

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İPEK FİBROİN TEMELLİ BİYONANOKOMPOZİTLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Saliha İldem DEMİRER

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2025

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İPEK FİBROİN TEMELLİ BİYONANOKOMPOZİTLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Saliha İldem DEMİRER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN

Bu tez çalışmasında, doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak ipek fibroin (SF), κ -karagenan (κ -Car) ve mezoporöz biyoaktif cam (MBG) kullanılarak farklı bileşimlerde kompozit grupları hazırlandı. SF/ κ -Car kompozit iskelesine %0,2, %0,4 ve %2 oranlarında mezoporöz biyoaktif cam (MBG) ve bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam (Cu-MBG) katkılanarak bu iskelelerin termal stabilitesi termogravimetrik analiz (TGA) ile incelendi, yüksek termal kararlılık gösterdikleri tespit edildi. Fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) analizleri, bileşiklerin kimyasal yapılarını doğruladı ve modifikasyon işlemlerinin başarıyla gerçekleştiğini gösterdi. X-ışını kırınımı (XRD) analizi, malzemelerin kristal yapılarını belirlerken, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS), yüzey morfolojisi ve elementel dağılım hakkında detaylı bilgiler verdi. Mekanik testler kompozit malzemelerin dayanıklılığını test etmek için gerçekleştirildi. Kompozitlerin su tutma kapasitesi, bozunma davranışı ve iyon salımı analizleri ile biyolojik ve çevresel koşullara uyumları değerlendirildi. İyon salım analizinde bakır içeren kompozitlerdeki bakır miktarı atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS) ile belirlendi. İndüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES) ile sentezlenen 29S29B mezoporöz biyoaktif camlarda yer alan elementler tespit edildi. *In vitro* sitotoksite testleri (MTT), düşük bakır konsantrasyonlarının hücreler üzerinde olumsuz etki göstermediğini, ancak yüksek konsantrasyonlarda toksisiteye neden olabileceğini gösterdi. Bakır içermeyen grupların ise hücre canlılığını desteklediği belirlendi. Çalışma bulguları geliştirilen nanokompozitlerin biyomedikal uygulamalar için uygun fiziksel, kimyasal ve *in vitro* biyolojik koşulları sağlama potansiyelini ortaya koydu.

Temmuz 2025, 99 sayfa

Anahtar Kelimeler: İpek fibroin, Biyananokompozit, Karagenan, Biyoaktif Cam, Bakır katkılama, Biyomalzeme, Doku mühendisliği, Biyoyouumluluk, Hidrojel

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT AND CHARACTERISATION OF SILK FIBROIN BASED BIONANOCOMPOSITES

Saliha İldem DEMİRER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN

In this study, different concentrations of composite groups were prepared using silk fibroin (SF), κ -carrageenan (κ -Car), and mesoporous bioactive glass (MBG) for tissue engineering applications. Mesoporous bioactive glass (MBG) and copper-doped mesoporous bioactive glass (Cu-MBG) were doped to the SF/ κ -Car composite scaffold at 0.2%, 0.4%, and 2% ratios, and the thermal stability of these scaffolds was investigated by thermogravimetric analysis (TGA), and it was determined that they showed high thermal stability. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) analyses confirmed the chemical structures of the compounds and showed that the modification processes were successful. X-ray diffraction (XRD) analysis determined the crystalline structures of the materials, while scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) provided detailed information on surface morphology and elemental distribution. Mechanical tests were applied to test the durability of the composite materials. Water retention capacity, degradation behavior, and ion release analyses of the composites were performed to evaluate their compatibility to biological and environmental conditions. In the ion release analysis, the amount of copper in the copper-containing composites was determined by atomic absorption spectrometry (AAS). Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) was used to determine the elements in the synthesised 29S29B mesoporous bioactive glasses. *In vitro* cytotoxicity tests (MTT) showed that low copper concentrations were biocompatible on cells, but high concentrations could cause toxicity. Copper-free groups were found to support cell viability. The findings of the study revealed the potential of the developed nanocomposites to provide suitable physical, chemical and *in vitro* biological conditions for biomedical applications.

July 2025, 99 pages

Key Words: Silk fibroin, Bionanocomposite, Carrageenan, Bioactive glass, Copper doping, Biomaterials, Tissue engineering, Biocompatibility, Hydrogel

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması kapsamında bilgi ve yardımlarını esirgemeyerek bana her konuda destek olup yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında biyolojik karakterizasyon sürecinde bana yardımcı ve destek olan değerli hocam Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her an yanımda olan, beni her koşulda destekleyen, motive eden ve birçok konuda ufkumu genişleterek yolumu aydınlatan değerli hocam Arş. Gör. Seyithan KANSIZ'a teşekkür ederim.

Yapılan çalışmaların karakterizasyon süreçlerinde güler yüzü ve samimiyetiyle her türlü desteği sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Orhan ATAKOL'a ve Erdal EMİR'e teşekkür ederim.

Tüm tez süreci boyunca ve deneysel süreçlerimin tamamında yanımda olan, yardımlarıyla ve pozitifliğiyle birçok yol kat ettiğim çalışma arkadaşım ve değerli dostum Aslı Nur GÜLER'e; her koşulda bana yardımcı olan ve tüm bu süreçte desteklerini esirgemeyen tüm ElçinLab üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Yıllardır olduğu gibi şimdi de yanımda olan ve varlıklarından güç aldığım sevgili dostlarım Şevval YAZICIOĞLU ve Hasret GÖNÜL'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda arkamda duran ve hayallerimin gerçekleşmesi için beni hep cesaretlendiren başta annem Saniye DEMİRER ve babam İbrahim DEMİRER olmak üzere bütün aile üyelerime çok teşekkür ederim. Her zaman yanımda olduğu gibi bu yoğun ve uzun süreçte de yanımda olan, kendimi her daim geliştirmem ve sınırlarımı zorlamam için destekleyen sevgili Aybars DAĞ'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK BİDEB 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Saliha İldem DEMİRER
Ankara, Temmuz 2025

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 İpek Fibroin	3
2.2 İpek Fibroin Ekstraksiyonu	5
2.3 İpek Fibroinin Bozunması	6
2.4 İpek Fibroin Nanokompozitler	7
2.5 İpek Fibroin Temelli Biyomalzemeler.....	8
2.5.1 İpek fibroin filmler	9
2.5.2 İpek fibroin hidrojeller	11
2.5.3 İpek fibroin fiberler	12
2.5.4 İpek fibroin süngerler	14
2.5.5 3D biyobasım iskeleleri	16
2.6 Biyomedikal Uygulamalar	17
2.6.1 Doku mühendisliği	17
2.6.2 İlaç taşıma sistemleri.....	21
2.6.3 Gen terapisi.....	22
2.7 Karagenanın Yapısı	23
2.8 Biyomalzeme Olarak Karagenan.....	25
2.8.1 Doku mühendisliği	26
2.8.2 İlaç taşıma sistemleri.....	28
2.9 Biyoaktif Camlar	30
2.9.1 Bakır katkılı biyoaktif camlar.....	32
2.10 Biyoaktif Cam Üretim Yöntemleri	33
2.10.1 Ergitme yöntemi	33
2.10.2 Sol- jel yöntemi	34
2.11 Biyoaktif Camların Kullanım Alanları	35
2.11.1 Kemik doku mühendisliği.....	35
2.11.2 Diş uygulamaları	37
2.11.3 Yara iyileşmesi.....	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1 Materyal	40
3.2 Yöntem	41
3.2.1 İpek fibroinin hazırlanması.....	41
3.2.2 Metakrilatlı κ -Karagenanın sentezi.....	42
3.2.3 Sol-jel yöntemi ile 29S29B mezoporöz biyoaktif cam sentezi.....	43
3.2.4 Sol-jel yöntemi ile 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam sentezi.....	43
3.2.5 İpek Fibroin / κ -Karagenan kompozitlerinin hazırlanması.....	44

3.2.6 İpek Fibroin/ κ -Karagenan/mezoporöz biyoaktif cam kompozitlerinin hazırlanması	44
3.2.7 İpek Fibroin/ κ -Karagenan/bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam kompozitlerinin hazırlanması.....	44
3.2.8 Biyoaktif camların karakterizasyonu.....	45
3.2.8.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	45
3.2.8.2 X-ışınları kırınımı (XRD) analizi.....	46
3.2.8.3 Termogravimetrik analiz (TGA)	46
3.2.8.4 İndüktif eşleşmiş plazma (ICP-OES) analizi	46
3.2.8.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Enerji dağılım x-ışını spektrometresi (EDS) analizi	46
3.2.9 Kompozit malzemelerin karakterizasyonu	47
3.2.9.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	47
3.2.9.2 Termogravimetrik analiz (TGA)	47
3.2.9.3 Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS).....	47
3.2.9.4 Borun azometin H türevi ile spektrofotometrik tayini	48
3.2.9.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Enerji dağılım x-ışını spektrometresi (EDS) analizi	48
3.2.9.6 Su tutma ve bozunma testi	48
3.2.9.7 Mekanik testler.....	49
3.2.9.8 <i>İn vitro</i> sitotoksosite testi	49
3.2.9.9 <i>İn vitro</i> kan uyumluluğu testi	50
3.2.10 İpek Fibroinin karakterizasyonu	50
3.2.10.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	50
3.2.11 κ -Karagenanın karakterizasyonu.....	51
3.2.11.1 Manyetik rezonans spektroskopisi analizi (^1H NMR)	51
3.2.11.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	51
3.2.12 İstatistiksel analizler	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
4.1 Biyoaktif Camların Karakterizasyon Bulguları.....	52
4.1.1 SEM ve EDS analizleri	52
4.1.2 XRD analizleri	53
4.1.3 FTIR analizleri	54
4.1.4 TGA analizleri	55
4.1.5 ICP-OES analizleri.....	56
4.2 İpek Fibroinin Karakterizasyon Bulguları.....	56
4.2.1 FTIR analizleri	56
4.3 κ -Karagenanın Karakterizasyon Bulguları.....	57
4.3.1 Manyetik rezonans spektroskopisi analizi (^1H NMR)	57
4.3.2 FTIR analizleri	58
4.4 Kompozit Malzemelerin Karakterizasyon Bulguları	59
4.4.1 SEM ve EDS analizleri	59
4.4.2 FTIR analizleri	62
4.4.3 TGA analizleri	63
4.4.4 İyon salım analizleri.....	65
4.4.5 Su tutma ve bozunma testleri.....	65
4.4.6 Mekanik testler.....	67
4.4.7 <i>İn vitro</i> sitotoksosite testi	68

4.4.8 <i>İn vitro</i> kan uyumluluğu testi	69
5. TARTIşMA ve SONUÇ	71
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİř.....	99



SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
kDA	: Kilodalton
SiO ₂	: Silisyum dioksit
P ₂ O ₅	: Fosfor pentaoksit
CaO	: Kalsiyum oksit
B ₂ O ₃	: Bor trioksit
CuO	: Bakır oksit
Cu	: Bakır
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit

Kısaltmalar

AAS	Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromür
Cu-MBG	Bakır Katkılı Mezoporöz Biyoaktif Cam
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Ekstraselüler Matris
EDS	Enerji Dağılım X-Işını Spektroskopisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA	Hidroksiapatit
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi
κ-Car	Kappa Karagenan
LiBr	Lityum Bromür
MBG	Mezoporöz Biyoaktif Cam
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	Hücre Canlılık Testi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Çözeltisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SF	İpek Fibroin
TCP	Trikalsiyum Fosfat
TGA	Termogravimetrik Analiz
TEOS	Tetraetil Ortosilikat
TEP	Trietil Fosfat
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
UV	Ultraviyole
XRD	X-ışını Kırınımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İpek böceği kozaları	4
Şekil 2.2 İpek kozasının fibroin ve serisinden oluşan katman yapısı	4
Şekil 2.7 İpek, tirozinli jelatin ve insan plasentası.....	10
Şekil 2.8 İn vivo ve in vitro kemik rejenerasyonunu desteklemek için fotoküre 3D baskılı nHA/MASF kompozit iskelelerin üretiminin şematik gösterimi	11
Şekil 2.9 Manuka balı yüklü ipek fibroin kompozit lifli matların üretimi için şematik gösterim (Yang vd. 2017)	13
Şekil 2.10 Nanokompozit SilMA sünger üretim sürecinin şeması (Spessot vd. 2024) ..	15
Şekil 2.11 Kol/SF iskelelerinin üretimi ve eklem kırıkdağı defektlerinin tedavisi için uygulanması (Yu vd. 2023).....	15
Şekil 2.13 DLP baskı süreci ve yaygın 3D baskı ile DLP 4D baskı arasındaki performans karşılaştırması.	18
Şekil 2.14 Poli-dopamin (PDA) kaplamalı ve kaplamasız iki farklı SF bazlı membranın üretiminin ve uygulamasının şematik gösterimi.	19
Şekil 2.16 PEG-FA-SFPNP'lerin hazırlanmasının şematik gösterimi	22
Şekil 2.17 Rekombinant ipek blok kopolimerlerinin pDNA komplekslerinin oluşum şeması.....	23
Şekil 2.18 Sülfatlanma derecelerine göre farklı karagenan türleri.....	24
Şekil 2.19 Metakrilat κ -karagenan (KaMA) sentezi ve hidrojel oluşumu	25
Şekil 2.20 Nano-hidroksiapatit (n-HA), arap zımkı (GA)/ κ -karagenan (κ -CG) içeren üçlü bir sistem üretimi.....	26
Şekil 2.21 κ CA-nanosilikat hidrojellerin sentezi. KCl çözeltisinde çapraz bağlanmış kappa karagenan (κ CA) ve nanosilikatları (Si) birleştirilerek enjekte edilebilir nanokompozit hidrojellerin üretiminin şematik gösterimi.....	27
Şekil 2.22 KC/PAM DPC-DC hidrojelinin üretiminin ve hidrojel üzerindeki hücre yanıtlarının şematik çizimi	28
Şekil 2.23 Önerilen etkileşim mekanizması sentezlenen karışım hidrojelinde sunulmuştur (Rasool vd. 2019)	29
Şekil 2.24 Biyoaktif seramiklerin kemik ile biyolojik etkileşimi (Jones 2013) ..	30
Şekil 2.25 Çeşitli yöntemlerle oluşturulan biyoaktif cam iskelelerin mikroyapıları: ...	31
Şekil 2.26 Çeşitli metal katyonların MBG yapısına dâhil edilmesinin ve bakteriyel üremenin engellenmesinin şematik gösterimi	32
Şekil 2.27 <i>In situ</i> bakır katkılı biyoaktif cam sentezi.....	33
Şekil 2.28 Sol- jel yöntemiyle biyoaktif cam sentezi.....	34
Şekil 2.29 Kompozit iskelelerin oluşturulmasının şematik gösterimi	36

Şekil 3.1 A) Bombyx morii ipek kozaları, B) kozaların küçük parçalara kesilmesi, C) ipeğin LiBr'de çözündükten sonra +4 derecede diyalize bırakılması.....	41
Şekil 3.2 A) %4 metakrilatlanmış κ -Karagenan sentezi, B) +4 derecede 3 gün diyalize bırakılması, C) elde edilen karagenanın liyofilizasyon işlemi, D) liyofilize edilen %4 metakrillenmiş κ -Karagenan.....	42
Şekil 3.3 Sol-jel yöntemiyle 29S29B mezoporöz biyoaktif cam sentezi.....	43
Şekil 3.4 Kompozit malzemelerin 365-405 nm ışın yayan UV lamba ile çapraz bağlandıktan sonra liyofilize edilmiş görüntüleri.	45
Şekil 4.1 (A) Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 29S29B mezoporöz biyoaktif cam ve (B) 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam partiküllerinin 500x büyütmelelerdeki SEM görüntüleri ve histogramları.....	52
Şekil 4.2 Biyoaktif camlarda bulunun elementlerin değişimini gösteren EDS sonuçları.....	53
Şekil 4.3 Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 29S29B mezoporöz biyoaktif cam ve 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam partiküllerinin XRD spektrumu	54
Şekil 4.4 29S29B biyoaktif camların FTIR spektrumu.....	55
Şekil 4.5 29S29B mezoporöz biyoaktif cam (MBG) partikülleri ve 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam (Cu-MBG) partiküllerine ait termogravimetrik analiz sonuçları.....	55
Şekil 4.6 İzole edilen ipek fibroinin FTIR spektrumu	57
Şekil 4.7 κ -Car ve metakrilatlı κ -Car 'ın 1H Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumları.....	57
Şekil 4.8 κ -Car ve metakrillenmiş κ -Car 'ın FTIR spektrumları	58
Şekil 4.9 Sentezlenen kompozit gruplarının 100x ve 500x büyütmelelerindeki SEM görüntüleri ve histogram grafikleri	62
Şekil 4.10 Kompozit iskelelerin FTIR spektrumları.	63
Şekil 4.11 (A) SC kompozit iskelesi (B) SC-0,2CuBG ve SC-0,2BG kompozit iskelelerin, (C) SC-0,4CuBG ve SC-0,4BG kompozit iskelelerin, (D) SC-2CuBG ve SC-2BG kompozit iskelelerin termogravimetrik analiz eğrileri	64
Şekil 4.12 Farklı konsantrasyonlardaki kompozitlerden 21 gün boyunca (A) bor ve (B) bakır iyonlarının kümülatif salımını gösteren grafikler	65
Şekil 4.13 SC ve farklı konsantrasyonlarda Cu-MBG ve MBG içeren kompozitlerin 24 saatlik su tutma yüzdeleri.....	66
Şekil 4.14 SC ve farklı konsantrasyonlarda Cu-MBG ve MBG içeren kompozitlerin bozunma yüzdeleri	67
Şekil 4.15 SC ve farklı konsantrasyonlarda biyoaktif cam içeren kompozitlerin basma dayanımı (kPa)	68
Şekil 4.16 SC ve farklı konsantrasyonlarda biyoaktif cam içeren kompozitlerin dermal fibroblast hücreleri üzerindeki MTT testi ile belirlenen canlılık oranları.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Sentezlenen biyoaktif cam grupları.	44
Çizelge 3.2 Sentezlenen kompozit grupları.	45
Çizelge 4.1 Kullanılan biyoaktif camların elementel bileşimi.	56
Çizelge 4.2 Sentezlenen kompozit malzemelerin elementel bileşimi.	62
Çizelge 5.1 Hazırlanan kompozit gruplarının mekanik dayanım testi verileri.	77
Çizelge 5.2 Kompozit malzemelerin MTT testine göre canlılık yüzdeleri.	79



1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, doku ve organların onarımı, korunması veya işlevselliğinin artırılması için biyolojik alternatiflerin geliştirilmesiyle ortaya çıkan çok disiplinli bir alandır. Doku mühendisliğinde nanopartiküllerin (NP'ler) uygulanması, öncelikle biyolojik ve mekanik işlevleri geliştirme kapasiteleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Gümüş, metal oksitler, kuantum noktaları ve karbon nanotüpler (CNT'ler) gibi metalik NP'leri kapsayan çeşitli nanoparçacıklar, onları çok sayıda doku mühendisliği uygulaması için uygun hale getiren kayda değer özellikler göstermiştir.

Biyonanomazemeler, çok sayıda doku mühendisliği stratejisinin temel bir unsurudur. Bu alanda doku mühendisliği için faydalı olan son gelişmeler, bulunduğu ortama yanıt verebilen yeni biyomalzemelerin sentezini içermektedir. Üç boyutlu biyo-baskı teknolojilerindeki ilerlemeler, doku mühendisliğindeki birçok gelişmenin merkezinde yer almaktadır. Artık birden fazla biyoyumlu malzemeyi (hem doğal hem de sentetik), hücreleri ve büyüme faktörlerini, çoğu *in vivo* benzerleriyle eşleşen işlevsel vasküler ağlara sahip karmaşık üç boyutlu dokular halinde birlikte basmak mümkündür.

Doğal ve sentetik polimerler, biyomedikal ve çevresel uygulamalar için biyomalzemelerin geliştirilmesinde çok yönlü bir platform sağlar. Doğal polimerler, aljinat, karagenan, hyaluronik asit, nişasta gibi polisakkaritler, kolajen, ipek, fibrin gibi proteinler ve bakteriyel polyesterler gibi doğada bulunan organik bileşiklerden oluşur. Bunun yanında sentetik polimerler, poli (laktik asit), poli (akrilik asit), poli (vinil alkol) ve polietilen glikol gibi farklı malzemelerden oluşur ve biyolojik olarak parçalanabilir ve biyoyumlu özelliklere sahip olabilirler. Bu nedenle, kontrollü ilaç salım sistemleri, nano taşıyıcılar, doku mühendisliği, bakteriyel biyofilmlerin dağıtılması, genetik dağıtım sistemleri, 3B baskıda biyo-mürekkep gibi birçok alanda araştırma ve uygulama yapılmaktadır (Satchanska vd. 2024). Aynı zamanda biyoseramikler, onarım, implantasyon ve ilaç dağıtım araçları dahil olmak üzere biyolojik amaçlar için kullanılan ilgi çekici seramik malzemelerdir. Kullanımları biyoyumluluklarına, mekanik uyumluluklarına ve kimyasal yapılarına dayanmaktadır (Habraken vd. 2016, Ana vd. 2018). Biyobozunur seramikler, kemik defektlerinin doldurulması ve kemik kırıklarının

onarımı için yaygın olarak kullanılan bir malzemedir. En yaygın kullanılan biyolojik olarak parçalanabilen seramikler hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP) ve dikalsiyum fosfattır (DCP) (Wei vd. 2020).

Nanopartiküller ve polimerleri birleştiren kompozit iskelelerin sentezi, doku mühendisliğinde yeni bir ufuk açmıştır. Bu kompozit malzemeler, polimerlerin özelliklerini ve nanopartiküllerin biyoaktif niteliklerini sinerjik olarak kullanır ve hücresel yapışma, çoğalma ve farklılaşma için optimum bir mikro ortam sunan iskeleler elde edilir.

Gözenek boyutu, gözeneklilik ve gözeneklerin birbirine bağlanabilirliği, iskelenin işlevini önemli ölçüde etkileyen kritik yapısal özellikleridir. Gözenekler ne kadar küçükse, yoğunluk o kadar yüksek olur ve bu da hücre içi sinyalleşmeyi, hücre bağlanmasını ve yapısal gücü kolaylaştırır. Tersine, daha büyük gözenekler atıkların atılmasına, gazların difüzyonuna ve besin maddelerinin tedarikine yardımcı olarak doku büyümesini ve damarlanmayı teşvik eder. Sonuç olarak, yeni dokunun rejenerasyon aşamasında optimum besin transferi ve mekanik güç sağlamak için optimum gözenek boyutu seçilmelidir (H. Chen vd. 2017, Wu vd. 2017, Juan vd. 2021, Guo vd. 2022).

Bu tez çalışmasında, Cu^{2+} katkılı biyoaktif cam (BAC) nanopartikülleri içeren ve içermeyen iki farklı seramik malzeme farklı katkılama oranlarıyla sentezlenip karakterize edilmiştir. Ayrıca seramik nanopartiküller 700 °C'de sinterlenerek biyoaktif camda bulunan organik bileşiklerin yakılarak uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sol-jel yöntemiyle üretilen biyoaktif camlar, *Bombyx mori* ipeğinden elde edilen fibroin proteini ve metakrilatlı κ -karagenan ile kompozit yapılar oluşturulmuştur. Oluşturulan kompozit iskelelerin fiziksel, kimyasal ve *in vitro* biyolojik karakterizasyonları yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

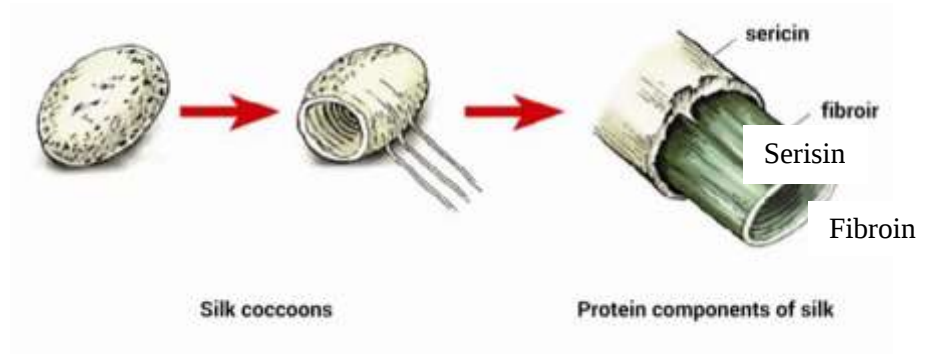
2.1 İpek Fibroin

Bombyx mori böceğinin kozasından elde edilen ipek fibroin parlak yapısı, alerjik doku yanıtı göstermemesi, biyolojik olarak bozunur ve biyoyumlu olması sayesinde kozmetiklerde, biyomedikal malzemelerde ve tekstil alanında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. İpek fibroinden elde edilen iskeleler kemik, kan damarı, deri ve kornea gibi doku mühendisliği alanında da başarıyla kullanılmaktadır. Doğal *B. mori* ipeği, suda çözünür serisin proteini ve fibröz fibroin proteininden oluşur. Serisin proteini kozanın ağırlık olarak %25-30'unu oluşturan bir grup çözülebilen yapışkan glikoproteinlerdir. Molekül ağırlığı 10-300 kDa arasında değişmektedir. Bu yapışkan yapı çıkartıldıktan sonra fibroin lifleri sulu bir çözelti içinde çözülür ve farklı malzemelere dönüştürülebilir (Rockwood vd. 2011). İpek liflerini çevreleyen serisin proteini yağ ve inorganik maddelerin çoğundan sorumludur. Bu sebeple serisinin uzaklaştırılması ipeğin yabancı maddelerden arındırılması için önemli bir adımdır. Kozaların çoğunluğu fibroin proteininden oluşur ve fibroin kozaya yapısal ve mekanik stabilite kazandırır. İpek fibroini, disülfür bağı ile kovalent bağlanmış bir hafif zincir (L zinciri, Mw ~26 kDa) ve bir ağır zincirden (H zinciri, Mw ~390 kDa) oluşur (Vepari ve Kaplan 2007). Ağır zincirler temel olarak glisin, alanin ve serin gibi tekrarlayan hidrofobik amino asit zincirlerini içerirken (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser), hafif zincir hidrofilik amino asitleri içerir.

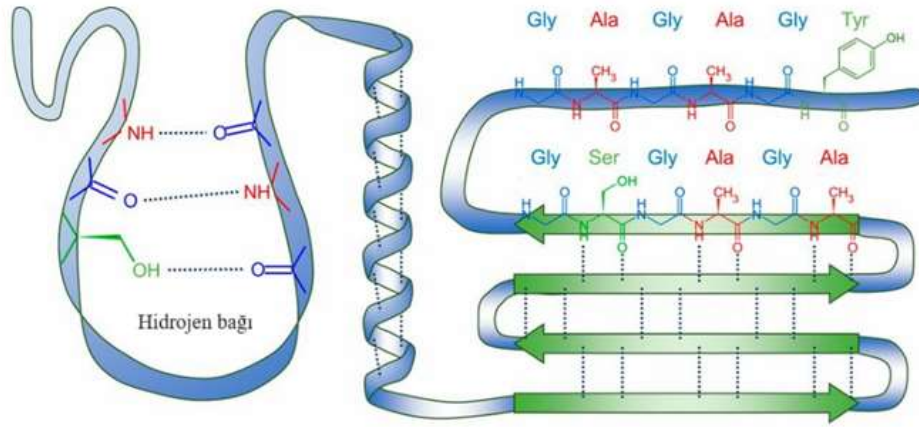


Şekil 2.1 İpek böceği kozaları

Diğer proteinler gibi ipek fibroin de birincil, ikincil ve üçüncül yapıları içerir ve bu ikincil yapılar arasında moleküller arası β -tabakalar oldukça önemlidir. Rastgele sarmal/ α -heliks konformasyonu (ipek I) fibroinin hidrat yapısıdır ve sulu ortamdaki fibroini kararlı hale getirmek için β -tabakalı (ipek II) yapının oluşması gerekir. Ağır zinciri oluşturan amino asitler moleküller arası fiziksel çapraz bağlanır ve kararlı kristalize β -tabaka yapısının oluşmasını sağlar. Bu yapı ısıtma, karıştırma, metanole maruz bırakma gibi mekanik, fiziksel veya kimyasal olaylar ile oluşur.



Şekil 2.2 İpek böceği kozası, fibroin ve serisin İpeğin protein bileşenleri

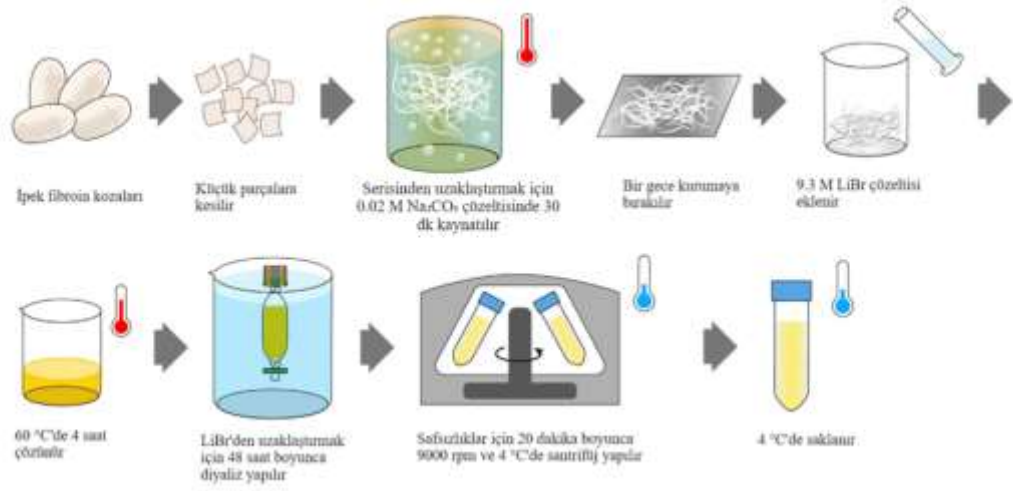


Şekil 2.3 Hidrojen bağı ve ipek fibroin yapılarını gösteren ipek fibroin moleküler zinciri. Sırasıyla rastgele sarmal, sarmal ve β -tabaka (Y. Wang vd. 2019)

2.2 İpek Fibroin Ekstraksiyonu

İpek fibroininin ekstraksiyonu, ham ipeğin çeşitli biyomedikal ve teknolojik uygulamalarda etkili bir şekilde kullanılabilmesi, biyoyumlu ve özelleştirilebilir bir malzemeye dönüştürülmesi için oldukça önemlidir. *Bombyx mori* kozalarından ipek fibroin ekstraksiyonu Rockwood ve arkadaşlarının çalışmasında tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Rockwood vd. 2011). *Bombyx mori* ipek kozaları küçük parçalar halinde kesilir ve serisini uzaklaştırmak için 0.02 M sodyum karbonat (Na_2CO_3) solüsyonunda 30 dakika kaynatılır. Kaynama süresi elde edilecek olan ipek fibroinin yapısı için önemli bir parametredir. Eğer daha uzun süreler kaynatılırsa ipek fibroin lifleri daha küçük molekül ağırlıklı peptidlere dönüşür. Nihai lifler, üç kez bol demineralize su ile durulanır ve gece boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. İpek fibroin lifleri, 9.3 M lityum bromür (LiBr) çözeltisiyle çözülür ve süspansiyon 60 °C'de maksimum 4 saat inkübe edilir. LiBr, ipek II polimorfunda bulunan hidrojen bağlarının zayıflamasını sağlayarak ipek I (sarmal/ α -heliks) yapısına geçişe izin verir (Frauchiger vd. 2017). Ortaya çıkan dispersiyon, lityum bromürü uzaklaştırmak için bir diyaliz tübünde 2 L damıtılmış suya karşı 48 saat diyaliz edilir. Çözünmeyen kalıntılar, 9,000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek çıkarılır. İpek fibroin dispersiyonu 4 °C' de saklanır. İpek fibroin ekstrakte edildikten sonra filmler, lifler, süngerler, hidrojeller ve iskeleler gibi çeşitli formlarda işlenebilir. Bu çok yönlülük, yara örtüleri, doku mühendisliği

iskeleleri, ilaç dağıtım sistemleri gibi geniş uygulama alanlarında kullanılmasına olanak tanır.



Şekil 2.4 İpek fibroin ekstraksiyon aşamaları (Dingle vd. 2021)

2.3 İpek Fibroinin Bozunması

Biyomalzemelerin bozunma kabiliyeti, doku mühendisliği alanında büyük önem taşımaktadır. Hasarlı veya hastalıklı dokular kendilerini onaramadığında, iyileşme sürecini kolaylaştırmak için genellikle yerine geçecek bir biyomalzemeye ihtiyaç duyulur. Kemik, tendon, bağ veya damar gibi farklı dokuların kendi kendini onarma süreleri farklıdır ve yeni dokuların oluşumunu kolaylaştırmak için ilgili bozunma oranlarına sahip biyomalzemelerin kullanılmasını gerektirir. İpek fibroinin biyolojik bozunmasının *in vitro* ortamda *in vivo* ortamdan daha hızlı gerçekleştiği bilinmektedir. Her iki durumda da bu süreç büyük ölçüde malzemenin nihai konformasyonuna bağlıdır ve malzemenin β -tabakalı yapısı özellikle önemli bir rol oynamaktadır.

In vitro ortamda, fibroinin biyolojik olarak parçalanması öncelikle enzimatik aktiviteye bağlanmaktadır. Proteinli yapısı nedeniyle, ipek fibroinin diğerlerinin yanı sıra proteaz XIV, kolajenaz IA ve α -kimotripsin tarafından hidroliz edildiği gösterilmiştir (Kambe vd. 2020). Bu enzimler fibroin içindeki peptit bağlarını parçalayarak daha küçük peptitlere ve amino asitlere ayırır. Enzimler fibroin yapısı içindeki belirli dizileri veya motifleri tanır ve bunlara bağlanarak bölünmeyi başlatır. β -tabakadaki kristal bölgeler, daha hızlı

bozunan amorf bölgelere kıyasla enzimatik bozunmaya karşı daha dirençlidir (Guo vd. 2020). Enzimatik aracılı biyolojik bozunma süreci büyük ölçüde kullanılan enzime bağlıdır. Bahsedilen üç enzim amorf bölgeleri parçalayabilirken, sadece kolajenaz IA ve proteaz XIV kristal bölgeleri parçalayabilmektedir. Bunlardan proteaz XIV en etkili olanıdır (Li ve Li 2014).

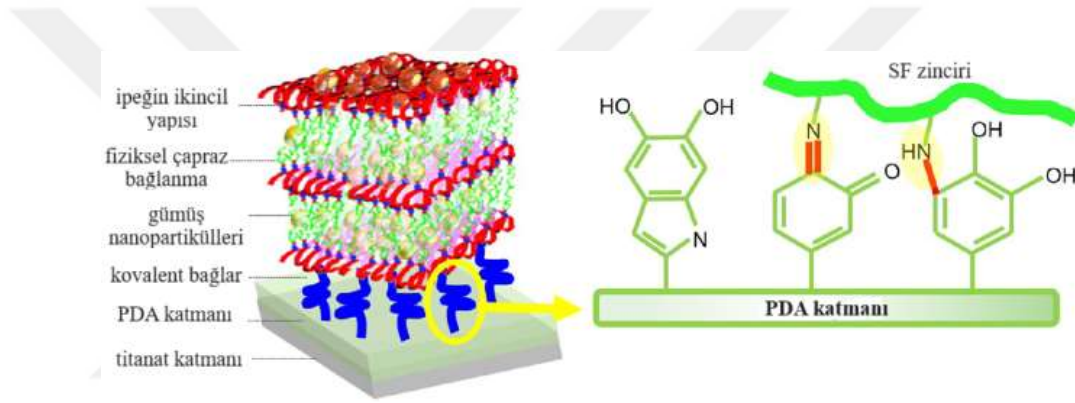
In vivo olarak ipek fibroinin biyolojik bozunması, enzimlerin varlığı, pH ve bağışıklık tepkileri dâhil olmak üzere biyolojik ortamdan etkilenir. Tam mekanizma implante edilen dokuya ve ipek fibroin malzemesinin kendisine bağlıdır (Li ve Li 2014).

Yapılan bir çalışmada, ipek fibroin biyomateryallerinin implantasyon sonrası bozunma potansiyelini noninvazif olarak değiştirmenin bir yolu olarak terapötik ultrason kullanımına yönelik yeni bir yaklaşım kullanılmaktadır. İpek fibroinin yapısı, malzemedeki gözeneklerin boyutu ve iskelede bulunan fibroin miktarı gibi farklı faktörler bozunma hızını etkileyebilir ve bu faktörler iskelenin bozunması için gereken süreyi oldukça değiştirebilir. Çalışma, terapötik ultrason, özellikle de düşük yoğunluklu odaklı ultrason (LIFU) kullanmanın ipek iskelelerin bozunmasını etkili bir şekilde hızlandırabileceğini göstermektedir. Bu tür ultrasonlar hücrelere veya dokulara zarar vermez. Ultrason dalgaları iskele ile etkileşime girdiğinde, ipek fibroininin bozunma şeklini değiştirmekten sorumlu olan akustik kavitasyon adı verilen bir süreç yaratılır. Böylelikle terapötik ultrason kullanarak ipek fibroin biyomalzemelerinin herhangi bir ameliyat yapmaya gerek kalmadan parçalanma hızı ayarlanabilir. Bu da doku rejenerasyonu ve iyileşmesi için daha iyi sonuçlara yol açar (DeBari vd. 2021).

2.4 İpek Fibroin Nanokompozitler

Doku mühendisliği uygulamaları ile ipek fibroin iskeleler için giderek daha fazla kullanılan stratejilerden biri, nanopartiküller, iç içe geçen ağlar, kaplamalar gibi inorganik oksitlerin veya tuzların dâhil edilmesidir. Bu etkileşimlerden bazıları, inorganik moleküllerle iç içe geçmiş organik moleküllerden oluşan çok fazlı yapılar olan nanokompozitler olarak kabul edilir. Bu tür yapılarda, fazlardan biri veya daha fazlası 100 nm veya daha küçük bir boyuta sahiptir (Camarata 2004, Jiang 2007).

İpek fibroin polimer ağı ile inorganik faz arasındaki entegrasyonu yöneten etkileşimler zayıftır. Bununla birlikte, bu etkileşimler heterojen bir dağılıma ve inorganik fazın istenmeyen bir şekilde ayrışmasına neden olabilir. Bu soruna potansiyel bir çözüm, ipek fibroin amino asitlerinin yan grupları kullanılarak oluşturulabilecek kovalent bağların kurulmasıdır (Naebe vd. 2014, Iwan vd. 2015). Polidopamin (PDA) yüzey kimyası ile çok katmanlı ve hiyerarşik iskeleler geliştiren Jia ve arkadaşları tarafından yeni bir yaklaşım kullanılmıştır. Kovalent bağların oluşumu, iskelenin daha uzun süreli mekanik stabilite göstermesi ve biyoaktif maddelerin dikkatli bir şekilde konumlandırılmasını sağlamıştır. Bu bağlar iskelenin biyolojik rejenerasyonu teşvik edici özelliklerini ve homojenliğini artırmaktadır (Jia vd. 2019).

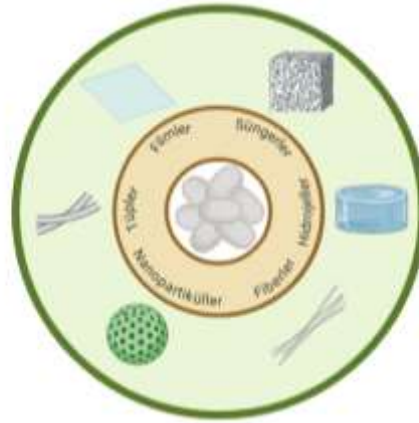


Şekil 2.5 m-SFAG yapısı ve farklı kaplama bileşenleri arasındaki olası etkileşimler (Jia vd. 2019)

2.5 İpek Fibroin Temelli Biyomalzemeler

İpek fibroin (SF) rejeneratif tıp, doku mühendisliği ve biyofabrikasyon alanlarında önemli potansiyele sahip çok yönlü bir biyomateryaldir. Çeşitli biyomalzemelerin üretimi için birçok fizikokimyasal özelliğe sahip olan benzersiz bir doğal proteindir. Bu özellikler: (1) biyouyumluluk, (2) ayarlanabilir biyobozunma, (3) düşük immünojenite, (4) çeşitli formatlara uyarlanabilirlik [üç boyutlu (3D) iskeleler, ince filmler, nanolifler, mikroküreler, nanopartiküller, hidrojeller, vb], (5) mükemmel mekanik dayanıklılık, (6) kolay erişilebilirlik, (7) düşük maliyet ve (8) çevre dostu işleme teknikleri olarak sınıflandırılabilir (Zhang vd. 2016, Huang vd. 2018, Sun vd. 2020). SF'nin biyouyumluluğuna katkıda bulunan faktörlerden biri, özellikle yapısal ve hücre yüzeyi

proteinlerinde olmak üzere birçok insan ve memeli proteininde de bulunan belirli amino asit dizilerinin, tekrarların ve periyodik olarak korunmuş amino asitlerin varlığıdır (De Giorgio vd. 2024). Ayrıca, biyoinformatik analiz yoluyla SF dizileri üzerinde yapılan çalışmalarda bilinen alerjenler, toksinler veya mutajenlerle herhangi bir eşleşme tespit edilmemiştir (Yigit vd. 2021). Hem doğal olarak elde edilen hem de biyomühendislikle üretilen ipek fibroinler, filmler, hidrojel, fiberler, süngerler ve 3D biyo-basımda kullanılabilir.

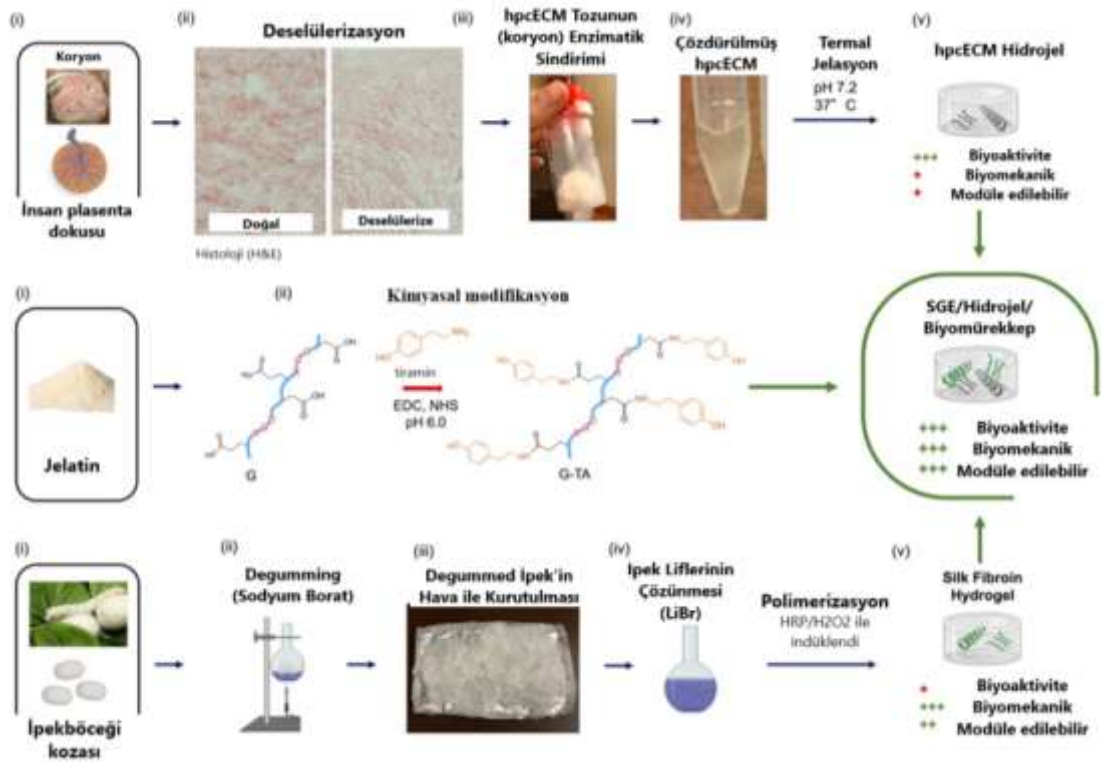


Şekil 2.6 İpek fibroin ile üretilen çeşitli malzeme formları

2.5.1 İpek fibroin filmler

SF filmlerin üretimi, yayma (Motta vd. 2002), döndürerek kaplama, döndürme destekli katman katman kaplama (Jiang vd. 2007), mürekkep püskürtmeli yazım ve 3D baskı dahil olmak üzere çeşitli teknikler ile gerçekleştirilebilir (Tao vd. 2015, Xuan Mu vd. 2020). Pürüzsüz yüzeyli bir ipek filmin hazırlanma yöntemi üç adımdan oluşur (Rockwood vd. 2011). İlk adım, bir SF çözeltisinin plastik bir Petri kabı gibi düz bir zemin yüzeyine bir döndürerek (spin) kaplama işlemi ile doğrudan dağıtılmasını içerir. İkinci adım, SF'nin denatürasyonunu önlemektir, bu da tipik olarak kurumaya izin vermek için oda sıcaklığında (25 °C) bir ortam sağlayarak elde edilir. Üçüncü olarak, kurutulan ipek film bir alkol çözeltisine (metanol veya etanol) veya su buharı ortamına daldırılarak kristalleşme tetiklenir ve gelişmiş mekanik özellikler ve istenen bir bozunma hızı elde edilir. Buna ek olarak, hazırlanan ipek filmin kalınlığı, SF çözeltisinin konsantrasyonu değiştirilerek, örneğin daha kalın filmler için konsantre edilerek veya daha ince filmler için seyreltilerek kontrol edilebilir (Wen vd. 2021).

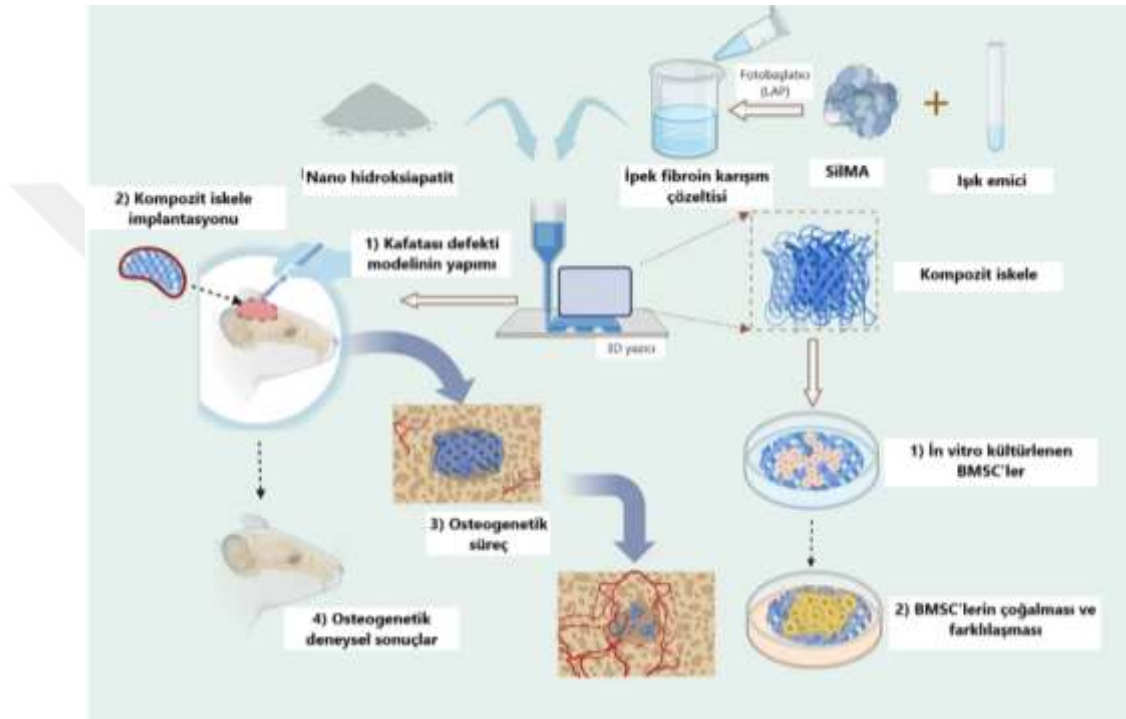
Schneider ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada SF filmleri jelatin ve insan plasental koryonik ECM ile birleştirilerek 3D biyo-baskı için yeni bir biyo-mürekkep formülasyonu oluşturulmuş ve yumuşak doku mühendisliği için üstün özelliklere sahip hücre yüklü yapıların üretilmesine olanak sağlanmıştır. Çalışma sonucunda SF filmleri, kompozit hidrojeller içinde kapsüllenmiş insan fibroblastlarının metabolik aktivitesini ve hücre davranışını araştırmak için kullanılmış ve belirli formülasyonlarda hücre yayılması, morfolojisi ve metabolik aktivitesinde önemli gelişmeler olduğu gösterilmiştir (Schneider vd. 2023).



Şekil 2.7 İpek, tirozinli jelatin ve insan plasenta ECM (SGE) kompozit hidrojelleri için bileşenlerin işlenme şeması

A) hpcECM hidrojel, insan plasentasından alınan koryonik dokunun doku deselülerizasyonu ve ardından hpcECM tozunun fizyolojik koşullarda (37 °C, pH 7,2) jel oluşturan bir ön hidrojel çözeltisi içinde çözdürülmesi için enzimatik sindirim ile üretilmiştir. B) Tiramin ile modifiye edilmiş amino asitlerin jelatin omurgasına EDC/NHS bağlanmasıyla sığır jelatin tip B'nin kimyasal modifikasyonu. C) (ii) *Bombyx mori* ipek koza liflerinin karbonat tamponu (60 dakika kaynatma) kullanılarak gamdan arındırılması, ardından (iii) alüminyum folyo üzerinde havada kurutma ve (iv) ipek fibroin ön hidrojel çözeltisi üretmek için ipek liflerinin lityum bromür (LiBr) ile çözdürülmesi. (v) Polimerizasyon, *horseradish* peroksidaz (HRP) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) kombinasyonu ile kimyasal olarak indüklenebilir. D) Üç bileşenin karıştırılmasıyla 3D baskı ve doku mühendisliği için SGE kompozit hidrojeller elde edilir (Schneider vd. 2023)

Bir diğer çalışmada ise 3D baskı teknolojisi kullanılarak nanohidroksiapatit (nHA)/metilakrilatlı ipek fibroin (MASF) kompozit biyolojik iskele geliştirilmiş ve kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile *in vitro* deneyler ve sıçan kafatası defektleri kullanılarak *in vivo* deneyler yoluyla iskelenin morfolojik yapısı ve biyoyumluluğu araştırılmıştır. Sonuç olarak, nHA/MASF kompozit iskele mükemmel biyoyumluluk ve osteojenik özellikler göstermiştir (Huiwen vd. 2024).



Şekil 2.8 İn vivo ve in vitro kemik rejenerasyonunu desteklemek için fotoküre 3D baskılı nHA/MASF kompozit iskelelerin üretiminin şematik gösterimi (Huiwen vd. 2024)

2.5.2 İpek fibroin hidrojeller

Hidrojeller, üç boyutlu (3D) ve çapraz bağlı ağ yapılarına sahip, su molekülü bakımından zengin polimerlerdir (Yuk vd. 2019, Correa vd. 2021). Böyle bir ağ sistemi, çok sayıda su molekülünü emme ve sıvı bir ortamda belirli bir şekli uzun süre korurken şişme yeteneğine sahiptir (Lin ve Metters 2006, Caccavo vd. 2018). İpek fibroinin jelleşmesi, makromoleküler protein zincirleri arasındaki moleküller arası ve molekül içi etkileşimlerin bir sonucudur. Bu etkileşimler, moleküler zincirleri fiziksel olarak çapraz

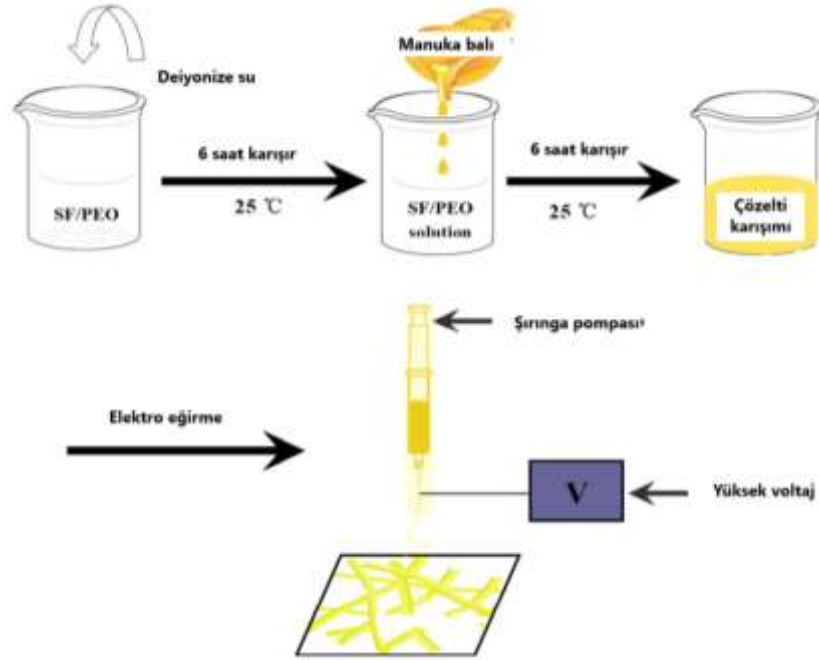
bağlayan hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri içerir. Sonuç olarak, normal koşullar altında bile SF çözeltileri jelleşme özellikleri gösterir (Kang vd. 2000, Luo vd. 2015). Ancak bu etki, ciddi bir zaman kaybı ve düşük kalitesi nedeniyle ipek hidrojellerin hazırlanmasında kullanılmamaktadır. SF'nin hidrojelasyonu, sulu SF çözeltilerinde yüksek sıcaklıklar, düşük pH, yüksek iyonik kuvvet, vorteksleme, sonikasyon, dondurarak jelleştirme ve elektrojelleştirme gibi bir dizi farklı yöntemlerle uyarılır (Kim vd. 2004, Bhardwaj vd. 2011). Jelleşme süreci sırasında, SF'deki yapısal değişiklikler düzensiz bir durumdan, jeli fiziksel olarak çapraz bağlayan ve stabilize eden bir β -tabaka konformasyonuna dönüşür (Huang ve Bonni 2016). Yapılan bir çalışmada biyomedikal uygulamalar için basit bir sonikasyon işlemi kullanılarak kurkumin yüklü ipek fibroin/hyaluronik asit hidrojelleri hazırlanmıştır (Chaala vd. 2023). Kurkuminin hidrojelere eklenmesinin, ipek I ve ipek II yapılarının oluşmasına yol açarak malzemelerin kristalliliğinde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Kurkumin yüklü ipek fibroin iskelenin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksikite değerlendirmesi, iskelenin 7 günlük bir süre boyunca toksisite sergilemediğini ve hücre canlılığının aslında daha yüksek kurkumin konsantrasyonlarıyla arttığını göstererek geliştirilen hidrojellerin potansiyel biyouyumluluğunu ortaya koymuştur.

2.5.3 İpek fibroin fiberler

İpek fibroin fiberlerin çok yönlülüğü, fonksiyonel özelliklerini geliştiren yüzeylerin ve dokuların oluşturulmasına olanak tanıyan nano ölçekte tasarlanabilme yetenekleriyle daha da artmaktadır. Fiberler, amaçlanan uygulamaya göre uyarlanabilen belirli gözenek boyutları, mekanik güçler ve bozunma oranları ile üretilebilir. Bu ayarlanabilirlik, onları geçici yara örtüleri ve rejeneratif tıpta uzun süreli implantlar dâhil olmak üzere birçok uygulama için ideal hale getirir. Rejenere ipek fibroin fiberleri veya yapay ipek lifleri genellikle elektro-eğirme, ıslak-eğirme ve kuru-eğirme gibi lif eğirme teknikleriyle üretilir. Elektro-eğirme tekniği, doku mühendisliği uygulamalarında hücre dışı matrisin (ECM) doğal liflerini daha yakından taklit edebilen polimerik nanofibröz iskeleler üretmek için kullanılabilir (Li ve Sun 2022).

Yapılan bir çalışmada Amplex Red ile aşılınmış elektroğirilmiş ipek fibroin fiberleri, hidrojen peroksiti tespit ederek yaralardaki oksidatif stresi görsel olarak algılamaktadır. Bu yenilikçi yaklaşım, yara iyileşme süreçlerinin eş zamanlı olarak izlenmesine olanak tanıyarak, özellikle iyileşme bozukluğu olan diyabetik hastalar için faydalı olmaktadır (Singh vd. 2020).

Yang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise Manuka balı ve ipek fibroin, yara pansumanı için kompozit lifli matrisler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Farklı oranlarda manuka balını ipek fibroin liflerine ekleyerek bu yeni matrislerin antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, manuka balı ve ipek fibroin kompozit matrislerin yara iyileşmesini önemli ölçüde iyileştirdiği ve sonuç olarak, manuka balı ve ipek fibroin kompozit lifli matrislerin, yara pansumanı için umut vaat eden bir seçenek olduğu görülmüştür (Yang vd. 2017).



Şekil 2.9 Manuka balı yüklü ipek fibroin kompozit lifli matların üretimi için şematik gösterim (Yang vd. 2017)

2.5.4 İpek fibroin süngerler

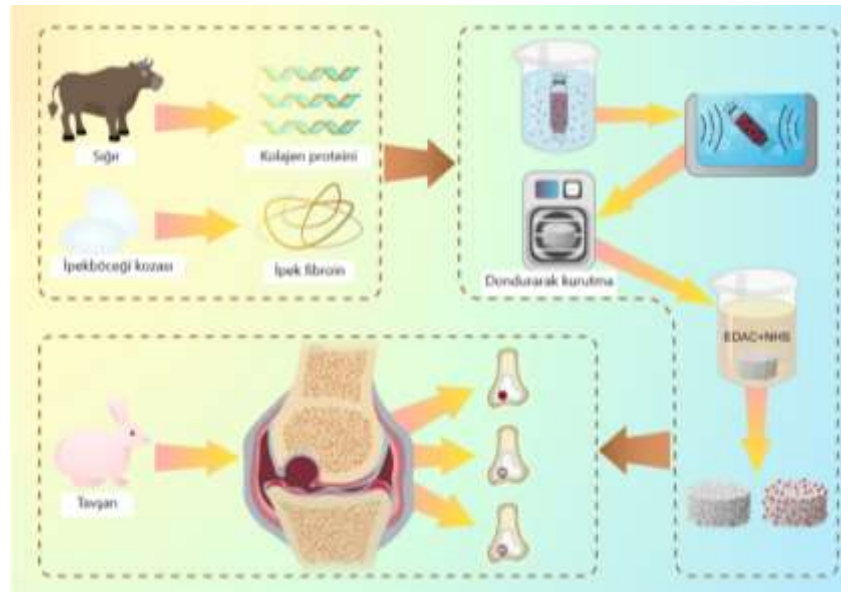
Son yıllarda bazı gözenekli biyomalzemeler biyotıp alanına önemli katkılarda bulunmuştur ve bu malzemeler yapay kemiklerin hazırlanmasında ve yumuşak dokuların onarımında kullanılmıştır. Ayrıca, gözenekli ipek fibroin süngerleri, üstün biyouyumlulukları ve kontrol edilebilir biyobozunurlukları nedeniyle 3D iskeleler olarak da öne çıkmaktadır (Yan vd. 2013). Gözenekli ipek fibroin süngerleri, dondurarak kurutma (liyofilizasyon), porojenler ve gaz köpürtme kullanılarak su bazlı veya çözücü bazlı ipek fibroin (örn. hekzafloropropanol) ile elde edilebilir (Vepari ve Kaplan 2007). Dondurarak kurutma tekniği yaygın yaklaşımlardan biridir ve sulu ipek fibroin çözeltisinin dondurularak gözenekli bir yapı oluşturmak için düşük basınç altında süblimleştirildiği kurutma tekniğidir. Kalıplama ve dondurma öncesinde, gözenekli çözücü bazlı süngerlerin hazırlanması için sulu ipek fibroin çözeltisine az miktarda çözücü (etanol, metanol, DMSO) eklenebilir (Tamada 2005). Diğer bir yöntem ise ipek fibroin çözeltisinin porojen görevi gören tuz partikülleri ile karıştırıldığı tuz süzme işlemidir. İpek fibroin katılaştığında, tuz süzülerek geride gözenekli bir sünger bırakır. Ayrıca, gaz köpürtme teknikleri, ipek fibroin matrisi içinde birbirine bağlı gözenekler oluşturmak için gaz kabarcıklarının oluşumunun kullanıldığı bir diğer tekniktir.

Kemik doku mühendisliği uygulamaları için yapılan bir çalışmada hidroksiapatit nanopartikülleri ile birleştirilmiş metakrilatlı ipek fibroin (SilMA) sünger iskeleler üretilmiştir. SF sünger iskelelerin hücre metabolizmasını aktive etme ve biyolojik sistemlerle güçlü etkileşime girme konusundaki etkinliği, osteosarkom hücrelerini içeren testlerde gösterilmiştir. Özellikle doğal kaynaklardan elde edilen hidroksiapatit nanopartiküllerinin dâhil edilmesinin hücresel aktiviteyi artırdığı ve SilMA/hidroksiapatit kompozit süngerlerini kemik rejenerasyonu uygulamaları için umut verici bir aday haline getirdiği görülmüştür (Spessot vd. 2024).



Şekil 2.10 Nanokompozit SilMA sünger üretim sürecinin şeması (Spessot vd. 2024)

Kıkırdak onarımı için ultrason ile muamele edilen kolajen ve ipek fibroin kompozit iskelelerinin geliştirildiği çalışmada ise ipek fibroin süngerler, belirli oranlarda kolajen ile birleştirilmiştir. Kıkırdak onarımı için kolajen/ipek fibroin kompozit iskelelerinin en uygun oranının 7:3 olduğu bulunmuştur. Bu süngerler, kıkırdak doku büyümesi için çok önemli olan spesifik kültür koşulları altında kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını başarıyla teşvik etmiştir. Tam kalınlıkta eklem kıkırdağı defektleri olan *in vivo* tavşan modelinde, ipek fibroin süngerler makroskopik, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler de dâhil olmak üzere çeşitli değerlendirmelerle doğrulandığı üzere osteokondral rejenerasyonu etkili bir şekilde desteklemiştir (Yu vd. 2023).

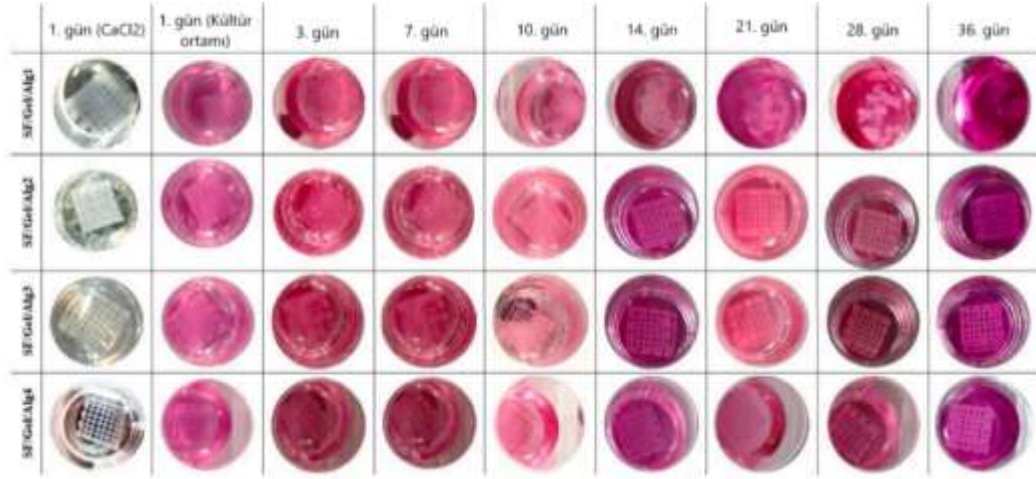


Şekil 2.11 Kol/SF iskelelerinin üretimi ve eklem kıkırdağı defektlerinin tedavisi için uygulanması (Yu vd. 2023)

2.5.5 3D biyobasım iskeleleri

3D baskı teknolojilerindeki son gelişmeler, polimer dispersiyonlarının basılmasına olanak sağlamıştır. Bu yapılardan biri olan ipek de şekil ve boyutlarının hassas bir şekilde kontrol edilmesiyle üretilmektedir. Bu yaklaşım, malzemenin çeşitli uygulamalara uyarlanmasını kolaylaştırmaktadır. Bazı yaklaşımlar, bir yapı elde etmek için ipeğin özelliklerine odaklanmıştır. Örneğin, ipek proteinlerinin hiyerarşik bir şekilde bir araya gelmesini sağlamak için tuzlu su banyosunda baskı uygulanırken (X. Mu vd. 2020), sentetik nanokil ve polietilen glikol (PEG) banyosunda serbest biçimli baskı, tek adımlı bir baskı ve *in situ* fiziksel jelleşme süreci oluşturmak için kullanılmıştır (Rodriguez vd. 2018). Diğer stratejiler ipek fibroinin PEG (Zheng vd. 2018), polioller (Jose vd. 2015) veya polisakkarit konjak glukomannan gibi diğer polimerler ve kıvam artırıcı maddelerle karıştırılmasına odaklanmıştır (Sommer vd. 2016).

Güncel olarak yapılan bir çalışmada ipek fibroin, jelatin ve aljinat ile biyo-baskı için biyomürekkep optimizasyonu hedeflenmiştir. Çalışmada, ipek fibroin eklenerek biyomürekkebin özelliklerinin iyileştirildiği ve doku mühendisliği uygulamaları için önemli olan su alımının arttığı ve bozunma oranının azaldığı görülmüştür. Biyomürekkebin en yüksek baskı doğruluğunu sağlamak için %4 w/v aljinat içeriği ile optimize edilmiştir. 36 gün boyunca kültür ortamında bozunmadan kalan biyomürekkep iyi bir stabilite göstermiştir. Optimum bileşenlerin eşit oranda %5 ipek fibroin, %7 jelatin ve %4 aljinat olduğu belirlenmiştir. Biyomürekkebin alendronat ile daha da geliştirilmesi, osteoblast benzeri hücrelerde alkalın fosfataz aktivitesinin artmasına yol açarak hücre davranışı ve hücrelerin kemik oluşumuna bağlılığı üzerinde olumlu bir etkisi olduğuna işaret etmektedir (Norouzi vd. 2024).



Şekil 2.12 Hücre kültürü ortamında stabilite test etmek için farklı günlerde iskelelerin bir dizi görüntüsü (Norouzi vd. 2024)

2.6 Biyomedikal Uygulamalar

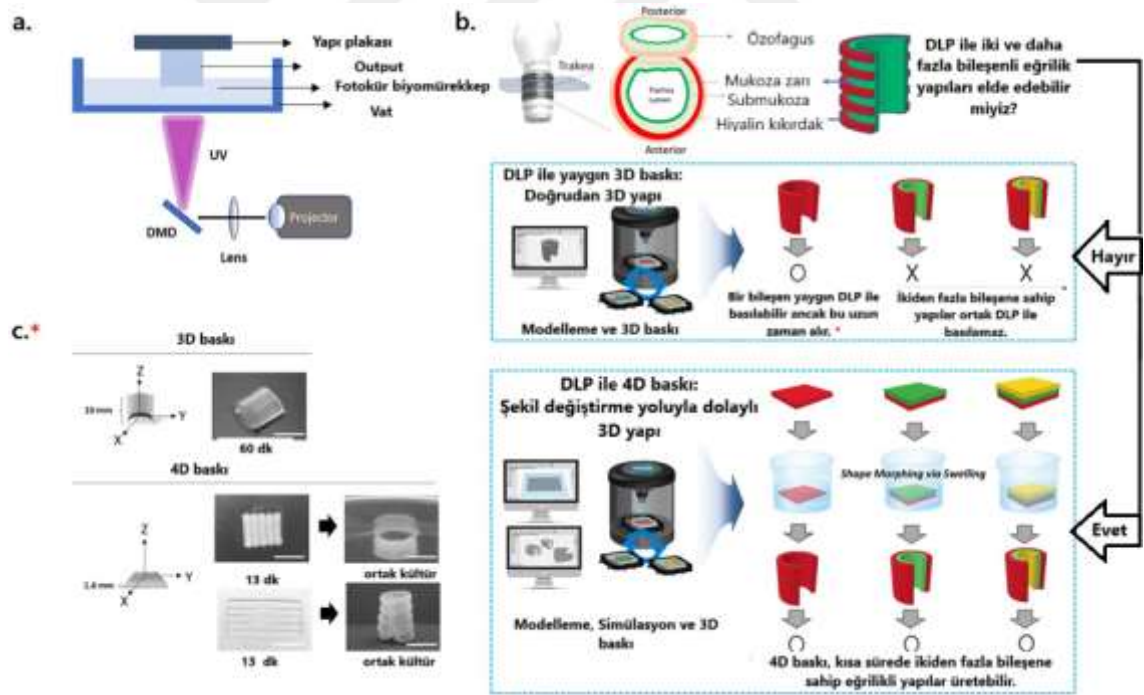
Bombyx mori ipekböceğinden elde edilen ipek fibroin, olağanüstü mekanik özellikleri, biyouyumluluğu ve ayarlanabilir biyolojik parçalanabilirliği nedeniyle çok çeşitli biyomedikal uygulamalar için çok yönlü bir biyomateryal olarak ortaya çıkmıştır (De Giorgio vd. 2024). İpek fibroin bazlı iskeleler hücre büyümesi ve doku rejenerasyonu için yapısal destek sağlarken, kontrollü bozunma yapıları sürekli ilaç salım sistemleri için idealdir. Ayrıca, ipek fibroin sargılar hücresel proliferasyonu teşvik ederek ve inflamasyonu azaltarak yara iyileşmesini artırır (Mazurek vd. 2022). İpek fibroinin işlenmesi ve işlevselleştirilmesindeki son gelişmeler, doku mühendisliği, ilaç dağıtımı ve yara iyileşmesi dâhil olmak üzere bir dizi uygulama için yenilikçi biyomalzemelerin geliştirilmesini sağlamıştır (Pollini ve Paladini 2024).

2.6.1 Doku mühendisliği

Doku mühendisliğinin amacı, hasarlı doku ve/veya organların rejenerasyonunu kolaylaştırmak için hücreleri iskele malzemeleri ve büyüme faktörleriyle birleştirmektir. İpek fibroinin insan hücrelerinin bağlanması ve büyümesini uyardığı bilinmektedir (Kamalathevan vd. 2018); bu nedenle, benzersiz özellikleri ve yapısı nedeniyle doku mühendisliğinde iskele olarak başarıyla kullanılabilen ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)

onaylı bir biyomateryal haline gelmiştir (Sun vd. 2021). Sentetik polimerlerin aksine ipek fibroin, doğal hücre dışı matrisin özelliklerine çok benzeyen ayırt edici özelliklere sahiptir. Bu da onu hücre büyümesini, farklılaşmasını ve doku entegrasyonunu desteklemek için uygun bir malzeme haline getirir. Bu çok yönlü malzeme, filmler, lifler, süngerler ve hidrojeller de dâhil olmak üzere çeşitli şekillerde işlenebilir; bu da kemik, kıkırdak, deri, sinirler ve kardiyovasküler dokuların rejenerasyonunda geniş bir uygulama alanı sağlar.

Kim ve arkadaşları tarafından kıkırdak dokusu üretimi için bir 4D biyo-baskı sistemi geliştirilmiştir. Araştırmacılar, 4D biyo-baskılı ipek hidrojelini üretilmesini ve trakea taklidi doku oluşturmak için kullanılmak üzere biyo-baskılı yapıyı 8 haftalık bir tavşanın hasarlı trakeasına başarıyla implante etmiş ve böylece bu yeni biyo-baskı sisteminin *in vivo* uygulanabilirliğini göstermiştir (Kim vd. 2020).

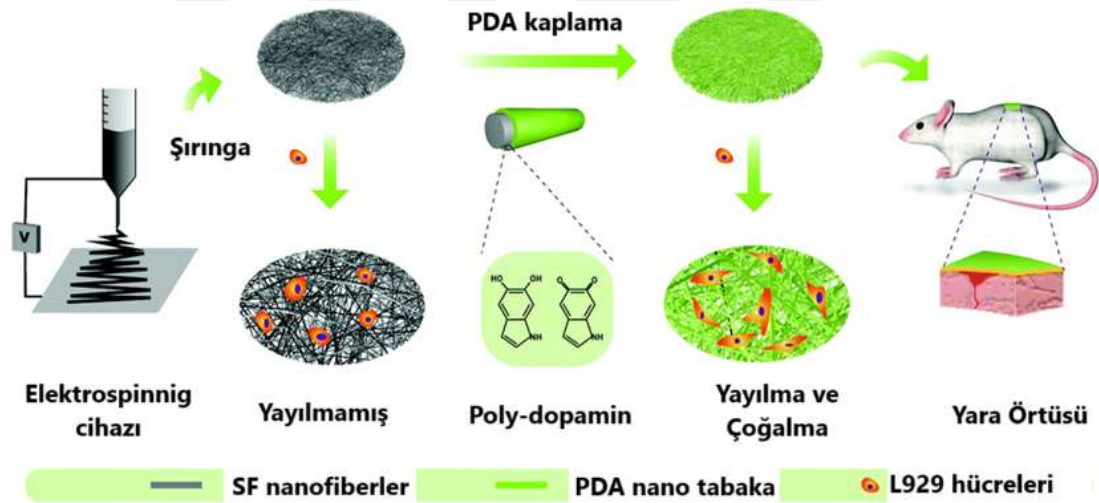


Şekil 2.13 DLP baskı süreci ve yaygın 3D baskı ile DLP 4D baskı arasındaki performans karşılaştırması

(a) DLP baskı prosedürünün şematik diyagramı. DMD: Dijital mikroayna cihazı. (b) DLP 4D baskının ana avantajı. Yaygın DLP 3D baskı teknolojisi, yalnızca tek tip hücre (veya malzeme) ile tamamlanmış bir eğrilik yapısının doğrudan üretilmesini sağlar. İnce iki katmanlı bir yapının 3D baskısı ve sulu bir çözelti içinde şekil değiştirmesi sırasında ilerleyen DLP 4D baskı teknolojisi, ikiden fazla hücre (veya malzeme) türüyle bir eğrilik yapısının üretilmesini sağlar. Bu nedenle, DLP 4D baskı yöntemiyle biyolojik ve yapısal olarak tatmin edici bir doku üretilir. (c) Baskı süresi karşılaştırması (Kim vd. 2020)

Yapılan bir çalışmada SF bazlı kemik boşluğu doldurucuların kalsiyum seramik bazlı dolduruculara kıyasla etkinliği *in vitro* testlerle araştırılmıştır. Yüksek gözeneklilik ve mekanik mukavemet gibi spesifik özelliklere sahip SF iskelelerinin, seramik bazlı iskelelere kıyasla daha iyi bir şekilde kemik rejenerasyonunu desteklediği bulunmuştur (Deshpande vd. 2021).

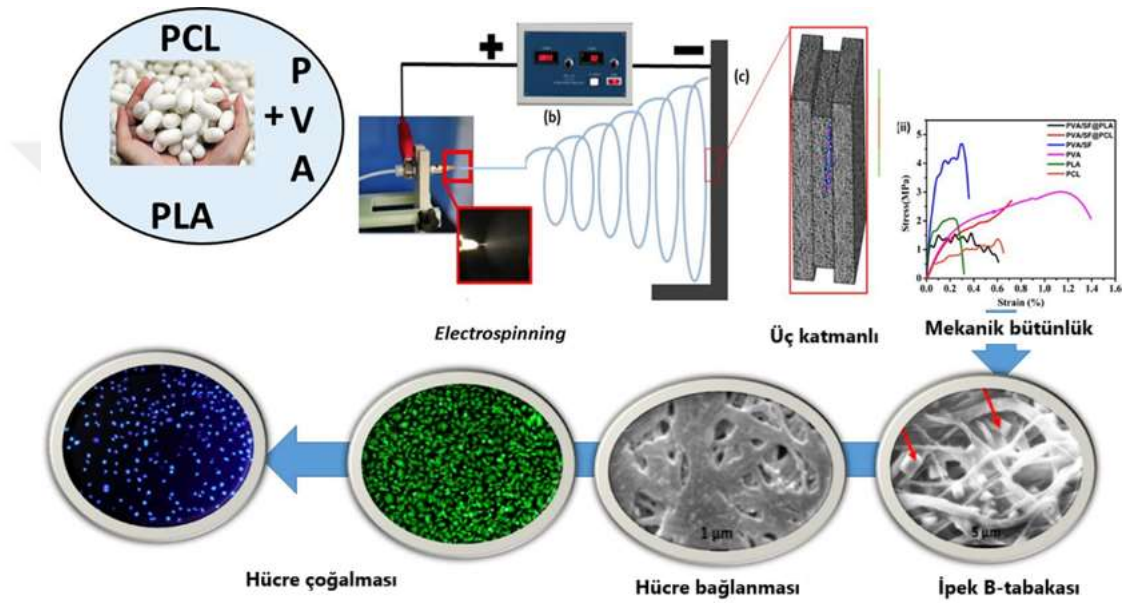
Yara örtüsü olarak Zhang ve arkadaşları çalışmalarında, biri poli-dopamin (PESF) ile modifiye edilmiş iki tip elektroğirilmiş SF iskelesini (ESF) incelemiştir. Bulguları, PESF'nin fibroblastların hidrofilitliğini ve protein adsorpsiyon kapasitesini, bağlanmasını, yayılmasını ve çoğalmasını artırdığını ve bunun da incelenen diğer iskelelere kıyasla iyileşme sürecinin hızlanmasına yol açtığını göstermiştir. Sonuç olarak, PESF membran iskelesi cilt rejenerasyonu için umut verici bir yara örtüsü olmayı vaad etmiştir (Zhang vd. 2019).



Şekil 2.14 Poli-dopamin (PDA) kaplamalı ve kaplamasız iki farklı SF bazlı membranın üretiminin ve uygulamasının şematik gösterimi

SF ilk olarak elektrosprink SF membranı (ESF) haline getirilmiştir. Ardından, PDA kaplı ESF membranı (PESF) oluşturmak için ESF'deki SF lifleri üzerine PDA kaplandı. Fare fibroblast hücreleri (L929), yara örtülerinin hücre canlılığını incelemek için hem ESF hem de PESF membranları üzerinde kültürlenmiştir. ESF üzerindeki hücreler dairesel ve iğsi olma eğilimindeyken, PESF üzerindeki hücreler yıldızlı görüntü sergilemiştir. PESF, ESF ve ticari bir yara örtüsüne (3MTM Tegaderm™) kıyasla protein adsorpsiyonunu, hücre bağlanmasını, yayılmasını ve çoğalmasını kolaylaştırmış ve sonuçta bir sıçan modelinde PESF membranı diğer iki gruba göre daha etkili yara iyileşmesine yol açmıştır (Zhang vd. 2019)

Mousa ve arkadaşları, hidrofilik orta katman olarak SF-PVA kompoziti ve sırasıyla üst ve alt katmanlar olarak PCL/PLA içeren üç katmanlı nanofiber yamalar üretmek için elektroğirme tekniğini kullanmıştır. Geliştirilen yamalar, *in vitro* fizyolojik koşullar altında tatmin edici bir bozunma oranı sergilemiştir. Ayrıca hücre yapışması ve çoğalmasına elverişli gelişmiş nanofiber özellikler göstererek kalp dokusunun fiziksel ve mekanik gereklilikleri için uygun olduğu görülmüştür (Mousa vd. 2020).



Şekil 2.15 Üst ve alt katmanlar elektroğirme tekniği ile sırasıyla polikaprolakton polimer (PCL) ve polilaktik asitten (PLA) oluşumunun gösterimi (Mousa vd. 2020)

İpek fibroin mat iskeleler, nöral mühendislik alanında da kullanılma potansiyeline sahiptir. Li ve arkadaşları, çalışmalarında hizalanmış ve rastgele elektrospunlanmış SF mat iskelelerini incelemişlerdir. Bunun sonucunda SF mat iskelenin nöral progenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını artırdığını tespit etmişlerdir. SF mat iskelesi nörogenez için elverişli bir mikro ortam sağlayarak onu nöral mühendislikte umut verici bir malzeme haline getirmiştir (Li vd. 2019).

2.6.2 İlaç taşıma sistemleri

İlaçların terapötik etkisini iyileştirmek ve yan etkilerini azaltmak için terapötik ajanların hastalıklı bölgelere ulaştırılması gerekmektedir. Bu hedeflere ulaşmak için, son yıllarda mezogözenekli silika nanopartiküller (NP'ler), lipozomlar ve polimerik NP'ler dâhil olmak üzere çeşitli nano ölçekli ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmiştir (Chen vd. 2018, Patra vd. 2018). Son yıllarda, kitosan, aljinat, jelatin ve ipek fibroin de dâhil olmak üzere bir dizi doğal polimer ilaç iletim malzemesi olarak geliştirilmiştir. Bunlar arasında ipek fibroin, nano ölçekli partiküller halinde kolaylıkla işlenebilen FDA onaylı bir polimerdir (Lammel vd. 2011, Kundu vd. 2014, George vd. 2019). Sudaki zayıf çözünürlükleri nedeniyle, kemoterapötik ajanlar stabilize edilebilir, biyoaktiviteleri serbest bırakıldıktan sonra korunabilir ve fibroin ağının β -tabaka kristal yapıları ile suda çözünmeyen ilişki sayesinde tedavi sonuçları iyileştirilebilir. Ayrıca, mevcut farklı formatlar sayesinde ipek fibroin tabanlı malzemelerle intratümöral ve enjekte edilebilir uygulama mümkün hale gelmiştir (Jastrzebska vd. 2015).

Kaplan grubu, ipek fibroin nanopartiküllerin pH'a bağlı net bir ilaç salım özelliği sergilediğini rapor eden ilk grup olmuştur. Doksorubisinin (DOX) ipek fibroin nanopartiküllerden salım hızının, pH değeri 7.4 ve 6.0 olan tamponlara kıyasla pH 4.5 tamponunda önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Tampondaki (pH 4.5) negatif net yüklerin kaybının ipek fibroin molekülleri ve DOX arasındaki elektrostatik etkileşimi zayıflatma etkisine sahip olduğu ve bunun da DOX'un NP'lerden salımının hızlanmasına yol açtığı varsayılmıştır (Seib vd. 2013).

Daha güncel olarak yapılan bir çalışmada ise, ipek fibroin protein nanopartiküller kolay ve çevre dostu bir süreç kullanılarak sülforafan bakımından zengin brokoli filizi özütü (BSE) yüklemek üzere sentezlenmiş ve ardından stabiliteyi, çözünürlüğü ve kanser hücresi hedeflemesini artırmak için polietilen glikol ve folik asit (PEG-FA) ile konjuge edilmiştir. Sülforafanın nanopartiküllerden salım profilinin pH'a bağlı olduğu ve maksimum salımın simüle edilmiş bağırsak sıvısında (pH 7.4) gerçekleştiği bulunmuştur. BSE'nin nanopartiküller içinde kapsüllenmesi, serbest BSE'ye kıyasla sülforafan salım hızının azalmasıyla sonuçlanmış ve bu da kontrollü salım özelliklerinin varlığını

göstermiştir. *İn vitro* çalışmalar, BSE yüklü nanopartiküllerin antioksidan ve antikanser aktiviteler sergilediğini göstermiştir. İpek fibroin protein nanopartikülleri normal fare fibroblast hücre hatları (L929) üzerinde fark edilebilir bir toksisite sergilememiştir, bu da normal hücreler için potansiyel olarak güvenli olduğunu göstermektedir (Ghanbari Hassan Kiadeh vd. 2024).



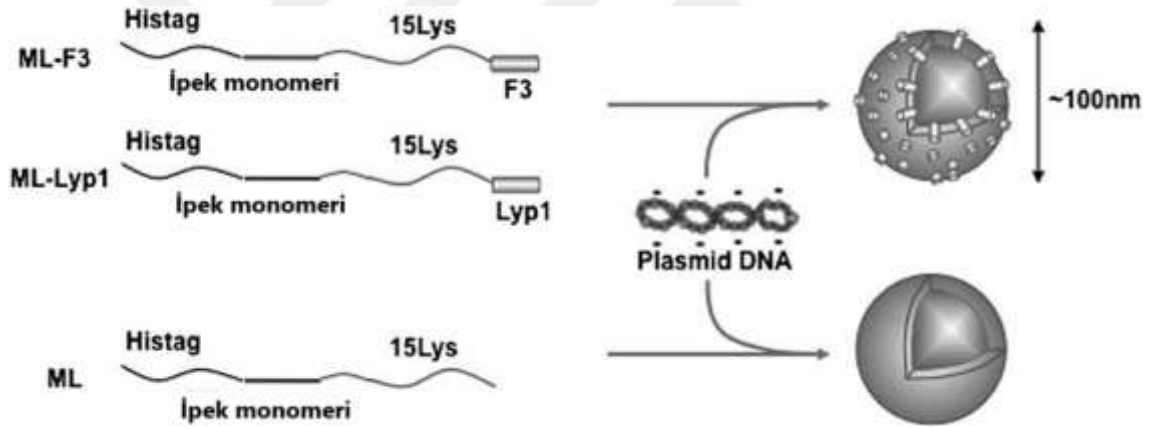
Şekil 2.16 PEG-FA-SFPNP'lerin hazırlanmasının şematik gösterimi (Ghanbari Hassan Kiadeh vd. 2024)

2.6.3 Gen terapisi

Genel olarak viral vektörler gen iletimi için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Fakat yüksek sistemik toksisite ve bağışıklık tepkilerine neden olma potansiyeli de dâhil olmak üzere doğal dezavantajları, kanser tedavisindeki uygulamalarını sınırlamıştır (Numata vd. 2010). Çeşitli malzemeler arasında, ipek bazlı nanotaşıyıcıların gen iletiminde biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyoyumluluk, yüksek transfeksiyon verimliliği ve DNaz direnci sağladığı bilinmektedir (Zhao vd. 2015). Rekombinant DNA teknikleri, ipek proteinlerine farklı peptitlerin eklenmesini sağlayarak, sistem tasarımını uyarlama ve hedeflemeyi optimize etme imkânı sunmaktadır. Bu sayede, ipek bazlı polimerler, lipozomlar ve sentetik polimerlere göre gen iletiminde önemli avantajlar sağlarlar.

İpek-elastin benzeri proteinler (SELP) ise gen dağıtım sistemleri olarak kullanılmak üzere hidrojel oluşturularak adenovirüs içeren raportör genleri serbest bırakmada kullanılmaktadır (Megeed vd. 2004, Gustafson vd. 2009). SELP ile yapılan gen dağıtımının, hedef hücrelerde daha yüksek gen ekspresyonuna yol açtığı bildirilmiş ve baş-boyun katı tümörleri için uygulanabilir olduğu gösterilmiştir (Greish vd. 2009, Gustafson vd. 2009).

Numata ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ipek proteini bazlı nanotaşıyıcılar gen iletimi amacıyla poli(L-lizin) (PLL) ile birleştirilerek insan embriyonik böbrek (HEK) hücrelerinde plazmid DNA'nın (pDNA) transfeksiyon verimliliğinde bir iyileşme sağlanmıştır (Numata vd. 2012).



Şekil 2.17 Rekombinant ipek blok kopolimerlerinin pDNA komplekslerinin oluşum şeması

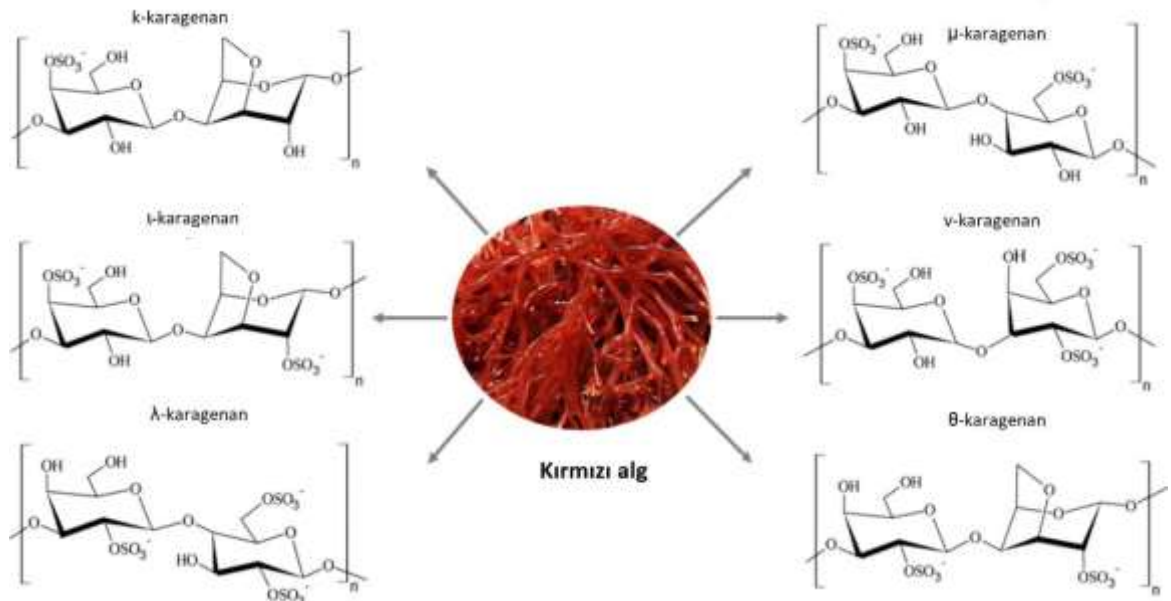
ML-F3: İpek monomer-15/lisin-F3 tümör hedefli peptit blok kopolimeri. ML-Lyp1: İpek monomer-15/lisin-Lyp1 tümör hedefli peptit blok kopolimeri. ML: İpek monomer-15/lisin blok kopolimeri (Numata vd. 2012)

2.7 Karagenanın Yapısı

Karagenan (Kar), kırmızı deniz yosunlarının ekstraksiyonundan elde edilen bir grup yüksek molekül ağırlıklı sülfatlı bir polisakkarittir. %15-40 oranında ester-sülfat içeriğine sahip sülfatlanmış bir poligalaktan olup anyonik bir yapıya sahiptir. D-galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktozun (3,6-AG) -1, 3 ve -1, 4 glikozidik bağlar aracılığıyla dönüşümlü olarak

bağlanmasıyla oluşur (Coviello vd. 2007, Necas ve Bartosikova 2013). Karagenan, jelleştirici, stabilize edici ve koyulaştırıcı bir madde olarak ve ayrıca gıda endüstrisinde, özellikle süt ürünlerinde yağ olarak kullanılır. Ayrıca kozmetik, ilaç, tekstil formülasyonları ve baskılar gibi farklı gıda dışı ürünlerde de kullanılırlar (Liu vd. 2015).

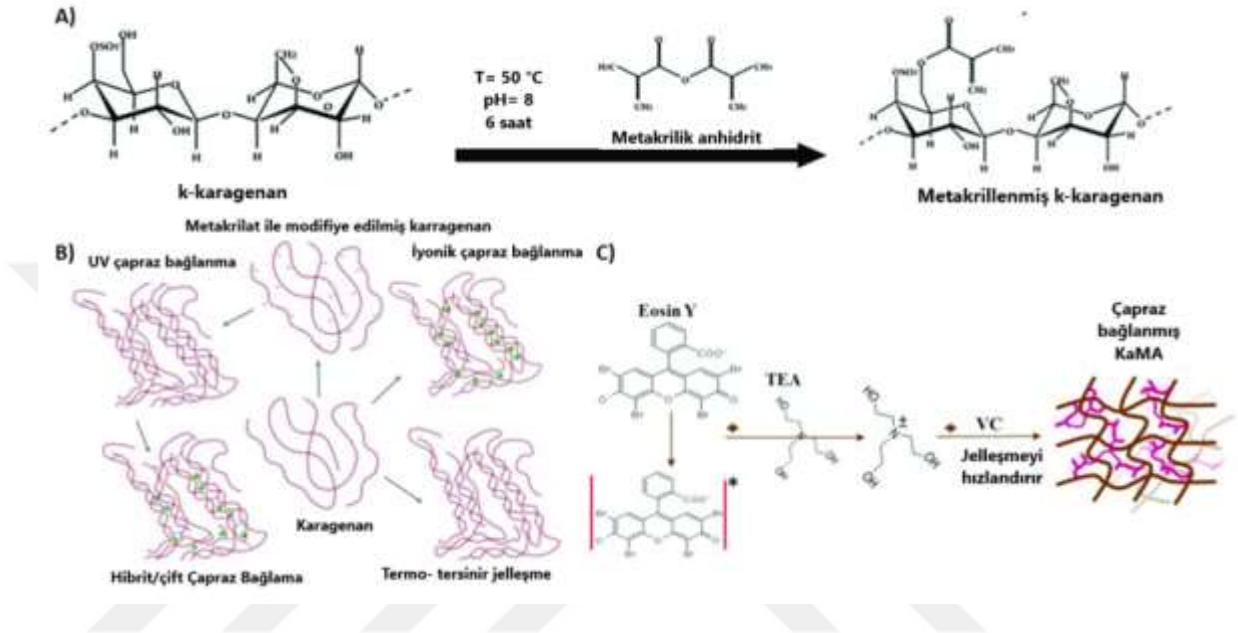
Sülfatlanma derecelerine göre farklılık gösteren üç temel karagenan türü vardır. (i) Kappa (κ)-karagenan, tekrarlayan disakkaritlerin birim başına bir negatif yük ile dönüşümlü olarak 3-bağlı -D-galaktoz 4-sülfat ve 4-bağlı 6-anhidro-galaktopiranozdan oluşur. (ii) Iota (ι)-karagenan, tekrarlayan disakkarit birim başına iki sülfat grubuna sahiptir. (iii) Lambda (λ)-karagenan disakkarit birimi başına üç sülfat grubuna sahiptir, ancak bunlar diğer iki karagenan türünün aksine herhangi bir 3,6-anhidrit köprüsü içermez (Campo vd. 2009, Pavli vd. 2011).



Şekil 2.18 Sülfatlanma derecelerine göre farklı karagenan türleri

Bunların arasından κ -karagenan, jelleşme özellikleri, mekanik mukavemeti ve doğal glikozaminoglikanlara (GAG) benzerliği nedeniyle doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel bir adaydır. κ -karagenan hidrojenleri iyonik çapraz bağlama yöntemleriyle oluşturulabilir, ancak bu hidrojenler fizyolojik ortamlarda düşük stabiliteye sahiptir,

bunun başlıca nedeni tek değerlikli iyonların çevrede bulunan iyonlarla yer değiştirmesidir (Sangfai vd. 2015). Bu dezavantajın üstesinden gelmek için κ -karagenan, metakrilatlı gruplarla kimyasal olarak işlevselleştirilir ve böylece foto çapraz bağlanabilir hidrojeller elde edilir. Çapraz bağlanma sırasında oluşan kovalent bağlar polimer ağına yüksek stabilite kazandırmaktadır (Mihaila vd. 2013).



Şekil 2.19 Metakrilat κ -karagenan (KaMA) sentezi ve hidrojel oluşumu

(A) Metakrilat κ -karagenan sentezinin şematik gösterimi. (B) Çift çapraz bağlı hidrojin değerlendirilmesi. (C) κ -karagenan metakrilatın eozin Y aracılığıyla görünür ışık çapraz bağlanma yaklaşımları (Mokhtari vd. 2021)

2.8 Biyomalzeme Olarak Karagenan

Karagenan, biyoyumluluğu, toksik olmaması ve hidrojel oluşturma kabiliyeti nedeniyle doku mühendisliği, ilaç dağıtımı ve yara iyileşmesi gibi biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir biyomateryaldir. Bu tür hidrojeller, hücre dışı matrisi taklit edecek şekilde tasarlanabilir ve böylece hücre büyümesi ve farklılaşması için destekleyici bir ortam sağlar. Karagenan hidrojellerinin oluşumu genel olarak sıcaklıkla tersinir jelleşme, iyonik çapraz bağlanma ve karagenan omurgasının foto çapraz bağlı metakrilat bağları ile modifikasyonu yoluyla elde edilir. Bu modifikasyonlar, oldukça iyi özellikler sergileyen çeşitli karagenan hidrojel formlarının üretilmesini sağlar (Yegappan vd. 2018).

2.8.1 Doku mühendisliği

Doku mühendisliğinde kullanılmak üzere hidrojellerin tasarımı özellikle kalp, sinir ve kemik dokuları için önemlidir. Karagenan gibi doğal sülfatlı polisakkarit bazlı iskelelerin bir dizi doku mühendisliği uygulaması için potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Bunun nedeni, hücre dışı matrisi taklit etme yetenekleri, yüksek büyüme faktörü tutma kapasiteleri ve gözenekli yapılarıdır (Dinoro vd. 2019, Du vd. 2022, Zhou vd. 2023).

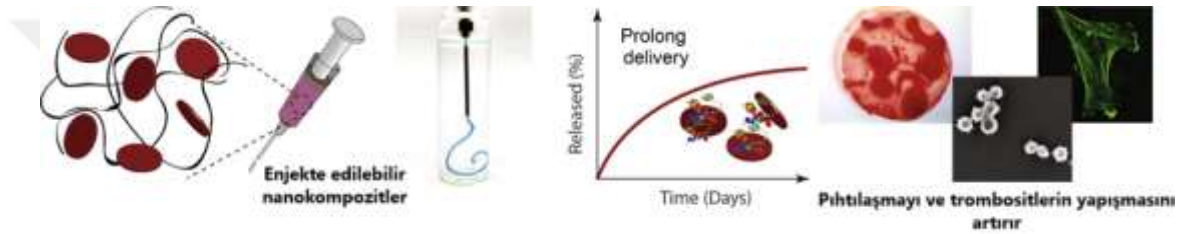
Mirza ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada nanohidroksiapatit (nHA), arap zankı (GA) ve κ -karagenanın farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonunun doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli incelenmiştir. Morfolojik, fizikokimyasal ve biyolojik çalışmaların karşılaştırmalı bir değerlendirmesi, üçlü sistemlerin nHA ve GA tarafından oluşturulan ikili sisteme kıyasla üstün biyoyumluluk, protein adsorpsiyonu ve osteojenik protein ekspresyonu sergilediğini ortaya koymuştur (Mirza vd. 2020).



Şekil 2.20 Nano-hidroksiapatit (n-HA), arap zankı (GA)/ κ -karagenan (κ -CG) içeren üçlü bir sistem üretimi (Mirza vd. 2020)

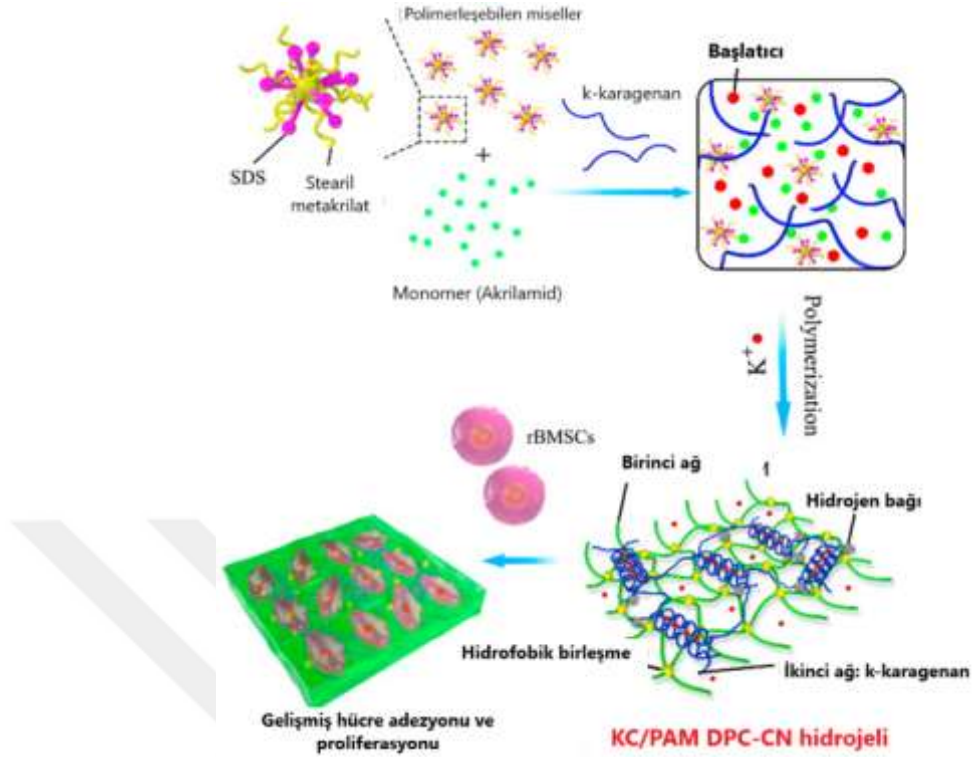
Yumuşak doku mühendisliği, hastalıklı yumuşak dokuları ve organları restore etmek için yeni bir strateji olarak geliştirilmiştir, ancak genellikle çeşitli yan etkileri olan invazif cerrahi ile birlikte uygulandığından bazı sınırlamaları vardır. Bu nedenle enjekte edilebilir

biyomalzemeler hasarlı alanı doğru bir şekilde doldurmak ve doku rejenerasyonunu kolaylaştırmak için geliştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, κ -karagenan katkılı iki boyutlu nanosilikatlar, iki bileşenin değişen oranlarda kombinasyonunu içeren basit bir karıştırma işlemiyle oluşturulmuştur. Nanosilikatların dâhil edilmesi sadece hidrojin mekanik özelliklerini, enjekte edilebilirliğini ve stabilitesini arttırmakla kalmamış, aynı zamanda terapötiklerin sürekli iletimi için uygun bir ortam sağlamıştır. Ayrıca, nanosilikatlar gelişmiş protein adsorpsiyonu, hücre yapışması, göçü ve trombosit bağlanması sergilemiş, böylece hem hemostatik hem de yara iyileştirici ajanlar olarak işlev görmüştür (Lokhande vd. 2018).



Şekil 2.21 κ CA-nanosilikat hidrojellerinin sentezi. KCl çözeltisinde çapraz bağlanmış kappa karagenan (κ CA) ve nanosilikatları (Si) birleştirerek enjekte edilebilir nanokompozit hidrojellerin üretiminin şematik gösterimi (Lokhande vd. 2018)

Karagenanın kimyasal yapısı, kıkırdığın hücre dışı matriksinde bulunan sülfatlı glikozaminoglikanların sentezlenmesini sağlar. Bu polimerler, kıkırdak hasarları için bir tedavi olarak geliştirilme potansiyeline sahiptir. Poliakrilamit (PAM) ve κ -karagenan (κ -Kar) kombinasyonundan oluşan yeni bir çift ağ (DN) hidrojel, Deng ve arkadaşları tarafından ikili fiziksel çapraz bağlama (DPC) stratejisiyle geliştirilmiştir. Bu hidrojel, PAM ile κ -karagenana çapraz bağlı sert bir K^+ ağının entegre edilmesiyle oluşturulmuştur. Hidrojin mekanik özellikleri, κ -karagenan konsantrasyonunun hassas bir şekilde kontrol edilmesiyle optimize edilmiş ve mükemmel mekanik performans elde edilmiştir. Hazırlanan hidrojel kovalent olmayan etkileşimler nedeniyle kök hücrelerin büyümesini destekleme yeteneği, onları yapay diyafram, tendon ve kıkırdak üretimi de dâhil olmak üzere doku mühendisliği uygulamaları için umut verici bir malzeme haline getirmektedir (Y. Deng vd. 2018).



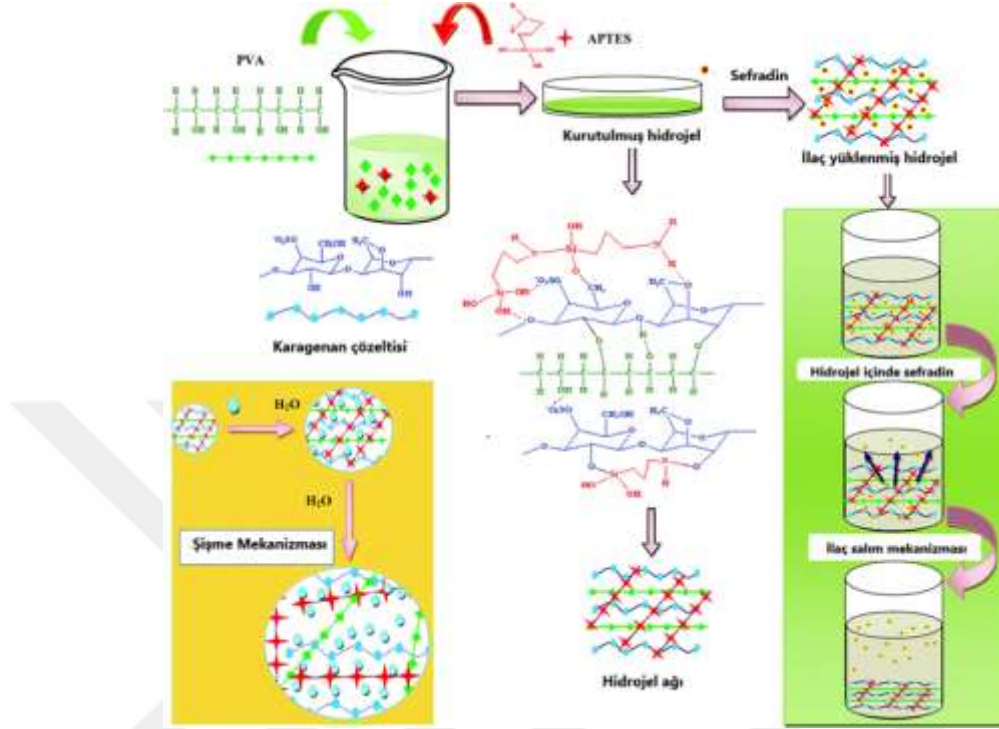
Şekil 2.22 KC/PAM DPC-DC hidrojelinin üretiminin ve hidrojel üzerindeki hücre yanıtlarının şematik çizimi (Yi Deng vd. 2018)

2.8.2 İlaç taşıma sistemleri

Özellikle biyouyumluluğu nedeniyle karagenan, ilaç formülasyonlarının özelliklerini geliştirmek, özellikle de ilaçların uzun süreli salımı için kullanılmaktadır; bu salım saatlerce hatta günlerce sürebilir. Yapışkanlığı ve pozitif yüzey yükü de dâhil olmak üzere karagenanın benzersiz özellikleri, mukozal ve epitelyal dokularda ilaçların salımını uzatmada belirgin bir avantaj sunar (Grenha vd. 2010, Pavli vd. 2010, Kianfar vd. 2013).

PVA, hidrojel oluşturmak için doğal karagenan ile birleştirildiğinde en yaygın kullanılan sentetik polimerlerden biridir. Rasool ve arkadaşları, sentetik polimer PVA ve silan çapraz bağlayıcı (3-aminopropil) trietoksisilan (APTES) kullanarak ilaç salım taşıyıcısı olarak uyarıcıya duyarlı κ -karagenan bazlı enjekte edilebilir bir hidrojel oluşturmuştur. Araştırmacılar, ilaç salımının artan pH ve zamanla birlikte arttığını ve 7,5 saat sonra zirveye ulaştığını keşfetmişlerdir. Bu hidrojin güçlü antibakteriyel aktivitesi, doğal

karagenan kullanımıyla onu vücutta enjekte edilebilir ilaç dağıtım sistemlerinde kullanım için ideal bir alternatif haline getirmiştir (Rasool vd. 2019).

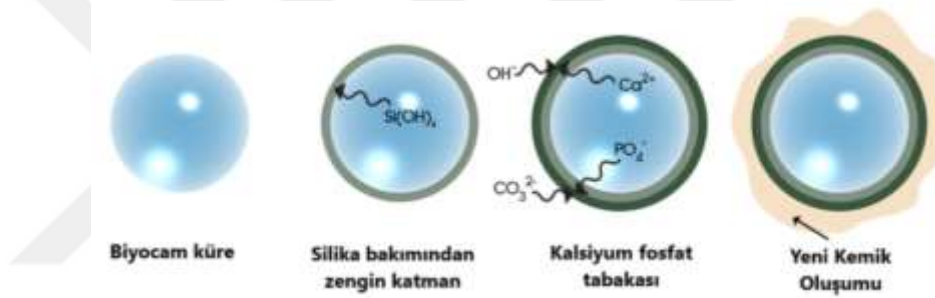


Şekil 2.23 Önerilen etkileşim mekanizması sentezlenen karışım hidrojelinde sunulmuştur (Rasool vd. 2019)

Ayrıca karagenan, Herpes Simpleks Virüsü (HSV), İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) ve Papillomavirüs enfeksiyonunu önlemek için bir mikrobisit olarak da kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, antiviral ilaç asiklovirin κ -karagenan hidroksil-propil-metil-selüloz (HPMC) kompozit hidrojel içine dâhil edildiğinde, yedi günlük bir süre boyunca uzun süreli ilaç salımı temin edilmiştir. κ -karagenanın HPMC'ye oranının ilacın sürekli salımında çok önemli bir faktör olduğu bulunmuştur. Vajinal mukoadhezif karagenanın kalış süresinin kitosandan daha uzun olduğu ve HPMC ile kombine edildiğinde hasta uyumunu artıran orta düzeyde şişme görülmüştür. Bu hidrojel sisteminin biyouyumlu olduğu ve genital herpes enfeksiyonunun önlenmesinde faydalı olabileceği görülmüştür (Sanchez-Sanchez vd. 2015).

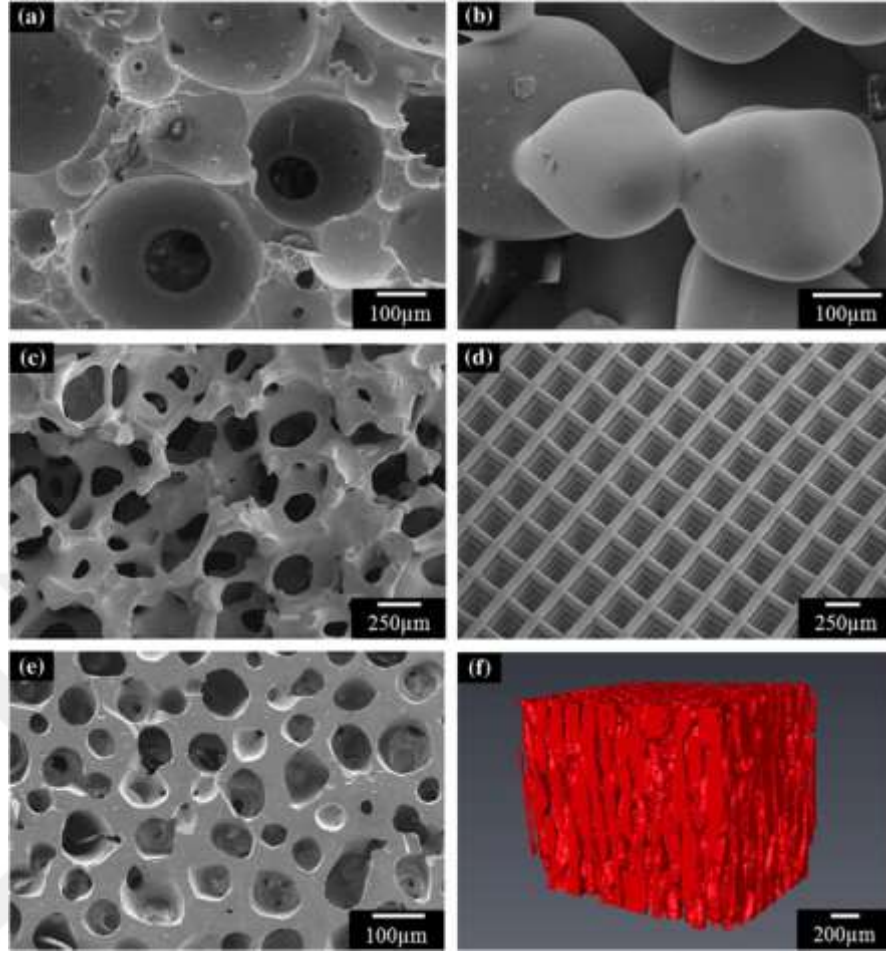
2.9 Biyoaktif Camlar

Doku rejenerasyonunda cam ve cam-seramiklerin kullanımı ilk olarak 1969 yılında L. L. Hench tarafından rapor edilmiştir (Larry L. Hench 2006). 45S5 olarak adlandırılan biyoaktif camın, doğal kemikte bulunan hidroksiapatite benzer bir mineral oluşturarak kemik arayüzlerine bağlanabildiği görülmüştür. Bu biyoaktif cam, ağırlıkça %45 SiO_2 , ağırlıkça %24,4 CaO , ağırlıkça %24,5 Na_2O ve ağırlıkça %6 P_2O_5 'ten oluşan ve üzerinde en çok çalışılan biyoaktif camdır. Bunun yanı sıra Rabiee ve arkadaşları, gümüş, magnezyum, stronsiyum, çinko, alüminyum, florür ve zirkonyum gibi elementlerin eklenmesinin biyoaktif camların aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir (Rabiee vd. 2015).



Şekil 2.24 Biyoaktif seramiklerin kemik ile biyolojik etkileşimi (Jones 2013)

45S5 biyoaktif camların kemik ile bağlanma mekanizması literatürdeki çok sayıda çalışmaya konu olmuştur (W. Huang vd. 2006, Wenhai Huang vd. 2006). Biyoaktif camlar sıvı koşullarda üç aşamadan oluşan bir yüzey reaksiyonu geçirir. Söz konusu aşamalar şu şekilde özetlenebilir: katyonların süzülmesi ve yer değiştirmesi, SiO_2 ağ yapısının çözünmesi ve hidroksikarbonatapatit (HCA) tabakasının oluşumu için Ca ve P birikimi (Fu vd. 2011). Bu aşamaların sonuncusu olan HCA tabakasının oluşumu, biyoaktif camların kemiğe bağlanma mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu tabaka, kemiğin inorganik yapısının %70'ini oluşturan hidroksiapatit mineraline benzerliği nedeniyle canlı kemik ile oldukça güçlü bir bağ oluşturur.



Şekil 2.25 Çeşitli yöntemlerle oluşturulan biyoaktif cam iskelelerin mikroyapıları

(a) sol-jel; (b) partiküllerin (mikrokürelerin) termal bağlanması (sinterlenmesi); (c) polimer köpük çoğaltma tekniği ile hazırlanan 'trabeküler' mikroyapı; (d) Robocasting ile hazırlanan ızgara benzeri mikroyapı; (e) süspansiyonların tek yönlü dondurulmasıyla hazırlanan yönlendirilmiş mikroyapı (yönlendirme yönüne dik düzlem); (f) yönlendirilmiş iskelelerin mikro bilgisayarlı tomografi görüntüsü (Fu vd. 2011)

Diğer yandan, mezogözenekli biyoaktif cam (MBG) benzersiz gözenek yapısı ve mükemmel biyoaktivitesi nedeniyle araştırmacıların yakın ilgisini çekmiştir (Wu vd. 2013, Kargozar vd. 2018). Bunun yanında, düzenli mezogözenekli yapısı (2-50 nm) ve geniş spesifik yüzey alanı sayesinde genellikle fonksiyonel iyonların ve biyomoleküllerin salımını kontrol etmek için taşıyıcı işlevi görmektedir (Bari vd. 2017). Ayrıca, araştırmacılar bazı fonksiyonel metal iyonlarının kalsiyum (Ca) veya silisyum (Si) atomlarının değiştirilmesi yoluyla MBG ağına katkılanabileceğini ve böylece diğer özel fonksiyonların elde edilebileceğini bulmuşlardır (Wang vd. 2016, Cacciotti 2017).



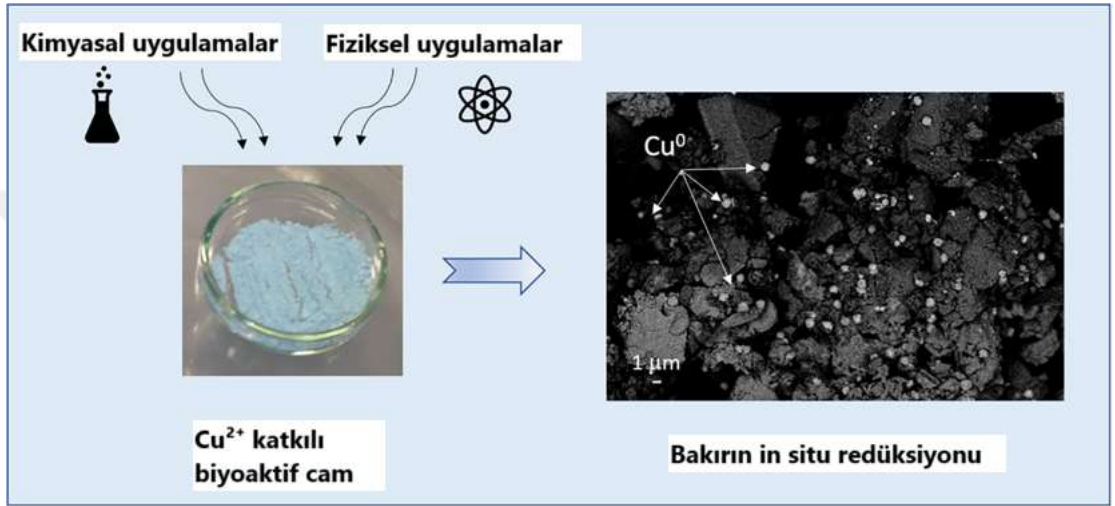
Şekil 2.26 Çeşitli metal katyonların MBG yapısına dâhil edilmesinin ve bakteriyel üremenin engellenmesinin şematik gösterimi (Kargozar vd. 2018)

2.9.1 Bakır katkılı biyoaktif camlar

Bakteriyel enfeksiyon, doku iyileşmesinin önünde önemli bir engel ve implantlardaki başarısızlığın önde gelen bir nedenidir. Bu nedenle, terapötik uygulamalar için antimikrobiyal özelliklere sahip belirli bir dizi metal katyonu (örn. Ag^+ , Ga^{3+} , Cu^{2+}) önerilmiştir. Bakır iyonları, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA bozulması sonucunda bakterileri öldürme kapasitesine sahiptir (Chatterjee vd. 2014). Bakır iyonlarının hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği bilinmektedir (Mehtar vd. 2008). Ek olarak, kemik hücreleri tarafından kolajen oluşumunu uyardıkları, böylece osteogeneze katkıda bulundukları ve osteoporozu önledikleri gösterilmiştir (Liu vd. 2016). Bu faydalı özellikler, bakırı biyoaktif seramik ve camlara dâhil etmek için çok değerli bir katkı maddesi haline getirerek, yeni terapötik yeteneklerin yanı sıra osteokondüksiyon/osteindüksiyon sergileyen çok işlevli biyomalzemelerin geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır.

Bakır miktarındaki artış, oksidatif strese önemli ölçüde bir artışa neden olur ve bu da çeşitli bakır formları arasında redoks döngüsüne yol açar. Cu, Cu (I) ve Cu (II)'nin her

birinin farklı bir toksisite mekanizması ve biyolojik hedefi vardır (Taye 2022). Örneğin, Cu nanopartikülleri bakteriler için CuO nanopartiküllerinden daha tehlikelidir ve bölgesel H_2O_2 üretimi yoluyla membran hasarına yol açar (Fan vd. 2021) ancak bunun yanı sıra, CuO nanopartikülleri bunu yapmaz ve bakteriyel ölümle sonuçlanır (Goh vd. 2014, Miola vd. 2018). Cu^{2+} iyonlarının avantajları, yara iyileşmesini hızlandırmak için umut verici bir strateji olabilecek Cu içeren BG'nin hazırlanmasını içerir (Li vd. 2016).



Şekil 2.27 *In situ* bakır katkılı biyoaktif cam sentezi (Miola vd. 2018)

2.10 Biyoaktif Cam Üretim Yöntemleri

2.10.1 Ergitme yöntemi

Biyoaktif camlar, toz halindeki cam içeren başlangıç malzemesinin birleştirilmesinin ardından 1300 ila 1500°C gibi yüksek sıcaklıklarda eritilmesi ve son olarak istenen şekillerde kalıplanmasıyla oluşur. Camın karıştırılması, eritilmesi, homojenleştirilmesi ve şekillendirilmesinin yabancı maddelerin girmesini engelleyecek şekilde yapılması oldukça önemlidir. Cam üretimi sırasında eriyiğin kirlenmesini önlemek için sadece platin veya platin alaşımlı potalar kullanılmalıdır. Numunelerin oluşturulması döküm veya püskürtme döküm işlemleriyle gerçekleştirilebilir (Hench).

2.10.2 Sol- jel yöntemi

Sol-jel yöntemi öncül maddelerin sol formuna hidrolizi ve sol partiküllerinin jele dönüştürülmesi olmak üzere iki temel aşamadan oluşur. Daha sonra jel yaklaşık 700 °C sıcaklıkta kurutma ve işleme tabi tutularak cam sistemlerin oluşumu sağlanır (Ma vd. 2010, Owens vd. 2016). Sol oluşturma ve jelleşme süreçleri aşağıdaki reaksiyonlara uygun olarak açıklanmış ve gösterilmiştir:

Reaksiyon 1: $\text{Si (OC}_2\text{H}_5)_4 + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Si (OH)}_4 + 4\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, H^+ katalizör ortamında Si (OH)₄ sol partiküllerinin oluşturulması.

Reaksiyon 2: $n\text{Si (OH)}_4 \rightarrow x(\text{SiO}_2) \cdot y(\text{OH}) + z\text{H}_2\text{O}$, birkaç gün sonra jel $x(\text{SiO}_2) \cdot y(\text{OH})$ oluşumu.

Jel sistemi, Si-O-Si-O-Si gibi düzenli bağlanma yapısına sahip inorganik bir polimerdir. Biyoaktif cam sentezlenirken, bağlanma düzenini bozmak için Ca^{2+} veya Na^+ gibi katyonik tuzlardan veya oksitlerden yararlanılır. Böylece sentetik camların amorf yapısal örgüsü oluşturulur. Düzenli bir bağ koparma süreci genellikle kuru bir jel sisteminin yüksek sıcaklıklarda işlenmesiyle meydana gelir (Tán Nhât vd. 2021).



Şekil 2.28 Sol- jel yöntemiyle biyoaktif cam sentezi

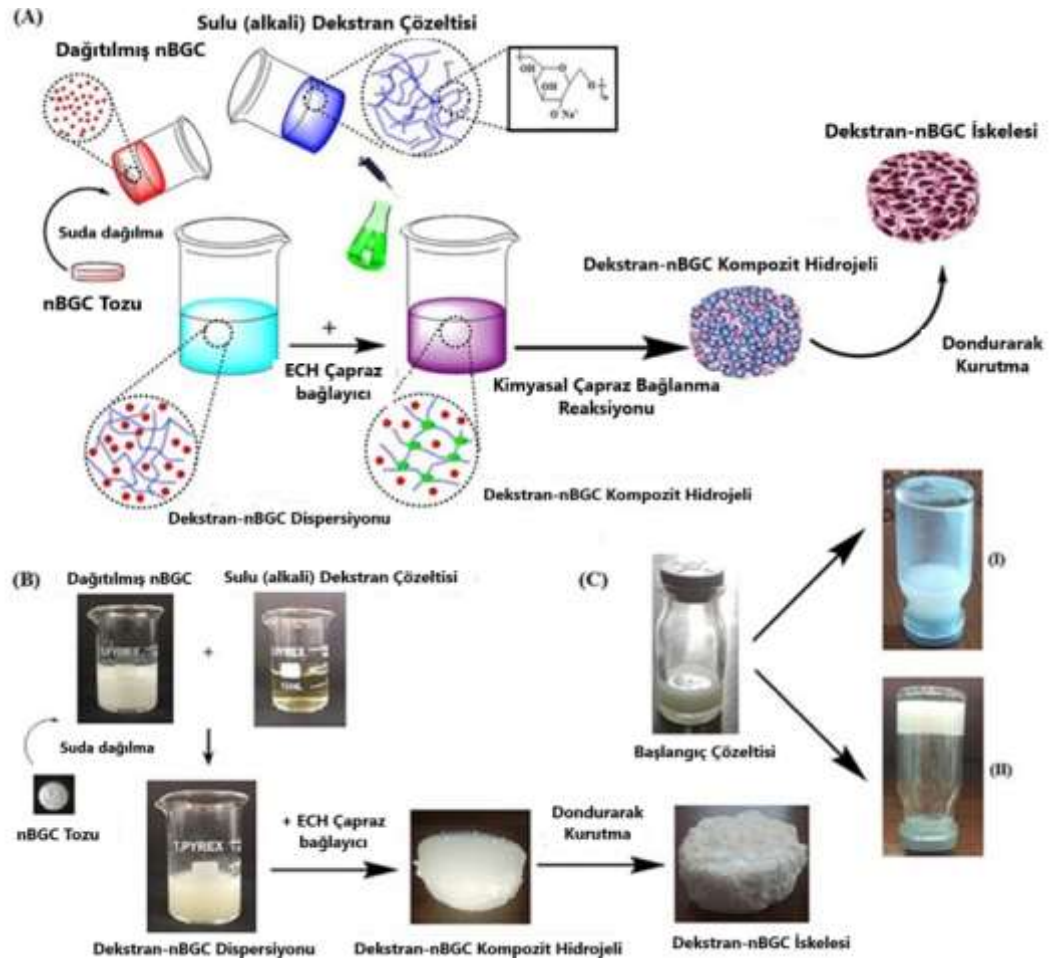
2.11 Biyoaktif Camların Kullanım Alanları

Ortopedi alanında, biyoaktif camlar kemik greftleri ve implantlarda kullanılmakta ve gelişmiş kemik onarımı ve rejenerasyonunu kolaylaştırmaktadır. Kemik dokusu ile bağ kurma kapasiteleri, onları kemik kusurlarının ve yaralanmalarının tedavisi için çok uygun bir seçenek haline getirmektedir. Diş hekimliği alanında, bu malzemeler diş implantları, kaplamalar ve dolgularda kullanılmakta, hasarlı dişlerin onarımı için destek sağlamakta ve ağız sağlığını teşvik etmektedir. Ayrıca, bu geleneksel uygulamaların ötesinde, biyoaktif camlar yumuşak doku onarımı, ilaç dağıtım sistemleri ve yara iyileşmesindeki potansiyelleri açısından giderek daha fazla araştırılmaktadır.

2.11.1 Kemik doku mühendisliği

Biyoaktif camların osteojenik ve anjiyojenik özellikleri, kemik doku mühendisliğini bu malzemelerin gelecekteki en umut verici klinik uygulamalarından biri haline getirmektedir (Brunner vd. 2006, Misra vd. 2010). Biyoaktif silikat camlar, kemik doku mühendisliği uygulamaları için TiO_2 , Al_2O_3 , ZrO_2 veya sinterlenmiş hidroksiapatit gibi diğer bozunmayan (çözünmeyen) biyoseramiklere göre üç önemli avantaja sahiptir. Öncelikle, malzeme yüzeyindeki kimyasal reaksiyonlar, bir hidroksil karbonat apatit (HCA) tabakasının oluşması yoluyla kemikle sağlam bir bağ kurulmasını sağlar (Hench ve Wilson 1993). İkinci olarak, biyoaktif camdan iyon salımı ve çözünme ürünleri, osteoprogenitör hücrelerde gen ifadesini aktive eder ve yukarı doğru düzenler, bu da kemiğin hızlı bir şekilde rejenerasyonuna yol açar. Bu süreç, hidroksiapatit gibi diğer inorganik seramiklere kıyasla daha yüksek kemik oluşum oranını açıklamaktadır (Hench ve Wilson 1993, Xynos vd. 2001, L. L. Hench 2006, Ghosh vd. 2008, Tsigkou vd. 2009, Hoppe vd. 2011). Üçüncü olarak, çalışmalar 45S5 Bioglass®'ın anjiyojenik etkilerini, yani fibroblastlarda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılanmasının ve VEGF gen ekspresyonunun arttığını, endotelial hücrelerin çoğaldığını ve *in vitro* olarak endotelial tübüllerin oluştuğunu ve *in vivo* olarak damarlanmanın arttığını göstermiştir (Leu ve Leach 2008, Gorustovich vd. 2010).

Nikpour ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, kemik doku mühendisliği uygulamaları çapraz bağlı dekstran hidrojelleri ve biyoaktif cam içeren kompozit iskelelerin mekanik özelliklerini ve biyoaktivitesini araştırmışlardır. Bunun çalışmanın sonucunda biyoaktif cam seramik nanopartiküllerinin (nBGC) dekstran matrisine dâhil edilmesi, üç boyutlu bir ağ oluşumu ve daha iyi mekanik özelliklerle sonuçlanmıştır. Yüksek nBGC içeriğine sahip kompozit iskeleler, artan su alımı, azalan basınç oranı ve hücrelerin canlılığını artırarak kemik doku mühendisliği uygulamaları için daha uygun hale gelmiştir (Nikpour vd. 2018).



Şekil 2.29 Kompozit iskelelerin oluşturulmasının şematik gösterimi (A) CDH-nBGC kompozit iskelelerin hazırlanması (B) CDH-nBGC kompozit hidrojellerinin jelleşme öncesi (I) ve sonrası (II) (C) (Nikpour vd. 2018)

Güncel bir çalışmada ise, biyoaktif cam mikro parçacıkları (BAC) içeren deselülerize kemik matriksi (DBM) kompozit yapıları ex ovo embriyonik civciv KAM dokusu

implantasyonu sonrası, civciv femurlarında endokondral osifikasyon üzerindeki etkileri analiz edilerek biyomalzemelerin osteojenik potansiyeli araştırılmıştır. DBM ve DBM/BAC kompozitlerinin anjiyojenik yanıtı, pro-anjiyojenik aktivitelerini değerlendirmek için *ex ovo* embriyonik civciv KAM modeli kullanılarak araştırılmıştır. Civciv koryoallantoik zarı (KAM) üzerindeki vasküler yoğunluk, DBM hidrojel bileşimine artan konsantrasyonlarda BAC eklenmesiyle artmış ve DBM/20 BAC ile kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. DBM/BAC kompozitlerinde BAC yüzeylerinden salım yapan iyonlar ile ilişkili olarak hipoksik koşulların oluşturulması, buna ek olarak hidroksiapatit oluşumuyla morfogenetik proteinlerin salımının uyarılması, civciv femurlarında endokondral osifikasyonun yukarı regülasyonu ile sonuçlanmıştır. Bu bulgular, BAC yüzeylerinden iyonların salımı yoluyla osifikasyonun teşvik edilme potansiyeline işaret etmektedir (Aytekin vd. 2024).

2.11.2 Diş uygulamaları

Doku mühendisliği, dentin, pulpa, periodonsiyum ve alveolar kemik dâhil olmak üzere diş ve çevresindeki dokuların rejenerasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Zafar vd. 2015, Najeeb vd. 2019). Biyoaktif cam, canlı dokuyla etkileşime girerek iyileşmeyi ve yenilenmeyi kolaylaştırdığı için en sık kullanılan malzemelerden biridir. Biyoaktif camda bulunan yüksek SiO₂ içeriği çevre dokularla bağ kurmasını ve kemik ve periodontal rejenerasyonda kritik öneme sahip olan hidroksiapatit oluşumunu desteklemesini sağlar. PerioGlas, kemik defektlerinin tedavisinde en etkili biyoaktif camlardan biridir. Bioglass 45S5 ile benzer formülasyonu, onu periodontal kemik defektlerinin yenilenmesi için ideal greftleme malzemesi haline getirmektedir.

Biyoaktif camların kemiğin greftlenmesinde kullanımına ek olarak, silika bazlı biyoaktif camlar implantların kaplanması için de kullanılmıştır. Çok sayıda implant titanyumdan oluşmaktadır ve belirli çalışmalarda titanyum implantları kaplamak için biyoaktif cam kullanılmıştır (Koller vd. 2007). Titanyum implantlara biyoaktif cam uygulanması, camın antimikrobiyal özelliklerinin bir sonucu olarak çevresindeki alanda oluşacak enfeksiyon ve iltihaplanmayı engeller (Lopez-Piriz vd. 2015). Ayrıca, biyoaktif camlar titanyum

implantların kemiğe yapışmasını artırır ve biyoinert doğalarını güçlendirir, böylece genel tedavi süresini azaltırlar (Mistry vd. 2011, Talreja vd. 2013).

Moonesi Rad ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, bor katkılı BG-NP'lerin insan diş pulpası kök hücrelerinin (hDPSC) odontojenik farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bor katkılı BG-NP'ler, karakteristik fonksiyonel gruplara sahip nano boyutlu, amorf malzemeler olarak sentezlenmiş ve artan bor içeriği ile spesifik yüzey alanında bir azalma göstermiştir. hDPSC'lerin 6,25 mg/ml konsantrasyonda bor katkılı BG NP'lerle muamelesi, ALP aktivite testleri, hücre içi kalsiyum ölçümleri ve spesifik belirteçlerin pozitif ekspresyonu ile kanıtlandığı üzere erken evre odontojenik farklılaşmayı artırmıştır (Moonesi Rad vd. 2018).

Başka bir çalışmada ise, kompozit bir malzemeye bakır katkılı mezogözenekli biyoaktif cam nanoküreler (Cu-MBGN) ekleyerek anti-bakteriyel özelliklere sahip dental reçine kompozitleri geliştirilmiştir. %10 Cu-MBGN içeren dental kompozitler, bakteriyel tutunma ve biyofilm oluşumundaki azalma ile kanıtlandığı üzere, *S. mutans*'a karşı en etkili anti-bakteriyel özellikleri göstermiştir. Buna karşılık, 45S5 biyoaktif cam içeren materyaller daha yüksek derecede *S. mutans* yapışması göstermiştir. %15 45S5 içeren biyoaktif cam kontrol materyali en yüksek kalsiyum salımını sergilemiş ve bu da yüzeydeki daha fazla sayıda açık porozite ile ilişkilendirilmiştir. Bu, materyallerdeki gözeneklilik ve iyon salımı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Munir vd. 2022).

2.11.3 Yara iyileşmesi

Yaralı dokuların iyileşmesini kolaylaştırmak amacıyla çeşitli yara örtüleri geliştirilmiştir. Yara iyileşmesinin dört ana aşaması olan hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenmede sinyal yolları ağı önemli bir rol oynar. Yaralanma bölgesinde bulunan iyonlar, doğrudan veya dolaylı olarak yolları indükleme potansiyeline sahiptir; ancak, mikro çevrenin doygunluğunu ve toksisiteyi önlemek için bunların girişi kademeli olmalıdır (Saghatchi vd. 2023). Bor iyonu salan camların fibroblast hücrelerinin toplanmasını ve çoğalmasını uyardığı, bunun da yara bölgesinde hücre dışı matris (ECM) salgılanmasını başlatabileceği ve her ikisinde anjiyojenik büyüme faktörleri olan VEGF

ve TGF- β 'yı dönüştürebilecek RNA'ların sentezini etkileyebileceği görülmüştür (Liu vd. 2013, Rigracciolo vd. 2015).

Yapılan bir çalışmada çeşitli bor içeren BG sistemleri, diğer terapötik iyonların dâhil edilmesi yoluyla anjiyogenezi, yara iyileşmesini ve osteogenezi geliştirme potansiyelleri açısından araştırılmıştır. Araştırmalar, bor ilavesinin sitotoksikite seviyelerini etkileyebileceğini göstermektedir. Örneğin, belirli cam bileşimine ve çalışmanın koşullarına bağlı olarak, belirli bor konsantrasyonlarının hücre çoğalmasını engellediği, diğerlerinin ise teşvik ettiği gösterilmiştir. Bulgular, borun BG'lere entegrasyonunun gelişmiş biyolojik aktiviteye yol açabileceğini ve onları biyolojik olarak emilebilir iskelelerde ve diğer tıbbi uygulamalarda kullanım için uygun adaylar haline getirebileceğini göstermektedir (Balasubramanian vd. 2018).

Yara iyileşmesi için potansiyel kompozit iskele yamalarının oluşturulduğu çalışmada ise, poli(3-hidroksibütirat-ko-4-hidroksibütirat) [P(3HB-co-4HB)] ile grafen (ağırlıkça %3,0) ve biyoaktif camı (ağırlıkça %2,5) çözücü dökümü yoluyla birleştirilmiştir. Biyoaktif cam ve grafen ilavesi, yüzey pürüzlülüğünün artmasına, düzensiz gözeneklere ve ıslanabilirlik ile hidrofilisitenin artmasına yol açarak su alımını %40'a kadar iyileştirmiştir. L929 fibroblast hücreleri, 14 günlük bir süre boyunca her iki kompozit iskele türüne de mükemmel yapışma göstererek hücre canlılığının arttığını göstermiş ve kompozit iskelelerin yara iyileştirme uygulamaları için potansiyelini vurgulamıştır (Abdul Rahim vd. 2024).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

İpek fibroin ekstraksiyonu için *Bombyx mori* ipekböceği kozaları (Koza Birlik, Bursa, Türkiye), sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.) çözeltisi ve lityum bromür (LiBr) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.) çözeltisi, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri sırasında ipek fibroini çözmek için çözücü olarak kullanıldı.

Kompozit iskelede matris malzemesi olarak kullanılan κ -Karagenan (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) sentezinde metakrilik anhidrit ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.) ve pH'nın ayarlanmasında sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.) kullanılmıştır.

İpek fibroin ve κ -Karagenanın diyaliz işlemi selüloz yapılı diyaliz torbasının (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) 2 litrelik kasetlere koyulmasıyla ve manyetik karıştırıcı (IKA, C-MAC HS7) üzerinde $+4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi.

29S29B Biyoaktif Cam sentezinde kullanılan bakır nitrat (CuNO_3)₂, nitrik asit (HNO_3), amonyak (NH_3), borik asit (B(OH)_3), tetraetil ortosilikat [TEOS, $\text{Si(OC}_2\text{H}_5)_4$], trietil fosfat [TEP, $\text{OP(OC}_2\text{H}_5)_3$], kalsiyum nitrat tetrahidrat [$\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] ve sodyum hidroksit (NaOH) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından temin edildi. Setrimonyum bromür [CTAB, $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.) mezogözenekli yapıları oluşturmak için kullanıldı. Sentezlenen Biyoaktif Cam malzemenin yaşlandırma işlemi Etüv (Nüve, FN 500, Türkiye), sinterleme işlemi kül fırını (Protherm PLF 120/10, Türkiye) ile yapıldı.

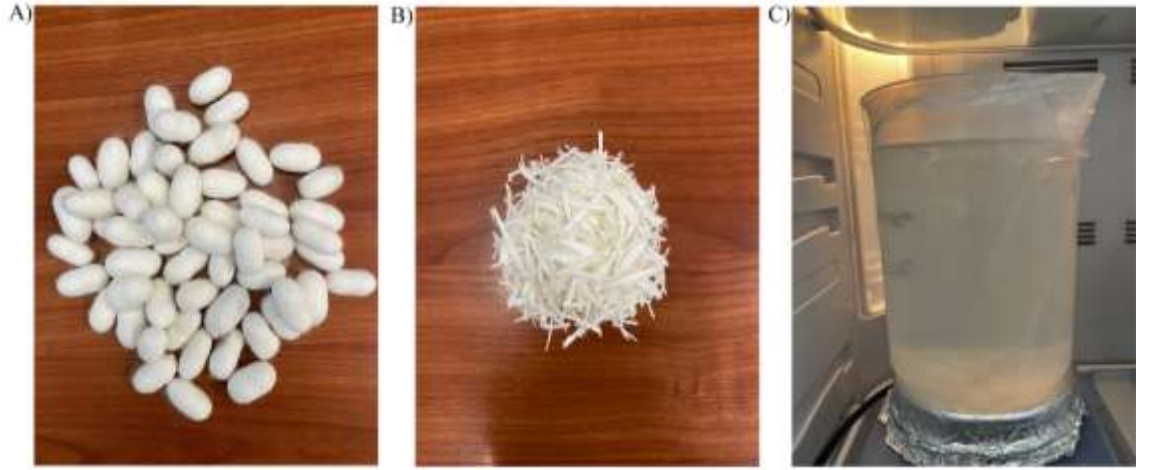
Kompozitlerin foto-çapraz bağlanmasında 365-405 nm dalga boylarında ışın yayan UV lamba (Ocean Sun X7 Plus W Uv Lamba) ve Irgacure® [2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiofenon] (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) fotobaşlatıcı olarak kullanıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1 İpek fibroinin hazırlanması

İlk olarak, ipek kozaları ince parçalar halinde kesildi ve 5 g tartıldı. Daha sonra bir beherde 0,02 M Na_2CO_3 (2,1 g, 1 L) çözeltisi hazırlandı. Çözelti 80-90 °C'ye ulaştığında 5 g ipek eklendi ve 30 dakika boyunca karıştırılmaya bırakıldı. 30 dakika sonunda ipek süzüldü. Son olarak, elde edilen ipek 3 kez 10'ar dakika süreyle saf su ile yıkandı ve kurutma kâğıdı üzerinde 1-2 gün kurumaya bırakıldı.

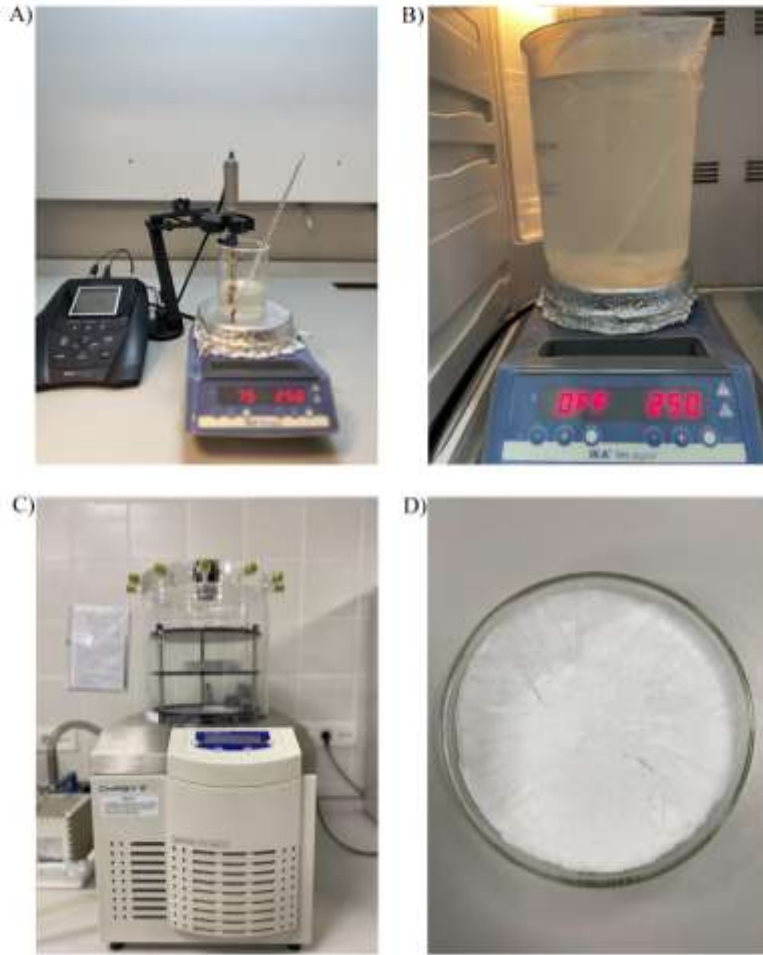
Elde edilen ipek küçük parçalar halinde kesilip 1 g tartıldı ve 9,3 M LiBr (7,09 g, 8 mL) çözeltisi hazırlandı. Tartılan ipek bir beher içerisinde 60 °C'deki bir etüve yerleştirildi ve hazırlanan LiBr çözeltisi damla damla eklendi. Daha sonra ipek ~4 saat boyunca etüvde çözünmeye bırakıldı. Çözünen ipek diyaliz membranına alındı ve suyu günde üç kez değişecek şekilde 2 gün boyunca +4 °C'de 2 L saf su içinde diyaliz edildi.



Şekil 3.1 A) Bombyx morii ipek kozaları, B) kozaların küçük parçalara kesilmesi, C) ipeğin LiBr'de çözüldükten sonra +4 derecede diyalize bırakılması

3.2.2 Metakrilatlı κ -Karagenanın sentezi

Karagenan hidrojeli hazırlarken, 1 gram κ -karagenan tartıldı ve ardından 50 °C sıcaklıkta 100 mililitre damıtılmış suda çözüldü. Ayrıca, 4 mL metakrilik anhidrit dakikada 1 mL olacak şekilde mikropipetle damla damla eklendi. Daha sonra, çözeltiyi bazik hale getirmek amacıyla 6 saatlik bir süre boyunca düzenli aralıklarla 5 M NaOH eklendi. Altı saatlik sürenin sonunda pH 8'e ulaştığında, 2 litrelik bir beher içinde diyaliz edildi. Dört gün boyunca +4 °C'de bırakıldı ve diyaliz suyu günlük olarak değiştirildi. Diyaliz süresinin tamamlanmasının ardından çözelti -80 °C'de donduruldu ve liyofilize edildi.



Şekil 3.2 A) %4 metakrilatlanmış κ -Karagenan sentezi, B) +4 derecede 3 gün diyalize bırakılması, C) elde edilen karagenanın liyofilizasyon işlemi, D) liyofilize edilen %4 metakrillenmiş κ -Karagenan

3.2.3 Sol-jel yöntemi ile 29S29B mezoporöz biyoaktif cam sentezi

100 mL etanol, 28 mL distile su, 1,53 g CTAB, 10 mL TEOS ve 5,53 g borik asit bir beherde karıştırıldı. Daha sonra 2,8 mL nitrik asit çözeltisi damla damla ilâve edildi ve 30 dakika karıştırıldı. 30 dakika sonra karışıma 2,15 mL TEP eklendi ve 20 dakika karıştırıldı. Ardından 14 g kalsiyum nitrat eklendi ve çözüldü. Son olarak 10 mL konsantre amonyak çözeltisi damla damla ilâve edildi ve hazırlanan karışımın viskozitesinin arttığı ve jelleşmenin meydana geldiği gözlemlendi. 60 °C sıcaklığa ayarlı etüvde kurumaya bırakıldı.

3.2.4 Sol-jel yöntemi ile 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam sentezi

50 mL etanol, 105,9 mL distile su, 0,639 g CTAB, 13,8 mL TEOS ve 3,43 g borik asit bir beherde karıştırıldı. Ardından 2,8 mL nitrik asit çözeltisi damla damla ilâve edildi ve 30 dakika karıştırıldı. 30 dakika sonra karışıma 2,15 mL TEP eklendi ve 20 dakika karıştırıldı. 14 g kalsiyum nitrat eklendi ve çözüldü. Daha sonra 0,29 g bakır nitrat eklendi ve karıştırıldı. Son olarak 40 mL amonyak çözeltisi damla damla ilâve edildi ve hazırlanan karışımın viskozitesinin arttığı ve jelleşmenin meydana geldiği gözlemlendi. Ardından 60 °C sıcaklığa ayarlı etüvde kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.3 Sol-jel yöntemiyle 29S29B mezoporöz biyoaktif cam sentezi

Çizelge 3.1 Sentezlenen biyoaktif cam grupları.

Biyoaktif Cam Grupları
29S29B mezoporöz biyoaktif cam (MBG)
29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam (Cu-MBG)

3.2.5 İpek Fibroin / κ -Karagenan kompozitlerinin hazırlanması

Diyalizden elde edilen 10 mL ipek fibroin çözeltisi hafifçe ısıtıldı ve 0,1 g Irgacure® eklendi. Irgacure® çözündükten sonra viskoz bir çözelti elde etmek için 0,2 g metakrillenmiş %4 κ -Car eklendi. Son olarak, hazırlanan kompozit çözelti 24 gözlü plakalara alındı ve 365-405 nm ışın yayan UV lamba ile çapraz bağlandı.

3.2.6 İpek Fibroin/ κ -Karagenan/mezoporöz biyoaktif cam kompozitlerinin hazırlanması

Diyalizden elde edilen 10 mL ipek fibroin çözeltisi 50 °C’de ısıtıldı ve 0,1 g Irgacure® eklendi. Irgacure® çözündükten sonra, üç farklı konsantrasyonda kompozit hazırlamak için farklı beherlere 0,2 g, 0,02 g ve 0,04 g olmak üzere önceden sinterlenmiş 29S29B-MBG bir havanda iyice ezildikten sonra eklendi. Kalan küçük parçaların dispersiyonunu artırmak için ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Daha sonra 0,2 g metakrillenmiş %4 κ -Car ilâve edildi. Son olarak, hazırlanan kompozit çözelti 24 kuyucuklu plakalara alındı ve 365-405 nm ışın yayan UV lamba ile çapraz bağlandı.

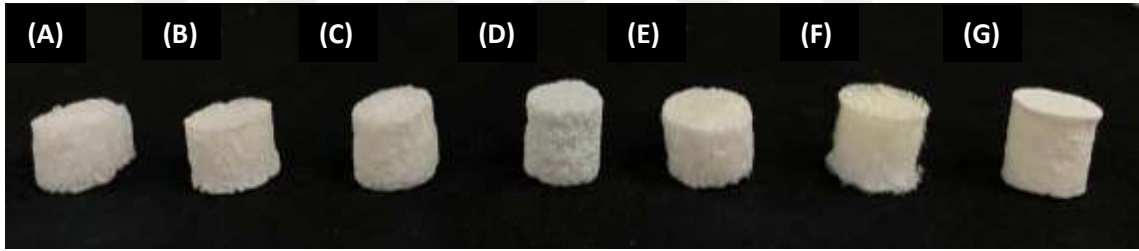
3.2.7 İpek Fibroin/ κ -Karagenan/bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam kompozitlerinin hazırlanması

Diyalizden elde edilen 10 mL ipek fibroin çözeltisi 50 °C’de ısıtıldı ve 0,1 g Irgacure® eklendi. Irgacure® çözündükten sonra, üç farklı konsantrasyonda kompozit hazırlamak için farklı beherlere 0,2 g, 0,02 g ve 0,04 g olmak üzere önceden sinterlenmiş 29S29B-Cu-MBG havan içerisinde ve tokmakla iyice ezildikten sonra karışıma ilâve edildi. Kalan küçük parçaların dispersiyonunu artırmak için ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Daha sonra 0,2 g %4 metakrillenmiş κ -Car ilâve edildi. Son olarak, hazırlanan kompozit

çözelti 24 kuyucuklu plakalara alındı ve 365-405 nm ışın yayan UV lamba ile çapraz bağlandı.

Çizelge 3.2 Sentezlenen kompozit grupları

Kompozit Grupları
İpek Fibroin/ κ - Karagenan (SC)
İpek Fibroin/ κ - Karagenan / %0,2 mezoporöz biyoaktif cam (SC-0,2BG)
İpek Fibroin/ κ - Karagenan / %0,4 mezoporöz biyoaktif cam (SC-0,4BG)
İpek Fibroin/ κ - Karagenan / %2 mezoporöz biyoaktif cam (SC-2BG)
İpek Fibroin/ κ - Karagenan / %0,2 bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam (SC-0,2CuBG)
İpek Fibroin/ κ - Karagenan / %0,4 bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam (SC-0,4 CuBG)
İpek Fibroin/ κ - Karagenan / %2 bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam (SC-2CuBG)



Şekil 3.4 Kompozit malzemelerin 365-405 nm ışın yayan UV lamba ile çapraz bağlandıktan sonra liyofilize edilmiş görüntüleri

(A) SC kompozit iskelesi (B) SC-0,2CuBG kompozit iskelesi (C) SC-0,4Cu-BG kompozit iskelesi (D) SC-2CuBG kompozit iskelesi (E) SC-0,2BG kompozit iskelesi (F) SC-0,4BG kompozit iskelesi (G) SC-2BG kompozit iskelesi

3.2.8 Biyoaktif camların karakterizasyonu

3.2.8.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

FTIR yöntemi biyoaktif camların kalitatif olarak bileşimini, fonksiyonel gruplarını belirlemek için kullanıldı. Örnekler attenuated total reflectance (ATR) tekniği 4000-600

cm-1 dalga sayıları aralığında Shimadzu IRAffinity (Kyoto, Japonya) spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.8.2 X-ışınları kırınımı (XRD) analizi

X-ışını kırınımı, kristal düzlemine gönderilen X-ışınlarının kristalin atom düzlemlerine çarparak yansımaları olayıdır. Sentezlenen biyoaktif camların kristal yapısı X-ışını kırınım desenleri Rigaku Ultima-IV XRD (Tokyo, Japonya) spektrometresi kullanılarak Cu K α ışınması altında, 20-80° 2 θ açıları arasında, 1°/dk tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.3 Termogravimetrik analiz (TGA)

Biyoaktif camların termal analizleri, Shimadzu DTG-60/60 (Kyoto, Japonya) simultane TGA cihazı kullanılarak azot ortamında, 30 °C- 600 °C sıcaklık aralığında, 10 °C/dk ısıtma hızında gerçekleştirildi.

3.2.8.4 İndüktif eşleşmiş plazma (ICP-OES) analizi

Bu yöntemde, plazmadan geçen ışığın optik özelliklerine bağlı olarak dalga boylarına göre numunenin belirlenmesi için indüktif eşleşmiş plazma yöntemi (Perkin Elmer Optima 4300DV, ABD) kullanıldı.

3.2.8.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Enerji dağılım x-ışını spektrometresi (EDS) analizi

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) (ZEISS EVO 40, Oberkochen, Almanya), biyoaktif camların görüntülenmesinde kullanıldı. Analiz için biyoaktif cam tozları, numune tablasına (stub) yapıştırılan iletken karbon bantlar üzerinde sabitlendi. EDS analizi (Bruker, Billerica, MA, A.B.D.) numunede bulunan elementleri tanımlamak ve miktarlarını ölçmek için kullanıldı. Bu analiz, bir numune yüzeyi boyunca elementlerin uzamsal dağılımını haritalayarak elementlerin mikroyapılar veya kompozit malzemeler içinde nasıl dağıldığını anlamaya yardımcı olur.

3.2.9 Kompozit malzemelerin karakterizasyonu

3.2.9.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Shimadzu IRAffinity-1A, Kyoto, Japonya) kompozit yapıdaki fonksiyonel grupların yapılarını aydınlatmak için kullanıldı. Geçirgenlik ölçümleri $4000-400\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığı kullanılarak gerçekleştirildi. Kompozit malzemeler hazırlandıktan sonra liyofilizasyon işlemine tâbi tutuldu. Elde edilen kuru kompozit bileşen toz haline getirildi ve analiz edildi.

3.2.9.2 Termogravimetrik analiz (TGA)

Hazırlanan kompozitlerin termal analizleri, Shimadzu DTG-60/60 (Kyoto, Japonya) simultane TGA cihazı kullanılarak azot ortamında, $30\text{ }^{\circ}\text{C}-600\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında, $10\text{ }^{\circ}\text{C/dk}$ ısıtma hızında gerçekleştirildi.

3.2.9.3 Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)

Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (AAS), bakır katkılı kompozit yapıların içindeki iyonların ve elementlerin konsantrasyonunu ölçmek için kullanıldı. Hazırlanan kompozitler, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de orbital karıştırıcıda 21 gün boyunca 10 mL PBS içinde karıştırıldı. Belirli aralıklarla 1 mL numune alındı ve stok tekrar 1 mL PBS ile tamamlandı. Atomik absorpsiyon için 1000 ppm bakır standardından 100 mL 100 ppm stok çözeltisi hazırlandı. Ardından, stok çözeltiden sırasıyla 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm ve 10 ppm çözeltiler hazırlandı. Son olarak 0,2 mL numune alındı, aynı miktarda %65 nitrik asit içinde çözüldü ve damıtılmış su ile 1 mL'ye seyreltildi. Nihai çözelti, 324,754 nm dalga boyunda Alev Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (FAAS) ile analiz edildi.

3.2.9.4 Borun azometin H türevi ile spektrofotometrik tayini

100 ppm bor standart çözeltisi hazırlandı ve 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm ve 5 ppm standart çözeltiler olarak seyreltilti. Tampon çözelti (pH 7,5) pH-metre kullanılarak seyreltilti ve amonyak çözeltisi ile pH ayarlaması yapıldı. 100 ppm stoktan 1 mL alındı ve seri seyreltme ile 24 gözlü plakalara aktarıldı. Ardından 0,15 mL tampon, 0,2 mL Azometin-H ve 0,4 mL distile su eklendi. Aynı prosedür örnekler için üç tekrar halinde tekrarlandı. Son olarak, 425 nm'deki absorbans UV spektrofotometresinde ölçüldü.

3.2.9.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve Enerji dağılım x-ışını spektrometresi (EDS) analizi

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) (ZEISS EVO 40, Oberkochen, Almanya), malzemenin biyolojik ortamlarla etkileşimini anlamak için kompozit yapıların gözenekliliğini belirlemek için yapıldı. Ardından malzemelerin gözenek boyutu ImageJ programı ile ölçülerek hisrogram grafikleri çizildi. Analiz için kompozit yapılar, numune tablasına (stub) yapıştırılan iletken karbon bantlar üzerinde sabitlendi. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (Bruker, Billerica, MA, ABD), kompozit yapıların temel bileşimlerini ve dağılımlarını belirlemek için kullanıldı.

3.2.9.6 Su tutma ve bozunma testi

Bu analizde, hazırlanan kompozit malzemenin su tutma özellikleri üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlanmaktadır. Su tutma analizi için, 24 kuyucuklu plakalarda liyofilize edilerek hazırlanan kompozitler 4 tekrarlı olacak şekilde analize tabi tutulmuştur. İlk olarak örneklerin başlangıç ağırlıkları tartıldı (W_i), ardından örnekler fosfat tampon çözeltisi (PBS) içine yerleştirildi ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat boyunca ağırlıkları alınarak 37°C'de saklandı (W_s). Daha sonra, yedi gün boyunca günde bir kez tartıldılar. Eşitlik 1.1 ve Eşitlik 1.2'ye göre sırasıyla su tutma ve bozunma oranı yüzdeleri hesaplandı.

$$\% \text{Su tutma} = ((W_s - W_i) / W_i) * 100 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

$$\% \text{Bozunma} = ((W_i - W_s)/W_i) * 100 \text{ (Denklem 3.2)}$$

3.2.9.7 Mekanik testler

Kompozit malzemelerin dayanıklılığını (basma direncini) ölçmek için Shimadzu/Autograph AGS-X (Kyoto, Japonya) marka mekanik test cihazında sıkıştırma testleri yapıldı. Hazırlanan yedi farklı kompozit grubu liyofilize edilerek kurutuldu ve 8 mm çap ve 8 mm yükseklik olacak şekilde kesildi. Farklı dolgu maddesi oranlarına sahip kompozitlerden silindirik, 3D iskeleler hazırlandı. Ardından 10 mm/dk basma hızı ile her bir grubun maksimum kuvvet dayanımları belirlendi.

3.2.9.8 *In vitro* sitotoksosite testi

Kompozit malzemelerin *in vitro* sitotoksosite özellikleri ISO 10993-5:2009 standardına göre indirekt sitotoksosite testi yapılarak incelenmiştir. Ardından %70'lik etanol içerisinde bekletildikten sonra PBS ile yıkama işlemi yapıldı ve UV ışık kaynağı altında 1 saat boyunca tutularak steril edildi. Kompozit malzemeler 24 kuyucuklu petri kaplarına yerleştirildi, 1,5 mL besi yeri (%90 DMEM, %10 FBS %1 L-Glutamin %0,2 Penisilin/Streptomisin) eklenerek inkübatörde (Heracell 240®, Waltham, MA, ABD) (37 °C ve %5 CO₂) 24 saat bekletildi. Daha sonra dermal fibroblast hücre hattı (PCS-201-012, ATCC, A.B.D.) 24 kuyucuklu petri kaplarına ekildikten sonra karbondioksitli inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) 24 saat kültürü yapıldı. Daha sonra kuyucuklardan besiyerleri çekilerek, üzerlerine 24 saat boyunca kompozit malzemelerin içinde bekletildiği besiyerleri eklendi. Hücreler bu besiyerleriyle 24 saat inkübe edildi. Yirmi dört saat sonunda steril PBS ile her bir kuyucukta yıkama yapıldı. Hücre canlılığını kantitatif olarak belirlemek için mitokondriyel dehidrojenaz aktiviteleri ölçüldü. Bu amaçla 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi yapıldı. Hücrelerin 24 saat inkübasyonundan sonra kuyucuklara 270 µL DMEM ve 30 µL MTT reaktifi eklenerek 4 saat inkübatörde kültür sürdürüldü. Daha sonra hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini açığa çıkarmak ve hücre zarlarını parçalamak amacıyla kuyucuklara toplamda 300 µL MTT çözeltisi (izopropanol/HCl çözeltisi) eklendi ve 570 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda okundu. Pozitif kontrol grubu için Triton X-

100 çözeltisi ile inkübe edilen dermal fibroblast hücreleri kullanıldı. Kompozitlerin maruz bırakılmadığı besiyeri eklenen kuyucuktaki hücrelerin verdiği absorbans %100 kabul edilip (negatif kontrol), % hücre canlılığı hesaplandı. Deney 4 tekrarlı yapılarak, sonuçların ortalaması ve standart sapma değerleri grafiğe geçirildi.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{[(\text{Örnek Absorbansı}) - (\text{PK Absorbansı})] / (\text{NK Absorbansı})}{1} \times 100 \quad (\text{Denklem 3.3})$$

3.2.9.9 *In vitro* kan uyumluluğu testi

Kompozit grupların kan uyumluluğu ISO 10993-4 standardına göre incelendi. Hazırlanan kompozitler 1:10 oranında PBS ile seyreltilmiş kan örnekleri içerisine yerleştirildi. Pozitif kontrol olarak saf su ile 1:10 oranında seyreltilmiş kan örneği, negatif kontrol olarak ise örnek içermeyen 1:10 oranında PBS içerisinde seyreltilmiş kan örnekleri kullanıldı. Kan uyumluluğu ölçümleri 545 nm dalga boyunda UV multi plaka okuyucu (Biotrak II, Amersham Biosciences, A.B.D.) cihazında okundu. Yüzde hemoliz değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Deney üç tekrarlı yapılarak sonuçların ortalaması ve standart sapma değerleri grafiğe geçirildi.

$$\% \text{ Hemoliz} = \frac{[(\text{Örnek Absorbansı}) - (\text{NK Absorbansı})] / (\text{PK Absorbansı})}{1} \times 100$$

(Denklem 3.4)

3.2.10 İpek Fibroinin karakterizasyonu

3.2.10.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Shimadzu IRAffinity-1A, Kyoto, Japonya), proteinin kimyasal bağları ve moleküler konformasyonu hakkında ayrıntılı bilgi sağlamak için ipek fibroinin ikincil yapısını analiz etmek amacıyla kullanıldı. İpek

fibroin esas olarak β -tabakalar, rastgele sarmallar ve α -helikslerden oluşur ve FTIR bu yapılarla ilişkili karakteristik absorpsiyon bantlarını göstermektedir.

3.2.11 κ -Karagenanın karakterizasyonu

3.2.11.1 Manyetik rezonans spektroskopisi analizi (^1H NMR)

Sentezlenen %4 oranında metakrilatlanmış kappa karagenanın kimyasal yapısını doğrulamak için ^1H NMR (proton nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi kullanıldı. Karagenan ve metakrilatlı kappa karagenanın ^1H NMR spektrumlarının karşılaştırılması ve analizi için Bruker (Massachusetts, ABD) 600MHZ NMR spektrofotometresi kullanıldı.

3.2.11.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Shimadzu IRAffinity-1A, Kyoto, Japonya), κ -Karagenanın yapısal özelliklerini tanımlamak ve özellikle kimyasal modifikasyonları doğrulamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. κ -Karagenan doğal bir polisakkarit olduğu için, FTIR ile içindeki glikosidik bağlar, sülfat grupları (S=O) ve C–O, O–H gibi karakteristik fonksiyonel gruplar tespit edilir.

3.2.12 İstatistiksel analizler

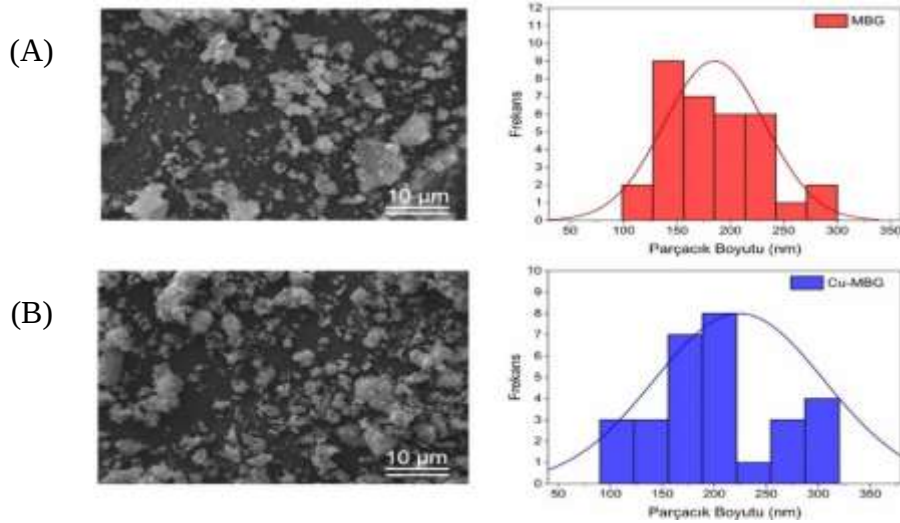
Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Normal dağılım sonuçlarını ve varyans homojenliğini değerlendirmek için ANOVA ve Tukey parametrik testleri kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p = 0,05$ olarak belirlenmiştir. Mekanik özellik testi, bozunma testi, su tutma testi, MTT testi, hemokompatibilite testi ve iyon salınımı deneyleri üç kez tekrarlanmış ve bu deneylerin sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

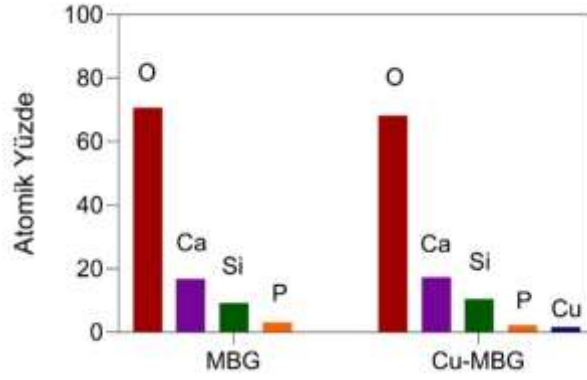
4.1 Biyoaktif Camların Karakterizasyon Bulguları

4.1.1 SEM ve EDS analizleri

Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, 29S29B-MBG ve bakır katkılı 29S29B Cu-MBG nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri SEM görüntülerinde gösterilmiştir ve mezogözenekli biyoaktif camların partikül boyutu 100 ila 325 nm aralığında değiştiği görülmektedir. 500x büyütme görüntülerinde, her iki malzemenin de kümeleşme eğiliminde olduğu ve düzensiz morfolojiye sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.2 enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) kullanılarak analiz edilen malzeme gruplarının element bileşimini göstermektedir. Şekilde, mezogözenekli biyoaktif cam (MBG) ile bakır katkılı MBG'yi (Cu-MBG) karşılaştırılmaktadır. Beklendiği gibi, silikat bazlı bileşimleri göz önüne alındığında, her ikisi de esas olarak oksijen (O) ve silikondan (Si) oluşmaktadır. Kayda değer miktarda kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) da mevcuttur ve bu elementler biyoaktivitede önemli bir rol oynamaktadır. Cu-MBG örneğindeki bakır (Cu) varlığı, antibakteriyel aktivite ve kemik rejenerasyonu gibi biyolojik özellikleri artırabilecek başarılı bir katkılamaya işaret etmektedir.



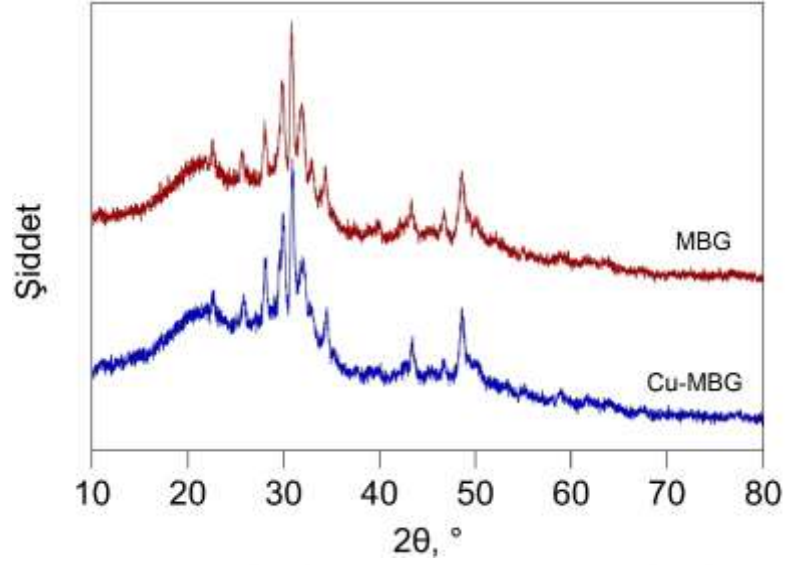
Şekil 4.1 (A) Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 29S29B mezoporöz biyoaktif cam ve (B) 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam partiküllerinin 500x büyütmelerdeki SEM görüntüleri ve histogramları



Şekil 4.2 Biyoaktif camlarda bulunan elementlerin değişimini gösteren EDS sonuçları

4.1.2 XRD analizleri

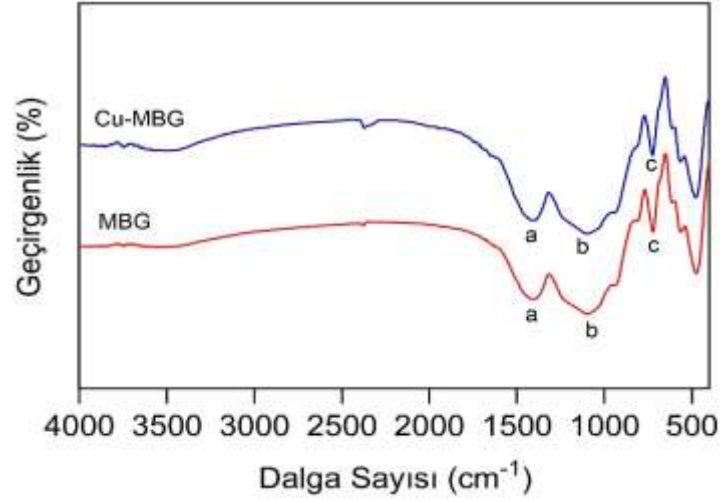
Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 29S29B mezopöröz biyoaktif cama ait XRD verilerinin grafiği Şekil 4.3 'de verilmektedir. Elde edilen 29S29B Biyoaktif cam örneğinin XRD sonuçlarında 700°C'de sinterleme sonrasında bakır katkılı ve katkısız biyoaktif camların amorf yapının yanısıra kristal yapıya da sahip olduğu görülmektedir. 2θ açılarında (22.60°, 25.55°, 28.04°, 29.91°, 30.68°, 31.93°, 34.26°, 39.86°, 43.44°, 46.86°, 48.73°) silika bakımından zengin kristal sodyum kalsiyum silikat fazı (combeite, $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) ve fosfat bakımından zengin kristal silikorhenanit fazı ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) olduğu görülmüştür. Literatür ile de desteklenen sonuçlara göre de 900°C'de sinterlenen biyoaktif cam tozunun esas olarak kombeit (ağırlıkça $\%64 \pm 3$) ve rhenanitten (ağırlıkça $\%5,7 \pm 0,4$) oluşan kristal fazdan oluştuğunu bildirmiştir (Nawaz vd. 2022). XRD sonuçlarına göre MBG ve Cu-MBG arasında bariz bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 4.3 Sol-jel yöntemi ile sentezlenen 29S29B mezoporöz biyoaktif cam ve 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam partiküllerinin XRD spektrumu

4.1.3 FTIR analizleri

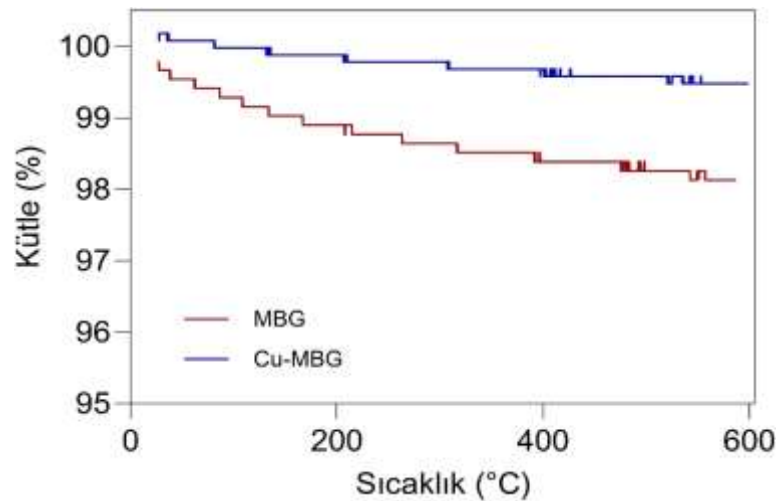
FTIR analizi için, kurutulmuş biyoaktif camlar öğütülmüş ve peletler halinde preslenmeden önce belirli bir oranda potasyum bromür (KBr) ile karıştırılmıştır. Şekil 4.4’de FTIR spektrumu incelendiğinde, (a) 1400 cm^{-1} ve 1450 cm^{-1} ’deki bantlar B-O’nun bükülme moduna karşılık gelmektedir. (b) 1106 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen omzun ise Si-O-Si’nin asimetric gerilme moduna karşılık geldiği görülmektedir. Bağlanmamış oksijen atomlarının Si-O simetrik gerilmesini gösteren bant ise (c) 728 cm^{-1} ’deki absorpsiyon bandına karşılık gelmektedir. Biyoaktif camın bakır içeriğinin yaklaşık %0,4 olduğu göz önüne alındığında, Cu-O pikinin ayırt edilmesi FTIR analiziyle gözlemlenememiştir.



Şekil 4.4 29S29B biyoaktif camların FTIR spektrumu

4.1.4 TGA analizleri

Şekil 4.5’ de görülen termal analiz sonuçları, grafiklerde gösterilen sinterlenmiş mezogözenekli biyoaktif camların ısı nedeniyle kütle kaybı göstermediği ve yüksek termal direnç sergilediği görülmüştür. SiO₂, CaO, P₂O₅, B₂O₃ ve CuO gibi katkılanan maddelerin, termal bozunmanın son aşamasında da varlıklarını sürdürdükleri ve gözlenen kütle kaybının yalnızca yüzeye adsorbe halde bulunan suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.5 29S29B mezoporöz biyoaktif cam (MBG) partikülleri ve 29S29B bakır katkılı mezoporöz biyoaktif cam (Cu-MBG) partiküllerine ait termogravimetrik analiz sonuçları

4.1.5 ICP-OES analizleri

Çizelge 4.1 Sol-jel yöntemiyle sentezlenen 29S29B mezoporöz biyoaktif camların ICP-OES analiz sonuçlarını göstermektedir. Bu sonuçta, yapıya dahil olan elementlerin yüzdeleri görülmektedir.

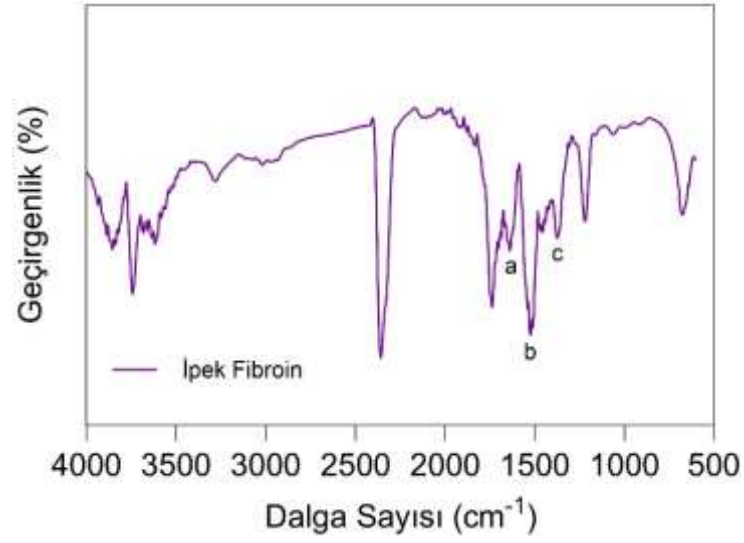
Çizelge 4.1 Kullanılan biyoaktif camların elementel bileşimi

BG Türü	Element Bileşimi				
	Ca (%)	Si (%)	P (%)	B (%)	Cu (%)
29S29B-MBG	28.0 ± 1.0	16.8 ± 0.1	1.87 ± 0.18	7.8 ± 0.1	-
29S29B-Cu-MBG	29.0 ± 1.0	17.0 ± 0.2	1.83 ± 0.15	6.9 ± 0.2	0.4 ± 0.16

4.2 İpek Fibroinin Karakterizasyon Bulguları

4.2.1 FTIR analizleri

Şekil 4.6’da gösterilen ipek fibroinin FTIR analizi, diyalizin ardından elde edilen ipek fibroinin liyofilizasyon işleminin ardından gerçekleştirilmiştir. FTIR sonuçları elde edilen örneklerin (a) 1633 cm⁻¹ (amid I), (b) 1522 cm⁻¹ (amid II) ve (c) 1225 cm⁻¹ (amid III)’de güçlü absorpsiyon bantları sergilediğini göstermektedir. Önceki çalışmalara göre, 1648-1654 cm⁻¹ ve 1535-1542 cm⁻¹’deki kıvılcımsı absorpsiyon ipek I yapısına karşılık gelmektedir. 1610-1630, 1695-1700 ve 1510-1520 cm⁻¹ bölgelerindeki pikler ise ipek II yapısına karşılık gelmektedir. Amid I yapısında 1633 cm⁻¹’deki absorpsiyon pikleri β tabaka oluşumu olduğunu göstermektedir.

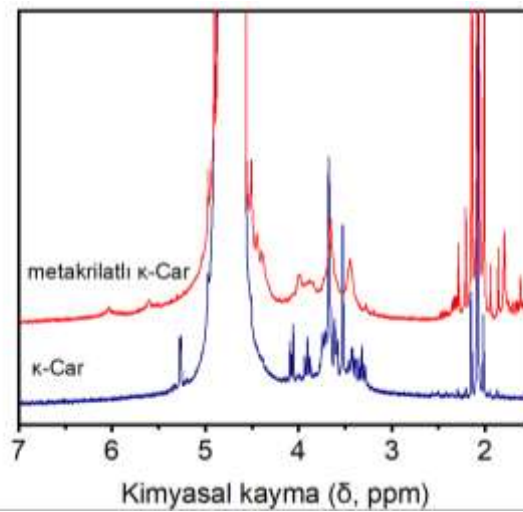


Şekil 4.6 İzole edilen ipek fibroinin FTIR spektrumu

4.3 κ -Karagenanın Karakterizasyon Bulguları

4.3.1 Manyetik rezonans spektroskopisi analizi (^1H NMR)

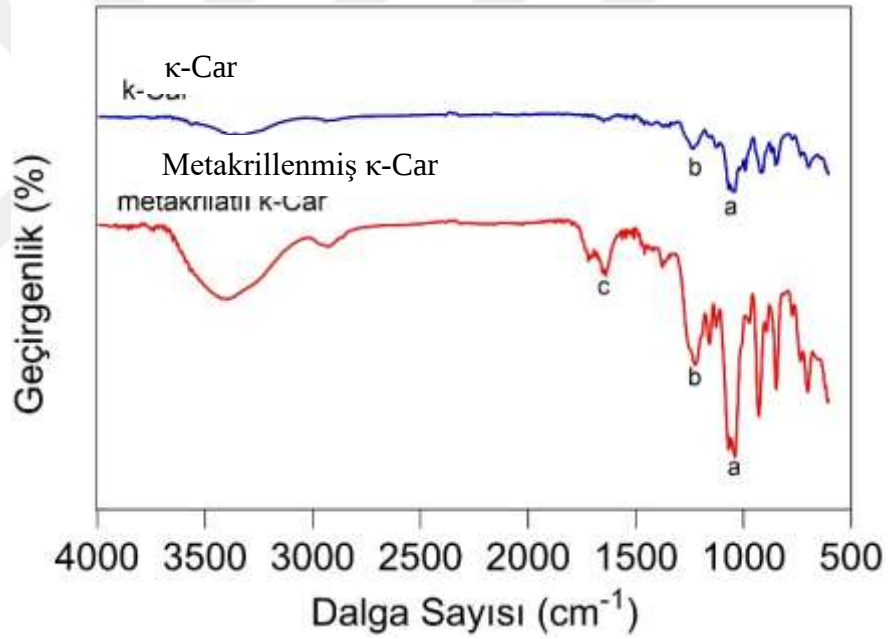
Şekil 4.7’de Metakrillenmiş κ -Car proton nükleer manyetik rezonans (^1H NMR) spektroskopisi, $\delta = 5.5\text{-}6$ ppm değerinde olefinik hidrojene ait ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$) ve $\delta = 1.9\text{-}2$ ppm’de metakrilat grubunun metil protonlarına ($-\text{CH}_3$) karşılık gelen bir pikin varlığı ile κ -Car’ın metakrilasyonunu göstermektedir (Mihaila vd. 2013).



Şekil 4.7 κ -Car ve metakrilatlı κ -Car ‘ın ^1H Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumları

4.3.2 FTIR analizleri

Şekil 4.8’de FTIR spektrumu incelendiğinde, mavi çizgiyle gösterilen saf κ -Car (kappa-karagenan) ve kırmızı çizgiyle gösterilen metakrilatlı κ -Car örnekleri karşılaştırılmıştır. (a) 1000 cm^{-1} civarındaki pik, κ -karagenanın glikosidik yapısından gelen C–O–C ve C–O gerilmelerini göstermektedir. Bu pik hem modifiye hem de saf örnekte görülmesi nedeniyle ana yapının korunmaya devam ettiğini göstermektedir. (b) $1220\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen pikler ise S=O gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Metakrilatlı κ -Car örneğinde yaklaşık (c) 1720 cm^{-1} civarında C=O (karbonil) gerilme titreşimi belirgin bir şekilde görülmüştür. Bunun sonucunda metakrilat grubun başarılı şekilde bağlandığı gözlemlenmiştir.



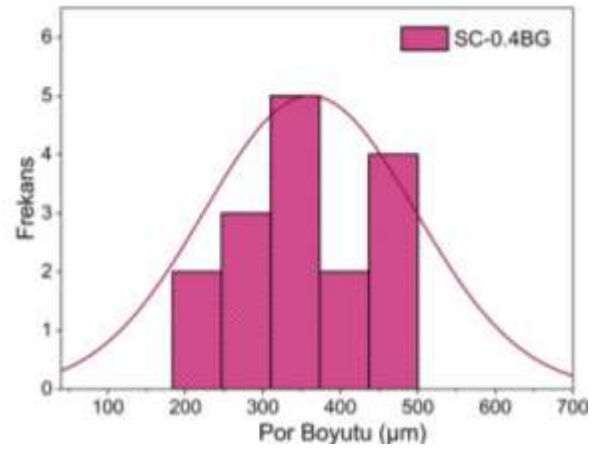
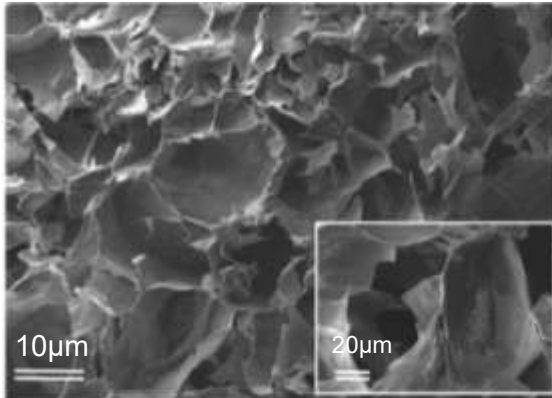
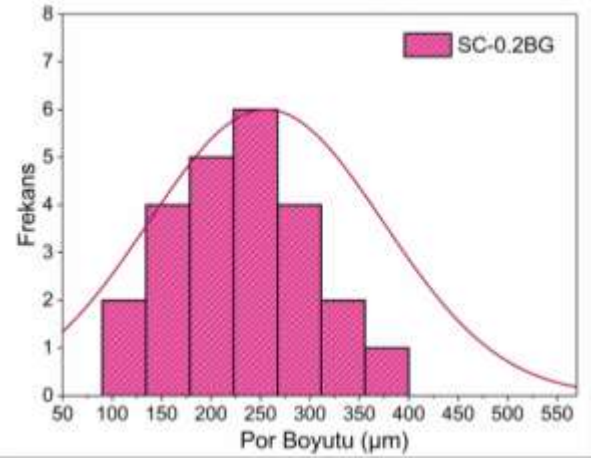
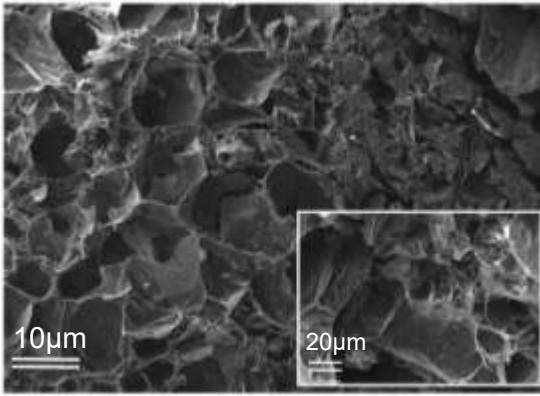
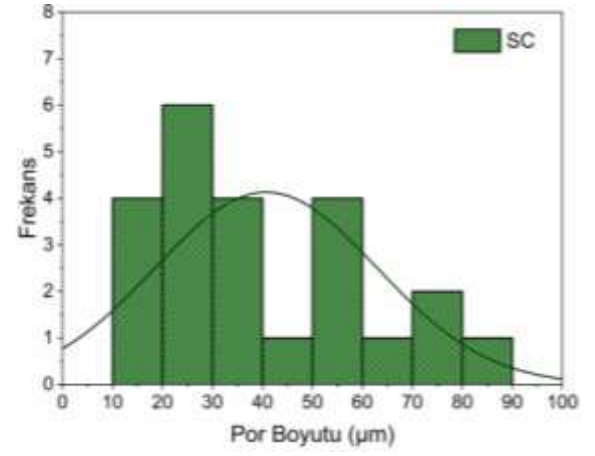
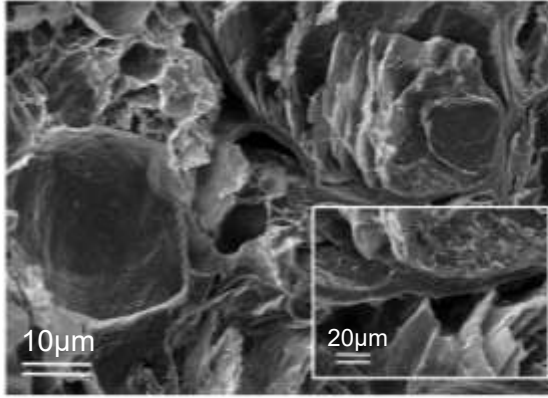
Şekil 4.8 κ -Car ve metakrillenmiş κ -Car ‘ın FTIR spektrumları

4.4 Kompozit Malzemelerin Karakterizasyon Bulguları

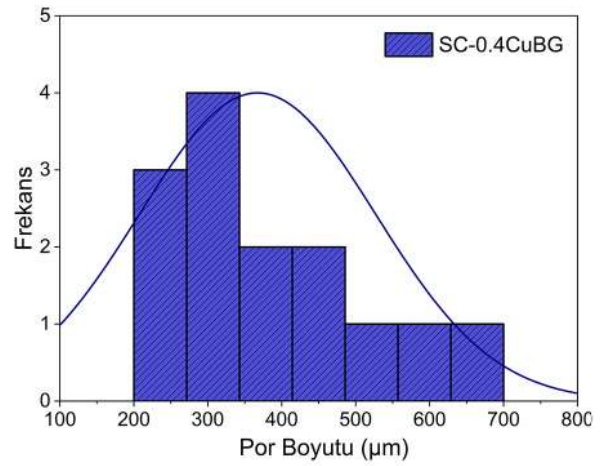
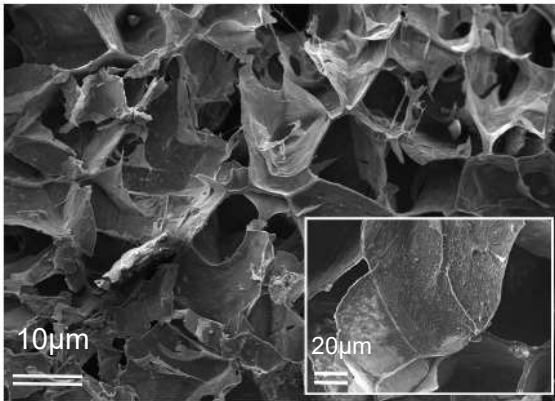
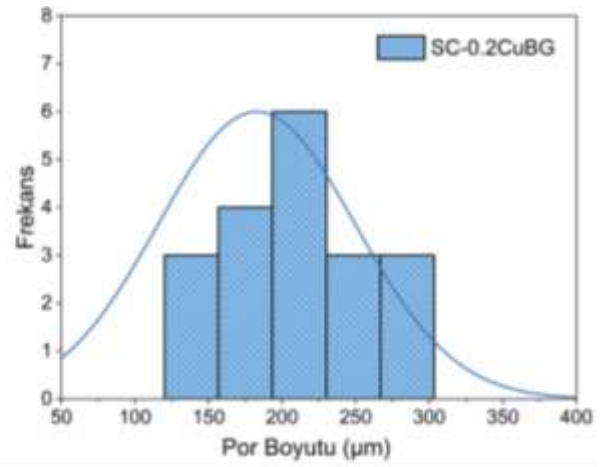
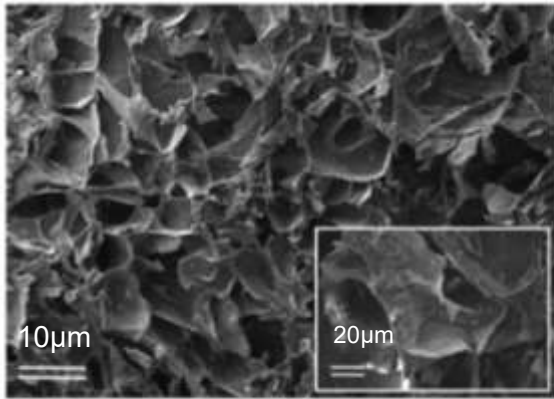
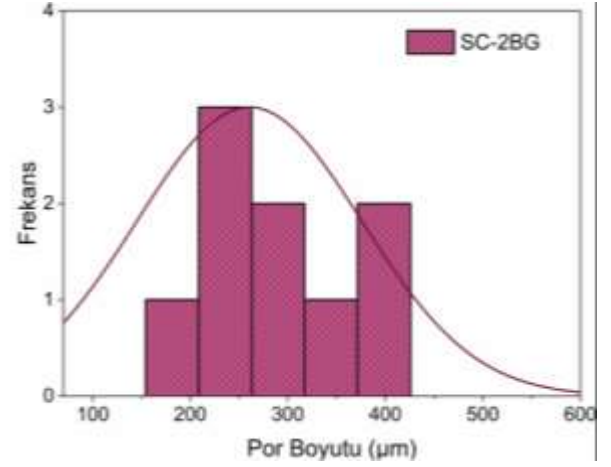
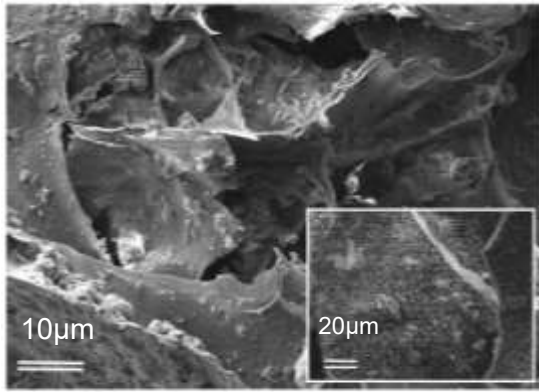
4.4.1 SEM ve EDS analizleri

Şekil 4.9'daki SEM görüntülerinde ve por boyutu analizinde, gözeneklerin büyük çoğunluğunun 100–300 µm aralığında yoğunlaştığı, ancak bazı yapıların 700 µm'ye kadar ulaşan daha büyük porlara da sahip olduğu görülmüştür. Bu dağılım, iskeletin hem makrogözenekli hem de heterojen yapıda olduğunu göstermektedir. Bir çalışmada, bor içeren mezogözenekli biyoaktif cam nanopartiküller mikroemülsiyon destekli sol-jel yaklaşımı kullanılarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Bor içeren MBG'nin partikül boyutu 100 ila 300 nm aralığında olduğu görülmüştür. Sentezlenen kompozit gruplarda 150 ila 400 µm arasında değişen gözenek boyutları gözlemlenmiştir (Zheng vd. 2020). Buna karşılık, 100 µm'den büyük gözenekler olarak tanımlanan makro gözeneklerin mineralize kemiğin rejenerasyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Karageorgiou ve Kaplan 2005, Murphy vd. 2010).

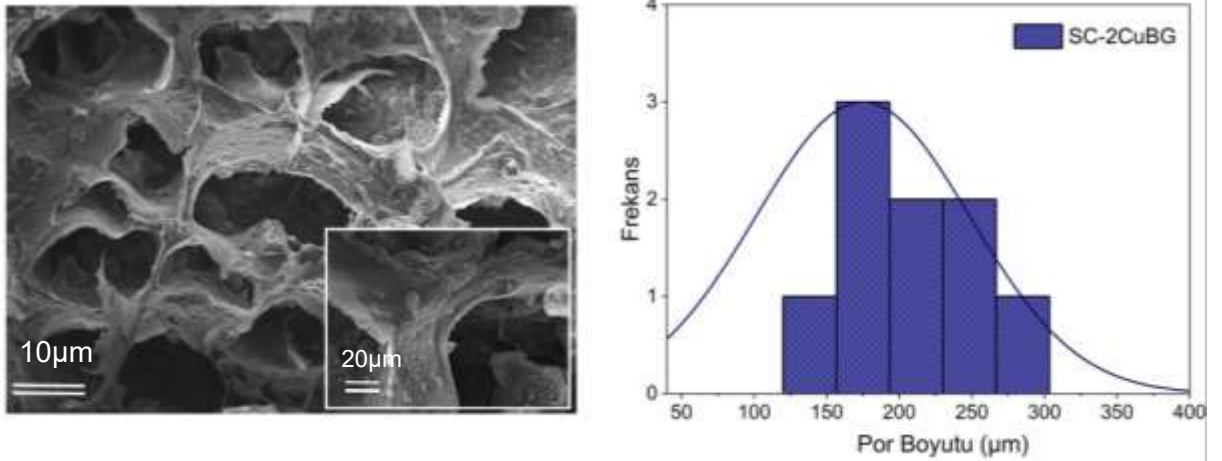
Çizelge 4.2 çeşitli Cu konsantrasyonlarına (%0,2, %0,4 ve %2) sahip SC, MBG ve Cu-MBG içeren kompozit grupların element bileşiminin arttığını göstermektedir. Oksijenin tüm örneklerde en çok bulunan element olduğu, kalsiyum, silikon ve fosforun da önemli seviyelerde bulunduğu görülmektedir. Buna ek olarak, bazı gruplarda karbon (C), sodyum (Na) ve potasyum (K) elementleri bulunmaktadır, bu da kompozitlerde başka bileşenlerin varlığına işaret etmektedir. Daha yüksek katkılı Cu-MBG örneklerinde artan Cu içeriği, bakırın biyoaktif cam yapısına başarılı bir şekilde dahil edildiğini ve bunun da malzemenin özellikleri ve biyolojik etkileşimleri üzerinde bir etkisi olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.9 Sentezlenen kompozit gruplarının 100x ve 500x büyütmelemlerindeki SEM görüntüleri ve histogram grafikleri



Şekil 4.9 Sentezlenen kompozit gruplarının 100x ve 500x büyütmelerindeki SEM görüntüleri ve histogram grafikleri (devam)



Şekil 4.9 Sentezlenen kompozit gruplarının 100x ve 500x büyütmelerindeki SEM görüntüleri ve histogram grafikleri (devam)

Çizelge 4.2 Sentezlenen kompozit malzemelerin elementel bileşimi.

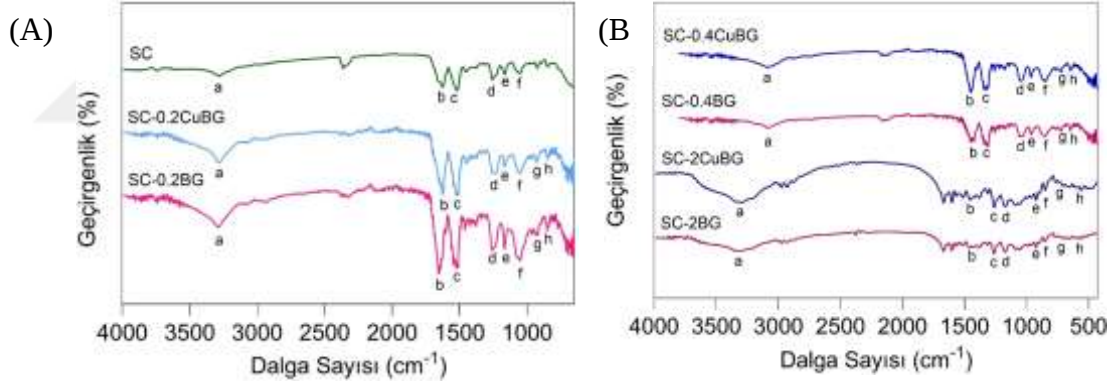
% (w/w)	O	Ca	Si	Cu	C	S	Na	K
SC	64,06	0,12	-	-	31,96	2,05	1,68	-
SC-0.2BG	55,52	0,03	0,17	-	39,72	-	2,78	0,09
SC-0.2CuBG	54,96	0,08	0,09	0,04	38,93	-	3,57	0,12
SC-0.4BG	58,89	0,09	0,2	-	33,89	-	4,15	0,12
SC-0.4CuBG	47,09	0,12	0,32	0,11	28,65	-	13,3	0,08
SC-2BG	18,16	2,65	2,13	-	3,2	-	37,11	0,88
SC-2CuBG	47,79	2,63	1,21	1,05	11,85	-	22,01	0,31

4.4.2 FTIR analizleri

Kompozit iskelelerde Şekil 4.10 (A) SC kompoziti ipeğin karakteristik özelliği olan 1550 ve 1650 cm^{-1} dalga boylarında iki adet pik olduğu görülmektedir. Ayrıca, k-karagenan polimeri de birçok tipik bant göstermiştir. Bunlar arasında 3000-3500 cm^{-1} 'de O-H gerilmesine karşılık gelen bir bant ve 1200-950 cm^{-1} 'de genellikle karbonhidratların parmak izi bölgesi olarak bilinen bir bant yer almaktadır. 1700-1650 cm^{-1} 'deki bant C=O gerilmesine sahiptir. Bunun yanında, 1263 cm^{-1} 'deki pik ester sülfat gruplarının asimetrik gerilmesine (O=S=O), 1046 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik C-O ve C-OH gerilmesine ve 940-900 cm^{-1} 3,6-anhidro-D-galaktozdaki C-O-C gerilmesine karşılık gelmektedir.

1150-950 cm^{-1} 'deki bant (1-3)-D galaktozdaki C-O-SO₃ gerilmesine karşılık gelmektedir. Kompozit gruba biyoaktif cam ilavesi yapıdaki bağları korumuş, bunlara ek olarak biyoaktif camın Si-O/Si-O titreşimleri (~ 900 -1200 cm^{-1}) gibi spesifik piklerini göstermiştir.

Şekil 4.10 B'de görüldüğü üzere, kompozit yapıya biyoaktif cam ve bakır katkısı eklenmesi özellikle SC-2BG ve SC-2CuBG 'nin FTIR spektrumlarında yapısal değişikliklere yol açmaktadır. İpek fibroin, κ -karagenan ve biyoaktif camın varlığı tüm örneklerde O-H ve N-H gerilmesi (~ 3000 -3500 cm^{-1}), amid I'den C=O gerilmesi (~ 1600 -1700 cm^{-1}) ve Si-O/Si-O titreşimleri (~ 900 -1200 cm^{-1}) için pikler göstermektedir. SC-2CuBG ve SC-2BG örneklerindeki Si-O-Si ve Si-O bantlarındaki azalmış yoğunluk ve kaymalar, biyoaktif camların yüksek konsantrasyonlardaki ilavesinin neden olduğu yapısal değişikliklere işaret etmektedir.



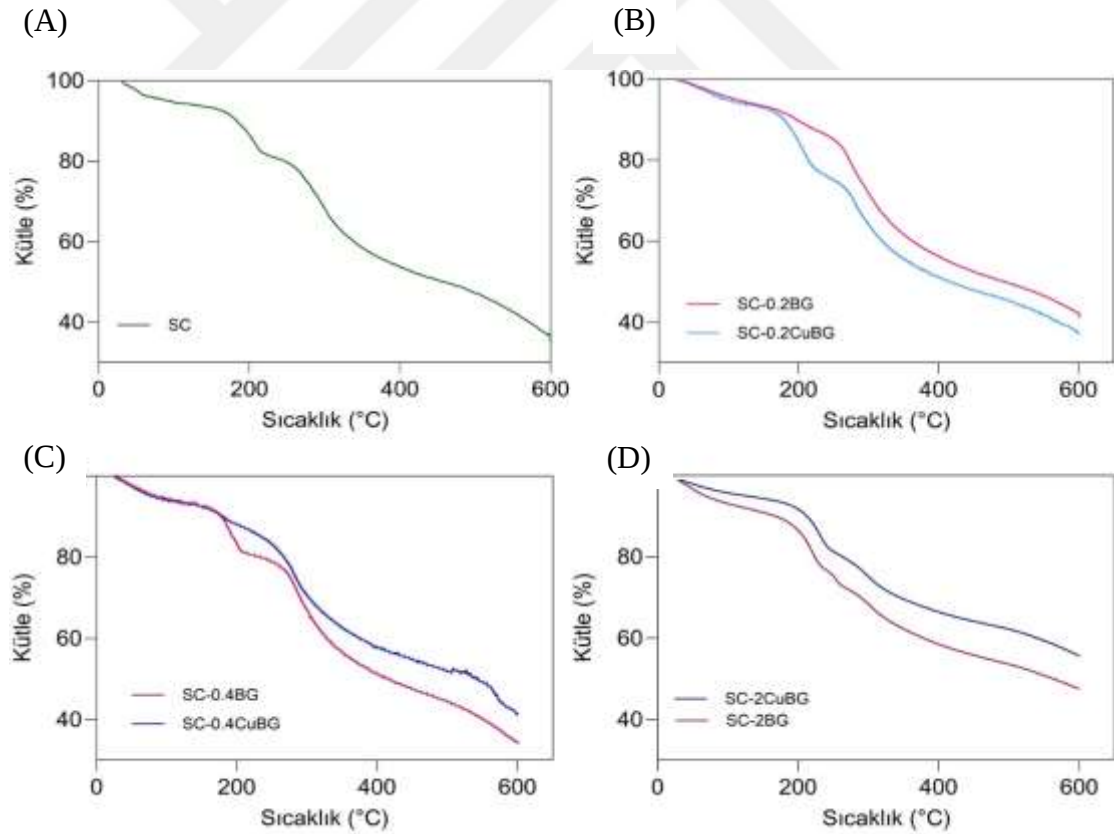
Şekil 4.10 Kompozit iskelelerin FTIR spektrumları

(a: 3000-3500 cm^{-1} O-H ve N-H gerilmesi ; b: 1700-1650 cm^{-1} C=O gerilmesi ; c: 1550-1650 cm^{-1} amid II bandı ; d: 1263 cm^{-1} ester sülfat gruplarının asimetrik gerilmesi (O=S=O) ; e: 1200-950 cm^{-1} karbonhidratların parmak izi bölgesi ; f: 1150-950 cm^{-1} (1-3)-D galaktozdaki C-O-SO₃ gerilmesi ; g: ~ 900 -1200 cm^{-1} Si-O/Si-O titreşimleri ; h: 847 cm^{-1} Si-OH gerilmesi)

4.4.3 TGA analizleri

Şekil 4.11'de SC iskele yapısına farklı konsantrasyonlarda Cu-MBG ve MBG katkılanması kompozit iskelelerin termal stabilitesinde değişiklikler olduğunu göstermektedir. Şekil 4.11 A' da SC kompozit iskelesinde kademeli kütle kaybı görülmüş

ancak %100 bir kütle kaybı gözlemlenmemiştir. Şekil 4.11 B'deki %0,2 katkılama seviyesi, Cu-MBG ve MBG'nin termal davranışlarında çok fazla farklılık olmadığını göstermektedir. Şekil 4.11 C, Cu-MBG'nin yüksek sıcaklıklarda kütlelerini korumada MBG'ye göre avantaj göstermektedir; bu da bakır ilavesinin termal direnci olumlu yönde etkileyebileceğini göstermektedir. Şekil 4.11 D'deki yüksek sıcaklıklarda %2 Cu-MBG katkısının termal stabiliteyi önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Ayrıca, %2 MBG içeren kompozit stabiliteyi arttırmış, ancak yine de Cu-MBG kompozitinden daha az bir termal stabilite göstermiştir. Sonuç olarak, biyoaktif cam katkı oranının yükselmesiyle termal stabilitenin arttığı gözlemlenmiştir. Tüm kompozitlerde gözlemlenen kademeli kütle kaybı, organik maddelerin azot atmosferinde yapıdan uzaklaştırılmasına bağlanabilir. Diğer katkı maddeleri, yani SiO_2 , CaO , P_2O_5 , B_2O_3 ve CuO , termal bozunmanın son aşamasındaki varlıkları nedeniyle yapıda kalmış ve bu nedenle %100 kütle kaybı gözlenmemiştir.

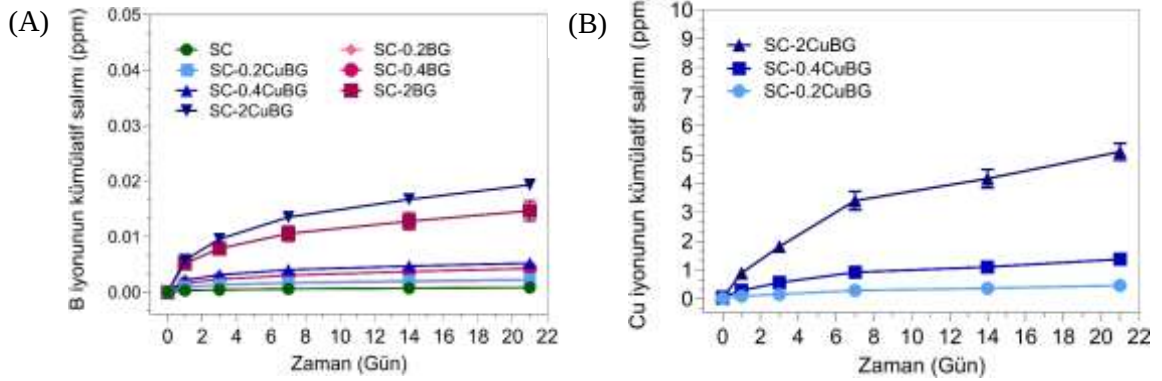


Şekil 4.11 (A) SC kompozit iskelesi (B) SC-0,2CuBG ve SC-0,2BG kompozit iskelelerin, (C) SC-0,4CuBG ve SC-0,4BG kompozit iskelelerin, (D) SC-2CuBG ve SC-2BG kompozit iskelelerin termogravimetrik analiz eğrileri

4.4.4 İyon salım analizleri

Bor iyonlarının kümülatif salım grafiğine bakıldığında Şekil 4.12 (A), farklı konsantrasyonlarda mezoporöz biyoaktif cam (MBG) ve bakır katkılı mezoporöz (Cu-MBG) içeren kompozit iskelelerden 21 günlük bir süre boyunca yüksek oranda Cu-MBG içeren iskeleler en önemli B iyonu salımını sergilemektedir. Buna karşılık, kontrol iskelesi (SC) ihmal edilebilir B iyonu salım sergilemiştir. Cu-MBG örneklerinde B iyonlarının artan salımı, bakır ilavesinin neden olduğu yapısal değişiklikleriyle ilgilidir.

Şekil 4.12 (B)' de iyon salım profilleri, bakır katkılı biyoaktif camın farklı ağırlık yüzdelerinin kompozit iskelelerin kümülatif salımını nasıl etkilediğini göstermektedir. İlk salım aşamasında, bakır iyonları tüm gruplarda yüzeyden hızla salınmaktadır. Daha sonra, iskelenin parçalanması ve matris boyunca iyon difüzyonu ile üretilen uzun süreli bir salım fazı gelmektedir. Başlangıçta daha yüksek miktarda salınabilir iyon olduğundan, daha yüksek bakır konsantrasyonuna sahip iskeleler daha belirgin bir salım sergiler. Diğer yandan, daha az bakır içeren iskelelerin salım profili daha yavaştır ve daha uzun iyon salımı gösterir.

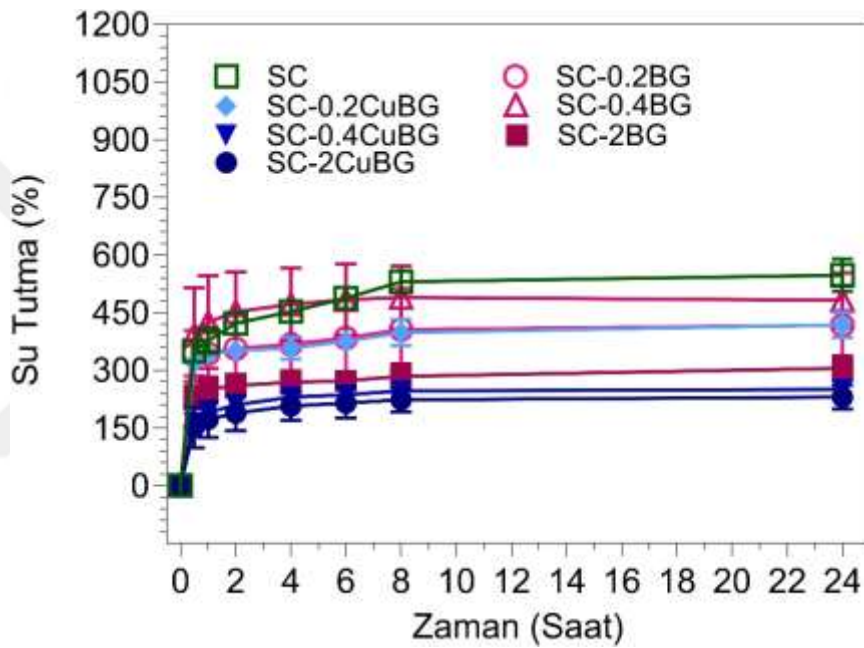


Şekil 4.12 Farklı konsantrasyonlardaki kompozitlerden 21 gün boyunca (A) bor ve (B) bakır iyonlarının kümülatif salımını gösteren grafikler

4.4.5 Su tutma ve bozunma testleri

Sentezlenen malzemelerin zamanla su tutma kapasiteleri (%) karşılaştırıldığında en yüksek su tutma kapasitesinin SC kompozit grubunda gözlemlendiği görülürken, diğer

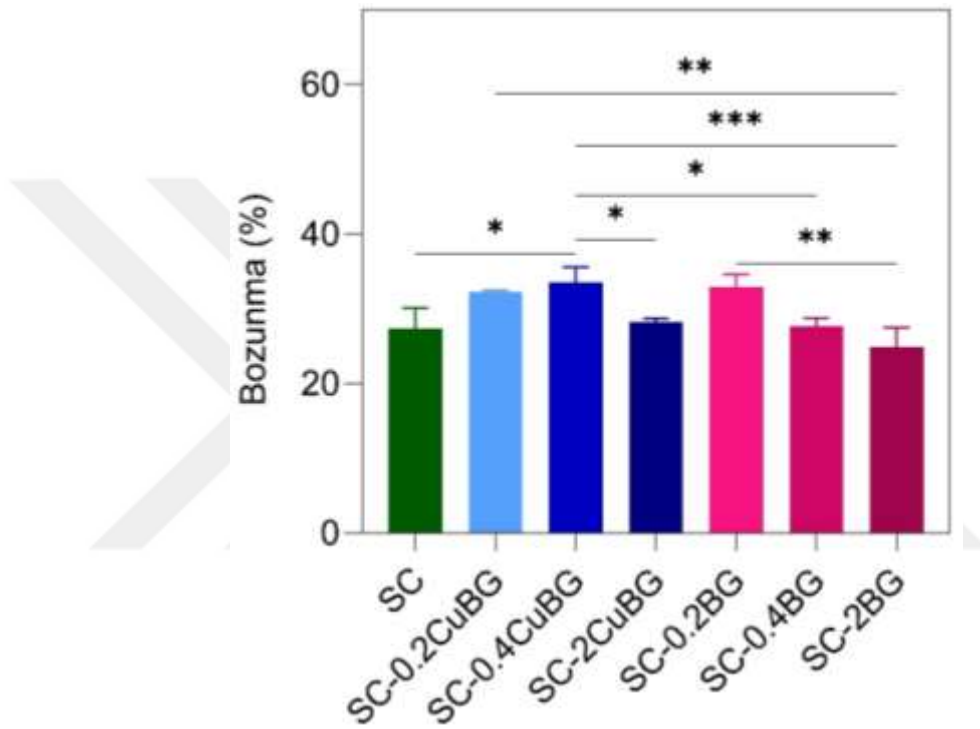
gruplar bu değerin altında kalmaktadır. Cu-MBG içeren gruplarda bakır katkılama oranı arttıkça su tutma kapasitesinin azaldığı görülmektedir; %2 Cu-MBG en düşük kapasiteyi gösterirken, % 0,4 ve %0,2 Cu-MBG orta seviyede su tutma sergilemektedir. MBG içeren kompozit gruplarında ise katkılanma miktarına bağlı olarak su tutma kapasitesi kısmen daha dengeli bir eğilim göstermekte, ancak SC'nin altında kalmaktadır. Bu sonuçlar, SC kompozit iskelesinin diğer gruplardan üstün bir su tutma kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.13 SC ve farklı konsantrasyonlarda Cu-MBG ve MBG içeren kompozitlerin 24 saatlik su tutma yüzdeleri

Kompozitlerin bozunma yüzdeleri karşılaştırıldığında SC grubu orta seviyede bir kararlılık sergilerken, Cu-MBG katkılı grupları (%0,2 ve %0,4) daha yüksek bozunma yüzdelere ulaşmış, bu da düşük bakır konsantrasyonlarının matriste bozunmayı hızlandırabileceğini göstermektedir. Ancak, %2 Cu-MBG katkılı kompozitin bozunma oranı, %0,2 ve %0,4 gruplarına göre daha düşüktür. Bu durum, bakır konsantrasyonunun artışıyla birlikte bozunmaya karşı direncin artabileceğini göstermektedir. Yüksek bakır içeriği, matriste daha güçlü iyonik bağlar oluşturmuş, daha kararlı bir ağ yapısı meydana getirmiş ve bozunmayı azaltmıştır. Diğer yandan, MBG katkılı gruplarda (%0,2, %0,4 ve %2) MBG konsantrasyonu arttıkça bozunma oranının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu

durum, MBG'nin yapısal kararlılığa önemli bir katkı sağladığını ve bozunmaya dirençli bir yapı oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Genel olarak, Cu-MBG ve MBG konsantrasyonlarının hem bozunma mekanizmalarını hem de matrisin genel stabilitesini etkilediği anlaşılmaktadır. Özellikle %2 Cu-MBG'de bakırın stabilite artırıcı etkisinin ortaya çıkması, düşük konsantrasyonlarda bozunmayı hızlandıran bakırın, daha yüksek konsantrasyonlarda yapısal kararlılığı destekleyebileceğini göstermektedir.



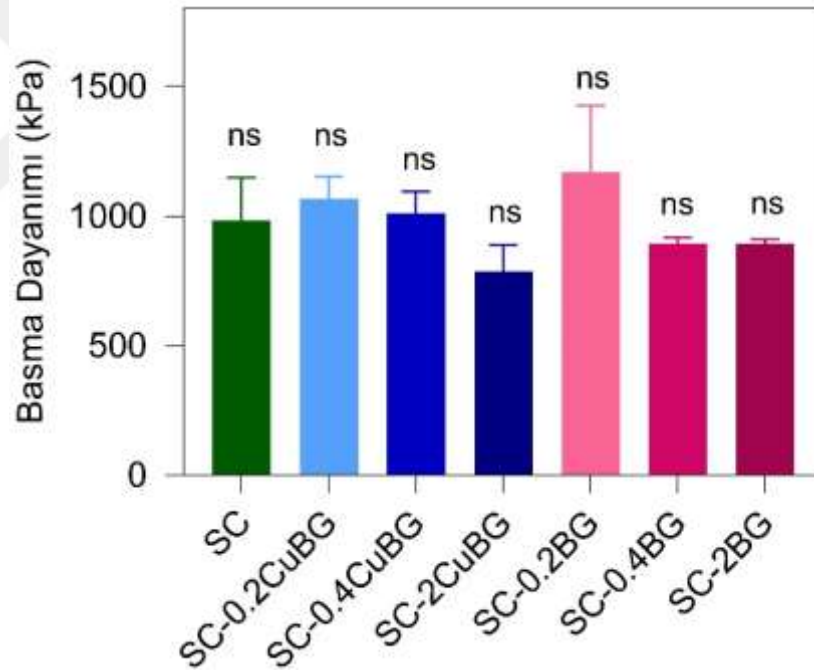
Şekil 4.14 SC ve farklı konsantrasyonlarda Cu-MBG ve MBG içeren kompozitlerin bozunma yüzdeleri

4.4.6 Mekanik testler

Şekil 4.15'deki grafik, farklı kompozit malzeme gruplarının basma dayanımını kıyaslayarak biyoaktif cam içeren kompozitlerin mekanik özelliklerini detaylı bir şekilde incelemektedir. SC kompoziti yaklaşık 1000 kPa'lık bir basma dayanımı sergilemektedir. Bu değer, SC'nin mekanik dayanıklılığının dengeli göstermektedir. Cu ile katkılanmış biyoaktif cam (Cu-MBG) içeren gruplar incelendiğinde, bakır konsantrasyon (%0,2 ve %0,4) artışının basma dayanımı üzerinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığı

görülmektedir. %0,2 Cu-MBG grubu SC ile benzer dayanım sergilerken, %0,4 Cu-MBG grubu biraz daha düşük bir dayanım göstermiştir. Bununla birlikte, %2 Cu-MBG grubunun dayanımı belirgin şekilde düşüktür, bu da yüksek bakır konsantrasyonunun mekanik dayanıklılığı olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Biyoaktif cam (MBG) içeren gruplara bakıldığında, özellikle %0,2 MBG kompoziti yaklaşık 1300 kPa'lık en yüksek basma dayanımına ulaşmıştır. Bu sonuç, düşük konsantrasyonlu MBG'nin mekanik dayanımı önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. %0,4 MBG grubu da SC ile karşılaştırıldığında yüksek bir dayanım sergilemiş, ancak %0,2 MBG'ye göre biraz daha düşük kalmıştır. %2 MBG kompoziti ise SC'den daha düşük bir dayanım göstererek, yüksek MBG konsantrasyonunun mekanik özellikler üzerindeki sınırlandırıcı etkisini ortaya koymuştur.

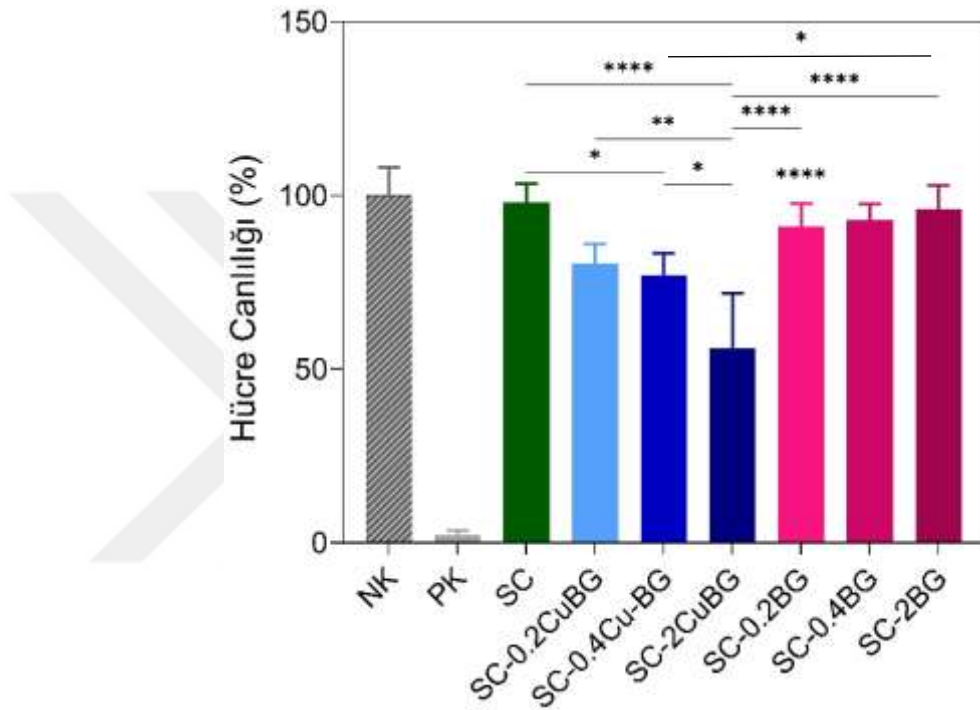


Şekil 4.15 SC ve farklı konsantrasyonlarda biyoaktif cam içeren kompozitlerin basma dayanımı (kPa)

4.4.7 *In vitro* sitotoksosite testi

Kompozit malzemelerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol grubuna kıyasla, malzemelerin farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı

üzerinde etkileri olduğu görülmektedir. MTT testi sonuçlarına göre, SC içeren grup en yüksek hücre canlılık oranına ulaşmış, Cu-MBG katkılı gruplarda, Cu konsantrasyonu arttıkça toksisite artmış ve %2 Cu-MBG grubunda canlılık oranı en düşük seviyeye inmiştir. Bunun yanında, MBG içeren gruplarda hücre canlılık oranları yüksek seviyelerde korunmuş, MBG'nin dermal fibroblast hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermediği görülmüştür.

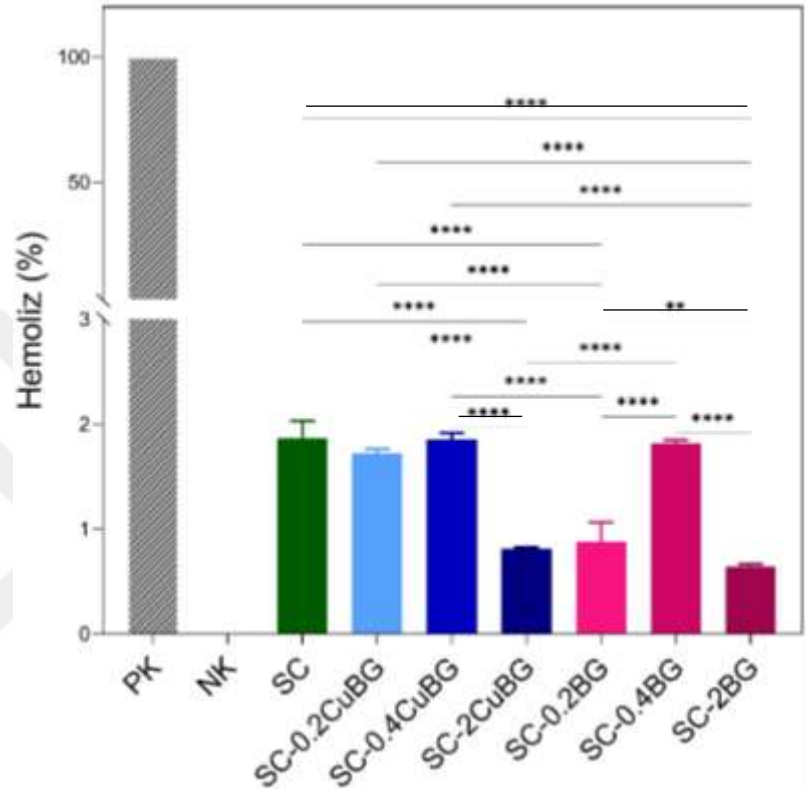


Şekil 4.16 SC ve farklı konsantrasyonlarda biyoaktif cam içeren kompozitlerin dermal fibroblast hücreleri üzerindeki MTT testi ile belirlenen canlılık oranları

4.4.8 *In vitro* kan uyumluluğu testi

Sentezlenen farklı kompozit grupların hemokompatibilite özelliklerini belirlemek amacıyla kan uyumluluğu testi uygulandı. Yüzde hemoliz değerleri formüle uygun hesaplandı ve 545 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler ile belirlendi. Tüm grupların % hemoliz oranlarının ISO 10993-4 standardında belirtilen %5'lik sınırın altında kaldığı görüldü. SC grubu %2.41, Cu-MBG içeren kompozitlerde, % 0.2 oranında katkı kullanılan grupta %1.56 hemoliz değeri ölçülürken, %0.4 ve %2 katkılı gruplarda sırasıyla %2.35 ve %2.18 hemoliz değerleri elde edilmiştir. MBG içeren örneklerde ise

hemoliz oranlarının tüm konsantrasyonlar için oldukça düşük olduğu, % 1.1 ile % 1.2 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Standarta uygun olarak gerçekleştirilen çalışmada, bulgulara bağlı olarak (<%5) toksik kabul edilebilek sınırı aşmadığı için membranların kan hücrelerinde toksik etki yaratmadığı ifade edilebilmektedir.



Şekil 4.17 SC ve farklı konsantrasyonlarda biyoaktif cam içeren kompozitlerin % hemoliz değerleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, SC kompozitlerine çeşitli konsantrasyonlarda Cu-MBG ve MBG katkılarının etkileri incelenmiş ve bu katkı maddelerinin kompozitlerin fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mekanik özellikleri üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Yapılan çalışmada biyoaktif camlar sol-jel yöntemiyle sentezlenmiştir. Furlan ve arkadaşlarının (Furlan vd. 2018) yapmış olduğu çalışmada 45S5 biyocamı ve bor bazlı 45S5B biyocamı sol-jel yöntemiyle sentezlenmiştir. Hosseini ve arkadaşlarının (Hosseini vd. 2023) yapmış olduğu çalışmada ise metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) karşı antibakteriyel özellikler sergileyen bakır içeren mezogözenekli biyoaktif cam nanopartikülleri (Cu-PMMBGN'ler) sentezlenmiştir. Gözenekli/mezogözenekli biyoaktif cam (MBG) iskeleler, apatit oluşumu ve ilaç dağıtım özellikleri nedeniyle yeni bir kemik rejenerasyon malzemesi sınıfı olarak önerilmiştir; ancak malzemenin doğal kırılabilirliği, yüksek bozunma ve yüzey kararsızlığı, biyolojik bir iskele olarak mekanik mukavemetini ve sitouyumluluğu için büyük dezavantajlardır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Wu ve arkadaşlarının (Wu vd. 2010) yaptığı çalışmada MBG ile ipek fibroin karışımının, kemik doku mühendisliği uygulamaları açısından etkileri araştırılmıştır. Bunun sonucunda iskelelerin basınç dayanımı, ipek modifikasyonu ile önemli ölçüde artmış ve ipekle modifiye edilmiş MBG iskeleleri, yüksek gözenekliliği ve büyük gözenek boyutları göstererek daha düzgün ve sürekli bir gözenek ağı sergilemiştir. Bununla birlikte mekanik özellikler, hidrofilitiklik, biyolojik uyum ve degradasyon gibi özelliklerin artırılması için biyoaktif cam/ipek fibroin kompozitleri çeşitli polisakkaritlerle birleştirilmektedir. Wang ve arkadaşlarının (Wang vd. 2021) yapmış olduğu çalışmada çinko katkılı biyoaktif camların, k-Karagenan ve ipek fibroin kompozit filmlerine entegrasyonu, yara iyileştirme özelliklerini artıran sinerjik bir etki ile sonuçlanmış ve yara iyileştirme uygulamaları için potansiyel olarak görülmüştür. Sonuçlar, oluşturulan kompozitin yüksek esneklik ve hidrofilitiklik gösterdiklerini; *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkili antibakteriyel özellikler gösterdiklerini ve fare modelinde vasküler proliferasyonu ve yara rejenerasyonunu desteklediğini göstermiştir.

Sentezlenen kompozit malzemelerin SEM görüntülerindeki gözenek morfolojisi değerlendirildiğinde, gözeneklerin büyük çoğunluğunun 100–300 μm aralığında yoğunlaştığı, ancak bazı yapıların 700 μm 'ye kadar ulaşan daha geniş gözenekler içerdiği belirlenmiştir. Bu dağılım, iskelelerin makrogözenekli ve heterojen porozite yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde, 100–300 μm aralığındaki gözeneklerin hücre göçü, besin ve oksijen difüzyonu gibi biyolojik süreçleri desteklediği; 300 μm üzerindeki porların ise vaskülarizasyon ve derin doku penetrasyonu açısından kritik öneme sahip olduğu bildirilmektedir (Karageorgiou ve Kaplan 2005). Bu bağlamda, elde edilen por yapısı, kemik doku mühendisliğine yönelik biyofonksiyonel bir mikroçevre sunmaktadır.

Diğer yandan, çalışmada kullanılan biyoaktif cam partiküllerinin boyutlarının 100–300 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu boyut aralığı, teknik olarak sub-mikron ölçekte değerlendirilse de yüksek yüzey alanı ve yüzey reaktivitesi nedeniyle nanopartikül sınıfında değerlendirilmektedir. Literatürde, bu tür partiküllerin osteojenik farklılaşmayı destekleyen iyon salımını hızlandırdığı, aynı zamanda ilaç taşıma sistemleri için uygun bir platform sunduğu bildirilmektedir. Örneğin Zhao ve arkadaşları (~300 nm çapında) mezogözenekli biyoaktif cam partiküllerinin kemik rejenerasyonu ve kontrollü ilaç salımı uygulamalarında etkinliğini ortaya koymuştur (Zhao vd. 2020). Benzer şekilde başka bir çalışmada, 100–300 nm aralığında sentezlenen bakır ve stronsiyum katkılı MBG partiküllerinin osteojenik ve antibakteriyel etkileri görülmüştür (Erol-Taygun vd. 2013).

Sentezlenen kompozit malzemelerin FTIR sonuçları literatürle de paralel olacak şekilde SC kompozitlerinde bulunan biyopolimerlerin ve biyoaktif camın etkileşimlerini doğrulamaktadır. İpek fibroin, κ -karagenan ve biyoaktif camın varlığına dair elde edilen spektrumlar, tüm kompozit yapılarda tipik fonksiyonel gruplara ait belirgin absorpsiyon bantlarının bulunduğunu göstermektedir. Özellikle, 1633 cm^{-1} 'deki amid I bandı, 1522 cm^{-1} 'deki amid II bandı ve 1225 cm^{-1} 'deki amid III bandı, ipek fibroinin yapısal varlığını doğrulamaktadır (Lu vd. 2011). Biyoaktif camın FTIR spektrumunda, özellikle silika (SiO_2) bazlı yapısının belirgin özellikleri ortaya çıkmaktadır. 1000-1200 cm^{-1} arasında yer alan Si-O-Si asimetrik gerilme bandı, biyoaktif camın ana yapısal bileşenlerinden biri olan silika ağına ait tipik bir özelliktir (Moreira vd. 2016). Bu bant, cam matrisinin düzenli yapıdaki siloksan bağlarının gerilmesine işaret etmektedir. Ayrıca, 450-500 cm^{-1}

bölgesinde Si-O bağlarının simetrik gerilmesine karşılık gelen zayıf bir pik de gözlemlenmiştir, bu da camın amorf yapısına işaret eder. FTIR spektrumunda 1450 cm^{-1} civarında bir bant, biyoaktif camda bor oksit (B_2O_3) içeriğinin varlığını gösteren boron-oksijen (B-O) bükülme moduna karşılık gelmektedir (Zhong vd. 2014). Cu-MBG katkılı örneklerde, bakır iyonlarının cam matrisine entegrasyonu ile ilgili olarak Cu-O bağlarının $500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ aralığında belirginleşen bir pik gözlemlenmiştir (El-Trass vd. 2012).

XRD analizleri, Cu-MBG katkılı kompozitlerin ve MBG katkılı kompozitlerin amorf ve kristal fazlara sahip olduğunu ortaya koymaktadır. XRD sonuçları, 700°C 'de sinterlenen cam örneklerinde, silika bakımından zengin sodyum kalsiyum silikat fazı (combeite) ve fosfat bakımından zengin silikorhenanit fazı (rhenanit) gibi önemli kristal fazların oluştuğunu doğrulamaktadır (Nawaz vd. 2022).

Termal analizler, SC kompozit iskelesinin termal stabilitesinde bakır ve MBG katkılarının etkilerini göstermektedir. Sonuçlar, Cu-MBG katkısının kompozitlerin termal stabilitesini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Özellikle %2 Cu-MBG katkısı, yüksek sıcaklıklarda kütle kaybını önemli ölçüde azaltarak, kompozitin termal direnç seviyesini artırmaktadır. Bu durum, bakırın kompozitlerdeki termal dayanıklılığı artırma potansiyeline işaret etmektedir. Bunun yanında, %2 MBG içeren kompozitlerin de yüksek sıcaklıklarda daha iyi bir termal stabilite sergilediği gözlemlenmiştir, ancak bakır içeren kompozitlere kıyasla daha düşük seviyelerde kalmıştır. Bu bulgu, bakırın cam matrisindeki termal direnç üzerinde olumlu etkiler sağladığını göstermektedir. %0,2 ve %0,4 Cu-MBG ve MBG katkılı kompozitlerde ise benzer termal davranışlar gözlemlenmiş, bu da düşük katkı seviyelerinin kompozitlerin termal stabilitesini çok fazla etkilemediğini göstermektedir.

Bakır katkılı kompozitlerin 21 günlük iyon salım profilleri, bakır oranına göre farklı salım hızları göstermektedir. %2 Cu-MBG içeren kompozitler, başlangıçta yüksek miktarda bakır iyonu salmış ($\approx 7.87\text{ }\mu\text{M}$) ve 21 gün boyunca salımda çok az bir artış gözlemlenmiştir. %0,4 Cu-MBG içeren kompozitler, daha kontrollü bir salım profili sergileyerek ($\approx 3.14\text{ }\mu\text{M}$), 21 gün boyunca bakır iyonlarının düzenli bir şekilde salındığı ve salımda çok küçük bir artış olduğu gözlemlenmiştir. %0,2 Cu-MBG içeren

kompozitler ise en yavaş iyon salımını göstererek ($\approx 1.57 \mu\text{M}$), 21 gün boyunca bakır iyonlarının çok az bir artışla kontrollü bir şekilde salındığını ortaya koymuştur. Yapılan bir çalışmada (Akhtar vd. 2024) %5 w/v oksitlenmiş aljinat-%7,5 w/v jelatin ve %0,25 w/v ipek fibroin hidrojelleri %0,3 w/v Cu-Ag katkılı mezogözenekli biyoaktif cam nanopartikülleri ile katkılanmıştır. Çalışmanın sonucunda hidrojellerin iyon salım profilleri Cu iyonlarının kümülatif salımının 6 günlük inkübasyona kadar doğrusal bir davranış sergilediğini göstermiştir. Cu iyonlarının bu şekilde salınmasının biyoaktif camların anjiyojenik özellikleri için faydalı olduğu düşünülmektedir. Yüksek bakır içeriği, kısa vadede hızlı biyolojik etki sağlarken, düşük bakır içeriği uzun vadeli tedavi etkilerini destekleyerek daha güvenli ve kontrollü bir salım sağlayabilme potansiyeline sahiptir. Wang ve arkadaşlarının (X. Wang vd. 2019) yaptığı çalışmada PCL/Cu-BaG iskelelerinin iyon salım profilleri incelenmiştir. İskelelerden iyon salımı, 30 günlük bir süre boyunca simüle edilmiş vücut sıvısında (SBF) değerlendirilmiştir. İskeleler, Cu^{2+} ve diğer iyonların önemli ölçüde ve sürekli salımını göstermiştir; Cu^{2+} için $140 \mu\text{M}$ 'ye kadar ulaşan konsantrasyonlar bulunmuştur. İskelelerden salınan Cu^{2+} iyonlarının insan kemik iliği kök hücreleri (hBMSCs) ve insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVECs) üzerinde önemli etkileri olduğu bulunmuştur. Çalışma, Cu^{2+} 'nin anjiyogenezi teşvik edebilirken, aynı zamanda hBMSC'lerin çoğalmasını ve farklılaşmasını etkileyerek doza bağlı sitotoksikite sergilediğini göstermiştir. Yüksek Cu^{2+} konsantrasyonlarının hBMSC proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca çalışmada, Cu^{2+} konsantrasyonu $20 \mu\text{M}$ altında tutulduğunda hBMSC'lerin proliferatif kapasitelerini koruduğunu göstermiştir. Bu sonuç, bu seviyedeki veya altındaki konsantrasyonların hücrel faaliyetler için genellikle güvenli olduğunu ve sitotoksik etkilere neden olmadığını göstermektedir. $50 \mu\text{M}$ 'nin üzerindeki konsantrasyonların hBMSC'lerin çoğalma oranını azalttığı bulunmuştur, bu da Cu^{2+} 'nin sitotoksik etkiler göstermeye başladığı net bir eşige işaret etmektedir.

Kompozit malzemelerin su tutma kapasiteleri karşılaştırıldığında, SC kompozit grubu en yüksek su tutma kapasitesine sahip olup, %400–%600 aralığında stabil bir performans göstermektedir. Bunun sebebinin, k-karagenanın'ın hidrofilik yapısı ve ipek fibroinin matrisi sağladığı dayanıklılık olduğu söylenebilir. Cu-MBG katkılı gruplarda bakır oranı arttıkça su tutma kapasitesinde belirgin bir azalma gözlenmiştir; özellikle %2 Cu-MBG

en düşük kapasiteyi sergilerken, %0,4 ve %0,2 Cu-MBG daha yüksek değerler göstermektedir. Bakırın varlığı, muhtemelen ağ yapısında daha yoğun çapraz bağlanmalara neden olarak hidrofilikliğı azaltmaktadır. Su tutma kapasitesi doku mühendisliği uygulamalarında polimerler için çok önemli bir özelliktir. Sıvıların verimli bir şekilde emilmesini sağlar ve besin maddelerinin, hücrel metabolitlerin taşınmasını ve atık ürünlerin iskeleler içinde uzaklaştırılmasını kolaylaştırır (Hakimi vd. 2023). Hua ve arkadaşlarının (Hua vd. 2020) yaptığı çalışmada bakır iyonlarının ipek fibroin yapısı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bunun sonucunda ipek fibroin iskelelerin su tutma kapasitesi bakır iyonlarının yüklenmesinden önemli ölçüde etkilendiği ve ağırlıkça %1,5'lik optimum konsantrasyonun en iyi stabiliteyi sağladığı görülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlar, ipek zincirleri arasındaki etkileşimlerin bozulması nedeniyle yapısal zayıflıklara ve çözünürlüğün artmasına neden olmaktadır. Bakır klorür dihidrat içeriği ağırlıkça %5,0'ı aştığında, ipek I kristalizasyonu önemli ölçüde engellenerek su stabilitesinde bir azalmaya ve su çözünürlüğünde bir artışa yol açmıştır (Zhou vd. 2006, Tian vd. 2019). Bu durum, bakır iyonlarının fazlalığının SF zincirleri arasındaki etkileşimleri bozarak yapısal bütünlük kaybına yol açabileceğini göstermektedir.

MBG katkılı gruplarda katkılama miktarına bağlı olarak su tutma kapasitesinde daha sınırlı bir değişim gözlenmiş, ancak bu gruplar genel olarak Cu-MBG katkılı gruplara kıyasla daha yüksek performans göstermiştir. Yapılan bir çalışmada (Niknafs vd. 2024) SF, BC/SF ve BC/SF/BGNPs kompozit gruplarının su tutma davranışları incelenmiş ve sırasıyla yaklaşık %780,3, %604,3 ve %498,7'lik şişme oranları sergileyerek yüksek su tutma kapasitelerini göstermiştir. BC/SF ve BC/SF/BGNPs iskelelerinin şişme oranının SF iskelelerine kıyasla önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu azalma, organik (SF ve BC) ve inorganik (BGNPs) fazlar arasındaki güçlü etkileşimlere bağlanmaktadır; bu da daha kalın gözenek duvarlarına ve daha düşük ortalama gözenek boyutlarına sahip kompozit iskelelerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu yapısal değişiklikler sonuçta iskelelerin su emme kabiliyetini etkilemektedir (J. Chen vd. 2017).

Bozunma sonuçlarına göre, Cu-MBG ve MBG katkılarının bozunma davranışları üzerindeki etkilerinin konsantrasyona bağlı olarak değişimi görülmektedir. Cu-MBG katkılı gruplarda bakır konsantrasyonu düşükken (%0,2 ve %0,4), bozunma oranları daha

yüksek bulunmuş, bu durum düşük seviyelerde bakırın bozunmayı hızlandırıcı etkisine göstermiştir. Ancak, %2 Cu-MBG katkısında bozunma oranının düşmesi, yüksek bakır konsantrasyonunun matriste daha güçlü iyonik bağlar oluşturup yapısal kararlılığı artırdığını göstermektedir. Bu bulgu, bakırın belirli bir eşiğin üzerinde bozunmayı hızlandırıcı değil, kararlılık artırıcı bir rol oynayabileceğini göstermektedir. MBG katkılı gruplarda ise konsantrasyon arttıkça bozunma oranının azaldığı görülmüştür. MBG'nin, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, matristeki su veya bozunma ortamıyla etkileşimini azaltarak kararlılığı desteklediği düşünülebilir. Niknafs ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Niknafs vd. 2024) SF iskelelerinin üç hafta boyunca yavaşça bozunduğu ve ağırlıklarının %19'unu kaybettiği görülmüştür. Buna karşılık, BC/SF ve BC/SF/BGNPs iskeleleri, üçüncü haftanın sonunda sırasıyla yaklaşık %15 ve %14'lük bozunma oranlarıyla daha fazla stabilite göstermiştir. Bu farklılıklar, matristeki iyonik ve kimyasal etkileşimlerin yanı sıra mikro-yapısal düzenlemelerin bozunma mekanizması üzerindeki önemli etkisini ortaya koymaktadır. Bir diğer çalışma da yine biyoaktif cam partiküllerinin yapıya katılmasının bozunma hızını yavaşlattığını desteklemektedir. Akhtar ve arkadaşlarının (Akhtar vd. 2024) sentezlediği ADA-GEL/SF/Cu-Ag MBGN kompozit hidrojenlerin bozunma davranışı incelenmiş ve Cu-Ag katkılı mezoporöz biyoaktif cam nanoparçacıklarının (MBGN) bozunma sürecini önemli ölçüde yavaşlattığı görülmüştür. Saf ADA-GEL hidrojenli en hızlı bozunmayı göstererek 3. günde %50, 7. günde ise tamamen bozunurken, ipek fibroin (SF) ilavesi bozunma hızını düşürmüş ve hidrofobik β -tabaka etkileşimleri nedeniyle hidrojenli daha dayanıklı hale getirmiştir. Cu-Ag MBGN eklenen hidrojenlerin bozunma oranı en düşük seviyede olup, 15. günde bile %30'dan fazlası korunmuştur, bu da bu katkının su alımını azalttığını ve çapraz bağ oluşumunu artırarak yapıyı stabilize ettiğini göstermektedir. Yavaş ve kontrollü bozunma, yara iyileşmesi için önemli olup, özellikle kronik yaralar ve uzun süreli tedavi gerektiren uygulamalar için avantaj sağlamaktadır.

Mekanik test sonuçları karşılaştırıldığında, biyoaktif cam (MBG) ve bakır katkılı biyoaktif cam (Cu-MBG) içeren kompozitlerin mekanik dayanımı, malzeme içeriği ve konsantrasyona bağlı olarak büyük ölçüde değişim göstermektedir. %0,2 MBG grubu, üstün mekanik performans sergileyerek en başarılı kompozit olarak öne çıkmıştır. Bidgoli ve arkadaşlarının (Bidgoli vd. 2019) yaptığı çalışmada üç boyutlu baskı ve dondurarak

kurutma yöntemini birleştirerek nano ve mikro ölçekli biyoaktif cam ile yüksek gözenekli ipek fibroin bazlı kompozit iskele üretilmiştir. Kompozit iskelenin mekanik sonuçlarına bakıldığında SF iskelesine kıyasla BG nanopartiküllerinin eklenmesiyle iskelenin basınç dayanımının arttığını (yaklaşık %28 kat daha yüksek) göstermektedir ($P = 0.05$). Bununla birlikte, SF-nBG'nin basınç modülü SF'den daha düşük ve aralarında önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu, partiküllerin polimer matrisi boyunca dağılımı ile açıklanabilir (Tamjid vd. 2013, Rajzer 2014). Nanopartiküller aglomerasyon eğilimine bağlı olarak seyrek dağılmışlardır. Ayrıca, önceki çalışmalarda bildirildiği üzere, mikropartiküller polimer kütlesinin içine gömülürken nanopartiküllerin iskele yüzeyinde birikme olasılığı daha yüksektir, bu da μ BG eklenmesi durumunda mukavemeti arttırmaktadır. Sonuç olarak, BG partikül boyutundaki artışla birlikte sırasıyla basınç stresi ve modülü artmıştır (Tamjid vd. 2013, Hajiali vd. 2018). Bununla birlikte, yüksek Cu ve MBG konsantrasyonlarının mekanik dayanımı olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, özellikle düşük Cu ve MBG konsantrasyonlarının mekanik dayanım üzerinde pozitif bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 5.1 Hazırlanan kompozit gruplarının mekanik dayanım testi verileri

Örnekler	Maksimum Gerinim (%)	Maksimum Uzama (N/mm ²)
SC	44,6207±8,5	983,3446±164,1584
SC-0,2BG	14,6649±4,6	1168,348±257,4806
SC-0,4BG	13,69233±1,91	1009,558±85,02158
SC-2BG	109,183±18,7	892,0071±17,46808
SC-0,2CuBG	16,05633±0,2	1067,846±85,49327
SC-0,4CuBG	18,05033±0,7	1009,558±85,02158
SC-2CuBG	50,43833±7,99	786,9873±100,0999

Kompozit malzemelerin hücresel canlılık üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiş olup SC kompoziti yüksek biyouyumluluk göstererek $98,02 \pm 4,6$ canlılık oranıyla matrisin hücreler üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını göstermiştir.

MBG içeren kompozit gruplarında canlılık oranlarının %90 ila %96 arasında değiştiği görülmektedir. Düşük ve orta oranlarda MBG içeren (%0,2 ve %0,4 MBG) kompozitlerin hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etki göstermediği, hatta %2 MBG içeren grubun daha yüksek bir canlılık oranına ($96,00 \pm 5,9$) sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, MBG'nin hücre proliferasyonunu destekleyici bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, Cu-MBG gruplarında artan bakır konsantrasyonu ile birlikte canlılık oranlarında belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. %0,2 Cu-MBG içeren kompozitte canlılık oranı $79,97 \pm 4,8$ iken, %0,4 Cu-MBG'de bu oran $76,52 \pm 5,4$ 'e ve %2 Cu-MBG'de $55,02 \pm 13,7$ 'ye düşmüştür. Özellikle %2 Cu-MBG grubunda gözlenen düşük hücre canlılığı, yüksek Cu konsantrasyonlarının hücreler üzerinde toksik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra düşük Cu konsantrasyonlarının biyomalzemeler içinde kontrollü salım sağlanarak kullanılabileceği görülmüştür. Özellikle %0,2 Cu-MBG grubunun canlılık açısından olumlu bir sonuç verdiği ortaya koyulmuştur. Hosseini ve arkadaşları (Hosseini vd. 2023) mezoporöz biyoaktif cam nanopartiküllerinin dirençli bakterilere karşı etkisini araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda, 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda %5 mol bakır iyonları içeren nanopartiküller, bakteriyel canlılığın %99,9 oranında azalmasıyla antibakteriyel etki göstermiştir. Nanopartiküller 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda preosteoblast hücrelerine karşı önemli bir sitotoksiste göstermemiştir (~ 85 -89 hücre canlılığı). Buna karşılık, daha yüksek konsantrasyonlarda (1000 $\mu\text{g/mL}$), sitotoksiste önemli ölçüde artmış ve hücre canlılığının %50-62'ye düşmesine neden olmuştur. Cu'nun antibakteriyel özellikleri bilinmesine rağmen, yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını negatif yönde etkileyebileceği bu çalışmada da doğrulanmıştır.

Çizelge 5.2 Kompozit malzemelerin MTT testine göre canlılık yüzdeleri.

Gruplar	Canlılık (%)
Negatif Kontrol	100 ± 7,0
Pozitif Kontrol (Triton X-100)	0,00 ± 1,093987
SC	98,01663468 ± 4,6
SC-0,2BG	90,85093 ± 5,7
ScC-0,4BG	92,83429 ± 4,02
SC-2BG	96,00128 ± 5,9
SC-0,2CuBG	79,97441 ± 4,8
SC-0,4CuBG	76,51951 ± 5,4
SC-2CuBG	55,02239 ± 13,7

Elde edilen kan uyumluluğu verileri, geliştirilen biyomalzemelerin kan hücreleri ile etkileşimlerinde ciddi bir zararlı etki oluşturmadığını ve hemokompatibilite açısından güvenli aralıkta olduklarını ortaya koymuştur. Özellikle MBG içeren grupların tüm konsantrasyonlarda oldukça düşük hemoliz oranlarına sahip olması, bu katkının biyoyumlu yapısını desteklemektedir. MBG'nin cam yapısındaki iyon salımının kontrollü olması ve yüzey özelliklerinin eritrosit zarına zarar vermeyecek düzeyde olması, bu olumlu sonucu açıklayabilir. Cu-MBG katkılı kompozitlerde ise konsantrasyon arttıkça hemoliz oranında hafif bir artış gözlenmiştir. Bu durum, yüksek konsantrasyondaki Cu iyonlarının membran bütünlüğünü etkileyerek hücre zarında bozulmaya yol açabileceğini düşündürmektedir. Ancak söz konusu artış %5 sınırını aşmadığı için, bu kompozitler de hemokompatibilite açısından uygun kabul edilmektedir. Sonuç olarak, MBG katkılı kompozitler kanla temas eden uygulamalar açısından daha avantajlı bir profil sunarken, Cu-MBG katkısının dikkatli optimizasyonla hem biyolojik etkinlik hem de biyoyum açısından dengeli sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak ipek fibroin, κ -karagenan ve mezoporöz biyoaktif camın farklı konsantrasyonlarla hazırlanan biyonanokompozit yapıların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Sol-jel yöntemiyle sentezlenen bakır katkılı ve katkısız biyoaktif camlar, kompozit iskelelere çeşitli oranlarda katkılanarak, yapıların karakterizasyonu çok yönlü analizlerle gerçekleştirilmiştir.

Yapılan termal analizler, özellikle Cu-MBG içeren grupların yüksek termal stabilite gösterdiğini ortaya koyarken; FTIR ve NMR analizleri, yapıların kimyasal bileşimini doğrulamıştır. SEM ve EDS analizleri, kompozitlerin homojen yapıda olduğunu ve elementlerin başarılı bir şekilde dağıldığını göstermiştir. Mekanik test sonuçları, uygun oranlardaki MBG ve Cu-MBG katkısının yapıya mekanik dayanıklılık kazandırdığını göstermiştir.

İn vitro sitotoksikite testleri, düşük konsantrasyonlardaki bakır katkısının hücre canlılığını önemli ölçüde etkilemediğini, ancak yüksek konsantrasyonlarda toksisiteye yol açtığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Cu içermeyen gruplar biyouyumluluk açısından daha olumlu sonuçlar vermiştir. Su tutma, bozunma ve iyon salım testleri ise bu yapıların biyolojik sistemlere uyum sağlayabilecek şekilde tasarlanabileceğini göstermiştir.

Elde edilen bulgular, ipek fibroin temelli bu yeni nesil kompozitlerin, uygun modifikasyonlarla birlikte, kemik doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalarda umut vadeden aday materyaller olabileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdul Rahim, M. A. H., Samsurrijal, S. F., Abdullah, A. A., & Mohd Noor, S. N. F. (2024). Development and physiochemical assessment of graphene-bioactive glass-P(3HB-co-4HB) composite scaffold as prospect biomaterial for wound healing. *Biomed Mater*, 19(4). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ad5632>
- Akhtar, M., Nazneen, A., Awais, M., Hussain, R., Khan, A., Irfan, M., Avcu, E., Ur Rehman, M. A., & Boccaccini, A. R. (2024). Oxidized alginate-gelatin (ADA-GEL)/silk fibroin/Cu-Ag doped mesoporous bioactive glass nanoparticle-based hydrogels for potential wound care treatments. *Biomed Mater*, 19(3). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ad2e0f>
- Ana, I. D., Satria, G. A. P., Dewi, A. H., & Ardhani, R. (2018). Bioceramics for Clinical Application in Regenerative Dentistry. *Adv Exp Med Biol*, 1077, 309-316. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_16
- Aytekin, E., Vurat, M. T., Elcin, A. E., & Elcin, Y. M. (2024). Decellularized Bone Matrix/45S5 Bioactive Glass Biocomposite Hydrogel-Based Constructs with Angiogenic and Osteogenic Properties: Ex Ovo and Ex Vivo Evaluations. *Macromol Biosci*, 24(4), e2300295. <https://doi.org/10.1002/mabi.202300295>
- Balasubramanian, P., Büttner, T., Miguez Pacheco, V., & Boccaccini, A. R. (2018). Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering. *Journal of the European Ceramic Society*, 38(3), 855-869. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001>
- Bari, A., Bloise, N., Fiorilli, S., Novajra, G., Vallet-Regi, M., Bruni, G., Torres-Pardo, A., Gonzalez-Calbet, J. M., Visai, L., & Vitale-Brovarone, C. (2017). Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration. *Acta Biomater*, 55, 493-504. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.012>
- Bhardwaj, N., Chakraborty, S., & Kundu, S. C. (2011). Freeze-gelled silk fibroin protein scaffolds for potential applications in soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol*, 49(3), 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.013>
- Bidgoli, M. R., Alemzadeh, I., Tamjid, E., Khafaji, M., & Vossoughi, M. (2019). Fabrication of hierarchically porous silk fibroin-bioactive glass composite scaffold via indirect 3D printing: Effect of particle size on physico-mechanical properties and in vitro cellular behavior. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 103, 109688. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.067>
- Brunner, T. J., Grass, R. N., & Stark, W. J. (2006). Glass and bioglass nanopowders by flame synthesis. *Chem Commun (Camb)*(13), 1384-1386. <https://doi.org/10.1039/b517501a>

- Caccavo, D., Cascone, S., Lamberti, G., & Barba, A. A. (2018). Hydrogels: experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behaviour. *Chemical Society Reviews*, 47(7), 2357-2373. <https://doi.org/10.1039/c7cs00638a>
- Cacciotti, I. (2017). Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties. *Journal of Materials Science*, 52(15), 8812-8831. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1010-0>
- Cammarata, R. C. (2004). Nanocomposites. In M. Di Ventra, S. Evoy, & J. R. Heflin (Eds.), *Introduction to Nanoscale Science and Technology* (pp. 199-213). Springer US. https://doi.org/10.1007/1-4020-7757-2_9
- Campo, V. L., Kawano, D. F., Silva, D. B. d., & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 167-180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.020>
- Chaala, M., Sebba, F. Z., Fuster, M. G., Moulefera, I., Montalban, M. G., Carissimi, G., & Villora, G. (2023). Accelerated Simple Preparation of Curcumin-Loaded Silk Fibroin/Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/polym15030504>
- Chatterjee, A. K., Chakraborty, R., & Basu, T. (2014). Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*, 25(13), 135101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/13/135101>
- Chen, H., Gu, Z., An, H., Chen, C., Chen, J., Cui, R., Chen, S., Chen, W., Chen, X., Chen, X., Chen, Z., Ding, B., Dong, Q., Fan, Q., Fu, T., Hou, D., Jiang, Q., Ke, H., Jiang, X., . . . Zhao, Y. (2018). Precise nanomedicine for intelligent therapy of cancer. *Science China Chemistry*, 61(12), 1503-1552. <https://doi.org/10.1007/s11426-018-9397-5>
- Chen, H., Huang, X., Zhang, M., Damanik, F., Baker, M. B., Leferink, A., Yuan, H., Truckenmuller, R., van Blitterswijk, C., & Moroni, L. (2017). Tailoring surface nanoroughness of electrospun scaffolds for skeletal tissue engineering. *Acta Biomater*, 59, 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.003>
- Chen, J., Zhuang, A., Shao, H., Hu, X., & Zhang, Y. (2017). Robust silk fibroin/bacterial cellulose nanoribbon composite scaffolds with radial lamellae and intercalation structure for bone regeneration [Article]. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(20), 3640-3650. <https://doi.org/10.1039/c7tb00485k>
- Correa, S., Grosskopf, A. K., Lopez Hernandez, H., Chan, D., Yu, A. C., Stapleton, L. M., & Appel, E. A. (2021). Translational Applications of Hydrogels. *Chem Rev*, 121(18), 11385-11457. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01177>

- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecci, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release*, 119(1), 5-24. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.004>
- De Giorgio, G., Matera, B., Vurro, D., Manfredi, E., Galstyan, V., Tarabella, G., Ghezzi, B., & D'Angelo, P. (2024). Silk Fibroin Materials: Biomedical Applications and Perspectives. *Bioengineering* (Basel), 11(2). <https://doi.org/10.3390/bioengineering11020167>
- DeBari, M. K., Niu, X., Scott, J. V., Griffin, M. D., Pereira, S. R., Cook, K. E., He, B., & Abbott, R. D. (2021). Therapeutic Ultrasound Triggered Silk Fibroin Scaffold Degradation. *Adv Healthc Mater*, 10(10), e2100048. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100048>
- Deng, Y., Huang, M., Sun, D., Hou, Y., Li, Y., Dong, T., Wang, X., Zhang, L., & Yang, W. (2018). Dual Physically Cross-Linked κ -Carrageenan-Based Double Network Hydrogels with Superior Self-Healing Performance for Biomedical Application. *ACS Appl Mater Interfaces*, 10(43), 37544-37554. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b15385>
- Deng, Y., Huang, M., Sun, D., Hou, Y., Li, Y., Dong, T., Wang, X., Zhang, L., & Yang, W. (2018). Dual Physically Cross-Linked κ -Carrageenan-Based Double Network Hydrogels with Superior Self-Healing Performance for Biomedical Application. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(43), 37544-37554. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b15385>
- Deshpande, R., Shukla, S., Sayyad, R., Salunke, S., Nisal, A., & Venugopalan, P. (2021). Silk fibroin and ceramic scaffolds: Comparative in vitro studies for bone regeneration. *Bioeng Transl Med*, 6(3), e10221. <https://doi.org/10.1002/btm2.10221>
- Dingle, Y. L., Bonzanni, M., Liaudanskaya, V., Nieland, T. J. F., & Kaplan, D. L. (2021). Integrated functional neuronal network analysis of 3D silk-collagen scaffold-based mouse cortical culture. *STAR Protoc*, 2(1), 100292. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100292>
- Dinoro, J., Maher, M., Talebian, S., Jafarkhani, M., Mehrali, M., Orive, G., Foroughi, J., Lord, M. S., & Dolatshahi-Pirouz, A. (2019). Sulfated polysaccharide-based scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, 214, 119214. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.025>
- Du, C., Hu, J., Wu, X., Shi, H., Yu, H. C., Qian, J., Yin, J., Gao, C., Wu, Z. L., & Zheng, Q. (2022). 3D printing of a tough double-network hydrogel and its use as a scaffold to construct a tissue-like hydrogel composite. *J Mater Chem B*, 10(3), 468-476. <https://doi.org/10.1039/d1tb02465e>

- El-Trass, A., ElShamy, H., El-Mehasseb, I., & El-Kemary, M. (2012). CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258(7), 2997-3001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.11.025>
- Erol-Taygun, M., Zheng, K., & Boccaccini, A. R. (2013). Nanoscale Bioactive Glasses in Medical Applications. *International Journal of Applied Glass Science*, 4(2), 136-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijag.12029>
- Fan, X., Yahia, L., & Sacher, E. (2021). Antimicrobial Properties of the Ag, Cu Nanoparticle System. *Biology (Basel)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biology10020137>
- Frauchiger, D. A., Tekari, A., Woltje, M., Fortunato, G., Benneker, L. M., & Gantenbein, B. (2017). A review of the application of reinforced hydrogels and silk as biomaterials for intervertebral disc repair. *Eur Cell Mater*, 34, 271-290. <https://doi.org/10.22203/eCM.v034a17>
- Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M. N., & Tomsia, A. P. (2011). Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 31(7), 1245-1256. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.022>
- Furlan, R. G., Correr, W. R., Russi, A. F. C., da Costa Iemma, M. R., Trovatti, E., & Pecoraro, É. (2018). Preparation and characterization of boron-based bioglass by sol-gel process. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 88(1), 181-191. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4806-8>
- George, A., Shah, P. A., & Shrivastav, P. S. (2019). Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *Int J Pharm*, 561, 244-264. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.011>
- Ghanbari Hassan Kiadeh, S., Rahaiee, S., Azizi, H., & Govahi, M. (2024). The synthesis of broccoli sprout extract-loaded silk fibroin nanoparticles as efficient drug delivery vehicles: development and characterization. *Pharm Dev Technol*, 29(4), 359-370. <https://doi.org/10.1080/10837450.2024.2336101>
- Ghosh, S. K., Nandi, S. K., Kundu, B., Datta, S., De, D. K., Roy, S. K., & Basu, D. (2008). In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 86(1), 217-227. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31009>
- Goh, Y.-F., Alshemary, A. Z., Akram, M., Abdul Kadir, M. R., & Hussain, R. (2014). In-vitro characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria. *Ceramics International*, 40(1, Part A), 729-737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.06.062>

- Gorustovich, A. A., Roether, J. A., & Boccaccini, A. R. (2010). Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Eng Part B Rev*, 16(2), 199-207. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0416>
- Greish, K., Araki, K., Li, D., O'Malley, B. W., Jr., Dandu, R., Frandsen, J., Cappello, J., & Ghandehari, H. (2009). Silk-elastinlike protein polymer hydrogels for localized adenoviral gene therapy of head and neck tumors. *Biomacromolecules*, 10(8), 2183-2188. <https://doi.org/10.1021/bm900356j>
- Grenha, A., Gomes, M. E., Rodrigues, M., Santo, V. E., Mano, J. F., Neves, N. M., & Reis, R. L. (2010). Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *J Biomed Mater Res A*, 92(4), 1265-1272. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32466>
- Guo, C., Li, C., & Kaplan, D. L. (2020). Enzymatic Degradation of Bombyx mori Silk Materials: A Review. *Biomacromolecules*, 21(5), 1678-1686. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00090>
- Guo, Y., Liu, F., Bian, X., Lu, K., Huang, P., Ye, X., Tang, C., Li, X., Wang, H., & Tang, K. (2022). Effect of Pore Size of Porous-Structured Titanium Implants on Tendon Ingrowth. *Appl Bionics Biomech*, 2022, 2801229. <https://doi.org/10.1155/2022/2801229>
- Gustafson, J., Greish, K., Frandsen, J., Cappello, J., & Ghandehari, H. (2009). Silk-elastinlike recombinant polymers for gene therapy of head and neck cancer: from molecular definition to controlled gene expression. *J Control Release*, 140(3), 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.022>
- Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M., & Böhner, M. (2016). Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today*, 19(2), 69-87. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>
- Hajiali, F., Tajbakhsh, S., & Shojaei, A. (2018). Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review. *Polymer Reviews*, 58(1), 164-207. <https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1332640>
- Hakimi, F., Jafari, H., Hashemikia, S., Shabani, S., & Ramazani, A. (2023). Chitosan-polyethylene oxide/clay-alginate nanofiber hydrogel scaffold for bone tissue engineering: Preparation, physical characterization, and biomimetic mineralization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123453>
- Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*, 17(11), 967-978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>

- Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>
- Hench, L. L., & Wilson, J. (1993). *An introduction to bioceramics* (Vol. 1). World scientific.
- Hench, L. L. A. W., June. *An Introduction to Bioceramics*. <https://doi.org/10.1142/2028>
- Hoppe, A., Guldal, N. S., & Boccaccini, A. R. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), 2757-2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>
- Hosseini, M., Hassani Besheli, N., Deng, D., Lievens, C., Zuo, Y., Leeuwenburgh, S. C. G., & Yang, F. (2023). Facile post modification synthesis of copper-doped mesoporous bioactive glass with high antibacterial performance to fight bone infection. *Biomater Adv*, 144, 213198. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213198>
- Hua, J., You, H., Li, X., You, R., & Ma, L. (2020). Cu(II) ion loading in silk fibroin scaffolds with silk I structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 275-281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.094>
- Huang, J., & Bonni, A. (2016). A decade of the anaphase-promoting complex in the nervous system. *Genes Dev*, 30(6), 622-638. <https://doi.org/10.1101/gad.274324.115>
- Huang, W., Day, D. E., Kittiratanapiboon, K., & Rahaman, M. N. (2006). Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *J Mater Sci Mater Med*, 17(7), 583-596. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-9220-z>
- Huang, W., Rahaman, N., Day, D., & Li, Y. (2006). Mechanisms for Converting Bioactive Silicate, Borate, and Borosilicate Glasses to Hydroxyapatite in Dilute Phosphate Solution. *Physics and Chemistry of Glasses - European Journal of Glass Science and Technology Part B*, 47, 647-658.
- Huang, W. W., Ling, S. J., Li, C. M., Omenetto, F. G., & Kaplan, D. L. (2018). Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chemical Society Reviews*, 47(17), 6486-6504. <https://doi.org/10.1039/c8cs00187a>
- Huiwen, W., Shuai, L., Jia, X., Shihao, D., Kun, W., Runhuai, Y., Haisheng, Q., & Jun, L. (2024). 3D-printed nanohydroxyapatite/methylacrylated silk fibroin scaffold for repairing rat skull defects. *J Biol Eng*, 18(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13036-024-00416-5>

- Iwan, M., Andryszewski, T., Wydryszek, M., & Fialkowski, M. (2015). Fabrication of nanocomposites by covalent bonding between noble metal nanoparticles and polymer matrix [10.1039/C5RA12474C]. *RSC Advances*, 5(86), 70127-70138. <https://doi.org/10.1039/C5RA12474C>
- Jastrzebska, K., Kucharczyk, K., Florczak, A., Dondajewska, E., Mackiewicz, A., & Dams-Kozłowska, H. (2015). Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy. *Rep Pract Oncol Radiother*, 20(2), 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.11.010>
- Jia, Z., Zhou, W., Yan, J., Xiong, P., Guo, H., Cheng, Y., & Zheng, Y. (2019). Constructing Multilayer Silk Protein/Nanosilver Biofunctionalized Hierarchically Structured 3D Printed Ti6Al4 V Scaffold for Repair of Infective Bone Defects. *ACS Biomater Sci Eng*, 5(1), 244-261. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00857>
- Jiang, C., Wang, X., Gunawidjaja, R., Lin, Y.-H., Gupta, M. K., Kaplan, D. L., Naik, R. R., & Tsukruk, V. V. (2007). Mechanical Properties of Robust Ultrathin Silk Fibroin Films. *Advanced Functional Materials*, 17(13), 2229-2237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.200601136>
- Jiang, M. (2007). Glossary of Biotechnology and Nanobiotechnology Terms. *BioMedical Engineering OnLine*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-6-5>
- Jones, J. R. (2013). Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4457-4486. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>
- Jose, R. R., Brown, J. E., Polido, K. E., Omenetto, F. G., & Kaplan, D. L. (2015). Polyol-Silk Bioink Formulations as Two-Part Room-Temperature Curable Materials for 3D Printing. *ACS Biomater Sci Eng*, 1(9), 780-788. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00160>
- Juan, P. K., Fan, F. Y., Lin, W. C., Liao, P. B., Huang, C. F., Shen, Y. K., Ruslin, M., & Lee, C. H. (2021). Bioactivity and Bone Cell Formation with Poly-epsilon-Caprolactone/Bioceramic 3D Porous Scaffolds. *Polymers (Basel)*, 13(16). <https://doi.org/10.3390/polym13162718>
- Kamalathevan, P., Ooi, P. S., & Loo, Y. L. (2018). Silk-Based Biomaterials in Cutaneous Wound Healing: A Systematic Review. *Adv Skin Wound Care*, 31(12), 565-573. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000546233.35130.a9>
- Kambe, Y., Mizoguchi, Y., Kuwahara, K., Nakaoki, T., Hirano, Y., & Yamaoka, T. (2020). Beta-sheet content significantly correlates with the biodegradation time of silk fibroin hydrogels showing a wide range of compressive modulus. *Polymer Degradation and Stability*, 179, 109240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109240>

- Kang, G. D., Nahm, J. H., Park, J. S., Moon, J. Y., Cho, C., & Yeo, J. H. (2000). Effects of poloxamer on the gelation of silk fibroin. *Macromolecular Rapid Communications*, 21, 788-791. [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000701\)21:11<788::AID-MARC788>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000701)21:11<788::AID-MARC788>3.0.CO;2-X)
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
- Kargozar, S., Montazerian, M., Hamzehlou, S., Kim, H.-W., & Baino, F. (2018). Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies. *Acta Biomaterialia*, 81, 1-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.052>
- Kianfar, F., Antonijevic, M., Chowdhry, B., & Boateng, J. S. (2013). Lyophilized wafers comprising carrageenan and pluronic acid for buccal drug delivery using model soluble and insoluble drugs. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103, 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.006>
- Kim, S. H., Seo, Y. B., Yeon, Y. K., Lee, Y. J., Park, H. S., Sultan, M. T., Lee, J. M., Lee, J. S., Lee, O. J., Hong, H., Lee, H., Ajiteru, O., Suh, Y. J., Song, S. H., Lee, K. H., & Park, C. H. (2020). 4D-bioprinted silk hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, 260, 120281. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120281>
- Kim, U. J., Park, J., Li, C., Jin, H. J., Valluzzi, R., & Kaplan, D. L. (2004). Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*, 5(3), 786-792. <https://doi.org/10.1021/bm0345460>
- Koller, G., Cook, R. J., Thompson, I. D., Watson, T. F., & Di Silvio, L. (2007). Surface modification of titanium implants using bioactive glasses with air abrasion technologies. *J Mater Sci Mater Med*, 18(12), 2291-2296. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3137-z>
- Kundu, B., Kurland, N. E., Yadavalli, V. K., & Kundu, S. C. (2014). Isolation and processing of silk proteins for biomedical applications. *Int J Biol Macromol*, 70, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.022>
- Lammel, A., Schwab, M., Hofer, M., Winter, G., & Scheibel, T. (2011). Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 32(8), 2233-2240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.060>
- Leu, A., & Leach, J. K. (2008). Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharm Res*, 25(5), 1222-1229. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9508-9>

- Li, G., Chen, K., You, D., Xia, M., Li, W., Fan, S., Chai, R., Zhang, Y., Li, H., & Sun, S. (2019). Laminin-Coated Electrospun Regenerated Silk Fibroin Mats Promote Neural Progenitor Cell Proliferation, Differentiation, and Survival in vitro. *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 190. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00190>
- Li, G., & Sun, S. (2022). Silk Fibroin-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092757>
- Li, J., Zhai, D., Lv, F., Yu, Q., Ma, H., Yin, J., Yi, Z., Liu, M., Chang, J., & Wu, C. (2016). Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound healing. *Acta Biomater*, 36, 254-266. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.011>
- Li, M., & Li, J. (2014). Biodegradation behavior of silk biomaterials. In (pp. 330-348). <https://doi.org/10.1533/9780857097064.2.330>
- Lin, C. C., & Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(12-13), 1379-1408. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>
- Liu, C., Fu, X., Pan, H., Wan, P., Wang, L., Tan, L., Wang, K., Zhao, Y., Yang, K., & Chu, P. K. (2016). Biodegradable Mg-Cu alloys with enhanced osteogenesis, angiogenesis, and long-lasting antibacterial effects. *Sci Rep*, 6, 27374. <https://doi.org/10.1038/srep27374>
- Liu, J., Zhan, X., Wan, J., Wang, Y., & Wang, C. (2015). Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydr Polym*, 121, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.063>
- Liu, X., Rahaman, M. N., & Day, D. E. (2013). Conversion of melt-derived microfibrillar borate (13-93B3) and silicate (45S5) bioactive glass in a simulated body fluid. *J Mater Sci Mater Med*, 24(3), 583-595. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4831-z>
- Lokhande, G., Carrow, J. K., Thakur, T., Xavier, J. R., Parani, M., Bayless, K. J., & Gaharwar, A. K. (2018). Nanoengineered injectable hydrogels for wound healing application. *Acta Biomaterialia*, 70, 35-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.045>
- Lopez-Piriz, R., Sola-Linares, E., Rodriguez-Portugal, M., Malpica, B., Diaz-Guemes, I., Enciso, S., Esteban-Tejeda, L., Cabal, B., Granizo, J. J., Moya, J. S., & Torrecillas, R. (2015). Evaluation in a Dog Model of Three Antimicrobial Glassy Coatings: Prevention of Bone Loss around Implants and Microbial Assessments. *PLoS One*, 10(10), e0140374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140374>

- Lu, Q., Zhang, B., Li, M., Zuo, B., Kaplan, D. L., Huang, Y., & Zhu, H. (2011). Degradation mechanism and control of silk fibroin. *Biomacromolecules*, 12(4), 1080-1086. <https://doi.org/10.1021/bm101422j>
- Luo, K., Yang, Y., & Shao, Z. (2015). Physically Crosslinked Biocompatible Silk-Fibroin-Based Hydrogels with High Mechanical Performance. *Advanced Functional Materials*, 26, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/adfm.201503450>
- Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Meng, X. G., & Shi, J. Z. (2010). Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅ bioglass. *Ceramics International*, 36(6), 1911-1916. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.03.017>
- Mazurek, L., Szudzik, M., Rybka, M., & Konop, M. (2022). Silk Fibroin Biomaterials and Their Beneficial Role in Skin Wound Healing. *Biomolecules*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/biom12121852>
- Megeed, Z., Haider, M., Li, D., O'Malley, B. W., Jr., Cappello, J., & Ghandehari, H. (2004). In vitro and in vivo evaluation of recombinant silk-elastinlike hydrogels for cancer gene therapy. *J Control Release*, 94(2-3), 433-445. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.10.027>
- Mehtar, S., Wiid, I., & Todorov, S. D. (2008). The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and Mycobacterium tuberculosis isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. *J Hosp Infect*, 68(1), 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.10.009>
- Mihaila, S. M., Gaharwar, A. K., Reis, R. L., Marques, A. P., Gomes, M. E., & Khademhosseini, A. (2013). Photocrosslinkable kappa-carrageenan hydrogels for tissue engineering applications. *Adv Healthc Mater*, 2(6), 895-907. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200317>
- Miola, M., Cochis, A., Kumar, A., Arciola, C. R., Rimondini, L., & Verne, E. (2018). Copper-Doped Bioactive Glass as Filler for PMMA-Based Bone Cements: Morphological, Mechanical, Reactivity, and Preliminary Antibacterial Characterization. *Materials (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/ma11060961>
- Mirza, S., Jolly, R., Zia, I., Saad Umar, M., Owais, M., & Shakir, M. (2020). Bioactive Gum Arabic/kappa-Carrageenan-Incorporated Nano-Hydroxyapatite Nanocomposites and Their Relative Biological Functionalities in Bone Tissue Engineering. *ACS Omega*, 5(20), 11279-11290. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03761>
- Misra, S. K., Ansari, T., Mohn, D., Valappil, S. P., Brunner, T. J., Stark, W. J., Roy, I., Knowles, J. C., Sibbons, P. D., Jones, E. V., Boccaccini, A. R., & Salih, V. (2010). Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites. *J R Soc Interface*, 7(44), 453-465. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0255>

- Mistry, S., Kundu, D., Datta, S., & Basu, D. (2011). Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone. *Aust Dent J*, 56(1), 68-75. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01305.x>
- Mokhtari, H., Tavakoli, S., Safarpour, F., Kharaziha, M., Bakhsheshi-Rad, H. R., Ramakrishna, S., & Berto, F. (2021). Recent Advances in Chemically-Modified and Hybrid Carrageenan-Based Platforms for Drug Delivery, Wound Healing, and Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/polym13111744>
- Moonesi Rad, R., Alshemary, A. Z., Evis, Z., Keskin, D., Altunbaş, K., & Tezcaner, A. (2018). Structural and biological assessment of boron doped bioactive glass nanoparticles for dental tissue applications. *Ceramics International*, 44(8), 9854-9864. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.02.230>
- Moreira, C. D., Carvalho, S. M., Mansur, H. S., & Pereira, M. M. (2016). Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 58, 1207-1216. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.075>
- Motta, A., Fambri, L., & Migliaresi, C. (2002). Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203(10-11), 1658-1665. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3935\(200207\)203:10/11<1658::AID-MACP1658>3.0.CO;2-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3935(200207)203:10/11<1658::AID-MACP1658>3.0.CO;2-3)
- Mousa, H. M., Hussein, K. H., Sayed, M. M., El-Aassar, M. R., Mohamed, I. M. A., Kwak, H.-H., Woo, H.-M., & Abdal-hay, A. (2020). Development of biocompatible tri-layered nanofibers patches with endothelial cells for cardiac tissue engineering. *European Polymer Journal*, 129, 109630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109630>
- Mu, X., Wang, Y., Guo, C., Li, Y., Ling, S., Huang, W., Cebe, P., Hsu, H.-H., De Ferrari, F., Jiang, X., Xu, Q., Balduini, A., Omenetto, F. G., & Kaplan, D. L. (2020). 3D Printing of Silk Protein Structures by Aqueous Solvent-Directed Molecular Assembly. *Macromolecular Bioscience*, 20(1), 1900191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.201900191>
- Mu, X., Wang, Y., Guo, C., Li, Y., Ling, S., Huang, W., Cebe, P., Hsu, H. H., De Ferrari, F., Jiang, X., Xu, Q., Balduini, A., Omenetto, F. G., & Kaplan, D. L. (2020). 3D Printing of Silk Protein Structures by Aqueous Solvent-Directed Molecular Assembly. *Macromol Biosci*, 20(1), e1900191. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900191>
- Munir, A., Marovic, D., Nogueira, L. P., Simm, R., Naemi, A. O., Landro, S. M., Helgerud, M., Zheng, K., Par, M., Taubock, T. T., Attin, T., Tarle, Z., Boccaccini, A. R., & Haugen, H. J. (2022). Using Copper-Doped Mesoporous Bioactive Glass Nanospheres to Impart Anti-Bacterial Properties to Dental Composites. *Pharmaceutics*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102241>

- Murphy, C. M., Haugh, M. G., & O'Brien, F. J. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461-466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
- Naebe, M., Wang, J., Amini, A., Khayyam, H., Hameed, N., Li, L. H., Chen, Y., & Fox, B. (2014). Mechanical Property and Structure of Covalent Functionalised Graphene/Epoxy Nanocomposites. *Scientific Reports*, 4(1), 4375. <https://doi.org/10.1038/srep04375>
- Najeeb, S., Khurshid, Z., Ghabbani, H., Zafar, M. S., & Sefat, F. (2019). 10 - Nano glass ionomer cement: modification for biodental applications. In Z. Khurshid, S. Najeeb, M. S. Zafar, & F. Sefat (Eds.), *Advanced Dental Biomaterials* (pp. 217-227). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102476-8.00010-4>
- Nawaz, Q., de Pablos-Martín, A., Berthold, L., Martins de Souza e Silva, J., Hurle, K., & Boccaccini, A. R. (2022). Mapping the elemental and crystalline phase distribution in Cu²⁺ doped 45S5 bioactive glass upon crystallization [10.1039/D1CE01160J]. *CrystEngComm*, 24(2), 284-293. <https://doi.org/10.1039/D1CE01160J>
- Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinarni medicina*, 58(4), 187-205. <http://dx.doi.org/10.17221/6758-VETMED>
- Niknafs, B., Meskaraf-asadabadi, M., Hamdi, K., & Ghanbari, E. (2024). Incorporating bioactive glass nanoparticles in silk fibroin/bacterial nanocellulose composite scaffolds improves their biological and osteogenic properties for bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 266, 131167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131167>
- Nikpour, P., Salimi-Kenari, H., Fahimipour, F., Rabiee, S. M., Imani, M., Dashtimoghadam, E., & Tayebi, L. (2018). Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym*, 190, 281-294. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.083>
- Norouzi, F., Bagheri, F., & Hashemi-Najafabadi, S. (2024). Alendronate releasing silk fibroin 3D bioprinted scaffolds for application in bone tissue engineering: Effects of alginate concentration on printability, mechanical properties and stability. *Results in Engineering*, 22, 102186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102186>
- Numata, K., Hamasaki, J., Subramanian, B., & Kaplan, D. L. (2010). Gene delivery mediated by recombinant silk proteins containing cationic and cell binding motifs. *J Control Release*, 146(1), 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.05.006>

- Numata, K., Mieszawska-Czajkowska, A. J., Kvenvold, L. A., & Kaplan, D. L. (2012). Silk-based nanocomplexes with tumor-homing peptides for tumor-specific gene delivery. *Macromol Biosci*, 12(1), 75-82. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100274>
- Owens, G. J., Singh, R. K., Foroutan, F., Alqaysi, M., Han, C.-M., Mahapatra, C., Kim, H.-W., & Knowles, J. C. (2016). Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 77, 1-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. d. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Pavli, M., Baumgartner, S., Kos, P., & Kogej, K. (2011). Doxazosin-carrageenan interactions: A novel approach for studying drug-polymer interactions and relation to controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 110-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.019>
- Pavli, M., Vrecer, F., & Baumgartner, S. (2010). Matrix tablets based on carrageenans with dual controlled release of doxazosin mesylate. *Int J Pharm*, 400(1-2), 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.021>
- Pollini, M., & Paladini, F. (2024). The Emerging Role of Silk Fibroin for the Development of Novel Drug Delivery Systems. *Biomimetics (Basel)*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/biomimetics9050295>
- Rabiee, S. M., Nazparvar, N., Azizian, M., Vashaei, D., & Tayebi, L. (2015). Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review. *Ceramics International*, 41(6), 7241-7251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.140>
- Rajzer, I. (2014). Fabrication of bioactive polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds with final bilayer nano-/micro-fibrous structures for tissue engineering application. *Journal of Materials Science*, 49(16), 5799-5807. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8311-3>
- Rasool, A., Ata, S., Islam, A., & Khan, R. U. (2019). Fabrication of novel carrageenan based stimuli responsive injectable hydrogels for controlled release of cephadrine. *RSC Adv*, 9(22), 12282-12290. <https://doi.org/10.1039/c9ra02130b>
- Rigiracciolo, D. C., Scarpelli, A., Lappano, R., Pisano, A., Santolla, M. F., De Marco, P., Cirillo, F., Cappello, A. R., Dolce, V., Belfiore, A., Maggiolini, M., & De Francesco, E. M. (2015). Copper activates HIF-1alpha/GPER/VEGF signalling in cancer cells. *Oncotarget*, 6(33), 34158-34177. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5779>

- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yucel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc*, 6(10), 1612-1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
- Rodriguez, M. J., Dixon, T. A., Cohen, E., Huang, W., Omenetto, F. G., & Kaplan, D. L. (2018). 3D freeform printing of silk fibroin. *Acta Biomater*, 71, 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.035>
- Saghatchi, M., Abdollahi, S., Eftekhari Yekta, B., & Mirkazemi, S. M. (2023). Synthesis of copper bearing borosilicate glass for soft tissue wound healing. *Ceramics International*, 49(4), 5657-5666. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.304>
- Sanchez-Sanchez, M. P., Martin-Illana, A., Ruiz-Caro, R., Bermejo, P., Abad, M. J., Carro, R., Bedoya, L. M., Tamayo, A., Rubio, J., Fernandez-Ferreiro, A., Otero-Espinar, F., & Veiga, M. D. (2015). Chitosan and Kappa-Carrageenan Vaginal Acyclovir Formulations for Prevention of Genital Herpes. In Vitro and Ex Vivo Evaluation. *Mar Drugs*, 13(9), 5976-5992. <https://doi.org/10.3390/md13095976>
- Sangfai, T., Tantishaiyakul, V., Hirun, N., & Li, L. (2015). Preparation and characterization of κ -carrageenan and xyloglucan blends for sustained release of a hydrophilic drug. *Polymer Bulletin*, 72(7), 1647-1661. <https://doi.org/10.1007/s00289-015-1360-1>
- Satchanska, G., Davidova, S., & Petrov, P. D. (2024). Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications. *Polymers (Basel)*, 16(8). <https://doi.org/10.3390/polym16081159>
- Schneider, K. H., Goldberg, B. J., Hasturk, O., Mu, X., Dotzlhofer, M., Eder, G., Theodossiou, S., Pichelkastner, L., Riess, P., Rohringer, S., Kiss, H., Teuschl-Woller, A. H., Fitzpatrick, V., Enayati, M., Podesser, B. K., Bergmeister, H., & Kaplan, D. L. (2023). Silk fibroin, gelatin, and human placenta extracellular matrix-based composite hydrogels for 3D bioprinting and soft tissue engineering. *Biomater Res*, 27(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00431-5>
- Seib, F. P., Jones, G. T., Rnjak-Kovacina, J., Lin, Y., & Kaplan, D. L. (2013). pH-dependent anticancer drug release from silk nanoparticles. *Adv Healthc Mater*, 2(12), 1606-1611. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300034>
- Singh, S., Cortes, G., Kumar, U., Sakthivel, T. S., Niemiec, S. M., Louiselle, A. E., Azeltine-Bannerman, M., Zgheib, C., Liechty, K. W., & Seal, S. (2020). Silk fibroin nanofibrous mats for visible sensing of oxidative stress in cutaneous wounds [10.1039/D0BM01325K]. *Biomaterials Science*, 8(21), 5900-5910. <https://doi.org/10.1039/D0BM01325K>
- Sommer, M. R., Schaffner, M., Carnelli, D., & Studart, A. R. (2016). 3D Printing of Hierarchical Silk Fibroin Structures. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(50), 34677-34685. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11440>

- Spessot, E., Passuello, S., Shah, L. V., Maniglio, D., & Motta, A. (2024). Nanocomposite Methacrylated Silk Fibroin-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomimetics (Basel)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/biomimetics9040218>
- Sun, W., Gregory, D. A., Tomeh, M. A., & Zhao, X. (2021). Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*, 22(3). <https://doi.org/10.3390/ijms22031499>
- Sun, W. Z., Zhang, Y., Gregory, D. A., Jimenez-Franco, A., Tomeh, M. A., Lv, S. W., Wang, J. Q., Haycock, J. W., Lu, J. R., & Zhao, X. B. (2020). Patterning the neuronal cells via inkjet printing of self-assembled peptides on silk scaffolds. *Progress in Natural Science-Materials International*, 30(5), 686-696. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2020.09.007>
- Talreja, P. S., Gayathri, G. V., & Mehta, D. S. (2013). Treatment of an early failing implant by guided bone regeneration using resorbable collagen membrane and bioactive glass. *J Indian Soc Periodontol*, 17(1), 131-136. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.107490>
- Tamada, Y. (2005). New process to form a silk fibroin porous 3-D structure. *Biomacromolecules*, 6(6), 3100-3106. <https://doi.org/10.1021/bm050431f>
- Tamjid, E., Simchi, A., Dunlop, J. W. C., Fratzl, P., Bagheri, R., & Vossoughi, M. (2013). Tissue growth into three-dimensional composite scaffolds with controlled micro-features and nanotopographical surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(10), 2796-2807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.34584>
- Tân Nhật, T., Bui, X., & Bui, H. (2021). Sol-Gel Method for Bioactive Glass Synthesis.
- Tao, H., Marelli, B., Yang, M., An, B., Onses, M. S., Rogers, J. A., Kaplan, D. L., & Omenetto, F. G. (2015). Inkjet Printing of Regenerated Silk Fibroin: From Printable Forms to Printable Functions. *Advanced Materials*, 27(29), 4273-4279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201501425>
- Taye, M. B. (2022). Biomedical applications of ion-doped bioactive glass: a review. *Applied Nanoscience*, 12(12), 3797-3812. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02672-7>
- Tian, W., Wang, Y., Xu, J., Li, H., Song, G., Ding, M., Kang, Z., Yin, Y., Wang, A., Ning, P., Dong, F., & Wang, J. (2019). Evaluation of the biomedical properties of a Ca(+) -conjugated silk fibroin porous material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 104, 110003. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110003>
- Tsigkou, O., Jones, J. R., Polak, J. M., & Stevens, M. M. (2009). Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials*, 30(21), 3542-3550. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.019>

- Vepari, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci*, 32(8-9), 991-1007. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013>
- Wang, R., Ruan, L., Li, P., Liu, T., & Jiang, G. (2021). Silk Fibroin and κ -Carrageenan Composite Films Containing Zinc-doped Bioactive Glass for Wound Closure. *Journal of Bionic Engineering*, 18(6), 1400-1412. <https://doi.org/10.1007/s42235-021-00105-9>
- Wang, X., Cheng, F., Liu, J., Smått, J.-H., Gepperth, D., Lastusaari, M., Xu, C., & Hupa, L. (2016). Biocomposites of copper-containing mesoporous bioactive glass and nanofibrillated cellulose: Biocompatibility and angiogenic promotion in chronic wound healing application. *Acta Biomaterialia*, 46, 286-298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.021>
- Wang, X., Molino, B. Z., Pitkanen, S., Ojansivu, M., Xu, C., Hannula, M., Hyttinen, J., Miettinen, S., Hupa, L., & Wallace, G. (2019). 3D Scaffolds of Polycaprolactone/Copper-Doped Bioactive Glass: Architecture Engineering with Additive Manufacturing and Cellular Assessments in a Coculture of Bone Marrow Stem Cells and Endothelial Cells. *ACS Biomater Sci Eng*, 5(9), 4496-4510. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00105>
- Wang, Y., Kim, B. J., Peng, B., Li, W., Wang, Y., Li, M., & Omenetto, F. G. (2019). Controlling silk fibroin conformation for dynamic, responsive, multifunctional, micropatterned surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(43), 21361-21368. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911563116>
- Wei, S., Ma, J. X., Xu, L., Gu, X. S., & Ma, X. L. (2020). Biodegradable materials for bone defect repair. *Mil Med Res*, 7(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00280-6>
- Wen, D.-L., Sun, D.-H., Huang, P., Huang, W., Su, M., Wang, Y., Han, M.-D., Kim, B., Brugger, J., Zhang, H.-X., & Zhang, X.-S. (2021). Recent progress in silk fibroin-based flexible electronics. *Microsystems & Nanoengineering*, 7(1), 35. <https://doi.org/10.1038/s41378-021-00261-2>
- Wu, C., Fan, W., & Chang, J. (2013). Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells. *J Mater Chem B*, 1(21), 2710-2718. <https://doi.org/10.1039/c3tb20275e>
- Wu, C., Zhang, Y., Zhu, Y., Friis, T., & Xiao, Y. (2010). Structure-property relationships of silk-modified mesoporous bioglass scaffolds. *Biomaterials*, 31(13), 3429-3438. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.061>
- Wu, S., Wang, Y., Streubel, P. N., & Duan, B. (2017). Living nanofiber yarn-based woven biotextiles for tendon tissue engineering using cell tri-culture and mechanical stimulation. *Acta Biomater*, 62, 102-115. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.043>

- Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D., Hench, L. L., & Polak, J. M. (2001). Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res*, 55(2), 151-157. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<151::aid-jbm1001>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::aid-jbm1001>3.0.co;2-d)
- Yan, S., Zhang, Q., Wang, J., Liu, Y., Lu, S., Li, M., & Kaplan, D. L. (2013). Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction. *Acta Biomater*, 9(6), 6771-6782. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.016>
- Yang, X., Fan, L., Ma, L., Wang, Y., Lin, S., Yu, F., Pan, X., Luo, G., Zhang, D., & Wang, H. (2017). Green electrospun Manuka honey/silk fibroin fibrous matrices as potential wound dressing. *Materials & Design*, 119, 76-84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.01.023>
- Yegappan, R., Selvaprithiviraj, V., Amirthalingam, S., & Jayakumar, R. (2018). Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing. *Carbohydr Polym*, 198, 385-400. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.086>
- Yigit, S., Hallaj, N. S., Sugarman, J. L., Chong, L. C., Roman, S. E., Abu-Taleb, L. M., Goodman, R. E., Johnson, P. E., & Behrens, A. M. (2021). Toxicological assessment and food allergy of silk fibroin derived from Bombyx mori cocoons. *Food Chem Toxicol*, 151, 112117. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112117>
- Yu, S., Shu, X., Chen, L., Wang, C., Wang, X., Jing, J., Yan, G., Zhang, Y., & Wu, C. (2023). Construction of ultrasonically treated collagen/silk fibroin composite scaffolds to induce cartilage regeneration. *Sci Rep*, 13(1), 20168. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43397-z>
- Yuk, H., Lu, B., & Zhao, X. (2019). Hydrogel bioelectronics. *Chemical Society Reviews*, 48(6), 1642-1667. <https://doi.org/10.1039/c8cs00595h>
- Zafar, M. S., Khurshid, Z., & Almas, K. (2015). Oral tissue engineering progress and challenges. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(6), 387-397. <https://doi.org/10.1007/s13770-015-0030-6>
- Zhang, C., Zhang, Y., Shao, H., & Hu, X. (2016). Hybrid Silk Fibers Dry-Spun from Regenerated Silk Fibroin/Graphene Oxide Aqueous Solutions. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(5), 3349-3358. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b11245>
- Zhang, Y., Lu, L., Chen, Y., Wang, J., Chen, Y., Mao, C., & Yang, M. (2019). Polydopamine modification of silk fibroin membranes significantly promotes their wound healing effect. *Biomater Sci*, 7(12), 5232-5237. <https://doi.org/10.1039/c9bm00974d>

- Zhao, Z.-h., Zhang, M.-h., Liu, W., & Li, Q.-t. (2020). Measurement of pore sized microporous-mesoporous materials by time-domain nuclear magnetic resonance. *BioResources*, 15, 1407-1418. <https://doi.org/10.15376/biores.15.1.1407-1418>
- Zhao, Z., Li, Y., & Xie, M. B. (2015). Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int J Mol Sci*, 16(3), 4880-4903. <https://doi.org/10.3390/ijms16034880>
- Zheng, K., Fan, Y. Q., Torre, E., Balasubramanian, P., Taccardi, N., Cassinelli, C., Morra, M., Iviglia, G., & Boccaccini, A. R. (2020). Incorporation of Boron in Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles Reduces Inflammatory Response and Delays Osteogenic Differentiation. *Particle & Particle Systems Characterization*, 37(7). <https://doi.org/ARTN200005410.1002/ppsc.202000054>
- Zheng, Z., Wu, J., Liu, M., Wang, H., Li, C., Rodriguez, M. J., Li, G., Wang, X., & Kaplan, D. L. (2018). 3D Bioprinting of Self-Standing Silk-Based Bioink. *Adv Healthc Mater*, 7(6), e1701026. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701026>
- Zhong, J., Ma, X., Lu, H., Wang, X., Zhang, S., & Xiang, W. (2014). Preparation and optical properties of sodium borosilicate glasses containing Sb nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 607, 177-182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.04.080>
- Zhou, A., Hu, Y., Chen, C., Mao, H., Wang, L., Zhang, S., & Huang, X. (2023). 3D bioprintable methacrylated carrageenan/sodium alginate dual network hydrogel for vascular tissue engineering scaffolding. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 72(7), 550-560. <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2032704>
- Zhou, L., Chen, X., Dai, W., & Shao, Z. (2006). X-ray photoelectron spectroscopic and Raman analysis of silk fibroin–Cu(II) films. *Biopolymers*, 82(2), 144-151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.20472>