



POLİETİLEN GLİKOL DİMETİLAKRİLAT DOKU İSKELELERİNİN DENTRİTİK GÖZENEKLERİ GENİŞLETİLMİŞ MEZOGÖZENEKLİ SİLİKA NANOPARÇACIKLAR İLE KATKILANDIRILMASI VE *IN VITRO* İNCELEMELERİ

¹Didem ŞEN KARAMAN , ²Ayşenur PAMUKÇU 

¹İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İzmir, TÜRKİYE

²İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı, İzmir, TÜRKİYE

¹didem.sen.karaman@ikcu.edu.tr, ²D200203008@ogr.ikc.edu.tr

(Geliş/Received: 24.11.2021; Kabul/Accepted in Revised Form: 16.02.2022)

ÖZ: Bu çalışmada, üç boyutlu (3D) polietilen glükol dimetakrilat (PEGDMA) hidrojel doku iskeleleri hazırlanmış ve hazırlanan doku iskelelerine hücre ekimi doku iskelesi üzerine ve kapsülleme yapılarak iki farklı hücre ekimi metodunu desteklemesi için dentritik mezogözenekli silika nanoparçacık (dMSN) ile katkılandırılması gerçekleştirilmiştir. Yapılan incelemelerle, dMSN'lerin hücre canlılığına yardımcı olmak için yapı iskelelerinin mekanik ve biyolojik aktivitesini düzenleme kapasitesi araştırılmıştır. dMSN'lerin hidrodinamik boyutu, net yüzey yükü ve morfolojisi, sırasıyla dinamik ışık saçılımı, zeta potansiyeli ölçümü ve taramalı elektron mikroskobu görüntülemesi ile karakterize edilmiştir. dMSN'lerin farklı konsantrasyonlarda PEGDMA iskelelerine karıştırılmasından sonra, hidrojel iskelelerinin mekanik ve fiziksel değişiklikleri sıkıştırma testleri ve şişme analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Murin fibroblast hücrelerinin kültürü için PEGDMA iskele matrisinde dMSN varlığının etkisi, kolorimetrik canlılık analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, dMSN katkılandırmasının, 3D PEGDMA iskelelerinin hassas elastik modülleri ve şişme oranları için faydalı olduğunu göstermiştir. Bu bulgular ışığında, dMSN-PEGDMA iskelesi içinde kapsüllenen hücrelerin, değişen dMSN miktarlarına bağlı olarak canlılık oranlarında değişiklik gözlemlenirken, iskelelerin üstüne ekilen hücreler inkübasyon süresi boyunca artan hücre canlılığı sergilemiştir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar, dMSN'lerin, 3D doku iskelesinin özelliklerini ve biyolojik aktivitesini düzenlemek için hidrojel iskele sistemlerinde biyomolekül taşıyıcıları olarak kullanılabileceğini ileri sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezogözenekli silika, Sol-jel, Doku iskelesi, Polimer

Integration of Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles with Enlarged Pores into Polyethylene Glycol Dimethacrylate Scaffold and *In Vitro* Investigations

ABSTRACT: In this study, three-dimensional (3D) polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDMA) hydrogel scaffolds were prepared and doped with dendritic mesoporous silica nanoparticle (dMSN) to support two different cell cultivation methods by cell encapsulation and cell seeding on the prepared scaffolds. During studies, the effect of dMSNs in modulating the mechanical and biological activity of scaffolds was investigated to aid cell viability. Hydrodynamic size, net surface charge, and morphology of dMSN were characterized by dynamic light scattering, zeta potential measurement, and scanning electron microscopy imaging, respectively. After the blending of dMSN into PEGDMA scaffolds at different concentrations, mechanical and physical changes of hydrogel scaffolds were investigated by employing compression tests and swelling analysis. Effect of dMSN presence in PEGDMA scaffold matrix for culture of murine fibroblast cells were evaluated by colorimetric viability analysis. Results demonstrated that the

blending of dMSN is beneficial to fine tuning elastic moduli and swelling ratios of 3D hydrogel scaffolds. These findings are endorsed with the viability assays demonstrating that cells encapsulated within dMSN-PEGDMA showed different degrees of viability in relation to dMSN concentration while cells seeded on top of the scaffolds exhibited increased cell viability over incubation time. Taken together, these results suggested that dMSN could be employed as biomolecule carriers in hydrogel scaffold systems to alter desired properties and to regulate the biological activity.

Keywords: *Mesoporous silica, Sol-gel, Tissue scaffold, Polymer*

GİRİŞ (INTRODUCTION)

Hidrojeller, doku mühendisliği uygulamalarında besin ve oksijen alışverişini sağlayan üç boyutlu polimerik ağlar olmaları sebebi ile oldukça ilgi duyulan yapılardır. Ayrıca hidrojeller barındırdıkları hücreleri mekanik stres ve sitotoksik ürünler gibi çevresel faktörlerden koruyabilirler. Hidrojel doku iskeleleri, doğal veya sentetik kökenli çok çeşitli polimerler kullanılarak üretilebilir. Sentetik olan hidrojeller arasında biyoinert hidrojel yapı iskeleleri büyük ilgi görmüştür ve serbest radikal fotopolimerizasyon yöntemleriyle çapraz bağlayarak oluşturulabilen polietilen glikol (PEG) ve PEG türevleri (PEG-diakrilat, PEG-metakrilat) yapıları oldukça ilgi duyulan polimerler arasına girmiştir. Polietilen glikol dimetil akrilat (PEGDMA) hidrojellerinin fizikokimyasal özellikleri, ilgili uygulama için polimer derişimi değiştirilerek modüle edilebilir (Mohammadi ve diğ., 2018; Burke ve diğ., 2019). Genel olarak, PEG ve türevleri kullanılarak üretilen hidrojel iskeleleri, istenen aktiviteyi göstermek için biyoaktif ipuçlarına sahip olacak şekilde modifiye edilebilirler (Tan ve diğ., 2017; Invagle ve diğ., 2014). Fakat uygulama açısından değerlendirildiğinde, özellikle çapraz bağlama yapılacak polimerlerin elde edilmesi için karmaşık sentez yöntemlerine ihtiyaç duyulması ve hidrojellerin çapraz bağlama işlemi sırasında yüksek monomer tüketimi ihtiyacının oluşması gibi dezavantajlar bulunmaktadır (Gong ve diğ., 2003). Bu nedenle, özellikle doku mühendisliği alanında, biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalar için daha iyi mekanik ve biyoaktif özelliklere sahip malzemelerin geliştirilmesinde, kolay ve karmaşık olmayan mekanik dayanımı artırılmış hidrojellere ihtiyaç vardır. Literatürde bu konuda yapılan çalışmalar arasında özellikle nanoparçacıklar ile katkılanarak elde edilmiş sentetik hidrojellerin hem mekanik özelliklerinin ihtiyaca göre ayarlanabilmesi hem de fonksiyonelliğinin artırılabilmesi açısından bu uygulamanın faydalı bir yaklaşım olduğu ileri sürülmüştür (Noh ve diğ., 2019; Huang ve Chu 2019).

Son dönemde mezogözenekli silika nanoparçacıkların (MSN) doku mühendisliği uygulamalarında öne çıkan avantajları dikkat çekmektedir (Lee ve diğ., 2013; Baumann ve diğ., 2017). Örneğin doku canlanmasında ve hücre farklılaşmalarında ihtiyaç duyulan biyomoleküllerin hücre ekilen ortama taşınması için doku iskeleleri ile birleştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Darouie ve diğ., 2020; Zhou ve diğ., 2015). Bu uygulamalar için mezogözenekli silika nanoparçacıklarının biyoyumlu olması, biyobozunur olması, geniş yüzey alanına sahip olmaları önemli avantajlar sağlamaktadır (Rosenholm ve diğ., 2016). MSN'lerin mezogözenekli yapısı, çeşitli moleküllerin yüksek miktarlarda yüklenmesini ve sürekli salımını sağlar. Bu uygulamalarda MSN'nin önem taşıyan özelliklerinden gözenek boyutu ve gözenek hacmi sentez kimyasında yapılan değişiklikler ile kolayca manipüle edilebilir (Fuertes ve diğ., 2010; Kao ve Mou 2013; Shen ve diğ., 2014). Ayrıca, MSN'lerin yüzey kimyasının çeşitlendirilebilmesi biyoaktif moleküller ile birleştirme fırsatı sağlar. Özellikle doku mühendisliği ile ilgili son dönemdeki çalışmalarda silikanın kemik ikamesi olarak kullanılabilirliği ve osteokondüktif olduğu belirtilmiştir (Heinemann ve diğ., 2007). Amorf silikanın matrisinde ve yüzeyinde yer alan silanol grupları sayesinde biyolojik olarak aktif kemik benzeri apatit oluşumunu destekleyebileceği ve özellikle kemik dokusu oluşumu için silika bazlı doku iskelelerinin biyoaktivitesinin biyobozunum esnasında açığa çıkan silisik asit sayesinde arttırılabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, geleneksel olarak 2-3 nm gözenek boyutuna sahip MSN yapılarının sentetik doku iskelelerinde biyomolekül taşıyıcısı olarak yer alabilmesi için gözenek boyutlarının genişletilecek bir sentez reçetesinin sağlanması önem taşımaktadır (Hu ve diğ., 2020). Çalışmamızda PEGDMA sentetik hidrojel doku iskelesine biyomolekül taşıma özelliği sağlayacak

şekilde MSN'ler elde edilerek katkılandırma gerçekleştirilmiştir. MSN'lere sentez aşamasında müdahale edilerek yüksek miktarda biyomolekül taşıyıcı özelliği kazandırabilmek için, su ve yağdan oluşan iki fazlı tabakalaşmaya dayalı yeni bir sol-jel yaklaşımı kullanılmıştır. İki fazlı tabakalaşma yaklaşımı, büyük kargo biyomoleküllerinin iletimi için faydalı olan daha büyük gözenekli, yani 10 nm ve üzeri, MSN'lerin sentezini sağlayacağı ön görülerek literatürde yer alan reçete modifiye edilerek uygulanmıştır (Shen ve diğ. 2014).

Bu çalışmada, biyoaktivitesi bulunmayan PEGDMA sentetik doku iskelesinin biyolojik etkinliğinin PEGDMA polimerinde herhangi bir kimyasal modifikasyon gerçekleştirilmeksizin genişletilmiş dentritik gözenek yapısına sahip mezogözenekli silika nanoparçacıklar (dMSN) aracılığı ile sağlanmasına çalışılmıştır. PEGDMA'nın dMSN ile katkılandırılması ile elde edilen üç boyutlu doku iskelesinin; i) doku oluşumunu destekleyen mekanik dayanıma sahip olması ii) doku mühendisliği uygulamalarında hücre farklılaşmasını teşvik edecek biyomoleküllerin kültür ortamına sağlayabilecek özellikte olması iii) biyoyumluluğunu ve biyoaktivitesini artırması amaçlanmıştır. Çalışmalar sırasında, foto-polimerizasyon yöntemleri kullanılarak PEGDMA polimeri ile dMSN'ler birleştirilerek ve birleştirilmeksizin üç boyutlu ortamlar oluşturulmuştur. Elde edilen üç boyutlu doku iskelesinin doku canlılığı üzerindeki etkileri, doku iskelesinin mekanik özellikleri ve biyoyumluluğu incelenerek gerçekleştirilmiştir. Biyoyumluluk incelemelerinde 3D hidrojel doku iskelesine hücrelerin ekilmesi için iki farklı strateji olan hidrojel doku iskeleleri foto-polimerizasyon ile oluşturulduktan sonra üstüne ekilmesi ve foto-polimerizasyon uygulama öncesi enkapsülasyon stratejileri kullanılmıştır. Gerçekleştirilen incelemeler sonucunda geliştirilen kompozit yapıdaki üç boyutlu sentetik hidrojel doku iskelesinin doku oluşumunu destekleyecek şekilde biyo-benzer özellik taşıdığı ve MSN katkılandırılmasının biyoyumluluğu arttırdığı sonucuna varılmıştır. İleriye dönük olarak gerçekleştirilen bu çalışma dMSN yapısının özellikle biyomolekül taşıyıcısı olarak PEGDMA polimeri ile oluşturulan üç boyutlu doku iskelelerinde kullanımının önünü açmıştır.

MATERYAL VE METODLAR (MATERIALS AND METHODS)

Dentritik Gözenekleri Genişletilmiş Mezogözenekli Silika Nanoparçacıkların (dMSN) Sentezi ve Karakterizasyonu (Synthesis and Characterization of Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles (dMSN) with Enlarged Pores)

Dentritik yapıdaki gözenekleri genişletilmiş mezogözenekli silika nanoparçacıkların (dMSN) sentezi, Shen ve arkadaşlarının reçetesi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Shen ve diğ. 2014). Sentez için 200 mL'lik hacimde silika kaynağı olarak %20 (hacim/hacim) tetraetil ortosilikat (TEOS) kullanılmıştır. Sentez için yapı düzenleyici ajan olarak setil-trimetil-amonyum-bromür (CTAB) kullanılmıştır. Bazik sulu faz için, 150 mL damıtılmış H₂O'ya 17 g CTAB dikkatlice ilave edilmiş ve CTAB tamamen çözündürüldükten sonra çözeltiliye 400 µL trietanolamin (TEA) bazı eklenmiştir. Nihai karışım, 60°C'de ve 150 rpm'de 1 saat karıştırılmıştır. Peşi sıra silika kaynağı olan 10 mL TEOS 40 ml sikloheksan çözeltilisi içinde homojen olarak karıştırılarak oluşturulan üst yağ fazı sulu faz üzerine yavaşça eklenmiştir. Sentez karışımı 18-24 saat boyunca 60°C sıcaklığa sahip yağ banyosu içerisinde karışmaya bırakılmıştır. Sentez tamamlandıktan sonra elde edilen dMSN ürünü 4500 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek toplanmıştır. Elde edilen ürün iki kez mutlak etanolde yıkanarak arta kalan yağ kalıntılarından arındırılmıştır. Gözenek yapısı düzenleyici olan CTAB'in dMSN matriksinden arındırılması için çözücü ile arındırma metodu uygulanmıştır. Çözücü ekstraksiyonu için %1,2 (ağırlık/hacim) amonyum nitrat-mutlak etanol solüsyonu kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi, dMSN'lerin 60°C'de 12 saat boyunca hazırlanan solüsyonda karıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra, ürünler 10000 rpm'de ve 4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve ardı sıra mutlak etanol ile yıkanmıştır. Çözücü ile arındırma işlemi 1 kez daha gerçekleştirildikten sonra, dMSN'ler DMF içinde dağıtılarak daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Elde edilen dMSN'lerin aşağıda belirtilen karakterizasyonları gerçekleştirildikten sonra PEGDMA içinde homojen bir şekilde dağıtılabilmesi ve ileriye dönük uygulamalarda kullanılacak biyomoleküllerle olan etkileşiminin artırılması için ön çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında aminopropil etilsilan (APTES) ve süksinik

anhidrit kullanılarak kimyasal yüzey modifikasyonu gerçekleştirildi. dMSN'lerin yüzey modifikasyonlarının ilk adımında, nanoparçacık yüzeyinde karboksil modifikasyonu eklenebilmesi için gerekli olan kök amin gruplarını sağlayacak aminopropil etilsilan ile reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 2,5 mg/mL derişimindeki dMSN'ler, bir sonikasyon banyosu kullanılarak 20 dakika boyunca toluen içinde dağıtıldı. Daha sonra solüsyona 1:1 oranında APTES çözeltisi (μL APTES: mg nanoparçacık) pipetlendi. Reaksiyon, gece boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Ertesi gün, fazla reaktantlarla birlikte toluen, çözeltinin 12000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmesiyle uzaklaştırıldı ve elde edilen ürün dMSN-APTES olarak adlandırıldı. dMSN-APTES daha sonra mutlak etanol ile yıkandı ve dMSN yüzeyinde karboksil gruplarının oluşturulması için süksinik anhidrid kullanılarak modifikasyon işlemine tabi tutuldu. Detayında, dMSN-APTES (10 mg/mL) sonikasyon yoluyla DMF içinde dağıtıldı. Daha sonra sonikasyon sırasında dMSN-APTES solüsyonuna süksinik anhidrit (10,3 mg/mL) ilave edildi. Elde edilen süspansiyon gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Ertesi gün karışım 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve reaksiyona katılmayan süksinik anhidritin fazlası arındırıldı. Elde edilen ürün dMSN-APTES-SUCC olarak isimlendirildi, daha sonra sonikasyon ve santrifüjleme yoluyla iki kez mutlak etanol ile yıkandı. dMSN-APTES-SUCC örneği daha sonra DMF içinde dağıtıldı ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı.

Sentezlenen dMSN yapısının yüzey alanı (BET), gözenek boyutu (dP) ve gözenek hacminin (VP) belirlenmesi ve böylece genişletilmiş gözenek yapısına sahip olduğunu göstermek amacı ile N_2 adsorpsiyon analizi Micromeritics 3Flex cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz için üretilmiş olan nanoparçacıklardan yaklaşık 200 mg kullanılmıştır. Elde edilen nanoparçacıkların morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile görüntülemesi yapılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 100 μL etanol içerisinde dağıtılan örnek süspansiyonları kuponlara damlatılarak tozsuz bir ortamda kurumaya bırakılmış ve ertesi gün tüm numunelere altın ile kaplama yapıldıktan sonra görüntülemeye alınmıştır. Elektron mikroskopu ile görüntülemeler yapıldıktan sonra dMSN-APTES-SUCC'nin hidrodinamik boyutu ve zeta potansiyeli, MSN'lerin 0,25 mg/mL derişimde 4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-etansülfonik asit (HEPES) tampon çözeltisi (pH=7,2, 25 mM) içinde dağıtılarak belirlenmiştir. Ölçüm sonuçları, Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak dinamik ışık saçılım yöntemiyle üç tekrarlı olacak şekilde ve her bir ölçüm en az 10 kez yapıp ortalaması alınarak elde edilmiştir. Böylece, elde edilen son nanoparçacık ürününün (dMSN-APTES-SUCC) morfoloji, hidrodinamik çap ve zeta potansiyeli belirlenerek karakterizasyonu tamamlanmıştır.

Üç Boyutlu Polietilen Glikol Dimetil Akrilat (PEGDMA) Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu (Preparation and Characterization of Three Dimensional Polyethylene Glycol Dimethacrylate (PEGDMA) Tissue Scaffolds)

Doku iskelelerinin hazırlanması için literatürdeki benzer reçetelerden faydalanılarak, %15 (a/h) derişimde PEGDMA ve %0,5 (a/h) derişiminde foto başlatıcı olan 2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2 - metilpropiofenon içeren fosfat tamponlu salin (PBS) hazırlandı (Noh ve diğ. 2017). Polimer öncü çözeltisinin homojen olarak dağıtılmasından sonra UV ışığı kullanılarak fotopolimerizasyon işlemi gerçekleştirildi. PEGDMA hidrojenlerinin tam polimerizasyonu için bir teflon kalıp ile bir cam slayt arasına 30 μL öncü çözelti pipetlendi ve 7 mW/cm^2 yoğunlukta 365 nm UV ışığı 2 dakika süreyle uygulandı. PEGDMA hidrojenlerinin dMSN-APTES-SUCC ile katılandırılmasında 3 farklı derişim denendi. Bu aşamada PEGDMA hidrojeni, dMSN'ler ile %0,25, %0,5 ve %1 (ağırlık/ağırlık: dMSN-APTES-SUCC /PEGDMA) olmak üzere üç farklı oranlarda birleştirildi. Bunun için bileşenler ilk önce %0,5'lik (a/h) fotobaşlatıcı solüsyonunda ayrı ayrı dağıtıldı ve PEGDMA polimeri ile birleştirildi. Polimer öncü çözeltisi daha sonra bileşenlerin eşit dağılımını sağlamak için bir sonikasyon banyosu kullanılarak homojenleştirildi. dMSN-APTES-SUCC-PEGDMA polimerizasyonları yukarıda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Farklı oranlarda dMSN-APTES-SUCC ile katılandırılmış olan PEGDMA hidrojenler sırası ile isimlendirmeyi kolaylaştırmak adına 0,25MSN-PEGDMA, 0,5MSN-PEGDMA ve 1MSN-PEGDMA kısaltılarak olarak isimlendirildi.

Elde edilen dMSN içeren ve içermeyen 4 farklı kompozisyona sahip 3D hidrojel doku iskelelerinin mekanik incelemeleri için sıkıştırma ve şişme testleri gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan hidrojellerin mekanik dayanımı, mekanik test cihazı (Discovery HR-2 hibrit reometre) ile hidrojellere sıkıştırma testi uygulanarak belirlendi. Tek eksenli sıkıştırma testleri sırasında, dMSN'in PEGDMA hidrojellerinin sıkıştırma modülü üzerindeki etkisi değerlendirildi. Bunun için farklı dMSN katkılandırma oranına sahip doku iskeleleri 20 mm çapında ve 1 mm kalınlığında diskler şeklinde üretilmiş ve 24 saat boyunca PBS'te bekletilmiştir. Daha sonra hidrojeller oda sıcaklığında 10 µm/s'lik çapraz kafa hızına tabi tutularak ve 20 mm'lik bir paralel plaka kullanılarak sıkıştırma testine tabi tutulmuştur. Farklı miktarlarda dMSN (0,25, 0,5 ve %1 (a/a)) içeren PEGDMA hidrojelleri için sıkıştırma modülü, sıkıştırma testi sonucu elde edilen stres-gerinim eğrilerinin lineer bölgesine (%25-35 gerinim) tekabül eden eğim kullanılarak hesaplanmıştır.

Farklı oranlarda dMSN ile katkılandırmanın hidrojellerin şişme özellikleri üzerindeki etkisi şişme testi ile araştırılmıştır. Testin gerçekleştirilmesi için 0,25MSN-PEGDMA, 0,5MSN-PEGDMA, 1MSN-PEGDMA ve katkılandırma yapılmamış PEGDMA hidrojelleri PBS tampon çözeltisinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. PBS uzaklaştırıldıktan sonra, hidrojel yüzeylerindeki fazla sıvı elimine edildi ve şişmiş ağırlıklar (W_s) ölçüldü. Kuru ağırlığın (W_D) belirlenmesi için aynı hidrojeller 60°C'de 24 saat vakumla kurutulmuş ve tekrar tartılmıştır. Her hidrojel yapısının şişme yüzdesi, W_s (şişmiş hidrojel ağırlığı) ve W_D (kuru hidrojel ağırlığı) değerleri kullanılarak aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme (\%)} = \left(\frac{W_s - W_D}{W_D} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

***In Vitro* Sitotoksitesite Testleri (*In Vitro* Cytotoxicity Assays)**

In vitro hücre kültürü çalışmalarında dMSN-APTES-SUCC nin tek başına ve üretilen 3D PEGDMA doku iskelelerinin sitotoksitesitesinin araştırılması için L929 sıçan fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. L929 hücreleri %10 (h/h) fetal sığır serumu ve %1 (h/h) penisilin-spreptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde büyütülmüştür. Sitotoksitesite testleri sırasında hücreler flask yüzeyinden %0,05 tripsin-EDTA ile kaldırılarak belirlenen yoğunlukta 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. dMSN-APTES-SUCC'nin tek başına sitotoksitesitesinin araştırılması için hücreler 7000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve yüzeye tutunmaları için 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Takip eden gün, kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak farklı derişimlerde (10, 25, 50 ve 100 µg/mL) dMSN içeren taze besiyeri hücreler üzerine eklenmiş, plakalar 24 ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa alamarBlue™ Hücre Canlılığı Reaktifi (%10 h/h) ilave edilip karanlık bir ortamda 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Alamar Blue Hücre reaktifi solüsyonunda bulunan resazurin boyasının canlı hücreler tarafından indirgenmesiyle ortaya çıkan resorufin ürününü ölçmek için CLARIOstar® plaka okuyucu ile 530/590 nm'lik uyarma/yayma dalga boyunda floresan ölçümü yapılmıştır. Deneyler sırasında nanoparçacık uygulanmamış hücre grupları negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

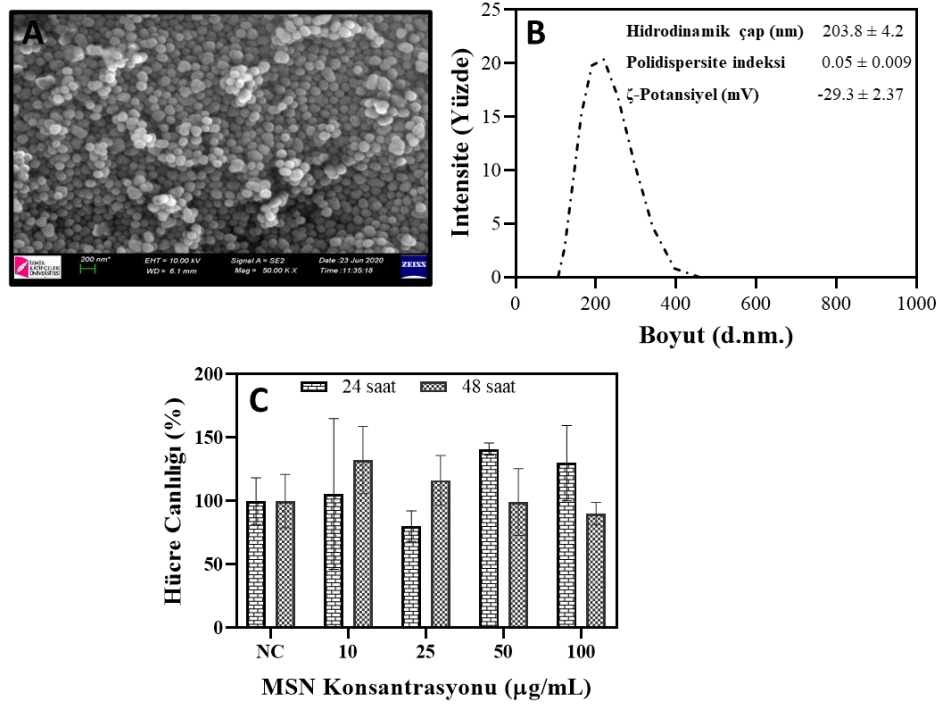
Daha sonraki adımda, dMSN-APTES-SUCC ile katkılandır yapılmış (0,25MSN-PEGDMA, 0,5MSN-PEGDMA ve 1MSN-PEGDMA) ve katkılandırma yapılmamış üç boyutlu hidrojel (PEGDMA) *in vitro* biyoyumlulukları açısından test edilmiştir. Üç boyutlu hücre kültürü için hücreler, iskele matrisi içinde kapsüllenerek ve doku iskelesi üzerine hücre ekimi yapılarak incelenmiştir. Hücrelerin kapsüllenmesi için, ilk önce polimer öncü çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra 5 × 10⁶ hücre/mL yoğunluğundaki L929 hücreleri, polimerizasyondan hemen önce öncü çözeltilerle karıştırılmıştır. 30 µL hücre-polimer karışımı daha sonra 2 dakika boyunca 7 mW/cm² yoğunlukta 365 nm UV ışığı kullanılarak polimerleştirilmiştir. Hücre kapsüllenmiş hidrojel doğrudan kültür ortamına aktarılmıştır. Kültür ortamı, reaksiyona girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması için 1 saat sonra taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Üç boyutlu doku iskelesi üzerine hücre ekimi için ise PEGDMA hidrojel doku iskeleleri dMSN-APTES-SUCC ile katkılandırma yapılmamış ve katkılandırılmış gruplar halinde hazırlanmış ve 30 µL polimer solüsyonu 2 dakika boyunca 7 mW/cm² yoğunlukta 365 nm UV ışığı kullanılarak polimerleştirilmiştir. Elde edilen hidrojel yapıları besiyerinde 30 dakika bekletildikten sonra üzerine yoğunluğu 5 × 10⁶ hücre/mL olacak

şekilde L929 hücreleri ekilmiştir. Daha sonra, iki ayrı grup olarak hücre kapsüllemesi yapılmış ve üzerine hücre ekilmiş doku iskeleleri 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı, iskelelerin doğrudan alamarBlue™ Hücre Canlılığı Reaktifi (%10 h/h) ile karanlık bir ortamda 4 saat süreyle inkübe edilmesiyle değerlendirilmiştir. Hücre canlılığının göstergesi olan rezazurin boyasının canlı hücreler tarafından indirgenmesiyle ortaya çıkan resorufin floresan ürününü ölçmek için CLARIOstar® plaka okuyucu ile 530/590 nm'lik uyarma/yayma dalga boyunda floresan ölçümü yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMALAR (RESULTS and DISCUSSIONS)

Dentritik Gözenekleri Genişletilmiş Mezogözenekli Silika Nanoparçacıkların (dMSN) Karakterizasyonu (Characterization of Dentritic Mesoporous Silica Nanoparticles with Enlarged Pores (dMSN))

Üç boyutlu PEGDMA hidrojel doku iskelelerinin fizikokimyasal özelliklerini modüle etmesi ve ilerideki doku mühendisliği çalışmalarında hücre farklılaşmasında yardımcı olacak biyomoleküllerinin ortama iletimi için taşıyıcı görevi görecektir. Dentritik yapıda ve genişletilmiş gözenek yapısına sahip dMSN'ler sol-jel yöntemi ile üretilmiştir. Gözenek genişliğine müdahale edilmesine olanak veren ve yeni bir sol-jel yaklaşımı olan iki fazlı tabakalaşma metodu bu çalışmada kullanılan dMSN'lerin üretimi sırasında kullanılmıştır. Üretilen dMSN'lerin BET analizi sonucunda $668,31\text{m}^2/\text{g}$ yüzey alanına, $8,83\text{nm}$ ortalama gözenek boyutuna ve $1,11\text{cm}^3/\text{g}$ gözenek hacmine sahip olduğu belirlenmiştir. SEM analizi ile elde edilen nanoparçacıkların başarılı bir şekilde üretildiği, boyutu ve eş büyüklüklü dağılımı olduğu belirlenmiştir. Şekil 1A'da verilen SEM görüntüsü küresel şekle sahip yaklaşık $150\text{-}200\text{nm}$ aralığındaki dMSN'lerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 1. A) dMSN'in SEM görüntüsü, B) dMSN-APTES-SUCC'nin boyut dağılım grafiği ve C) dMSN-APTES-SUCC'nin sitotoksikite sonucu.

Figure 1. A) SEM image of dMSN, B) Size distribution graph of dMSN-APTES-SUCC and C) Cytotoxicity result of dMSN-APTES-SUCC.

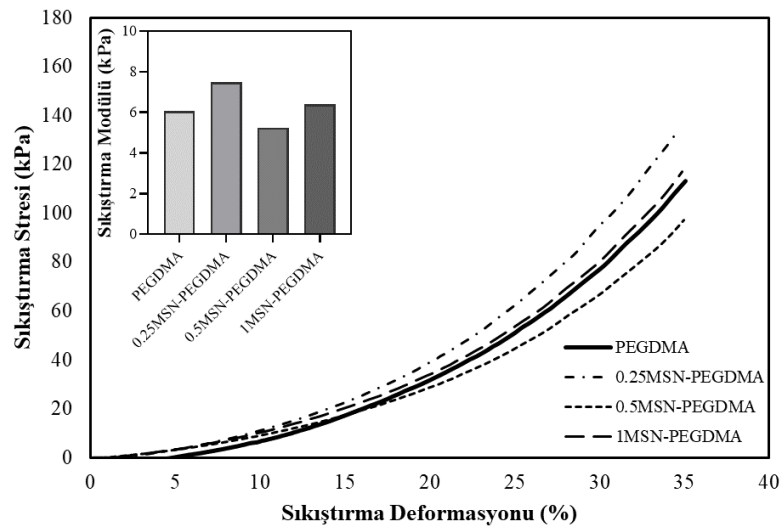
Nanoparçacıkların morfolojisinin SEM analizi ile doğrulanmasının ardından aminopropil silan ve akabinde süksinik anhidrid ile yüzey modifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve dMSN yüzeyinde nihai olarak karboksil grupları oluşturulmuştur. Oluşturulan karboksil gruplarının dMSN-APTES-SUCC'nin koloidal kararlılığına etkisi ve net yüzey yükü DLS ve ζ -potansiyel ölçümleri ile incelenmiştir. Şekil 1B'de

de sunulduğu gibi dMSN-APTES-SUCC nanoparçacıkları $203,8 \pm 4,2$ nm çapa ve $0,05 \pm 0,009$ PDI değerine sahiptir. PDI değeri süspansiyon içindeki nanoparçacıkların boyut benzerliğinin önemli bir ölçüsü olarak kabul edilmekte ve $0,08$ 'den küçük PDI değeri elde edilen örnekler eş büyüklüklü dağılıma sahip olarak sınıflandırılmaktadır. dMSN-APTES-SUCC'nin ζ -potansiyel değeri ise $-29,3 \pm 2,4$ mV olarak belirlenmiş olup artan negatif yüzey yükü karboksil gruplarının yüzeyde oluşturulduğunu ve kolloidal kararlılığı sağlamak için yeterli olduğunu göstermektedir.

dMSN-APTES-SUCC nanoparçacığının karakterizasyonunun son aşamasında ise olası sitotoksitesi L929 hücre hattında incelenmiştir. Şekil 1C'de verilen sonuçlar ışığında nanoparçacıkların hücrelerde herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadığı ve yüksek derişimlerde bile hücre canlılığının yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

dMSN Katkılandırılmış ve Katkılandırılmamış Üç Boyutlu Polietilen Glikol Dimetil Akrilat (PEGDMA) Doku İskelelerinin Karakterizasyonu (Characterization of Three Dimensional Polyethylene Glycol Dimethacrylate (PEGDMA) Tissue Scaffolds with / without dMSN)

Doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin modüle edilmesi ve hücre tutunması gibi biyolojik işlevlerin kazandırılması için PEG-tabanlı hidrojelere MSN ile birleştirilmesi son yıllarda uygulanan bir yaklaşım olmuştur. Zhan ve arkadaşları da silika nanoparçacıkların PEGDA hidrojelinin viskoelastik özelliklerine olan etkisini incelemiş ve düşük derişimde silika nanoparçacık ile katkılandırılmış hidrojel bile viskoelastik özelliklerinde farklılıklar olduğunu göstermiştir (Zhan ve diğ. 2017). Bu bağlamda çalışmamızda PEGDMA doku iskelelerinin katkılandırılmasında kullanılan farklı derişimdeki dMSN-APTES-SUCC'lerin iskelelerin mekanik dayanım ve su çekme kapasitesi gibi fizikokimyasal özelliklerine olan etkisi incelenmiştir. İlk aşamada, disk şeklinde hazırlanan hidrojellerin artan sıkıştırma kuvvetine karşı olan tepkisi incelenmiş ve sıkıştırma modülü (Şekil 2) hesaplanmıştır.



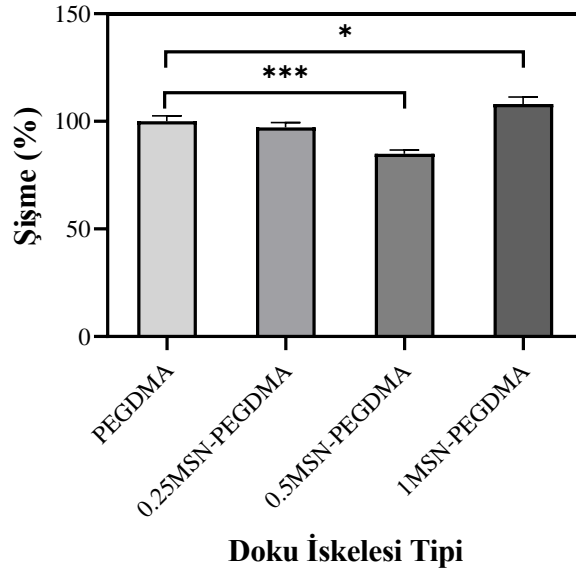
Şekil 2. MSN katkılandırılmış ve katkılandırılmamış PEGDMA doku iskelelerinin sıkıştırma stresi-deformasyon grafiği. İçteki şekil stres-deformasyon grafiği kullanılarak hesaplanan sıkıştırma modülü değerlerini göstermektedir.

Figure 2. Compressive stress vs. strain graph of PEGDMA tissue scaffolds with / without MSN. Inset graph shows the compressive modulus values calculated using the stress-strain graph.

Şekil 2'de gösterildiği üzere %0,25 (a/a) dMSN-APTES-SUCC ile katkılandırılmış PEGDMA doku iskelesinin, 0,25MSN-PEGDMA, mekanik dayanımı kontrol grubuna göre artarken %0,5 (a/a) dMSN-APTES-SUCC oranında katkılandırmanın yapıldığı 0,5MSN-PEGDMA grubunun mekanik dayanımında düşüş gözlenmiştir. %1 (a/a) dMSN-APTES-SUCC ile katkılandırma yapılan 1MSN-PEGDMA doku

iskelesinin strese karşı gösterdiği deformasyon ise kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir. Sıkıştırma stresi – deformasyon eğrilerinin lineer bölgesi kullanılarak hesaplanan sıkıştırma modülü değerleri de aynı trende sahip olup gruplar arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

Sıkıştırma testinde kullanılan örnek gruplarının aynuları şişme testine tabi tutularak değişen dMSN-APTES-SUCC oranlarının PEGDMA hidrojellerinin su tutma kapasitesine olan etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ağırlıkça %0,25 ve %0,5 (a/a) dMSN-APTES-SUCC içeren doku iskelelerinin su tutma kapasitesinde derişimle orantılı bir düşüş gözlemlenmiştir. %1 (a/a) dMSN-APTES-SUCC ile katkılanmış 1MSN-PEGDMA doku iskelesinin şişme derecesinde ise artış elde edilmiştir. Bu sonuç göz önüne alınarak belli bir nanoparçacık derişimine kadar doku iskelelerinin şişme derecesindeki düşüşün nanoparçacıkların polimer ağındaki zincirlerin hareketini kısıtlamasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Gaharwar ve arkadaşları da artan silika nanoparçacık derişiminin PEG hidrojellerinin şişme derecesini düşürdüğünü göstermiştir (Gaharwar ve diğ. 2013). %1 (a/a) dMSN-APTES-SUCC içeren 1MSN-PEGDMA doku iskelelerindeki artış ise çok önemli derecede olmamakla beraber, bu etkinin yüksek derişimde dMSN-APTES-SUCC'nin polimer ağında porojen gibi davranması ve gözenekli yapısından ötürü gözeneklerinde suyu hapsedme ihtimalinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 3. MSN katkılanmış ve katkılanılmamış PEGDMA doku iskelelerinin şişme testi sonucu.

Figure 3. Swelling test result of PEGDMA tissue scaffolds with / without MSN.

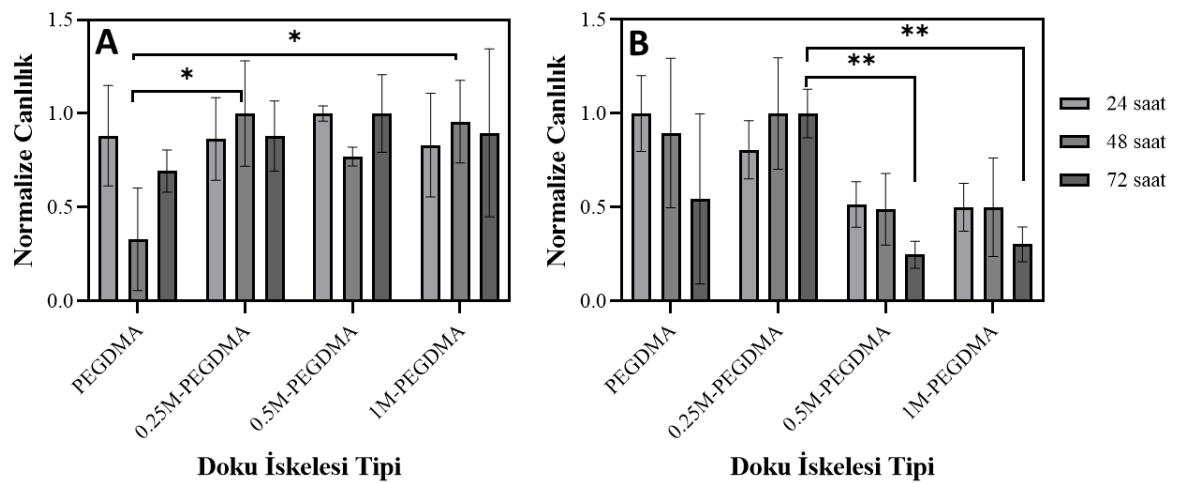
3.3 *In vitro* Sitotoksinite Testleri (*In Vitro* Cytotoxicity Assays)

dMSN-APTES-SUCC ile katkılanmış PEGDMA üç boyutlu hidrojel doku iskelelerinin hücre canlılığına olan etkisi *in vitro* sitotoksinite testleri ile incelenmiştir. Değişen dMSN-APTES-SUCC derişiminin yanı sıra, hücrelerin doku iskelesi ile birleştirilme şekli de incelenmiş, bunun için L929 hücreleri hem doku iskelesi içine kapsüllenmiş hem de üzerine ekilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılığı alamarBlue™ Hücre Canlılığı Reaktifleri kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4A), dMSN-APTES-SUCC katkılanmış PEGDMA doku iskelesi üzerine ekilen hücrelerin canlılığı kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Bir diğer yandan, farklı dMSN-APTES-SUCC miktarlarıyla katkılanmış PEGDMA doku iskelelerinde hücre canlılığı açısından önemli bir fark oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bu veriden yola çıkılarak farklı derişimlerde dMSN-APTES-SUCC bulunan doku iskelelerinin üzerine hücre ekilmesi durumunda hücre canlılığının nanoparçacık derişiminden etkilenmediği sonucuna varılabilir.

Hücrelerin doku iskelesine kapsüllenmesi durumunda, artan nanoparçacık derişiminin hücre canlılığını olumsuz etkilediği ve hücrelerin nanoparçacık derişimine bağlı olarak farklı derecelerde

canlılığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doku iskeleleri grupları arasında, 0,25MSN-PEGDMA doku iskelesinin Şekil 4B'de görüldüğü üzere hücreler üzerinde sitotoksik bir etki oluşturmadığı ve analiz edilen zaman süresinde biyoyumlu olduğu gözlemlenmiştir. 0,5/1MSN-PEGDMA doku iskelelerine kapsüllenmiş hücrelerin canlılık değerlerinde meydana gelen düşüşün ise yüksek dMSN-APTES-SUCC derişiminden ötürü oksijen ve besinlerin difüzyonunun azalması veya hücrelerin hareketlerini kısıtlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bir diğer sonuç olarak ise, belirlenen hücre yoğunluğunun doku iskelesi üzerinde kültürlenme için yeterli gelmesine rağmen, doku iskelesine kapsülleme için yetersiz gelmesi ve bundan ötürü hücreler arası iletişim ve etkileşimin beklenen düzeyde gerçekleşmemesine bağlı olarak hücre canlılığında düşüş meydana gelmesi olabilir (Perera ve diğ. 2018; Lam ve diğ. 2020). Buradan hareketle, ilerleyen çalışmalarda hücre kapsülleme çalışmalarında hücre yoğunluğunun canlılığa olan etkisi ve uygun derişimin optimize edilmesi yönünde çalışmalar yapılması uygun olacaktır.



Şekil 4. MSN katkılandırılmış ve katkılandırılmamış PEGDMA doku iskelelerinin A) üzerine hücre ekilmesi B) içine hücre kapsüllemesi sonucu elde edilen hücre canlılığı sonuçları.

Figure 4. Cell viability results obtained due to A) cell seeding, B) cell encapsulation of PEGDMA tissue scaffolds with / without MSNs.

SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Çalışmanın içeriğinde, dentritik yapıda genişletilmiş gözenek dizilimine sahip mezogözenekli silika nanoparçacıkları literatürdeki reçete modifiye edilerek özgün bir sol-gel sentez reçetesi ile oluşturulmuştur. Buna ilaveten, elde edilen dMSN'lere biyomolekül taşıma potansiyelini arttıracak ön görülen peşi sıra amin ve karboksil yüzey modifikasyonları sağlanarak dMSN-APTES-SUCC nanoparçacığı elde edilmiştir. Gözenek yapısı ve yüzey kimyası itibari ile biyomolekül taşıma özelliğine sahip bu mezogözenekli silika nanoparçacıklar herhangi bir biyolojik aktivite göstermeyen PEGDMA üç boyutlu doku iskelesinin içerisine başarıyla katkılandırılmış aynı zamanda hücre canlılığının artmasına katkıda bulunmuştur. Farklı oranlardaki dMSN-APTES-SUCC katkılandırmasının doku iskelelerindeki hücre çoğalmasına etkisinin hücre ekim yolu ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Hücre kapsülleme işlemi yapılmış MSN-PEGDMA doku iskelelerinde dMSN-APTES-SUCC derişimine bağlı bir etki görülürken doku iskelelerinin üzerine hücre ekimi yapıldığında dMSN-APTES-SUCC derişiminden çok zamana bağlı bir değişim olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

Baumann, B., Jungst, T., Stichler, S., Feineis, S., Wiltschka, O., Kuhlmann, M., Linden, M. ve Groll, J., 2017, "Control of nanoparticle release kinetics from 3D printed hydrogel scaffolds", *Angew Chem Int Ed*, Vol. 56, Issue 16, pp. 4623-4628.

- Burke, G., Barron, V., Geever, T., Geever, L., Devine, D.M. ve Higginbotham, C.L., 2019, "Evaluation of the materials properties, stability and cell response of a range of PEGDMA hydrogels for tissue engineering applications", *J Mech Behav Biomed Mater*, Vol. 99, pp. 1–10.
- Darouie, S., Ansari, M.S., Rahimi, F., Hashemi, E., Kabirsalmanni, M., Dolatshahi-Pirouz, A. ve Arpanaiea, A., 2020, "The fate of mesenchymal stem cells is greatly influenced by the surface chemistry of silica nanoparticles in 3D hydrogel-based culture systems", *Mater Sci Eng C*, Vol. 106, pp. 110259.
- Fuertes, A.B., Valle-Vigón, P. ve Sevilla, M., 2010, "Synthesis of colloidal silica nanoparticles of a tunable mesopore size and their application to the adsorption of biomolecules", *J Colloid Interface Sci*, Vol. 349, Issue 1, pp. 173–180.
- Gaharwar, A.K., Rivera, C., Wu, C.-J., Chan, B.K. ve Schmidt, G., 2013, "Photocrosslinked nanocomposite hydrogels from PEG and silica nanospheres: Structural, mechanical and cell adhesion characteristics", *Mater Sci Eng C*, Vol. 33, Issue 3, pp. 1800–1807.
- Gong, J.P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T., and Osada, Y., 2003, "Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength" *Adv Mater*, Vol. 15, Issue 14, pp. 1155-1158.
- Heinemann, S., Heinemann, C., Ehrlich, H., Meyer, M., Baltzer, H., Worch, H., ve Hanke, T., 2007, "Novel Biomimetic Hybrid Material Made of Silicified Collagen: Perspectives for Bone Replacement", *Adv. Eng. Mater.* Vol. 9, Issue 12, pp. 1061-1068.
- Huang, W.-S. ve Chu, I.-M., 2019, "Injectable polypeptide hydrogel/inorganic nanoparticle composites for bone tissue engineering", *PLoS ONE*, Vol. 14, Issue 1, pp. 1-17.
- Ingavle, G.C., Gehrke, S.H. ve Detamore, M.S., 2014, "The bioactivity of agarose–PEGDA interpenetrating network hydrogels with covalently immobilized RGD peptides and physically entrapped aggrecan", *Biomaterials*, Vol. 35, Issue 11, pp. 3558–3570.
- Kao, K.-C. ve Mou, C.-Y., 2013, "Pore-expanded mesoporous silica nanoparticles with alkanes/ethanol as pore expanding agent", *Micropor Mesopor Mat*, Vol. 169, pp. 7–15.
- Lam, D., Enright, H.A., Peters, S.K., Moya, M.L., Soscia, D.A., Cadena, J., Alvarado, J.A., Kulp, K.S., Wheeler, E.K. ve Fischer, N.O., 2020, "Optimizing cell encapsulation condition in ECM-Collagen I hydrogels to support 3D neuronal cultures" *J Neurosci Methods*, Vol. 329, pp. 108460.
- Lee, J. H., Park, J. H., Eltohamy, M., Perez, R., Lee, E. J. ve Kim, H. W., 2013, "Collagen gel combined with mesoporous nanoparticles loading nerve growth factor as a feasible therapeutic three-dimensional depot for neural tissue engineering", *RSC Adv*, Vol. 3, pp. 24202–24214.
- Mohammadi, M., Mousavi Shaegh, S.A., Alibolandi, M., Ebrahimzadeh, M.H., Tamayol, A., Jaafari, M.R. ve Ramezani, M., 2018, "Micro and nanotechnologies for bone regeneration: Recent advances and emerging designs", *J Control Release*, Vol. 274, pp. 35–55.
- Noh, M., Choi, Y.H., An, Y.-H., Tahk, D., Cho, S., Yoon, J.W., Jeon, N.L., Park, T.H., Kim, J. ve Hwang, N.S., 2019, "Magnetic Nanoparticle-Embedded Hydrogel Sheet with a Groove Pattern for Wound Healing Application" *ACS Biomater Sci Eng*, Vol. 5, Issue 8, pp. 3909–3921.
- Noh, M., Kim, S.-H., Kim, J., Lee, J.-R., Jeong, G.-J., Yoon, J.-K., Kang, S., Bhang, S.H., Yoon, H.H., Lee, J.-C., Hwang, N.S., ve Kim, B.-S., 2017, "Graphene oxide reinforced hydrogels for osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells", *RSC Adv*, Vol. 7, Issue 34, pp. 20779–20788.
- Park, J.Y., Park, S.H., Kim, M.G., Park, S.-H., Yoo, T.H. ve Kim, M.S., 2018, "Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomimetic Medical Materials: From Nanotechnology to 3D Bioprinting*, Vol. 1064, Editor: Noh, I., Springer, Singapore, pp. 109–121.
- Perera, D., Medini, M., Seethamraju, D., Falkowski, R., White, K., ve Olabisi, R. M., 2018, "The effect of polymer molecular weight and cell seeding density on viability of cells entrapped within PEGDA hydrogel microspheres", *J microencapsul*, Vol. 35, Issue 5, pp. 475-481.
- Rosenholm, J.M., Zhang, J., Linden, M., Sahlgren, C., 2016, "Mesoporous silica nanoparticles in tissue engineering-a perspective", *Nanomedicine*, Vol. 11, Issue 4, pp. 391–402.

- Shen, D., Yang, J., Li, X., Zhou, L., Zhang, R., Li W, Chen, L., Wang, R., Zhang, F. ve Zhao, D., 2014, "Biphase stratification approach to three-dimensional dendritic biodegradable mesoporous silica nanospheres", *Nano Lett*, Vol. 14, Issue 2, pp. 923–932.
- Tan, F., Liu, J., Liu, M. ve Wang, J., 2017, "Charge density is more important than charge polarity in enhancing osteoblast-like cell attachment on poly(ethylene glycol)-diacrylate hydrogel", *Mater Sci Eng C*, Vol. 76, pp. 330–339.
- Xu, C., Xiao, L., Cao, Y., He, Y., Lei, C., Xiao, Y., Sun, W., Ahadian, S., Zhou, X., Khademhosseini, A. ve Ye, Q., 2020, "Mesoporous silica rods with cone shaped pores modulate inflammation and deliver BMP-2 for bone regeneration", *Nano Res*, Vol. 13, Issue 9, pp. 2323–2331.
- Zhan, Y., Pan, Y., Chen, B., Lu, J., Zhong, Z. ve Niu, X., 2017, "Strain rate dependent hyperelastic stress-stretch behavior of a silica nanoparticle reinforced poly (ethylene glycol) diacrylate nanocomposite hydrogel", *J Mech Behav Biomed Mater*, Vol. 75, pp. 236–243.
- Zhou, X., Feng, W., Qiu, K., Chen, L., Wang, W., Nie, W., Mo, X. ve He, C., 2015, "BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells", *ACS Appl Mater Interfaces*, Vol. 7, Issue 29, pp. 15777–15789.