

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere nanopartikül katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi

Development of tissue scaffolds with nanoparticles for bone tissue engineering applications

Zeynep Püren AKGÜNER¹ , Ayça BAL ÖZTÜRK² 

¹Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Bölümü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstinye Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
purenakguner95@gmail.com

²Analitik Kimya Bölümü, Eczacılık Fakültesi, İstinye Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
aycabal@gmail.com, aozturk@istinye.edu.tr

Geliş Tarihi/Received: 02.04.2020
Kabul Tarihi/Accepted: 14.06.2020

Düzeltilme Tarihi/Revision: 10.06.2020

doi: 10.5505/pajes.2020.63933
Araştırma Makalesi/Research Article

Öz

Bu çalışmada, farklı oranlarda çift katmanlı hidroksit bileşikler (LDH) içeren bir seri jelatin-metakrilat (JelMA)/ İpek fibroin (J/IF LDH) doku iskeleleri hazırlanmış, LDH nanopartiküllerinin fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyolojik özellikleri üzerine etkileri ve kemik dokusu olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Mg/Al LDH nanopartikülleri hidrotermal metot ile sentezlenmiş, FTIR, XRD, ICP-MS, TEM, partikül boyu ve zeta potansiyeli analizleri ile karakterize edilmiştir. Mg/Al LDH nanopartiküllerinin sitotoksitesi osteoblast hücre hattı kullanılarak 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) testi ile belirlenmiş ve toksik olmadıkları bulunmuştur. J/IF LDH doku iskeleleri Irgacure2659 (fotobaşlatıcı) varlığında UV ışığı altında mikro-kalıplama tekniği ile hazırlanmıştır. Yapısı FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. Şişme analizi, mekanik dayanım testi ve osteoblast hücreleri ile hücre-adezyon testi gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar, Mg/Al LDH nanopartikül katkılı doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için yapay kemik üretiminde kullanılabilirliğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Kemik doku mühendisliği, doku iskelesi, İpek fibroin, LDH nanopartikülleri, JelMA.

Abstract

In this study, a series of gelatin-methacrylate (GelMA)/ Silk fibroin tissue scaffolds with different contents of layered double hydroxides (LDHs) were prepared (J/IF LDH), the effects of Mg/Al LDH nanoparticles on physical, chemical, mechanical and biological properties of scaffolds and their use as bone tissue were investigated. Mg/Al LDH nanoparticles were synthesized by hydrothermal method and characterized by FTIR, XRD, ICP-MS, TEM, particle size and zeta potential analysis. The cytotoxicity of Mg/Al LDH nanoparticles was assessed by using 3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay with osteoblast cell line. Mg/Al LDH nanoparticles were found to be non-toxic. J/IF LDH tissue scaffolds were prepared by micro-molding technique under UV light in the presence of Irgacure2659 (photoinitiator). Their structures were characterized by FTIR analysis. Swelling analysis, mechanical strength test and cell-adhesion test were performed with osteoblast cell line. All results showed that tissue scaffolds with different contents of Mg/Al LDH nanoparticles have great potential in artificial bone tissue production for bone tissue engineering applications.

Keywords: Bone tissue engineering, Tissue scaffolds, Silk fibroin, LDH nanoparticles, GelMA.

1 Giriş

Her yıl milyonlarca insan, kompleks kırıklar, tümörler veya travmaların neden olduğu kemik kusurları ile karşı karşıyadır. Otogreft transplantasyonu, kemik kusurları için en etkili tedavi olarak kabul edilse de yetersiz donör doku ve donör bölge morbiditesi gibi dezavantajları nedeniyle klinik uygulamalarını sınırlandırmaktadır [1]. Son yıllarda, kemik dokusu mühendisliği yaklaşımıyla doğal kemiğin yapısını ve kimyasal bileşimlerini taklit edebilen biyomimetik kemik doku iskelelerinin geliştirilmesi kapsamında yoğun araştırmalar yürütülmektedir [1],[2].

Doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen ideal bir doku iskelesi; hücre adezyonunu, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemeli, biyoyumlu, gözenekli, gerekli oranda mekanik dayanım ve biyo-bozunma profiline sahip olmalıdır [3]. Kemik doku mühendisliğinde, kemik doku iskelesi tipik olarak yapay bir hücre dışı matris, osteoblastlar veya osteoblast olabilen hücrelerini ve hücre bağlanmasını,

farklılaşmasını ve mineralize kemik oluşumunu destekleyen düzenleyici faktörleri içermelidir [4].

Hücre-dışı matris (ECM) esas olarak kollajen ve proteoglikanlardan oluşmakta, bu durum doğal polimerleri kemik dokusu mühendisliği için ideal biyomalzemeler yapmaktadır. Jelatin, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılan, yapısında hücre bağlama motifleri (RGD) bulunan, biyoyumlu, biyobozunur ve kolajenden türetilen doğal bir polimerdir [1]. Jelatin polimerinin metakrilik anhidrit ile modifikasyonundan jelatin-metakrilat (JelMA) polimeri elde edilmektedir. JelMA polimeri, modifiye edilmiş doğal ECM bileşenlerinden oluşan fotopolimerize edilebilir bir yapıya sahip olup ve bu da onu doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel bir malzeme haline getirmektedir [5]. Ancak, JelMA temelli doku iskeleleri zayıf mekanik özelliklere sahiptir ve yüksek çözünürlüğü hızlı bozunmaya yol açmaktadır [6]. Ayrıca, JelMA hidrojeni ile herhangi bir biyoaktif madde veya ön işlem (in vitro mineralizasyon) uygulamadan kemik dokusunun yeniden oluşumunu teşvik etmek zordur. Bu durum JelMA'nın kemik

*Yazışılan yazar/Corresponding author

onarımındaki uygulamasını sınırlamaktadır [1]. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, çeşitli inorganik ajanlar yapıya entegre edilerek, biyo-mineralizasyonu arttırmaya yol açan kalsiyum iyonlarının difüzyonunu modüle ederek JelMA temelli hidrojellerin biyoaktivitesi iyileştirilmektedir. Bu kapsamda kalsiyum fosfatlar, alüminosilikatlar, çift katmanlı hidroksit bileşikleri (LDH) ve biyo-camlar gibi biyoaktif seramikler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır [6]-[9].

Brusit benzeri malzemeler olarak da bilinen LDH'ler, iki boyutlu anyonik killer sınıfındadır. LDH'ler, genellikle M^{2+} ve M^{3+} kanyonlarının brusit içerisine yerleştirildiği $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2]^{x+}(A^{m-})_x/m \cdot nH_2O$ (burada $x=0.2-0.33$ M^{2+}/M^{3+} molar oranı 2-4'tür) formülü ile ifade edilirler. Yaklaşık 100 nm boyuta sahip LDH nanopartiküllerinin silika ve altın dahil diğer inorganik nanopartiküllere kıyasla, mükemmel biyoyoumluluk, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, biyoaktivite, hücresel sitoplazmada biyobozunurluk ve pH-duyarlı özelliğinin olması nedeniyle oldukça avantajlı olduğu kanıtlanmıştır [10]. LDH nanopartikülleri her ne kadar ilaç ve gen salım çalışmaları için kullanılsa da farklı çalışmalar kemik doku mühendisliği için de umut verici bir materyal olduğunu kanıtlamıştır. Örneğin; Romeo ve arkadaşları, LDH partikülleri ile desteklenmiş polikaprolakton (PCL) elektrospun nano elyaflarının basılabilme kabiliyetini arttırdığını göstermiştir [11]. Ramanathan ve arkadaşları, elektroçirime yöntemiyle LDH partikülleri ile desteklenmiş poli(3-hidroksibutirik asit)-poli(N-vinilpirolidon) temelli doku iskelelerini üretmişler, bu iskelelerin kemik dokusu mühendisliği için greft olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir [2]. Li ve arkadaşları, asitle aşındırılmış saf titanyum yüzeyler üzerine hidrotermal işlem ile LDH filmi oluşturmuşlar, hazırladıkları LDH filmlerinden tıbbi implant malzemeleri alanında umut verici sonuçlar almışlardır. Çalışmada LDH ile kaplı implantlar kontrol grupları ile karşılaştırılmış, LDH içeren implantlar kontrol grubuna oranla hücre yapışmasını ve proliferasyonunu daha iyi desteklediği görülmüştür [12]. Ek olarak; Kang ve arkadaşları, çalışmasında LDH partiküllerinin pre-osteoblast performanslarını incelemişlerdir. LDH partiküllerinin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının, osteoblast farklılaşmasında osteojen işaretleyici genlerin inhibisyonu ile modüle edilen Cofilin alımına bağlı olarak hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini tetikleyerek osteoblast adezyonunu modüle ettiğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmalarında, LDH'lerin kemik biyomühendisliği için bir iskele olarak kemik bozukluklarına uygulanacak terapötik nanomalzemeler olarak araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır [4]. Ancak, bu kapsamda yapılan çalışmalar çok azdır [13].

İpek fibroin (IF) esas olarak ipekböceği ve örümcekler tarafından üretilen lifli bir proteindir. Eşsiz mekanik özellikleri, ayarlanabilir biyodegradasyon hızı ve mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını destekleme yeteneği sayesinde kemik dokusu mühendisliği için uygun bir iskele malzemesi haline gelmiştir [14]. IF temelli doku iskelelerinde hücre adezyonu zayıf olabilmektedir. Bu nedenle hücre adezyonunu destekleyen malzemelerle harmanlayarak malzemenin özellikleri iyileştirilebilmektedir. Örneğin, IF temelli malzemeler; iyileşmiş özellikler göstermesi için jelatin, kitosan ve hiyalüronik asit gibi doğal polimerler ile harmanlanmıştır [15]-[20].

Bu çalışmada, farklı oranlarda Mg/Al LDH nanopartikülleri içeren bir seri JelMA/ İpek fibroin temelli doku iskeleleri (J/IF LDH) hazırlanmış, Mg/Al LDH nanopartiküllerinin fiziksel, kimyasal mekaniksel ve biyolojik özellikleri üzerine etkileri ve

kemik dokusu olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Mg/Al LDH nanopartikülleri hidrotermal metot ile sentezlenmiş, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), X-ışını difraksiyonu (XRD), indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), partikül boyu ve zeta potansiyeli analizleri ile karakterize edilmiştir. Mg/Al LDH nanopartiküllerinin sitotoksitesi osteoblast hücreleri üzerinde 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) testi ile belirlenmiştir. Takiben hidrojel temelli doku iskeleleri Irgacure2659 (fotobaslatıcı) varlığında UV ışığı altında mikro-kalıplama tekniği [5] ile hazırlanmış, Mg/Al LDH katkılı J/IF doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

2 Materyal metot

2.1 Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3), lityum bromür (LiBr), magnezyum nitrat heksahidrat ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), alüminyum nitrat nonahidrat ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$), jelatin ve metakrilik anhidrid, 2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiofenon (Irgacure 2959), dimetilsülfoksit (DMSO) 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT), penisilin-streptomisin Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Düşük glikoz miktarına sahip Dulbecco's Modified Eagle's Medium (L-DMEM) ve Fetal Sığır Serumu (FBS) Gibco'dan, Rhodamine-Phalloidin (Alexa-Fluor 594) ve 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) Invitrogen'den temin edilmiştir.

2.2 JelMA sentezi

10 gr jelatin 100 mL pH 7.4 fosfat tampon çözeltisinde (PBS) 50 °C'de tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır. Üzerine 8 mL metakrilik anhidrit ilave edilmiş 50 °C'de 2 sa. boyunca belirli bir hızda karıştırılmıştır. Elde edilen reaksiyon karışımına 100 mL PBS çözeltisi ilave edilerek iki kat seyreltilmiş, karıştırma işlemine 10 dk. daha devam edilmiştir. Takiben elde edilen reaksiyon karışımı diyaliz membranına (MWO 12000-14000 Da) alınarak 40 °C'de distile suya karşı 7 gün diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra 200 mL distile su ilave edilmiş, sonrasında süzgeç kağıdı ile süzümüştür. Liyofilize edilerek kurutulmuştur [21].

2.3 İpek fibroin izolasyonu

İpek kozalarından ipek fibroin izolasyonu, literatürde belirtildiği şekilde standart izolasyon protokolüne göre yapılmıştır [22]. İlk olarak ipek kozaları makasla küçük parçalara kesilerek 5 g tartılmıştır. 200 mL 0.02M sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi içerisinde 30 dk. kaynatılmış ve sonrasında distile su ile durulanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuru fiberlerden 1 g tartılıp üzerine 4 mL 12M lityum bromür (LiBr) çözeltisi eklenmiş 4 sa. 65 °C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen çözelti şırınga yardımıyla diyaliz membranına (MWO 12000-14000 Da) alınıp distile suya karşı 3 gün diyaliz edilmiştir. 4 °C'de 9000 rpm hızla 20 dk. santrifüjlenmiş ve elde edilen ipek fibroin çözeltisi (ağırlıkça $\approx 7\%$) 4 °C'de saklanmıştır.

2.4 LDH nanopartiküllerinin sentezi

LDH bileşikleri "birlikte çöktürme yöntemi" ile $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ve $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ tuzları kullanılarak sentezlenmiştir [23]. İlk olarak 16.025 g (62.5 mmol) $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ve 11.723 g (31.25 mmol) $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 250 mL deiyonize suda çözüldükten sonra belirli bir sabit hız ile karıştırılmakta olan

10 g NaOH ve 3.312 g Na₂CO₃ içeren 250 mL sulu çözeltiye damla damla ilave edilmiştir. 1 sa. karıştırıldıktan sonra elde edilen çözelti süzülüş ve distile su ile pH nötr olana kadar yıkanmıştır. Nano-boyutlu Mg/Al LDH partikülleri hidrotermal metot ile hazırlanmıştır [24],[25]. Elde edilen çamur kıvamındaki üründen 600 mg tartılmış 60 mL distile suda dispersiyeye edilmiş ve 100 °C'de bir otoklav içerisinde 16 sa. inkübe edilmiştir. Takiben liyofilize edilerek kurutulmuştur.

2.5 Karakterizasyon

Sentezlenen JelMA polimerinin yapısı FTIR ve Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H NMR) analizleri ile doğrulanmıştır. ¹H NMR analizleri Varian UNITY INOVA cihazı ile (D₂O, 500 MHz, δ, ppm) alınmıştır. Sentezlenen LDH nanopartikülleri; FTIR, XRD, ICP-MS, partikül boyu, zeta potansiyeli ve TEM analizleri ile karakterize edilmiştir. LDH nanopartiküllerinin XRD analizleri CuKα (λ-1.5418 Å) radyasyonu kullanılarak 45 mA, 40 kV ve Ni-filtresinde PANanalytical X'Pert Pro MPD Model XRD cihazı ile yapılmıştır. LDH nanopartiküllerinin partikül boyu ve zeta potansiyeli analizleri Nanosizer cihazı ile (NanoZS Malvern Instrument, UK) 25 °C'de yapılmıştır. Her formülasyon için ardarda üç ölçüm yapılmıştır. LDH nanopartiküllerinin TEM analizleri JEOL JEM 1220 cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.6 Doku iskelelerinin hazırlanması

Hidrojel temelli doku iskeleleri mikrokalıplama tekniği ile hazırlanmıştır [5]. Farklı miktarlarda tartılan Mg/Al LDH nanopartikülleri (Tablo 1) fotobazlatıcı çözeltisi içerisinde (Irgacure 2959: 2.5 mg/mL) homojenize edilmiştir. Belirli miktardaki JelMA bu karışıma ilave edilmiş 80 °C su banyosunda 1 sa. karıştırılmıştır. Soğuyan karışımın üzerine belirli bir hacimdeki ipek fibroin çözeltisi ilave edilerek elde edilen çözelti belirli bir süre daha karıştırılmıştır. Mikropipet yardımıyla 100 µl polimer çözeltisi alınarak 1 mm aralığıyla ayrılmış iki cam slayt arasına pipetlenmiştir. Daha sonra polimer karışımı 2.5 mW/cm² güçte 40 sn. boyunca UV ışığına (Omniculture S2000) maruz bırakılarak doku iskeleleri hazırlanmıştır.

Tablo 1. J/IF LDH Doku iskelelerinin bileşimi ve isimlendirilmesi.

Table 1. Composition and codes of J/IF LDH tissue scaffolds.

Doku İskeleleri	JelMA (mg/mL)	IF (ağırlıkça%)	Mg/Al LDH (mg/mL)	Irgacure2959 (mg/mL)
J/IF LDH0	75	3.5	0	2.5
J/IF LDH1	75	3.5	1	2.5
J/IF LDH2	75	3.5	2	2.5
J/IF LDH3	75	3.5	3	2.5
J/IF LDH5	75	3.5	5	2.5
J/IF LDH7	75	3.5	7	2.5

2.7 Şişme testi

Doku iskelelerinin şişme davranışları 37 °C'de PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. Kuru tartımları alınan örnekler PBS ortamına daldırılmış, 48 sa. sonunda ortamdaki uzaklaştırılarak fazla suyu alınıp tekrar tartılmış ve şişme oranları hesaplanmıştır [26]. Tüm denemelerde üç tekrarlı çalışılmıştır.

2.8 Mekaniksel dayanım testi

Hazırlanan doku iskeleleri distile su ortamında şişirildikten sonra silindirik ebatlarda olması için 5 mm çaplı biopsy punch ile delinmiştir [27]. Sonrasında örnekler cihazın (TA.XTPlus Tekstür Analiz Cihazı) iki sıkıştırma plakası arasına yerleştirilerek 1 mm/dk.'lık bir yer değiştirme hızında sıkıştırılmıştır. Elastik modülü doğrusal bölgedeki %5-10

gerinime karşılık gelen eğimden hesaplanmıştır [28]. Tüm analizlerde üç tekrarlı çalışılmıştır.

2.9 Hücre kültürü

Çalışma kapsamında osteoblast hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan osteoblast hücrelerinin pasaj numaraları 6'dır. Osteoblast hücrelerinin kültürü; L-DMEM, %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 75 cm²'lik kültür kabında inkübe edilmiştir. Hücre kültür besiyeri her 2 günde bir değiştirilmiş, hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında %0.05 Trypsin/0.02 EDTA solüsyonu ile kültür kabından ayrılmıştır. Takiben, hücre medyumunu ile süspanse edilerek 1500 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Medyum, pipet yardımıyla atıldıktan sonra hücreler medyum ile tekrar süspanse edilerek thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır.

2.10 Sitotoksikite testi

Mg/Al LDH nanopartiküllerinin sitotoksitesini belirlemek amacıyla MTT testi kullanılmıştır [29]. MTT testi, yaşayan hücre sayısının tespiti için yaygın olarak kullanılan, enzim aktivitesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Test kapsamında hücreler 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 48-kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin yapışması ve yayılması için kültür kapları 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 24 sa. boyunca inkübe edilmiştir. Steril LDH nanopartikülleri hücre medyumunu ile farklı konsantrasyonlarda seyreltilmiştir (0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10 ve 15 mg/mL). 48-kuyucuklu kültür kaplarındaki hücre medyumları uzaklaştırılmış, farklı konsantrasyonlarda nanopartikül içeren hücre medyumları ilave edilerek 37 °C'de, %5 CO₂'li ortamda 24 sa. inkübe edilmiştir. Takiben kuyucuklardaki nanopartikül içeren hücre medyumunu uzaklaştırılmış, her kuyucuğa MTT solüsyonu ilave edilmiştir ve 4 sa. boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki MTT solüsyonu uzaklaştırılmış, DMSO ilave edilmiş ve 10 dk. daha inkübe edilmiştir. Ardından plakalar 570 nm'de mikropilaka okuyucuda (SpektrostarNano) okunmuştur.

2.11 Hücre adezyonu testi

Hücre adezyon testi 48-kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerin morfolojisini görselleştirmek için hücreler Rhodamine-Phalloidin (Alexa-Fluor 594) ve DAPI ile boyanmıştır [7]. Öncelikle doku iskeleleri steril şartlarda 48-kuyucuklu kültür kaplarında hazırlanmıştır. 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 48-kuyucuklu kültür kaplarında bulunan doku iskelelerinin üzerine ekilmiştir. Belirli süreler sonrasında (1. 3. ve 5. günlerde) hücreler %4'lük paraformaldehit ile fikse edilmiş, PBS ile yıkandıktan sonra %0.05 TritonX-100 ile belirli bir süre muamele edilmiş ve takiben %5'lik tavşan serumu ile bloke edilmiştir. Karanlıkta sırasıyla Rhodamine-Phalloidin (1 sa.) ve DAPI ile boyanarak (30 dk.) PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskobu (Zeiss AxioScope Z1) ile hücreler görüntülenmiştir.

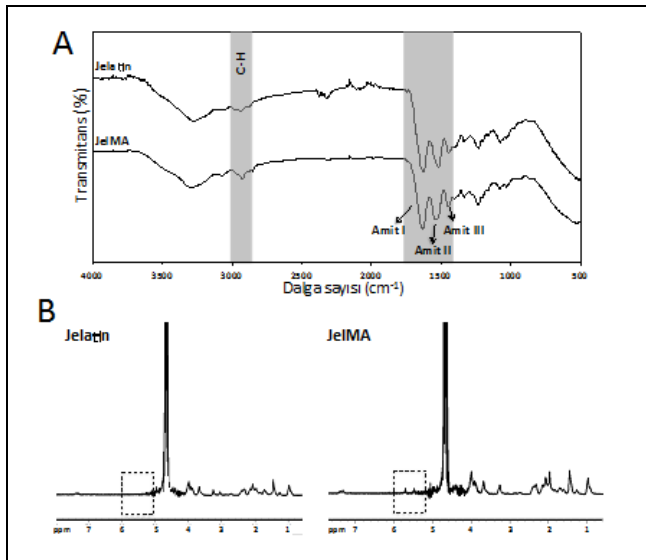
3 Tartışma ve sonuçlar

3.1 Yapısal karakterizasyon

JelMA, jelatinin işlevselleştirilmesiyle oluşturulan bir proteindir. Proteinler, birbirine amid bağları ile bağlanan amino asitlerden oluşur. Polipeptitler ve proteinler, amid I, II ve benzeri olarak bilinen tekrar eden birimlere sahiptir. JelMA'nın amid bantları, peptid bağının farklı titreşimsel durumlarını

göstermektedir. Jelatinin metakrilik anhidrit ile modifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen JelMA polimerine ait FTIR spektrumu Şekil 1(A)'da verilmiştir. Jelatin ve JelMA'nın 1625 cm^{-1} (amid I), 1522 cm^{-1} (amid II), ve 1440 cm^{-1} (amid III)'de görülen pikleri sırasıyla -C=O bağının gerilme titreşimi, N-H bağının eğilme titreşimi ve C-N ve N-H bağlarının düzlem-içi eğilme titreşiminden kaynaklanmaktadır [30]. Metakrilasyon sonrası JelMA polimerinde bu amid piklerinin konumları değişmemiş olup sadece 1625 cm^{-1} 'de (amid I) bulunan pikin yoğunluğu bir dereceye kadar artmıştır [31]. Yapılan literatür araştırmasına göre, GelMA polimerinde yapıya katılan metakrilat gruplarının C=C gerilme titreşimleri de aynı bölgede titreşim vermektedir. Bu durum GelMA polimerinde 1625 cm^{-1} 'de bulunan pikin şiddetinde artışa neden olmuştur [31],[32]. Ayrıca, JelMA polimerinde, 2915 cm^{-1} 'de ortaya çıkan pik C-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Ek olarak, Jelatin ve JelMA'nın FTIR spektrumunda 3260 cm^{-1} 'de görülen büyük yayvan pik O-H gerilme titreşimlerine aittir [33]. Tüm sonuçlar metakrilasyon reaksiyonun gerçekleştiğini ve JelMA polimerinin başarı ile sentezlendiğini göstermektedir.

Jelatinin metakrilik anhidrit ile modifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen JelMA polimerine ait ^1H NMR sonuçları Şekil 1(B)'de verilmiştir. 5.4 ppm ve 5.7 ppm 'de gözlemlenen pikler jelatine konjüge edilmiş metakrilat gruplarının alkenil çiftli bağı göstermektedir [33]. Doğal jelatin üzerinde ise çift bağı olmadığını doğrulayan 5.4 ppm ve 5.7 ppm değerlerinde herhangi bir pik yoktur. Sonuçlar, FTIR sonuçları ile uyum göstermekte olup JelMA polimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır.



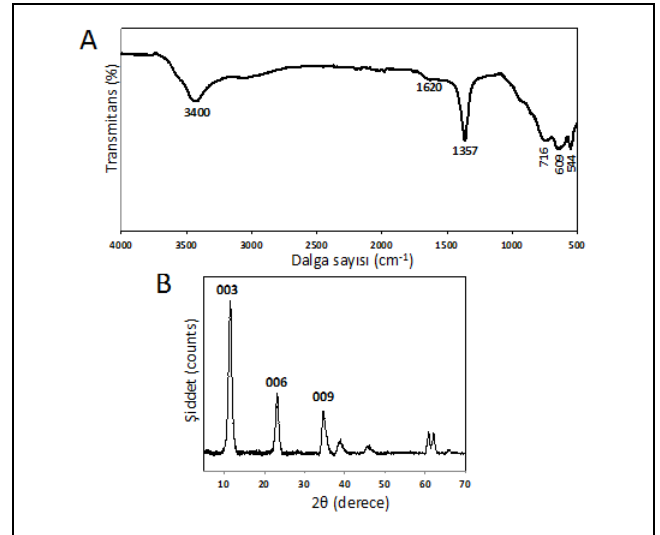
Şekil 1. Jelatin ve JelMA polimerlerinin FTIR (A) ve ^1H NMR sonuçları (B).

Figure 1. FTIR (A); and ^1H NMR (B): Spectra of gelatin and JelMA polymers.

JelMA polimerinin metakrilasyon derecesi, modifiye edilmemiş jelatinin üzerindeki amin gruplarının sayısına bölünen jelatine bağlı metakrilatlı grupların sayısı olarak tanımlanmaktadır. ^1H NMR analizi ile JelMA numunesindeki serbest amin grubunun metakrilasyon derecesi (MD) belirlenmiştir. JelMA'nın metakrilasyon derecesi literatürde açıklandığı şekilde hesaplanmıştır [34].

MD derecesinin ölçülmesi için, spektrumlar jelatin konsantrasyonlarını temsil eden fenilalanin sinyaline

($7.0\text{-}7.5\text{ ppm}$) göre normalize edilir. JelMA'nın spektrumunda, jelatininkine kıyasla 5.4 ppm ve 5.7 ppm değerlerinde ortaya yeni pikler çıkmıştır. Bu pikler metakrilik metakrilolil fonksiyonlarının akrilik protonlarını göstermektedir [35]. Yapılan hesaplamalar sonrasında JelMA polimerinin % Metakrilasyon derecesi %94 bulunmuştur. Böylelikle daha stabil ve mekaniksel dayanımı daha yüksek doku iskeleleri hazırlanabilecektir. Şekil 2(A)'da Mg/Al LDH partiküllerinin FTIR spektrumu görülmektedir. M-O ve O-M-O (M= Mg, Al) titreşim bantları $400\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ arasında görülmektedir [36]. 1357 cm^{-1} 'de görülen keskin absorpsiyon bandı ara katmanda yeterli miktarda nitrat iyonunun varlığını göstermektedir. 3900 cm^{-1} ile 2700 cm^{-1} arasında görülen geniş absorpsiyon bandı (maksimumu 3400 cm^{-1}) tabakalar arasında bulunan su ve hidroksil gruplarının -OH gerilme titreşimlerine aittir [37],[38]. 1620 cm^{-1} 'de bulunan bandı suyun eğilme deformasyonuna (bending deformation) aittir [39],[40]. Mg/Al LDH partiküllerinin elde edilen XRD paterni, Şekil 2(B)'de görülmektedir. 11.51° , 23.13° , 34.560° (2θ)'de üç adet pikin varlığı, LDH partiküllerinin ara tabaka aralıklarının d003 düzleminde (7.682 \AA), d006 düzleminde (3.842 \AA) ve d009 düzleminde (2.593 \AA) olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, LDH nanopartiküllerinin tabakalı ve kristalin yapıya sahip olduğunu ve literatür ile uyumlu olarak başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir [41]-[43].



Şekil 2. Mg/Al LDH nanopartiküllerinin FTIR (A) ve XRD (B) sonuçları.

Figure 2. FTIR (A) and XRD (B) results of Mg/Al LDH nanoparticles.

Mg/Al LDH'ların $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ oranı, Mg^{2+} konsantrasyonunun ICP-MS ile belirlenen şekilde Al^{3+} konsantrasyonuna bölünmesi ile hesaplanmıştır [44]. LDH partiküllerinin analiz sonuçlarından beklenen teorik değerlere yakın olduğu görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 2. Sentezlenen LDH bileşiğinin ICP-MS sonucu.

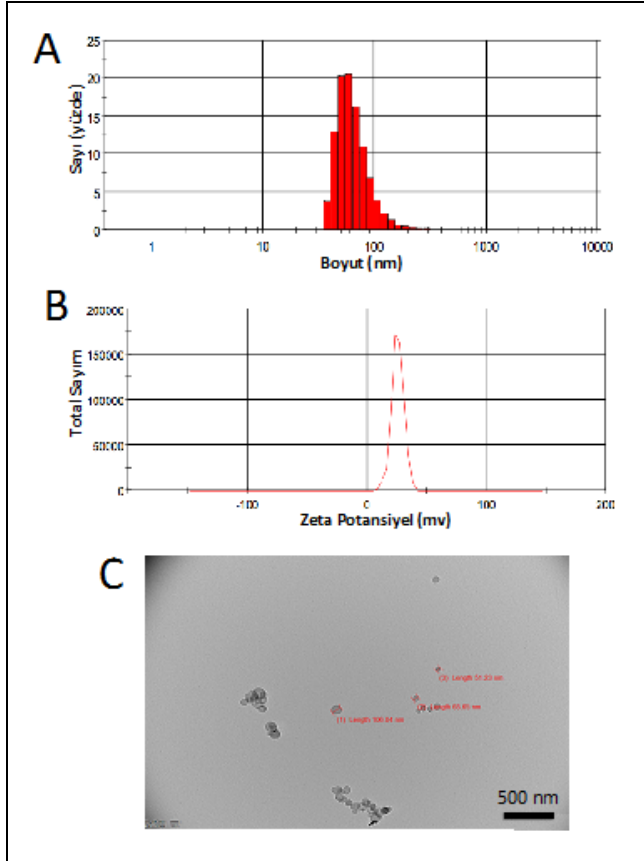
Table 2. ICP-MS result of the synthesized LDH compound.

LDH	Mg^{2+} (%kütlece)	Al^{3+} (%kütlece)	$\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ (mol oranı)*	$\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ (mol oranı)**
Mg/Al 2:1	20.85	10.43	2.22	2

*. ICP-MS sonuçlarına göre hesaplandı. **: Teorik oran.

Şekil 3'te Mg/Al LDH partiküllerinin partikül boyu ve zeta potansiyeli sonuçları görülmektedir. Şekil 3(A)'da görüldüğü

üzere elde edilen LDH partikülleri nano boyutludur. Partikül boyutunun 66.85 ± 27.67 nm ve PDI değerinin 0.240 olduğu bulunmuştur. Şekil 3(B)'de Mg/Al LDH nanopartiküllerinin zeta potansiyel sonuçları görülmekte olup partiküllerin pozitif yüklü oldukları görülmektedir. Zeta potansiyeli değeri 25.6 ± 5.19 mV olarak ölçülmüştür. Şekil 3(C)'de Mg/Al LDH partiküllerinin TEM görüntüleri görülmektedir. TEM görüntülerinden LDH nanopartiküllerinin küresel morfolojiye sahip olduğu sonucu çıkmaktadır. Sonuçlar literatür ile uyumludur [45],[46].



Şekil 3. Sentezlenen Mg/Al LDH partiküllerinin boyut analiz sonuçları (A), zeta potansiyeli sonuçları (B) ve TEM görüntüleri (C).

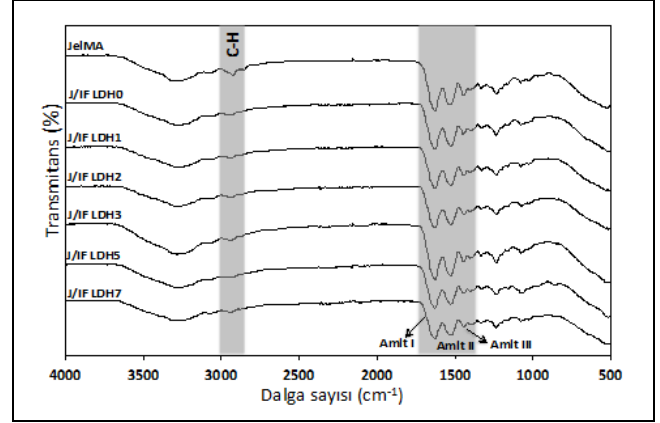
Figure 3. Particle size (A); Zeta potential. (B); and TEM images. (C): of the synthesized Mg/Al LDH particles.

3.2 Doku iskelelerinin karakterizasyonu

Bir dizi farklı oranlarda Mg/Al LDH içeriklerine sahip bir seri J/IF temelli doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hidrojel temelli J/IF LDH doku iskelelerinin UV ışığı-altında çapraz bağlandığını göstermek için FTIR-ATR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. JelMA polimeri ve geliştirilen J/IF LDH doku iskelelerine ait FTIR spektrumu Şekil 4'te verilmiştir. Tüm ürünlerde, tipik amid I ve II bantları, 1615 cm^{-1} ve 1509 cm^{-1} 'de (sırasıyla C=O gerilmesi ve N-H bükülmesinden dolayı) mevcuttur. Çapraz-bağlanmamış JelMA polimerinde C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 2915 cm^{-1} 'de görülen pikin şiddeti azalmıştır, bu da foto-polimerizasyonun başarısını ve bunun sonucunda çapraz bağlı hidrojel yapısının oluştuğunu göstermektedir [33],[47].

Doku iskelelerinin şişme davranışları, kemik dokusunun yenilenmesi sırasında besin maddelerinin ve atık ürünlerin

difüzyonu ile birlikte vücut sıvısının emilimiyle ilgili olduğu için önem taşımaktadır [26]. Şekil 5(A)'da görüldüğü üzere geliştirilen hidrojel doku iskelelerinin tamamı yüksek oranda birbirine bağlı gözenekli yapıları nedeniyle çok miktarda su emerek şişebilmektedir. Bununla birlikte, LDH içermeyen J/IF hidrojelinin şişme oranının LDH içeren J/IF hidrojellerine göre yükselmiş olup anlamlı bir farklanma ($p < 0.05$) görülmemiştir.



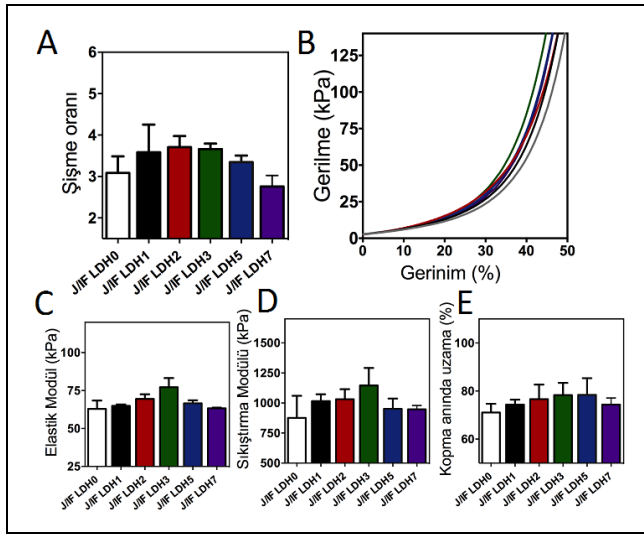
Şekil 4. J/IF LDH doku iskelelerinin FTIR sonuçları.

Figure 4. FTIR results of J/IF LDH tissue scaffolds.

Hidrojellerin mekanik özellikleri, polimer ağlarının çapraz bağlanma yoğunluğundan etkilenir. Mekanik özellikler, hücrelerin yayılma davranışını önemli ölçüde etkiler. Hidrojellerin sertliği, gözenek boyutlarıyla ters orantılıdır. Bu nedenle, biyomalzemenin gözenek boyutu çok küçükse hücreler üç boyutlu (3B) yapı içerisinde yayılamazlar [27]. LDH nanopartikül miktarının doku iskelelerinin mekanik özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için sıkıştırma testi uygulanmıştır. Malzemenin sertliği polimer konsantrasyonu ve yoğunlukla içerisindeki nanopartikül miktarı arttıkça artar, bu da mekanik özelliklerde bir artışa neden olur. Geliştirilen yapı iskelelerinin gerilim-gerinim eğrileri (Şekil 5B), mekanik özelliklerinin LDH nanopartiküllerinin ilavesiyle belirli ölçüde farklılık gösterebildiğini göstermiştir. Geliştirilen doku iskelelerinin elastik modülleri gerilim-gerinim eğrilerinin %0-10 gerilme aralığında doğrusal bölgenin eğimi alınarak hesaplanmıştır. Elastik modül sonuçları Şekil 5(C)'de görülmektedir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere yapıya LDH nanopartiküllerinin katılması ile elastik modül değerlerinde artış gözlenmiştir. J/IF LDH0 doku iskelelerinin elastik modülü 62.88 ± 5.5 kPa bulunmuştur. J/IF LDH1, J/IF LDH2 ve J/IF LDH3 kodlu doku iskelelerinde bu değer sırasıyla 64.9 ± 0.96 kPa, 69.47 ± 3.13 kPa ve 77.2 ± 6.06 kPa seviyelerine yükselmiş olup J/IF LDH5 ve J/IF LDH7 doku iskelelerinde ise 66.56 ± 2.03 kPa ve 63.30 ± 0.64 kPa seviyelerinde kalmıştır. LDH içeren doku iskelelerinin elastik modüllerinin LDH içermeyen iskelelerine göre artış gösterdiği (maksimum artış J/IF LDH3) sonucuna varılmıştır. Hidrojel doku iskelelerinin sıkıştırma modülleri Şekil 5(D)'de görüldüğü üzere, içeriğindeki LDH nanopartiküllerinin miktarına bağlıdır. Örneğin, LDH içermeyen J/IF LDH0 doku iskeleleri J/IF LDH1, J/IF LDH2 ve J/IF LDH3 doku iskeleleri ile karıştırıldığında, sıkıştırma modüllerinin eş zamanlı olarak sırasıyla 877 ± 183 kPa'dan 1016 ± 57 kPa, 1031 ± 84 kPa ve 1146 ± 145 kPa'a yükselmiştir. J/IF LDH5 ve J/IF LDH7 doku iskelelerinde ise düşüş gözlenmiş olup sırasıyla 952 ± 94 kPa ve 948 ± 32 kPa bulunmuştur. Bu sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında; Xiao ve arkadaşlarının geliştirdikleri JelMA/ipek fibroin hidrojellerinde en yüksek

600 kPa seviyelerine ulaşılmıştır [48]. Zheng ve arkadaşlarının kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere geliştirdikleri JelMA temelli biyoaktif-cam katkılı doku iskelelerinde en yüksek 240 kPa seviyelerine ulaşılmıştır [49]. Li ve arkadaşları ise geliştirdikleri hidroksiapatit nanopartikül katkılı JelMA temelli doku iskelelerinde maksimum 625 kPa değerinde sıkıştırma modülüne erişmişlerdir [50]. Sonuçlar, bu çalışmada geliştirilen J/IF LDH doku iskelelerinin literatürden üstünlüğünü ortaya koymaktadır.

Kopma anındaki uzama değerlerinde ise LDH içeren doku iskelelerinde yükseldiği ancak aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür Şekil 5(E). Doku iskelelerinde (artan LDH miktarına göre) kopma anındaki uzama değerleri sırasıyla %71.05±3.64, %74.38±2.00, %76.62±6.04, %78.3±5.10, %78.4±6.97 ve %74.36±2.74 olduğu bulunmuştur.



Şekil 5. J/IF LDH doku iskelelerinin fiziksel ve mekaniksel özellikleri: şişme oranları (A): Gerilme-gerinim eğrileri. (B): Elastik modülleri. (C): Sıkıştırma modülleri. (D): ve kopma anında uzama değerleri (E).

Figure 5. Physical and mechanical properties of J/IF LDH scaffolds: swelling ratios (A): stress-strain curves (B): Elastic modules (C): Compression modules (D): and elongation values at break (E).

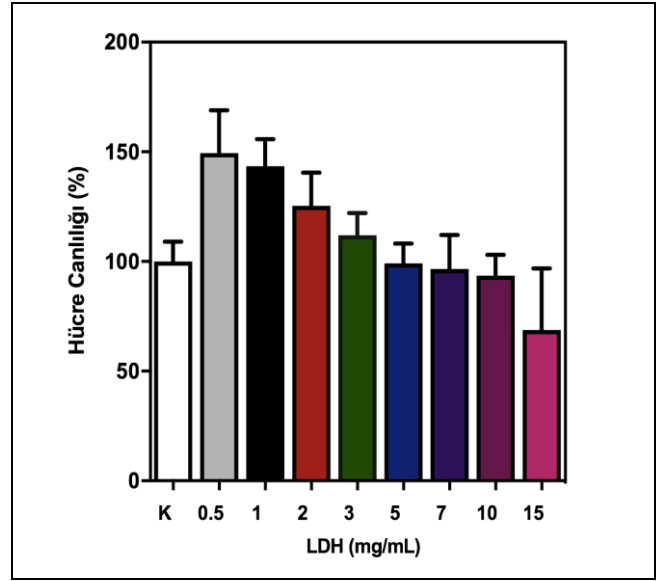
3.3 LDH partiküllerinin sitotoksikite testi sonuçları

MTT sonuçlarına göre (Şekil 6), 24. sa. sonunda 0.5-10 mg/mL arasındaki dozların osteoblast hücrelerine karşı in vitro toksik etki göstermediği saptanmıştır. Sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, Wu ve arkadaşları çalışmalarında Mg/Al (mol oranı 3:1) LDH nanopartiküllerinin (≈ 100 nm) embriyonik kök hücrelerin (mESC) yaşayabilirliği üzerindeki etkisini MTT analizi ile değerlendirmişler ve herhangi bir toksik etki (2-40 μ g/mL) gözlemlenmemişlerdir [13]. Bir başka çalışmada, Mg/Al (mol oranı 3:1) LDH nanopartikülleri (≈ 100 nm) ile preosteoblast hücreleri üzerinde çalışılmış ve 0.02 mg/mL konsantrasyona kadar toksik olmadığı sonucuna varılmıştır [4]. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar ve literatür sonuçları LDH nanopartiküllerinin doku mühendisliği uygulamalarında güvenli bir şekilde kullanılabilmesini göstermektedir.

3.4 Doku iskelelerinin hücre adezyonu testi sonuçları

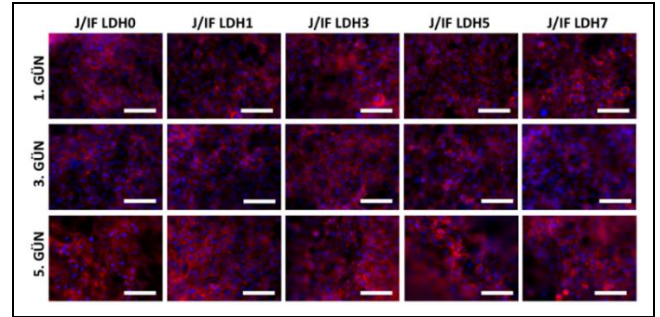
Bir biyomateryalin doku mühendisliği alanında doku iskelesi olarak kullanılabilirliğinin ve performansının saptanması için hücre adezyonu davranışlarının araştırılması gerekmektedir

[48]. Bu çalışmada, J/IF LDH doku iskelelerinin osteoblast hücre adezyonu kabiliyetlerinin belirlenmesi kapsamında Rhodamine-Phalloidin/DAPI boyamaları gerçekleştirilerek, kemik doku mühendisliği alanında kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Şekil 7 osteoblast hücrelerinin doku iskelelerinin üzerine ekilmesinden sonraki 1., 3. ve 5. gündeki görüntülerini göstermektedir. Görüntüler tüm doku iskelelerinin biyoyumlu olduğunu ve osteoblast hücrelerinin yüzeylerine kolayca bağlanabileceğini ve kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliğini göstermektedir.



Şekil 6. Mg/Al LDH nanopartiküllerinin MTT sonuçları.

Figure 6. MTT results of Mg/Al LDH nanoparticles.



Şekil 7. J/IF LDH doku iskelelerinin hücre adezyonu sonuçları.

Figure 7. Cell adhesion results of J/IF LDH tissue scaffolds.

4 Sonuçlar

Kemik doku mühendisliğinde yapay kemik olarak kullanılmak üzere farklı oranlarda Mg/Al LDH nanopartikül içeren bir seri J/IF LDH doku iskeleleri hazırlanmıştır. LDH nanopartiküllerinin doku iskelelerinin fiziksel, kimyasal, mekaniksel ve biyolojik özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Sentezlenen Mg/Al LDH nanopartiküllerinin boyutları 66.85 ± 27.67 nm zeta potansiyelleri 25.6 ± 5.19 mV olarak ölçülmüştür. TEM görüntüleri sonuçları, nanopartiküllerin küresel morfolojiye sahip olduklarını göstermiştir. J/IF LDH doku iskelelerinin FTIR sonuçları, çapraz bağlı yapının oluştuğunu, foto-polimerizasyonun başarı ile gerçekleştiğini doğrulamıştır. J/IF LDH0 hidrojelinin şişme oranının LDH içeren J/IF LDH hidrojellerine göre yükselmiş

olup anlamlı bir farklanma ($p < 0.05$) görülmemiştir. LDH içeren doku iskelelerinin elastik modüllerinin LDH içermeyen iskelelerine göre artış gösterdiği (maksimum artış J/IF LDH3) sonucuna varılmıştır. Mekaniksel dayanım sonuçları (maksimum 77.2 ± 6.06 kPa elastik modül, 1146 ± 145 kPa sıkıştırma modülü) literatürdeki benzer yapılardan çok daha yüksektir. Mg/Al LDH nanopartiküllerinin in vitro sitotoksikite çalışmaları, 0.5-10 mg/mL arasındaki dozların osteoblast hücrelerine karşı toksik etki göstermediğini saptamıştır. Geliştirilen tüm J/IF LDH doku iskeleleri osteoblast hücre-adezyonunu desteklemiştir.

Sonuçlar, Mg/Al LDH nanopartikül katkılı doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için yapay kemik üretiminde kullanılabileceğini göstermiştir.

5 Conclusions

A series of J/IF LDH tissue scaffolds containing different amounts of Mg/Al LDH nanoparticles have been prepared for use as artificial bone in bone tissue engineering. The effects of LDH nanoparticles on physical, chemical, mechanical and biological properties of tissue scaffolds were investigated. Particles sizes and zeta potentials of the synthesized Mg/Al LDH nanoparticles were measured 66.85 ± 27.67 and 25.6 ± 5.19 mV, respectively. TEM images showed that nanoparticles have spherical morphology. FTIR results of J/IF LDH tissue scaffolds confirmed that a cross-linked hydrogel structure was formed and photo-polymerization was successful. The swelling ratio of J/IF LDH0 hydrogel increased compared to J/IF LDH hydrogels containing LDH, and no significant difference ($p < 0.05$) was observed. It was concluded that the elastic modules of tissue scaffolds containing LDH nanoparticles showed an increase (maximum increase J/IF LDH3) compared to scaffolds without LDH nanoparticles. The mechanical strength results (maximum 77.2 ± 6.06 kPa elastic module, 1146 ± 145 kPa compression module) are much higher than similar structures in the literature. In vitro cytotoxicity studies of Mg/Al LDH nanoparticles found that doses ranging from 0.5-10 mg/mL were not toxic on the osteoblast cell line. J/IF LDH tissue scaffolds supported osteoblast cell-adhesion.

Results showed that tissue scaffolds containing Mg/Al LDH nanoparticles can be used in the production of artificial bone for bone tissue engineering applications.

6 Teşekkürler

Bu çalışma, TÜBİTAK 118S549 No.lu proje tarafından desteklenmiştir.

7 Yazar katkı beyanı

Gerçekleştirilen çalışmada Zeynep Püren AKGÜNER deneylerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi başlıklarında; Ayça BAL ÖZTÜRK fikrin oluşması, literatür taraması, deney tasarımının yapılması, deneylerin yapılması, kullanılan malzemelerin temin edilmesi, makalenin kontrol edilmesi, sonuçların değerlendirilmesi, yazım denetimi ve içerik başlıklarında katkı sunmuştur.

8 Etik kurul onayı ve çıkar çatışması beyanı

"Hazırlanan makalede etik kurul izni alınmasına gerek yoktur" "Hazırlanan makalede herhangi bir kişi/kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır".

9 Kaynaklar

- [1] Zheng J, Zhao F, Zhang W, Mo Y, Zeng L, Li X, Chen X. "Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration". *Materials Science and Engineering: C*, 89, 119-127, 2018.
- [2] Ramanathan G, Fardim P, Sivagnanam UT. "Fabrication of 3D dual-layered nanofibrous graft loaded with layered double hydroxides and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering". *Process Biochemistry*, 64, 255-259, 2018.
- [3] Shafiei SS, Shavandi M, Ahangari G, Shokrolahi F. "Electrospun layered double hydroxide/poly (ϵ -caprolactone) nanocomposite scaffolds for adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells". *Applied Clay Science*, 127, 52-63, 2016.
- [4] Kang HR, da Costa Fernandes CJ, da Silva RA, Constantino VRL, Koh IHJ, Zambuzzi WF. "Mg-Al and Zn-Al Layered double hydroxides promote dynamic expression of marker genes in osteogenic differentiation by modulating mitogen-activated protein kinases". *Advanced Healthcare Materials*, 2018. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700693>
- [5] Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. "Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels". *Biomaterials*, 73, 254-271, 2015.
- [6] Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, Shokrgozaer MA, Dehghan MM, Larijani B. "Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study". *Materials Science and Engineering: C*, 76, 701-714, 2017.
- [7] Zheng J, Zhao F, Zhang W, Mo Y, Zeng L, Li X, Chen X. "Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration". *Materials Science and Engineering: C*, 89, 119-127, 2018.
- [8] Kwon S, Lee SS, Sivashanmugam A, Kwon J, Kim SHL, Noh MY, Hwang NS. "Bioglass-incorporated methacrylated gelatin cryogel for regeneration of bone defects". *Polymers*, 10(8), 1-17, 2018.
- [9] Kang H, Shih YRV, Hwang Y, Wen C, Rao V, Seo T, Varghese, S. "Mineralized gelatin methacrylate-based matrices induce osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells". *Acta biomaterialia*, 10(12), 4961-4970, 2014.
- [10] Piao H, Kim MH, Cui M, Choi G, Choy JH. "Alendronate-anionic clay nanohybrid for enhanced osteogenic proliferation and differentiation". *Journal of Korean Medical Science*, 34(5), 1-17, 2019.
- [11] Romeo V, Gorrasi G, Vittoria V, Chronakis IS. "Encapsulation and exfoliation of inorganic lamellar fillers into polycaprolactone by electrospinning". *Biomacromolecules*, 8(10), 3147-315, 2007.
- [12] Li Q, Wang D, Qiu J, Peng F, Liu X. "Regulating the local pH level of titanium via Mg-Fe layered double hydroxides films for enhanced osteogenesis". *Biomaterials Science*, 6(5), 1227-1237, 2018.
- [13] Wu Y, Zhu R, Zhou Y, Zhang J, Wang W, Sun X, Wang S. "Layered double hydroxide nanoparticles promote self-renewal of mouse embryonic stem cells through the PI3K signaling pathway". *Nanoscale*, 7(25), 11102-1111, 2015.

- [14] Melke J, Midha S, Ghosh S, Ito K, Hofmann S. "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering". *Acta Biomaterialia*, 31, 1-16, 2016.
- [15] Luetchford KA, Chaudhuri JB, Paul A. "Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering". *Materials Science and Engineering: C*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110116>
- [16] Yang Z, Xu LS, Yin F, Shi YQ, Han Y, Zhang L, Fan DM. "In vitro and in vivo characterization of silk fibroin/gelatin composite scaffolds for liver tissue engineering". *Journal of Digestive Diseases*, 13(3), 168-178, 2012.
- [17] Fan H, Liu H, Wang Y, Toh SL, Goh JCH. "Development of a silk cable-reinforced gelatin/silk fibroin hybrid scaffold for ligament tissue engineering". *Cell Transplant*, 17(12), 13891401, 2008.
- [18] Arkhipova AY, Kotlyarova MC, Novichkova SG, Agapova OI, Kulikov DA, Kulikov AV, Moisenovich MM. "New silk fibroin-based bioresorbable microcarriers". *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(4), 491-494, 2016.
- [19] Chung TW, Chang YL. "Silk fibroin/chitosan-hyaluronic acid versus silk fibroin scaffolds for tissue engineering: promoting cell proliferations in vitro". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(4), 1343-1351, 2010.
- [20] Yan S, Zhang Q, Wang J, Liu Y, Lu S, Li M, Kaplan DL. "Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction". *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6771-6782, 2013.
- [21] Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. "Cell-Laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels". *Biomaterials*, 31(21), 5536-5544, 2010.
- [22] Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. "Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin". *Nature Protocols*, 6(10), 1612-1631, 2011.
- [23] Özgümüş S, Gök MK, Bal A, Güçlü G. "Study on novel exfoliated polyampholyte nanocomposite hydrogels based on acrylic monomers and Mg-Al-Cl layered double hydroxide: synthesis and characterization". *Chemical Engineering Journal*, 223, 277-286, 2013.
- [24] Xu ZP, Stevenson GS, Lu CQ, Lu GQ, Bartlett PF, Gray PP. "Stable suspension of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solution". *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 36-37, 2006.
- [25] Yan S, Gu W, Zhang B, Rolfe BE, Xu ZP. "High adjuvant activity of layered double hydroxide nanoparticles and nanosheets in anti-tumour vaccine formulations". *Dalton Transactions*, 47(9), 2956-2964, 2018.
- [26] Camci-Unal G, Cuttica D, Annabi N, Demarchi D, Khademhosseini A. "Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels". *Biomacromolecules*, 14(4), 1085-1092, 2013.
- [27] Shin SR, Aghaei-Ghareh-Bolagh B, Dang TT, Topkaya SN, Gao X, Yang SY, Khademhosseini A. "Cell-laden microengineered and mechanically tunable hybrid hydrogels of gelatin and graphene oxide". *Advanced Materials*, 25(44), 6385-6391, 2013.
- [28] Bal Öztürk A, Cevher E, Pabuccuoğlu S, Özgümüş S. "pH sensitive functionalized hyperbranched polyester based nanoparticulate system for the receptor-mediated targeted cancer therapy". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(8), 417-432, 2019.
- [29] Cao Y, Lee BH, Peled HB, Venkatraman SS. "Synthesis of stiffness-tunable and cell-responsive gelatin-poly (ethylene glycol) hydrogel for three-dimensional cell encapsulation". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(10), 2401-2411, 2016.
- [30] Mamaghani KR, Naghib SM, Zahedi A, Mozafari M. "Synthesis and microstructural characterization of GelMa/PEGDA hybrid hydrogel containing graphene oxide for biomedical purposes". *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15635-15644, 2018.
- [31] Li C, Mu C, Lin W. "Novel hemocompatible nanocomposite hydrogels crosslinked with methacrylated gelatin". *RSC Advances*, 6(49), 43663-43671, 2016.
- [32] Resmi R, Unnikrishnan S, Krishnan LK, Kalliyana Krishnan V. "Synthesis and characterization of silver nanoparticle incorporated gelatin-hydroxypropyl methacrylate hydrogels for wound dressing applications". *Journal of Applied Polymer Science*, 134(10), 1-9, 2017.
- [33] Usal TD, Yucel D, Hasirci V. "A novel GelMA-pHEMA hydrogel nerve guide for the treatment of peripheral nerve damages". *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 699-706, 2019.
- [34] Wang Y, Ma M, Wang J, Zhang W, Lu W, Gao Y, Guo Y. "Development of a photo-crosslinking, biodegradable GelMA/PEGDA hydrogel for guided bone regeneration materials". *Materials*, 11(8), 1-12, 2018.
- [35] Choi BY, Chalisserry EP, Kim MH, Kang HW, Choi IW, Nam SY. "The Influence of astaxanthin on the proliferation of adipose-derived mesenchymal stem cells in gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels". *Materials*, 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12152416>
- [36] Zhang M, Gao B, Yao Y, Inyang M. "Phosphate removal ability of biochar/MgAl-LDH ultra-fine composites prepared by liquid-phase deposition". *Chemosphere*, 92(8), 1042-1047, 2013.
- [37] Ols HW, Torres-Dorante LO, Eckelt R, Kosslick H. "Comparison of different synthesis routes for Mg-Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties". *Applied Clay Science*, 43(3-4), 459-464, 2009.
- [38] Nogueira KA, Cecilia JA, Santos SO, Aguiar JE, Vilarrasa-García E, Rodríguez-Castellón E, Silva IJ. "Adsorption behavior of bovine serum albumin on Zn-Al and Mg-Al layered double hydroxides". *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 80(3), 748-758, 2016.
- [39] Wang SL, Wang PC. "In situ XRD and ATR-FTIR study on the molecular orientation of interlayer nitrate in Mg/Al-layered double hydroxides in water". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 292(2-3), 131-138, 2007.
- [40] Chubar N. "EXAFS and FTIR studies of selenite and selenate sorption by alkoxide-free sol-gel generated Mg-Al-CO 3 layered double hydroxide with very labile interlayer anions". *Journal of Materials Chemistry A*, 2(38), 15995-16007, 2014.
- [41] Shafiei SS, Shavandi M, Ahangari G, Shokrolahi F. "Electrospun layered double hydroxide/poly (ϵ -caprolactone) nanocomposite scaffolds for adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells". *Applied Clay Science*, 127, 52-63, 2016.

- [42] Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, Shokrgozar MA, Dehghan MM, Larijani B. "Release behavior and signaling effect of vitamin D3 in layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffold: an in vitro evaluation". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 697-708, 2017.
- [43] Theiss FL, Ayoko GA, Frost RL. "Removal of iodate (IO₃⁻) from aqueous solution using LDH technology". *Materials Chemistry and Physics*, 202, 65-75, 2017.
- [44] Theiss FL, Ayoko GA, Frost RL. "Iodide removal using LDH technology". *Chemical Engineering Journal*, 296, 300-309, 2016.
- [45] Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, Shokrgozar MA, Dehghan MM, Larijani B. "Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study". *Materials Science and Engineering: C*, 76, 701-714, 2017.
- [46] Dasgupta, S. "Controlled release of ibuprofen using Mg Al LDH nano carrier". In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 225(1), 1-11, 2017.
- [47] Almeida JF, Ferreira P, Lopes A, Gil MH. "Photocrosslinkable biodegradable responsive hydrogels as drug delivery systems". *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 948-954, 2011.
- [48] Xiao W, Li J, Qu X, Wang L, Tan Y, Li K, Liao X. "Cell-laden interpenetrating network hydrogels formed from methacrylated gelatin and silk fibroin via a combination of sonication and photocrosslinking approaches". *Materials Science and Engineering: C*, 99, 57-67, 2019.
- [49] Zheng J, Zhao F, Zhang W, Mo Y, Zeng L, Li X, Chen X. "Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration". *Materials Science and Engineering: C*, 89, 119-127, 2018.
- [50] Liu J, Li L, Suo H, Yan M, Yin J, Fu J. "3D printing of biomimetic multi-layered GelMA/nHA scaffold for osteochondral defect repair". *Materials & Design*, 171, 1-9, 2019.