. Eksikliğinde insanlarda hemofili A adıyla bilinen pıhtılaşma bozukluğuna neden olmaktadır. Literatüre bakıldığında FVIII'in endotel hücreleri üzerindeki bilinmeyen olası rollerinin araştırılmaya başlandığı, ancak anjiyogenez ilişkisini doğrudan araştıran çalışmaların çok olmadığı görülmektedir [52]. Bununla birlikte, henüz bilinmeyen veya netliğe kavuşmayan bilgiler mevcuttur. Örneğin bir çalışmada vWF'nin anjiyogenezde regülatör ve belirteç olduğu ancak FVIII ile bağlantılı olmadığı belirtilmiştir [3]. Bir başka yayında ise hemofili A hastalarından alınan endotel hücrelerinde *in vitro* çalışmada göç potansiyeli, tübülogenez ve damar geçirgenliğinde zayıflama gözlenmiştir, ayrıca sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında bazı genlerin aşağı regüle olmasıyla endotel hücre stabilitesinin bozulduğu belirtilmiştir [53]. Buradan yola çıkılarak FVIII'in endotel hücrelerin sağlıklı fenotipte ve fizyolojik işlevde bulunması açısından önemli olduğu sonucuna varılabilir. Ek olarak FVIII'in proanjiyogenik bir faktör olduğu belirtilmiştir [54]. Tüm bu çalışmalar ışığında sunulan tez çalışması kapsamında FVIII'in anjiyogeneze olası doğrudan etkisi araştırılmak istenmiştir. Bu amaç doğrultusunda model olarak anjiyogenez çalışmalarında uygulama çeşitliliği ve gözlenebilirlik açısından son derece uygun olan koriyoallantoyik membran modeli (CAM) kullanılmıştır. Ayrıca FVIII'in süreli etkisini değerlendirmek için sodyum aljinat-jelatin hidrojeller hazırlanmıştır. Jeller glukonolakton ve CaCO<sub>3</sub> ile fiziksel çapraz bağlanmıştır. Sodyum aljinat ile hazırlanan jeller için bazı çalışmalarda kalsiyum klorür kullanılmaktadır. Örneğin bir çalışmada intervertebral disk için çapraz bağlayıcı olarak kalsiyum klorür kullanılmıştır [55]. Çalışmada CaCO<sub>3</sub>, jelin mekanik dayanımının iyi olması açısından tercih edilmiştir. Örneğin bir çalışmada çapraz bağlayıcı ajan olarak CaCO<sub>3</sub>'ün eklenmesinin mekanik dayanımı artırırken aynı zamanda jelin esnekliğini koruduğunu belirtmiştir [56]. Hidrojelin hazırlanması sürecinde çapraz bağlayıcı miktarları açısından altı farklı konsantrasyon denenmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça jelin kırılma enerjisi, sertleştiği ve dolayısıyla enjekte edilebilir yapısında bozulmalar olduğu görülmüştür. Literatürde de çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça daha sert yapıda jeller oluştuğu belirtilmiştir [57]. Bu sonuçlarla uyumlu olarak en az çapraz bağlayıcı içeren formül olan A grubu jeller seçilmiştir. 2:1 oranda hazırlanan aljinat jeller

enjekte edilebilirlik bakımından daha iyi özellikte olmuştur [58]. Ayrıca biyouyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve su içeriği gibi özellikleriyle sodyum aljinat tercih edilmiştir[46].

Çalışma doğrultusunda yumurtalara boş hidrojel, FVIII ve FVIII yüklü hidrojeller uygulanmıştır. Deney süresi olarak uygulama yapılan gün sıfırıncı saat olarak belirlenip 72 saat sonunda koriyoallantoyik membran fotoğraflanarak Image J programıyla damarlanma sayısındaki değişim değerlendirilmiştir.

Literatürde doku mühendisliği, toksikoloji, kanser araştırmaları ve ilaç izleme çalışmaları gibi pek çok alanda CAM modeli uygun bir çalışma metodu sağlamaktadır ve modelin kullanıldığı fazla sayıda çalışma mevcuttur [59][60][61][62]. Modelin avatajları arasında öncelikle temel düzeyde ekipman gerektirmesi ve embriyolu yumurtaların, hücre kültürü ekipmanları, hücre hatları ve hayvan çalışmalarının yanında daha ulaşılabilir olması söylenebilir [63]. Bunun yanısıra çoğunlukla etik izin gerektirmemesi ise çalışmayı kolaylaştıran bir başka avantajı olarak ifade edilebilir [64]. Ancak modelin bazı kısıtlamaları da bulunmaktadır. Öncelikle koriyoallantoyik membran oldukça ince, hassas ve yumurta zarına bitişik olarak bulunmaktadır. Çalışma sırasında zedelenmesi görece kolay olabilmektedir. Zedelenme sonucunda kanamalar meydana gelebilmektedir; bu embriyo canlılığını ve dolayısıyla çalışmanın verimini kısıtlamaktadır. Yumurtanın iç hacmi nedeniyle yumurta zarına ve kabuğuna yakın duran membranın zardan ayrılması ve daha ulaşılabilir olması için çoğunlukla yumurtanın geniş ucundan steril enjektör yardımıyla bir miktar albumin alınması gerekmektedir. Bu konuda farklı uygulamalar yapılmaktadır. Bazı protokollere göre albumin alınmasında miktarlar bile değişkenlik gösterirken, bazı yayınlarda ise albumin alma uygulaması embriyo canlılığını olumsuz etkileyen bir parametre olarak belirtilmektedir [65][66]. Bu modelin kullanımında ayrıca farklı araştırma ekipleri farklı protokoller geliştirmişler ve uygulamışlardır [67]. Örneğin inkübasyon koşulları her çalışma için sabit değildir ve laboratuvaradan laboratuvara değişmektedir. Bu durum literatürde çok çeşitli protokollerin uygulanmasına bağlı olarak CAM modeli için standardizasyon problemini düşündürmektedir. 2023 yılında *Cancers* dergisinde yayınlanan bir makalede halen bilimsel topluluklarda kanser çalışmalarında *in vivo* hayvan

modellerinin CAM modeli yerine tercih edildiği ve bunun en önemli nedeninin uluslararası uyum ve modelin çalışıldığı laboratuvarların çok farklı olması nedeniyle standardizasyonun çok düşük seviyede olması; farklı bir açıdan ise fare deneyleri ve CAM modelinin bir karşılaştırmasının olmaması olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte aynı makalede, CAM modelinin *in vitro* alışmalar ve *in vivo* hayvan çalışmaları arasında ara bir basamak olabileceği belirtilmiştir [68].

Yapılan alışma ile FVIII'in pro-anjiyogenik etkisi belirli bölge sınırlarında oluşan damarlanmanın sayılması ile ölçülmüştür. Sayımda damar dallanmaları ve kavşak noktaları ve mikrodamarlar da dikkate alınmıştır. Tez alışması kapsamında ilk olarak 40 µl olarak belirlenen FVIII dozunun uygulanması embriyo canlılığını olumsuz etkilemiş gibi görülmektedir. Bu nedenle özellikle morfolojik olarak anlamlı olmayan artışların moleküler seviyede incelenmesi ile FVIII için dozaj aralığının belirlenebileceği düşünölmektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre FVIII'in damarlanmayı arttırdığı görölmüştür. Özellikle FVIII yüklü hidrojinin anjiyogenez üzerinde anlamlı derecede arttırıcı etkide bulunduğu görölmüştür. Ancak, daha kesin sonuçların elde edilebilmesi için daha detaylı *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* alışmaların sonuçlarının bir araya getirilmesi [7] ve CAM'dan alınan doku üzerinde moleküler düzeyde anjiyogenezle ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi ve immünohistokimyasal değerlendirmelerin yapılması gerektiği düşünölmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] S. Y. Yoo and S. M. Kwon, "Angiogenesis and its therapeutic opportunities," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, no. 1, 2013, doi: 10.1155/2013/127170.
- [2] J. Rouwkema and A. Khademhosseini, "Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 9, pp. 733–745, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.03.002.
- [3] B. Samuelson Bannow *et al.*, "Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis," *Blood Rev.*, vol. 35, pp. 43–50, May 2019, doi: 10.1016/J.BLRE.2019.03.002.
- [4] "How does the blood circulatory system work? - InformedHealth.org - NCBI Bookshelf." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279250/> (accessed Feb. 21, 2023).
- [5] M. Kamei and S. A. Health, "Molecular distinction between arteries and veins," no. November 2003, 2014, doi: 10.1007/s00441-003-0771-8.
- [6] "Circulatory system: Structure, function, parts, diseases | Kenhub." <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/circulatory-system> (accessed Aug. 28, 2022).
- [7] A. P. Michael W. Irvin, Andries Zijlstra, John P. Wikswo, "Techniques and assays for the study of angiogenesis," vol. 239, no. 11, pp. 1476–1488, 2015, doi: 10.1177/1535370214529386.Techniques.
- [8] M. Jahani, D. Rezazadeh, P. Mohammadi, A. Abdolmaleki, A. Norooznezhad, and K. Mansouri, "Regenerative Medicine and Angiogenesis; Challenges and Opportunities," *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 10, no. 4, p. 490, 2020, doi: 10.34172/APB.2020.061.
- [9] A. E. By Bhanu Nandan, E. Bhoje Gowd, Nadja C. Bigall and M. S. Petr Formanek, Paul Simon, "Biointerface Research in Applied Chemistry comparative study," vol. 6, no. 3, pp. 1185–1189, 2016.
- [10] S. M. Bhat *et al.*, "REVIEW-CANCER RESEARCH 3D tumor angiogenesis

- models: recent advances and challenges,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 147, no. 3, pp. 3477–3494, 2021, doi: 10.1007/s00432-021-03814-0.
- [11] D. Hielscher, C. Kaebisch, B. J. V. Braun, K. Gray, and E. Tobiasch, “Stem Cell Sources and Graft Material for Vascular Tissue Engineering,” *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 14, no. 5, pp. 642–667, 2018, doi: 10.1007/s12015-018-9825-x.
- [12] A. N. Makanya, I. Dimova, T. Koller, B. Styp-Rekowska, and V. Djonov, “Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis,” *PLoS One*, vol. 11, no. 4, p. e0152821, Apr. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0152821.
- [13] D. Ribatti, B. Nico, A. Vacca, and M. Presta, “The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay,” *Nat. Protoc.* 2006 11, vol. 1, no. 1, pp. 85–91, Jun. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.13.
- [14] V. Hamburger and H. L. Hamilton, “A series of normal stages in the development of the chick embryo,” *J. Morphol.*, vol. 88, no. 1, pp. 49–92, Jan. 1951, doi: 10.1002/JMOR.1050880104.
- [15] D. C. Kennedy, B. Coen, A. M. Wheatley, and K. J. A. McCullagh, “Microvascular experimentation in the chick chorioallantoic membrane as a model for screening angiogenic agents including from gene-modified cells,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 1, 2022, doi: 10.3390/ijms23010452.
- [16] S. Rezzola *et al.*, “Angiogenesis-Inflammation Cross Talk in Diabetic Retinopathy: Novel Insights From the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane/Human Vitreous Platform,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. September, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.581288.
- [17] A. Thompson, “Structure and Function of the Factor VIII Gene and Protein.”
- [18] T. J. S. Lopes, R. Rios, T. Nogueira, and R. F. Mello, “Protein residue network analysis reveals fundamental properties of the human coagulation factor VIII,” *Sci. Rep.*, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-92201-3.
- [19] N. A. Turner and J. L. Moake, “Factor VIII is synthesized in human

- endothelial cells, packaged in weibel-palade bodies and secreted bound to ULVWF strings,” *PLoS One*, vol. 10, no. 10, pp. 1–28, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0140740.
- [20] N. A. Turner and J. L. Moake, “Factor VIII Is Synthesized in Human Endothelial Cells, Packaged in Weibel-Palade Bodies and Secreted Bound to ULVWF Strings,” *PLoS One*, vol. 10, no. 10, Oct. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0140740.
- [21] J. Pan *et al.*, “Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo,” *Blood*, vol. 128, no. 1, pp. 104–109, 2016, doi: 10.1182/blood-2015-12-684688.
- [22] B. Samuelson Bannow *et al.*, “Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis,” *Blood Rev.*, vol. 35, pp. 43–50, 2019, doi: 10.1016/j.blre.2019.03.002.
- [23] W. G. Chang and L. E. Niklason, “OPEN A short discourse on vascular tissue engineering,” *npj Regen. Med.*, no. January, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1038/s41536-017-0011-6.
- [24] S. Saberianpour, M. Heidarzadeh, M. H. Geranmayeh, H. Hosseinkhani, R. Rahbarghazi, and M. Nouri, “Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using biomaterials,” *J. Biol. Eng.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1186/s13036-018-0133-4.
- [25] J. A. Eble and S. Niland, “The Extracellular Matrix of Blood Vessels,” pp. 1385–1400, 2009.
- [26] L. L. M. and T. W. Hatem Jouda, “Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications,” 2016, pp. 113–126.
- [27] D. M. Radulescu, I. A. Neacsu, A. M. Grumezescu, and E. Andronescu, “New Insights of Scaffolds Based on Hydrogels in Tissue Engineering,” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 4, pp. 1–30, 2022, doi: 10.3390/polym14040799.
- [28] J. M. Alonso, J. Andrade, R. P. Gonzalez, and V. Saez-martinez, “Injectable Hydrogels : From Laboratory to Industrialization,” 2021.

- [29] F. Z. Kocak, A. C. S. Talari, M. Yar, and I. U. Rehman, "In-situ forming pH and thermosensitive injectable hydrogels to stimulate angiogenesis: Potential candidates for fast bone regeneration applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 5, pp. 1–26, 2020, doi: 10.3390/ijms21051633.
- [30] J. Feng, M. Xing, W. Qian, J. Qiu, and X. Liu, "An injectable hydrogel combining medicine and matrix with anti-inflammatory and pro-angiogenic properties for potential treatment of myocardial infarction," *Regen. Biomater.*, vol. 10, no. April, 2023, doi: 10.1093/rb/rbad036.
- [31] Y. Ding *et al.*, "An Injectable Nanocomposite Hydrogel for Potential Application of Vascularization and Tissue Repair," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 48, no. 5, pp. 1511–1523, 2020, doi: 10.1007/s10439-020-02471-7.
- [32] Y. Wang, R. K. Kankala, C. Ou, A. Chen, and Z. Yang, "Advances in hydrogel-based vascularized tissues for tissue repair and drug screening," *Bioact. Mater.*, vol. 9, no. June 2021, pp. 198–220, 2022, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.07.005.
- [33] S. Antonio *et al.*, "Characterization of Sodium Alginate Hydrogels Reinforced with Nanoparticles of Hydroxyapatite for Biomedical Applications," *Polymers (Basel)*, 2021.
- [34] F. Abasalizadeh *et al.*, "Erratum: Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting (Journal of Biological Engineering (2020) 14: 8 DOI: 10.1186/s13036-020-0227-7)," *J. Biol. Eng.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–22, 2020, doi: 10.1186/s13036-020-00239-0.
- [35] R. Andrezza, A. Morales, S. Pieniz, and J. Labidi, "Gelatin-Based Hydrogels: Potential Biomaterials for Remediation," *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 4, pp. 1–12, 2023, doi: 10.3390/polym15041026.
- [36] J. Skopinska-Wisniewska, M. Tuszyńska, and E. Olewnik-Kruszkowska, "Comparative study of gelatin hydrogels modified by various cross-linking agents," *Materials (Basel)*, vol. 14, no. 2, pp. 1–17, 2021, doi: 10.3390/ma14020396.



- [37] F. Rizzo and N. S. Kehr, "Recent Advances in Injectable Hydrogels for Controlled and Local Drug Delivery," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–26, 2021, doi: 10.1002/adhm.202001341.
- [38] S. Almawash, S. K. Osman, G. Mustafa, and M. A. El Hamd, "Current and Future Prospective of Injectable Hydrogels — Design Challenges and Limitations," 2022.
- [39] Y. H. Yun, B. K. Lee, K. Park, and W. Lafayette, "Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation," pp. 2–7, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.005.Controlled.
- [40] M. S. Ku, "Use of the Biopharmaceutical Classification System in Early Drug Development," *AAPS J.*, vol. 10, no. 1, p. 208, 2008, doi: 10.1208/S12248-008-9020-0.
- [41] S. R. Shivakalyani Adepu, "Controlled Drug Delivery Systems : Current Status and Future Directions," 2021.
- [42] M. Sanopoulou and K. G. Papadokostaki, "Controlled drug release systems: Mechanisms and kinetics," *Biomed. Membr. (Bio)artificial Organs*, pp. 1–33, 2017, doi: 10.1142/9789813223974\_0001.
- [43] G. Liu, H. Zhou, H. Wu, R. Chen, and S. Guo, "Preparation of alginate hydrogels through solution extrusion and the release behavior of different drugs," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 27, no. 18, pp. 1808–1823, 2016, doi: 10.1080/09205063.2016.1237452.
- [44] P. Shah, B. Goodyear, N. Dholaria, V. Puri, and B. Michniak-kohn, "Nanostructured Non-Ionic Surfactant Carrier-Based Gel for Topical Delivery of Desoximetasone," 2021.
- [45] M. Kouhi, J. Varshosaz, B. Hashemibeni, and A. Sarmadi, "Materials Science & Engineering C Injectable gellan gum / lignocellulose nano fi brils hydrogels enriched with melatonin loaded forsterite nanoparticles for cartilage tissue engineering : Fabrication , characterization and cell culture studies," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 115, no. February, p. 111114, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.111114.

- [46] M. Ghosh, M. Halperin-Sternfeld, I. Grinberg, and L. Adler-Abramovich, "Injectable alginate-peptide composite Hydrogel as a scaffold for bone tissue regeneration," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 4, 2019, doi: 10.3390/nano9040497.
- [47] G. Kaya and F. Oytun, "Rheological properties of Injectable hyaluronic acid hydrogels for soft tissue engineering applications," *Biointerface Res. Appl. Chem.*, vol. 11, no. 1, pp. 8424–8430, 2021, doi: 10.33263/BRIAC111.84248430.
- [48] U. Soiberman *et al.*, "Subconjunctival injectable dendrimer-dexamethasone gel for the treatment of corneal inflammation," pp. 38–53, 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.016.Subconjunctival.
- [49] L. Lei, Y. Bai, X. Qin, J. Liu, W. Huang, and Q. Lv, "Current Understanding of Hydrogel for Drug Release and Tissue Engineering," *Gels*, vol. 8, no. 5, 2022, doi: 10.3390/gels8050301.
- [50] M. S. Kim, Y. S. Hwang, H. S. Lee, O. H. Nam, and S. C. Choi, "Development of Growth Factor Releasing Hyaluronic Acid-Based Hydrogel for Pulp Regeneration: A Preliminary Study," *Gels*, vol. 8, no. 12, 2022, doi: 10.3390/gels8120825.
- [51] K. W. Lee *et al.*, "Sustained release of vascular endothelial growth factor from calcium-induced alginate hydrogels reinforced by heparin and chitosan," *Transplant. Proc.*, vol. 36, no. 8, pp. 2464–2465, 2004, doi: 10.1016/j.transproceed.2004.08.078.
- [52] M. Cadé *et al.*, "FVIII regulates the molecular profile of endothelial cells : functional impact on the blood barrier and macrophage behavior," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 79, no. 3, pp. 1–17, 2022, doi: 10.1007/s00018-022-04178-5.
- [53] "From Coagulation to Angiogenesis: Extra-coagulative Role of FVIII - ISTH Congress Abstracts." <https://abstracts.isth.org/abstract/from-coagulation-to-angiogenesis-extra-coagulative-role-of-fviii/> (accessed Sep. 05, 2022).
- [54] G. E. Walker *et al.*, "Factor VIII as a potential player in cancer pathophysiology," no. November 2021, pp. 648–660, 2022, doi:

10.1111/jth.15611.

- [55] E. A. Gowney Kalaf, R. Flores, J. G. Bledsoe, and S. A. Sell, "Characterization of slow-gelling alginate hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 63, pp. 198–210, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.02.067.
- [56] N. Xu, J. Xu, X. Zheng, and J. Hui, "Preparation of Injectable Composite Hydrogels by Blending Poloxamers with Calcium Carbonate-Crosslinked Sodium Alginate," *ChemistryOpen*, vol. 9, no. 4, pp. 451–458, 2020, doi: 10.1002/open.202000040.
- [57] C. J. Maxwell, A. M. Soltisz, W. W. Rich, and M. A. Reilly, "Alginate Hydrogels as Injectable Drug Delivery Vehicles for Optic Neuropathy Treatment," 2021.
- [58] J. Zhou *et al.*, "Preparing an injectable hydrogel with sodium alginate and Type I collagen to create better MSCs growth microenvironment," *E-Polymers*, vol. 19, no. 1, pp. 87–91, 2019, doi: 10.1515/epoly-2019-0011.
- [59] L. Miebach, J. Berner, and S. Bekeschus, "In ovo model in cancer research and tumor immunology," *Front. Immunol.*, vol. 13, no. September, pp. 1–19, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1006064.
- [60] I. Moreno-Jiménez *et al.*, "The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: A refinement animal model for tissue engineering," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. August, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1038/srep32168.
- [61] P. Holzmann *et al.*, "Investigation of bone allografts representing different steps of the bone bank procedure using the CAM-model.," *ALTEX*, vol. 27, no. 2, pp. 97–103, 2010, doi: 10.14573/altex.2010.2.97.
- [62] Z. Zuo *et al.*, "The CAM cancer xenograft as a model for initial evaluation of MR labelled compounds," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. October 2016, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/srep46690.
- [63] P. Nowak-Sliwinska, T. Segura, and M. L. Iruela-Arispe, "The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering,"

- Angiogenesis*, vol. 17, no. 4, pp. 779–804, 2014, doi: 10.1007/s10456-014-9440-7.
- [64] C. Van Ongeval, Y. Ni, and Y. Li, “Utilisation of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model Platform for Imaging-Navigated Biomedical Research,” 2021.
- [65] K. M. Marshall, J. M. Kanczler, and R. O. C. Oreffo, “Evolving applications of the egg: chorioallantoic membrane assay and ex vivo organotypic culture of materials for bone tissue engineering,” *J. Tissue Eng.*, vol. 11, 2020, doi: 10.1177/2041731420942734.
- [66] N. Everaert *et al.*, “The effect of albumen removal before incubation (embryonic protein under-nutrition) on the post-hatch performance, regulators of protein translation activation and proteolysis in neonatal broilers,” *Br. J. Nutr.*, vol. 110, no. 2, pp. 265–274, 2013, doi: 10.1017/S000711451200503X.
- [67] M. Naik, P. Brahma, and M. Dixit, “A Cost-Effective and Efficient Chick Ex-Ovo CAM Assay Protocol to Assess Angiogenesis,” doi: 10.3390/mps1020019.
- [68] D. Fischer *et al.*, “The CAM Model—Q&A with Experts,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 1, 2023, doi: 10.3390/cancers15010191.