

**TROMBİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MOLEKÜLER
BASKILANMIŞ MİKROKRİYOJELLER**

**MOLECULAR IMPRINTED MICROCRYOGELS FOR
THROMBIN PURIFICATION**

MERVE ASENSA ÖZBEK

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

TROMBİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ MİKROKRIYOJELLER

Merve Asena ÖZBEK

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Haziran 2024, 114 sayfa

Protein saflaştırma alanı, proteinlerin yapısal ve işlevsel özelliklerini anlamak ve hücre ve doku içerisindeki rollerini açıklayabilmek için çok gerekli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde yaşam bilimlerindeki gelişmelerle birlikte protein saflaştırılması, biyoteknoloji endüstrisinde temel basamak olan protein üretimi gibi belirli uygulamalarda önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla protein saflaştırma alanında düşük maliyetli, kolay ve verimli saflaştırma yöntemlerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında, sağlık alanında önemli bir yere sahip trombinin yüksek saflıkta, tek basamakta ve düşük maliyetli bir şekilde elde edilmesi için uygun polimerik malzemeler hazırlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada, seçiciliği yüksek ve tekrar kullanıma imkan sağlayan, birçok alanda bu üstün özellikleri dolayısıyla tercih edilen moleküler baskılama yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca büyük gözenek boyutlarına sahip, esneklik, kısa difüzyon yolu, iyi biyouyumluluk ve yüksek mekanik dayanıklılık gibi eşsiz özellikleri olan mikro ölçeğinde mikrokriyojeller sentezlenmiştir. Tez

çalışması kapsamında, hazırlanan bu polimerik malzemelerin söz konusu protein olan trombinin biyoayırma ve saflaştırma işlemlerindeki etkinliği araştırılmıştır.

Tez çalışmasının ilk basamağında, lazer uygulaması ile mikrokriyojellerin sentezleneceği 400-650 µm aralığında farklı boyutlara sahip mikrostensil kalıplar oluşturulmuştur. Aminoasit temelli fonksiyonel monomer olan N-Metakriloil-(L)-glutamik asit sentezlenmiştir. Daha sonraki adımlarda, mikrostensil kalıplar kullanılarak farklı oranda içeriklere sahip trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokriyojeller sentezlenmiştir. Mikrokriyojellerin karakterizasyon çalışmaları mikro bilgisayarlı tomografi (µCT), taramalı elektron mikroskobu (SEM), optik mikroskop, yüzey alanı ölçümleri (BET analizleri) ve şişme testi ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Trombin adsorpsiyonuna etki eden pH, sıcaklık, başlangıç derişimi, iyonik şiddet, adsorpsiyon süresi gibi çeşitli parametreler taranarak adsorpsiyon-desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiş olup ayrıca belirlenen yarışmacı ajanlar ile mikrokriyojellerin seçiciliği incelenmiştir. Trombinin saflığı hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrokriyojeller, Afinite kromatografisi, Moleküler baskılama, Trombin, Protein saflaştırma.

ABSTRACT

MOLECULAR IMPRINTED MICROCRYOGELS FOR THROMBIN PURIFICATION

Merve Asena ÖZBEK

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

June 2024, 114 pages

The field of protein purification appears as a very necessary method to understand the structural and functional properties of proteins and to explain their roles in cells and tissues. Nowadays, with the developments in life sciences, protein purification plays an important role in certain applications such as protein production, which is a basic step in the biotechnology industry. Therefore, the need for low-cost, easy and efficient purification methods in the field of protein purification is increasing.

In the presented thesis study, suitable polymeric materials were prepared to obtain high purity, single-step and low-cost thrombin, which has an important place in the field of health. For this purpose, the molecular imprinting method, which is highly selective and allows reuse and is preferred in many areas due to its superior properties, was used in the study. Additionally, micro-scale microcryogels with large pore sizes and unique properties such as flexibility, short diffusion path, good biocompatibility and high

mechanical strength have been synthesized. Within the scope of the thesis study, the effectiveness of these prepared polymeric materials in the bioseparation and purification processes of the protein in question, thrombin, was investigated.

In the first step of the thesis, microstencil array chips with different sizes in the range of 400-650 μm were created with laser application, from which microcryogels would be synthesized. N-Methacryloyl-(L)-glutamic acid, an amino acid-based functional monomer, was synthesized. In the next steps, thrombin imprinted and non-imprinted microcryogels with different contents were synthesized using microstencil array chips. Characterization studies of microcryogels were accomplished with micro-computed tomography (μCT), scanning electron microscope (SEM), optical microscope, surface area measurements (BET analyses) and swelling test measurements. Adsorption, desorption and reusability studies were carried out by scanning various parameters affecting thrombin adsorption such as pH, temperature, initial concentration, ionic strength, adsorption time, and the selectivity of microcryogels was also examined with the determined competitive agents. The purity of thrombin was evaluated by fast protein liquid chromatography (FPLC).

Keywords: Microcryogels, Affinity chromatography, Molecular imprinting, Thrombin, Protein purification.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca her türlü olanağı sağlayan, bilimsel katkılarını ve maddi manevi desteğini hiç esirgemeyen, bu güzel ailenin bir parçası olmama fırsat tanıyan, bilgi birikimi ve tecrübesinden her aşamada faydalandığım ve öğrencisi olmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Bizlerden güler yüzünü hiç eksik etmeyen, güzel enerjisiyle mutluluk aşıl原因an, her daim ihtiyacım olan motivasyonu bulduğum, mütevazı kişiliği ile kendime örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e,

Geldiğim ilk günden beri buraya daha kolay adapte olmamda hep yardımcı olan, sadece ders ve deneysel çalışmalarımda değil her anlamda desteğini gördüğüm, bana her daim yol gösteren, hayatımda hep var olacak kalbi güzel kendi güzel değerli hocam Prof. Dr. Nilay Bereli'ye,

Çalışmalarım sırasında her soruma sabır ve içtenlikle cevap veren, hep yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Deniz Türkmen'e,

Tez çalışmama verdikleri katkılardan dolayı değerli jüri üyelerime,

Keşke çok daha önce tanışaydım dediğim, birçok kişinin hayatına dokunduğu gibi benden de hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, bulunduğu ortama aile sıcaklığı katan, akademik yolculuğa ek olarak hayata dair de çok şey öğrendiğim değerli hocam Prof. Dr. Lokman Uzun'a,

Tanıştığımız günden beri bende çokça emeği olan, beraber çalışma fırsatı bulduğum için çok şanslı hissettiğim, gerçek anlamda konu fark etmeksizin her başım sıkıştığında koştuğum ve her defasında aynı sabır, hoşgörü ve samimiyetle bana rehberlik eden değerli Hocam Doç. Dr. Erdoğan Özgür'e,

Her anlamda daima desteğini gördüğüm, iyi niyeti ve sevecenliğiyle güzel dileklerinin hep benimle olduğunu bildiğim, beni asla yalnız hissettirmeyen değerli hocam Doç. Dr. Canan Armutcu Çorman'a,

Doktora sürecim boyunca birlikte çokça güldüğüm, çok güzel anılar biriktirdiğim, birbirimize hep destek olduğumuz sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Merve Çalışır ve Muhammed Erkek'e,

Hepsinden ayrı ayrı çok şey öğrendiğim ve aralarında olmaktan mutluluk duyduğum değerli Bioreg ailesi üyelerine,

Geç bulup erken kaybetmek istemediğim, konuşmadan aynı düşünceye sahip olduğumuzu bildiğim, nerede kaldıysak oradan devam edeceğimize inandığım gönülden destekçim Tunca Karasu'ya,

Yolumuz kesiştiği için çokça mutluluk duyduğum, beraber gülüp beraber ağladığım, samimiyetlerinden bir an olsun şüphe duymadığım güzel kızlarım Burcu Akar ve Sena Pişkin'e,

Başarılarıyla gurur duyduğum Ahmet Burak Berk ve Buğra Kağan Ünal'a,

Doktora çalışmalarım boyunca bana destek sağlayan, bursiyeri olduğum 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve 100/2000 YÖK Doktora Bursu Programı kapsamında Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı'na (YÖK),

Hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, her koşulda karşılıksız hem çok sevip hem çok sevildiğim, yaptıklarının karşılığını hiçbir zaman tam olarak ödeyemeyeceğim, bugünlerin asıl mimarları olan canım anneme, canım babama ve olmasaydı ne yapardım dediğim, kullandığım mikrostensil kalıplar konusunda yaşadığım sıkıntıda dahi kritik müdahalesi ile tez çalışmamda yadsınamaz katkısı olan, "iyi ki"lerin en büyüğü, canım kardeşim Anıl'a,

Mesleği gereği yaşadığı tüm zorluklara rağmen kendi sıkıntılarını unutup benim derdimi kendine dert edinen, bu süreçte çokça fedakarlıkla sınanmamıza rağmen en uzaklardan bile her şeye yetişen, varlığı her daim güç veren, bana benden çok inanan, en iyi arkadaşım, canım eşim Mehmet'e,

Teşekkürlerimi sunarım.

Merve Asena Özbek

Haziran 2024, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Trombin	3
2.2. Proteinlerin Saflaştırılması	3
2.3. Protein Saflaştırma Teknikleri	9
2.3.1. Tuz Çöktürmesi.....	9
2.3.2. Diyaliz.....	9
2.3.3. Elektroforez	9
2.3.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi	10
2.3.5. İyon Değişim Kromatografisi	11
2.4. Afinite Kromatografisi.....	12
2.4.1. Afinite Kromatografisinin Güncel Uygulamaları	14
2.4.2. Afinite Kromatografisinde İmmobilizasyon Teknikleri	15
2.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	18
2.5.1. Moleküler Baskılama Tekniği	19
2.5.2. Moleküler Baskılama Tekniğinin Temel Bileşenleri.....	20
2.5.2.1. Kalıp Molekül	20
2.5.2.2. Fonksiyonel Monomerler.....	20
2.5.2.3. Çapraz Bağlayıcılar.....	21
2.5.2.4. Çözücüler	23
2.5.3. MIP'ler İçin Sentez Stratejileri	23
2.5.3.1. Kovalent Baskılama.....	23

2.5.3.2. Yarı Kovalent Baskılama	24
2.5.4. MIP'lerin Performanslarının Değerlendirilmesi	24
2.6. Kriyojeller	26
2.6.1. Kriyojellerin Sentezi ve Fiziksel Özellikleri	27
2.6.2. Kriyojellerin Fiziksel Özelliklerine Etki Eden Parametreler	29
2.6.2.1. Sıcaklığın Etkisi	29
2.6.2.2. Soğutma Hızının Etkisi	29
2.6.2.3. Ön Polimer Çözeltilisinin Etkisi.....	30
2.6.3. Mikrokriyojeller	32
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	36
3.1. Kimyasal Malzemeler	36
3.2. Moleküler Baskılanmış Mikrokriyojellerin Sentezi	36
3.2.1. Mikrostensil Kalıpların Tasarımı ve Üretimi	36
3.2.2. N-Metakriloil-(L)-glutamik asit (MAGA) monomerinin sentezi.....	37
3.2.3. Ön Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması	39
3.2.3. Trombin Baskılanmış Mikrokriyojellerin Hazırlanması	40
3.2.4. Karakterizasyon Çalışmaları	41
3.2.4.1. Yüzey Morfolojisi	41
3.2.4.2. Bilgisayarlı Mikrotomografi (μ CT) Analizi.....	42
3.2.4.3. Yüzey Alanı Ölçümleri	42
3.2.4.4. Mikrokriyojellerin Şişme Davranışları.....	42
3.2.4.5. Mikrokriyojellerin Jelleşme Verimleri.....	43
3.3. Adsorpsiyon Çalışmaları	43
3.4. Matematiksel Analizler	44
3.5. Seçicilik Çalışmaları	45
3.6. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi.....	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. Ön Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	47
4.2. Mikrokriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları	48
4.2.1. Yüzey Morfolojisi	48
4.2.2. Mikrokriyojellerin Fiziksel Karakterizasyon Çalışmaları.....	59
4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları	60
4.3.1. pH Etkisi.....	60

4.3.2. Sıcaklık Etkisi	61
4.3.3. İyonik Şiddet Etkisi	62
4.3.4. Etkileşim Süresinin Etkisi.....	63
4.3.5. Derişim Etkisi	64
4.3.6. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları.....	66
4.4. Adsorpsiyon İzotermeleri ve Kinetik Analizler.....	67
4.5. Seçicilik Çalışmaları	74
4.6. Kromatografik Analizler.....	75
5. YORUM	77
6. KAYNAKLAR	80
EKLER	100
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	100
EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	100
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Trombinin iki ekzositinin (turuncu renkli) ve aktif bölgesinin (mavi renkli) gösterildiği yüzey temsili [11].	4
Şekil 2.2.	Pıhtılaşma kademesine genel bakış. Çok adımlı intrinsik (sol) ve ekstrinsik yolağın (sağ) diyagramı. Şekil, hemostatik ajanların, mekanik ve yapışkan hemostatların pıhtılaşma kademesinde rollerini nerede sergilediğini göstermektedir [20].	5
Şekil 2.3.	Afinite kromatografisinin açık/kapalı modunda başvuru (a) örnek uygulama/yıkama adımları ve (b) elüsyon yöntemleri [57].	13
Şekil 2.4.	Afinite kromatografisinin rutin olarak uygulandığı alanlar [57].	15
Şekil 2.5.	Afinite kromatografisinde immobilizasyon teknikleri [57].	16
Şekil 2.6.	Moleküler baskılanmış polimer hazırlama prosedürünün şematik gösterimi [82].	19
Şekil 2.7.	Kriyojelasyon sürecinin şematik gösterimi [125].	27
Şekil 2.8.	Kriyojeller çeşitli şekil, boyut ve formatlarda üretilebilir. (A) Küre, disk, levha, monolit ve enjekte edilebilir olmak üzere farklı şekil ve boyutlardaki kriyojellerin şematik gösterimi. (B) Monolit, disk, levha ve farklı boyutlardaki küreler şeklinde sentezlenen kriyojellerin dijital görüntüleri [148].	33
Şekil 2.9.	Mikrokriyojellerin üretim aşamalarının gösterimi. (a) Polimer çözeltisi karıştırıldıktan sonra mikro oyuklara sahip kalıba aktarılır, (b) Kriyojelasyon işlemi yapılır, (c) Liyofilize işlemi gerçekleştirilir, (d) Birbirine bağlanmış üç boyutlu makro gözenekli ağa sahip mikrokriyojeller toplanır [150].	35
Şekil 3.1.	Lazer ile farklı boyutlarda hazırlanmış mikrostensil kalıplar.	37
Şekil 3.2.	N-Metakrilolil-(L)-glutamik asit (MAGA).	38
Şekil 3.3.	p(HEMA-MAGA) mikrokriyojeller [151].	39
Şekil 4.1.	Ön polimerizasyon komplekslerinin spektrofotometre sonuçları. Kompleks 1: Trb:MAGA, 1:1; Kompleks 2: Trb:MAGA, 1:2; Kompleks 3: Trb:MAGA, 1:3; Kompleks 4: Trb:MAGA, 1:5; Kompleks 5: Trb:MAGA, 1:10; Kompleks 6: Trb:MAGA, 1:15.	47

Şekil 4.2.	Trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokriyojellerin SEM görüntüleri. (A-G) MIP 1-7, (H) NIP 1.	49
Şekil 4.3.	Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin SEM görüntüleri. (A) MIP 7, (B) MIP 6, (C) MIP 4.....	53
Şekil 4.4.	Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin optik mikroskop görüntüleri. (A) MIP 7, (B) MIP 6, (C) MIP 4.	54
Şekil 4.5.	Trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokriyojellerin Micro-CT görüntüleri. (A-G) MIP 1-7, (H) NIP 1.	55
Şekil 4.6.	pH'ın trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, T: 25°C)	61
Şekil 4.7.	Sıcaklığın trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, pH: 7,4)	62
Şekil 4.8.	İyonik şiddetin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, pH: 7,4, T: 25°C).	63
Şekil 4.9.	Etkileşim süresinin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (pH: 7,4, T: 25°C).	64
Şekil 4.10.	(A) Başlangıç derişiminin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (pH: 7,4, süre: 60 dakika, T: 25°C). (B) NIP 1, NIP 2 ve trombin baskılanmış mikrokriyojellerin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, pH: 7,4, süre: 60 dakika, T: 25°C).....	65
Şekil 4.11.	Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin tekrarlanabilirliği (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, pH: 7,4, T: 25°C).	66
Şekil 4.12.	Adsorpsiyon izoterm modelleri. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin Langmuir (A), Freundlich (B) ve Langmuir-Freundlich (C) modelleri. ...	68
Şekil 4.13.	Farklı derişim değerlerine sahip trombin baskılanmış mikrokriyojeller için kinetik modellerin parametreleri. 0,36 mg/mL için birinci derece (A) ve ikinci derece (B); 1,8 mg/mL için birinci derece (C) ve ikinci derece (D); 3,6 mg/mL için birinci derece (E) ve ikinci derece (F) kinetik modelleri. 70	70
Şekil 4.14.	Trombin numunelerinin 1,0 mL/dk akış hızında FPLC kromatogramı; λ : 280 nm; T: 25°C.	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan monomerlerin yapısal formülleri [93].	21
Çizelge 2.2. Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcıların yapısal formülleri [73]......	22
Çizelge 2.3. Çeşitli parametrelerin kriyojel özellikleri üzerindeki etkisi [132]......	32
Çizelge 3.1. Kalıp molekül Trb ve fonksiyonel monomer MAGA ile hazırlanan ön polimerizasyon kompleksi oranları.....	40
Çizelge 3.2. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin bileşen oranları.	41
Çizelge 4.1. Mikrokriyojellerin fiziksel karakterizasyon sonuçları.	60
Çizelge 4.2. Trombin baskılanmış mikrokriyojeller için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm parametreleri.....	69
Çizelge 4.3. Farklı derişim değerlerine sahip kinetik modellerin parametreleri.	73
Çizelge 4.4. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin seçicilik sonuçları.	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Derece Celsius
μM	Mikromolar
mg	Milligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar

Kısaltmalar

APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır serum albümin
BET	Brunauer-Emmett-Teller yöntemi
FPLC	Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi
Hb	Hemoglobin
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
LYS	Lizozim
MAGA	N-Metakriloil-(L)-glutamik asit
MBAAm	N,N'-metilen bisakrilamid
μCT	Mikro bilgisayarlı tomografi
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NIP	Moleküler baskılanmamış polimer
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Trb	Trombin
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin
Q _{maks}	Maksimum adsorpsiyon kapasitesi

1. GİRİŞ

Yara iyileşme ve kan pıhtılaşması süreçlerinde kritik bir enzim olan thrombin, allosterik bir serin proteazdır. Zimojen durumdaki protrombinin proteolitik aktivasyonu ile trombin üretimi gerçekleşmektedir. Çözünür bir plazma proteini olan fibrinojenin, uzun, yapışkan fibrin iplikçiklerine dönüşmesini ve diğer birçok pıhtılaşma ile ilişkili tepkime thrombin tarafından katalize edilmektedir. Başta hemofili, iltihaplanma, tromboz ve ateroskleroz (damar sertliği) olmak üzere çeşitli hastalıklar, trombinin anormal aktivitesi veya aşırı ekspresyonu ile bağlantılıdır [1,2].

Moleküler baskılama teknolojisi, spesifik tanıma bölgelerine sahip yapay reseptör olarak işlev gören sentetik malzemelerin sentezine yönelik etkin bir yöntemdir. Bu tanıma bölgeleri, hedef molekülün boyut ve şekli bakımından tamamlayıcıdır, bu da hedef molekülün yüksek afinite ve seçicilikle yeniden bağlanmasını kolaylaştırır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), diğer tanıma sistemleriyle karşılaştırıldığında spesifik tanıma üstünlüğü sergilemektedir. Ek olarak fiziksel/termal kararlılığı ve tekrar kullanılabilirliği yüksek, hazırlanması kolay ve maliyeti düşük malzemeler olması gibi birçok başka avantaja da sahiptir. Ayırma ve saflaştırma bilimi, tıbbi teşhis, enzimatik kataliz, biyo/kemoalgılama ve afinite kromatografisi uygulamaları dahil olmak üzere birçok farklı alanda MIP'ler sahip olduğu üstün özellikler ile oldukça dikkat çekmektedir [3].

Kriyojeller, monomerik veya polimerik öncüllerin dondurulmuş çözeltilerinde oluşturulan jel matrisleridir. Sıfırın altı sıcaklıklarda gerçekleşen kriyojelasyon süresince reaktantlar çapraz bağlı ağı oluşturan donmamış/yarı donmuş fazlarda yoğunlaşmaktadır. Bu süreçte sulu fazdan çekirdeklenmiş buz kristalleri ise porojen olarak önemli bir role sahiptir. Kriyojeller sergiledikleri birbirine bağlı makro gözenekli yapılar sayesinde parçacıkların, moleküllerin ve hücrelerin difüzyonunun sorunsuz bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca sahip oldukları olağanüstü elastikiyet, deformasyon sonucunda şekillerinin geri kazanımına izin vermektedir. Gözenek boyutlarının optimum şekilde ayarlanabilmesine ek olarak eşsiz özellikleri,

kriyojelleri biyo ayırma sistemleri dahil olmak üzere multidisipliner alanlarda ilgi çekici bir yaklaşım haline gelmiştir [4].

Son zamanlarda, kriyojellerin hazırlanma sürecinde olduğu gibi bir jel oluşturucu öncülünden mikro boyutlarda sentezlenen farklı morfolojiler ve gözeneklilik sergileyen mikrokriyojeller oldukça dikkat çekmektedir. Mikrokriyojeller şekil hafıza özellikleri, yüksek mekanik dayanımları, esneklikleri ve süngerimsi yapısal özellikleri ile potansiyel matrisler haline gelmişlerdir [5,6].

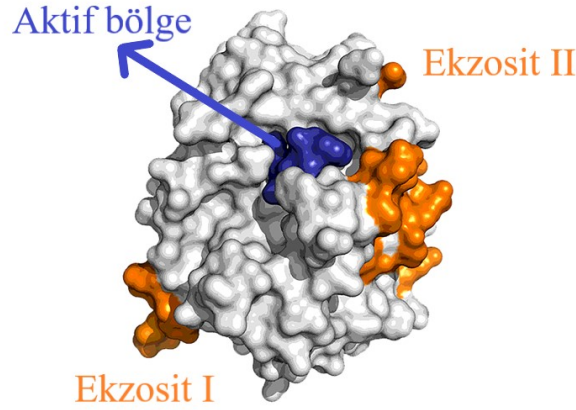
Sunulan tez çalışmasında, moleküler baskılama tekniğine dayalı farklı içeriklere sahip trombin baskılanmış mikrokriyojeller, mikrostensil kalıplar kullanılarak sentezlenmiş ve trombin saflaştırma işlemleri için uygulanmıştır. İlk aşamada, bilgisayarlı mikrotomografi (μ CT), taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey alanı ölçümleri (BET analizleri), şişme testi ölçümleri ve optik mikroskop gibi detaylı karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sonraki adımlarda adsorpsiyon kapasitesini etkileyen bir dizi parametre taranmıştır. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarına ek olarak belirlenen rekabetçi ajanlar ile sentezlenen mikrokriyojellerin seçiciliği değerlendirilmiştir. Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) kullanılarak sulu çözültiden trombinin saflığı incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Trombin

Normal hemostazın sürdürülmesi, prokoagulan ve antikoagulan yolların dengesiyle kontrol edilmekte ve bu süreçlerin bozulması, aşırı kanama gibi hemostatik kontrolün kaybına veya tromboz potansiyeline yol açmaktadır. Geleneksel olarak kanama bozuklukları, pıhtılaşma faktörlerinin aktivitesini ölçmeye yönelik gerçekleştirilen laboratuvar deneyleri ile değerlendirilmektedir. Bu kapsamdaki testler pıhtılaşma sistemindeki olumsuzlukları tespit ederek tanıya karar verilmesinde etkin rol almaktadır. Ancak doğal sınırlamalar sebebiyle hemostatik fonksiyonun tam olarak açıklanabilmesinde yetersiz kalınan durumlar olabilmektedir. Trombin aktivitesinin daha iyi aydınlatılabilmesi ve kanama bozukluklarındaki kritik rolünün açıklanabilmesi amacıyla tedaviye verilen tepkilerin de takip edilebildiği küresel tahlillerin geliştirilmesinin yolu açılmıştır [7].

Trombin (E.C 3.4.21.5) bir serin proteaz olup α -zinciri ve β -zinciri olarak adlandırılan iki polipeptit zincirinden oluşmaktadır [8]. Tipik trombin, moleküler ağırlığı 36 kDa olan dört disülfid bağı ile çapraz bağlanmış 36 amino asit kalıntısı ile A zinciri (hafif zincir) ve 259 amino asit kalıntısı ile B zincirinden (ağır zincir) oluşmaktadır [9]. Bununla birlikte, trombinin neredeyse nötr bir izoelektrik noktası vardır, görünen elektrostatik alan moleküler yüzeyin ötesine önemli bir mesafe kadar uzanır. Trombinin genel yapısı ele alındığında aktif bölge, sodyum iyonu bağlanma bölgesi ve iki pozitif yüklü anyon bağlanma bölgesi (ekzosit 1 ve ekzosit 2) içerdiği bilinmektedir (Şekil 2.1) [10].



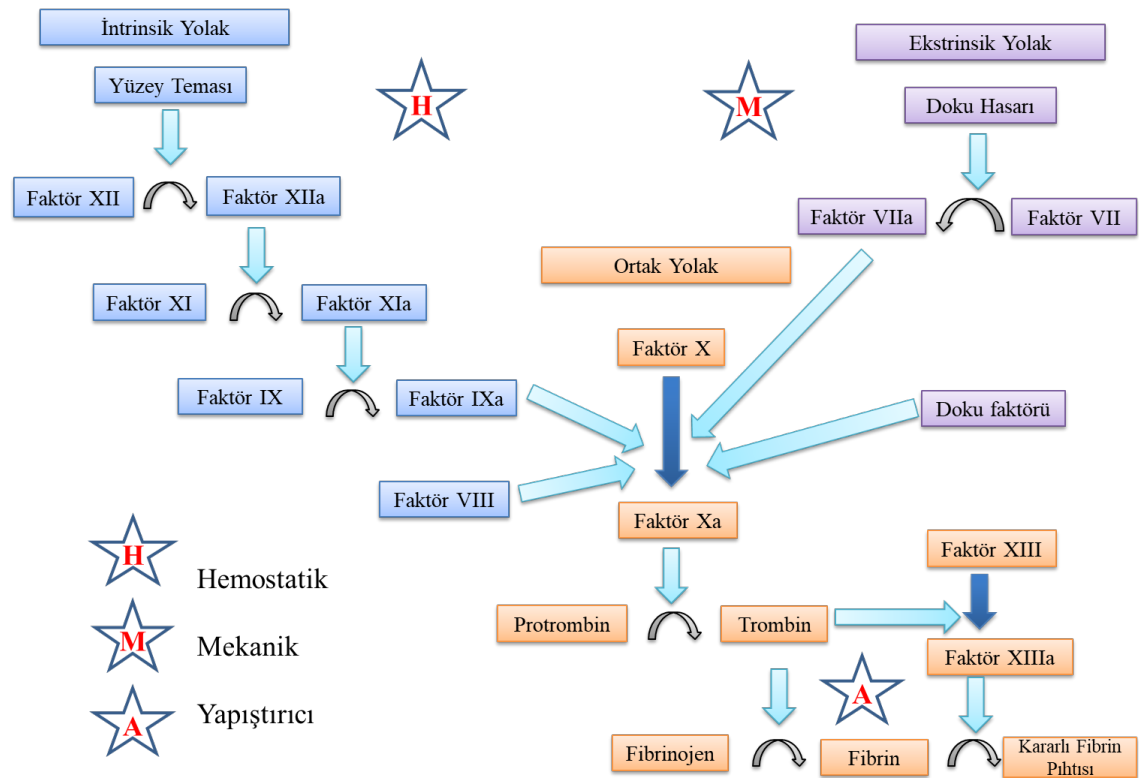
Şekil 2.1. Trombinin iki ekzositinin (turuncu renkli) ve aktif bölgesinin (mavi renkli) gösterildiği yüzey temsili [11].

19. yüzyılda keşfedilen α -trombin, anti-pıhtılaştırıcı ve pro-pıhtılaştırıcı faktör olarak paradoksal olarak hareket etmektedir ve günümüze kadar bu yapısal ve işlevsel karmaşıklıktan dolayı derinlemesine araştırılmıştır [12]. α -trombin, proteolitik ayrışma ile pasif ögelerin aktivasyonunun sağlandığı enzimatik amplifikasyon ağının ürünü olarak ortaya çıkmaktadır [13–15]. α -trombinin ana görevi, çözünür fibrinojenin çözünmeyen fibrin pıhtısına dönüştürülmesini sağlamaktır [16]. Ayrıca trombositleri yara bölgesine sabitleyici ve onarım süreci başlatılmış olur [17].

Trombin hemostatik dengenin korunmasında önemli bir enzim olup birbiriyle ilişkili ve eş zamanlı gerçekleşen hücrel ve proteolitik tepkimelerin merkezinde yer almaktadır [18]. Yaralanma sonrasında hemostaz aktivasyonu sağlanarak trombosit tıkaçı oluşturulmakta ve bunu kararlı fibrin pıhtısı takip etmektedir. Birincil hemostaz süresince yaralanma bölgesinde hücre dışı matriks bileşenlerine ve birbirlerine tutunan trombositler kanamanın durdurulmasına yardımcı olmaktadır. İkincil hemostaz ise başlama, büyüme ve çoğalma evrelerindeki pıhtılaşma faktörlerinin (faktör [F]V, FVII, FVIII, FIX, FX ve FXI vb.) enzimler sayesinde aktivasyonlarının kazanıldığı adımlardan oluşmaktadır. Hemostazın bu aşamaları, pıhtılaşma sürecini kontrol eden ve trombin oluşumunun yerini, miktarını ve zamanlamasını düzenleyen iki ana hücre türü, doku faktörü (TF) içeren hücreler ve trombositler ile gerçekleşmektedir [19]. Süreçte,

oluşan trombosit tıkaçını kararlı bir fibrin dokusuyla desteklemek ve bu amaçla fibrinojenden fibrin oluşması için gerekli trombinin sağlanması ulaşılmak istenen noktadır.

Trombin, ikincil hemostaz sırasında fibrin pıhtı oluşumunun yanı sıra birden fazla rol oynamaktadır. Pıhtılaşmanın başlama aşamasında, dokuda TF-içeren hücrelerde küçük miktarlarda trombin üretilmektedir. Burada gerçekleşen ilk trombin üretimi ile kritik adım, bitişik trombositleri oldukça yüksek bir oran ile prokoagülan duruma aktive etmektir. Trombin büyüme fazı basamağında, FXI, FV ve FVIII aktivasyonunu içeren çeşitli pozitif geri besleme döngüsünde görev almaktadır. Bu ana kadar gerçekleşen tüm olgular sonucunda, fibrin pıhtı oluşumundan sorumlu ve aktivasyonu gerçekleştirilmiş trombosit yüzeylerinde oldukça büyük trombin kümelerinin üretilmesi sağlanmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Pıhtılaşma kademesine genel bakış. Çok adımlı intrinsik (sol) ve ekstrinsik yolağın (sağ) diyagramı. Şekil, hemostatik ajanların, mekanik ve yapışkan hemostatların pıhtılaşma kademesinde rollerini nerede sergilediğini göstermektedir [20].

Trombin oluşum miktarı ve modelinin tanımlanmasındaki etkenler, pıhtılaşma boyunca sergilenen çeşitli özelliklere bağlıdır. Üretilen trombinin aktivite miktarının tayininde antitrombin ve protrombin miktarlarının önemli bir etken olduğuna dair kanıtlar varken trombosit bileşenleri için aynı durum söz konusu değildir. Trombosit bileşenlerinin de bahsedilen olguda görev aldığı bilinmekte fakat katkısı esnasındaki mekanizması tam anlamıyla çözülememiştir.

Tüm bu bulgular ele alındığında trombinin düzenlenme mekanizmasının oldukça karmaşık ve birçok faktöre bağlı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Oldukça hassas bir dengeye sahip olan prokoagülan ve antikoagülan süreçlerde beklenmeyen bir aksaklık olması durumunda, hemostatik kontrolün sağlanamaması sonucu, kişide aşırı kanama veya trombozun patolojik sonuçları gözlenebilmektedir [7].

2.2. Proteinlerin Saflaştırılması

Biyoteknolojide saflaştırma ve karakterizasyon yöntemleri ile yüksek kaliteli ürün üretimi önemlidir. Özellikle kritik olan bir adım da saflaştırma işlemidir. Canlı organizmalarda kritik öneme sahip olan proteinler, biyolojik makromoleküllerin en temel parçalarıdır. Bu bağlamda, proteinlerin incelenmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda ayırma ve saflaştırma adımları son derece önemlidir. İnsan kanındaki eser miktarda bulunan proteinlerin ayrılması ve analizlerinin yürütülmesi birçok hastalığın erken teşhisine katkı sağlayabilmektedir [21].

Günümüzde, proteomik çalışmalar yalnızca belirli bir numunede çok proteini tanımlamaktan ziyade bu proteinlerin kesin miktarlarının belirlenmesine odaklanmaktadır. Değişken protein ekspresyon profillerinin detaylı bir şekilde araştırılması, klinik proteomikte biyobelirteçler, patolojik yollar ve ilaçların hedef bölgeleri hakkında aydınlatıcı bilgiler elde etmeye yardımcı olmaktadır. Son zamanlarda proteomik alanında çalışan araştırmacıların başvurabileceği farklı metodolojilerden oluşan çok sayıda proteomik yaklaşım geliştirilmiştir [22].

Proteinlerin yapısını, özellikle translyasyon modifikasyonlarını ve fonksiyonunu belirlemenin yanı sıra peptit ve protein dizilerini tespit etmek için proteomik çalışmalar önem arz etmektedir. Bu aşamada tekrar kullanılabilir malzemeler sayesinde yüksek dereceli proteolizin maliyetini azaltılmasına yönelik verimli, hızlı ve kolay prosedürlerin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Son yıllarda polimer [23], membran [24], jel boncuklar [25], cam [26], sol-jel destekleri [27], gözenekli silikon matrisi [28] ve gözenekli monolitik malzemeler [29,30] gibi farklı substratlar üzerine proteolitik enzimler immobilize edilmiştir.

Proteomik, biyoakışkanların, hücrelerin, dokuların ve organizmaların içerdiği tüm proteinlerin geniş kapsamlı analizidir [31]. Özellikle klinik proteomik, hasta iyileşme sürecini açıklayabilmek amacıyla proteinlerin ekspresyonu ve lokalizasyonunun yanı sıra moleküler etkileşimleri ve post-translyasyonel modifikasyonları araştırır [32]. Proteomiklerin bu yaygın uygulanabilirliği, bilimsel sorunun kendisine, incelenen proteom türüne (örneğin, çözünür veya zar proteinleri, translyasyon sonrası modifiye edilmiş proteinler, protein izoformları) ve ayrıca analiz edilecek numune türlerine (örneğin, doku, kültürlenmiş hücreler, vücut sıvıları, bitkiler, bakteriler) bağlı olarak, özelleştirilmiş teknikler ve iş akışları ihtiyacının gereklilikleri anlamına gelmektedir. Tüm bu talepleri karşılamak için, izolasyon, ayırma, sindirme, zenginleştirme, tüketme, tanımlama ve ayrıca proteinlerin mutlak ve nispi miktar tayini için kapsamlı bir deneysel teknikler repertuarı yıllar içinde geliştirilmiştir ve daha fazla iyileştirmeler halen devam eden araştırmaların bir parçasıdır. Nicel klinik proteomik çalışmaların başarıyla yürütülmesi için etiketsiz proteomik, yüksek verim sağlayan bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır [22].

Proteomik stratejik olarak biyolojik bir sistemin proteomunun tam ve kapsamlı niceliksel ve niteliksel tanımlanmasını hedeflemektedir. Ancak biyolojik sistemin karmaşık düzeni nedeniyle belirlenen hedefe ulaşmak güçleşmektedir. Proteinler hücresel fonksiyonlarda kritik bilgiler sağlarken sahip oldukları hidrofilitik/hidrofobiklik, post-translyasyonel modifikasyonlar ve boyut gibi karakteristik özelliklerinin çok çeşitli olmasından dolayı büyük ölçekte tespit edilmesi en zor hücresel bileşenlerdir. Proteomik yaklaşımlar tipik olarak hücresel materyal

içindeki proteinlerin ayrılmasını ve tanımlanmasını içeren ortak bir teknik kullanılmaktadır. Burada sınırlayıcı durum proteinlerin aydınlatılmasından ziyade doğru bir şekilde ayrılmasını sağlamaktır. Karmaşık biyolojik numunelerden proteinleri analiz etmek amacıyla yaygın olarak başvuru olan İki boyutlu (2D) elektroforez tekniği ile proteomik yaklaşımlardaki kısıtlamalar ortadan kalkmaktadır [33]. Klose ve O'Farrell [34] tarafından bağımsız olarak geliştirilen bu teknik, proteinlerin bir yönde izoelektrik odaklama ile net yüklere göre ve diğer yönde sodyum dodesil sülfat varlığında elektroforez ile görünür moleküler kütleleri temelinde proteinlerin ortogonal olarak ayrılmasını sağlar. 2D elektroforez metodolojisinin en büyük avantajı, farklı modifikasyon durumlarında binlerce proteinin aynı anda ayrılması, görselleştirilmesi ve nicelleştirilmesi yeteneği ile bağlantılıdır. Bununla birlikte, 2D elektroforezin otomasyonu belirli aşamalar için zordur. Bu bağlamda, afinite kromatografisi güçlü bir proteomik araç olarak literatürde önemli bir yere sahiptir. Kısaca immobilize ligandlar ve hedef proteinleri arasındaki özgün etkileşimi temel alan çok yönlü afinite kromatografisi tekniğinin farklı ihtiyaçlara yönelik uygulamaları mevcuttur [35].

Çeşitli protein türlerinin izolasyonu ve saflaştırılmasına yönelik çalışmalarda antikorlar ve antijenler arasındaki etkileşimler başta olmak üzere elektrostatik adsorpsiyon, hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler, metal şelasyon gibi farklı yaklaşımlar ön sürülmektedir. Ayrıca belirtilen tekniklerde, karmaşık biyolojik makromoleküllerin saflaştırılması ve/veya zenginleştirilmesi için ihtiyaca yönelik farklı özelliklere sahip malzemeler söz konusudur [36].

Hücre sel ve kolloidal malzemelerden oluşan safsızlıklar, biyo ürünleri saflaştırmada sınırlayıcı bir durumdur ve bir dizi farklı teknoloji sayesinde bu durumun üstesinden gelinebilmektedir. Bu bağlamda hızlı protein sıvı kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, çökeltme, elektroforez, santrifüj, ultrafiltrasyon sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve adsorpsiyon işlemleri etkili araçlar olarak değerlendirilmektedir. Bu süreçlerde yer alan cihazlar özel adımlar olarak düzenlenmiştir ancak her adımda önemli miktarda ürün kaybı olabilmektedir. Bu analitik ayırma ve saflaştırma yöntemleri çok pahalı, zahmetli ve zaman alıcıdır ve bu yöntemlerin dezavantajı sistematik ve bireysel hata olasılığının yüksek olmasıdır [36].

2.3. Protein Saflaştırma Teknikleri

2.3.1. Tuz Çöktürmesi

Hedef proteinin bulunduğu çözeltiye yüksek derişimde tuz ilavesiyle gerçekleştirilen tuz çöktürme yöntemi, proteinler arasındaki elektrostatik etkileşimi etkilemekte ve proteinlerin kümelenmesine neden olmaktadır.

Proteinlerin çözünürlüğünün en aza indirgenmesine sebep olan tuz derişimi, her bir protein için farklılık göstermektedir. Ayrıca bu teknik ile elde edilen protein saflığı çoğunlukla istenilen düzeye ulaşmamaktadır. Buradan yola çıkarak, ek saflaştırma teknikleri ile bir arada uygulanması gerektiği ve proteinlerin kısımlara ayrılma sürecinde tuz çöktürmesi tekniğine başvurulabileceği bildirilmektedir [37,38].

2.3.2. Diyaliz

Diyaliz, yarı geçirgen bir membranın kullanıldığı ve itici güç olarak derişim gradyanını temel alan bir ayırma tekniğidir. Burada, yarı geçirgen membranla birbirinden ayrılmış çözeltiler arasındaki derişim farkı sayesinde uzaklaştırılmak istenen maddelerin taşınması hedeflenmektedir. Makromoleküler yapıdaki proteinler söz konusu membrandan geçememektedir.

Bununla birlikte diyaliz tekniği tek başına kullanıldığında ayırma ve saflaştırma çalışmaları için yetersiz olmaktadır. Genellikle tuz ya da diğer küçük moleküllerin hücre kısımlarından uzaklaştırılması veya protein saflığını iyileştirme ve geliştirme amacıyla diğer saflaştırma teknikleri ile beraber başvuru alan bir uygulama olarak literatürde yer almaktadır [37,39].

2.3.3. Elektroforez

Elektroforez, bir elektriksel alan etkisi altında yüklü parçacıkların farklı hızlarda hareket ederek göç ettiği ve böylelikle ayırmanın gerçekleştiği bir teknik olarak ifade edilmektedir. DNA, RNA ve proteinler başta olmak üzere makromoleküllerin ayrılmasına yönelik yapılan çalışmalarda sıklıkla uygulanan bu teknik, hedeflenen

biyomoleküllerin tuzdan arındırılmasının yanı sıra zenginleştirme, ayırma ve saflaştırma işlemleri için de kullanılabilir. Proteinler göz önünde bulundurulduğunda herhangi bir proteinin elektriksel alanda göç etme hızı, proteinin net yükü, elektriksel alanın gücü ve sürtünme katsayısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [37,40].

Kullanılan araçlara, destekleyici ortama ve ayırma mekanizmasına göre farklı elektroforez yaklaşımları bulunmaktadır. Elektroforez ile ayırma işlemleri çoğunlukla gözenekli jeller ile gerçekleştirilmektedir. Poliakrilamid jel elektroforezi ile protein ve polipeptidlere ait saflık, boyut, izoelektrik nokta ve miktar gibi karakteristik özelliklerin tayin edilmesi mümkündür. Ayrıca, anyonik bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat ile muamele edilerek proteinlerin moleküler kütlesi belirlenebilmektedir [41,42].

Bir diğer yaklaşım ise izoelektrik noktalarının farklılığından faydalanarak proteinleri ayırma işlemini gerçekleştiren izoelektrik odaklama tekniğidir. Burada, öncelikle jelde farklı izoelektrik noktalarına sahip amfolitler sayesinde kararlı bir pH gradienti oluşturulmaktadır. Daha sonra uygulanan elektriksel alan ile beraber proteinler, net yüklerinin sıfır olduğu kendi izoelektrik pH'larına ulaşıncaya kadar jelde göç etmeye devam etmektedirler [40,43].

Karmaşık protein karışımlarının ayrılmasına yönelik yapılan çalışmalarda farklı elektroforetik teknikler bir arada kullanılabilir. Plazma gibi çeşitli derişimlerde çok farklı proteinlerin bulunduğu ortamlarda, izoelektrik odaklama ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi tekniklerinin kombinasyonu sonucu ortaya çıkan iki boyutlu jel elektroforezi tekniği sayesinde etkin bir ayırma sürecine olumlu katkılar sağlanmaktadır [43,44].

2.3.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Biyomoleküllerin ayrılmasına yönelik yaşam bilimlerinde en önemli analitik yöntemlerden biri olan jel filtrasyon kromatografisinden sıklıkla faydalanılmaktadır. Tipik bir jel filtrasyon kromatografisi işleminde, agaroz, dekstran ya da poliakrilamid gibi çözünmeyen ancak yüksek oranda şişmiş ve iyi tanımlanmış bir gözenek boyutu

aralığına sahip gözenekli jel mikroküreler ile hazırlanmış bir kolon bulunmaktadır. Sabit faz olarak da adlandırılan bu kolon moleküler bir elek görevi görmektedir. Daha sonra hareketli faz kolona yüklenerak ayırma süreci başlatılmaktadır. Bu aşamada, kolon boyunca hareket devam ederken gözenekli jel mikrokürelerin gözenek boyutundan daha küçük boyuta sahip biyomoleküller, mikrokürelerin gözenekli yapısına nüfuz etmektedir. Daha büyük boyutlara sahip biyomoleküller ise mikroküreler arasındaki boşluklardan geçerek kolonda daha hızlı yol almaktadır. Dolayısıyla büyük biyomoleküller küçük biyomoleküllere göre kolonu önce terk etmektedir.

Jel filtrasyon kromatografisinde ayırma işlemi, biyomoleküllerin boyut farklılıklarına göre kolonda tutulma sürelerinin değişmesi ve dolayısıyla elüsyon sürelerinin farklılaşması prensibine dayanmaktadır [45,46].

2.3.5. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, biyolojik makromoleküllerin sahip olduğu net yüklere göre ayrılmasını sağlayan bir sıvı kromatografi tekniğidir. Yaygın olarak protein ve peptidlerin ayrılmasında kullanılan bu tekniğin en önemli üstünlüklerinden biri, denatürasyona sebebiyet vermeden saflaştırma işleminin gerçekleştirilebilmesidir. İyon değişim kromatografisi, iyon değiştiricinin yüküne bağlı olarak katyon değişim ve anyon değişim kromatografisi olmak üzere alt başlıklara ayrılmaktadır.

Pek çok sayıda amino asitten oluşan proteinler yükleri bakımından farklılık göstermekte ve dolayısıyla yüklü kromatografik matrisler ile farklı şekilde etkileşime girmektedirler. İyon değişim kromatografisinin temelinde, verilen bir pH'da proteinlerin net elektrik yükünün işareti ve büyüklüğüne göre ayırma söz konusudur. Bu teknik ile bir tuz veya pH gradyanı oluşturularak iyon değiştiricideki yüklü grupların saflaştırmak istenilen karışımda bulunan zıt yüklü proteinleri adsorbe etmesi sağlanmaktadır [47,48].

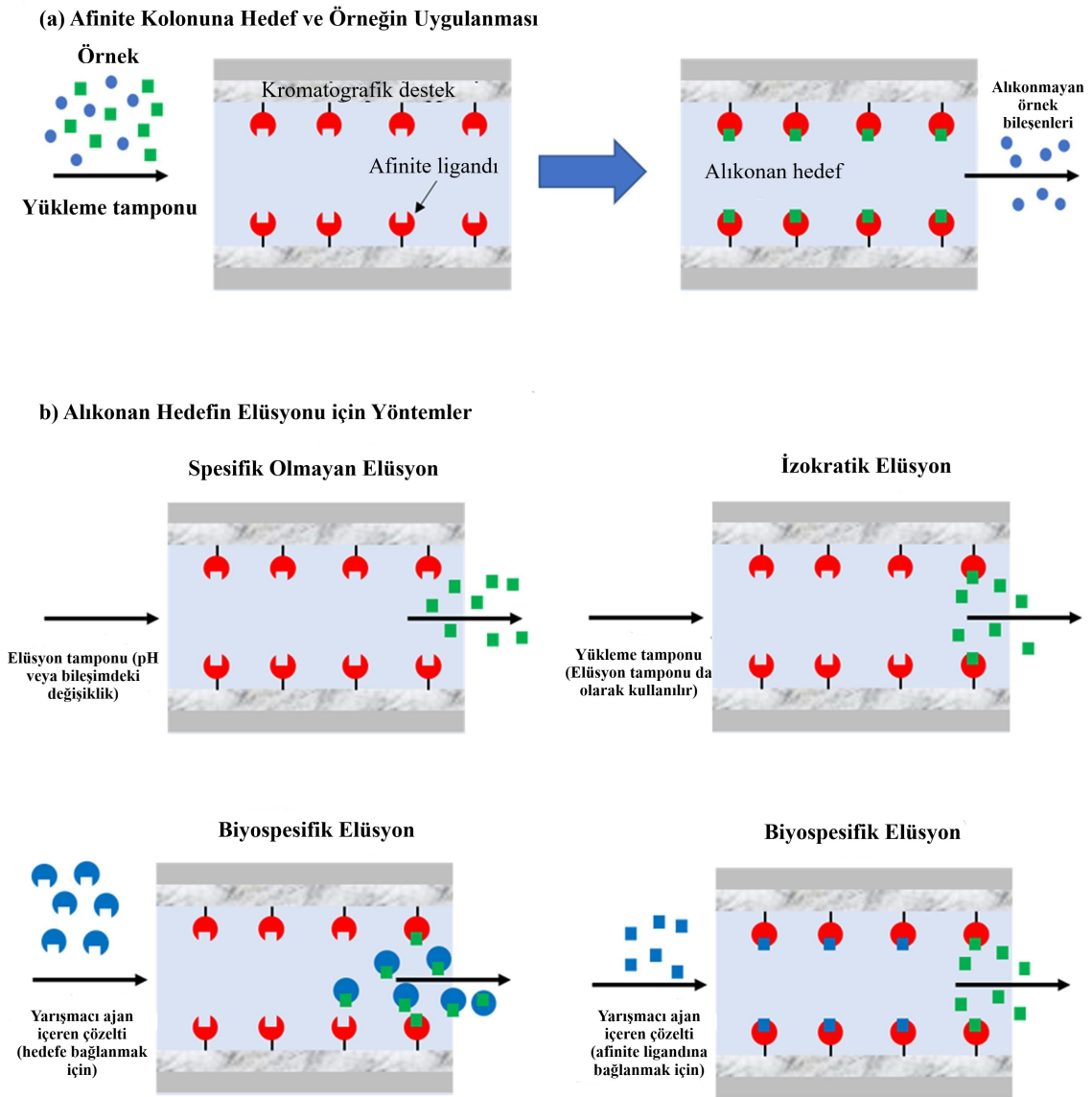
2.4. Afinite Kromatografisi

Nicel ve nitel proteomik yaklaşımlar için gereken şartlar biyolojik örneğin fraksiyonlanmasına bağlı olarak karmaşıklığın azaltılmasıdır. Afinite kromatografisinin temelinde hedeflenen makromoleküller ve uygun immobilize ligandlar arasında gerçekleşen etkileşimler yer almaktadır. Kullanılan ligandların çeşitliliği, translasyon sonrası modifiye edilmiş proteinler dahil olmak üzere karmaşık biyolojik örneklerin etkin bir şekilde ayrılmasına katkı sağlamaktadır. Söz konusu metodoloji, izotop kodlu afinite etiketlerine başvurarak protein ekspresyonunun nicelleştirilmesine ve protein-protein etkileşim ağlarının açığa kavuşturulmasına da yardımcı olmaktadır [35].

Sıvı kromatografisi türlerinden biri olan afinite kromatografisi, sabit faz olarak biyolojik olarak ilişkili bir bağlayıcı ajandan faydalanmaktadır. Uzun yıllardır kullanılan teknik, biyolojik etkileşimlerde gerçekleşen spesifik ve geri dönüşümlü bağlanmaları kullanarak belirlenmiş hedeflerin saflaştırılmasına yönelik yaygın olarak tercih edilmektedir [49–51]. Bahsi geçen etkileşimlere örnek olarak enzim-substrat, antikor-antijen ve hormon-reseptör etkileşimleri verilebilmektedir. Bu kromatografik sistemde “afinite ligandı” olarak adlandırılan ajan kromatografik destek üzerine immobilize edilir ve afinite ligandı, hedeflenen biyomolekülün bulunduğu karmaşık ortamdan seçici şekilde tutulmasını sağlayan kolon sistemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır [52,53].

Afinite kromatografisine yönelik sıklıkla kullanılan ve en temel format açık/kapalı modu olarak bildirilmiştir (Şekil 2.3). Bu formatta, afinite ligandının aktif olduğu ve hedefin kuvvetle bağlanmasını sağlayacak pH ve iyonik güce sahip yükleme tamponu ile örnek, hedeflenen biyomolekülü yakalayıp tutabilen bir kolondan geçirilmektedir. Süreç boyunca örnekte bulunan diğer bileşenlerin bağlanma dereceleri çok düşüktür veya bağlanma göstermezler. Ayrıştırma süresince hedef biyomolekül korunurken elüsyon tamponu veya güçlü bir mobil fazın kolondan geçirilmesiyle hedefin serbest bırakılması sağlanmaktadır. Elüsyon için spesik olmayan, biyospesifik ve izokratik elüsyon olmak üzere üç farklı yaklaşım söz konusudur. Spesik olmayan elüsyonda hedef biyomolekül, mobil faz bileşimi, iyonik kuvvet veya pH değeri değiştirilerek serbest bırakılmaktadır. Diğer bir yaklaşım olan biyospesifik elüsyonda hedef

biyomolekülün serbest bırakılması için uygun bir rakip ajan belirlenmektedir. Sonraki adımlarda sistemin dengeye getirilmesi için yükleme tamponu kullanılmaktadır ve süreç tekrar edilmektedir [54,55]. Alternatif olarak izokratik elüsyonda yükleme tamponu ve elüsyon tamponu aynı amaç için kullanılabilir. Bu yaklaşım, hedef biyomoleküller için zayıf veya orta derecede bağlanma sergileyen afinite ligandlarının kullanımında öne çıkmaktadır [56,57].

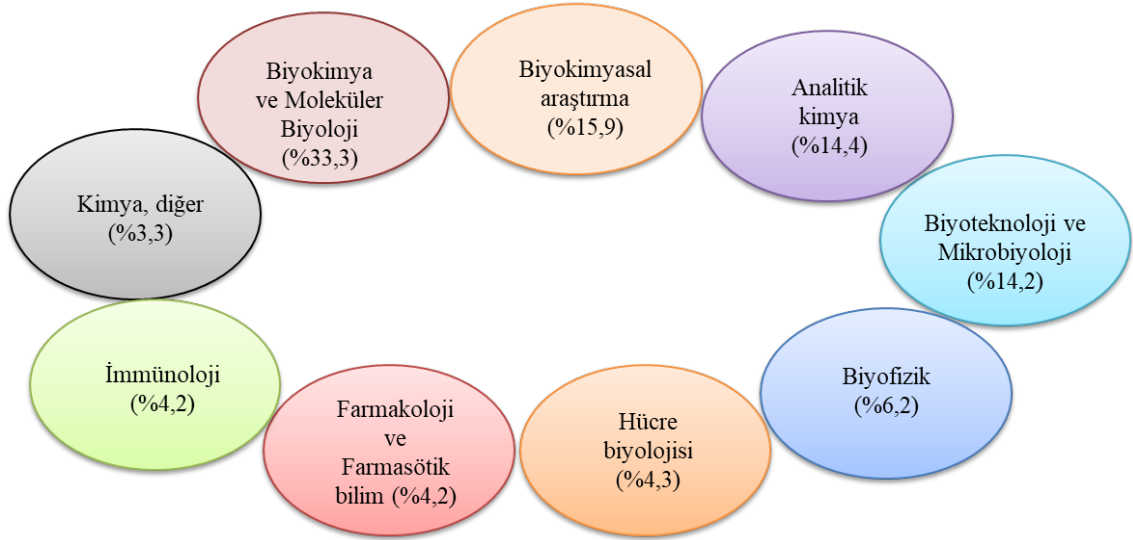


Şekil 2.3. Afinite kromatografisinin açık/kapalı modunda başvuru (a) örnek uygulama/yıkama adımları ve (b) elüsyon yöntemleri [57].

Afinite kromatografisi tekniğinin basit ve oldukça seçici olmasından dolayı biyomolekül, biyofarmasotik gibi birçok farklı ajanın saflaştırılmasında uygulamaları mevcuttur. Afinite kromatografisi hem numune hazırlama hem de biyolojik, klinik ve çevresel numunelerdeki belirli hedeflerin izolasyonu veya ölçümü için analitik bir araç olarak kullanılmıştır. Dahası afinite kromatografisi yaklaşımı ile biyolojik etkileşimleri değerlendirmek ve karakterize etmek mümkün olmaktadır [58,59].

2.4.1. Afinite Kromatografisinin Güncel Uygulamaları

Saflaştırma, karakterizasyon, kimyasal veya biyokimyasal ayırmalar ve çeşitli analiz süreçleri başta olmak üzere afinite kromatografisi yaklaşımının uygulanabileceği birçok farklı alan söz konusudur. Şekil 2.4, bu yöntemi kullanan araştırma yayınlarına dayalı olarak, afinite kromatografisinin sıklıkla kullanıldığı bazı alanları göstermektedir. Bu uygulamaların çoğunluğunu (toplamda %49,2'dir) biyokimya, biyokimyasal araştırma ve moleküler biyoloji oluşturmaktadır. Biyoteknoloji, immünoloji, mikrobiyoloji ve hücre biyolojisi de söz konusu yaklaşıma sıklıkla başvuran alanlar olarak karşımıza çıkmaktadır (toplamda %22,7'dir). Analitik kimya ve kimyanın diğer alanları (örneğin, çevre kimyası, klinik kimya, çok disiplinli kimya, %17,7) ile birlikte farmakoloji ve farmasötik bilim (%4,2) afinite kromatografisi için bir başka önemli uygulama grubunu oluşturmaktadır. Biyolojik sistemlerin biyofiziksel çalışmaları da bu kapsamda değerlendirmeye alınmıştır (%6,2). 1970 ila 1980 yılları arasını kapsayan süreçte yüksek performanslı afinite yöntemlerinin geliştirilmesini takiben farklı alanlardaki uygulamaların artışı göze çarpmaktadır [60,61].

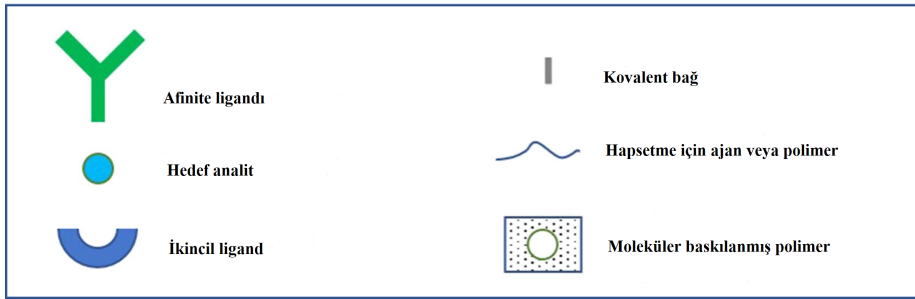
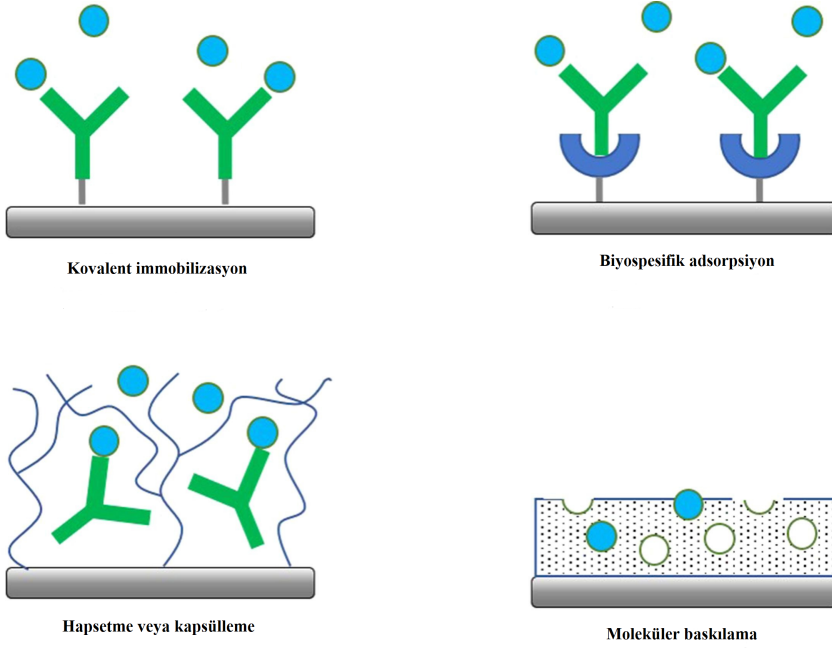


Şekil 2.4. Afinite kromatografisinin rutin olarak uygulandığı alanlar [57].

Belirlenen hedefin karmaşık bir matriste dahi bir veya birkaç adımda ayrılmasını sağlayan afinite kromatografisi tekniği, yüksek seçiciliğin yanı sıra güçlü bağlanma başta olmak üzere önemli avantajlara sahiptir. Enzimlerin, doğal ve rekombinant proteinlerin küçük ve büyük ölçekli saflaştırma işlemleri biyomimetik veya boya ligand afinite kromatografisi uygulamalarına örnek olarak gösterilebilmektedir [62,63].

2.4.2. Afinite Kromatografisinde İmmobilizasyon Teknikleri

İmmobilizasyon tekniklerinin uygunluğu ile afinite kromatografisinin kullanıldığı uygulama alanları doğru orantılı olarak gelişmektedir. Afinite kromatografisinde kullanılacak çeşitli immobilizasyon teknikleri Şekil 2.5'te verilmiştir. Bir afinite kolonu hazırlanması aşamasında afinite ligandının aktivitesi üzerindeki kritik etkisinden dolayı immobilizasyon tekniğinin doğru seçimi titizlik ve hassasiyet gerektiren bir faktördür. Aksi halde sterik engelleme veya yanlış oryantasyon gibi durumlar sonucu bağlayıcı ajanın aktivitesinde azalma gözlenebilmektedir. Benzer şekilde, afinite ligandının katı desteğe çok bölgesel bağlanma gerçekleştirmesi, bağlayıcı ajanın aktivitesinde değişiklik olmasına neden olabilmektedir.



Şekil 2.5. Afinite kromatografisinde immobilizasyon teknikleri [57].

Günümüzde katı desteğe bir afinite ligandının bağlanmasını sağlamak amacıyla sıklıkla başvurulan kovalent immobilizasyon tekniği, ilk olarak 1936 yılında Landsteiner ve van der Scheer [64] ve 1951 yılında Campbell ve diğerleri [65] tarafından kullanılmıştır. Kovalent immobilizasyon tekniğinde katı desteğin ve/veya ligandın aktivasyonu sağlanması gerekmektedir. Cautrecasas ve diğerleri [66] siyanojen bromür (CNBr) yöntemine başvurmuşlardır. Burada katı destek üzerinde bulunan hidroksil grupları aktif bir siyanat esteri veya imidokarbonat grubu oluşturması amacıyla modifiye edilmektedir. Böylece afinite ligandı üzerinde bulunan birincil aminlerle tepkime gerçekleştirilebilmektedir. Ek olarak bağlayıcı ajanlar, karbonildiimidazol veya N-hidroksisüksinimit ile aktive edilen yüzeylerdeki aminler sayesinde immobilize

edilebilmektedirler [67]. Schiff bazı yöntemi ve indirgeyici animasyon yöntemi ile amin içeren maddelerin kullanımın yanı sıra karboksil veya hidroksil grupları içeren bağlayıcı maddeler de kovalent immobilizasyonda tercih edilebilmektedirler.

Kovalent immobilizasyon tekniğinden farklı olarak afinite kromatografisi ile ilgili yapılan erken çalışmalarda, katı desteğe bir afinite ligandı bağlanması amacıyla kovalent olmayan immobilizasyon yaklaşımı kullanılmıştır. Burada, fiziksel adsorpsiyon kapsamında katı destek ve afinite ligandına göre değişkenlik gösterebilecek etkin etkileşimler hidrojen bağı, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerdir. Bu yaklaşımda yararlanılan katı desteklere karbohidratlar, silika ve alümina başta olmak üzere inorganik destekler örnek gösterilmektedir. Uygulanması basit olmasına rağmen bu yöntem ile hazırlanan afinite desteği için kararlılığın sınırlı olması ve rastgele yönlendirme nedeniyle bağlayıcı ajan aktivitesinde azalmalar gerçekleşmesi, yöntemin sınırlayıcı etkenleri arasında yer almaktadır.

Birincil afinite ligandını immobilize etmek için katı desteğe bağlanan ikincil bir ligandan faydalanan tekniğe biyospesifik adsorpsiyon adı verilmektedir. Kovalent olmayan immobilizasyonun bir örneği olan bu yaklaşım ile ilgili 1976 yılında peptitler ve proteinler biyotin etiketleri ile modifiye edilmiş ve immobilize edilmiş avidin içeren desteklere bağlanmıştır. Benzer şekilde bu tekniğin biotin etiketleri ve streptavidin içeren desteklerle uygulamaları da mümkündür. Protein G veya protein A'nın antikorları bağlamak ve immobilize etmek amacıyla bir katı destek üzerinde kullanıldığı uygulamalar biyospesifik adsorpsiyon kapsamında değerlendirilmektedir.

Hapsetme veya kapsülleme temelli yöntemler konusundaki ilk çalışmalarda, afinite ligandı etrafında bir organik polimer oluşturarak immobilizasyon sağlanmış olup bu yöntemler kovalent olmayan immobilizasyon başlığı altında yer almaktadır. Proteinlerin, enzimlerin ve diğer afinite ligandlarının alıkonmasında silikat bazlı sol jeller ile tasarlanan inorganik materyallerin kullanımı uzun yıllardır dikkat çeken bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır [68]. Başka bir yol olarak afinite ligandı katı desteğin içine veya üzerine yerleştirilebilmekte ve çapraz bağlanma veya ligandın söz konusu materyali terk edebilme yetisini farklılaştırma ile yakalanabilmesi sağlanmaktadır.

Örneğin, sığır serum albümin (BSA) proteini, glutaraldehit ile bu proteini çapraz bağlama yoluyla yakalanmıştır. Literatürdeki mevcut diğer çalışmalarda, α_1 -asit glikoprotein (AGP), insan serum albümin (HSA), immünoglobulin G (IgG) ve diğer ajanlar, yakalama ajanı olarak oksitlenmiş glikojen ve hidrazid ile aktive edilmiş destekler sayesinde silika içinde hapsedilmiştir [69–71].

İmmobilizasyon tekniklerine alternatif olarak moleküler baskılama, 1970'lerin başında kiral ayırma uygulamaları ile afinite kromatografisi kapsamında yer almıştır. Burada temel prensip, hedef biyomoleküle uygun afinite ligandları olarak faaliyet gösteren bağlayıcı bölgeler içeren bir katı destek oluşturmaktır. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) sentez prosedüründe, hedef molekül ve hedef molekül ile etkileşime girebilecek fonksiyonel gruplar içeren monomerler varlığında bir polimerizasyon çözeltisi hazırlanmaktadır. Daha sonraki adımda hedef molekül polimerik yapıdan uzaklaştırılmakta ve yapılacak uygulamalarda hedef molekülün bağlanmasını sağlayacak özgün bölgeler veya boşluklara sahip bir katı destek elde edilmektedir. Önceki çalışmalarda düşük kütleli hedef analitlerin yakalanması ve ayrılması için başvurulan moleküler baskılama yaklaşımında MIP'lerin sahip olduğu etkileşimler, biyolojik sistemlerdeki etkileşimlere oldukça benzerlik göstermektedirler [72–74]. Son zamanlarda, MIP'lerin proteinler gibi makromoleküller ile gerçekleştirilen çalışmalarda uygulamaları mevcuttur [75,76]. Katı faz ekstraksiyonunun yanı sıra afinite kromatografisinde seçici bağlanma için monolitler ve partiküllü katı destekler hazırlanarak farklı uygulamalarda MIP'lerden yararlanılmıştır [77,78].

2.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi

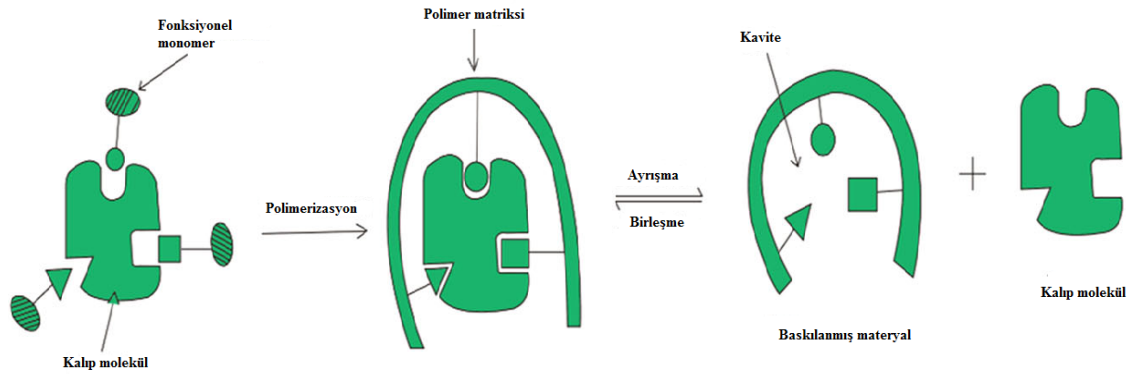
Geçtiğimiz yirmi yılda, moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP'ler) hazırlanması ve bunların uygulamaları büyük ilgi görmüştür. MIP'ler molekülü, antikorlara ve biyolojik reseptörlere benzer afinite ve özgüllük açısından bağlamak için bir “kilit ve anahtar” mekanizmasıyla çalışmaktadır [79]. Moleküler baskılanmış polimerler şu anda sentetik moleküler reseptörler oluşturmak için en genel, çok yönlü, ölçeklenebilir ve uygun maliyetli yaklaşımdır [80].

Biyomühendislik, malzeme bilimi ve yaşam bilimi başta olmak üzere birçok multidisipliner alanda proteinlerin tanınması ve izolasyonuna yönelik gerçekleştirilen çalışmalar günümüzde oldukça dikkat çekmektedir. Kararlılığı ve seçiciliği yüksek, düşük maliyetli ve kolay hazırlanabilen protein baskılanmış polimerler, bu kapsamda ideal tanıma malzemeleri amacıyla kullanılacak potansiyel adaylar olarak düşünülmektedir [3].

2.5.1. Moleküler Baskılama Tekniği

Hedef moleküle yönelik yüksek seçicilik sergileyen MIP'ler plastik antikorlar olarak ifade edilebilmektedir. Ayrıca MIP'ler sayesinde farklı analitler için uyarlanabilir ve kimyasal olarak dayanıklı sentetik moleküler tanıma sistemleri geliştirmek mümkündür.

MIP'lerin sentez prosedürü temel olarak bir fonksiyonel monomer, bir çapraz bağlayıcı ve hedef analit olan bir kalıp molekülü varlığında gerçekleşen kopolimerizasyondan oluşmaktadır (Şekil 2.6) [81].



Şekil 2.6. Moleküler baskılanmış polimer hazırlama prosedürünün şematik gösterimi [82].

MIP sentezi polimerizasyon sürecinde indüksiyon, sıklıkla bir başlatıcının UV veya termal aktivasyonu sayesinde gerçekleştirilmektedir. Polimerizasyonun tamamlanmasını takiben kalıp molekül polimerik yapıdan uzaklaştırıldıktan sonra hedef analite boyut, şekil açısından uyumlu ve seçici bağlanma için fonksiyonel gruplar kapsamında

tamamlayıcı boşluklara sahip bir polimer elde edilmektedir [83]. Ön polimerizasyon kompleksindeki fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında gerçekleşen etkileşimler, MIP'lere baskılanmamış polimerlere (NIP'ler) göre olağanüstü tanıma kabiliyeti sağlamaktadır. Diğer geleneksel sorbentlere göre MIP'lerin avantajı, numunenin bulunduğu matriste analite maruz kalması durumunda söz konusu etkileşimlerin kolay bir şekilde tekrar kurulabilmesinden kaynaklanmaktadır [73]. Kromatografi [84,85], sensörler [86,87], ilaç taşınımı [88,89] ve kataliz [90,91] dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalarda kullanılan MIP'ler, numune ön işleme ve ön-derişim için seçici ekstraksiyon aşamaları olarak uygulanabilir.

2.5.2. Moleküler Baskılama Tekniğinin Temel Bileşenleri

2.5.2.1. Kalıp Molekül

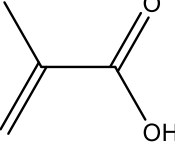
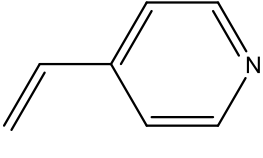
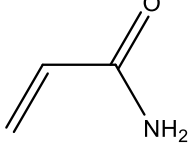
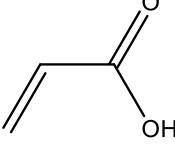
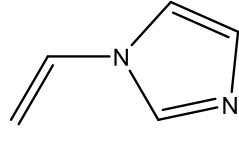
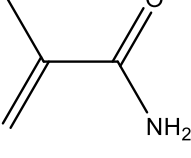
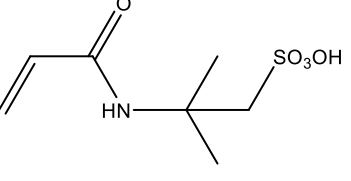
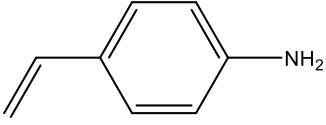
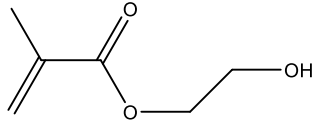
Etkin ve verimli bir MIP sentezi gerçekleştirmek için kimyasal reaktiflerin uygun bir şekilde amaca yönelik seçilmesi önem arz etmektedir. İlaçlar, amino asitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar ve koenzimler gibi çok çeşitli kalıp biyomoleküller başarıyla kullanılmıştır.

Çift kalıplı yaklaşımda sentez sürecinin bir veya daha fazla kalıp biyomolekül ile gerçekleştirilmesi, eş zamanlı daha fazla hedef molekülü bağlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu yaklaşım sayesinde, uzun zaman gerektiren ekstraksiyon işlemlerinde karmaşık örneklerin işlenmesine yönelik geliştirilen tek kalıp biyomolekülün kullanıldığı MIP sistemlerinin getirdiği dezavantajların üstesinden gelinebilmektedir [92].

2.5.2.2. Fonksiyonel Monomerler

Fonksiyonel monomerler yalnızca kalıp moleküle özgü boşlukların oluşturulmasında kritik role sahiptir. Heteroaromatik bazlar, karboksilik ve sülfonik asitler olmak üzere MIP sentez sürecinde sıklıkla başvurulan fonksiyonel monomerler Çizelge 2.1'de verilmiştir. Baskılanmış materyalleri sentezlemek için en iyi monomerler, kalıp molekül-monomer etkileşimlerinin gücü ve doğası dikkate alınarak seçilmektedir [93].

Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan monomerlerin yapısal formülleri [93].

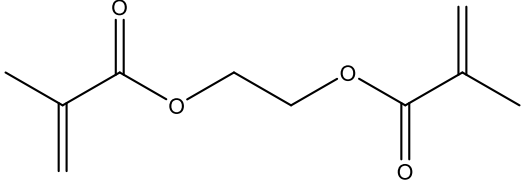
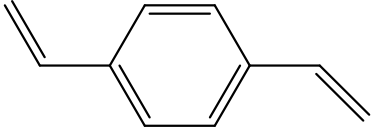
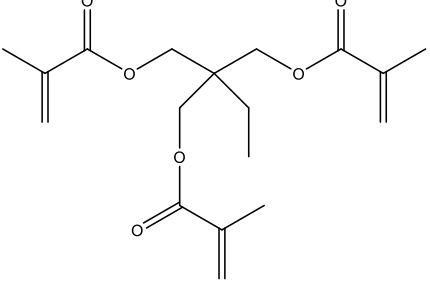
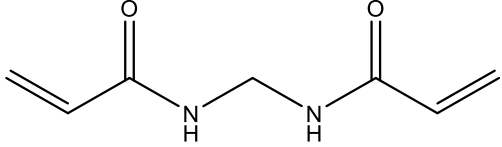
Asidik kalıntı taşıyan monomerler	Bazik kalıntı taşıyan monomerler	Nötral monomerler
 <p>Metakrilik asit</p>	 <p>4-Vinilpiridin</p>	 <p>Akrilamid</p>
 <p>Akrilik asit</p>	 <p>1-Vinylimidazol</p>	 <p>Metakrilamid</p>
 <p>2-Akrilamido-2-metil-1-propan sülfonik asit</p>	 <p>p-Aminostiren</p>	 <p>2-Hidroksietil metakrilat</p>

2.5.2.3. Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcı ajanlar, moleküler baskılanmış bölgelerin kararlılığına ek olarak polimerik yapının morfolojik yapısının kontrolü ve mekanik kararlılık hususunda MIP sentez sürecine önemli katkılar sağlamaktadır. Bu kapsamda başvurulan tipik çapraz bağlayıcı ajanlar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Mekanik kararlılığı yüksek makro gözenekli yapıların sentez sürecinde uygulanan çapraz bağlama oranları genellikle yüksek olmaktadır. Trimetilol propan trimetakrilat (TRIM) ile etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) karşılaştırmasında, TRIM'in tercih edildiği uygulamalarda polimerik yapının daha sert bir yapısal düzen ve daha etkili bağlanma bölgeleri ile sonuçlandığı belirtilmiştir [94].

Çizelge 2.2. Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcıların yapısal formülleri [73].

 <p>Etilen glikol dimetakrilat</p>	 <p>Divinilbenzen</p>
 <p>Trimetilolpropan trimetakrilat</p>	 <p>N,N'-Metilenbisakrilamid</p>

Tipik olarak çapraz bağlayıcı, polimerlerin fiziksel özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir; kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki spesifik etkileşimler üzerinde ise çok daha az etkiye sahip olduğu bulunmuştur [95]. MIP sentez sürecinde çapraz bağlayıcı seçiminin verim ve parçacıkların nihai boyutu hususunda güçlü etkileri söz konusudur. Çapraz bağlayıcı ajan olarak divinilbenzen (DVB) tercih edilen çalışmalarda MIP parçacıklarının düşük verimle elde edildiği, aksine TRIM'in uygulandığı çalışmalarda yüksek verim (%90) ve tek tip parçacıkların elde edildiği bildirilmiştir [96,97].

2.5.2.4. Çözücüler

MIP sentez sürecinde kullanılan çözücülerin polimer matriksindeki gözenekli yapının oluşmasına katkıda bulunmalarından dolayı çözücünün “porojen” şeklinde ifade edilmesi, sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Ayrıca porojenler, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında gerçekleşen kompleksin oluşmasında önemli rol oynamaktadırlar. Genellikle tercih edilen porojenlere kloroform, asetonitril, toluen ve diklorometan örnek gösterilebilir. Kovalent olmayan baskılama yaklaşımında, toluen veya kloroform gibi daha az polar olarak ifade edilen çözücüler hidrojen bağları gibi polar kovalent olmayan etkileşimleri kolaylaştırmakta ve böylelikle kompleks oluşumunun artması yönünde etki etmektedirler. Başka bir ifadeyle, metanol, asetonitril veya su gibi daha polar olarak tanımlanan çözücüler ön polimer kompleksindeki kovalent olmayan etkileşimleri ayırma yönünde eğilim göstermektedirler [94]. Etkin bir MIP hazırlanırken kalıp molekül-monomer etkileşimleri güçlü bir şekilde elde edildiğinde polar porojenler uygulamalarda herhangi bir problem olmaksızın tercih edilebilmektedir [98].

2.5.3. MIP'ler İçin Sentez Stratejileri

Polimerik yapıda bulunan kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında gerçekleşen etkileşimler aşağıda verildiği üzere üç başlık altında incelenmektedir.

2.5.3.1. Kovalent Baskılama

Bu yaklaşımda, polimerizasyon için gerekli ön polimerizasyon kompleksini elde etmek amacıyla kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent bağlar oluşturulmaktadır. Daha sonra kimyasal bir tepkime sayesinde kalıp molekül uzaklaştırılmakta ve sonraki analizlerde elde edilen MIP'ler, kovalent bağları kullanarak kalıp molekülü yeniden bağlamaktadır [99].

Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki sabit sitokiyometrik oran sayesinde MIP'lerde homojen boşluklar ve özgül bağlanma bölgeleri elde edilmektedir [100]. Yüksek kararlılık sağlamanın yanı sıra kalıp molekülün salınması ve bağlanmasının yavaşlığı ve zorluğu, bu yöntemin dezavantajları arasındadır. Ek olarak, tersinir

kovalent etkileşimler gerçekleştirebilecek uygunluğa sahip kalıp molekül ve fonksiyonel monomerlerin sınırlı oluşu bu yaklaşım ile ilgili bir diğer olumsuzluktur [101].

2.5.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Kalıp molekül ve monomer arasındaki kovalent olmayan etkileşimler (örneğin, hidrojen bağı, iyon çifti veya dipol etkileşimleri) tarafından oluşturulan MIP'ler, monomer-kalıp molekül kompleksinin oluşumunu teşvik etmek için sıklıkla fazla miktarda monomer kullanılmaktadır [100]. Kullanılan monomer miktarının fazla olması sonucunda spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşabilmektedir. Sürecin hızlı oluşu, kalıp molekülün kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi ve çok çeşitli hedef moleküllere uygulanabilmesi bu yaklaşımın avantajları arasında yer almaktadır [81,102].

2.5.3.2. Yarı Kovalent Baskılama

Kovalent ve kovalent olmayan baskılama yaklaşımlarının kombinasyonu sonucu ortaya çıkan yarı kovalent baskılama yaklaşımında kalıp moleküller, fonksiyonel monomere kovalent bağlanarak seçiciliğin artması sağlanmaktadır. Kovalent baskılamanın bir dezavantajı olan uzun denge süresinin olumsuz etkisi, analiz boyunca hedef analitin kovalent olmayan etkileşimler ile yeniden bağlanması sayesinde ortadan kaldırılmaktadır [103]. Ayrıca bu yaklaşımla elde edilmiş MIP'ler organik ve inorganik olmak üzere polimerik ağlara hızlı kütle aktarımı gerçekleştirmeye ek olarak daha homojen bağlanma bölgeleri sergilemektedirler.

2.5.4. MIP'lerin Performanslarının Değerlendirilmesi

Elde edilen MIP'lerin performansını belirlemek hususunda denge adsorpsiyon kapasitesi başta olmak üzere adsorpsiyonun karakteristik özelliklerine dikkat edilmelidir. Bu amaçla denge adsorpsiyon kapasitesinin sağlanabilmesi için sentezlenen MIP'ler sulu matrislerde [104] veya asetonitril (ACN) [105], metanol (MeOH) [106], diklorometan (DCM) [107] gibi organik çözücülerde veya su ile karıştırılmış bir organik çözücü ile [108] yeterli süre boyunca hedef molekül ile etkileştirilmektedir.

Sözü edilen denge kapasitesi (Q_e), aşağıda verilen eşitlik (1) aracılığıyla hesaplanmaktadır [109]:

$$Q_e = (C_0 - C_e) \times V/m \quad (2.1)$$

Bu eşitlik kapsamında, çözeltideki hedef molekülün başlangıç derişimi C_0 , denge derişimi ise C_e olarak tanımlanmaktadır. Adsorpsiyonda kullanılan polimerin kütlesi m , numune hacmi V ile ifade edilmektedir. Hazırlanan MIP'lerin adsorpsiyon sürecindeki seçicilik özellikleri baskılama faktörü (IF) ile değerlendirilmektedir (eşitlik (2)):

$$IF = Q_{MIP}/Q_{NIP} \quad (2.2)$$

Bu eşitlik kapsamında, hedef molekülün MIP'ler üzerindeki denge adsorpsiyon kapasitesi Q_{MIP} , NIP'ler üzerindeki denge adsorpsiyon kapasitesi Q_{NIP} olarak tanımlanmaktadır [110]. Yüksek bir IF, NIP'lerin performansı tarafından tahmin edilen seçici olmayan bağlanma için bölgelerin çok fazlasında analitleri seçici olarak bağlayan bölgelerle baskılamanın başarılı olduğunu göstermektedir.

Sentezlenen MIP'lerin seçicilik açısından değerlendirilmesi amacıyla hedef moleküle benzer başka bileşiklerin adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilebilmektedir. Aşağıda verilen eşitlikler ile söz konusu yarışmacı moleküller ve hedef molekülün afinitesi değerlendirilebilmekte ve k_d dağılım katsayısını, k seçicilik katsayısını ve k' bağıl seçicilik katsayısını ifade etmektedir [81]:

$$k_d = Q_e/C_e \quad (2.3)$$

$$k = k_{d(\text{hedef molekül})}/k_{d(\text{yarışmacı molekül})} \quad (2.4)$$

$$k' = k_{MIP}/k_{NIP} \quad (2.5)$$

2.6. Kriyojeller

Poli(vinil alkol) (PVA) temelli olmak üzere kriyojeller ilk olarak Japonya'da ve ayrıca bağımsız olarak 1970'lerin ilk zamanlarında Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği'nde sentezlendiği bilinmektedir. PVA'nın sahip olduğu viskoelastik özelliklerin bazı insan dokularına benzemesinden yola çıkılarak koroner arter ve üretra olmak üzere iç dokuların modellenmesi ve iç hastalıkların teşhisi amacıyla invaziv olmayan teknikler geliştirilmesi söz konusudur [111].

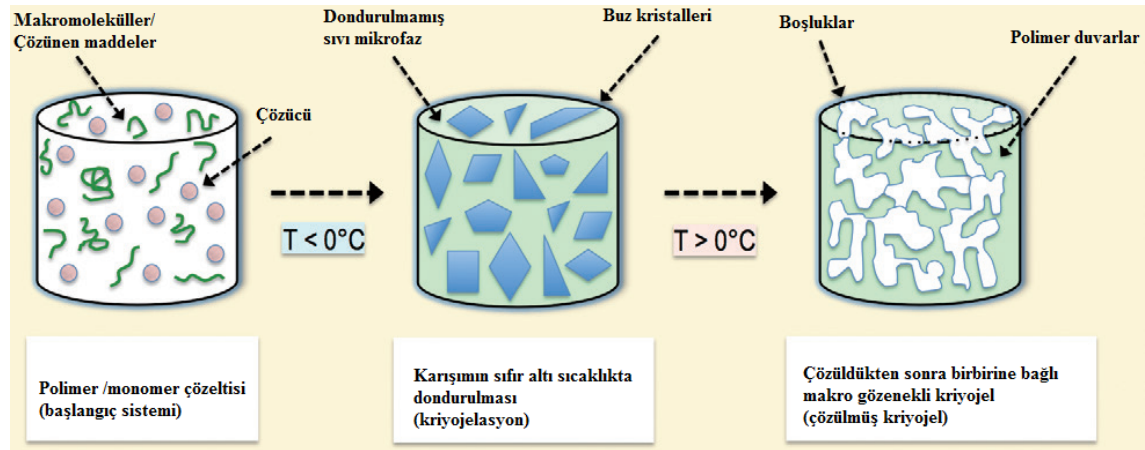
Kriyojeller hedef biyomoleküllerin kimyasal olarak bağlanmasını ve seçici bir şekilde tanınmasını sağlayan spesifik ligandlara sahiptir. Bu nedenle spesifik adsorpsiyon, doku mühendisliği için iskeleler, biyokataliz ve biyoayırma başta olmak üzere biyomedikal ve biyoteknoloji uygulamaları açısından kriyojeller önemli malzemelerdir. Biyoligandlar ile kriyojellerin kopolimerizasyonu iki farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bunlardan ilki hidrosietilmetakrilat (HEMA) ve akrilamid gibi yapısal monomerlerin, kimyasal olarak reaktif fonksiyonel grup taşıyan alil glisidil eter gibi fonksiyonel monomerler ile kopolimerizasyonu sağlandıktan sonra arzu edilen modifikasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesidir. İkinci yaklaşımda ise amaca yönelik liganda sahip monomerler ile doğrudan kopolimerizasyon gerçekleştirilmektedir [112].

Kriyojel hazırlama, buz kristallerinin oluşumu tamamlandıktan sonra kopolimerizasyon ve üç boyutlu çapraz bağlı polimerik ağ oluşumunun gerçekleşmesini sağlamak için dikkatlice ayarlanmalıdır. Sıcaklık, çapraz bağlayıcı ve monomer derişimi aynı olsa dahi katı fazda bulunan çözücü kristallerinin kafes yapılarının farklı olmasından dolayı farklı gözenekliliğe sahip kriyojel yapıları elde edilebilmektedir. Sentezin gerçekleşeceği sıcaklık çözücü seçimine bağlılık göstermektedir. Kriyojelin sentez aşamasında arzu edilen sıcaklık -6 ila $+10$ °C gibi yüksek bir sıcaklık ise burada çözücü olarak su yerine dimetil sülfoksit veya 1,4-dioksan tercih edilebilmektedir. Son aşamada radikal polimerizasyon başarıyla tamamlandıktan sonra kriyojel yapısından çözücünün uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Sentez aşaması yüksek oranda çapraz bağlı polimer ağ içerisinde oldukça gözenekli bir kriyojel yapısı ile sonuçlanmaktadır.

Kriyojel sentez yöntemleri ele alındığında serbest radikal polimerizasyon [113,114], ışınlama (UV ışınması, elektron ışını, gama ışınları) [115], kendi kendine toplanma bazlı jel oluşumu [116], kriyo-koşullar altında polikondenzasyon tepkimesi [117–119], enzimatik kataliz [120], iyonik etkileşimler veya metal-polimer koordineli bağlar [119,121] gibi birçok yöntem ile kriyojel sentez uygulamaları literatürde bildirilmiştir.

2.6.1. Kriyojellerin Sentezi ve Fiziksel Özellikleri

Sıfırın altındaki sıcaklıklarda gerçekleşen kriyojelasyon sürecinde porojen görevini yerine getirecek çözücü kristallerine başvurulmaktadır. Kriyojelasyon işleminde çözücü kristallerinin erimesiyle birbirine bağlı makro gözenekli yapılar elde edilmektedir (Şekil 2.7). Söz konusu teknik, kaynak kullanımı ve zaman yönetimi kapsamında sergilediği üstünlükler sayesinde diğer teknikler arasında öne çıkmaktadır [122,123]. Çözücü görevinde sıklıkla suyun kullanılmasından dolayı çevre dostu ve maliyeti düşük olan bir yöntem olmasına ek olarak uygulama amacına yönelik sentez parametrelerinin kolay bir şekilde ayarlanabilir olması kriyojelasyon işleminin sağladığı diğer avantajlar arasında yer almaktadır [124].



Şekil 2.7. Kriyojelasyon sürecinin şematik gösterimi [125].

Özetle kriyojelasyon işleminde, su içeren bir çözücü içerisinde monomer ve/veya polimerler karıştırıldıktan sonra jelleşme ve/veya kriyopolimerizasyon sürecinin başlatılması için elde edilen karışımın sıfırın altındaki sıcaklıklarda inkübasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu aşamada, buz kristalleri oluşumu gözlenmekte ve bu buz

kristalleri polimerik yapıda porojen görevini üstlenmektedir. Jelleşme tamamlandıktan sonra polimer karışımı oda sıcaklığına getirildiğinde oluşan buz kristalleri erimekte ve sonuçta birbirine bağlı makro gözenekli kriyojel yapısı elde edilmektedir. Ayrıca kriyojeller, polimerik yapıdaki safsızlıkları ve tepkimeye girmemiş monomer ve polimer öncülerini uzaklaştırmak amacıyla birçok kez saf su ile yıkanmaktadır [125].

Kriyojeller biyomedikal araştırma alanında devrim yaratmıştır. Yüksek su içeriği, önemli gözenek boyutu ve gözenekliliğe ek olarak yüksek gözenek bağlantısı dahil olmak üzere bir dizi benzersiz kriyojel özelliği, onları doğal yumuşak dokulara çok benzetmektedir. Makro gözenekli kriyojellerin geniş gözenekli yapıları, düşük geri basınca neden olmakta ve böylece yüksek viskoziteye sahip ortamlarda çalışma problemini ortadan kaldırmaktadır. Kriyojellerdeki birbiri ile bağlantılı makro gözenekler difüzyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesine, nano veya makro boyuttaki partiküllerin kütle transferine katkıda bulunmaktadırlar [126,127].

Gerçekleştirilecek uygulamanın amacına yönelik olacak şekilde kriyojellerin özellikleri ayarlanabilmekte ve birbirinden farklı morfolojilere sahip kriyojeller sentezlenebilmektedir. Gözenek duvar kalınlığı, şişmiş gözenek duvarlarındaki polimer derişimine karşılık gelen gözenek yoğunluğuna ek olarak temelinde birbirine bağlanabilirlik, gözenek boyutu ve gözenek boyutu dağılımı olan gözenek yapıları kriyojel özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Jel yapısındaki kütle aktarımının kontrolü, toplam gözenek hacmi olarak ifade edilen gözenek boyutu ve gözenek ara bağlantılarının koordinasyonu ile sağlanmaktadır. Sentezlenen kriyojelin mekanik özellikleri ise gözenek yoğunluğu ve gözenek duvar kalınlığı ile bağlantılı olmaktadır [128,129].

Kriyojellerin ciddi deformasyon koşulları altında dahi oldukça güçlü bir yapı sergilemeleri ve çok elastik malzemeler olmaları, onları diğer makro gözenekli yapılara sahip malzemelerden üstün hale getirmektedir. Ayrıca, sergiledikleri mekanik kararlılık sayesinde gözenekli yapıları kayda değer şekilde zarar görmeden sahip oldukları ilk hacmin en az %50'si kadar tekrar tekrar sıkıştırılmaları mümkün olmaktadır [130,131].

2.6.2. Kriyojellerin Fiziksel Özelliklerine Etki Eden Parametreler

Çok çeşitli özellikler sergileyen kriyojeller elde edebilmek amacıyla soğutma hızı ve polimerizasyon sıcaklığına ek olarak çözücü ve polimer içeriği gibi parametrelerin optimizasyonu yapılarak kriyojelasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Örnek olarak bu parametreler arasında çözücü seçimi ele alındığında, kriyojelasyon sürecinde donma noktasının etkilenmesi üzerine gözeneklilik ve polimer duvar kalınlığının da etkilenebileceği düşünülmektedir. Bir başka benzer durum ise tuz varlığıdır. Ortamdaki tuz varlığının buz kristali çekirdeklenmesinin azalması yönünde etkilediği veya değişimine yol açtığı belirtilmektedir [132].

2.6.2.1. Sıcaklığın Etkisi

Farklı polimerizasyon sıcaklıkları kullanılarak, polimer duvar kalınlığının yanı sıra gözenek boyutu, dağılımı, yönelimi ve bağlantısı kontrol edilebilmektedir. Kriyojelasyon sürecindeki faz ayrımında ve dolayısıyla fiziksel özelliklerin tanımlanmasında kritik rol oynayan sıcaklık etkisidir. Bu kapsamda, polimerik yapıda büyük gözenekler amaçlandığında olabilecek en düşük soğutma hızı ve en yüksek donma sıcaklığı göz önüne alınarak sentez süreci tasarlanmalıdır. Öte yandan, kriyojel içinde küçük gözenekler oluşturmak için dondurmanın yüksek bir soğutma hızında ve mümkün olan en düşük donma sıcaklığında gerçekleşmesi gerekmektedir. Söz konusu etkiler donmamış sıvı faz ile buz kristalleri arasında bulunan tabaka kalınlığı ile açıklanmaktadır [133–135]. Klasik çekirdeklenme teorisi kapsamında, düşük kriyojelasyon sıcaklıklarında kristalleşme hızı artmasından dolayı çok sayıda daha küçük çözücü kristallerinin çekirdeklenmesi gözlenmektedir. Sentez süreci tasarlanırken gözenek boyutunun maksimum olacağı optimum donma sıcaklığı hususunda özen gösterilmelidir [136,137].

2.6.2.2. Soğutma Hızının Etkisi

Kriyojel sentez sürecinde, polimer çözeltisinde buz kristallerinin oluşmasını sağlayan faz ayrımının yanı sıra suyun donma sıcaklığını düşürebilen monomerlerin bulunması, yüksek düzeyde birbirine bağlı makro gözenekli yapı oluşumunu kısıtlayabilmektedir. Benzer şekilde, polimerik yapıda porojen olarak görev yapan buz kristallerinin

oluşumundan çok daha hızlı gerçekleşen çapraz bağlanmadan kaynaklı hedeflenen makro gözenekli yapı elde edilemeyip süreç nano gözenekli yapılar ile sonuçlanabilmektedir. Bu aşamada, çapraz bağlanma hızı yavaşlatılarak buz kristallerinin oluşmasına ve büyümesine imkan sağlanmalıdır [138].

Kriyojel yapısındaki gözenek dağılımı ve gözenek boyutuna etki eden polimer çözeltisinin başlangıç sıcaklığı ile soğutma hızının doğrudan ilişkili olduğu unutulmamalıdır [139].

Kısaca, polimer çözeltisinin başlangıç sıcaklığı artırıldığı zaman bu sıcaklık ile kriyojelasyon sıcaklığı arasındaki fark artmaktadır. Bu durum daha çok buz kristallerinin oluşmasına dolayısıyla da kriyojel yapısındaki gözenek boyutunun daha küçük olması ile sonuçlanmaktadır. Başka şekilde ifade etmek gerekirse, kriyojel sentez sürecinde soğutma hızının daha düşük olması durumunda, daha büyük buz kristalleri oluşumuyla beraber yüksek oranda birbirine bağlı makro gözenekli yapılar elde etmek mümkün hale gelmektedir [132].

2.6.2.3. Ön Polimer Çözeltisinin Etkisi

Çözücü bileşenleri ve polimer türü bağlamında ön polimer çözeltisinin sentezlenen kriyojellerin fiziksel özellikleri üzerindeki etkisi oldukça önem taşımaktadır. Örneğin, iyonik polimerler nötr olanlardan farklı davranırlar, polimerin moleküler ağırlığının yanı sıra derişimi de viskoziteyi etkileyebilmektedir [138].

Kriyojel sentez sürecinde polimer derişiminin sabit olduğu düşünöldüğünde genellikle daha düşük moleküler ağırlıklı polimerlerin daha büyük gözenekli yapıya sahip olduğu gözlenmektedir [140]. Elde edilen bu sonuçlar, polimerin moleküler ağırlığının artması durumunda ortamdaki serbest su miktarının azalması prensibine dayanan Mark-Kuhn-Houwink denklemi ile desteklenebilmektedir. Sonuçta daha kalın polimer duvarlarına ve daha küçük gözenekli yapıya sahip kriyojeller elde edilmektedir [141]. Dahası, kriyojelin sahip olduğu gözenek boyutlarının azalmasında bir diğere etken, moleküler ağırlığı sabit olan bir polimer ele alındığında polimer derişiminde gerçekleşen artış ile

beraber çapraz bağlanabilen grupların artması ve dolayısıyla serbest su miktarında azalma gözlenmesidir [142].

Sıklıkla kullanılan suyun yanı sıra başka (ko-)çözücülerin ön polimer çözeltisine eklenmesi durumunda çözeltinin donma noktası etkilenecek ve buna bağlı olarak donmamış sıvı faz kalınlığı değişkenlik gösterecektir. Bu parametreler bağlamında sentezlenen kriyojellerin çapraz bağlama yoğunluğu, polimer duvar kalınlığı ve gözenek boyutu açısından birbirinden farklı, adapte edilebilir fiziksel özellikleri olduğu gözlemlenecektir [140]. Bir başka etken de küçük derişimlerde tuz ilavesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu gibi durumlarda donma noktasının düşmesine bağlı olarak buz kristalleri çekirdeklenmesi de azalmakta ve sonuçta bağlanabilirlik ve kriyojel yapısının sahip olduğu gözenek boyutu da farklılık göstermektedir [138].

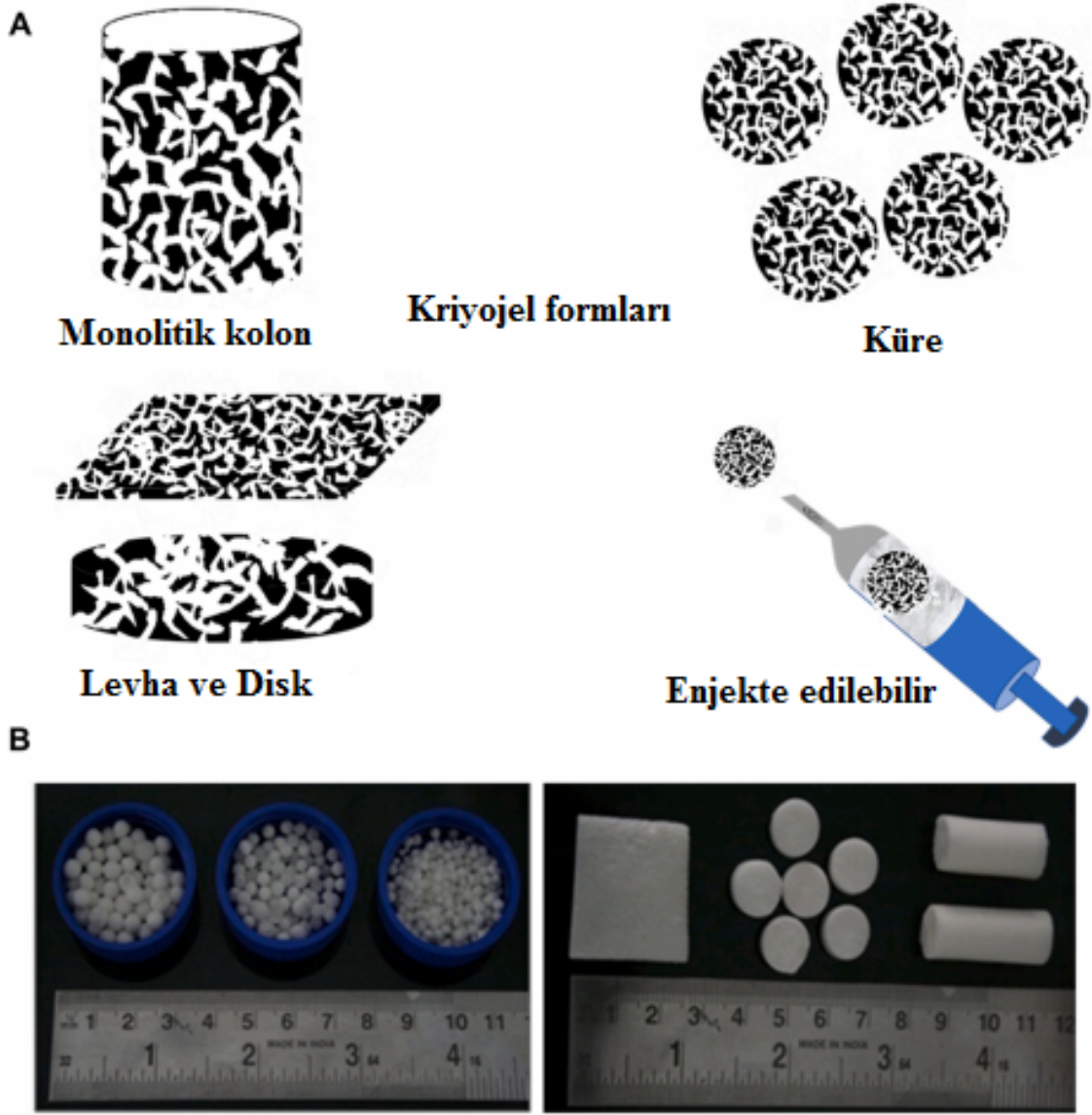
Çizelge 2.3. Çeşitli parametrelerin kriyojel özellikleri üzerindeki etkisi [132].

Parametreler	Etkileri
Çapraz bağ türü	Fiziksel çapraz bağlar: Mukavemeti çözülme hızıyla ters orantılı olan yeterince büyük gözeneklere sahip jeller ile sonuçlanır. Kimyasal çapraz bağlar: Sahip oldukları potansiyel sitotoksitelerine rağmen yeterli düzeyde büyük gözenekli jeller ile sonuçlanır.
Kriyojelleşme sıcaklığı	Artırıldığında: Gözenek yoğunluğu ve duvar kalınlığına ek olarak gözenek boyutunun artışı ile sonuçlanır.
Polimer molekül ağırlığı	Artırıldığında: Jel yapısındaki sertliğin artışı ile sonuçlanır. Azaltıldığında: Artan gözenek boyutu ile sonuçlanır.
Kriyo-konsantrasyon	Artırıldığında: Artan esneklik ile sonuçlanır. Azaltıldığında: Artan jelleşme süresi ile sonuçlanır.
Soğutma hızı	Artırıldığında: Azalan gözenek boyutu ile sonuçlanır.

2.6.3. Mikrokriyojeller

Süngerimsi yapıları ve yüzey alanları, kriyojellerin kromatografi matrisleri, yapı iskeleleri, ilaç taşınımı ve kontrollü salım sistemleri, yapay antikorlar ve biyoreaktörler olarak kullanımına uygun olduğunu kanıtlamıştır [143]. Kriyojeller yüksek kütle aktarımı yapabilme özelliğinden dolayı kromatografik kolonlarda yüksek saflık ve hızla ayırma işlemlerini gerçekleştirmek için uygun malzemelerdir [144,145]. Kriyojeller

disk, monolitik kolon, çubuk, toz ve küre şeklinde tasarlanabilen gözenek boyutu uygulamaya göre ayarlanabilen yapılardır (Şekil 2.8) [146,147].



Şekil 2.8. Kriyojeller çeşitli şekil, boyut ve formatlarda üretilebilir. (A) Küre, disk, levha, monolit ve enjekte edilebilir olmak üzere farklı şekil ve boyutlardaki kriyojellerin şematik gösterimi. (B) Monolit, disk, levha ve farklı boyutlardaki küreler şeklinde sentezlenen kriyojellerin dijital görüntüleri [148].

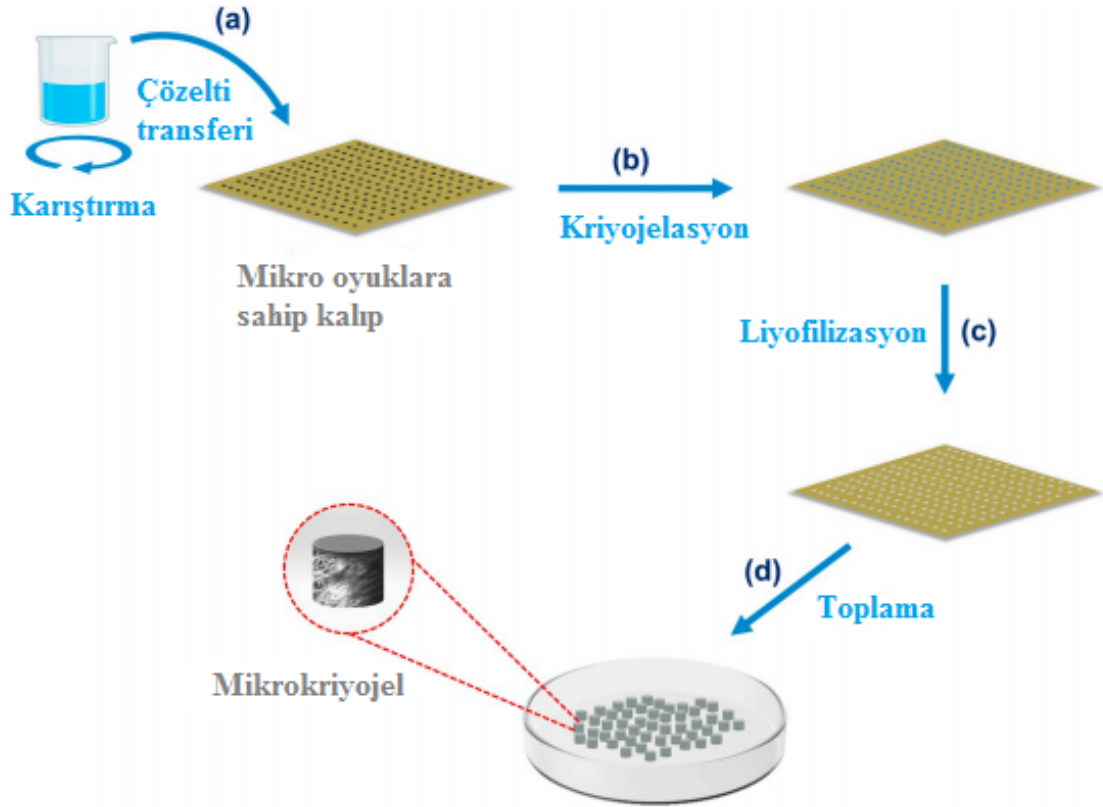
Kriyojeller tipik olarak birbirine bağı makro gözenekli yapılar sergilerler, moleküllerin, parçacıkların ve hatta hücrelerin engelsiz difüzyonuna izin vermelerinin yanı sıra, sahip oldukları olağanüstü elastikiyet ile birlikte deformasyondan sonra şekil iyileşmesine olanak sağlamaktadırlar [4].

Bu avantajlara rağmen makroskopik boyutlu yapıya sahip kriyojellerin invazif olmayan cerrahi işlemlerine uygulanamaması, bu malzemelerin işlevselliğini kısıtlamaktadır. Bu durumun üstesinden gelmek amacıyla hazırlanan ve hasta ile uyumu oldukça yüksek olan enjekte edilebilir kriyojeller sayesinde enfeksiyon riski ve iyileşme süresi en aza indirgenerek maliyeti düşük tedavi hizmeti sağlanabilmektedir. Ek olarak, bu kriyojellerin bir iğne yoluyla enjekte edilebilmesi ve enjeksiyondan sonra şekillerini geri kazanabilmesi, cerrahi implantasyon veya yerinde jelleşme ihtiyacını ortadan kaldırdığı için avantajlıdır [146].

Son yıllarda, alternatif olarak süngerimsi kriyojeller, biyomedikal uygulamalar için yetkin bir enjekte edilebilir sistem olarak ortaya çıkmıştır. Bu tür sistemleri oluşturmak için kullanılan malzemelerin uyması gereken bazı standartlar söz konusudur. Biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumlu, implante edilebilir, biyomimetik olmalı, hücre çoğalmasını artırmalı, sürekli ve uzun süreli ilaç salım kapasitesine, yüksek sıvı emme yeteneğine ve engelsiz besin akışı veya toksinlerin uzaklaştırılmasını sağlamalıdır. Kriyojeller, esnekliği, süngerimsi yapısı, mekanik stabilitesi ve sağlamlığının yanı sıra şekil hafızası özellikleri nedeniyle enjekte edilebilir sistem olarak umut verici adaylardır [148].

Kriyojellere benzer özelliklere sahip enjekte edilebilir kriyojeller, şekil hafızası özellikleri ve sünger benzeri makro gözenekli yapısal özellikleri ile hücre ve amaca yönelik ligandların immobilizasyonu ile kolaylıkla tanınarak vücut tarafından kabul edilebilmektedir. Bundan dolayı, biyomedikal alanında çok çeşitli uygulamalarda ideal biyomateryaller olarak kriyojellere başvurulmaktadır [149].

Mikro boyutlu kriyojeller olan mikrokriyojellerin günümüzde giderek artan uygulamalarından bazıları manyetik olarak kontrol edilebilir 3D mikro dokular, ilaç taraması, rejeneratif tedavi, immünoafinite adsorban ve enjekte edilebilir hücre taşıyıcıları başta olmak üzere literatürde yerini almıştır (Şekil 2.9) [146].



Şekil 2.9. Mikrokriyojellerin üretim aşamalarının gösterimi. (a) Polimer çözeltisi karıştırıldıktan sonra mikro oyuklara sahip kalıba aktarılır, (b) Kriyojelasyon işlemi yapılır, (c) Liyofilize işlemi gerçekleştirilir, (d) Birbirine bağlanmış üç boyutlu makro gözenekli ağa sahip mikrokriyojeller toplanır [150].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

- N-Metakriloil-(L)-glutamik asit (MAGA) fonksiyonel monomerinin sentezlenmesi, karakterizasyonu ve ön kompleksin hazırlanması,
- Mikrokriyojellerin sentezleneceği mikrostensil kalıpların hazırlanması,
- Trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokriyojellerin sentezlenmesi ve karakterizasyon çalışmaları,
- Hazırlanan mikrokriyojeller ile trombin adsorpsiyon çalışmaları ve kinetik analizleri,
- Hazırlanan mikrokriyojellerin seçiciliğinin ve tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması,
- Hazırlanan mikrokriyojeller ile sulu çözeltiden trombin saflaştırılmasına yönelik FPLC çalışmaları.

3.1. Kimyasal Malzemeler

Trombin, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), N,N'-metilen bisakrilamid (MBAAm), amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin (TEMED), lizozim (LYS), hemoglobin (Hb), sığır serum albumin (BSA) ve trietanolamin Sigma (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Diğer tüm kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Deneyleerde kullanılan su, bir Barnstead (Dubuque, Iowa, ABD) ROpure LP® ters osmoz ünitesi ile saflaştırılmıştır.

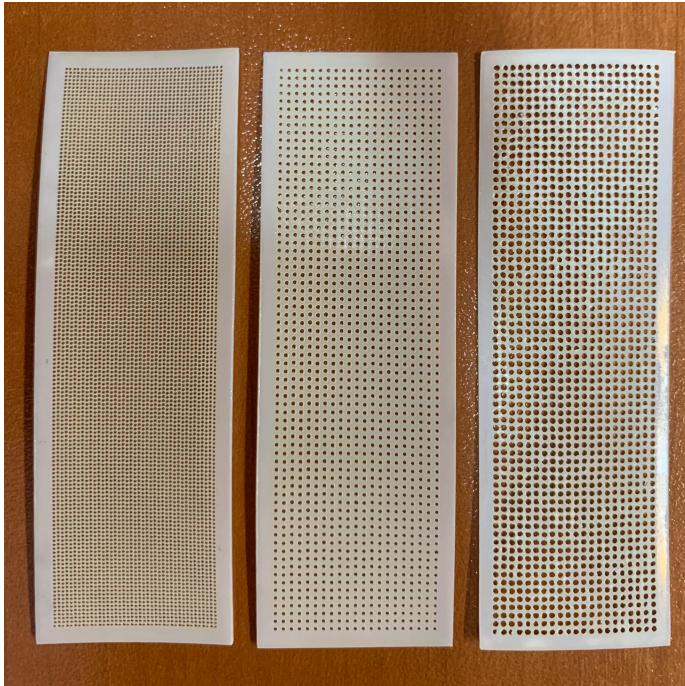
3.2. Moleküler Baskılanmış Mikrokriyojellerin Sentezi

3.2.1. Mikrostensil Kalıpların Tasarımı ve Üretimi

Trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokriyojellerin sentezi için mikrostensil kalıplar kullanılmıştır. Bunun için mikrokriyojellerin hazırlanmasında kullanılmak

üzere optimum kalınlıkta malzemeler denenmiştir. Mikrostensil kalıplar (7,4 cm x 2,4 cm) AutoCAD 2018 yazılımı aracılığıyla tasarlanmış ve BYLaser lazer sistemi (arayüz programı RDWorks8, BYLaser, EBY1610/2, Çin) kullanılarak üretilmişlerdir.

Mikrostensil kalıplar farklı boyutlarda ve farklı geometrilere hazırlanabilmektedir. Tez çalışması kapsamında, mikrokriyojellerin sentezleneceği bu malzemelerin yüzeylerine dairesel geometrilere sahip 400-650 µm aralığında mikro kuyucuklar oluşturulmuş olduğu SEM ölçümleri ile belirlenmiş ve farklı boyutlarda mikrostensil kalıplar elde edilmiştir (Şekil 4.3). Ayrıca elde edilen mikrostensil kalıplardaki kuyucukların çapı Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler büyük mikrostensil, orta mikrostensil ve küçük mikrostensildeki kuyucuklar için sırasıyla $647\pm 14,18$ µm; $504\pm 20,66$ µm ve $428\pm 18,14$ µm olarak bulunmuştur.



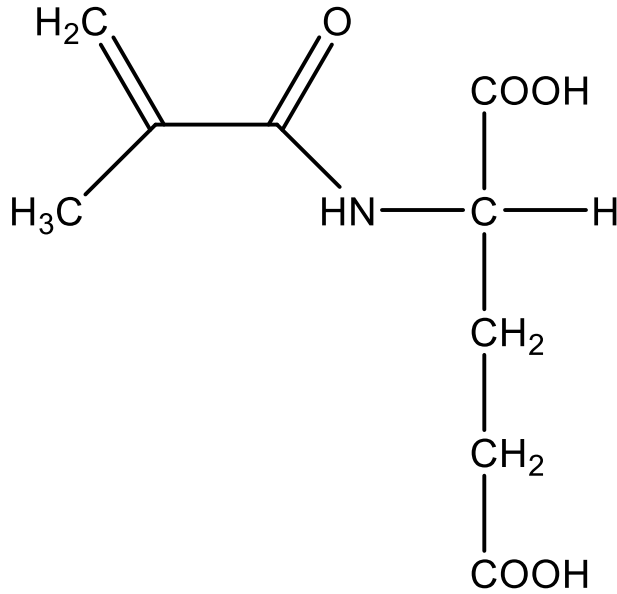
Şekil 3.1. Lazer ile farklı boyutlarda hazırlanmış mikrostensil kalıplar.

3.2.2. N-Metakriloil-(L)-glutamik asit (MAGA) monomerinin sentezi

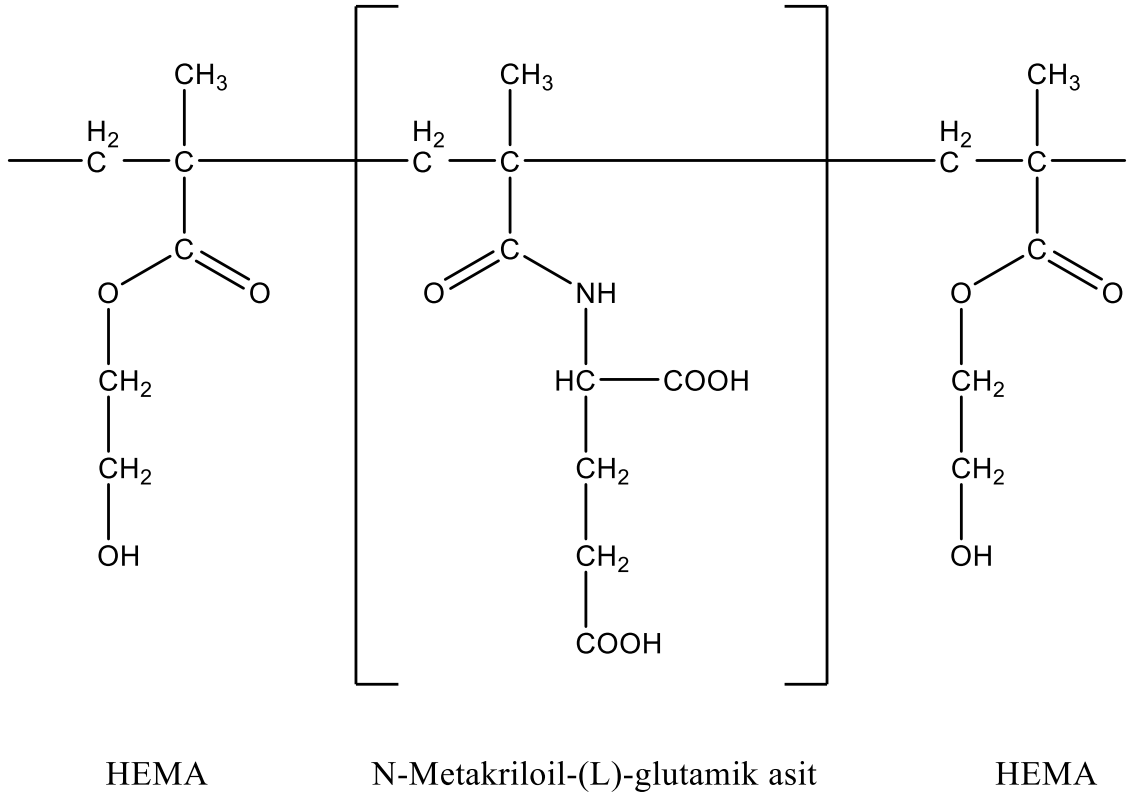
MAGA monomerinin sentezi için belirtilen deneysel adımlar uygulanmıştır: İlk adımda 5,0 g L-glutamik asit ve 0,2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan çözeltisi içinde

çözümüştür. Elde edilen çözeltinin 0°C'ye kadar soğutulması sağlanmıştır. Bir sonraki adımda çözeltiliye ilk olarak 13,0 g trietilamin ilavesi ve ardından nitrojen atmosferi altında 4,0 mL metakriloil klorür ilavesi yavaşça gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözelti, 2 saat boyunca oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Kimyasal tepkime tamamlandıktan sonra tepkimeye girmemiş metakriloil klorürün, %10 NaOH ile ekstraksiyonu sağlanmıştır. Son adımda sulu faz, bir döner buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırılmış ve çökelti etanol içinde çözülmüştür [151].

MAGA monomerine ait moleküler formülün gösterimi Şekil 3.2.'de, p(HEMA-MAGA) mikrokriyojellere ait moleküler formülün gösterimi Şekil 3.3.te sunulmuştur.



Şekil 3.2. N-Metakriloil-(L)-glutamik asit (MAGA) monomeri.



Şekil 3.3. p(HEMA-MAGA) mikrokriyojeller [151].

3.2.3. Ön Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması

Trombin (Trb) baskılanmış mikrokriyojellerin sentezi için öncelikle fizyolojik serumda çözülmüş farklı oranlarda Trb ve MAGA monomeri içeren ön polimerizasyon kompleksleri 2 saat boyunca karıştırılarak hazır hale getirilmiştir (Çizelge 3.1). Hazırlanan ön polimerizasyon komplekslerinin bilgisayar kontrollü UV-VIS spektrofotometresinde 200-800 nm dalga boyu aralığında absorbans ölçümleri alınarak optimum oran belirlenmiş ve sentezlenen tüm mikrokriyojellerde belirlenen oranda ön polimerizasyon kompleksi kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Kalıp molekül Trb ve fonksiyonel monomer MAGA ile hazırlanan ön polimerizasyon kompleksi oranları.

Kompleks No	Trb:MAGA Oranı	Trb (μM)	MAGA (μM)
1	1:1	30	30
2	1:2	30	60
3	1:3	30	90
4	1:5	30	150
5	1:10	30	300
6	1:15	30	450

3.2.3. Trombin Baskılanmış Mikrokriyojellerin Hazırlanması

İlk olarak, trombin ve MAGA (1:5 mol/mol), bir ön-kompleks oluşturmak için 2 saat karıştırılmıştır. Trombin baskılanmış mikrokriyojeller şu şekilde sentezlenmiştir; HEMA monomeri ve çapraz bağlayıcı olarak MBAAm, deiyonize suda (DI) ayrı ayrı çözülmüştür. 2 saat sonra, ön-kompleks karışımı HEMA çözeltisine eklenmiştir. Daha sonra bu karışım MBAAm çözeltisine ilave edilerek karışması sağlanmıştır. 0,5 mL DI içinde çözülmüş APS, başlatıcı olarak polimerizasyon karışımına ilave edilmiştir. Son aşamada ise katalizör olarak kullanılan TEMED ilave edilerek sağlanan polimer karışımı, cam levha üzerine yerleştirilmiş mikrostensil kalıplara dökülmüştür. İki cam plaka arasındaki mikrostensil kalıplarda kriyojelasyon işlemi $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Kriyojelasyon işlemi tamamlandıktan sonra, cam plakalar çıkarılmış ve mikrostensil kalıplar $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 6 saat süreyle liyofilizatöre yerleştirilmiştir. Son adımda, trombin baskılanmış mikrokriyojeller toplanmıştır. Çapraz bağlayıcı miktarının optimizasyonu için polimerizasyon karışımı, farklı mol oranlarında HEMA monomer ve MBAAm çapraz bağlayıcı kullanılarak aynı prosedürle hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Ayrıca NIP-HEMA (NIP 1) ve NIP-HEMA/MAGA (NIP 2) olmak üzere baskılanmamış mikrokriyojeller, moleküler baskılama etkinliğini incelemek için kalıp molekül olan trombin kullanılmadan aynı prosedür ile sentezlenmiştir. Farklı içeriklerde sentezlenen mikrokriyojellerin tamamında safsızlıkları ve tepkimeye girmemiş monomer yapılarını polimerik yapıdan

uzaklaştırmak amacıyla çok tekrarlı olacak şekilde deiyonize su ile yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin bileşen oranları.

Polimer adı	Mikrostensil kalıpların boyutu	Trb/MAGA (mol/mol)	HEMA/MBAAm (mol/mol)	APS (mg)	TEMED (µL)
MIP 1	600-650 µm	1/5	5	10	12,5
MIP 2	600-650 µm	1/5	6	10	12,5
MIP 3	600-650 µm	1/5	8	10	12,5
MIP 4	600-650 µm	1/5	10	10	12,5
MIP 5	600-650 µm	1/5	15	10	12,5
MIP 6	500-550 µm	1/5	10	10	12,5
MIP 7	400-500 µm	1/5	10	10	12,5
NIP 1	600-650 µm	-	10	10	12,5

3.2.4. Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları hem farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip trombin baskılanmış mikrokriyojeller (MIP 1-7) hem de NIP 1 mikrokriyojeller için gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Yüzey Morfolojisi

Hazırlanan mikrokriyojellerin yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (GAIA3, Tescan, Çek Cumhuriyeti) kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak kurutulmuş mikrokriyojel örnekleri SEM örnek plakası üzerine tutturulmuş, daha sonra ince bir altın tabakası ile vakum altında kaplanarak yüzeyleri iletken hale getirilmiştir. Son adımda elde edilen örneklerin çeşitli büyütme oranlarında görüntüleri alınmıştır. Ayrıca mikrokriyojellerin boyutu ve genel şekli, optik mikroskop (Olympus CH40, Japonya) yardımı ile görüntülenmiştir.

3.2.4.2. Bilgisayarlı Mikrotomografi (μ CT) Analizi

Mikrokriyojellerin gözenekli yapısını göstermek ve bu gözeneklerin dağılımını ve akış kanallarını üç boyutlu görüntülemek üzere bilgisayarlı mikrotomografi (μ CT) (Skyscan 1272, Bruker, ABD) kullanılmıştır.

3.2.4.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

Kuru hale getirilen mikrokriyojellerin spesifik yüzey alanı ölçümleri, Brunauer-Emmett-Teller (BET) cihazı (Tristar II, Micromeritics, ABD) ile sağlanmıştır. Bu amaçla, mikrokriyojel örnekleri dikkatlice tartılmış ve örnek haznesine yerleştirilmiştir. Daha sonra, örneklerin azot atmosferinde 150 °C'de 1 saat gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu 210 °C'de ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve spesifik yüzey alanı hesaplamalarında mikrokriyojellerin desorpsiyon aşamasında ulaşılan sonuçlarından faydalanılmıştır.

3.2.4.4. Mikrokriyojellerin Şişme Davranışları

Mikrokriyojellerin şişme davranışlarının belirlenebilmesi için farklı içeriğe sahip kuru mikrokriyojeller dikkatlice tartılmıştır. Daha sonra DI içeren behere konulup 25±0,5 °C'de 2 saat süreyle bekletilen mikrokriyojeller tekrar tartılmış ve kuru ve şişmiş mikrokriyojellerin ağırlıkları kaydedilmiştir. Mikrokriyojellerin denge şişme yüzde oranları (S) aşağıdaki eşitlik ile belirlenmiştir:

$$S (\%) = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada W_0 (mg), kurutulmuş mikrokriyojellerin ağırlığını, W_1 (mg), DI ile tamamen şişmiş mikrokriyojellerin ağırlığını ifade etmektedir.

3.2.4.5. Mikrokriyojellerin Jelleşme Verimleri

Mikrokriyojellerin jelleşme verimlerinin belirlenebilmesi için farklı içeriğe sahip mikrokriyojeller kurutularak ağırlıkları kaydedilmiştir. Mikrokriyojellerin jelleşme verimi (G) aşağıdaki eşitlik ile değerlendirilmiştir:

$$G (\%) = \frac{W_0}{W_m} \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte W_0 kuru jelin ağırlığı (g), W_m ise polimer karışımındaki monomerlerin toplam ağırlığıdır (g).

3.3. Adsorpsiyon Çalışmaları

Mikrokriyojellerin tüm adsorpsiyon işlemleri kesikli sistemde bir rotatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon işleminin ilk adımı, mikrokriyojellerin 30 dakika süreyle DI ile yıkanmasını ve ardından 30 dakika süreyle adsorpsiyon tamponu ile dengelenmesini içermektedir. Yapılan adsorpsiyon çalışması sonucunda UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japonya) ile 280 nm'de [152] adsorbe edilen trombin miktarı bulunmuştur.

Adsorbe edilen trombin miktarı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$Q = (C_0 - C_e) \times V/m \quad (3.3)$$

Q, mikrokriyojellerin birim kütlesi başına adsorbe edilen trombin miktarını (mg/g); C_0 ve C_e , sırasıyla adsorpsiyon işleminden önceki ve sonraki trombin çözeltilerinin derişimlerini (mg/mL); V, trombin çözeltisinin toplam hacmini (mL); m, mikrokriyojellerin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında trombinin adsorpsiyon kapasitesini etkileyen sıcaklık (4-45°C), pH (5,0-8,0), adsorpsiyon süresi (0-180 dk), derişim (0,18-10,8 mg/mL) ve iyonik şiddet (0,001-0,3 M NaCl) gibi parametreler araştırılmıştır. Ayrıca trombin baskılanmış mikrokriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini test etmek için 10 kez adsorpsiyon ve desorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Trombinin mikrokriyojellerden desorpsiyonu 1,0 M NaCl çözeltisi kullanılarak bir rotator yardımıyla 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirilerek hazırlanan tez çalışmasında tüm deneylerin ortalama değerlerine yer verilmiştir.

3.4. Matematiksel Analizler

Adsorpsiyon izoterm modellemesi, adsorpsiyon sürecinin kendine özgü özelliklerini, adsorpsiyon denge mekanizmasını ve adsorpsiyon kapasitesini öngörmek için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu parametrelerin her biri, adsorbanların etkinliğini belirlemede büyük önem taşımaktadır.

Langmuir adsorpsiyon izotermi, çeşitli biyosorbentlerin performansını karşılaştırmak ve değerlendirmek için sıklıkla başvuru alan modellerden biridir. Bu model, adsorpsiyonun belirli bölgelerde ve eşdeğer şekilde olmasının yanı sıra komşu bölgelerde dahi adsorbe edilen biyomoleküller arasında hiçbir sterik engel ve yanıl etkileşim olmaksızın tek katmanlı adsorpsiyonun gerçekleşme sürecini ifade etmektedir [153,154].

Langmuir izoterm modeli aşağıdaki eşitlik ile belirlenmektedir:

$$\text{Langmuir: } Q_e = (Q_{maks} \times C)/(K_D + C) \quad (3.4)$$

Bir diğler model Freundlich adsorpsiyon izoterminde, adsorban farklı adsorpsiyon bölgelerinden meydana gelen heterojen bir yüzey sergilemektedir. Bu yaklaşım, adsorpsiyon sürecinin başarıyla tamamlanması sonucu adsorplanan miktarın, adsorpsiyon enerjisi üstel olarak azalınca kadar tüm bölgelerde gerçekleşen adsorpsiyonun toplamı olduğu fikrine dayanmaktadır. Ayrıca, tek katmanlı

adsorpsiyonla sınırlı olan Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin aksine, Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli çok katmanlı adsorpsiyon için kullanılabilir [153,155].

Freundlich izoterm modeli aşağıdaki eşitlik ile değerlendirilmektedir:

$$\text{Freundlich: } Q_e = Q_{maks} \times C^{1/n} \quad (3.5)$$

Langmuir-Freundlich adsorpsiyon modeli, geniş bir derişim aralığı için adsorpsiyon davranışını açıklamakta ve heterojenlik hakkında bilgi sağlamaktadır [153].

Langmuir-Freundlich izoterm modeli aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmaktadır:

$$\text{Langmuir- Freundlich: } Q_e = (Q_{maks} \times C^{1/n}) / (K_D + C^{1/n}) \quad (3.6)$$

Adsorpsiyon sürecinde adsorban etkinliğini karakterize etmek ve deneysel adsorpsiyon verilerini değerlendirmek amacıyla adsorpsiyon kinetik modellerine başvurulmaktadır. Kinetik modeller sayesinde adsorbat alımının ne derece hızlı olduğuna bağlı olarak adsorpsiyon hızı hakkında öngörülerde bulunmak mümkün hale gelmektedir. Ayrıca bu modeller, adsorpsiyonu kontrol eden mekanizma ile ilgili fikirler edinilmesi hususunda araştırmacılara yardımcı olmaktadır. Bu kinetik modeller arasında en yaygın kullanılan modeller, pseudo birinci derece ve pseudo ikinci derece olarak literatürde yerini almıştır [154,156].

3.5. Seçicilik Çalışmaları

Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin özgülüğünü göstermek için sığır serum albümini (BSA, MW: 66,5 kDa, pI: 4,9), hemoglobin (Hb, MW: 64,5 kDa, pI: 6,8-7,2) ve lizozim (LYS, MW: 15,0 kDa, pI: 11,0) yarışmacı proteinler olarak seçilmiştir. 10 µM derişime sahip (pH: 7,4 fosfat tamponu) yarışmacı proteinlerin çözeltileri ayrı ayrı

hazırlanmış ve her biri için aynı prosedür izlenerek trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile trombin baskılanmamış mikrokriyojeller NIP 1 ve NIP 2 dahil olmak üzere adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Adsorpsiyon süreci tamamlandıktan sonra gerçekleştirilen protein derişimi ölçümleri UV-VIS spektrofotometre ile elde edilmiştir. Mikrokriyojellerin trombin için seçiciliği, aşağıda verilen eşitlikler ile değerlendirilmiştir:

$$k = Q_{(Trb)}/Q_{(Yarışmacı\ protein)} \quad (3.7)$$

$$k' = k_{baskılanmış}/k_{baskılanmamış} \quad (3.8)$$

Burada k seçicilik katsayısı, k' ise bağıl seçicilik katsayısıdır.

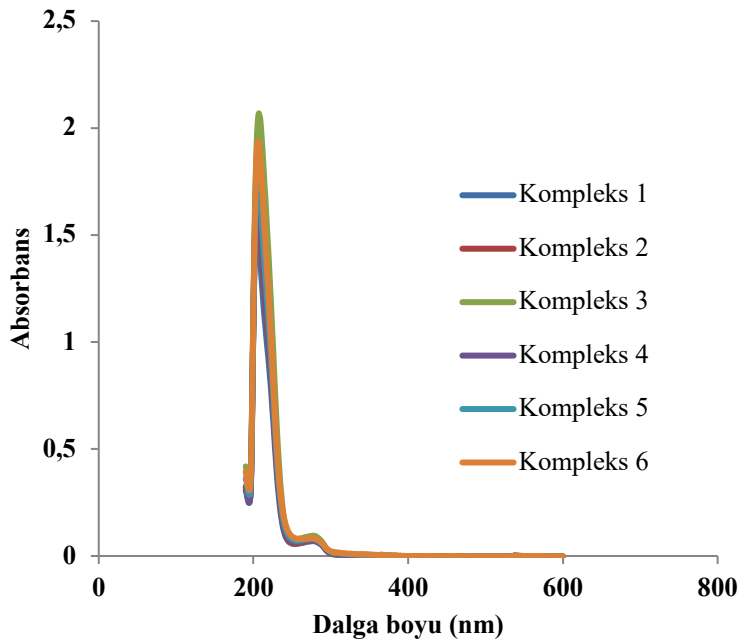
3.6. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi

Mevcut tez çalışmasında, trombinin sulu çözeltiden seçici olarak saflaştırıldığını göstermek için FPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla trombin baskılanmış mikrokriyojeller trombin çözeltisi ile 1 saat inkübe edilmiştir. UV dedektörü, monitör, INV-907 enjeksiyon valfi ve Frac920 fraksiyon toplayıcı ile donatılmış bir AKTA-FPLC (Amersham Bioscience, Uppsala, İsveç) sisteminden oluşan FPLC cihazı ile saflaştırma basamağındaki deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerle trombin saflaştırma çalışmalarında anyon değiştirme kolonu (HiTrapVR Q HP, Cytiva 29-0513-25) kullanılmıştır. Bu aşamada, trombin örneklerinden 0,1 mL enjeksiyon hacmi uygulanmıştır. FPLC'de mobil faz A ve mobil faz B, sırasıyla 10 mM trietanolamin tamponu (pH 9,0) ve 10 mM trietanolamin tamponu (pH 9,0) içinde 1,0 M NaCl kullanılarak hazırlanmıştır. FPLC ile kromatografik saflaştırma sürecinde 1,0 mL/dk akış hızı ile doğrusal gradyan uygulanmıştır. Ayrıca, %100 mobil faz A ile gerçekleştirilen 1 dakikalık başlangıç periyodunu takiben 2 dakikada %0 B'den %100 B'ye doğrusal gradyana geçiş sağlanmıştır. Daha sonra 6 dakika %100 mobil faz B ile devam edilmiş ve kolondan 6 dakika %100 mobil faz A geçirilerek süreç sonlandırılmıştır. Çözeltiler ve tamponlar kullanılmadan önce filtre edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön Polimerizasyon Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Moleküler baskılama tekniğinde, kalıp molekül ve fonksiyonel monomeri içeren ön polimerizasyon kompleksinin mol oranı polimerlerin performansını önemli ölçüde etkileyen bir parametredir. Bunun için en uygun kalıp molekül:monomer oranının belirlenmesi amacıyla Trb:MAGA oranı değiştirilerek hazırlanan numuneler UV-VIS spektrofotometresi ile karakterize edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda 1:5 mol oranına sahip kompleksin daha kararlı olduğu belirlenmiş (Şekil 4.1) ve sonraki çalışmalarda bu mol oranına sahip 4 no'lu kompleks moleküler baskılama işlemlerinde kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Ön polimerizasyon komplekslerinin spektrofotometre sonuçları. Kompleks 1: Trb:MAGA, 1:1; Kompleks 2: Trb:MAGA, 1:2; Kompleks 3: Trb:MAGA, 1:3; Kompleks 4: Trb:MAGA, 1:5; Kompleks 5: Trb:MAGA, 1:10; Kompleks 6: Trb:MAGA, 1:15.

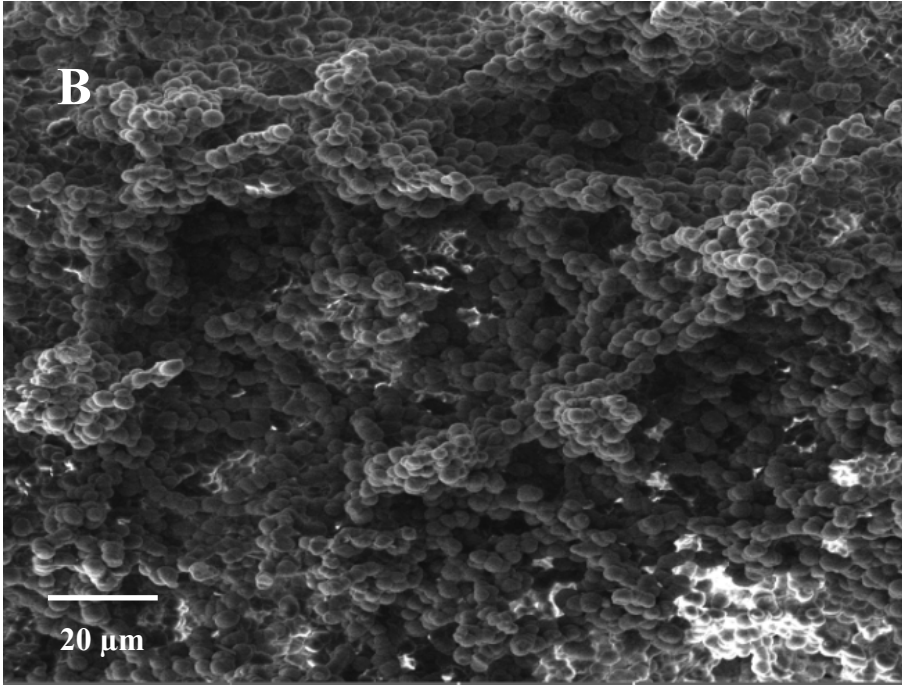
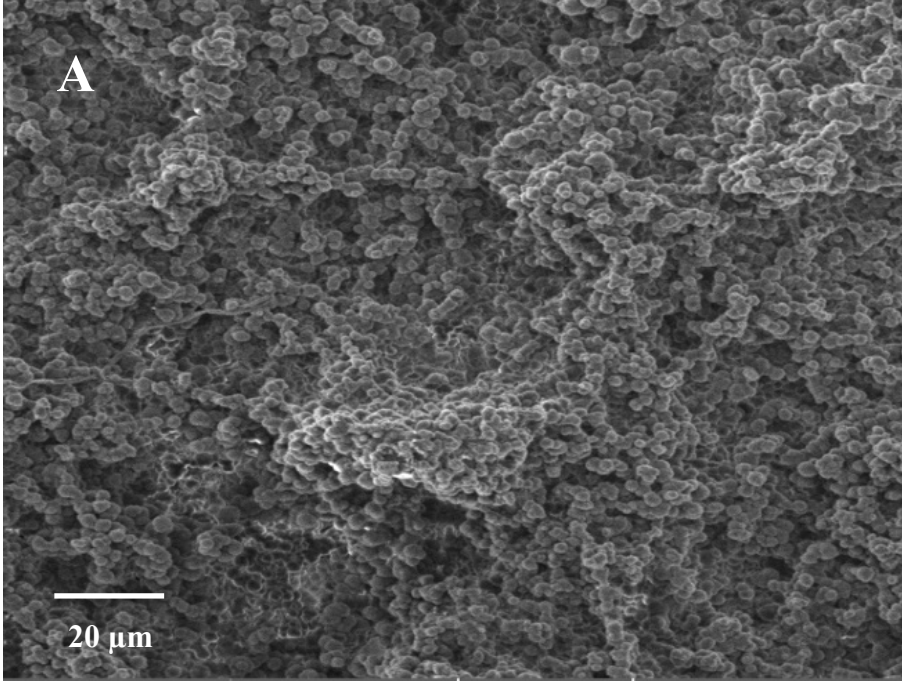
4.2. Mikrokriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.1. Yüzey Morfolojisi

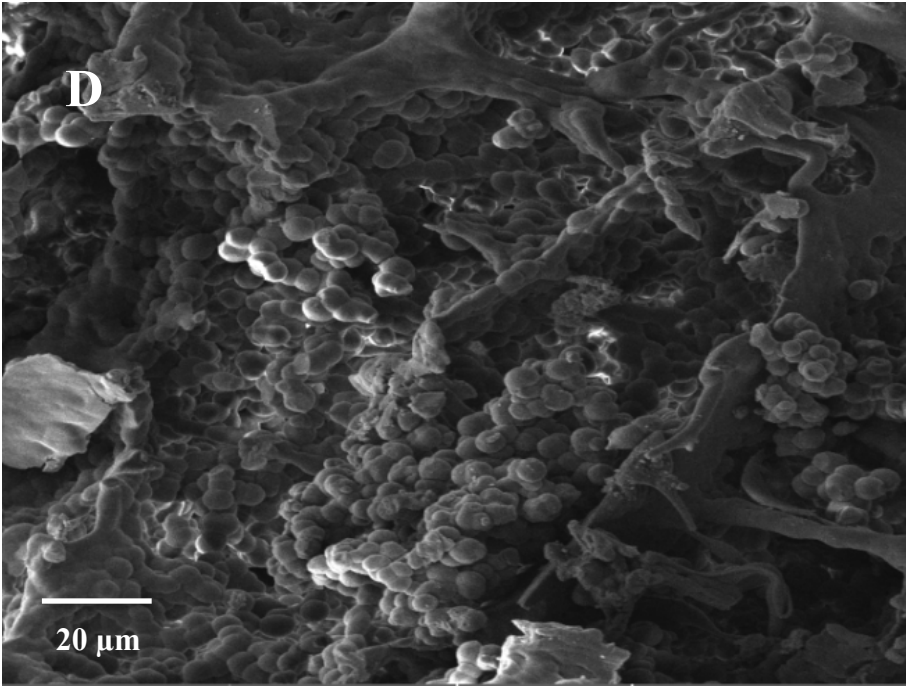
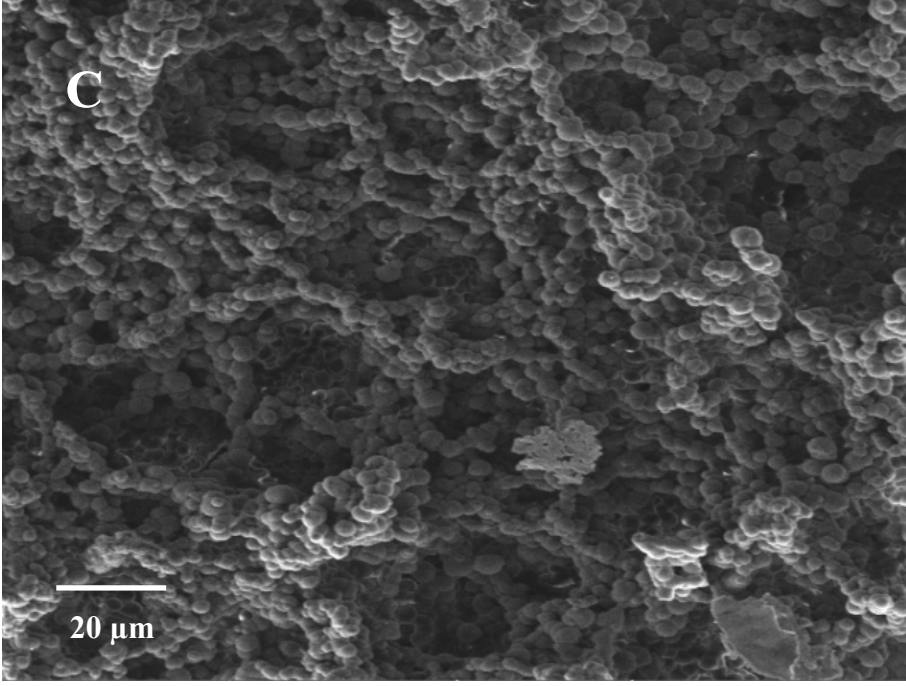
Farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip trombin baskılanmış mikrokriyojellerin ve p(HEMA) mikrokriyojellerin yüzey morfolojisi SEM analizi görüntüleri ile gösterilmiştir. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin birbirine bağlı ve süper makrogözenekli yapıları sayesinde trombin gibi makromoleküllerin polimerlerin gözeneklerinden herhangi bir tıkanma sorunu yaşamadan geçmesi mümkündür (Şekil 4.2).

Ayrıca farklı boyutlardaki mikrostensil kalıplar üzerinde sentezlenen trombin baskılanmış mikrokriyojellerin SEM görüntüleri Şekil 4.3'te ve optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekil 4.3 incelendiğinde trombin baskılanmış mikrokriyojellerin çapının 400 µm ile 650 µm arasında değiştiği görülmektedir.

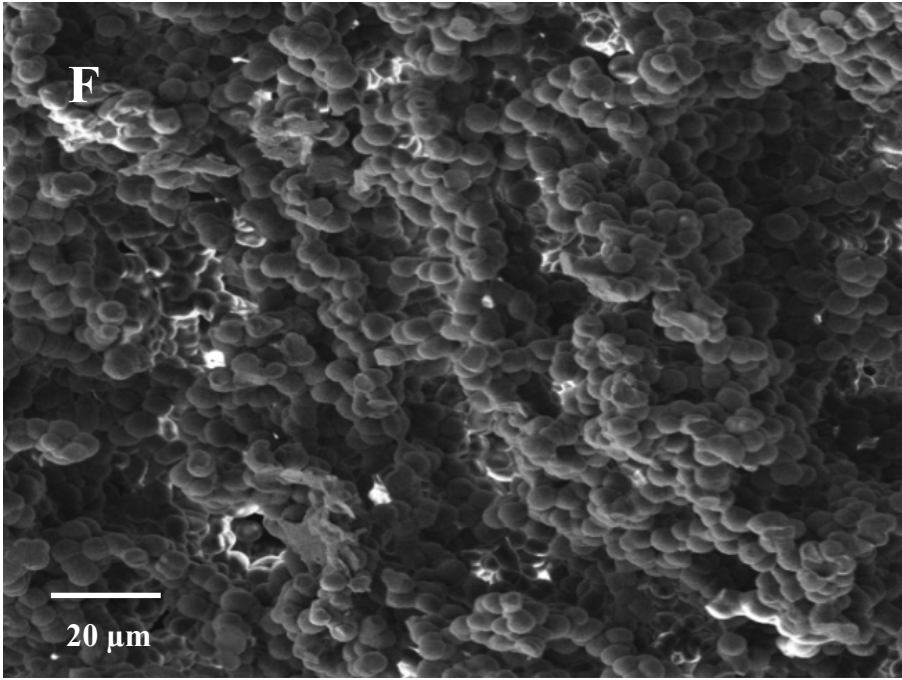
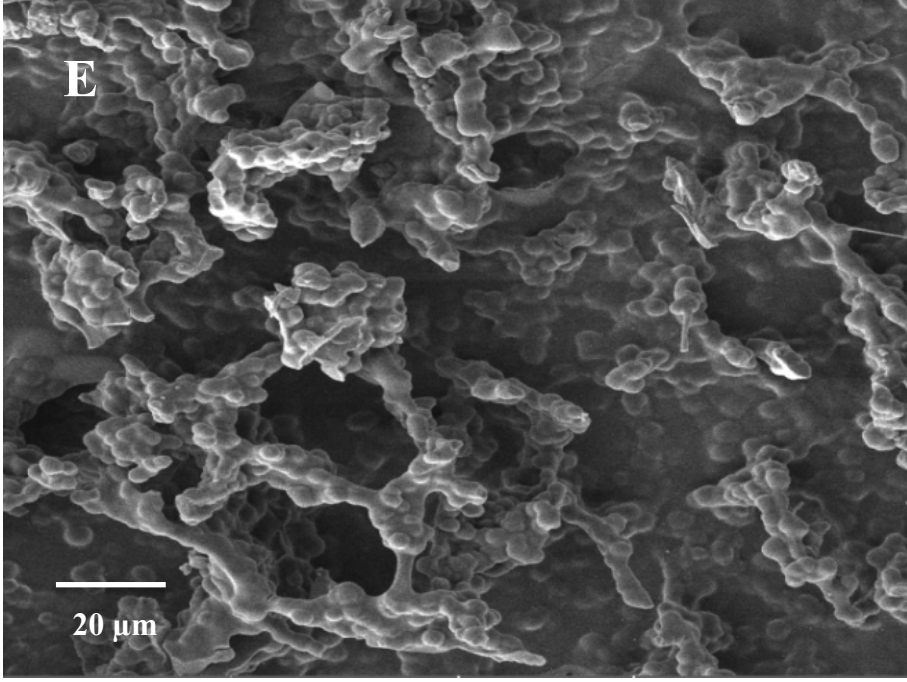
Trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokriyojellerin iç yapısı bilgisayarlı mikrotomografi ile tahribatsız olarak incelenmiştir. Monomer/çapraz bağlayıcı oranının gözenek dağılımı üzerindeki etkisi Şekil 4.5'te kolayca görülebilmektedir. Toplam gözeneklilik, artan çapraz bağlayıcı miktarı ile azalmaktadır (Çizelge 4.1).



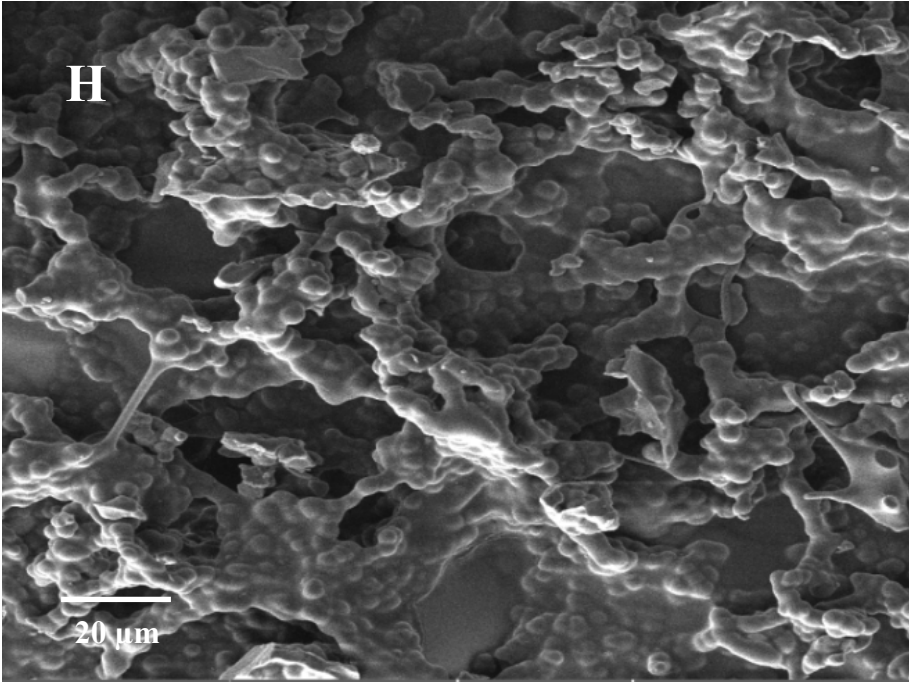
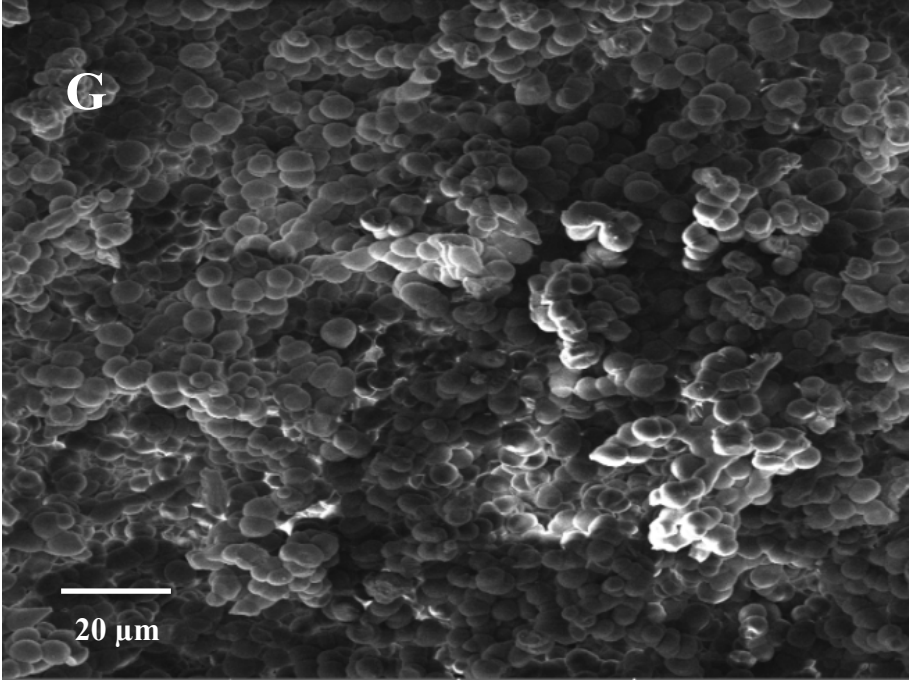
Şekil 4.2. Trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokrijojellerin SEM görüntüleri. (A-G) MIP 1-7, (H) NIP 1 (Büyütme oranı: 2000x).



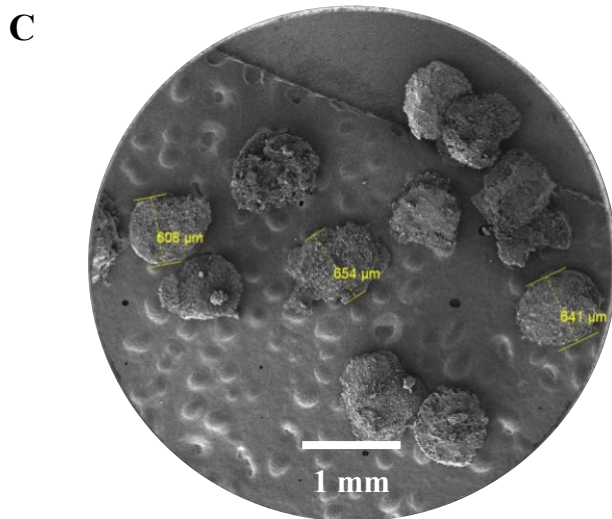
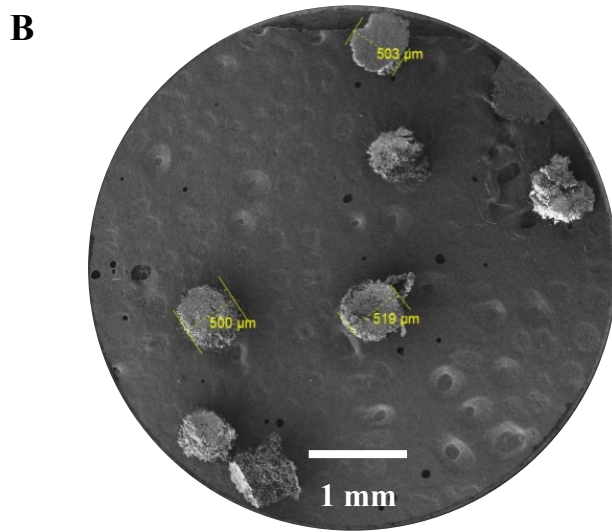
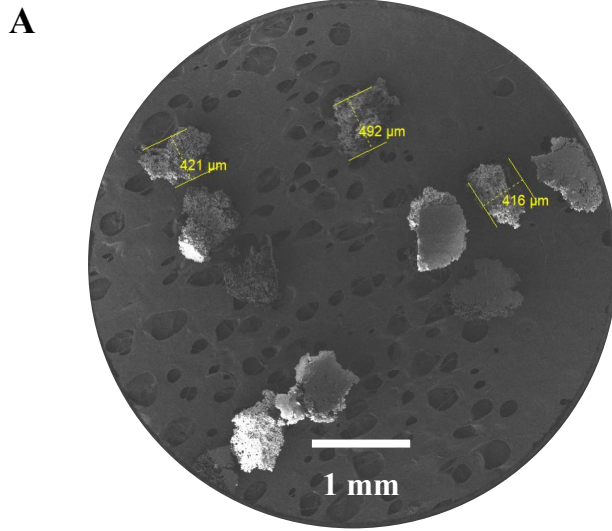
Şekil 4.2. (devamı).



Şekil 4.2. (devamı).

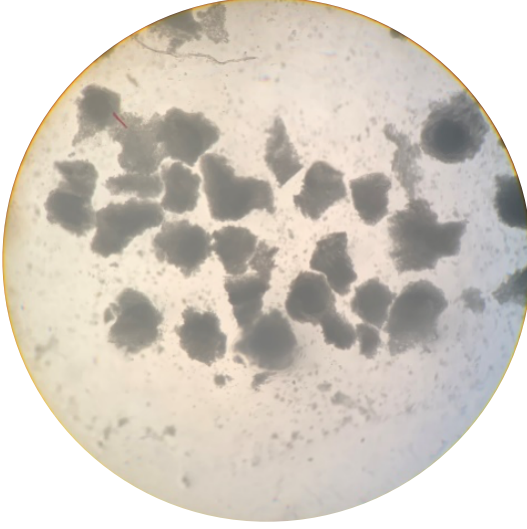


Şekil 4.2. (devamı).

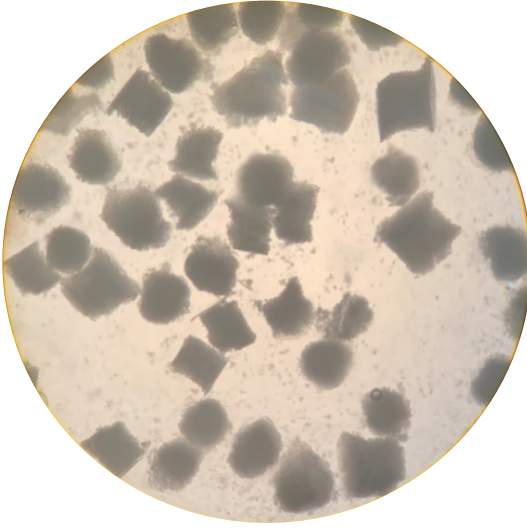


Şekil 4.3. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin SEM görüntüleri. (A) MIP 7, (B) MIP 6, (C) MIP 4. (Büyütme oranı: 45x)

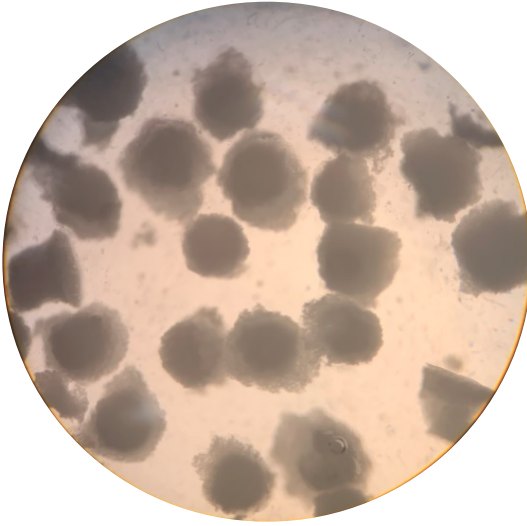
A



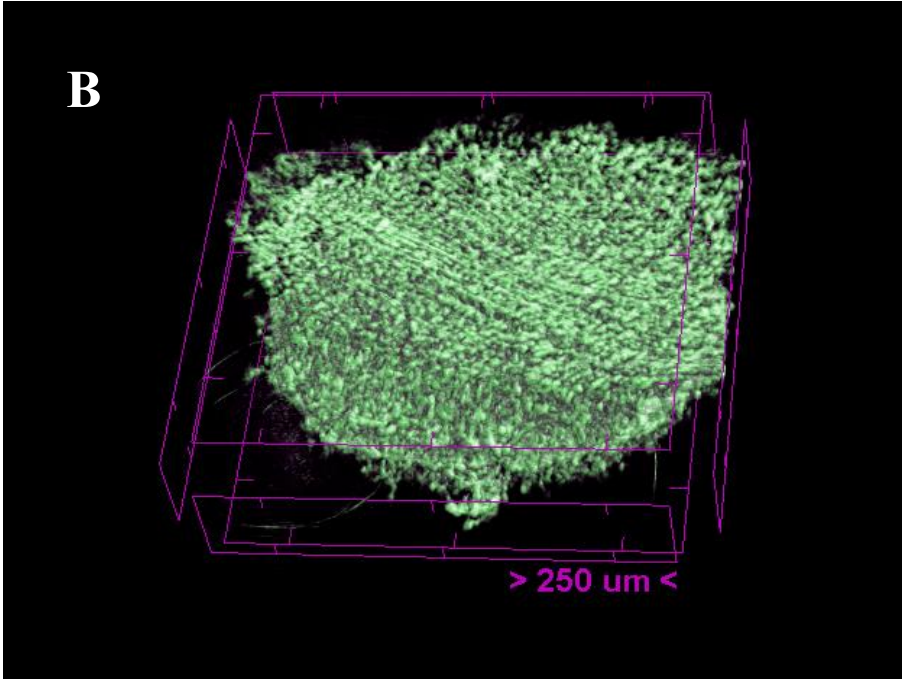
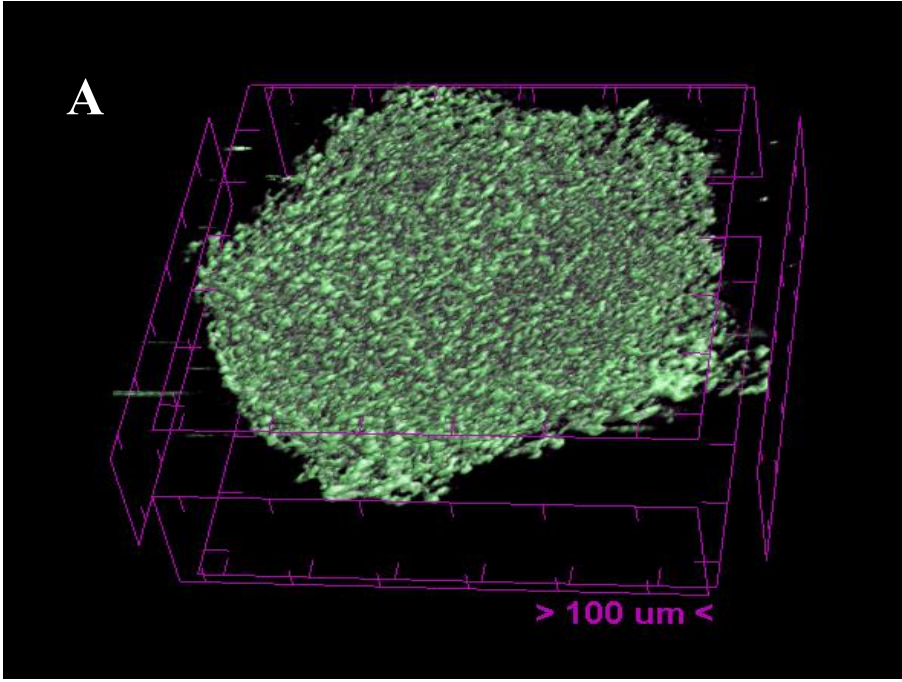
B



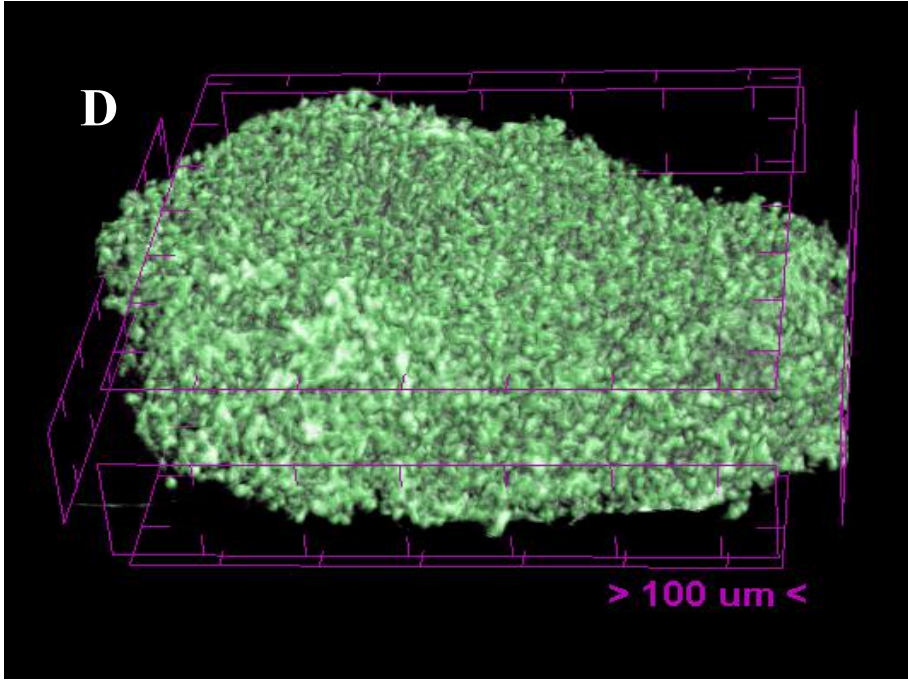
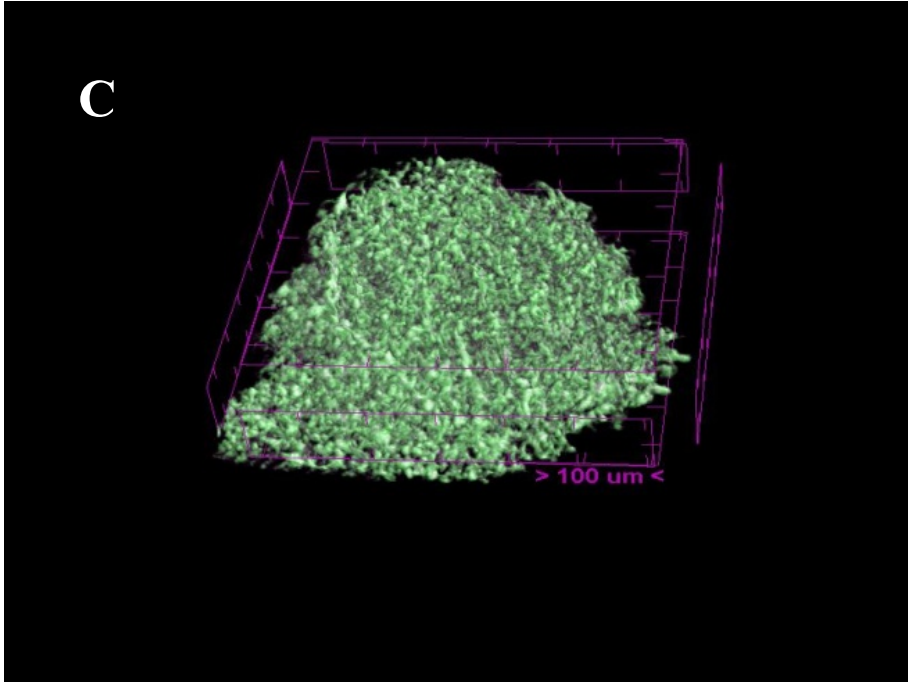
C



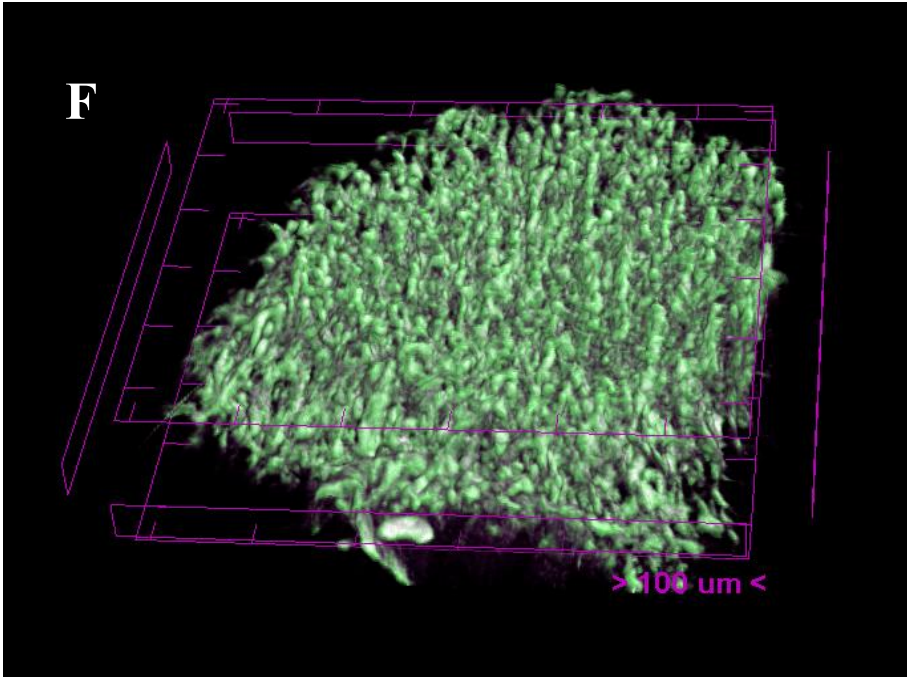
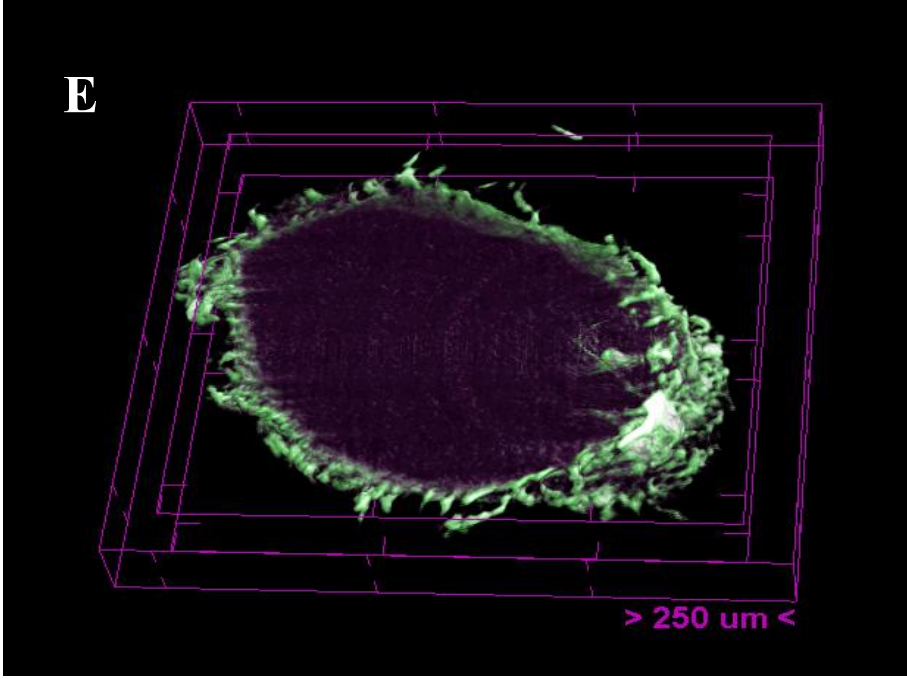
Şekil 4.4. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin optik mikroskop görüntüleri. (A) MIP 7, (B) MIP 6, (C) MIP 4.



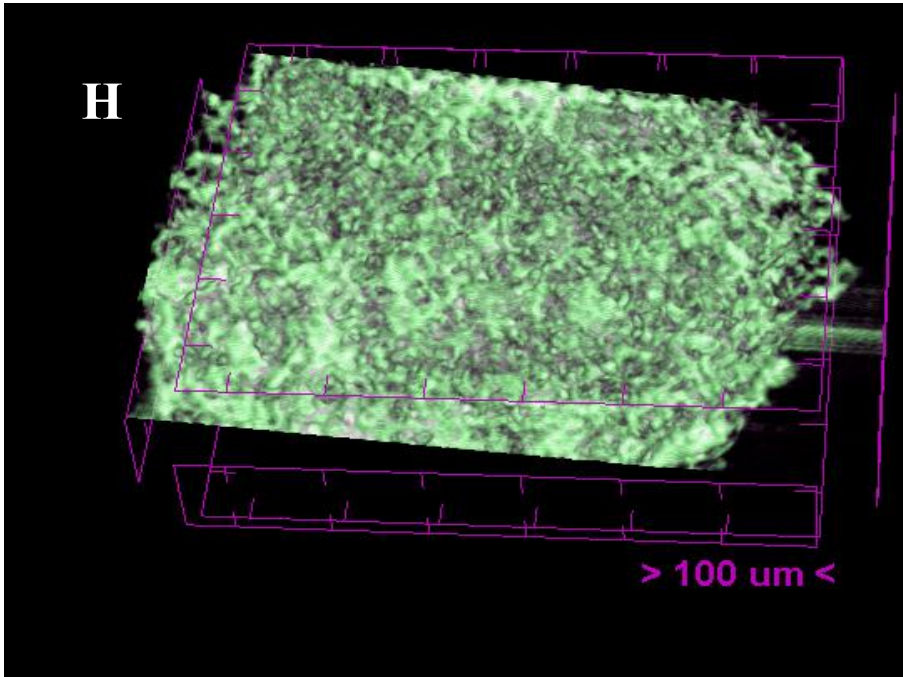
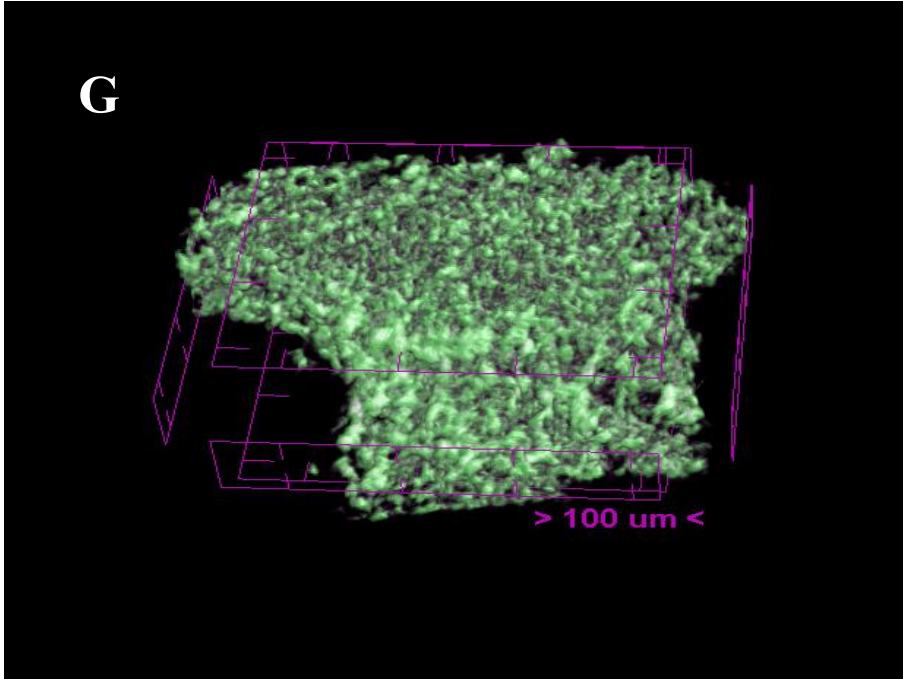
Şekil 4.5. Trombin baskılanmış ve baskılanmamış mikrokriyojellerin Micro-CT görüntüleri. (A-G) MIP 1-7, (H) NIP 1.



Şekil 4.5. (devamı).



Şekil 4.5. (devamı).



Şekil 4.5. (devamı).

4.2.2. Mikrokriyojellerin Fiziksel Karakterizasyon Çalışmaları

Mikrokriyojeller için önem arz eden şişme oranı, gözeneklilik, jelleşme verimi ve spesifik yüzey alanı gibi karakterizasyon işlemlerinin sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Polimerizasyon sırasında farklı çapraz bağlayıcı oranlarının kullanılması, sentezlenen mikrokriyojellerin fiziksel özelliklerini farklılaştırmaktadır. Daha düşük çapraz bağlayıcı dereceleri ve daha düşük duvar kalınlıklarının, ağ genişlemesini kolaylaştıran ve dolayısıyla daha yüksek şişme oranları sergileyen esnek gözeneklerle sonuçlandığı belirtilmiştir [157–159]. Biyomakromoleküllerin adsorpsiyon kapasitelerini artırmak için özgül yüzey alanlarının artırılması gerektiği bilinmektedir. Bu amaçla moleküler baskılamanın güçlü bir yaklaşım olduğunu ve azalan çapraz bağlayıcı oranı ile özgül yüzey alanının azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur [160–162]. Bu çalışmada, baskılanmış mikrokriyojellerde trombine özgü boşlukların varlığından dolayı trombin baskılanmış mikrokriyojellerin yüzey alanının NIP 1’den daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [163,164]. Ayrıca farklı boyutlarda sentezlenen mikrokriyojellerin özgül yüzey alanı, partikül boyutu küçüldükçe artmaktadır. Gözeneklilik ve çapraz bağlayıcı oranı karşılaştırıldığında, çapraz bağlayıcı miktarındaki azalma gözenekliliğin artmasına neden olmuştur [165,166].

Elde edilen verilere göre farklı oranlarda hazırlanan mikrokriyojellerin performansları değerlendirilmiştir. Mikrokriyojellerin genel performansı göz önünde bulundurulduğunda ileri çalışmalar MIP 4 adı verilen mikrokriyojellerle gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Mikrokriyojellerin fiziksel karakterizasyon sonuçları.

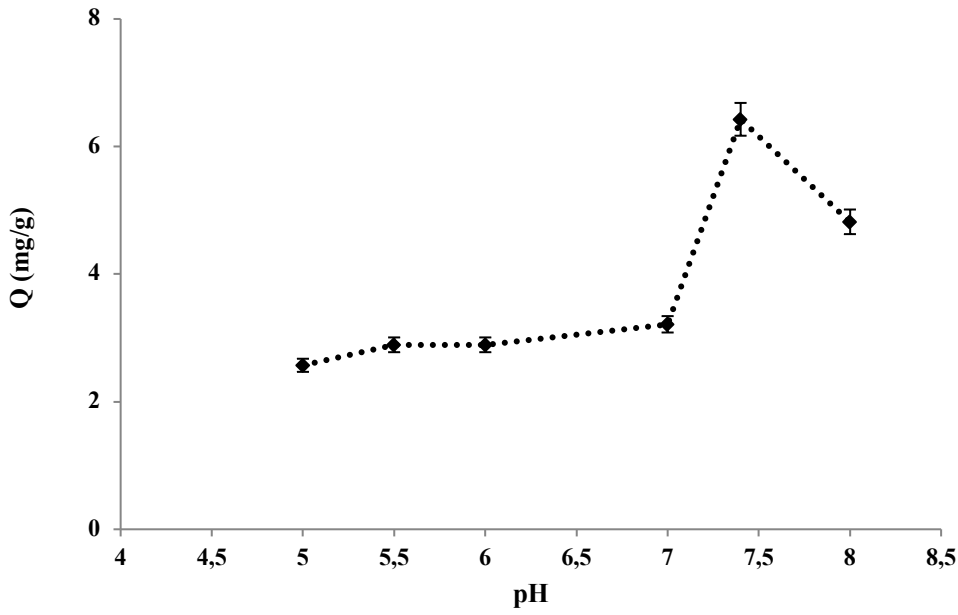
Polimer adı	Jelleşme verimi (%)	Spesifik yüzey alanı (m ² /g)	Şişme oranı (%)	Toplam gözeneklilik (%)
MIP 1	92,40	7,79	622,22	62,31
MIP 2	91,32	7,36	778,94	64,99
MIP 3	92,55	6,02	1000	65,60
MIP 4	94,61	5,45	1052,94	66,63
MIP 5	93,77	4,01	1317,85	67,13
MIP 6	95,68	5,82	1093,33	67,84
MIP 7	91,38	6,40	1158,97	68,25
NIP 1	92,33	4,68	1025,92	65,90

Şişme oranı için standart sapma değeri (SD) %5'tir.

4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları

4.3.1. pH Etkisi

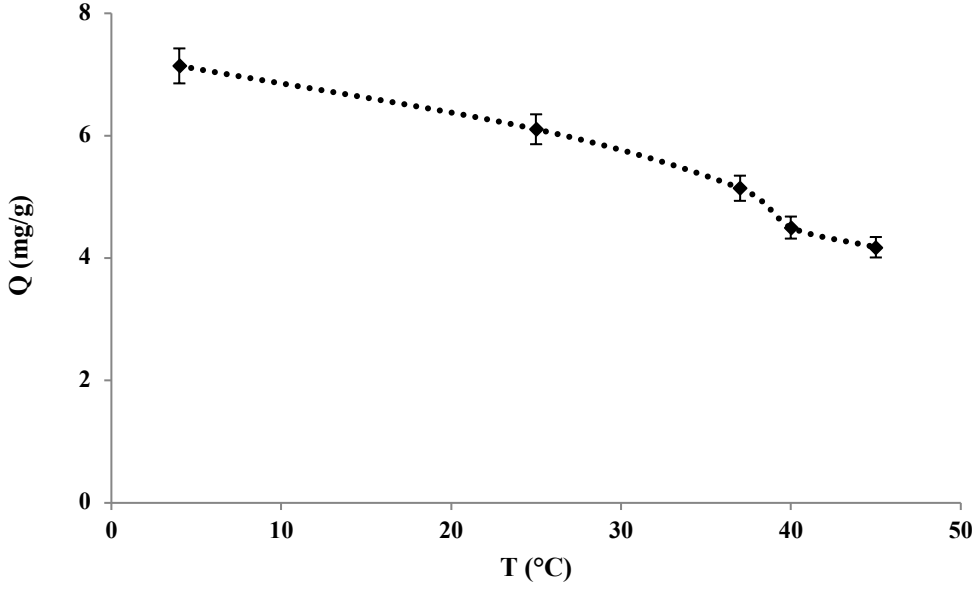
pH değeri adsorpsiyon işleminin hassasiyetini etkilediğinden optimizasyon koşulları için önemli bir rol oynamaktadır. pH'ın trombin baskılanmış mikrokriyojeller aracılığıyla trombin adsorpsiyonu üzerindeki etkisini tanımlamak için farklı pH değerlerine sahip asetat ve fosfat tampon çözeltileri ile trombin adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{maks}) pH 7.4'te elde edilmiştir. pH 7,4'ün üzerindeki ve altındaki pH değerlerinde adsorpsiyonda dikkate değer bir azalma olduğu tespit edilmiştir. İzoelektrik noktada trombinin net yükü sıfıra yakın olduğundan, genellikle bu noktada Q_{maks} değeri izlenir. Trombinin izoelektrik noktası dikkate alındığında (pI: 7,0-7,6), bu pH değeri beklenen bir sonuçtur [1,167,168]. Elde edilen veriler sonucunda sonraki parametreler pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi varlığında incelenmiştir.



Şekil 4.6. pH'ın trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, T: 25°C)

4.3.2. Sıcaklık Etkisi

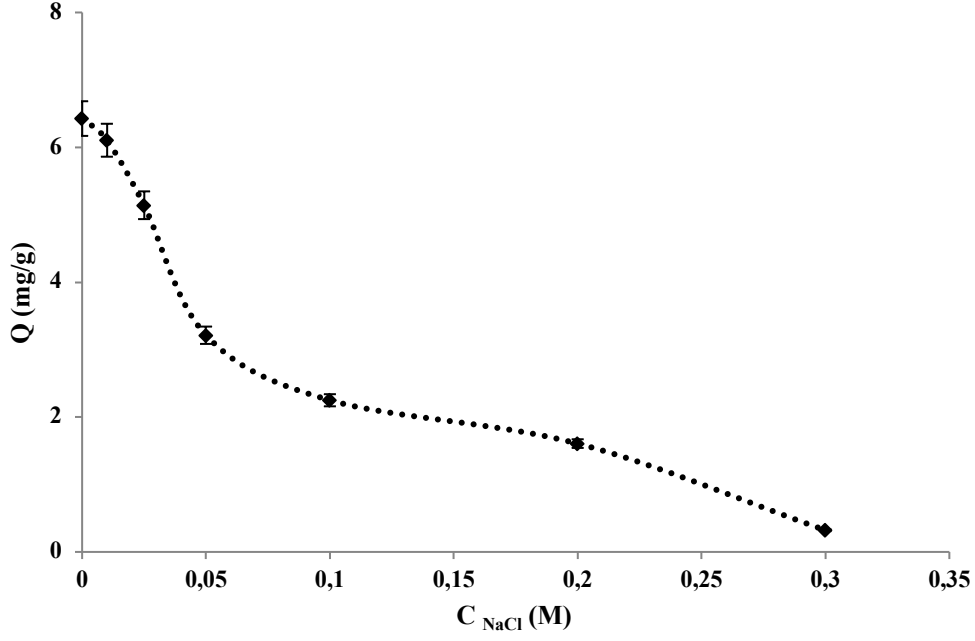
Adsorpsiyon sürecini optimum şartlarda gerçekleştirebilmek için sıcaklığın bu süreci nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu amaçla 4,0, 25,0, 37,0, 40,0 ve 45,0°C olmak üzere çeşitli sıcaklık değerlerinde trombin adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Şekil 4.7'ye göre, trombin adsorpsiyon kapasitesi artan sıcaklıkla birlikte azalmıştır. Bu davranışın adsorpsiyonun ekzotermik yapısından kaynaklandığı, ayrıca baskın etkileşimlerin hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler olduğu literatürdeki çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir [169,170]. Ek olarak, Flory-Huggins izoterm modeli trombin adsorpsiyon sürecinin kendiliğindenliğini açıklamaktadır [171]. Buradan yola çıkarak Flory-Huggins denge sabiti K_{FH} kullanılmış ve Gibbs serbest enerjisi $-17,09$ kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, trombin adsorpsiyonunun daha düşük bir enerji gereksinimi ile kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.7. Sıcaklığın trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, pH: 7,4)

4.3.3. İyonik Şiddet Etkisi

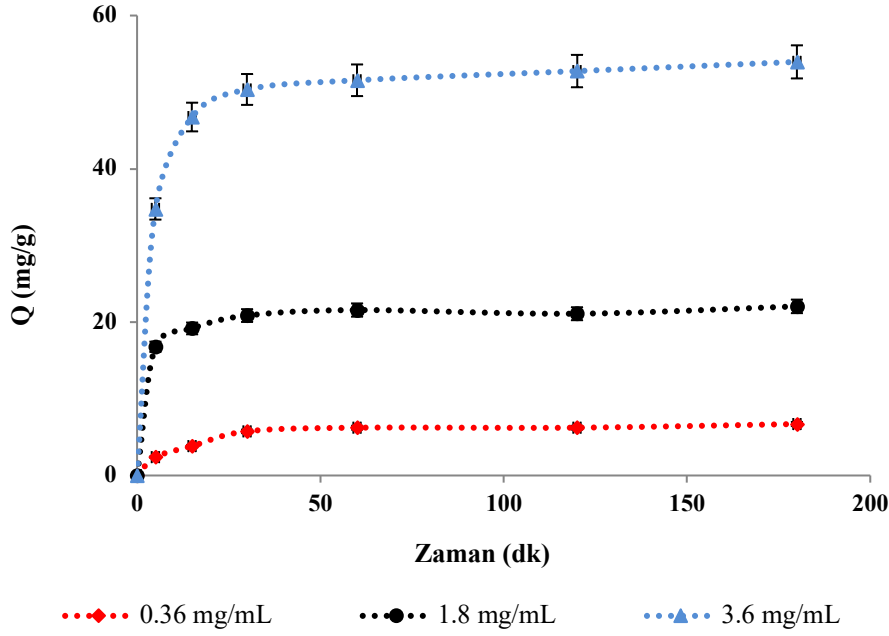
İyonik kuvvetin etkisini açıklamak için farklı derişimlerde (0,001-0,3 M) NaCl içeren pH 7,4 fosfat tamponu ile trombin çözeltileri hazırlanmıştır. Artan NaCl derişimi ile trombin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum, artan tuz derişimi ile trombin çözünürlüğünün azalması ve bu nedenle trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile olan etkileşimin azalması şeklinde açıklanabilir. Bir başka bakış açısıyla söz konusu davranışın, trombin molekülleri ve trombin baskılanmış mikrokriyojeller arasında bulunan itici elektrostatik kuvvetler kaynaklı olması düşünülmektedir [172].



Şekil 4.8. İyonik şiddetin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi ($C_{trombin}$: 0,36 mg/mL, pH: 7,4, T: 25°C).

4.3.4. Etkileşim Süresinin Etkisi

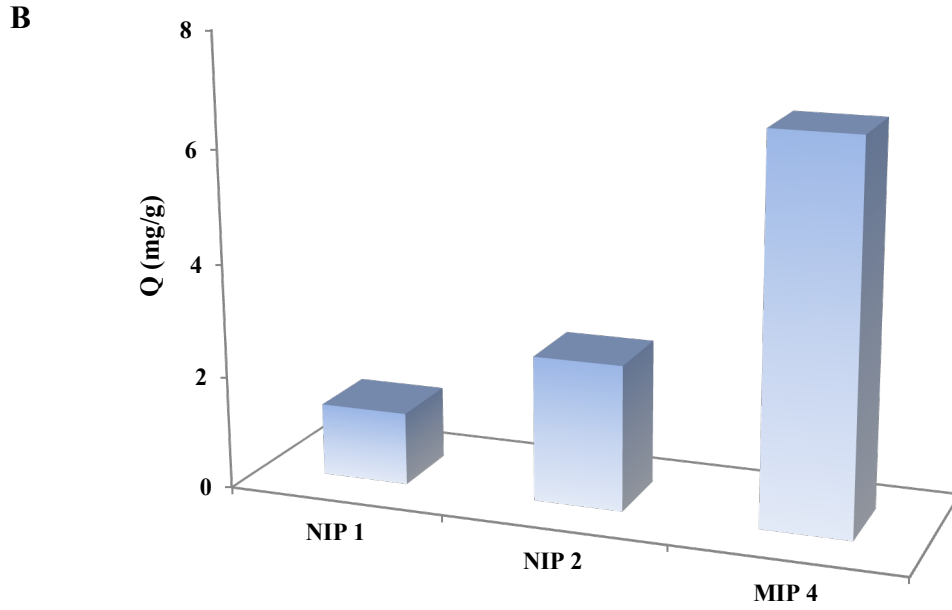
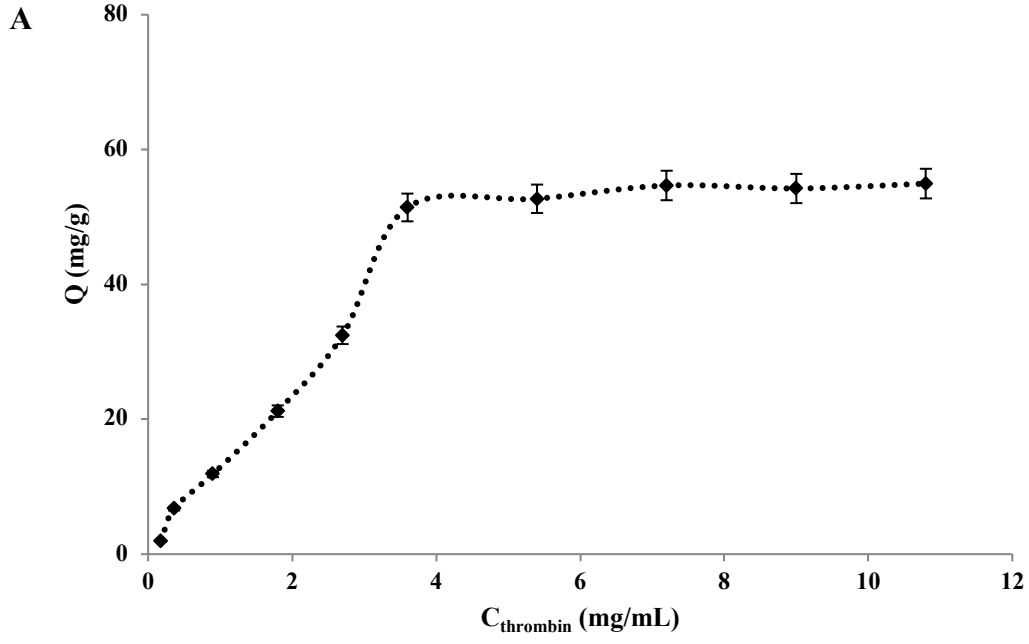
Trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile denge adsorpsiyon süresi değerlendirilmiştir (0-180 dk). Şekil 4.9'da, adsorpsiyon hızının sürecin ilk aşamalarında hızla yükseldiği ve çeşitli trombin derişimleri için doygunluk seviyesine yaklaşık 60 dakikada ulaşıldığı görülmektedir. Söz konusu davranış, moleküler baskılama yaklaşımının üstünlükleri sayesinde trombinin mikrokriyojellere olan afinitesinin yüksek olması ve mikrokriyojellerin geniş gözenek yapısından dolayı ilk aşamada adsorpsiyon hızının arttığı daha sonra denge derecesine ulaşıldığı şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.9. Etkileşim süresinin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (pH: 7,4, T: 25°C).

4.3.5. Derişim Etkisi

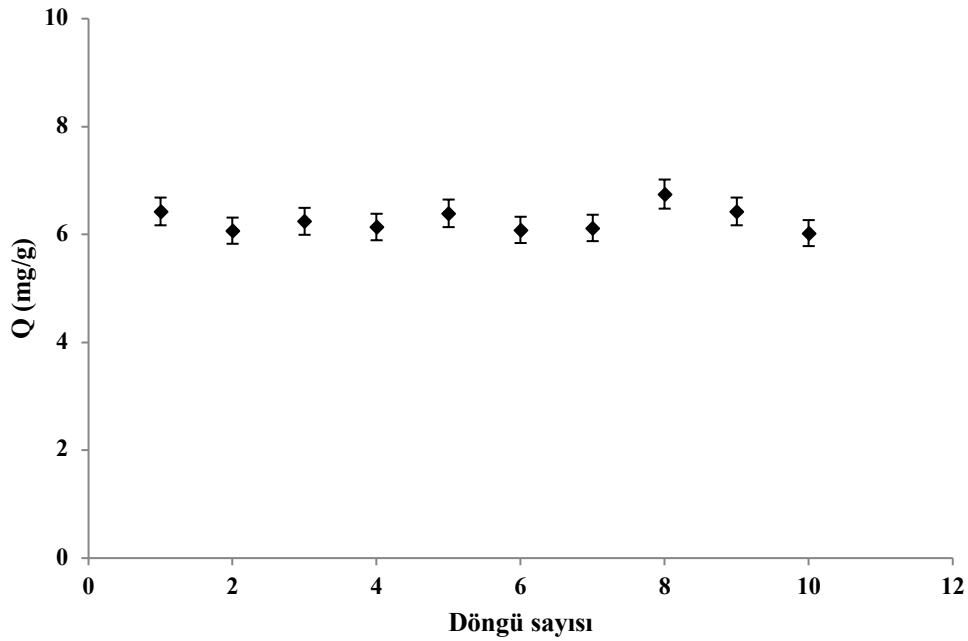
Şekil 4.10A'da, trombin baskılanmış mikrokriyojeller (0,18-10,8 mg/mL) için trombinin başlangıç derişiminin etkisi sunulmuştur. Artan trombin derişimi ile trombin adsorpsiyonunun önemli ölçüde arttığı, yaklaşık 3,6 mg/mL derişimde doygunluk değerine ulaşıldığı sonucuna varılmıştır. Bu noktada trombin adsorpsiyonu için ulaşılabilen tüm bağlanma yerlerinin trombin molekülleri tarafından işgal edildiği düşünülebilir. Trombin baskılanmış mikrokriyojeller için Q_{maks} değeri 55,86 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Aynı koşullar altında yapılan deneyler sonucunda, trombin baskılanmış mikrokriyojellerin, sırasıyla NIP 1 (1,28 mg/g) ve NIP 2'ye (2,57 mg/g) göre daha yüksek trombin bağlama kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10. (A) Başlangıç derişiminin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (pH: 7,4, süre: 60 dakika, T: 25°C). (B) NIP 1, NIP 2 ve trombin baskılanmış mikrokriyojellerin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi (C_{trombin} : 0,36 mg/mL, pH: 7,4, süre: 60 dakika, T: 25°C).

4.3.6. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

Tekrarlanabilirlik çalışması, tasarlanan adsorbentin stabilitesini ve maliyetini etkilemesi nedeniyle adsorpsiyon çalışmalarında kritik öneme sahiptir. Buradan yola çıkarak 10 defa olmak üzere aynı trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri yürütülmüştür. Şekil 4.11’de gösterildiği gibi, 10 kez adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında Q_{maks} değeri yaklaşık %90 oranında korunmuş, adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma gözlenmemiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, trombin baskılanmış mikrokriyojeller, uygun maliyetli ve verimli adsorbanlar olarak değerlendirilebilmektedir.



Şekil 4.11. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin tekrarlanabilirliği ($C_{trombin}$: 0,36 mg/mL, pH: 7,4, T: 25°C).

4.4. Adsorpsiyon İzotermi ve Kinetik Analizler

Adsorpsiyon izoterm modelleri, hedeflenen biyomolekülün adsorbent ile nasıl etkileşim kurduğu ile ilgili bilgiler sunmaktadır. Tez çalışması kapsamında etkileşimleri karakterize edebilmek amacıyla Langmuir (eşitlik 4.1), Freundlich (eşitlik 4.2) ve Langmuir-Freundlich (eşitlik 4.3) adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli, etkileşim bölgelerinin eşdeğer enerjiye sahip olduğunu ve yanal etkileşimler olmadan homojen olarak dağıldığını ifade etmektedir. Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen yüzeylere uymaktadır [153].

Baskılanmış biyomalzemelerin homojenliği hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon modelleri incelenmiştir.

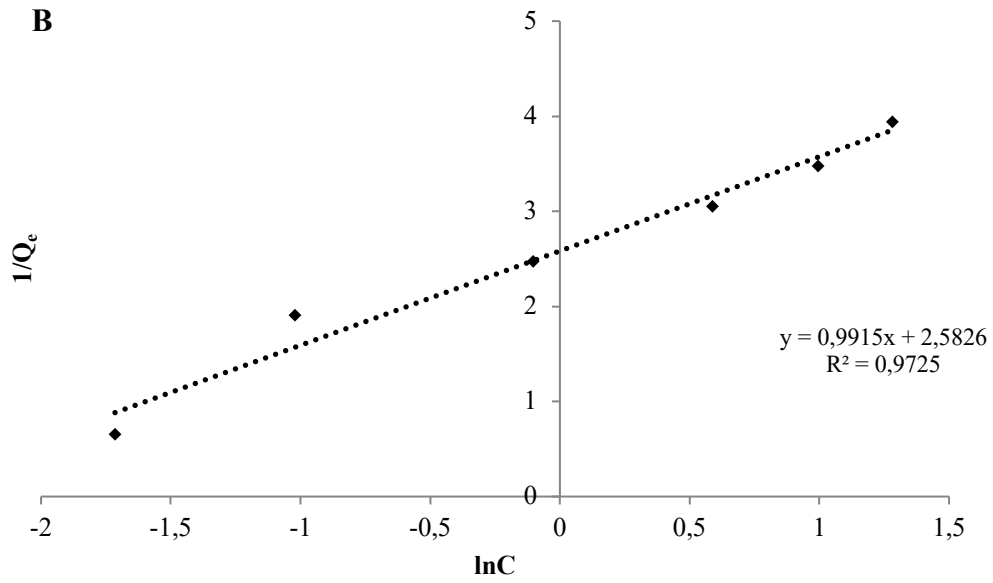
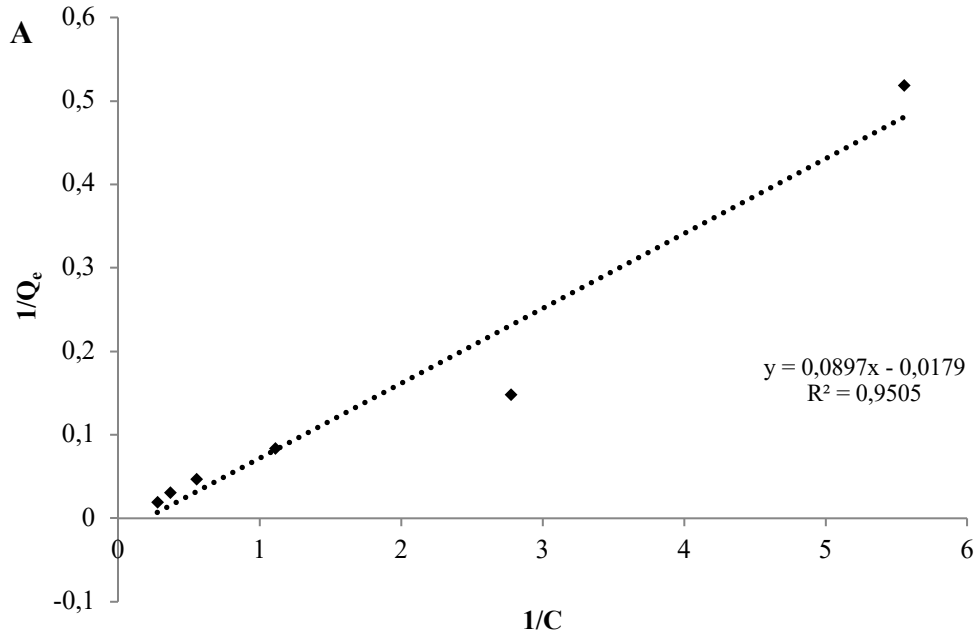
$$\text{Langmuir: } 1/Q_e = \left(K_D/Q_{maks} \times 1/C \right) + 1/Q_{maks} \quad (4.1)$$

$$\text{Freundlich: } \ln Q_e = \ln Q_{maks} + (1/n \times \ln C) \quad (4.2)$$

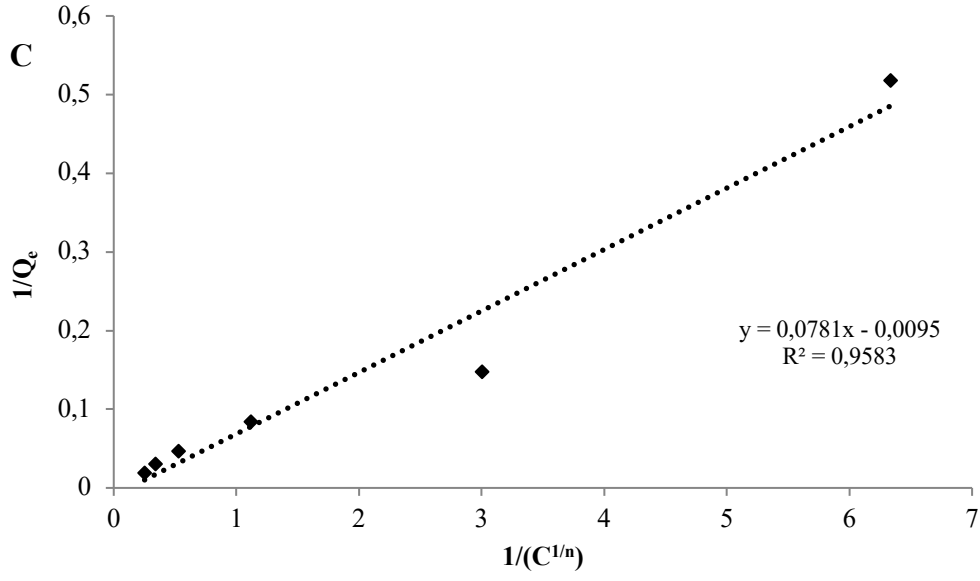
$$\text{Langmuir- Freundlich: } 1/Q_e = \left(K_D/Q_{maks} \times 1/C^{1/n} \right) + 1/Q_{maks} \quad (4.3)$$

$$K_A = 1/K_D \quad (4.4)$$

Burada Q_e (mg/g), bir gram adsorbent başına adsorbe edilen protein miktarı; C (mg/mL), çözeltideki denge protein derişimi; K_A (mg/mL), bağlanma sabiti; K_D (mg/mL), ayrışma sabiti; $1/n$, Freundlich katsayısı olarak ifade edilir.



Şekil 4.12. Adsorpsiyon izoterm modelleri. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin Langmuir (A), Freundlich (B) ve Langmuir-Freundlich (C) modelleri.



Şekil 4.12. (devamı).

Çizelge 4.2. Trombin baskılanmış mikrokriyojeller için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm parametreleri.

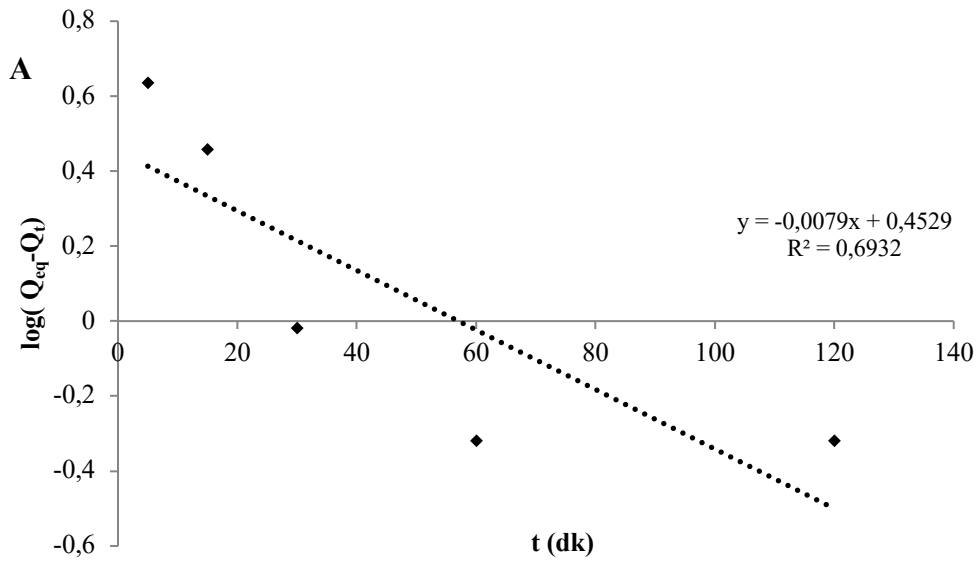
Langmuir	Freundlich	Langmuir-Freundlich
Q_{maks} (mg/g): 55,86	Q_{maks} (mg/g): 13,23	Q_{maks} (mg/g): 105,26
K_D (mg/mL): 5,01	1/n: 0,99	1/n: 0,99
K_A (mg/mL): 0,19	R^2 : 0,9725	K_D (mg/mL): 8,22
R^2 : 0,9505		K_A (mg/mL): 0,12
		R^2 : 0,9583

Ayrıca, protein adsorpsiyonu için en çok kullanılan adsorpsiyon kinetik parametreleri olan pseudo birinci derece (eşitlik 4.5) ve pseudo ikinci derece (eşitlik 4.6) kinetik modelleri üç farklı trombin derişiminde uygulanmıştır [171].

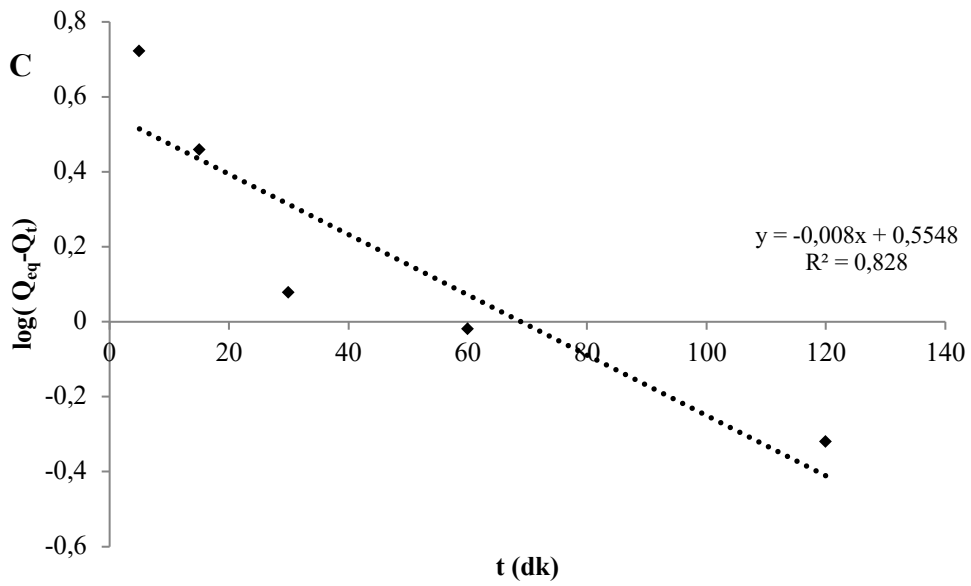
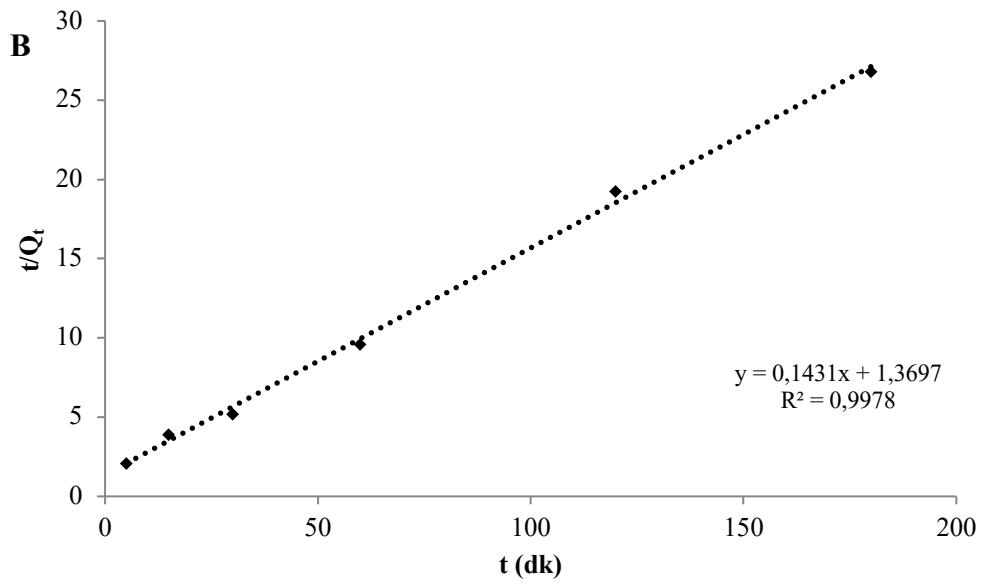
$$\log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - (k_1/2,303) \times t \quad (4.5)$$

$$(t/Q_t) = (1/k_2 \times Q_e^2) + (1/Q_e) \times t \quad (4.6)$$

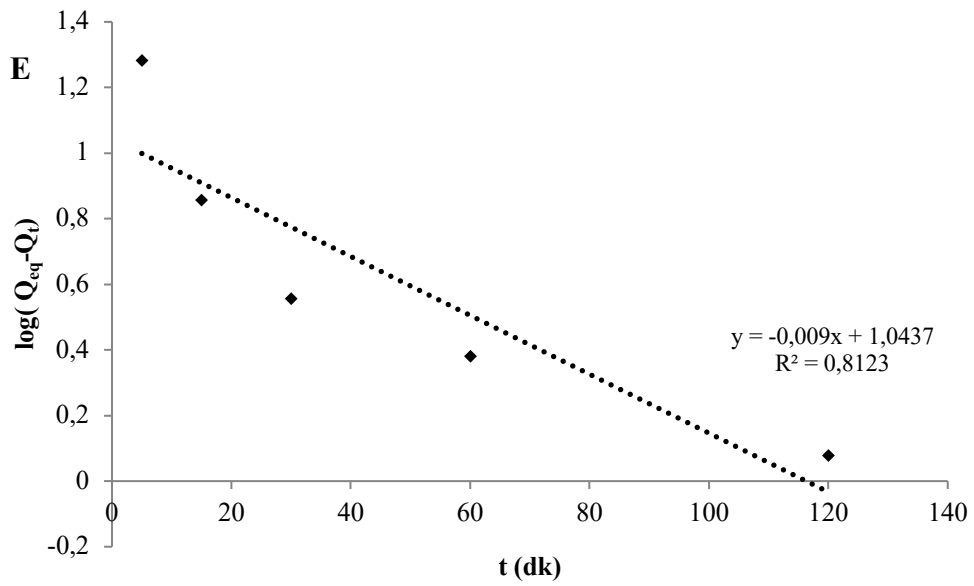
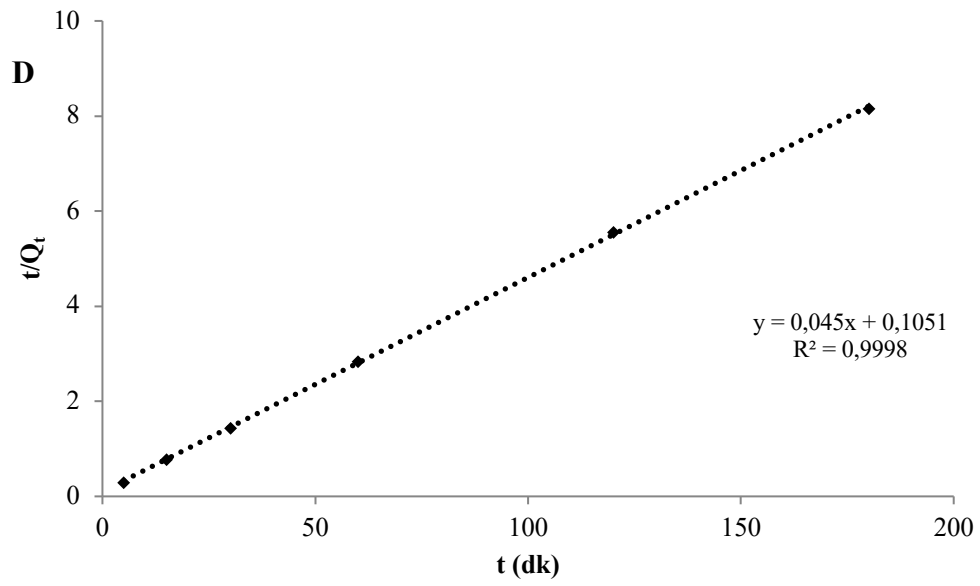
Bu denklemlerde, Q_t (mg/g), zamana karşılık aktif adsorpsiyon kapasitesi; t (dk), süre; k_1 (1/dk), pseudo birinci dereceden hız sabiti; ve k_2 (g/mg.dk), pseudo ikinci dereceden hız sabitidir.



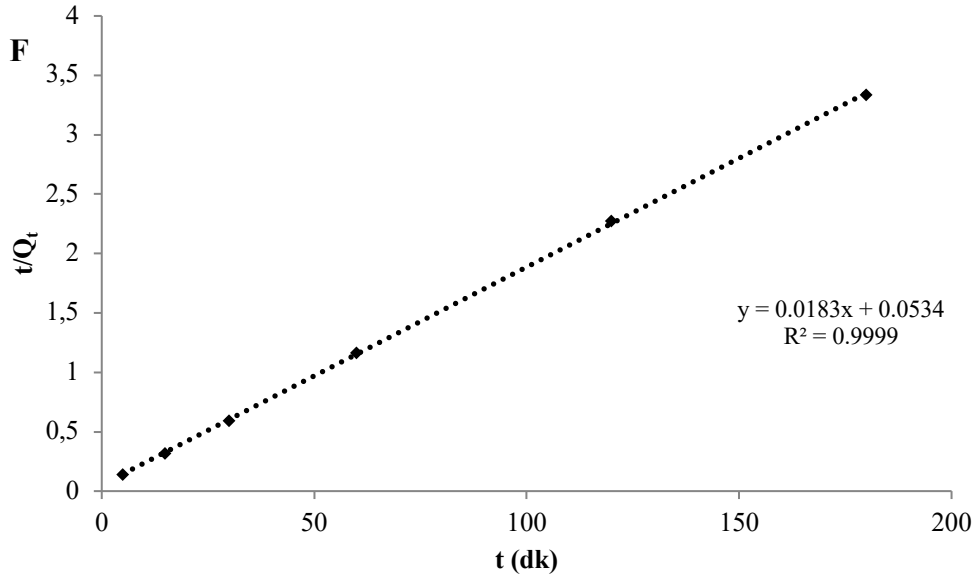
Şekil 4.13. Farklı derişim değerlerine sahip trombin baskılanmış mikrokriyojeller için kinetik modellerin parametreleri. 0,36 mg/mL için birinci derece (A) ve ikinci derece (B); 1,8 mg/mL için birinci derece (C) ve ikinci derece (D); 3,6 mg/mL için birinci derece (E) ve ikinci derece (F) kinetik modelleri.



Şekil 4.13. (devamı).



Şekil 4.13. (devamı).



Şekil 4.13. (devamı).

Çizelge 4.3. Farklı derişim değerlerine sahip kinetik modellerin parametreleri.

	Derişim		
	0,36 mg/mL	1,8 mg/mL	3,6 mg/mL
Birinci derece	Q_e (mg/g): 2,83 k_1 (1/min): 0,01 R^2 : 0,6932	Q_e (mg/g): 3,58 k_1 (1/min): 0,01 R^2 : 0,828	Q_e (mg/g): 11,05 k_1 (1/min): 0,02 R^2 : 0,8123
İkinci derece	Q_e (mg/g): 6,98 k_2 (g/mg.min): 0,01 R^2 : 0,9978	Q_e (mg/g): 22,22 k_2 (g/mg.min): 0,01 R^2 : 0,9998	Q_e (mg/g): 54,64 k_2 (g/mg.min): $6,27 \times 10^{-3}$ R^2 : 0,9999

Trombin baskılanmış mikrokriyojeller için adsorpsiyon izotermi ve kinetik parametreler, sırasıyla Şekil 4.12 ve 4.13 ile Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. En yüksek korelasyon katsayısı Freundlich izoterm modelinde (R^2 : 0,9725) elde edilmesine rağmen deneysel sonuçların Langmuir izoterm modelinde hesaplanan Q_{maks}

değerine (Q_{maks} : 55,86 mg/g) çok yakın olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3). Dolayısıyla trombin adsorpsiyon sürecini daha doğru bir şekilde açıkladığı için Langmuir izoterm modelinin en uygun model olduğu sonucuna varılmıştır. Bu, geliştirilen adsorban yüzeyinin homojen ve tek tabakalı olduğunu, etkileşim bölgelerinin eşdeğer enerjiye sahip olduğunu ve yanal etkileşimlerin ihmal edilebilir düzeyde olduğunu gösterir [173]. Çizelge 4.4'e bakıldığında, ikinci dereceden kinetik modelin, üç farklı trombin derişimi için hem Q_e hem de R^2 değerleri açısından deneysel verilere uyduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlar, trombin adsorpsiyon işleminin kimyasal süreç tarafından kontrol edildiğini göstermektedir.

4.5. Seçicilik Çalışmaları

Sulu çözeltide trombin baskılanmış mikrokriyojellerin seçiciliğini test etmek için yapılan deneyler sonucunda seçicilik katsayıları Çizelge 4.4'te özetlenmiştir. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin BSA, Hb ve LYS için adsorpsiyon kapasitesi sırasıyla 3,97, 1,87 ve 3,18 mg/g olarak bulunmuştur. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin NIP 1'e karşı seçicilik katsayıları BSA, Hb ve LYS için sırasıyla 3,75, 6,22 ve 3,13 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu değerler NIP 2'ye göre hesaplanmış ve BSA, Hb ve LYS için sırasıyla 2,46, 1,76 ve 2,31 olarak bulunmuştur. Elde edilen verilerden de anlaşılacağı üzere trombin baskılanmış mikrokriyojellerin spesifik olarak trombin moleküllerini tanıdığı sonucuna varmak mümkündür.

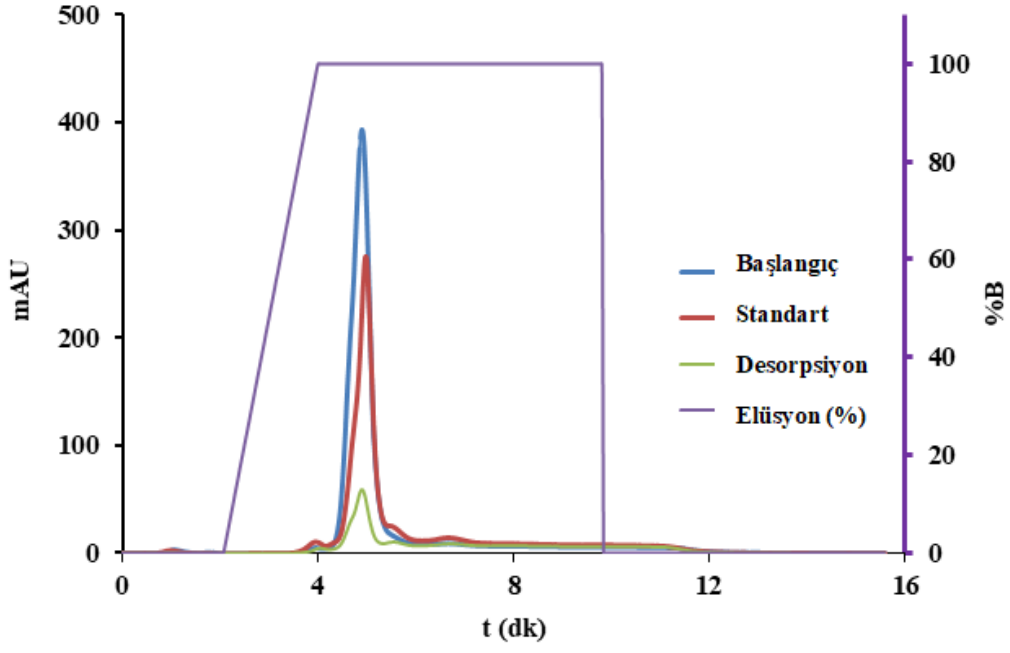
Çizelge 4.4. Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin seçicilik sonuçları.

	MIP		NIP 1		k'	NIP 2		k''
	Q	k	Q	k		Q	k	
Trb	6,75		1,28			2,57		
LYS	3,18	2,12	1,89	0,68	3,13	2,80	0,92	2,31
BSA	3,97	1,70	2,84	0,45	3,75	3,72	0,69	2,46
Hb	1,87	3,61	2,21	0,58	6,22	1,25	2,05	1,76

4.6. Kromatografik Analizler

Sulu çözeltilerden trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile saflaştırılan trombinin saflığı FPLC analizleri ile kontrol edilmiştir. FPLC ile gerçekleştirilen kromatografik çalışmanın ilk adımında, başka bir çalışmada prosedürü verilen PD-10 Desalting Columns (Sephadex™ G-25M, GE Healthcare, UK) kullanılmıştır [52]. Bu işlemde kısaca, kolonun kapağı çıkarılıp saklama çözeltisi boşaltıldıktan sonra üst filtre alınarak kolonun alt ucu işaretli bölgeden kesilmiştir. Kolon, 50 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 3 kez dengeleme tamponu ile yıkanmıştır. Bir sonraki aşamada denge tamponu ile santrifüj işlemi (1000 x g, 2 dakika) gerçekleştirilmiş ve numune uygulama aşamasına geçilmiştir. Bunun için iki kez olmak üzere 2,5 mL desorpsiyon çözeltisi alınmış ve santrifüj yapılmıştır (1000 x g, 2 dk). Elüat her seferinde ayrı bir kaba alınarak işlem tamamlanmıştır.

Şekil 4.14'te gösterildiği gibi, sulu çözeltilerden trombin saflaştırılması trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile etkin bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda, trombinin temas süresinin 4,5 dk civarında olduğu bilgisine ulaşılmaktadır. Tüm veriler dikkate alındığında hazırlanan adsorbanların yüksek seçicilik ve yüksek adsorpsiyon kapasitesi sağlayarak trombinin başarılı bir şekilde saflaştırılmasına katkı sağladığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.14. Trombin numunelerinin 1,0 mL/dk akış hızında FPLC kromatogramı; λ : 280 nm; T: 25°C.

5. YORUM

Sunulan tez çalışması, trombin saflaştırılmasına yönelik alternatif bir yol olarak geliştirilen trombin baskılanmış mikrokriyojellerin sentezlenmesi, karakterizasyon çalışmalarına ek olarak sulu çözelti uygulamalarını içermektedir.

Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak lazer uygulaması ile mikrokriyojellerin sentezleneceği 400-650 µm aralığında farklı boyutlara sahip mikrostensil kalıplar oluşturulmuştur.

Bir aminoasit olan glutamik asidin polimerleşebilen türevi N-Metakrilolil-(L)-glutamik asit sentezlenmiştir.

Moleküler baskılanmış polimerlerde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki oran büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle MAGA içeriğinin trombin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Trombin baskılanmış mikrokriyojeller için farklı oranlarda trombin ve MAGA oranları denenerek optimum ön polimerizasyon kompleks oranı 1:5 mol/mol olarak belirlenmiş ve ilerleyen çalışmalarda bu oranda sentezlenen mikrokriyojeller kullanılmıştır.

Çapraz bağlayıcı miktarının etkisini açıklayabilmek için polimerizasyon karışımında farklı mol oranlarında HEMA monomer ve MBAAm çapraz bağlayıcı kullanılarak aynı boyuttaki mikrostensil kalıpta sentezlenen farklı içeriklere sahip MIP (1-5) olmak üzere trombin baskılanmış mikrokriyojeller hazırlanmıştır.

Mikrostensil kalıp boyutlarının trombin adsorpsiyon kapasitesine olan etkisini açıklayabilmek adına farklı boyuttaki mikrostensil kalıplarda sentezlenen aynı çapraz bağlayıcı oranına sahip MIP (4, 6, 7) olmak üzere trombin baskılanmış mikrokriyojeller hazırlanmıştır.

Ek olarak, moleküler baskılama etkinliğini incelemek için NIP 1 ve NIP 2 olmak üzere baskılanmamış mikrokriyojeller, kalıp molekül olan trombin kullanılmadan aynı prosedür ile sentezlenmiştir.

Farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip farklı boyutlardaki mikrostensil kalıplar ile hazırlanmış trombin baskılanmış mikrokriyojeller (MIP 1-7) ile trombin baskılanmamış mikrokriyojellerin (NIP 1) detaylı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Mikrokriyojellerin genel performansı göz önünde bulundurularak trombin adsorpsiyonu için ileri çalışmalara MIP 4 adı verilen, HEMA monomer ve MBAAm çapraz bağlayıcı oranı 1:10 mol/mol olan ve boyutu 600-650 µm aralığındaki mikrostensil kalıplarda sentezlenen mikrokriyojeller ile devam edilmiştir.

Tekrarlanabilirliğin test edilmesi amacıyla aynı trombin baskılanmış mikrokriyojeller kullanılarak 10 kez adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen trombin baskılanmış mikrokriyojellerin trombin adsorpsiyon veriminde önemli bir azalma olmadan defalarca kullanılabilir olduğu, tasarlanan adsorbentin yüksek kararlılığı ve düşük maliyetli olduğu özellikle vurgulanmalıdır.

Trombin baskılanmış mikrokriyojellerin özgülüğünü göstermek için sığır serum albümini (BSA), hemoglobin (Hb) ve lizozim (LYS) yarışmacı proteinler olarak seçilmiştir. Ek olarak moleküler baskılamanın etkinliğini vurgulamak amacıyla NIP 1 ve NIP 2 mikrokriyojellerin de belirlenen yarışmacı proteinler ve trombin ile adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, trombin baskılanmış mikrokriyojellerin spesifik olarak trombin moleküllerini tanıdığını göstermektedir.

Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modelleri olmak üzere üç farklı adsorpsiyon modeli uygulanmıştır. Trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile trombin molekülleri arasındaki etkileşimi açıklamak için korelasyon katsayısı ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerleri dikkate alındığında en uygun modelin Langmuir izotermi olduğu bulunmuştur (R^2 : 0,9725, Q_{maks} : 55,86 mg/g).

Trombin adsorpsiyon sürecinin kontrol mekanizmasının kütle transferi veya kimyasal tepkime olup olmadığını incelemek için deneysel verilere kinetik modeller uygulanmıştır. Geliştirilen adsorpsiyon sürecinin elde edilen deneysel sonuçlar doğrultusunda pseudo ikinci dereceden kinetik ile daha uyumlu olduğu görülmüştür. Bu durum trombin adsorpsiyon sisteminin kontrol basamağının kimyasal süreç olduğunu göstermektedir.

Sulu çözeltilerden trombin baskılanmış mikrokriyojeller ile saflaştırılan trombinin saflığı FPLC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik analiz sonuçları dikkate alındığında sentezlenen trombin baskılanmış mikrokriyojellerin, trombin saflaştırılmasını etkin bir şekilde gerçekleştirdiği görülmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, trombinin sulu çözeltilerden saflaştırılması için trombin baskılanmış mikrokriyojellerin kullanımı başarıyla gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, sentezlenen mikrokriyojellerin trombinin yüksek özgüllükle yakalama ve izole etmede oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, geliştirilen mikrokriyojeller ile saflaştırma süreci özel ekipman gerektirmedikinden sınırlı kaynaklara sahip araştırmacılar için erişilebilir olma özelliğine sahiptir.

Sonuç olarak, deneysel bulgular moleküler baskılanmış mikrokriyojellerin biyomoleküllerin saflaştırılması için bir araç olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. İleri çalışmalarda, geliştirilen mikrokriyojeller enjekte edilebilir sistemlere dönüştürülebilir ve bu amaçla hazırlanan mikrokriyojellerin mikro taşıyıcı olarak hücre çalışmaları, doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve ilaç salımı alanlarında fayda sağlayabileceği öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] W. Cheng, J. Pan, J. Yang, Z. Zheng, F. Lu, Y. Chen, W. Gao, A photoelectrochemical aptasensor for thrombin based on the use of carbon quantum dot-sensitized TiO₂ and visible-light photoelectrochemical activity, *Microchim. Acta.* 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2800-z>.
- [2] Y. Hou, J. Liu, M. Hong, X. Li, Y. Ma, Q. Yue, C.Z. Li, A reusable aptasensor of thrombin based on DNA machine employing resonance light scattering technique, *Biosens. Bioelectron.* 92 (2017) 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.024>.
- [3] X. Xu, P. Guo, H. Shu, K. Qu, Y. Ge, G. Chen, Z. Luo, W. Du, C. Chang, R. Liu, Q. Fu, Preparation of biocompatible molecularly imprinted film on biowaste-derived magnetic pomegranate rind carbon for protein recognition in biological sample, *Mater. Sci. Eng. C.* 115 (2020) 111063. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111063>.
- [4] W. Liu, Y. Li, Y. Zeng, X. Zhang, J. Wang, L. Xie, X. Li, Y. Du, Microcryogels as injectable 3-D cellular microniches for site-directed and augmented cell delivery, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1864–1875. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.008>.
- [5] X. Zhao, B. Guo, H. Wu, Y. Liang, P.X. Ma, Injectable antibacterial conductive nanocomposite cryogels with rapid shape recovery for noncompressible hemorrhage and wound healing, *Nat. Commun.* 9 (2018) 2784. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04998-9>.
- [6] K.R. Hixon, T. Lu, S.A. Sell, A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 62 (2017) 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.033>.
- [7] C. Negrier, M. Shima, M. Hoffman, The central role of thrombin in bleeding disorders, *Blood Rev.* 38 (2019) 100582. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.05.006>.
- [8] E. Manseth, P.O. Skjervold, R. Flengsrud, Sample displacement chromatography of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) thrombin, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 60 (2004) 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.04.016>.

- [9] F. Chen, G. Huang, Mechanism and inhibition kinetics of peptide P13 as thrombin inhibitor, *Int. J. Biol. Macromol.* 150 (2020) 1046–1052. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.109>.
- [10] A. Aviñó, A.F. Jorge, C.S. Huertas, T.F.G.G. Cova, A. Pais, L.M. Lechuga, R. Eritja, C. Fabrega, Aptamer-peptide conjugates as a new strategy to modulate human α -thrombin binding affinity, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1863 (2019) 1619–1630. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.014>.
- [11] A. Pica, I.R. Krauss, V. Parente, H. Tateishi-Karimata, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, N. Sugimoto, F. Sica, Through-bond effects in the ternary complexes of thrombin sandwiched by two DNA aptamers, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) 461–469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1113>.
- [12] E. Di Cera, Thrombin, *Mol. Aspects Med.* 29 (2008) 203–254. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.01.001>.
- [13] W. Bode, Structure and interaction modes of thrombin, *Blood Cells, Mol. Dis.* 36 (2006) 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.12.027>.
- [14] J.A. Huntington, Molecular recognition mechanisms of thrombin, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 1861–1872. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01363.x>.
- [15] J.A. Huntington, T.P. Baglin, Targeting thrombin - Rational drug design from natural mechanisms, *Trends Pharmacol. Sci.* 24 (2003) 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.002>.
- [16] A.S. Wolberg, Thrombin generation and fibrin clot structure, *Blood Rev.* 21 (2007) 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.11.001>.
- [17] T. Myles, T.H. Yun, L.L.K. Leung, Structural requirements for the activation of human factor VIII by thrombin, *Blood.* 100 (2002) 2820–2826. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0843>.
- [18] D.M. Monroe, M. Hoffman, What does it take to make the perfect clot?, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 41–48. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83>.
- [19] D.M. Monroe, M. Hoffman, H.R. Roberts, Platelets and thrombin generation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 1381–1389.

<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000031340.68494.34>.

- [20] K. Dammann, A. Gifford, K. Kelley, S. P. Stawicki, Operative Hemostasis in Trauma and Acute Care Surgery: The Role of Biosurgical Agents, *Contemp. Appl. Biol. Hemostatic Agents across Surg. Spec. - Vol. 2* [Working Title]. (2020). <https://doi.org/10.5772/intechopen.94100>.
- [21] Z. Liu, S. Fan, H. Liu, J. Yu, R. Qiao, M. Zhou, Y. Yang, J. Zhou, P. Xie, Enhanced detection of low-abundance human plasma proteins by integrating polyethylene glycol fractionation and immunoaffinity depletion, *PLoS One*. 11 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166306>.
- [22] D.A. Megger, T. Bracht, H.E. Meyer, B. Sitek, Label-free quantification in clinical proteomics, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1834 (2013) 1581–1590. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.001>.
- [23] T.R. Silva, D.P. Rodrigues, J.M.S. Rocha, M.H. Gil, S.C.S. Pinto, J.A. Lopes-da-Silva, A.J. Guimar, Immobilization of trypsin onto poly(ethylene terephthalate)/poly(lactic acid) nonwoven nanofiber mats, *Biochem. Eng. J.* 104 (2015) 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.026>.
- [24] F. Xu, W.H. Wang, Y.J. Tan, M.L. Bruening, Facile trypsin immobilization in polymeric membranes for rapid, efficient protein digestion, *Anal. Chem.* 82 (2010) 10045–10051. <https://doi.org/10.1021/ac101857j>.
- [25] J. Wu, M. Luan, J. Zhao, Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads, *Int. J. Biol. Macromol.* 39 (2006) 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.03.017>.
- [26] T. Liu, S. Wang, G. Chen, Immobilization of trypsin on silica-coated fiberglass core in microchip for highly efficient proteolysis, *Talanta*. 77 (2009) 1767–1773. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.009>.
- [27] H.L. Wu, P.Y. Yang, G.R. Fan, Y.P. Tian, H.J. Lu, H. Jin, Sol-gel-derived poly(dimethylsiloxane) enzymatic reactor for microfluidic peptide mapping, *Chinese J. Chem.* 24 (2006) 903–909. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200690172>.
- [28] K. Sakai-Kato, M. Kato, T. Toyo’oka, Creation of an on-chip enzyme reactor by encapsulating trypsin in sol-gel on a plastic microchip, *Anal. Chem.* 75 (2003) 388–393. <https://doi.org/10.1021/ac026240+>.

- [29] G. Wang, Y. Xin, W. Han, H. Uyama, Immobilization of catalase onto hydrophilic mesoporous poly(ethylene-co-vinyl alcohol) monoliths, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015) 1–5. <https://doi.org/10.1002/app.42556>.
- [30] S. Xu, C. Pan, L. Hu, Y. Zhang, Z. Guo, X. Li, H. Zou, Enzymatic reaction of the immobilized enzyme on porous silicon studied by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, *Electrophoresis*. 25 (2004) 3669–3676. <https://doi.org/10.1002/elps.200406063>.
- [31] T.R. Shah, A. Misra, *Proteomics*, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384964-9.00008-6>.
- [32] N.M. Verrills, Clinical proteomics: present and future prospects., *Clin. Biochem. Rev.* 27 (2006) 99–116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077880><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1579414>.
- [33] R. Aebersold, M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics: Abstract: *Nature*, *Nature*. 422 (2003) 198–207.
- [34] J. Klose, U. Kobalz, Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*. 16 (1995) 1034–1059. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601175>.
- [35] M. Azarkan, J. Huet, D. Baeyens-Volant, Y. Looze, G. Vandebussche, Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 849 (2007) 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.056>.
- [36] R. Eivazzadeh-keihan, H. Bahreinizad, Z. Amiri, H. Madanchi, Functionalized magnetic nanoparticles for the separation and purification of proteins and peptides, *Trends Anal. Chem.* 141 (2021) 116291.
- [37] S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, H. Cong, Recent advances on protein separation and purification methods, *Adv. Colloid Interface Sci.* 284 (2020) 102254. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254>.
- [38] H. Wang, H. Sun, C. Gao, Q. Chen, W. Dong, Y. Chang, H. Luo, A phase separation process induced by pH change for purification of His-tagged protein at

- low salt concentration, *Biochem. Eng. J.* 191 (2023) 108792. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108792>.
- [39] S.F. Tehrani, P. Bharadwaj, J. Leblond Chain, V.G. Roullin, Purification processes of polymeric nanoparticles: How to improve their clinical translation?, *J. Control. Release.* 360 (2023) 591–612. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.06.038>.
- [40] B. Hemmateenejad, E. Rafatmah, Z. Shojaeifard, Microfluidic paper and thread-based separations: Chromatography and electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1704 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464117>.
- [41] Z. Yu, Y. Cao, Y. Tian, W. Ji, K.E. Chen, Z. Wang, J. Ren, H. Xiao, L. Zhang, W. Liu, L. Fan, Q. Zhang, C. Cao, Real-time and quantitative protein detection via polyacrylamide gel electrophoresis and online intrinsic fluorescence imaging, *Anal. Chim. Acta.* 1291 (2024) 342219. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342219>.
- [42] M. Zarei, Application of nanocomposite polymer hydrogels for ultra-sensitive fluorescence detection of proteins in gel electrophoresis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 93 (2017) 7–22. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.003>.
- [43] T. Kondo, Cancer biomarker development and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE), *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1867 (2019) 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.07.002>.
- [44] M.R. Kim, C.W. Kim, Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 849 (2007) 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.046>.
- [45] C.M. Yang, P.Y. Chu, A.Y. Wu, P.H. Hsieh, C.H. Hsieh, M.H. Wu, Development of an optically induced dielectrophoresis (ODEP) microfluidic system with a virtual gel filtration chromatography (GFC)-inspired mechanism for the high-performance sorting and separation of microparticles based on their size differences, *Sensors Actuators B Chem.* 395 (2023) 134443. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134443>.
- [46] A.M. Caltabiano, J.P. Foley, A.M. Striegel, Aqueous size-exclusion chromatography of polyelectrolytes on reversed-phase and hydrophilic

- interaction chromatography columns, *J. Chromatogr. A.* 1532 (2018) 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.007>.
- [47] T. Brooijmans, P. Breuer, P.J. Schoenmakers, R.A.H. Peters, Charge-based separation of synthetic macromolecules by non-aqueous ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1626 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461351>.
- [48] S. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037>.
- [49] B.V. Ayyar, S. Arora, C. Murphy, R. O’Kennedy, Affinity chromatography as a tool for antibody purification, *Methods.* 56 (2012) 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.10.007>.
- [50] H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 49 (2001) 199–240. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00200-7).
- [51] J. Guo, H. Lin, J. Wang, Y. Lin, T. Zhang, Z. Jiang, Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 165 (2019) 182–197. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.009>.
- [52] M. Asena Özbek, D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Metal-chelated polyamide hollow fiber membranes for ovalbumin purification from egg white, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1203 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123293>.
- [53] D.S. Hage, J.A. Anguizola, C. Bi, R. Li, R. Matsuda, E. Papastavros, E. Pfaunmiller, J. Vargas, X. Zheng, Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.004>.
- [54] S. Arora, V. Saxena, B.V. Ayyar, Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification, *Methods.* 116 (2017) 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.010>.
- [55] A.C.A. Roque, C.S.O. Silva, M.Â. Taipa, Affinity-based methodologies and

- ligands for antibody purification: Advances and perspectives, *J. Chromatogr. A.* 1160 (2007) 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.109>.
- [56] C. Zhang, E. Rodriguez, C. Bi, X. Zheng, D. Suresh, K. Suh, Z. Li, F. Elsebaei, D.S. Hage, High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents, *Analyst.* 143 (2018) 374–391. <https://doi.org/10.1039/c7an01469d>.
- [57] E.L. Rodriguez, S. Poddar, S. Iftekhar, K. Suh, A.G. Woolfork, S. Ovbude, A. Pekarek, M. Walters, S. Lott, D.S. Hage, Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1157 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>.
- [58] L. Uzun, H. Yavuz, R. Say, A. Ersöz, A. Denizli, Poly(ethylene dimethacrylate-glycidyl methacrylate) monolith as a stationary phase in dye-affinity chromatography, *Ind. Eng. Chem. Res.* 43 (2004) 6507–6513. <https://doi.org/10.1021/ie040045z>.
- [59] M. Andaç, I.Y. Galaev, A. Denizli, Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1021 (2016) 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.034>.
- [60] E. Calleri, G. Marrubini, G. Brusotti, G. Massolini, G. Caccialanza, Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.030>.
- [61] Y. Ge, A.P.F. Turner, Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.01.001>.
- [62] S.F. Teng, K. Sproule, A. Husain, C.R. Lowe, Affinity chromatography on immobilized “biomimetic” ligands: Synthesis, immobilization and chromatographic assessment of an immunoglobulin G-binding ligand, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 740 (2000) 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00549-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00549-6).

- [63] Y.D. Clonis, N.E. Labrou, V.P. Kotsira, C. Mazitsos, S. Melissis, G. Gogolas, Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification, *J. Chromatogr. A.* 891 (2000) 33–44. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00577-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00577-X).
- [64] K. Landsteiner, J. Van Der Scheer, On cross reactions of immune sera to azoproteins ii. Antigens with azocomponents containing two determinant groups, *J. Exp. Med.* 63 (1936) 325–339. <https://doi.org/10.1084/jem.67.5.709>.
- [65] D.H. Campbell, E. Luescher, L.S. Lerman, Immunologic Adsorbents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 37 (1951) 575–578. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.9.575>.
- [66] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C.B. Anfinsen, Selective enzyme purification by affinity chromatography., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61 (1968) 636–643. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.636>.
- [67] H.S. Kim, Y.S. Kye, D.S. Hage, Development and evaluation of N-hydroxysuccinimide-activated silica for immobilizing human serum albumin in liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A.* 1049 (2004) 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.010>.
- [68] T.R. Besanger, J.D. Brennan, Entrapment of membrane proteins in sol-gel derived silica, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 40 (2006) 209–225. <https://doi.org/10.1007/s10971-006-8132-1>.
- [69] J. Vargas-Badilla, S. Poddar, S. Azaria, C. Zhang, D.S. Hage, Optimization of protein entrapment in affinity microcolumns using hydrazide-activated silica and glycogen as a capping agent, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1121 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.004>.
- [70] A.J. Jackson, J. Anguizola, E.L. Pfaunmiller, D.S. Hage, Use of entrapment and high-performance affinity chromatography to compare the binding of drugs and site-specific probes with normal and glycosylated human serum albumin, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5833–5841. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6981-3>.
- [71] C. Bi, A. Jackson, J. Vargas-Badilla, R. Li, G. Rada, J. Anguizola, E. Pfaunmiller, D.S. Hage, Entrapment of alpha1-acid glycoprotein in high-performance affinity columns for drug-protein binding studies, *J. Chromatogr. B*

- Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1021 (2016) 188–196.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.021>.
- [72] V. Pichon, K. Haupt, Affinity separations on molecularly imprinted polymers with special emphasis on solid-phase extraction, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 989–1023. <https://doi.org/10.1080/10826070600574739>.
- [73] L. Chen, S. Xu, J. Li, Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 2922–2942. <https://doi.org/10.1039/c0cs00084a>.
- [74] R.I. Boysen, Advances in the development of molecularly imprinted polymers for the separation and analysis of proteins with liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 51–71. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800945>.
- [75] H.R. Culver, N.A. Peppas, Protein-Imprinted Polymers: The Shape of Things to Come?, *Chem. Mater.* 29 (2017) 5753–5761. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b01936>.
- [76] P. Zahedi, M. Ziaee, M. Abdouss, A. Farazin, B. Mizaikoff, Biomacromolecule template-based molecularly imprinted polymers with an emphasis on their synthesis strategies: a review, *Polym. Adv. Technol.* 27 (2016) 1124–1142. <https://doi.org/10.1002/pat.3754>.
- [77] Z. Iskierko, P.S. Sharma, K. Bartold, A. Pietrzyk-Le, K. Noworyta, W. Kutner, Molecularly imprinted polymers for separating and sensing of macromolecular compounds and microorganisms, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 30–46. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.002>.
- [78] R. Schirhagl, Bioapplications for molecularly imprinted polymers, *Anal. Chem.* 86 (2014) 250–261. <https://doi.org/10.1021/ac401251j>.
- [79] B. Cui, P. Liu, X. Liu, S. Liu, Z. Zhang, Molecularly imprinted polymers for electrochemical detection and analysis: progress and perspectives, *J. Mater. Res. Technol.* 9 (2020) 12568–12584. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.08.052>.
- [80] O.S. Ahmad, T.S. Bedwell, C. Esen, A. Garcia-Cruz, S.A. Piletsky, Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.009>.
- [81] A. Azizi, C.S. Bottaro, A critical review of molecularly imprinted polymers for

- the analysis of organic pollutants in environmental water samples, *J. Chromatogr. A.* 1614 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460603>.
- [82] S. Lay, X. Ni, H. Yu, S. Shen, State-of-the-art applications of cyclodextrins as functional monomers in molecular imprinting techniques: a review, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 2321–2331. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600003>.
- [83] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.* 19 (2006) 106–180. <https://doi.org/10.1002/jmr.760>.
- [84] W. Shi, S.Q. Zhang, K. Bin Li, W.P. Jia, D.M. Han, Integration of mixed-mode chromatography and molecular imprinting technology for double recognition and selective separation of proteins, *Sep. Purif. Technol.* 202 (2018) 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.03.057>.
- [85] E. Esen, B. Osman, M.N. Demir, Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for selective determination of melatonin, *Microchem. J.* 170 (2021) 106666. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106666>.
- [86] E. Özgür, Y. Saylan, N. Bereli, D. Türkmen, A. Denizli, Molecularly imprinted polymer integrated plasmonic nanosensor for cocaine detection, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 31 (2020) 1211–1222. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1751524>.
- [87] A. Valero-Navarro, A. Salinas-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, R. Mallavia, A. Fernández-Gutiérrez, The development of a MIP-optosensor for the detection of monoamine naphthalenes in drinking water, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2305–2311. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.11.022>.
- [88] D. Türkmen, N. Bereli, M.E. Çorman, H. Shaikh, S. Akgöl, A. Denizli, Molecular imprinted magnetic nanoparticles for controlled delivery of mitomycin C, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 42 (2014) 316–322. <https://doi.org/10.3109/21691401.2013.823094>.
- [89] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Molecularly imprinted polymers for drug delivery, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 804 (2004) 231–

245. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.12.032>.
- [90] A. Strikovskiy, J. Hradil, G. Wulff, Catalytically active, molecularly imprinted polymers in bead form, *React. Funct. Polym.* 54 (2003) 49–61. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(02\)00182-7](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(02)00182-7).
- [91] G. Wulff, Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers, *Chem. Rev.* 102 (2002) 1–27. <https://doi.org/10.1021/cr980039a>.
- [92] M.R. Gama, C.B.G. Bottoli, Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.045>.
- [93] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1742–1778. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.011>.
- [94] G. Vasapollo, R. Del Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 5908–5945. <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>.
- [95] X. Shi, A. Wu, G. Qu, R. Li, D. Zhang, Development and characterisation of molecularly imprinted polymers based on methacrylic acid for selective recognition of drugs, *Biomaterials.* 28 (2007) 3741–3749. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.036>.
- [96] X. Liu, Y. Wang, L. Li, R. Li, Synthesis and characterization of azoxystrobin hydrophilic molecularly imprinted microspheres, *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* 56 (2019) 907–917. <https://doi.org/10.1080/10601325.2019.1607751>.
- [97] K. Yoshimatsu, K. Reimhult, A. Krozer, K. Mosbach, K. Sode, L. Ye, Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: The control of particle size suitable for different analytical applications, *Anal. Chim. Acta.* 584 (2007) 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.004>.
- [98] S. Scorrano, L. Longo, G. Vasapollo, Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine, *Anal. Chim. Acta.* 659 (2010) 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.046>.

- [99] S. Rahman, B. Bozal-Palabiyik, D.N. Unal, C. Erkmen, M. Siddiq, A. Shah, B. Uslu, Molecularly imprinted polymers (MIPs) combined with nanomaterials as electrochemical sensing applications for environmental pollutants, *Trends Environ. Anal. Chem.* 36 (2022) e00176. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00176>.
- [100] A. Sarafraz-Yazdi, N. Razavi, Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.004>.
- [101] E. Turiel, A. Martín-Esteban, Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review, *Anal. Chim. Acta.* 668 (2010) 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.019>.
- [102] H. Zhou, H. Qiu, J. Zhang, Y. Fang, B. Cui, Y. Shen, Design, preparation, and application of molecularly imprinted nanomaterials for food safety analysis with electrochemistry, *Coord. Chem. Rev.* 500 (2024) 215523. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215523>.
- [103] Y. Wang, M. Tian, K. Yu, L. Li, Z. Zhang, L. Li, A versatile strategy to fabricate magnetic ENG molecularly imprinted mesoporous silica particles for specific magnetic separation of bisphenol A, *New J. Chem.* 43 (2019) 3400–3408. <https://doi.org/10.1039/C8NJ06027D>.
- [104] H. Sun, Y. Li, J. Yang, X. Sun, C. Huang, X. Zhang, J. Chen, Preparation of dummy-imprinted polymers by Pickering emulsion polymerization for the selective determination of seven bisphenols from sediment samples, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 2188–2195. <https://doi.org/10.1002/jssc.201501305>.
- [105] Z. Sun, W. Schüssler, M. Sengl, R. Niessner, D. Knopp, Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta.* 620 (2008) 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.020>.
- [106] J. Yin, Z. Meng, M. Du, C. Liu, M. Song, H. Wang, Pseudo-template molecularly imprinted polymer for selective screening of trace β -lactam antibiotics in river and tap water, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 5420–5426. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.044>.

- [107] H. Shaikh, N. Memon, H. Khan, M.I. Bhangar, S.M. Nizamani, Preparation and characterization of molecularly imprinted polymer for di(2-ethylhexyl) phthalate: Application to sample clean-up prior to gas chromatographic determination, *J. Chromatogr. A.* 1247 (2012) 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.056>.
- [108] X.P. He, Z.R. Lian, L.J. Tan, J.T. Wang, Preparation and characterization of magnetic molecularly imprinted polymers for selective trace extraction of dienestrol in seawater, *J. Chromatogr. A.* 1469 (2016) 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.052>.
- [109] W. Guan, J. Pan, X. Wang, W. Hu, L. Xu, X. Zou, C. Li, Selective recognition of 4-nitrophenol from aqueous solution by molecularly imprinted polymers with functionalized tetratitanate whisker composites as support, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1244–1252. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100032>.
- [110] W. Zhang, X. She, L. Wang, H. Fan, Q. Zhou, X. Huang, J.Z. Tang, Preparation, characterization and application of a molecularly imprinted polymer for selective recognition of sulphuride, *Materials (Basel)*. 10 (2017). <https://doi.org/10.3390/ma10050475>.
- [111] S. V. Mikhalovsky, I.N. Savina, M. Dainiak, A.E. Ivanov, I.Y. Galaev, *Biomaterials/Cryogels*, Second Edi, Elsevier B.V., 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00432-3>.
- [112] F.M. Plleeva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1657–1671. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700127>.
- [113] N. Orakdogan, M.Y. Kızılay, O. Okay, Suppression of inhomogeneities in hydrogels formed by free-radical crosslinking copolymerization, *Polymer (Guildf)*. 299 (2020) 112134. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.09.082>.
- [114] A.Z. Baimenov, D.A. Berillo, V.J. Inglezakis, Cryogel-based Ag⁰/Ag₂O nanocomposites for iodide removal from water, *J. Mol. Liq.* 299 (2020) 112134. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112134>.
- [115] S. Reichelt, C. Abe, S. Hainich, W. Knolle, U. Decker, A. Prager, R. Konieczny,

- Electron-beam derived polymeric cryogels, *Soft Matter*. 9 (2013) 2484–2492. <https://doi.org/10.1039/c2sm27517a>.
- [116] D. Berillo, B. Mattiasson, I.Y. Galaev, H. Kirsebom, Formation of macroporous self-assembled hydrogels through cryogelation of Fmoc-Phe-Phe, *J. Colloid Interface Sci.* 368 (2012) 226–230. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.006>.
- [117] D. Berillo, L. Elowsson, H. Kirsebom, Oxidized Dextran as Crosslinker for Chitosan Cryogel Scaffolds and Formation of Polyelectrolyte Complexes between Chitosan and Gelatin, *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 1090–1099. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200023>.
- [118] O. Zaushitsyna, D. Berillo, H. Kirsebom, B. Mattiasson, Cryostructured and crosslinked viable cells forming monoliths suitable for bioreactor applications, *Top. Catal.* 57 (2014) 339–348. <https://doi.org/10.1007/s11244-013-0189-9>.
- [119] D. Akilbekova, M. Shaimerdenova, S. Adilov, D. Berillo, Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine, *Int. J. Biol. Macromol.* 114 (2018) 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.116>.
- [120] H. Kirsebom, L. Elowsson, D. Berillo, S. Cozzi, I. Inci, E. Piskin, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Enzyme-Catalyzed Crosslinking in a Partly Frozen State: A New Way to Produce Supermacroporous Protein Structures, *Macromol. Biosci.* 13 (2013) 67–76. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200343>.
- [121] N. V. Kramareva, A.Y. Stakheev, O.P. Tkachenko, K. V. Klementiev, W. Grünert, E.D. Finashina, L.M. Kustov, Heterogenized palladium chitosan complexes as potential catalysts in oxidation reactions: Study of the structure, *J. Mol. Catal. A Chem.* 209 (2004) 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2003.08.004>.
- [122] N. Bereli, H. Yavuz, A. Denizli, Protein chromatography by molecular imprinted cryogels, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 6076 (2020) 657–670. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1780606>.
- [123] Y. Saylan, A. Denizli, Supermacroporous composite cryogels in biomedical applications, *Gels*. 5 (2019) 20. <https://doi.org/10.3390/gels5020020>.
- [124] J. Van Hoorick, H. Declercq, A. De Muynck, A. Houben, L. Van Hoorebeke, R. Cornelissen, J. Van Erps, H. Thienpont, P. Dubruel, S. Van Vlierberghe, Indirect

- additive manufacturing as an elegant tool for the production of self-supporting low density gelatin scaffolds, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5566-4>.
- [125] S.A. Bencherif, T.M. Braschler, P. Renaud, Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry, *J. Periodontal Implant Sci.* 43 (2013) 251–261. <https://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.6.251>.
- [126] W.S.L. Roman V. Ivanov, Vladimir I. Lozinsky, Seok Kyun Noh, Sung Soo Han, Preparation and Characterization of Polyacrylamide Cryogels Produced from a High-Molecular-Weight Precursor. I. Influence of the Reaction Temperature and Concentration of the Crosslinking Agent, *Trends Biotechnol.* 106 (2007) 1470–1475. <https://doi.org/DOI 10.1002/app.26559>.
- [127] G. Ertürk, B. Mattiasson, Cryogels-versatile tools in bioseparation, *J. Chromatogr. A.* 1357 (2014) 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.055>.
- [128] V.M. Gun'Ko, L.I. Mikhalovska, I.N. Savina, R. V. Shevchenko, S.L. James, P.E. Tomlins, S. V. Mikhalovsky, Characterisation and performance of hydrogel tissue scaffolds, *Soft Matter.* 6 (2010) 5351–5358. <https://doi.org/10.1039/c0sm00617c>.
- [129] F.M. Plieva, M. Karlsson, M.R. Aguilar, D. Gomez, S. Mikhalovsky, I.Y. Galaev', Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter.* 1 (2005) 303–309. <https://doi.org/10.1039/b510010k>.
- [130] I.Y. Galaev, M.B. Dainiak, F. Plieva, B. Mattiasson, Effect of matrix elasticity on affinity binding and release of bioparticles. Elution of bound cells by temperature-induced shrinkage of the smart macroporous hydrogel, *Langmuir.* 23 (2007) 35–40. <https://doi.org/10.1021/la061462e>.
- [131] M.B. Dainiak, A. Kumar, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Detachment of affinity-captured bioparticles by deformation of a macroporous hydrogel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 849–854. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508432103>.
- [132] A. Memic, T. Colombani, L.J. Eggermont, M. Rezaeeyazdi, J. Steingold, Z.J.

- Rogers, K.J. Navare, H.S. Mohammed, S.A. Bencherif, Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications, *Adv. Ther.* 2 (2019) 1–45. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800114>.
- [133] M. Rezaeeyazdi, T. Colombani, A. Memic, S.A. Bencherif, Injectable hyaluronic acid-co-gelatin cryogels for tissue-engineering applications, *Materials (Basel)*. 11 (2018) 23–25. <https://doi.org/10.3390/ma11081374>.
- [134] F.J. O'Brien, B.A. Harley, I. V. Yannas, L.J. Gibson, The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds, *Biomaterials*. 26 (2005) 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.052>.
- [135] Y. Zhang, C. Wang, W. Jiang, W. Zuo, G. Han, Influence of Stage Cooling Method on Pore Architecture of Biomimetic Alginate Scaffolds, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16024-x>.
- [136] I. Kim, S.S. Lee, S. Bae, H. Lee, N.S. Hwang, Heparin Functionalized Injectable Cryogel with Rapid Shape-Recovery Property for Neovascularization, *Biomacromolecules*. 19 (2018) 2257–2269. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00331>.
- [137] T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean, A.J. O'Connor, Formation and characterisation of a modifiable soft macro-porous hyaluronic acid cryogel platform, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 26 (2015) 881–897. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1065597>.
- [138] H. Kirsebom, D. Topgaard, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes, *Langmuir*. 26 (2010) 16129–16133. <https://doi.org/10.1021/la102917c>.
- [139] L. Serex, T. Braschler, A. Filippova, A. Rochat, A. Bédurier, A. Bertsch, P. Renaud, Pore Size Manipulation in 3D Printed Cryogels Enables Selective Cell Seeding, *Adv. Mater. Technol.* 3 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1002/admt.201700340>.
- [140] S. Lin, N. Sangaj, T. Razafiarison, C. Zhang, S. Varghese, Influence of physical properties of biomaterials on cellular behavior, *Pharm. Res.* 28 (2011) 1422–1430. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0378-9>.

- [141] T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean, A.J. O'Connor, Cryogels for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 2682–2695. <https://doi.org/10.1039/c3tb20280a>.
- [142] A. Ström, A. Larsson, O. Okay, Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1002/app.42194>.
- [143] K. Çetin, A. Denizli, 5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 126 (2015) 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.038>.
- [144] S. Asliyüce, N. Bereli, L. Uzun, M.A. Onur, R. Say, A. Denizli, Ion-imprinted supermacroporous cryogel, for in vitro removal of iron out of human plasma with beta thalassemia, *Sep. Purif. Technol.* 73 (2010) 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.04.007>.
- [145] N. Bereli, M. Andaç, G. Baydemir, R. Say, I.Y. Galaev, A. Denizli, Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *J. Chromatogr. A.* 1190 (2008) 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.110>.
- [146] K. Çetin, S. Asliyüce, N. Idil, A. Denizli, Preparation of lysozyme loaded gelatin microcryogels and investigation of their antibacterial properties, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 32 (2021) 189–204. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1825303>.
- [147] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation.* 10 (2001) 163–188. <https://doi.org/10.1023/A:1016386902611>.
- [148] P.A. Shiekh, S.M. Andrabi, A. Singh, S. Majumder, A. Kumar, Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications, *Eur. Polym. J.* 144 (2021) 110234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110234>.
- [149] D. Çimen, M.A. Özbek, N. Bereli, B. Mattiasson, A. Denizli, Injectable cryogels in biomedicine, *Gels.* 7 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.3390/gels7020038>.
- [150] K. Çetin, A. Denizli, Immunoaffinity microcryogels for purification of transferrin, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1114–1115

- (2019) 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.017>.
- [151] A. Denizli, R. Say, B. Garipcan, S. Patir, Methacryloylamidoglutamic acid functionalized poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for UO₂²⁺ removal, *React. Funct. Polym.* 58 (2004) 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2003.09.005>.
- [152] F. Chen, H. Jiang, W. Chen, G. Huang, Interaction of the synthetic antithrombotic peptide P10 with thrombin: A spectroscopy study, *RSC Adv.* 9 (2019) 18498–18505. <https://doi.org/10.1039/c9ra02994j>.
- [153] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>.
- [154] J. Bensalah, Removal of the textile dyes by a resin adsorbent polymeric: Insight into optimization, kinetics and isotherms adsorption phenomenally, *Inorg. Chem. Commun.* 161 (2024) 111975. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111975>.
- [155] X. Chen, M.F. Hossain, C. Duan, J. Lu, Y.F. Tsang, M.S. Islam, Y. Zhou, Isotherm models for adsorption of heavy metals from water - A review, *Chemosphere.* 307 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135545>.
- [156] J.P. Varela, On validity, physical meaning, mechanism insights and regression of adsorption kinetic models, *J. Mol. Liq.* 376 (2023) 121416. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121416>.
- [157] S.J. Shirbin, F. Karimi, N.J.A. Chan, D.E. Heath, G.G. Qiao, Macroporous Hydrogels Composed Entirely of Synthetic Polypeptides: Biocompatible and Enzyme Biodegradable 3D Cellular Scaffolds, *Biomacromolecules.* 17 (2016) 2981–2991. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00817>.
- [158] T. Xiang, T. Lu, W.F. Zhao, C.S. Zhao, Ionic-Strength Responsive Zwitterionic Copolymer Hydrogels with Tunable Swelling and Adsorption Behaviors, *Langmuir.* 35 (2019) 1146–1155. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01719>.
- [159] P. Öncel, K. Çetin, A.A. Topçu, H. Yavuz, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel membranes for mitomycin C delivery, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 28 (2017) 519–531. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1282772>.
- [160] B.P. Santora, M.R. Gagné, K.G. Moloyt, N.S. Radu, Porogen and cross-linking

- effects on the surface area, pore volume distribution, and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization 3, *Macromolecules*. 34 (2001) 658–661. <https://doi.org/10.1021/ma0004817>.
- [161] Y. Qiang, A. Patel, I. Manas-Zloczower, Enhancing microfibrillated cellulose reinforcing efficiency in epoxy composites by graphene oxide crosslinking, *Cellulose*. 27 (2020) 2211–2224. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02916-w>.
- [162] C. Wang, X.Y. Dong, Z. Jiang, Y. Sun, Enhanced adsorption capacity of cryogel bed by incorporating polymeric resin particles, *J. Chromatogr. A*. 1272 (2013) 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.059>.
- [163] I. Perçin, N. Idil, A. Denizli, Molecularly imprinted poly(N-isopropylacrylamide) thermosensitive based cryogel for immunoglobulin G purification, *Process Biochem*. 80 (2019) 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.001>.
- [164] K. Çetin, A. Denizli, Microcryogels as plastic antibodies for transferrin purification, *Process Biochem*. 79 (2019) 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.020>.
- [165] S. Moosavi, S. Gan, C.H. Chia, S. Zakaria, Evaluation of Crosslinking Effect on Thermo-mechanical, Acoustic Insulation and Water Absorption Performance of Biomass-Derived Cellulose Cryogels, *J. Polym. Environ*. 28 (2020) 1180–1189. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01676-0>.
- [166] B. Ari, N. Sahiner, Biodegradable super porous inulin cryogels as potential drug carrier, *Polym. Adv. Technol*. 31 (2020) 2863–2873. <https://doi.org/10.1002/pat.5014>.
- [167] N. Yu, J. Wu, Rapid and reagentless detection of thrombin in clinic samples via microfluidic aptasensors with multiple target-binding sites, *Biosens. Bioelectron*. 146 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111726>.
- [168] N. Pourreza, M. Ghomi, Hydrogel based aptasensor for thrombin sensing by Resonance Rayleigh Scattering, *Anal. Chim. Acta*. 1079 (2019) 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.049>.
- [169] N. Bereli, L. Uzun, H. Yavuz, A. Elkak, A. Denizli, Antibody purification using porous metal-chelated monolithic columns, *J. Appl. Polym. Sci*. 101 (2006) 395–404. <https://doi.org/10.1002/app.23894>.

- [170] M. Bakhshpour, I. Göktürk, N. Bereli, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel cartridges for the selective recognition of tyrosine, *Biotechnol. Prog.* 36 (2020). <https://doi.org/10.1002/btpr.3006>.
- [171] F.S. Nworie, F.I. Nwabue, W. Oti, E. Mbam, B.U. Nwali, Removal of methylene blue from aqueous solution using activated rice husk biochar: Adsorption isotherms, kinetics and error analysis, *J. Chil. Chem. Soc.* 64 (2019) 4365–4376. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072019000104365>.
- [172] L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography, *React. Funct. Polym.* 64 (2005) 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2005.05.003>.
- [173] C. Armutcu, E. Özgür, M.E. Çorman, L. Uzun, Interface imprinted polymers with well-oriented recognition sites for selective purification of hemoglobin, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 197 (2021) 111435. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111435>.

EKLER

EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

1. M.A. Özbek, E. Özgür, N. Bereli, A. Denizli, Molecular imprinted based microcryogels for thrombin purification, Journal of Chromatography B, 1228 (2023) 123848. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123848>

EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. Merve Asena Özbek, Erdoğan Özgür, Nilay Bereli, Adil Denizli, “Trombin Saflaştırılmasına Yönelik Moleküler Baskılama Temelli Mikrokriyojellerin Sentezi” *Sözlü Sunum*, Kromatografi XXI Kongresi 14-16 Haziran 2023, Didim.