

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ
FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI
PROJE DETAY RAPORU
PROJE KATEGORİSİ

PROJE ADI: Ortopedik İmplantların Ameliyat Sırasında Antibakteriyel Jel ile Kaplanması

TAKIM ADI: AKI ANTI-JEL

TAKIM ID: 15079-155

DANIŞMAN ADI: Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

1.Proje Özeti (Proje Tanımı)

Kalça, diz ve bilek gibi vücudun belirli bölgelerinde oluşan travmatik hasarların tedavilerinde ortopedik implantlar kullanılmaktadır. Ortopedik implantlar genellikle titanyum ve kobalt-krom içeren alaşımlar kullanılarak üretilmektedir. Ortopedik ameliyat sonrasında hastada zaman zaman enfeksiyon, şişme, ağrı gibi durumlar ortaya çıkmaktadır ve bu durumların kontrol altına alınabilmesi için hastaya oral yolla veya damardan antibiyotik verilmektedir.



Şekil 1: AKI Anti-Jel Logosu

Biyomateryaller ile ilgili enfeksiyon, özellikle implante biyomalzemelerde biyofilm oluşumu nedeniyle klinik uygulamalar için ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir.

Sağlık hizmetinin kalitesindeki büyük ilerlemelere rağmen, cerrahi bir prosedür sırasında enfeksiyon olasılığı hala yüksektir.

Bu çalışmada, hastaya entegre edilen ortopedik implantlarda biyofilm oluşumunu engellemek ve osseointegrasyonu artırmak için antibakteriyel jel ile kaplama konusu ele alınmıştır.

Bu yolda alanında uzman kişilerle irtibata geçilerek karşılaşılan sorunlar konuşulmuş ve klinikte karşılaşılan problem belirlendikten sonra literatür taramasına başlanmıştır. Literatür taramaları sonucunda antibakteriyel jel üretilmesine karar verilmiştir. Bu doğrultuda ana malzemeler olarak Hidroksipropil metilselüloz (HPMC), Gentamisin ve Hyalüronik Asit kullanılacaktır. İmplant vücuda entegre edildikten sonra gelişen inflamasyon süreci istenen ve beklenen süreçtir. Ancak bu sürecin hasta açısından en acısız, tıbbi açıdan ise başarılı olması istenmektedir. Bunun için jelin içindeki antibiyotiğin ilk 24 saat içinde çok hızlı salınması, sonrasında ise nispeten daha yavaş salınım yapması hedeflenmektedir. Bunun sonucunda enfeksiyon riski ortadan kaldırılarak hastaların günlük yaşam aktivitelerine kısa zamanda geri dönmeleri sağlanacaktır. Ürün, enfeksiyon riskini ortadan kaldırmanın yanı sıra, hyalüronik asit ile yeni kemik oluşumunu sağlayacak ve kemik/implant yüzey etkileşimini artırarak iyileşme süresini ve implant stabilitesini geliştirecektir. Sonuçta ameliyat öncesinde jelin, implanta yaydırılarak kullanılması sağlanacaktır. Bu çalışmayla bu alanda hem ilk yerli üretimi yapmak hem de sanayide ekonomik kalkınma yaratmak temel hedeflerdendir. Ayrıca proje bitiminde bir makale yayınlayarak bu alanda çalışan insanlara katkı sağlanması düşünülmektedir.

Hazırlanan rapor jeli elde etmek için yapılan tüm araştırmaları, projenin yenilikçi yönlerini, projenin maliyet ve bütçe hesaplamalarını, projenin gerçekleştirilme aşamasında karşılaşılan risklere detaylı olarak değinilmiştir.

2.Problem/Sorun

Ortopedik implantlar hastaya entegre edildiğinde kritik saat olarak belirlenen özellikle 24-72 saat aralıklarında, hastada zaman zaman enfeksiyon, şişme, kızarıklık ve morarma gibi semptomlar görülmektedir. Paslanmaz çelik, titanyum alaşımları ve kobalt krom alaşımları, korozyon direnci, mekanik stabilite, kırılma tokluğu ve biyoyumluluk gibi mükemmel özelliklere sahip oldukları için ortopedik cerrahide kalıcı implantlar için tercih edilen metallerdir (Hayes ve Richards, 2010).

Ortopedik ve travma cerrahisinde cerrahi teknikler ve implant tasarımlarındaki iyileşmeye rağmen, biyomateryaller ile ilgili enfeksiyon, özellikle implante biyomalzemelerde biyofilm oluşumu nedeniyle klinik uygulamalar için ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir. Her biyomateryal implante edildiğinde, bir rekabet konakçı ve bakteri arasında yüzey kolonizasyonu meydana gelir. Bir implanta bakterilerin yapışması durumunda, anında biyofilm oluşumu başlar ve bakterileri konağın savunma mekanizmalarına ve antimikrobiallere karşı son derece dirençli hale getirir (Diefenbeck ve arkadaşları, 2006). İmplantta bakteri yapışmasını engellemek için günümüzde klinik uygulamalarda birçok farklı biyomateryallerle kaplı implantın ve antibiyotik yüklü kemik çimentosunun kullanımının yanı sıra enfeksiyon oluşumunun kontrol altına alınabilmesi için hastaya oral yolla veya damardan antibiyotik verilmektedir (Diefenbeck ve arkadaşları, 2006; Romanò ve arkadaşları, 2019). Antibiyotik yüklü kemik çimentosunun klinikte kullanımı araştırıldığı zaman çimentolu total kalça artroplastilerinin derin enfeksiyon oranlarını ve “aseptik” gevşemeye bağlı revizyon oranlarını azaltabileceğine rastlanmıştır (Engesaeter ve arkadaşları, 2003). Fakat Polimetilmetakrilat (PMMA) çimentosunun antibiyotik taşıyıcı olarak tasarlanmamasından dolayı biyofilm oluşumunu engelleyemeyeceğine ve antibiyotiğe direnç gösterebilen küçük koloni varyantlarını geliştirebileceğine rastlanmıştır. Ayrıca, dünya genelinde, özellikle kalçada çimentosuz implantların artan kullanımı, bu seçeneği sadece sınırlı sayıda hasta için mümkün kılmaktadır (Neut ve arkadaşları, 2005). Enfeksiyon oluşumunu azaltmak için tercih edilen diğer bir klinik uygulama olan antibakteriyel kaplamaların literatürde klinik olarak başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, uygulanan kapmalama tekniklerinin implantın mekanik özelliğini ve toksisitesini bozabildiği ve ayrıca osseointegrasyona zarar verebildiği ve daha fazla geliştirmesi gereken bir konu olduğu anlaşılmıştır (Gallo ve arkadaşları, 2014). Literatüre bakıldığı zaman biyofilm oluşumunu engellemek amacıyla gümüş kaplamanın en yaygın yöntem olduğu (Chernousova ve Epple, 2013) ancak gümüş iyonlarının toksisite özelliklerinden dolayı gümüş kaplı implantların rutin kullanımının sınırlandırıldığı gözlemlenmiştir (Hardes ve arkadaşları, 2010; Wafa ve arkadaşları, 2015). Hem biyofilm oluşumunu engellemek hem de osseointegrasyonu artırmak ortopedi alanında yapılan cerrahi uygulamalar için çok önemli yere sahiptir. Bu alanda daha çok çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3.Çözüm

Ortopedik implantların hastaya entegre edilmesi sonucunda görülebilen biyofilm oluşumunu engellemek öncelikli hedeftir. Biyofilm oluşumunu azaltmanın yanında osseointegrasyonun da artması hedeflenmiştir.

Yapılan tüm literatür araştırmaları sonrasında kolayca ilaç salınımı yapabilecek, implantın mekanik özelliğine zarar vermeyecek ve kolay uygulanabilir kaplama yöntemi olabilmesi için hidrojel kaplama yöntemi seçilmiştir. Hidrojeller su açısından zengin ve biyoyumlu yumuşak polimerik malzemelerdir. Oksijene, besin maddelerine ve metabolitlere karşı oldukça geçirgendirler. Bir kaplama olarak, hidrojeller düzenli katı yüzeylere birçok avantaj sağlar ve yüksek hidrofilitiklik, kayganlık, biyoyumluluk ve ilaç salınımı gibi özelliklere sahiptirler (Custódio ve arkadaşları, 2016; Deng ve arkadaşları, 2019). Bu doğrultuda üretilecek olan jel HPMC (Hidroksipropil metilselüloz) bazlı olup içerisinde gentamisin ve hyalüronik asit bulunacaktır.

Yarı sentetik bir selüloz türevi olan HPMC, toksik olmayan, kararlılığı, yapışabilirliği ve yeterli diğer mekanik özellikleri sayesinde doku mühendisliği iskele yapımında tercih edilen malzemeler arasında olmuştur (Escudero ve arkadaşları, 2010; Yang ve arkadaşları, 2020). Bunun yanı sıra, yüksek şişebilirliği, termal jelleşme özellikleri, tuz deşarj performansı, pH stabilitesi, su tutma, mükemmel film oluşturma özellikleri, enzimlere karşı geniş direnç, dispersiyon ve yapışma gibi birçok özelliği ve biyolojik olarak uyumlu polimer olduğundan dolayı ilaç salım sistemleri için önemli taşıyıcı malzeme olduğu gözlemlenmiştir (Joshi, 2011; Maderuelo ve arkadaşları, 2011; Appel ve arkadaşları, 2015). Çalışma sonucunda olumlu veriler elde edebilmek adına antibakteriyel özellik için gentamisin, kemik ve doku uyumu için ise hyalüronik asit kullanılacaktır. Çeşitli bakteriyel enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan bir antibiyotik olan gentamisin genellikle kemik enfeksiyonları ve pelvik inflamatuvar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Wilson, 2014). İmplant ameliyatları sonrasında insan vücudunda genellikle, Staphylococcus, Acinetobacter Baumannii, Enterobacter Cloacae, Klebsiella Pneumoniae, Pseudomonas Aeroginosa, Enterococcus Faecalis ve Proteus Mirabilis bakteri çeşitleri saptanmaktadır. Böylece gentamisinin bu bakterilere karşı bu çalışma için en uygun malzeme olduğu ön görülmüştür (GÜLTAC ve arkadaşları, 2017). Bununla birlikte hyalüronik asitin yara iyileşme sürecini modüle etmede benzersiz özelliklere sahip olduğu ve implantı çevreleyen doku çalışmalarında kemik onarımı ve rejenerasyonu için kullanıldığından dolayı osseointegrasyonu artırmak amacıyla kullanılması ön görülmüştür (Pitarresi ve arkadaşları, 2013; Zhai ve arkadaşları, 2020). Hyalüronik asit (HA), insan vücudunda her yerde bulunan biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polisakarittir ve tıbbi ürünler için otuz yılı aşkın bir süredir klinik olarak kullanıldığı gözlemlenmiştir (Necas ve arkadaşları, 2008). İçerisinde bulunan koronavirüs tehdidi nedeniyle laboratuvar çalışmaları yaz aylarına ertelenmiştir. Laboratuvarda çalışma yapılamadığı için jel de üretilmemiştir. Bu sebeple şu anda bir prototip bulunmamakla birlikte yaz aylarında bu prototipin oluşturulmuş olması hedeflenmektedir. Oluşturulacak jelin ameliyat öncesinde implant üzerinde yayılması sağlanacak olup bu sayede bahsedilen sorunlara içerisindeki maddelerle çözüm sunulmuş olacaktır.

4.Yöntem

Yapılan tüm literatür taramaları doğrultusunda, öncelikle ayrı ayrı Hyalüronik asit ve Gentamisin çözeltileri elde edilecek ve iyonik jelleşme tekniği kullanılarak Hyaluronik asit ve Gentamisin yüklü HPMC jeli hazırlanacaktır. Biyomedikal uygulamalar için Hyaluronik asit kullanımı,% 1 -% 3 arasında kullanılmasını gerektirir. Hyalüronik asidi çözebilmek için çözücü olarak su kullanılacaktır. Cam behere 98 g damıtılmış su ilave edilecektir. Bundan sonra, 2 g Hyalüronik asit içerisine eklenip, görünür topaklar kalmayana kadar yaklaşık 5 dakika karıştırma işlemi yapılacaktır. Hyalüronik asit çözeltisinin pH seviyesi, en sonunda elde edilecek hidrojelin pH seviyesine göre NaOH ve HCl ile kontrol edilecektir. Eş zamanlı olarak, 0,3 g Gentamisinin 100 ml saf su içinde çözünmesi için 1 dk boyunca karıştırma işlemi yapılacaktır. Böylece Hyalüronik asit ve Gentamisin çözeltileri hidrojele ilave edilmek için hazır olacaktır.

HPMC çözeltisini elde etmek için 100 ml damıtılmış kaynar suya (90-70 °C) 2g HPMC tozu azar azar eklenecek ve yavaş karıştırma işlemi yapılarak su içinde eritilecektir.

Hava baloncuklarının oluşumunu engellemek için karıştırma işlemi çok yavaş yapılacaktır. Daha sonra HPMC çözeltisi ocaktan alınıp manyetik karıştırıcı üzerinde içerisine yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan Hyalüronik Asit ve Gentamisin çözeltileri eklenip homojen çözelti elde etmek için manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 saniye boyunca karıştırma işlemi yapılacaktır. Ardından önceden HPMC oranına %0,5 oranla hazırlanan 100 mL poly(ethyleneimine) çapraz bağlayıcı eklenecektir. Burada poly(ethyleneimine) jelleşme süresinde jelin viskozitesini artırmak amacıyla kullanılacaktır. Hydroxypropyl Methylcellulose çözeltisinin sıcaklığı 60 °C'nin altına düştüğü zaman, sıvının viskozitesi yavaş yavaş artar ve daha sonra saydam ve aynı zamanda viskoz bir jel oluşmaya başlar. Böylece karıştırma işlemleri bittikten sonra jelleşme elde edebilmek için çözelti oda sıcaklığında soğumaya bırakılacak ve sonrasında 1 gece buzdolabında bekletilecektir. HPMC'nin geniş pH stabilitesi vardır ve yapılan çalışmalarda pH 3-13 aralığında stabilitesi garanti edilmiştir. Böylece HPMC çözeltisi için Hyaluronic Asit ve Gentamisine uygun pH değeri belirlenip pH'ını düşürmek için hidroklorik asit (HCl) veya yükseltmek için sodyum hidroklorür (NaOH) kullanılacaktır. Tüm bu aşamalar sonucunda jel elde edilmiş olacaktır.

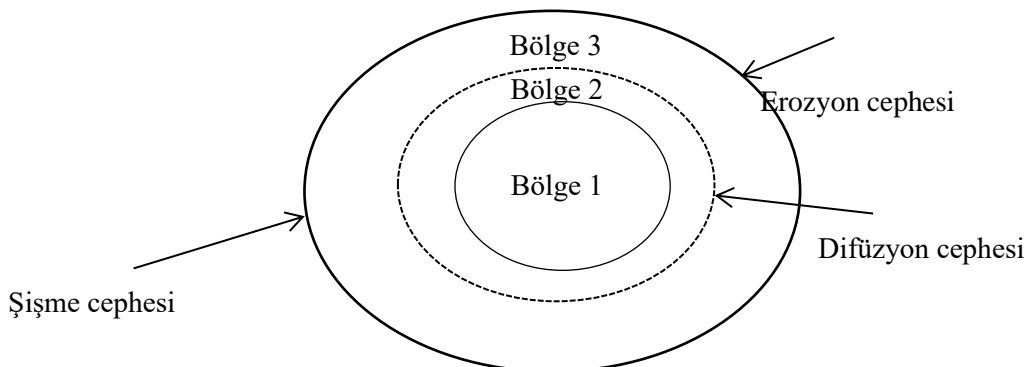
İlaç salınım sistemleri, istenen zamanlamaya uygun çeşitli salınım profilleri ile tasarlanabilir. Doku mühendisliği için yaygın salınım profilleri şunları içerir:

1. Sıfır Sıralı
2. Gecikmeli
3. Sürekli
4. Difüzyonlu (Siepmann et al., 2012)

Salınım profilleri öncelikle ilaç yükleme mekanizmaları tarafından kontrol edilir. İlaç, fiziksel birleşme yoluyla yüklenecektir ve tipik olarak, görünür difüzyon sabitinin biyomateryal ve ilaç arasındaki ilişkilere ve ayrılma sabitlerine bağlı olduğu bir difüzyon salınım profili izleyecektir.

Etkili ilaç salınım sistemlerine yönelik yaklaşımlar, ilacın belirli bir süre boyunca kontrollü bir hızda salındığı ve ilacın kanserli dokular gibi vücudun sadece hedeflenen bir bölgesinde aktif olduğu hedefli verilişte olduğu kontrollü salım formülasyonlarını içerir.

HPMC bir ilaç taşıyıcı olarak 1960'ların başından beri kullanılmaktadır. İyi sıkıştırma özellikleri, yeterli şişme özellikleri (şişme süresi ve kapasitesi), yüksek miktarda ilaç taşıyabilme kapasitesi ve toksik olmamasından dolayı HPMC projede tercih edilmiştir. Projemizde gentamisin'in HPMC bazlı jelden salınımı için difüzyon kontrollü salınım mekanizması kullanılacaktır.



Şekil 2: Radyal ilaç salımı sırasında şişebilen HPMC bazlı bir matris tabletin şematik gösterimi (kesit görünümü).

Bölge 1'de öncelikle katı halde HPMC bulunur. HPMC'nin suyla çözünmesi polimer zincirleri arasındaki bağların kuvvetini azaltacak ve şişmesine sebep olacaktır. İlaç difüzyon cephesi, katı (bölge 2) ve çözünmüş ilaç (bölge 3) arasındaki sınırdan oluşur. Bu nedenle, bu ön tarafta ilaç çözünmesi meydana gelir ve çözünmüş ilaç daha sonra erozyon cephesine doğru radyal yönde yayılır.

Siepmann ve peppas, yıllar boyunca geliştirilen HPMC tabanlı sistemler için matematiksel model türlerinin ayrıntılı bir incelemesini sunmuştur. Sistemin tasarlanmasında bu modellerden yararlanılacaktır.

HPMC bazlı farmasötik cihazlardan genel ilaç salım mekanizması, belirli bir uygulama sisteminin tasarımına (bileşim ve geometri) büyük ölçüde bağlıdır. Aşağıdaki fenomenler söz konusudur:

(i) İşlemin başlangıcında, polimer / su arayüzünde dik su konsantrasyonu gradyanları oluşur, bu da matris su emdirir. Bu süreci yeterince tanımlamak için,

(i) cihazın tam geometrisi;

(ii) silindir durumunda, kütle naklinin hem aksel hem de radyal yönü; ve

(iii) su difüzyon katsayısının matris şişme oranına önemli ölçüde bağımlılığı.

Kuru sistemlerde difüzyon katsayısı çok düşükken, yüksek oranda şişmiş jellerde saf sudakiyle aynı büyüklüktedir. Su plastikleştirici görevi görür ve sistemin cam geçiş sıcaklığını azaltır. Tg, sistemin sıcaklığına eşit olduktan sonra, polimer zincirleri camı olandan lastik haline geçer.

(ii) Suyun emilimi nedeniyle HPMC şişer, bu da polimer ve ilaç konsantrasyonlarında dramatik değişikliklere ve sistemin boyutlarının artmasına neden olur.

(iii) Su ile temas ettiğinde ilaç çözülür ve (konsantrasyon gradyanları nedeniyle) cihazdan dışarı yayılır.

(iv) Artan su içeriği ile ilacın difüzyon katsayısı önemli ölçüde artar.

(v) Suda çözünürlüğünün zayıf olması durumunda, çözünmüş ve çözünmemiş ilaç polimer matrisi içinde bir arada bulunur. Çözünmeyen ilaç difüzyon için mevcut değildir.

(vi) Yüksek başlangıç ilaç yüklemeleri durumunda, matrisin iç yapısı ilaç salımı sırasında önemli ölçüde değişir ve ilaç tükenmesi üzerine difüzyon için daha gözenekli ve daha az kısıtlayıcı hale gelir.

(vii) Kullanılan HPMC tipinin zincir uzunluğuna ve ikame derecesine bağlı olarak, polimerin kendisi az ya da çok hızla çözünür. Belirli durumlarda, örneğin polimer çözünmesi önemli hale gelmeden önce tüm ilaçların daha önce salınmış olması durumunda bu fenomen önemsizdir (Kiil and Dam-Johansen, 2003).

Ürünün ameliyat öncesi doktorlar tarafından uygulanacak şekilde tasarlanmasından dolayı, elde edilen jel steril ve ucu spatula şeklinde olan şırınga içerisinde sunulacaktır. Şırınga, Autocad çizim programında tasarlanıp ilk örneği Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği'nde 3B yazıcı kullanılarak üretilecektir.



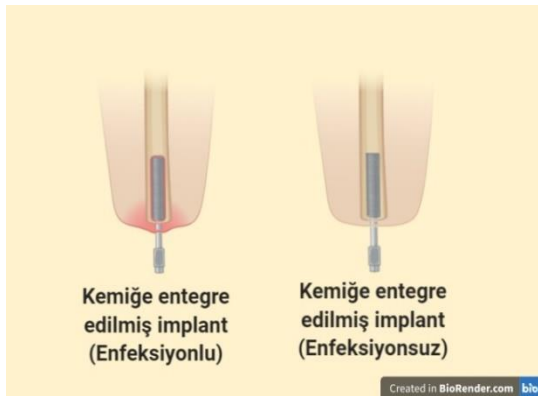
Şekil 3: Ürünün implant üzerine yayılması için kullanılacak şırınganın görsel tasarımı

Prototip elde edildikten sonra jelin başarısını test edebilmek amacıyla, MEDICAST şirketinden temin edilen ortopedik plaklar kullanılarak jel, sırayla sitotoksisite, reolojik karakterizasyon analizleri, immünoreaktivite ve genotoksisite testlerine tabi tutulacaktır. Testler için uygun koşullar sağlandığı takdirde Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği laboratuvarlarında gerçekleştirecek fakat uygun olmayan koşullar için hizmet satın alınacaktır. Söz konusu testlere ayrıntılı olarak uygulanabilirlik kısmında değinilmiştir. Test sonuçlarında karşılaşılabilecek olumsuz sonuçlar doğrultusunda risk yönetiminde belirtilen yöntemler ele alınarak jel üzerinde iyileştirmeler yapılacaktır.

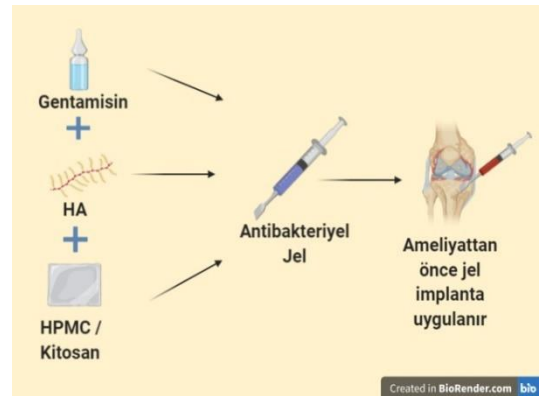
5.Yenilikçi (İnovatif) Yönü

İmplant ilişkili enfeksiyon oranları azalmasına rağmen implant kullanım sayısının artması ve bu implantlarla hastaların yaşam sürelerinin uzaması ve buna bağlı olarak geç ve hematogen enfeksiyonların görülme riskinin artması nedeniyle günümüzde enfekte implant görülme sıklığı artmaktadır (Gültaç ve arkadaşları, 2017).

- Ameliyattan sonra hastaya uzun süreli antibiyotik tedavisinin uygulandığı bilinmektedir. Öte yandan, çimentolu uygulamalarda antibiyotiklerin yüksek oranda kullanılması kemik çimentolarının basınç ve gerilme mukavemetini azaltır. Bu proje sayesinde ortopedik implant ameliyatlarından sonra oral yolla alınan ve çimentolu uygulamalarda kullanılan antibiyotik miktarı, jelde kullanılacak gentamisin nedeniyle sınırlı olacak veya hiç kullanılması gerekmeyecektir.



Şekil 4: Enfeksiyonlu ve enfeksiyonsuz implant örneklemesi



Şekil 5: Projenin nasıl hazırlanacağını örnek gösterimi

- Uygulama açısından ürünümüzün kullanımı kolaydır çünkü sadece ameliyattan hemen önce implant üzerine sürülmek suretiyle uygulanır.
- Jelde kullanılacak gentamisin ve hyalüronik asit kullanımı nedeniyle, doku ve entegre edilecek implantın kaynaşması kolaylaşacaktır.
- Hyalüronik asit ve kitosan, bakteriyel yapışmayı azaltma ve antibiyotik yüklemeye bile biyofilmin oluşumunu önleme yeteneğine sahiptir. Gentamisin ile birlikte kullanıldıklarında, birlikte maksimum etkiyi göstermeleri beklenir.
- Türkiye marketinde benzer bir ürün bulunmamaktadır. Jelimizin üretiminde kullanılan malzemelerin tümü de yerli malzemelerdir. Böylece ameliyatlar sonrasında oluşan enfeksiyon riski göz önünde bulundurulduğunda, ürünümüzün hem hastaların refahının artmasına hem de ülkemizin ekonomisine katkıda bulunacağından şüphe yoktur.

6.Uygulanabilirlik

Proje için kullanılacak olan malzemelerin temini:

- HPMC ve Hyalüronik Asit BMT Calsis Sağlık Teknolojileri Sanayi Ticaret A.Ş tarafından sağlandı.
- Gentamisin eczaneden temin edildi.
- Jelin üzerinde yaydırılacak olduğu plak MEDİCAST firması tarafından sağlandı.
- Çapraz bağlayıcı olarak kullanılacak poli(etilenimin) malzemesi ise Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölüm başkanı Prof. Dr. Serpil TAKAÇ tarafından sağlandı.
- Kitosan, Asetik Asit, HCl, NaOH ve kullanılacak olan araç-gereçler Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği bölümünden temin edilecek.



Şekil 6: Projede kullanılacak malzemeler

Projemiz laboratuvar ortamında, yukarıda belirttiğimiz yöntemler kullanılarak elde edilecektir ve sonrasında amacına uygun olup olmadığının anlaşılması için -aşağıda detaylarıyla bahsedilecek olan- gerekli testler uygulanacaktır. Projenin ilk örneği Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği bölümünde bulunan laboratuvarlarda elde edilecektir. İlk olarak yukarıda yöntem bölümünde belirtilen aşamalar uygulanacaktır. Böylece anti bakteriyel jel elde edilmiş olacaktır. Yukarıda bahsedilen malzemelerin tümünün yerli firmalardan tedarik edilmesi ürünümüzün yerli üretim olduğunu göstermektedir.

Biyoteknoloji, hastalıkların teşhisi için yöntemlerin değiştirilmesine ve geliştirilmesine ve biyokimya ve akıllı biyomateryaller gibi yeni tedavi tekniklerinin geliştirilmesine olanak sağlar. Bu amaçla endüstride, bir ürünün ticari olarak satışa sunulması için güvenlik testlerinin geliştirilmesi ve gerçekleştirilmesi gerekir.

Bilim ve teknolojiye sürekli gelişmeyle, hidrojeller gibi tıbbi malzemeler sitotoksisite, reolojik karakterizasyon analizleri, immünoreaktivite ve genotoksisite testi gibi testlere tabi tutulmalıdır (Vidal ve Granjeiro, 2017).

Gültaç ve arkadaşlarının çalışmasında ortopedik implant enfeksiyonları incelendiğinde en fazla izole edilen bakteri grubunun stafilokok grubu olduğu görüldü (%37.8). (Staphylococcusepidermidis (%13) en sık). İkinci en sık saptanan bakteri ise Acinetobacter Baumannii olduğu görüldü (%16). Diğer izole edilen bakteriler ise sıklık sırasına göre Enterobacter Cloacae 4 (%10), Klebsiella Pneumoniae 3 (%8.1), Pseudomonas Aeroginosa 2 (%5.4), Enterococcus Faecalis 2 (%5.4), Proteus Mirabilis 2 (5.4), Escherichia Coli 2 (%5.4), Bacillus Cereus 1 (%2.7) ve Pantoea Agglomerans 1 (%2.7) olarak saptandı. Böylece

yapılacak testlerde bu bakteri gruplarının kullanılması jelin aktivitesinin saptanması açısından yararlı olacaktır. Testler uygun koşullar sağlandığı takdirde Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği laboratuvarlarında gerçekleştirecek fakat uygun olmayan koşullar için hizmet satın alınacaktır.

6.1. Sitotoksisite Testi

Sitotoksisite testinde hücrelerin canlılığı ölçülür. Hücre canlılığı, bir örnekteki sağlıklı hücre sayısı olarak tanımlanır ve hücrelerin uygun koşullar altında hızlı bir şekilde hücre döngüsünü tamamlayarak çoğalması, zehirli ajanlara maruz kaldıktan sonra hücre hayatta kalması veya ölümü ile ilgili bazı genlerin, proteinlerin ve yolların etki mekanizmalarını anlamak için hayati bir göstergedir. Genel olarak, yaşayabilirliği belirlemek için kullanılan yöntemler hücre çoğalmasının tespiti için de yaygındır.

Hücre sitotoksisitesi ve proliferasyon deneyleri genellikle test moleküllerinin (oluşturacağımız jelin) hücre proliferasyonu üzerinde etkileri olup olmadığını veya doğrudan sitotoksik etkiler gösterip göstermediğini saptamak için taramasında kullanılır. Kullanılan hücre bazlı testin türü ne olursa olsun, deneyin sonunda kaç tane canlı hücrenin kaldığını bilmek önemlidir (Adan et al., 2016).

Üreteceğimiz hidrojelimiz için Calcein AM Testini kullanacağız. Calcein AM bozulmamış canlı hücrelere kolayca nüfuz eden, floresan olmayan, hidrofobik bir bileşiktir ve hücre canlılığını ve/veya sitotoksisiteyi ölçmek için basit, hızlı ve doğru bir yöntem sağlar. Veri elde etmek için MTT Testi gibi farklı sitotoksisite testleri de vardır. Herhangi bir olumsuz durumda, MTT gibi diğer seçenekleri de deneyebiliriz.

Bununla birlikte, farklı analizler test ajanı, hücre tipi ve kullanılan yönteme bağlı olarak farklı sonuçlara yol açabilir (Weyermann ve arkadaşları, 2005). Tüm bu olasılıkların dışında, olumsuz bir durumda bu testi gerçekleştirmek için hizmet de satın alabiliriz.

6.2. Genotoksisite Testi

Bu test, üreteceğimiz jelin kullanılmasından kaynaklanabilecek mutasyon veya kromozomal anormallik olasılığını değerlendirmek için bakteri ve somatik hücreler kullanılarak gerçekleştirilir. Klinik pratikte uygulanabilmesi için yeni tasarlanmış biyomalzemelerin sahip olması gereken temel özellik biyoyumlu olmalarıdır. Sitotoksisite testinin yanı sıra, genotoksisite ve mutajenite deneyleri biyoyumluluğun değerlendirilmesinde çok önemlidir. Genotoksisite/mutajenite, biyomedikal ve klinik uygulamalarda bazı biyomalzemelerin kullanımını tamamen devre dışı bırakabilen bir özelliktir, özellikle de malzeme uzun süreli kullanım için tasarlanmışsa. Genotoksisite, mutajenitenin yanı sıra, bir ajanın DNA'ya ve gen fonksiyonunu etkileyebilecek diğer rahatsızlıklara çeşitli zararlara neden olma özelliğini ifade eden daha geniş bir terimdir (Cvetković ve arkadaşları, 2018). Genotoksisite, biyomedikal materyallerin sistemik uyumluluğuna göre önemli bir faktördür, bu da mutajenite ve kanserojenlik ile sonuçlanabilecek bir DNA reaktif bileşenin varlığı anlamına gelir (Yin ve arkadaşları, 2009). ISO 10993, mukoza, kemik veya dentin dokuları ile 30 günden daha uzun süre temas edecek tüm materyallerin genotoksisite testine tabi tutulmasını şart koşar (ISO 10993, 1992). In vitro genotoksisite testi apoptoz ve DNA zincir kırılması açısından izlenir (Yin ve arkadaşları, 2009). Biz de üreteceğimiz hidrojele gentamisin yüklemesi nedeniyle kromozomal anormallikler veya mutasyonlar olup olmadığını inceleyeceğiz. Bu testte

kolorimetrik, floresan, elektrokemilüminesan veya diğer tespit yöntemleri kullanılabilir. Spesifik yöntem protokollerine bağlı olarak, immüno analizler birkaç saat veya iki güne kadar süren zaman aralıklarında gerçekleştirilebilir (Marian ve Seghezzi, 2013).

6.3.Reolojik Karakterizasyon Testi

Hidrojel, yüksek su tutma kapasitesine sahip hidrofilik polimer ağlarından oluşan bir malzeme sınıfıdır; şişme, geçirgenlik ve mekanik, yüzey ve optik özellikler gibi fiziksel özellikleri modüle edilebilir. Tıp alanında, biyo-uyumlu hidrojel, doku ikameleri, cerrahi yardımcıları ve ilaç taşıyıcıları olarak kullanım dahil olmak üzere geniş potansiyel uygulamalara sahiptir (Felix ve arkadaşları, 2005).

Genel olarak, jelasyona tabi tutulan malzeme sistemlerinin viskoelastik özellikleri, mikro yapılarını neredeyse hiç bozmadan reometri ile izlenebilir. Kitosan ve HPMC'den formüle edilen viskoz sıvıların karakterize edilmesinde reometri kullanılır (Weng ve arkadaşları, 2007). Çapraz bağlama kullanarak oluşturduğumuz jelimizin viskoelastik özelliklerini değerlendirmek ve ilaç yüklendiğinde oluşan stabiliteyi belirlemek için reolojik karakterizasyon testini kullanacağız.

6.4.Immunoreaktivite Testi

İmmünoanalizler klinik teşhis, biyofarmasötik analiz, çevresel izleme, güvenlik ve gıda testi gibi çeşitli biyoanalitik ortamlarda kritik bir rol oynamaktadır (Vashist ve Luong, 2018). İmmünoanalizler, biyolojik tanıma maddesi olarak bir antikor veya bir antijenin kullanılması yoluyla, bir çözeltide küçük moleküllerden makromoleküllere kadar değişen analitlerin varlığını veya konsantrasyonunu ölçen oldukça seçici bir biyoanalitik yöntemdir (Ju ve arkadaşları, 2017). İmmünoanalizler, sahada ve laboratuvarında belirli molekülleri tespit etmek için kullanılabilen hızlı ve doğru testlerdir ve bir antikorun, bir molekülün spesifik yapısına bağlanma özelliğine dayanır. Antikorlar, yabancı bir molekülün (antijen) vücuda girmesine yanıt olarak hayvanlar tarafından üretilen proteinlerdir. Antikorlar kan ve doku sıvılarında bulunur ve her karşılaştığında antijene bağlanır. ELISA son derece yüksek hassasiyet, özgüllük, kesinlik ve verimi sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ELISA'nın biyoanalitik performansı, daha iyi antikor immobilizasyon kimyası, ultra hassas enzim substratlarının geliştirilmesi, mikromateryal veya nanomateryal bazlı sinyal geliştirme stratejileri ve yeni immünoanaliz kavramları ile önemli ölçüde örtüşmesi, yapılan testlerin iyileşmesinde önemli ölçüde etkili olmuştur (Luppa ve arkadaşları, 2001; Vashist ve Luong, 2018). Hidrojellerimiz için immünoreaktiviteyi tanımlamak için ELISA yöntemini kullanacağız.

Yukarıda bahsedilen testlerden olumlu sonuçlar elde edildiği takdirde, projemizin teknolojik bir ürün olarak uygulanabilirliğinde mevcut risklerin varlığını tespit edebilmek adına öncelikle Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumuna bağlı olan klinik araştırmalar etik kuruluna başvurulması hedeflenmektedir. Böylece gerekli onay alınması durumunda in vivo olarak hayvanlar üzerinde jel test sürecine tabi tutulacaktır.

Daha sonra bu doğrultuda 19.01.2005 tarihli ve 25705 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği kapsamında gerekli belgelendirmeleri yapıp ürün ruhsat başvurusunda bulunduktan sonra, projemizi en fazla 5 yıl içerisinde ticari bir ürün olarak piyasaya sunmayı hedefliyoruz.

7.Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

7.1.Malzeme Listesi

Gentamisin	Manyetik Karıştırıcı
HPMC (Hidroksipropil Metil Selüloz)	Santrifüj
Hyalüronik Asit	Isıtıcı
Kitosan	Soğutucu
Poli(etilenimin) (PEI)	NaOH / Hidroklorik asit veya Asetik Asit
Saf Su	

7.2.Bütçe ve Maliyet Tablosu**

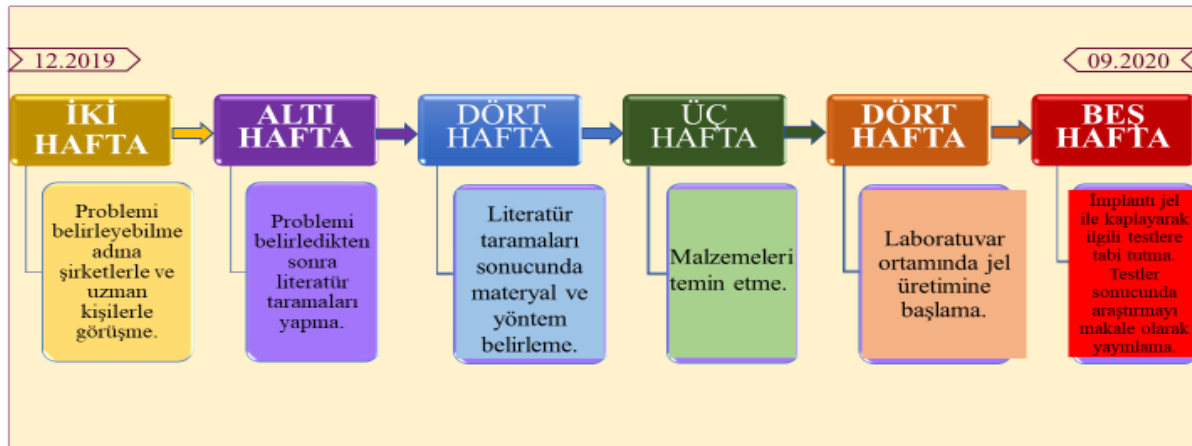
Tablo 1. Maliyet ve bütçe tablosu

Malzeme	Paket Fiyatı	Kullanılacak Miktara Göre Fiyatı
HPMC	34 TL (1 kg)	0.68 TL (2gr)
Kitosan	40,50 TL (100 gr)	0.0405 TL (0.1 gr)
Gentamisin	16,61 TL (300 mg)	4,43 TL (80 mg)
NaOH	12 TL (250 gr)	*
Polyethyleneimine Solution	638,98 (200 mL)	319,49 TL (100 mL)
Hyaluronic Acid	1114,5 TL (10 mg)	222,9 TL (2 mg)
HCl	30 TL (1 kg)	*
TOPLAM	1886,59 TL	547,5 TL

*Gerektiği takdirde damla damla eklenerek pH ayarlaması için kullanılacaktır.

**Şekil 2.'de verilen proje takvimin göre 7-15 Mart tarihleri arasında temin edilmek üzere harcama yapılması planlandı.

7.3.Zaman Planlaması



Şekil 7: Proje Takvimi

Proje takviminde malzeme temini aşamasından sonra laboratuvar ortamında jel üretimine başlanacaktı. Fakat araya giren korona virüs tehlikesi nedeniyle bu süreci yaz ayında devam ettirme kararı alındı. Şu an proje takvimine göre malzemeler temin edilmiş olup jel üretimi için beklenmektedir.

NOT: Türkiye piyasasında benzer ürün bulunmadığı için maliyet karşılaştırması yapılamamıştır.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

AKI Anti-Jel omuz, kalça veya diz artroplastisi (kısaca ortopedik implant) ameliyatı olacak hastalarda enfeksiyonu önlemek amacıyla ameliyat sırasında doktorlar tarafından kullanılacak şekilde tasarlanmıştır. Böylece genel olarak bu projenin hedef kitle ortopedi ve travmatoloji doktorlarıdır.

9. Riskler

Tablo 2: Ortaya Çıkabilecek Problemler ve B Planı

Ortaya Çıkabilecek Problemler	B Planı
Elde edilen HPMC bazlı jelin kullanım amacına uymaması	HPMC malzemesi yerine Kitosan kullanılacaktır.
Uygulama yönteminin uygun olmaması	Bu durumda implanta jeli yaymak için yeni bir spatula tasarımı yapılacaktır.
Elde edilen jelin, uygulanacak implant ile yüzey uyumunun sağlanamaması	Yüzey uyumunu artırmak için thiol-ene click kimyası kullanılacaktır.

9.1. İş- Zaman Çizelgesi

Tablo 3: İş paketlerinin isimleri, hedefleri ve zaman aralıkları

İP NO	İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Zaman Aralığı
1	Jelin muhafaza edileceği şırınganın tasarlanıp 3B yazıcıda üretilmesi ve sterilizasyonu.	5 gün
2	Hyalüronik Asit ve Gentamisin çözeltilerinin elde edilmesi.	3 gün
3	Elde edilen çözeltilerin HPMC ile birleştirilmesiyle jelin elde edilip daha sonra şırınga içerisine eklenerek prototipin elde edilmesi.	10 gün
4	Medicast Şirketinden temin edilen protez plakları üzerinde jelin salınımının gerçekleştirilmesi ve jelin antibakteriyel davranışlarının laboratuvar ortamında test edilmesi.	30 gün

9.2. Olasılık ve Risk Değerlendirme Matrisi

Tablo 4. Mevcut risk değerlendirme matrisi

	TEHLİKE	RİSK	OLASILIK	ŞİDDET	Mevcut Risk Değerlendirmesi (Olasılık x Şiddet)
1	Elde edilen HPMC bazlı jelin kullanım amacına uymaması	Jelin vücut içinde istenen düzeyde istikrarlı kalamaması ve istenen anti bakteriyel etkiyi sağlamaması	Yüksek Olasılık (3)	Yüksek Şiddet (4)	Orta Derece Risk (12)
2	Uygulama yönteminin uygun olmaması	Uygulama esnasında kullanılacak olan şırınganın ürünü istendiği gibi yaymaması ve böylece ürünün verimini azaltması.	Düşük Olasılık (2)	Orta Derece Şiddet (4)	Orta Derece Risk (8)
3	Elde edilen jelin, uygulanacak implant ile yüzey uyumunun sağlanamaması	Yüzey modifikasyonu olmadığı için jelin implantın yüzeyinden kayması ve istenen etkiyi sağlayamaması	Orta Derece Olasılık (3)	Yüksek Şiddet (4)	Orta Derece Risk (12)

10. Proje Ekibi

Takım Lideri: Işıl YAZGAN

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Işıl YAZGAN	Alanında uzman kişilerle irtibata geçmek, literatür taramaları yapmak, malzeme temini sonrası laboratuvar ortamında etkin olarak çalışıp ürünü ortaya çıkarmak.	Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği 4. Sınıf	4. Sınıf bitirme projesini bu konu üzerine tamamladım. Ortopedik implant satışı yapan bir firmada çalıştım. Biyomalzeme, Polimer Mühendisliği, Biyokimya, Biyoteknoloji ve Farmasötik, İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi, Doku Mühendisliği, Kontrollü Salım Sistemleri ve İlaç Hedefleme derslerinde hem teorikte hem de uygulamada aktif olarak yer aldım.

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Kübranur ÖNER	Proje fikrinin oluşma sürecinde alanında uzman kişilerle irtibata geçmek, literatür taraması yapmak, malzeme temini yapmak, temin edilen malzemeler ile laboratuvar çalışması ile ürünün ortaya çıkmasına katkı sağlamak	Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği 4.Sınıf	4.sınıf bitirme projemi bu konu üzerine yaptım. Ortopedik implant satışı yapan bir firmada çalıştım. Biyomalzeme, Polimer Mühendisliği, Biyokimya, Biyoteknoloji ve Farmasötik, İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi, Doku Mühendisliği, Kontrollü Salım Sistemleri ve İlaç Hedefleme derslerinde hem teorikte hem de uygulamada aktif olarak yer aldım.
Aylin Mustafa	Proje fikrini oluşturmada alanında uzman kişilerle irtibata geçmek ve bu doğrultuda literatür taraması yapmak, malzeme temin etmek ve laboratuvar ortamında ürünü ortaya çıkmasında katkıda bulunmak.	Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği 4. Sınıf	Bu konu üzerinde bitirme projemi tamamladım. Ortopedik implant satışı yapan bir firmada yarı zamanlı çalıştım. Biyomalzeme, Polimer Mühendisliği, Biyokimya, Biyoteknoloji ve Farmasötik, İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi, Doku Mühendisliği, Kontrollü Salım Sistemleri ve İlaç Hedefleme derslerinde hem teorikte hem de uygulamada aktif olarak yer aldım.

11.Kaynaklar

- Adan A., Kiraz Y., Baran Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(14):1213-1221. Doi: 10.2174/1389201017666160808160513.
- Appel EA, Tibbitt MW, Webber MJ, Mattix BA, Veisoh O, Langer R (2015). Self-assembled hydrogels utilizing polymer–nanoparticle interactions. *Nat Commun* 6: 6295. doi:10.1038/ncomms7295.
- Chernousova S, Epple M (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:1636–53. doi: 10.1002/anie.201205923.
- Custódio CA, Reis RL, Mano JF (2016). Photocrosslinked Laminarin based hydrogels for biomedical applications. *Biomacromolecules* 17 (5): 1602-1609. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01736.
- Cvetković V., Miladinov D.T., Stojanovic S. (2018). Genotoxicity and Mutagenicity Testing of Biomaterials. *Biomaterials in Clinical Practice* , pp.501-527. DOI: 10.1007/978-3-319-68025-5_18.

- Deng Z, Wang H, X. Ma P, Guo B (2019). Self-healing conductive hydrogels: preparation, properties and applications. *Nanoscale* 1224-1246. DOI: 10.1039/c9nr09283h.
- Diefenbeck M, Mückley T, Hofmann GO (2006). Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of Antibiotics. *Injury* 37 Suppl 2: S95-104. doi: 10.1016/j.injury.2006.04.015.
- Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI (2003). Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand* 74: 644-51. doi: 10.1080/00016470310018135.
- Escudero JJ, Ferrero C, Jiménez-Castellanos MR (2010). Compaction properties, drug release kinetics and fronts movement studies from matrices combining mixtures of swellable and inert polymers. II. Effect of HPMC with different degrees of methoxy/hydroxypropyl substitution. *International Journal of Pharmaceutics* 387(1-2): 56–64. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.12.001.
- Felix, L.; Hernandez, J.; Arguelles-Monal, W. M.; Goycoolea, F. M. (2005). Kinetics of gelation and thermal sensitivity of N-isobutryl chitosan hydrogels. *Biomacromolecules*. 6, 2408-2415.
- Gallo J, Holinka M, Moucha CS (2014). Antibacterial Surface Treatment for Orthopaedic Implants. *Int J Mol Sci* 15(8): 13849–13880. doi: 10.3390/ijms150813849.
- Gültaş E., Kılınç C.Y., Açıkan A.E., Aydoğan N.H. (2017). Ortopedik İmplant Enfeksiyonlarında İzole Edilen Bakteri Çeşitliliği ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi* ;4(3):19-20.
- Hardes J, von Eiff C, Streitbuenger A, Balke M, Budny T, Henrichs MP, Hauschild G, Ahrens H (2010). Reduction of periprosthetic infection with silver-coated megaprotheses in patients with bone sarcoma. *J Surg Oncol* 101(5): 389–95. doi: 10.1002/jso.21498.
- Hayes JS, Richards RG (2010). The use of titanium and stainless steel in fracture fixation. *Expert Rev Med Devices* 7(6): 843–853. doi: 10.1586/erd.10.53.
- Joshi SC (2011). Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release. *Materials* 4(10): 1861-1905. doi: 10.3390/ma4101861
- Ju, H., Lai, G., & Yan, F. (2017). Introduction. *Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers*, 1–30. doi:10.1016/b978-0-08-101999-3.00001-3.
- Kiil S., Dam-Johansen K. (2003). Controlled drug delivery from swellable hydroxypropylmethylcellulose matrices: model-based analysis of observed radial front movements. *Journal of Controlled Release*. Volume 90, Issue 1, Pages 1-21. doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00122-6
- Liu, Y., Hou, W., Sun, H., Cui, C., Zhang, L., Jiang, Y., ... Tan, W. (2017). Thiol–ene click chemistry: a biocompatible way for orthogonal bioconjugation of colloidal nanoparticles. *Chemical Science*, 8(9), 6182–6187. doi:10.1039/c7sc01447c.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*. *Clinica Chimica Acta*, 314(1-2), 1–26. doi:10.1016/s0009-8981(01)00629-5.

Maderuelo C, Zarzuelo A, Lanao JM (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J Control Release* 154(1): 2-19. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.04.002.

Marian M., Seghezzi W. (2013). Novel Biopharmaceuticals. In book: *Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars, Vaccines and Specialty Biologics*, pp.97-137. DOI: 10.1016/B978-0-12-394810-6.00004-6

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 53(8): 397–411. DOI: 10.17221/1930-VETMED

Neut D, Hendriks JG, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ (2005). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and slime excretion on antibiotic-loaded bone cement. *Acta Orthop* 76(1): 109-114. doi: 10.1080/00016470510030427.

Pitarresi G, Palumbo FS, Calascibetta F, Fiorica C, Stefano MD, Giammona G (2013). Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. *International Journal of Pharmaceutics* 449(1): 84-94. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.059.

Romanò CL, Tsuchiya H, Morelli I, Battaglia AG, Drago L (2019). Antibacterial coating of implants: are we missing something? *Bone Joint Res* 8(5): 199–206. doi: 10.1302/2046-3758.85.BJR-2018-0316.

Siepmann J., Siegel R.A., Rathbone M.J. (2012). *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. New York: Springer US.

Vashist S.K., Luong J.H.T. (2018). Immunoassays: An Overview. In: Sandeep K. Vashist, John H.T. Luong, editors. *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances and Applications*. 1st ed. Cork, Ireland: Academic Press, pp.1-3

Vidal M.N.P., Granjeiro J.M. (2017). Cytotoxicity Tests for Evaluating Medical Devices: An Alert for Development of Biotechnology Health Products. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 10(09):431-443. DOI: 10.4236/jbise.2017.109033

Wafa H, Grimer RJ, Reddy K, Jeys L, Abudu A, Carter SR, Tillman RM (2015). Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients: case-control study. *Bone Joint J* 97: 252–7. DOI: 10.1302/0301-620X.97B2.34554.

Weng L¹, Chen X, Chen W. (2007). Rheological Characterization of in Situ Crosslinkable Hydrogels Formulated from Oxidized Dextran and N-Carboxyethyl Chitosan. *Biomacromolecules*. 8(4):1109-15. DOI:10.1021/bm0610065

Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376.

Wilson DN (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 12(1): 35-48. doi: 10.1038/nrmicro3155.

Yang J, Sun X, Zhang Y, Chen Y (2020). The application of natural polymer based hydrogels in tissue engineering. Pages 273-307. doi: 10.1016/B978-0-12-816421-1.00010-0.

Yin L¹, Zhao X, Cui L, Ding J, He M, Tang C, Yin C. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of superporous hydrogel containing interpenetrating polymer networks. *Food Chem Toxicol.* 47(6):1139-45. doi: 10.1016/j.fct.2009.01.043.

Zhai P, Peng X, Li B, Liu Y, Sun H, Li X (2020). The Application of Hyaluronic Acid in Bone Regeneration. *Int J Biol Macromol* 151: 1224-1239. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169.