

**BAKTERİ AYRILMASI İÇİN MOLEKÜLER BASKILAMA
TEMELLİ KRİYOJEL MEMBRANLAR**

**MOLECULAR IMPRINTING BASED CRYOGEL
MEMBRANES FOR BACTERIA SEPARATION**

BURCU AKBULUT

PROF. DR HANDAN YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Lisans hayatımda almış olduğum ilk Genel Kimya dersimde ‘‘Çocuklar ve bilim insanları her zaman ‘NEDEN?’ diye sorarlar, sizler de bu bölümü bitirdiğinizde her şeye ‘NEDEN?’ sorusunu yönelten kişiler olacaksınız’’ diyerek biz öğrencilerine farkındalık katan, benim hayatımın dönüm noktalarında yer alan kişilerden biri olan ve yaklaşık bir sene önce vefat eden sevgili hocam Prof. Dr. Abdülkerim KARABAKAN'a...

Ve bilim yolunda ilerlemiş olan, ilerleyen ve ilerleyecek olan herkese ithaf ediyorum.

ÖZET

BAKTERİ AYRILMASI İÇİN MOLEKÜLER BASKILAMA TEMELLİ KRİYOJEL MEMBRANLAR

Burcu AKBULUT

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Nisan 2023, 69 sayfa

Aerobik ve gram-negatif bir basil olup fermente-edici özelliğe sahip olmayan *Pseudomonas*, toprakta, suda ve çeşitli nemli ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. İnsanlarda en sık hastalıkla ilişkilendirilen türü, özellikle başka bir hastalığı olan ya da immün sistemi baskılamış hastaların hemen her organ ya da dokusunda enfeksiyona sebep olabilen fırsatçı patojen özelliğiyle *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa*, diğer su kaynaklı patojenlerden farklı olarak çevrede çeşitli sıcaklık aralıklarına ve zayıf besin varlığına bile adaptasyon gösterebilir. Polisakkarit yapıdaki kapsülü sayesinde yüzeylere tutunarak su sistemlerinde hızla sayısını arttırarak biyofilm oluşturur. Özellikle hastaneler gibi büyük binalarda su sistemlerine yerleşerek hastane içinde bulaşlara sebep olabilmektedir. İnsan faaliyetlerinin yaygın olduğu çevrelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca içme suyu üretimi için yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra bile arıtılan suda *P. aeruginosa* bulunması nedeniyle indikatör bakteriler arasında

sınıflandırılmaktadır. Tüm bu özellikleri nedeniyle su kaynaklarından *P. aeruginosa*'nın ayrıştırılması halk sağlığının korunması açısından oldukça önemlidir.

Yapay moleküler tanıma özelliklerine sahip materyallerin tasarlanması ve geliştirilmesi tıp, çevresel izleme, gıda güvenliği ve ulusal güvenlik gibi çok farklı alanlarda uygulama alanına sahip, aktif bir alandır. Kriyojeller, 1-100 µm arasında makro-gözenekliliği kontrol edilerek çapraz-bağlı hidrofilik polimer ağdan oluşan materyallerdir. Kriyojel elde etmek için polimerizasyon sonucunda, büyük gözenekler ve birbirine bağlı kriyojel kanalları oluşur. Yüksek akış hızı ve hızlı kütle transferi, karmaşık biyolojik örneklerden bile hücrelerin karmaşık ön uygulama süreçleri olmaksızın doğrudan ayrılmasını mümkün kılar. Kriyojeller, süpermakrogözenekleri nedeniyle bakteri hücrelerinin baskılanması ve dolayısıyla uzaklaştırılması için en uygun yapılardır.

Bu çalışmada farklı derişimlerde *P. aeruginosa* içeren çözeltiler kriyojellerden geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve şişme deneyleri ile kriyojellerin yapı ve yüzey morfolojisi karakterize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri baskılama, moleküler baskılama, adsorpsiyon, PHEMA-temelli kriyojel membran.

ABSTRACT

MOLECULAR IMPRINTING BASED CRYOGEL MEMBRANES FOR BACTERIA SEPARATION

Burcu AKBULUT

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

April 2023, 69 pages

Pseudomonas, an aerobic and gram-negative bacillus without fermenting properties, is widely found in soil, water and various moist environments. The type most commonly associated with disease in humans is *Pseudomonas aeruginosa*, with its opportunistic pathogen feature that can cause infection in almost any organ or tissue, especially in patients with another disease or immunocompromised. Unlike other aquatic pathogens, *P. aeruginosa* can even adapt to various temperature ranges and poor nutrient availability in the environment. Thanks to its polysaccharide capsule, it attaches to surfaces and rapidly increases its number in aquatic systems and forms a biofilm. Especially in large buildings such as hospitals, it can settle in water systems and cause contamination within the hospital. It is commonly found in environments where human activities are common. In addition, *P. aeruginosa* is found in the treated water, even after the purification processes for the production of drinking water, it is classified among the indicator

bacteria. Due to all these features, the separation of *P. aeruginosa* from water sources is very important for the protection of public health.

The design and development of materials with artificial molecular recognition properties is an active field with applications in fields as diverse as medicine, environmental monitoring, food safety and national security. Cryogels are materials consisting of a cross-linked hydrophilic polymer network with controlled macroporosity between 1-100 μm . As a result of polymerization to obtain cryogel, large pores and interconnected cryogel channels are formed. The high flow rate and fast mass transfer enable direct separation of cells without complex pretreatment processes, even from complex biological samples. Cryogels are the most suitable structures for the suppression and therefore removal of bacterial cells due to their supermacropores.

In this study, solutions containing *P. aeruginosa* at different concentrations were removed by passing through cryogels. The structure and surface morphology of the cryogels were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and swelling experiments.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria imprinting, molecular imprinting, adsorption, PHEMA-based cryogel membrane.

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı içerisinde akademik hayatıma yön vermemi sağlayan hocalarımla hocası olan ve Moleküler Baskılama konusunda bugün bu yüksek lisans tez kapsamında yol kat etmiş olmamın ilk yapı taşlarını yıllar önce oluşturan sevgili hocam **Prof. Dr. Adil DENİZLİ**'ye...

Bir akademik yıl Erasmus+ öğrenim dönemimde, telefon ile iletişim kurarak tanıştığım, Polonya'dan döndükten sonra beni Lisans bitirme tezi öğrencisi olarak kabul eden, Canım Hocam olarak hitap ettiğim ve bugün ise yüksek lisans tez danışmanım olarak sağladığı destekler için **Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ**'e...

Lisans dönemimde almış olduğum Biyokimya dersim ile ilk olarak tanıdığım, beni benden daha iyi analiz edebilen, güncel hayat içerisinde de yeri geldiğinde bir abla gibi davranıp ışık olup yol gösteren ve bir diğer Canım Hocam olarak hitap ettiğim **Prof. Dr. Nilay BERELİ**'ye...

Yüksek lisans tez dönemimin başlangıcında, benimle kendi tez öğrencisiymişim gibi ilgilenip yol gösteren ve kontrol sağlayan sevgili hocam **Prof. Dr. Deniz TÜRKMEN**'e...

Yüksek lisans tez dönemim boyunca yanımda deneylerimde yol gösteren ve şu an Bursa Uludağ Üniversitesi'nde bulunan sevgili hocam **Dr. Öğr. Üyesi Monireh YÜCEL**'e ve Hacettepe Üniversitesi Biyoloji bölümünde bu tezde yer alan bakterilerimi ve bakterilerim ile ilgili bilgilerimi benimle paylaşan sevgili hocam **Ar. Gör. Dr. Sinem DİKEN GÜR**'e...

Yüksek lisans tez dönemimde tanışıp, ablam olarak bilip fikir alabildiğim ve şu an Doktora sürecinde olan **Ar. Gör. Merve ÇALIŞIR**'a ve lisans bitirme tezimde yanımda olduğu gibi bugün de yüksek lisans tezimde yanımda olan **Öğr. Gör. Dr. Semra AKGÖNÜLLÜ**'ye...

2013 yılından bugüne, Hacettepe Üniversitesi Kimya bölümündeki lisans ve yüksek lisans öğrenimlerimizde birbirimize yaptığımız yol arkadaşlığı için, hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen ve şu an Doktora öğrencisi olan **Muhammed ERKEK**'e...

Ülkemizde Moleküler Baskılama konusu üzerine çok sayıda çalışmalar yapmış olan ve Sensörler üzerine çalışmalarla da devam eden hocalarımla yer aldığı **BioregLab grubuna**...

Yüksek lisans dönemimde pandemiye denk gelmem ile, bir yıl boyunca benimle evde çevrimiçi derslerimizin çakışması durumunda oda kapmaca oynadığımız **kız kardeşim Duygu**'ya, **annem Meliha**'ya ve **babam Turhan**'a...

Tez dönemimde ilk kez iş hayatına adım atmış olmamın verdiği sorumluluklar arasında, deneylerim için laboratuvarında bulunduğum sürede çalışma saatlerim konusunda esneklik sağlayan ve ekip lideri olarak severek çalıştığım **Chemleg Danışmanlık Şirketi**'me ve **birlikte çalıştığım iş arkadaşlarıma**...

Benim bugünkü ben olmamı sağlayan herkese çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1. Biyofilm Oluşumu.....	6
2.2. Moleküler Baskılama Yaklaşımı	7
2.2.1. Moleküler Baskılama Yapılmış Polimerler	10
2.2.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması	11
2.2.2.1. Kalıplar ile Monomerler Arasında Yer Alan Etkileşimler	11
2.2.2.2. Kovalent Etkileşimler.....	12
2.2.2.3. Kovalent-Olmayan Etkileşimler.....	12
2.2.2.4. Yarı-Kovalent Etkileşimler	12
2.2.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Bileşenleri	13
2.2.3.1. Kalıp Molekül	13
2.2.3.2. Fonksiyonel Monomer	14
2.2.3.3. Çapraz Bağlayıcı	14
2.2.3.4. Porojenik Çözücü	15
2.2.3.5. Başlatıcı.....	15
2.3. Kriyojeller	18
2.3.1. Kriyojelin Elde Edilmesi	19
2.4. Kromatografik Yöntemler	22
2.4.1. Membran Bazlı Ayırma Teknikleri ve Membran Özellikleri.....	24
2.4.1.1. Membran Ayırma Sürecini Etkileyen Parametreler	26
2.4.2. Filtrasyon ve Ultrafiltrasyon	27

2.4.3. Biyootografi	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Mikroorganizmalar	30
3.2. Kimyasal Malzemeler	31
3.3. Deneysel Yöntemler	31
3.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Kültürlenmesi	31
3.3.2. Fonksiyonel Monomer Sentezi ve Karakterizasyonu	31
3.3.3. Ön Kompleks Hazırlanması.....	32
3.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Baskılanmış Kriyojellerin Hazırlanması	32
3.4. Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	33
3.4.1. Yapı Analizi için FTIR	33
3.4.2. Yüzey Morfolojisi.....	33
3.4.3. Şişme Davranışları.....	33
3.5. MIP Kriyojellerin Adsorpsiyon Çalışmaları.....	34
3.5.1. Farklı Derişimlerde Adsorpsiyon Çalışmaları	34
3.6. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları.....	34
3.7. Seçicilik Çalışmaları	34
3.8. Mevcut Adsorpsiyon İzoterm Modelleri.....	35
3.8.1. Langmuir İzoterm Modeli.....	35
3.8.2. Freundlich İzoterm Modeli	35
3.8.3. Langmuir ile Freundlich İzoterm Modeli	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	37
4.1.1. FTIR ile Yapı Analizi	37
4.1.2. Yüzey Morfolojisi.....	38
4.1.3. Şişme Davranışları.....	41
4.2. MIP Kriyojellerin Adsorpsiyon Çalışmaları.....	41
4.2.1. Farklı Derişimlerde Adsorpsiyon Çalışmaları	41
4.2.2. Adsorpsiyon Kinetik Modellerinin İncelenmesi.....	43
4.3. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları.....	45
4.4. Seçicilik Çalışmaları	46
4.5. Literatür Özeti.....	49

5. YORUM.....	53
6. KAYNAKLAR.....	56
EKLER.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın klinik incelemeleri sonucunda mikrobiyal biyofilm etkileşimleri.	4
Şekil 2.2. <i>P. aeruginosa</i> bakterisi için biyofilmlerinin temel özellikleri ve enfeksiyon sonuçları.....	6
Şekil 2.3. Moleküler baskılamada uygulama adımlarının şematize edilmesi.....	8
Şekil 2.4. Moleküler baskılama temelli farklı tekniklerin şematik diyagramı.....	10
Şekil 2.5. MIP’de yaygın olarak kullanılan monomerler. (A) Kovalent monomerler (B) Kovalent olmayan monomerler.	11
Şekil 2.6. Kriyojelin elde edilme sürecinin şematik gösterimi.	20
Şekil 2.7. Kriyojelin çeşitli parametrelerine genel bakış.	22
Şekil 2.8. Kromatografik yöntemlerin analitik süreçleri.	24
Şekil 2.9. Mikrobiyolojik yöntemlerin biyolojik olarak belirlenmesi için sınıflandırılma şeması.....	28
Şekil 4.1. a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -baskılanmış kriyojel (MIP), b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -baskılanmamış kriyojel (NIP).....	38
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -baskılanmamış kriyojel (NIP) SEM görüntüleri. .	39
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -baskılanmış kriyojel (MIP) SEM görüntüleri.	40
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> için UV – 600 nm ölçümündeki kalibrasyon grafiği.....	42
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> baskılanmış (MIP) kriyojelde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ’nın CFU/mL birim derişime karşı adsorplanan bakteri miktarı.	42
Şekil 4.6. Langmuir İzoterm grafiği.	44
Şekil 4.7. Freundlich İzoterm grafiği.....	45
Şekil 4.8. Bakteri baskılanmış kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.	46
Şekil 4.9. MIP seçicilik grafiği (Oda sıcaklığında, 2 saat, pH 7.4 PBS içerisinde).....	47
Şekil 4.10. NIP seçicilik grafiği (Oda sıcaklığında, 2 saat, pH 7.4 PBS içerisinde).	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerlerin, bazı çapraz bağlayıcıların ve bazı başlatıcıların yapıları.	16
Çizelge 2.2. Çeşitli tayin yöntemleri ve uygulama amacına göre kullanılan membran özellikleri.....	25
Çizelge 2.3. Çeşitli bakterilerin/mantarların, TLC kromatografi tekniği kullanarak sadece antibakteriyel, sadece antifungal ve antibakteriyel ve antifungal analiz örneklerinin TLC kromatografi tekniğinin incelenmesi.	29
Çizelge 4.1. MIP ile farklı sıcaklıklar için % Makrogözeneklilik ve % Şişme sonuçları.	41
Çizelge 4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -baskılanmış kriyojel kolon için Langmuir ve Freundlich izotermi.	43
Çizelge 4.3. MIP ve NIP kriyojel kolonun <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Salmonella paratyphi</i> bakterileri için seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları.	48
Çizelge 4.4. Moleküler baskılama yöntemlerinin karşılaştırılması.	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Q	Adsorpsiyon kapasitesi
R	Ayırıcılık
W	Ağırlık
C	Derişim
V	Hacim
t	Zaman
T	Sıcaklık

Kısaltmalar

IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliđi
KF	Kistik Fibröz
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP	Moleküler Baskılanmamış Polimer
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
GC	Gaz Kromatografisi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UF	Ultrafiltrasyon
FT-IR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopi
SEM	Yüzey taramalı Elektron Mikroskobu
UV	Ultraviyole
PBS	Fosfat Tamponlanmış Tuz çözeltisi

APS	Amonyum Persülfat
MAH	N-metakriloil (L) histidinmetilester
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen diamin
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
MBAAm	N,N'-metilen-bis(akrilamit)
CFU	Koloni-Oluşturan Birimler (KOB)
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo nükleik asit

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenip listelenmiş bazı bakteriler için, bilim insanlarından acil olarak yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesi talep edilmiştir. Bu bakteriler, yüksek önem düzeyine göre üç kategoriye ayrılmıştır. Üçüncü önem (orta) düzeyde *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella spp.* yer alırken, ikinci önem (yüksek) düzeyde *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonellae*, ve *Neisseria gonorrhoeae* bulunmaktadır. *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* ise en yüksek (kritik) düzey kategorisi içerisinde. Listede yer alan bakteriler, mevcut en iyi antibiyotiklerden olan karbapenemler ve 3. kuşak sefalosporinler dahil çok sayıda antibiyotiğe direnç kazanmışlardır ve çoğu gram-negatiftir [1].

Bu tez için, kan dolaşımı enfeksiyonlarına ve zatürre gibi ciddi ve ölümcül enfeksiyonlara da neden olabilen *Pseudomonas aeruginosa* gram-negatif bakterisi seçilmiştir. Hastalık yapıcı etmen ile konakçı hücrenin karşılaşması sonucu antibiyotiğe ihtiyaç duyulmaktadır. Tezde amaçlanan konu ise, ilk olarak hiç maruz kalmadan *Pseudomonas aeruginosa*'yı ortamdan uzaklaştırmak veya *Pseudomonas aeruginosa*'ya maruz kalmanın olabildiğince azaltılmasını sağlamaktır.

1972 yılında Günter Wuff ve arkadaşları tarafından ilk kez tanımlanan Moleküler Baskılama Teknolojisi, günümüzde de bir araştırma yöntemi olarak kullanılmaya devam etmektedir. Moleküler tanıma olayı, iki veya daha fazla molekülün kovalent-olmayan etkileşimler ile bir araya gelerek aralarında spesifik etkileşimlere sahip olmasıdır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) için, fonksiyonel monomerlerin varlığında kalıp moleküle çapraz bağlanarak sentetik yapı elde edilir. Başlangıçta, fonksiyonel monomerlerin ve baskı molekülünün ön-polimerizasyon kompleksi, yani kalıp, kovalent olmayan etkileşimler (kendiliğinden-birleşme) veya kovalent bağlanma yoluyla oluşturulur. Fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların ko-polimerizasyonu, fonksiyonel monomerlerin kalıp moleküle göre uzamsal düzenlemesini sabitlemek için gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrası kalıp uzaklaştırılır ve hedef moleküle

kimyasal ve mekansal olarak spesifik boşluklar oluşturulur. Böylelikle, hedef moleküller boşluklara spesifik ve seçici olarak bağlanabilir [2].

Bu tez kapsamında Moleküler Baskılama yönteminden yararlanarak, *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış PHEMA kriyojel membran hazırlanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış polimer (MIP) ve *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmamış polimer (NIP) için FTIR ile yapı analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yüzey morfolojisi ve şişme deneyleri karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tezin son bölümünde ise *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış PHEMA kriyojelleri ile adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilip, kinetik ve seçicilik çalışmaları tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

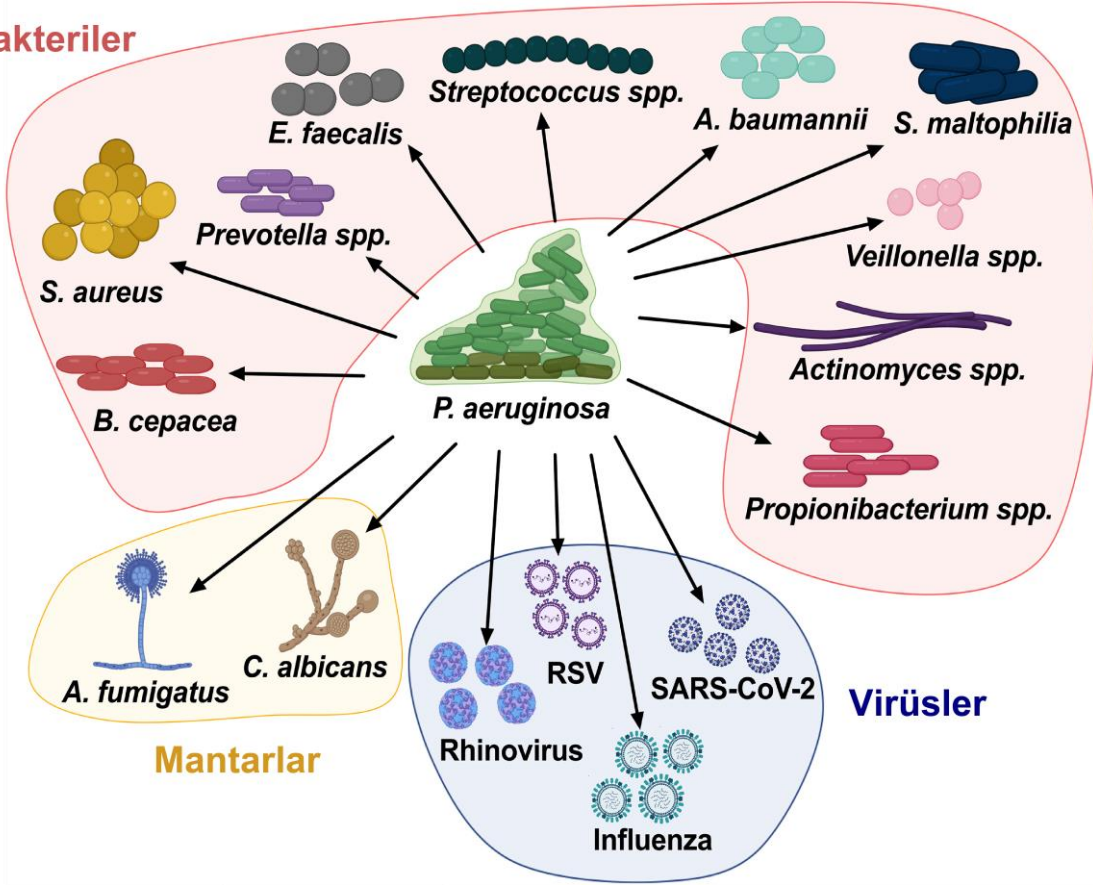
2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Aerobik ve çubuksu yapıya sahip *Pseudomonas aeruginosa*, gram-negatif olarak tanımlanan bir bakteri ırkıdır. Toprak, bitki ve memeli dokusu dahil olmak üzere ortamdaki izole edilebilmektedir [3]. Bu gram negatif bakteri, kamçı ve biyofilmler gibi bağlayıcı faktörlere sahiptirler, bu özelliklerini kullanarak suda ve farklı ortamlarda yaşamsal faaliyet gösterebilirler. Bu sebeple *P. aeruginosa*, doğal ve yapay ortam türleri olan göller, hastaneler gibi ortamlarda bol miktarda bulunan bir bakteri türüdür [4].

Pseudomonas aeruginosa insanlarda çeşitli hastalık ve enfeksiyonlara karşı vücut direncini değiştiren ve neden olan fırsatçı patojen türlerinden biridir (Şekil 1). Bu bakteri türü enfeksiyonlara karşı ve antibiyotik direnci gibi faktör için önemli bir yere sahip olmuştur [5,6]. *Pseudomonas aeruginosa*, yoğun bakım ünitesi enfeksiyonları, kan enfeksiyonları, cerrahi işlem enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, yanık yarası enfeksiyonları, keratit ve orta kulak iltihabı dahil olmak üzere sağlık bakımı enfeksiyonları ile ilgili fırsatçı bakterilerden biri olarak belirtilebilir [7–10]. *Pseudomonas aeruginosa* aynı zamanda antibiyotiklere karşı hızlı direnç gösterebilen ve ortam koşullarına karşı olan değişikliklere uyum sağlayabilen çeşitli virülans faktörleri üretebilme yeteneğine sahip bir organizma türüdür [11].

P. aeruginosa, farklı filumlar ile etkileşime girebilir ancak daha çok çeşitli mikroplarla aynı anda etkileşime girebilir ve aynı anda birlikte var olabilir. Şekil 2.1’de, *P. aeruginosa* için bakteriler (*Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Prevotella spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Veillonella spp.*, *Actinomyces spp.*, ve *Propionibacterium spp.*), mantarlar (*Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans*) ve virüsler (solunum sinsityal virüsü (RSV), insan rinovirüsü, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü 2 (SARS-CoV-2) ve grip) ile açıklanan ana etkileşimleri göstermektedir [12].

Bakteriler



Şekil 2.1. *P. aeruginosa*'nın klinik incelemeleri sonucunda mikrobiyal biyofilm etkileşimleri [12].

P. aeruginosa, bir enfeksiyon oluşturmak için konakçı savunmasındaki zayıflıklardan yararlanır. *P. aeruginosa*, antibiyotiklere direnç gösteren ve insanlara yönelik fırsatçı bir patojendir. Bakteri, bozulmamış dokuları neredeyse hiç enfekte etmez, ancak bağışıklık yetmezliği ile kuşatılmış herhangi bir dokuyu istila edebilir. *P. aeruginosa*, özellikle şiddetli yanık, tüberküloz, kanser ve AIDS hastalarında idrar yolu, solunum sistemi, dermis, yumuşak doku, bakteriyemi, kemik ve eklem, sindirim sistemi ve kanda enfeksiyona neden olur. Daha da önemlisi, *P. aeruginosa* kanser, kistik fibröz (KF) ve yanıklarla hastaneye yatırılan hastalarda %50 ölümlü önemli bir soruna neden olur [13]. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) uyarınca, ABD hastanelerindeki *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının genel insidansı ortalama %0,4'tür (1000 taburcu edilen hastada 4) ve bakteri dördüncü en yaygın izole hastane kaynaklı patojendir ve tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %10'unu oluşturur. *P. aeruginosa*, 0.5–0.8 μm x 1.5–3.0 μm çubuk şekli gösterir. Bakteri ırkları, tek bir polar kamçı ile hareketlidir. Metabolizma,

oksijen-temelli solunumdur, ancak bu her yerde bulunan bakteri, O₂ yokluğunda, NO₃ varlığında büyüyecektir [14,15].

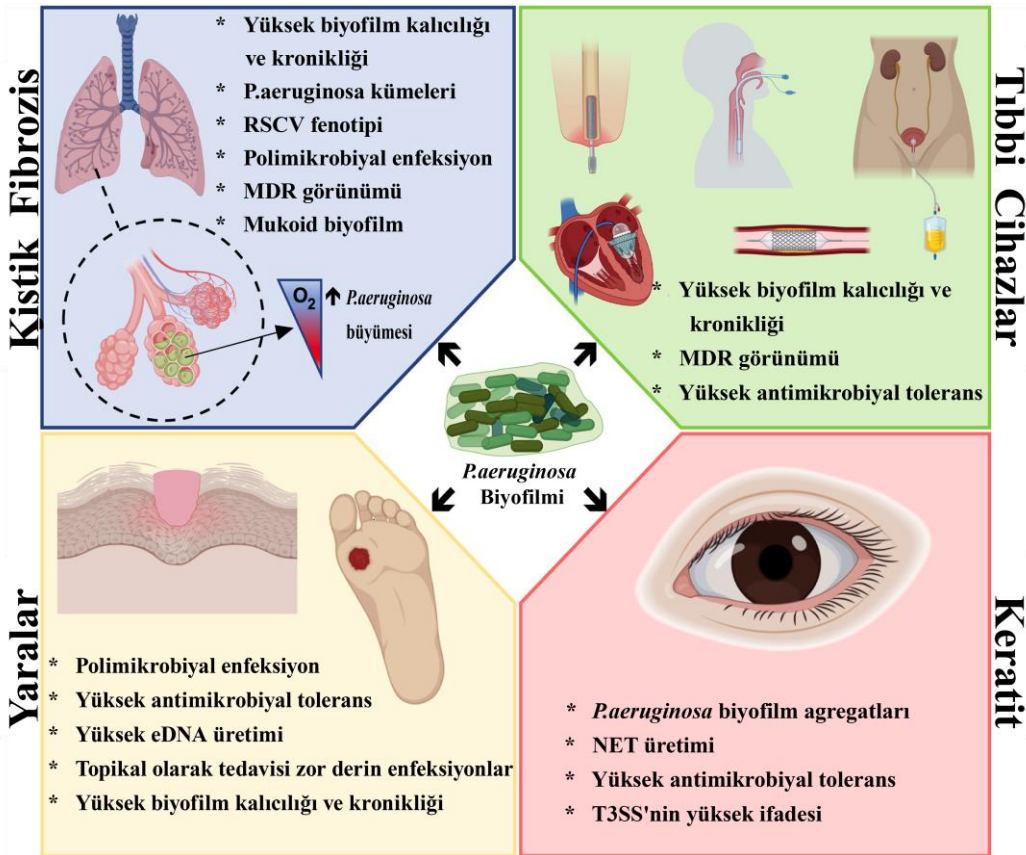
Doğadaki tipik *Pseudomonas*, bir yüzeye veya substrata bağlı olarak biyofilm biçimlerinde veya kamçısını kullanarak aktif olarak yüzen tek hücreli bir organizma olarak planktonik bir formda bulunabilir. Gerçekten de *Pseudomonas*, vahşi yaşamdan veya hastalardan alınan örneklerde görüldüğü gibi kuvvetli, hızlı-yüzen bir bakteridir [16].

P. aeruginosa, doğal ortamlarda tipik bir psödomonad olmayabilir. *P. aeruginosa*'nın basit bir besin kaynağına ihtiyacı vardır ve damıtılmış suda bile aynı zamanda büyüebilir. *P. aeruginosa* ayrıca asetat (karbon kaynağı) ve amonyum sülfat (azot kaynağı) içeren bir ortamda da iyi büyüebilir. Büyümeleri için optimum ortam sıcaklığı 37°C'dir. Fakat *P. aeruginosa* 42°C'ye kadar çıkabilen sıcaklıklarda da büyüme gösterebilmektedir [17]. *P. aeruginosa*, yüksek derişimlerde tuzlara ve boyalara ve birçok antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir [14].

P. aeruginosa izolatları üç tür koloni gösterir. Toprak ve sudan elde edilen doğal izolatlar genellikle küçük ve pürüzlü bir koloni sahip iken, klinik izolatlar ise düzgün koloni türleridir ve bu izolatlar bazen büyük, pürüzsüz, düz kenarlı bir görünüme sahip olabilmektedir. Solunum ve idrar yolu salgıları, mukoid tür olarak da gösterebilir. *P. aeruginosa*'nın iki farklı çözünebilir pigmente sahiptir, floresan pigment piyoverdin ve mavi piyosiyenin. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu iltihap oluşturan enfeksiyonlar tipik bir mavi renkte iltihaba neden olur ve bu iltihaba piyosiyenin olarak adlandırılmaktadır. Piyoselin (piyosiyenin bir türevi) bir siderofor (demir taşıyıcı) olur. Aynı zamanda bu patojenin büyümesini sürdürmek için konakçıdan ortamdan ve düşük-demirli ortamlarda demir alabilir. Piyosiyenin, insan burun kirpikleri ve solunum epitelinin normal işlevini bozarak pro-inflamatuvar cevaplarını ateşleyebilir [18]. Floresan pigmentler için hiçbir virülans kanıtı açıklanmamıştır.

2.1.1. Biyofilm Oluşumu

Antibiyotiklere ve bağışıklık sistemlerine karşı duyarlılık gösteren biyofilmler; *P. aeruginosa* için, KF akciğerinde oluşan biyofilmler antibiyotik direnci göstermektedir ve aynı zamanda başlıcan ölüm nedenlerinden biri sayılmaktadır. Aşırı aljinat üreten *P. aeruginosa* ırkları tarafından oluşturulan biyofilmler, antimikrobiallere ve konakçı bağışıklık sistemlerine karşı direncin teşvik edilmesi yoluyla KF hastalarında *P. aeruginosa*'nın kalıcılığına neden olduğu düşünülen yüksek düzeyde yapılandırılmış bir mimari gösterir [19]. *P. aeruginosa* biyofilmlerinin neden olduğu başlıca enfeksiyonları göstermektedir: kistik fibroz, yaralar, tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm büyümesine bağlı enfeksiyonlar ve özellikleri (Şekil 2.2). Şema, biyofilmlerde *P. aeruginosa* büyümesine yol açan başlıca nedenleri göstermektedir. Aşırı mukusla dolu olan bir akciğerin alveolleri, kistik fibröz (KF) enfeksiyonları ve tıbbi cihazlar sonucunda oluşan enfeksiyonlar, yara enfeksiyonu için cilt yaraları örnek olarak gösterilir ve son olarak ise keratit enfeksiyonlarına göz de oluşan enfeksiyonlar da dahil edilebilir [12].

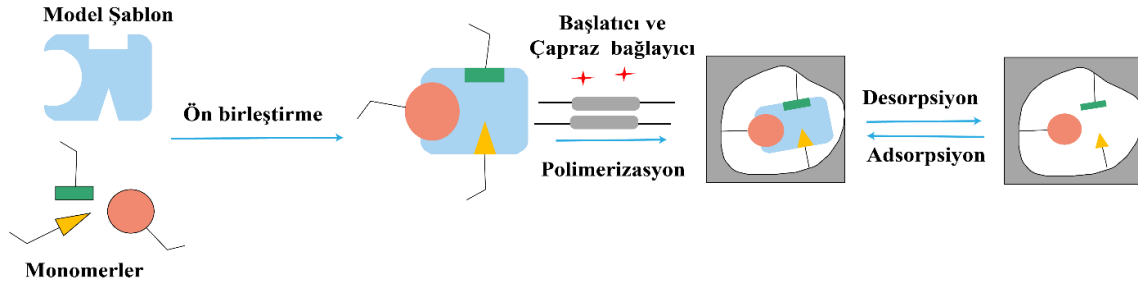


Şekil 2.2. *P. aeruginosa* bakterisi için biyofilmlerinin temel özellikleri ve enfeksiyon sonuçları [12].

Bazı *P. aeruginosa* ırkları aljinat üretemezler fakat biyofilm oluşturabilir. Bu türlerin oluşturduğu biyofilmler, *psl* ve *pel* lokusları tarafından kodlanan bir polisakarit matrisinden oluşur. *Psl* lokusu, hücre-yüzey ve hücre-hücre etkileşimlerinin yanı sıra biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynayan mannoz açısından zengin polisakaritleri kodlar [20]. *P. aeruginosa* ayrıca zar adı verilen sıvı-hava yüzeyinde biyofilm oluşturabilir. Zar, glikoz açısından zengin bir polisakarittir ve *pel* lokusu, mukoid olmayan *P. aeruginosa* biyofilm matrisinin glikoz açısından zengin bileşeninin sentezi için genler içerir. DNA ayrıca *P. aeruginosa* biyofilminin ana matris bileşenidir. Araştırmacılar, DNaz uygulamasının *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu engelleyebileceğini ve hatta tamamlanmış biyofilmlerin dağılmasını başlatabileceğini bulmuştur. İlerleyen çalışmalar ile birlikte, biyofilmlerdeki DNA'nın *P. aeruginosa* genomik DNA'sına karşı benzerlik gös, bu da bu DNA'nın bütün-hücre lizisinin sonucu olabileceğini düşündürmektedir [19].

2.2. Moleküler Baskılama Yaklaşımı

Moleküler tanıma yönteminin doğada sonsuz sayıda uygulaması vardır; enzimatik kataliz, antikor-antijen tanıma, hücre iletişimi ve diğer biyolojik işlemlerde kullanılır [21]. Moleküler baskılı polimerlerin (MIP'ler), yüksek kararlılığa, hazırlanma kolaylığına ve düşük maliyete sahipken biyomoleküler tanıma mekanizmasını taklit ettikleri için seçici moleküler tanıma bölgeleri taşıyan en umut verici sentetik malzemeler olduğu gösterilmiştir [22]. 1970'lerde Wulff ve ark. sentetik bir polimer matriste 'substrat' molekülünü işlevsel ve yapısal olarak tamamlayıcı olan bağlanma bölgelerinin oluşturulmasını içeren Moleküler Baskılama Teknolojisini (MIT) uygulamak için kovalent bir yaklaşım kullandı. Analitler (veya kalıplar) önce monomerlerle birleştirildi ve bunlar daha sonra polimerleştirildi [23]. Polimerler, kalıpları sterik ve kimyasal olarak tamamlayıcı olan boşluklar oluşturmak için oyulmuştur. Kalıplar çıkarıldığında, kesin bağlama boşlukları, kalıplar ve analogları arasındaki farkı anlatacaktır [24,25].



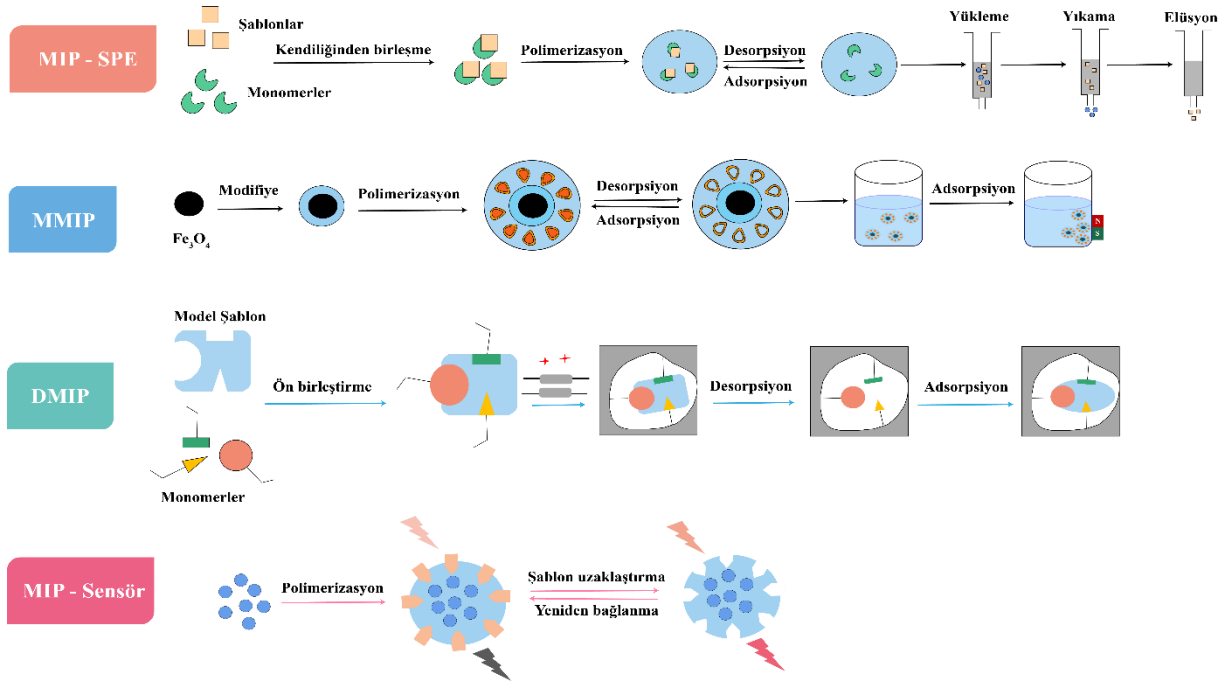
Şekil 2.3. Moleküler baskılamada uygulama adımlarının şematize edilmesi.

Moleküler baskılama yaklaşımında, fonksiyonel ve çapraz bağlanan monomerler, bir kalıp molekül (analit) varlığında kopolimerize edilir ve üç boyutlu bir polimer ağı oluşturulur. Moleküler baskılama yaklaşımında öncelikle fonksiyonel monomer baskılanır daha sonra polimerize edilecek molekül ile kompleks oluşturulur. Fonksiyonel monomerlerin, çapraz bağlı yapılar tarafından belirli bir pozisyonda tutulurlar. Daha sonraki aşamada kalıp molekül ortadan kaldırılır ardından kalıp boyut ve şekil bakımından tamamlayıcı bölgelerin tanımlanmasını ve belirlenmesini açıklar. Böylece, polimer matrisinde artık kalıbı yüksek özgüllükle yeniden bağlayabilen bir moleküler bellek kalır. Moleküler baskılama yöntemine yaklaşım prosedürünün şematik gösterimi Şekil 2.3'te gösterilmektedir.

Moleküler baskılanmış polimer (MIP), polimerizasyon işleminin ardından bir ekstraksiyon işlemi uygulanmaktadır. Bu işlem ile polimer kalıbın çıkarılmasıyla boşluklar ve gözenekler oluşur, bu yapılar polimerin seçici bağlanma bölgeleri olarak nitelendirilmektedir. Polimerin seçici bağlanma bölgeleri, yapıda hedef moleküllerin tanımlanması kolaylaştırır. Bu bölgeler yapının işlevini, boyutunu, şeklini ve özelliklerini tanımlamaktadır [26,27]. MIP'ler genellikle yüksek afinite ve seçiciliğe sahiptirler, fiziksel ve kimyasal kararlılıkları yüksektir. Hazırlama maliyeti, dayanıklılıkları ve düşük maliyetleri gibi birçok avantaja sahiptirler [28]. Bunların neticesinde moleküler baskılama yöntemi son zamanlarda bilim insanları tarafından büyük ilgi görmekte olup, kimyasal ve ilaçlar gibi çeşitli hedef moleküller için oldukça sık kullanılmaya devam edilmektedir.

Moleküler baskılanmış polimer (MIP) bileşenlerinin oluşumu için; bir kalıp molekül, bir çapraz bağlayıcı, bir çözücü, fonksiyonel monomer ve polimerizasyon işleminin başlaması için gerekli olan başlatıcı içerir. Bu bileşenler MIP'ın oluşum süreci, polimerik yapı elde edilebilmesinde önemli bir yere sahiptir [26]. MIP'lerde molekül tespitinin gerçekleşmesi için öncelikle kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim sonucunda uygun bir kavite oluşumu sağlanarak oluşmaktadır. Uygun fonksiyonel gruplarıyla, kalıp [27] ve fonksiyonel monomer arasında kararlı bir kompleks oluşumu sağlanır. Çapraz bağlayıcılar bu süreçte kalıp molekül etrafındaki fonksiyonel gruplara ait monomerin bağlarını sabitler. Çünkü kalıp molekül çıkarılması sonunda MIP'nin sert yapısı korunmuş olarak kalır. Başka bir deyişle, çapraz bağlayıcı, polimerin şeklini sabitlemek ve stabilitesini korumak için bir yapıştırıcı/yapıştırıcı işlevi görür [28]. Polimerizasyon işleminde gözenek oluşturucu olarak kullanılan çözücüler porojenler olarak adlandırılır. Bir dispersiyon ajanı olarak da kullanılabilir [26].

Son zamanlarda, moleküler baskılanmış polimerler (MIP), antibiyotikler, sentetik hormonlar ve organik boyalar gibi kirleticilerin seçici ekstraksiyon analizlerinde tercih edilmiştir. MIP ile kullanılan farklı tekniklerin şematik bir diyagramı sağlanmıştır (Şekil 2.4). Dört ana moleküler baskılama tekniği türü vardır: DMIP: Model moleküler baskılama polimer-bazlı ekstraksiyon; MIP-SPE: Moleküler baskılama polimer-bazlı katı-faz ekstraksiyonu; MMIP: Manyetik moleküler baskılama polimer-bazlı ekstraksiyon; MIP sensörü: Moleküler baskılama polimer-bazlı sensörler [29].



Şekil 2.4. Moleküler baskılama temelli farklı tekniklerin şematik diyagramı [29].

2.2.1. Moleküler Baskılama Yapılmış Polimerler

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), antijen-antikor eşleşmesinin sentetik analogları olarak da iyi bilinir. "Anahtar-kilit" uyumu ile kalıbı çıkarmak istenilen molekülün seçici şekilde bağlanması sonucu üretilir. Çevre koşullarına uyum, düşük maliyet ve dayanıklılık gibi konularda MIP'ler avantaj sağlar. Kullanım için sıcaklık aralığı geniştir. Bu gözden geçirmenin sonraki bir bölümünde ayrıntılı olarak açıklanacak olan birden çok üretim yöntemi vardır, ancak tüm yöntemler aynı temel taslağı takip eder:

- (1) kovalent olarak bağlı kalıp veya hedef molekülü içeren bir polimer üretilir veya kovalent olmayan bir şekilde, konakçının fonksiyonel bir grubuna,
- (2) kalıp molekül, polimer konakçıdan çıkarılır ve yeniden bağlanma için hedefe özgü bir boşluk bırakılır ve
- (3) MIP, hedef içeren numuneye maruz bırakılır ve kavite, karmaşık bir numuneden hedef molekülü seçici olarak alır.

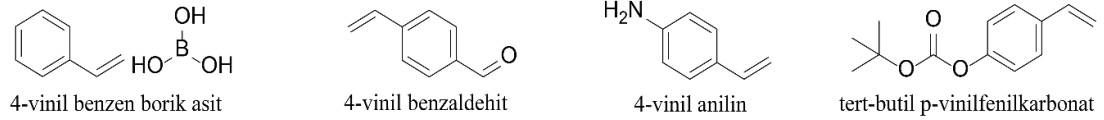
Sentetik reseptörlerin ek bir avantajı, özellikle küçük moleküller söz konusu olduğunda evrenselliğe yakın olmasıdır. MIP'ler, hedeflenen her molekül için elde edilebilir. Antikorlar makromoleküller olduğu için diğer küçük moleküllere göre daha kolay üretilir. Bu MIP'ler doğal antikor maliyetlerine göre daha ucuzdur [30]. Yüzey moleküler baskılanmış polimerler (SMIP'ler), kalıp ile fonksiyonel monomerlerin bir kompleks oluşturduğu polimerizasyon öncesi adım, monomerlerin kalıp ve çapraz bağlama maddesi varlığında polimerleştiği polimerizasyon adımı ve son adım olarak kalıp uzaklaştırmayla üç hazırlık süreci içerir [31].

2.2.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması

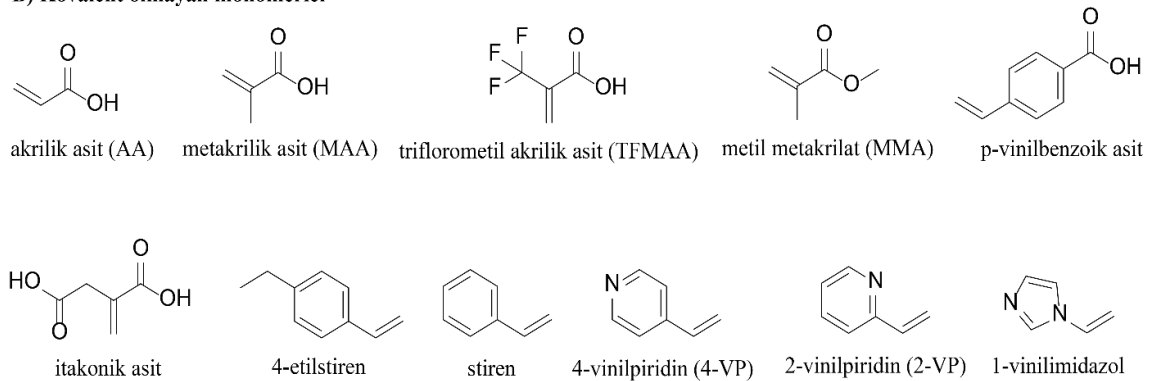
2.2.2.1. Kalıplar ile Monomerler Arasında Yer Alan Etkileşimler

Kalıplar ile fonksiyonel monomerler arasında kovalent etkileşim, kovalent olmayan etkileşim ve yarı-kovalent etkileşim olmak üzere üç farklı etkileşim baskılama işlemi yer almaktadır. Ancak kolay olmasına dayanarak, en çok kullanılan kovalent-olmayan bağdır.

A) Kovalent monomerler



B) Kovalent olmayan monomerler



Şekil 2.5. MIP’de yaygın olarak kullanılan monomerler. (A) Kovalent monomerler (B) Kovalent olmayan monomerler.

2.2.2.2. Kovalent Etkileşimler

Bu etkileşimler, kalıp moleküller ile fonksiyonel monomerlerin arasında bulunan tersinir kovalent bağlarla ilgilidir ve bu bağların polimerizasyon sonrası kalıbın kimyasal bölünmesiyle polimer matrisinden ayrılır [31–33]. Kovalent etkileşimlerin gücünde, tanıma bölgelerinin tek tür dağılımını belirlemek ve özel-olmayan etkileşimleri azaltmak kovalent etkileşimlerin avantajlarından olsa da bu yaklaşımın sınırları, kovalent bağların gücü nedeniyle termodinamik dengeye gelmenin zorluğunu [29] ve sonucunda birkaç hedef molekül [34] tanınmasını içerir [31]. Genel olarak, tüm hedefler, baskılama işlemine katılmak için bir veya daha fazla polimerize edilebilir grup ile türevlendirme yeteneğine sahip değildir, bu da kovalentin uygulama kapsamını büyük ölçüde azaltır [35].

2.2.2.3. Kovalent-Olmayan Etkileşimler

Kovalent olmayan yaklaşımın, kovalent etkileşime kıyasla tercih edilen birçok avantajı bulunur. Çünkü van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler gibi fonksiyonel monomer ile kalıp arasındaki etkileşimlerin oluşumunu esas alır [29]. Ayrıntılı olarak, kovalent olmayan baskılama, prosedürün basitliği ve çeşitli monomerleri (metakrilik asit [36], 4-vinil benzoik asit [37], akrilamid [38], vinil pirolidon [39], 2-hidroksietil metakrilat [40], vb.) kullanma ve geniş bir molekül spektrumunu hedefleme olasılığı ile karakterize edilir [31,41–43]. Kovalent-olmayan baskılama, fonksiyonel monomerlerin ve kalıpların, kalıp-monomer kompleksleri oluşturmak için kovalent-olmayan etkileşimler (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşim, hidrofobik etkileşim, metal şelatlaması, koordinasyon, vb. gibi [29]) yoluyla kendiliğinden bir araya gelerek önceden düzenlendiği anlamına gelir.

2.2.2.4. Yarı-Kovalent Etkileşimler

Yarı-kovalent etkileşim, kovalent ve kovalent-olmayan etkileşimlerin birleştirilmesiyle elde edilir. Kalıp ve fonksiyonel monomerler arasındaki ön polimerizasyon etkileşimlerinin kovalent olduğu, yeniden bağlanma aşamasının ise kovalent olmayan etkileşimlerle karakterize edildiği ara yarı kovalent etkileşimlerdir. Bu etkileşim türü, yeniden bağlanma fazındaki hızlı bağlanma kinetiği ile ön-polimerizasyon kompleksinin oluşumundaki yüksek afinite ile birleşimini mümkün kılmaktadır. Bununla beraber,

kovalent yöntemde hem bazı sınırlandırmalar çözülememektedir hem de ağır kimyasal sentez ve ayırma gelişimini engellemiştir [29,35].

2.2.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Bileşenleri

2.2.3.1. Kalıp Molekül

Kalıp molekül, polimer matrisinden uzaklaştırıldığında şeklini ve fonksiyonel grubunu tamamlayıcı boşluklar bırakan moleküler baskılamada monomere bağlı olan ilgili moleküldür [44]. Kalıp molekül, benzen gibi küçük molekülleri ve peptitler gibi daha büyük molekülleri içerir. Fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün arasında, kimyasal ve fiziksel etkileşimler beklenmektedir. İyi bir ön-polimerizasyon kompleksi için örnek olarak, kalıp molekül hidroksil grubuna sahip aromatik bir yapı ve fonksiyonel grup karbonil verilebilir. Bu durum, fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün arasındaki π - π etkileşimi ve hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. Dikkate değer, yüksek sıcaklıklarda kararsızlık, polimerize olabilen grupların varlığı ve polimerizasyon sürecini inhibe edebilen gruplar gibi nedenlerle moleküler baskılamada tüm küçük veya büyük moleküller bir kalıp molekül olarak işlev göremez [44]. Hem polimerizasyon koşulunda uygun çözünürlük hem de düşük maliyet bir kalıbın kalıp molekül seçiminde önemli olmaktadır. Kalıbın varlığı çok önemli olmasına rağmen, bu MIP'lerin sentezinde ciddi bir zorluk olmayabilir. Çünkü yapı ve özelliğine göre gerçek kalıp moleküle benzer olan bir model kalıbın kullanılması, kalıp molekülün yerine kullanılmasını sağlar [45]. Tamoksifen ve metabolitlerinin uzaklaştırılması için kalıp olarak klorlu bir taksimofen-benzeri yapı olan klomifen örnek olarak verilebilir [46]. Hem benzer özelliğe sahip olan daha küçük moleküllerin kullanımı hem de yüksek molekül ağırlıklı biyomoleküllerin baskılanması açısından bu yaklaşım kullanılmıştır [25]. Kullanılabilirliğin ötesinde, polimerizasyon koşulu altında kalıp molekülün kararsızlığı ve zayıf çözünürlüğü, model bir kalıbın kullanılmasını gerektirebilir [44]. Literatürde iyi bir seçiciliğe sahip ikili ve çoklu kalıp baskılama yer aldığı için, kalıp molekülün kesinlikle tekli bileşik olması gerekmediği önemli bir sonuçtur [47].

2.2.3.2. Fonksiyonel Monomer

Polimerizasyon işlemi sonrası üç-boyutlu çapraz bağa sahip yapının iskeletini moleküler baskılamada oluşturan fonksiyonel monomerdir. Kalıp molekül ile moleküller arası etkileşimi artırabilen işlevsel monomer, yeniden-bağlanma sırasında kendini tekrar edebilmesiyle bir ön-polimerizasyon kompleksini oluşturur. Ortaya çıkan MIP'ler üzerinde aktif bellek bölgeleri elde edilir [45]. Özel olarak kendiliğinden-birleşerek sentezlenen MIP'ler için, en az 1:4'lük bir kalıp-monomer oranına gerek duyulur [44]. Bu, fonksiyonel monomerin kalıp moleküle göre fazla olmasının beklendiğini ve böylece sentezlenen MIP'lerin miktarını arttırdığını gösterir. Diğer tüm polimerlerin sentezinde olduğu gibi, fonksiyonel monomer, ko-polimerizasyona girebilen iki veya daha fazla monomerin bir kombinasyonu olabilir [45]. Kopolimerizasyon ihtimali haricinde, MIP'ler için bir destek olarak da matrisler kullanılabilir. Bunun çok iyi bir örneği Qu ve ark. [48] tarafından, destek olarak silika jele bağlı modifiye edilmiş β -siklodekstrin ile akrilamid bazlı MIP'nin sentezinde gösterilmiştir. Moleküler Baskılanmış Polimer için özgüllük, bir analit (kalıp) ve yapısal analoglardaki fonksiyonel grupların ayrımı ile artırılır [49]. Ayrıca, bazı fonksiyonel monomerler, sahip oldukları çok sayıda işlevsellik ile çapraz-bağ oluşturma kabiliyetlerinin bir sonucu olarak çapraz bağlanan monomerler olarak adlandırılır [50]. Moleküler baskılamının maliyetini azaltmanın yanı sıra, bu monomerlerin seti, çapraz bağlayıcı kullanımı aşamalı olarak kaldırıldığından yeniden bağlanma sürecini iyileştirme şansına sahiptir. Kayda değer, düşük bir monomer-çapraz bağlayıcı oranı, yeniden bağlanma sürecini engeller [47,51].

2.2.3.3. Çapraz Bağlayıcı

Polimerlerdeki çapraz-bağın derecesi, elde edilen MIP'nin mekanik kararlılığı, morfolojisi ve bağlanma bölgesinin kararlılığı için temeldir. Bu nedenle, çapraz bağlama ajanı, fonksiyonel monomere kıyasla çoğu zaman çok fazladır. Bu, kısmen makro gözenekli bir morfoloji elde etmektir. Tüm çapraz bağlayıcılardan EGDMA, bir dizi monomer ile uyumluluğu ve bulunabilirliği nedeniyle rutin MIP'ler sentezi için en yaygın olarak kullanılan çapraz-bağlayıcılardan biri olmuştur. Polimerizasyondan sonra kararlı bir ağ eldesi için, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı arasında iyi bir kimyasal etkileşim bulunmalıdır. Bu, fonksiyonel monomerler olarak akrilamid [48] 4-vinilpiridin, ve metakrilik asit [46] ile çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilik asit (EGDMA)

kullanan bazı yayınlarda açıkça görülmektedir; çapraz-bağlayıcı olarak tris (2,2'-bitiyofen-5-il) metan ve monomer olarak 2,2' (bitienil) metan [52]; çapraz bağlayıcı olarak divinil benzen ve monomer olarak 4-vinil piridin [53], sadece birkaçının ismidir. İlginç bir şekilde, bir çapraz bağlayıcı bazen fonksiyonel monomer olarak da işlev görebilir. Bu konuda çok iyi bir örnek, Fatma ve ark. [54] burada akriyollenmiş-grafen oksit/karbon siyahı kompozit, çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomer olarak işlev görmüştür [47].

2.2.3.4. Porojenik Çözücü

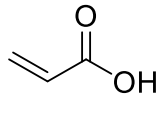
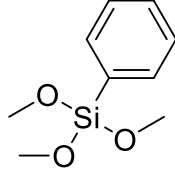
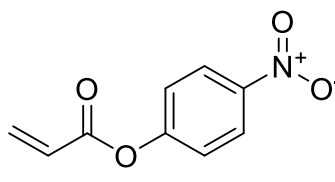
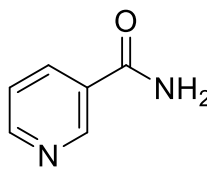
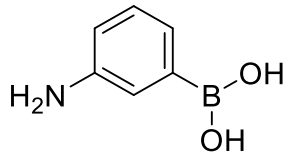
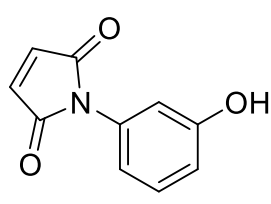
Porojenik çözücü olarak adlandırılan, MIP'nin diğer tüm bileşenlerini tek bir faza getiren çözücü, MIP için hem gözenek oluşumunda hem de morfolojisini kontrol etmede önemli bir rol oynar [55]. İyi porojenik çözücüler, MIP'lere uygun gözenek yapısı ve boyutu ve ayrıca yüzey alanı sağlarken, MIP sentezinde kalıp-monomer ön-polimerizasyon kompleksi oluşumunu destekleyen bir çözücü tercih edilir. Polar-olmayan bir aprotik çözücü toluen ve tetraklorometan gibi, hidrofilik kuvvetler ile kalıp-monomer kompleksi oluşumunu yönlendirmesi beklendiğinde iyi çözücüler kullanılır. Hidrofobik kuvvetlerin önemli olduğu durumlarda da su tercih edilir [44]. Bu mantık yürütme biçimi, klomifen ve metakrilik asidin (MAA) sırasıyla kalıp molekül ve monomer olarak kullanıldığı tamoksifen baskılanmış polimerin sentezinde gerçekleştirilmiştir ve ikisi arasında H-bağının ortaya çıkma olasılığı vardı [46]. Orta polariteye sahip aprotik bir çözücü olan asetonitril, polar çözücü olarak seçilmiştir çünkü asetonitrilin MAA ve klomifen ile hidrojen bağı için rekabet etme olasılığının düşük olması beklenmektedir. Enantiyomerlerin moleküler tanınması, bu çözücülerin seçiminin de önemli etkendir [45,47].


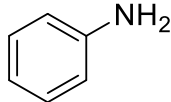
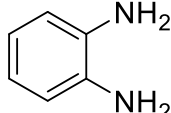
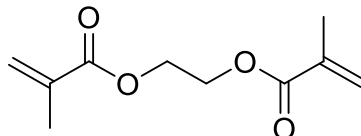
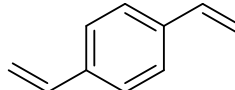
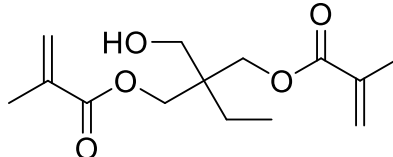
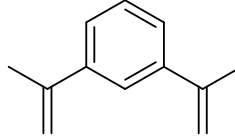
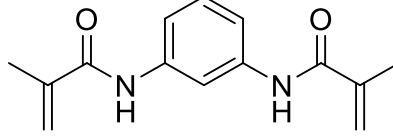
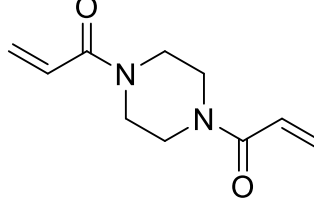
2.2.3.5. Başlatıcı

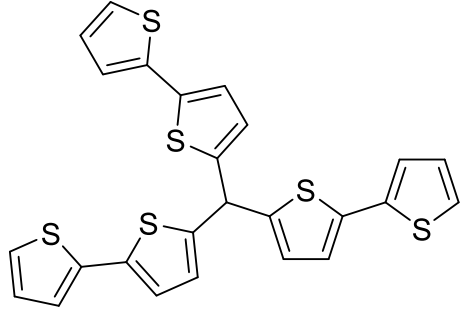
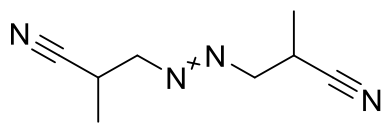
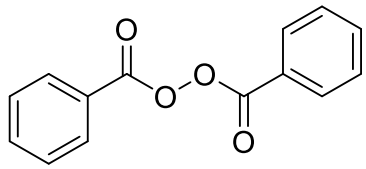
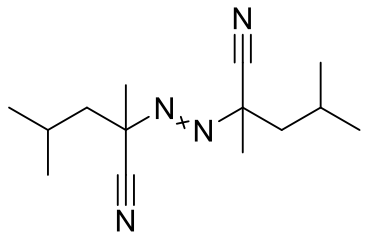
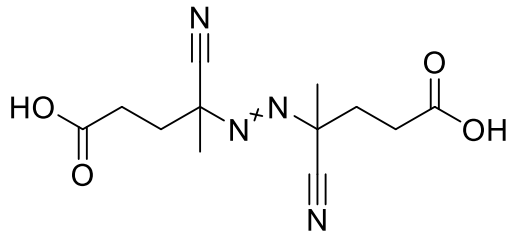
MIP'lerin temel bileşenlerinden biri başlatıcılardır. Özellikle de serbest radikal polimerizasyonunda, termal veya fotokimyasal yol ile serbest radikaller elde edilir. Termal ve fotokimyasal olarak kararlı olmayan taslak molekül, sırasıyla termal ve fotokimyasal olarak aktive edilmiş başlatıcılar kullanılarak polimerize edilmeyecektir. Polimerizasyon için düşük sıcaklık kullanılması gerektiğinde, fotokimyasal olarak aktif

başlatıcılar uygulanır [44]. MIP'lerin temel bileşenleri, Çizelge 2.1'de daha net olarak verilmiştir.

Çizelge 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerlerin, bazı çapraz bağlayıcıların ve bazı başlatıcıların yapıları [47].

MIP bileşenleri	İsim	Yapı
Fonksiyonel monomerler	Metakrilik asit (MAA)	
	Fenil trimetoksi silan (PTMOS)	
	4-nitrofenil akrilat (NPA)	
	Nikotinamid (NA)	
	3-aminofenil boronik asit (3-APB)	
	N-(3-hidroksi fenil) maleimid (NHPM)	

	Pirol	
	Anilin	
	o-fenilen diamin (o-PD)	
Çapraz bağlayıcılar	Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)	
	Divinil benzen (DVB)	
	Trimetilolpropan dimetakrilat (TMPD)	
	1,3-diizopropenil benzen (DIPB)	
	N,N'-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamid) (PBMP)	
	1,4-diakriloil piperazin (DAP)	

	Tris(2,2'-bitiyofen-5-il) metan	
Başlatıcılar	Azo bis izobütironitril (AIBN)	
	Benzoil peroksit (BPO)	
	2,2'-Azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ABDV)	
	4,4'-azobis(4-siyanovalerik asit) (ACVA)	

2.3. Kriyojeller

Üç-boyutlu yapıya sahip olan yapı iskeletleri ve matrisler, biyomedikal alanda sıkça kullanılmaktadır. Hidrojeller de bu alanda yaygın kullanılmasına rağmen, gözenek boyutunun küçük, mekanik özelliklerin zayıf olması ve sınırlı difüzyon sebebiyle uygulamayı zorlaştırır [56]. Alternatif matris olarak kriyojeller, biyomedikal alanda vazgeçilmezdir. Bir çözücü içinde çözülmüş polimerik/monomerik başlatıcıların kontrollü bir kriyotropik jel oluşumunu içeren kriyojelasyon işlemi ile oluşturulurlar ve

böylece "kriyojeller" adını verirler. Kriyojeller, kırk ila elli yıldır tanımlanmış teknoloji olmasına rağmen, son on yılda biyomedikal ve endüstriyel gibi alanlarda kullanılmaktadır. Çünkü yeni bir translasyonel platform, gelişen gözenekli yapı iskeletlerinin sayesinde [57-59]. Çok yönlü kullanılabilen kriyo-yapılandırma ile gözenek yapısı ayarlanabilir. Bu sayede yeni yapılar elde edilip oluşturulabilir. Yüzey alanı ile adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olmasının yanı sıra sünger dokuya da sahip kriyojeller, uygulama alanına göre sentezlenir. Çeşitli özellikleri ile istenilen ihtiyaçları karşılamak için özel olarak hazırlanır.

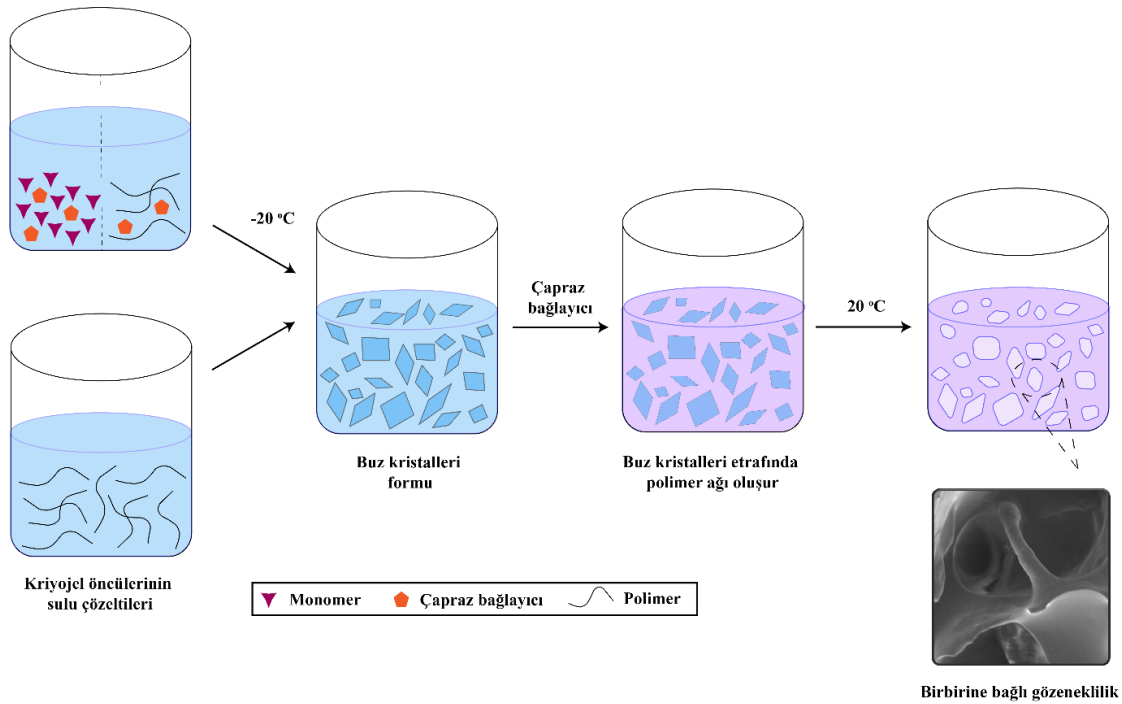
Kriyojeller, farklı gözenek yapısı, değişen gözenek boyutları, değiştirilen şişme kapasitesi, kılcal hareket, yüksek sıkıştırılabilirlik ve ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip elastikiyet ile üretilebilir. Kriyojellerin kendi doğası gereği sahip olduğu özelliklere, farklı özellikler de katılabilir. Bu tür özelliklerin adaptasyonu öncelikle polimer/monomer türüne ve derişimine, çapraz bağlayıcı derişimine, donma sıcaklığına ve donma yolunun kontrolüne bağlıdır. Başlangıçta, kriyojeller üretilmiştir ve karakterize edilmiştir, özellikle biyomedikal uygulamalar için kriyo koşullarının jel yapısı üzerindeki etkisi incelenmiştir [60-64]. Ardından, çeşitli biyoüretimler sağlamak için kriyojellerin gözenekli yapısına hapsederek ve hareketsizleştirilerek uygulanır [65,66].

Ayrıca, kriyojeller biyo-ayırma ve saflaştırma uygulamalarında kromatografi teknikleri için kullanılmıştır [67-69]. Kriyojellerde doğal polimerlerin kullanımı ve karakterize etme yöntemlerinin geliştirilmesine ilişkin farklı araştırmalar ve artan çalışma alanları olmuştur. Son yirmi yılda, kriyojeller, hücre ayırma, kromatografi, çevresel iyileştirme, biyomedikal mühendislik, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp ve daha önceki raporlarda kapsamlı bir şekilde tartışılan diğer birçok uygulama dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için yaygın olarak kullanılmıştır [66,70-72].

2.3.1. Kriyojelin Elde Edilmesi

Pasif bir matris olarak kullanılan kriyojeller, gelecekte daha da değerlendirilecek bir yapı iskelesine dönüşmüştür. Sıfırın-altındaki sıcaklıklarda elde edilen polimerlerin eşsiz özellikleri ile bu kriyoyapının anlaşılması 1980 yıllarının sonuna doğru olmuştur [62,73].

Kriyojellerin birbirine bağı makro-gözenekleri, besinlerin ve oksijenin hücrelere taşınmasını ve metabolik atıkların hücrelerden kolayca uzaklaştırılmasını sağlar [74,75]. Hidrofilik ve ağ yapıdaki süper-makro gözenekli yapıya sahip jeller, kriyojel olarak tanımlanır [76]. Serbest radikal polimerizasyon ürünü olan kriyojeller, suyun donma noktası altında monomer ve başlatıcılar ortama katılarak elde edilir [67,77]. Donmuş aşamada polimerdeki buz kristalleri, birbirine bağı süper makro-gözenekli yapı oluşturur [78,79]. Kriyojelin elde edilme süreci, Şekil 2.6'da özetlenmiştir.



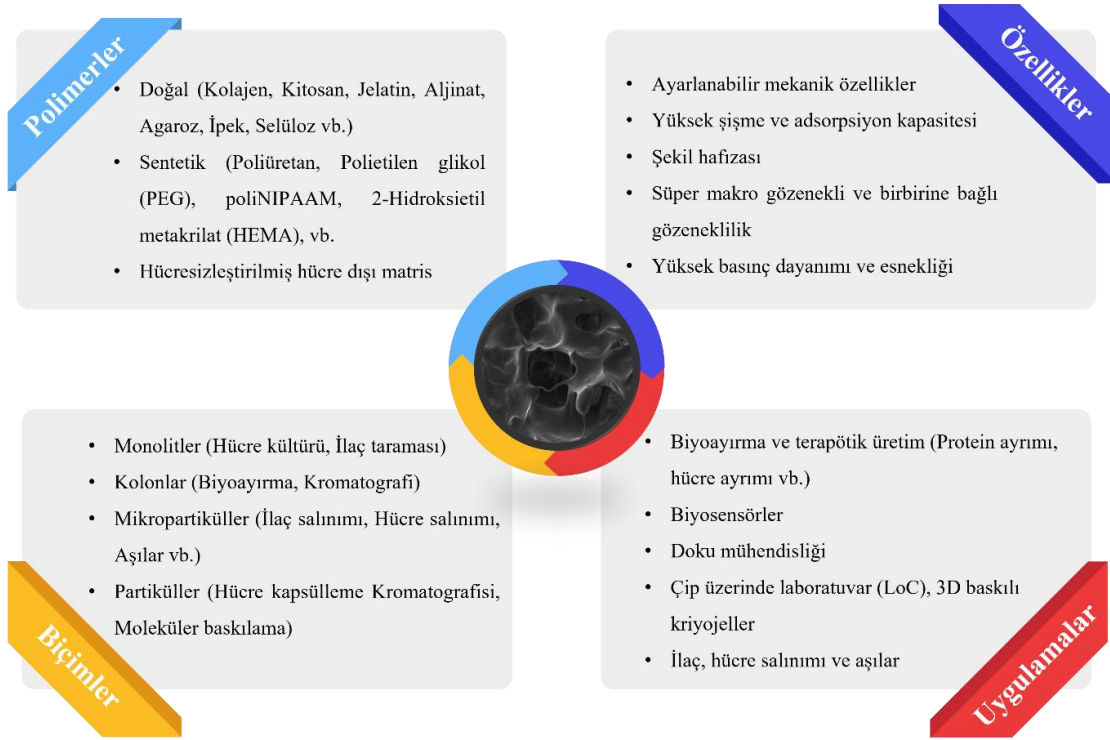
Şekil 2.6. Kriyojelin elde edilme sürecinin şematik gösterimi. İlk olarak uygun monomerler, çapraz bağlayıcılar ve başlatıcılar ile polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Sıfırın altında 17-24 saat boyunca polimerizasyon işlemi gerçekleşmiş ve kriyojellerin çözdürülmesi oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Kriyojelasyon için başlatıcı çözelti, bağı çözücü ve serbest çözücü olarak sınıflandırılan polimer/monomer/çapraz bağlayıcı ve çözücünden (örneğin su) oluşur [80]. Güçlü etkileşim, çözünen ile suyun arasındaki bağdan kaynaklıdır. Serbest halde bulunan su, çözünenin moleküllerinden bağımsız haldedir [57,81]. Bunun sonucunda bağı halde bulunan su, yüksek derişimde başlatıcı çözünen moleküller içerir. İstenilen donma koşullarında, kriyo-derişime başlatıcı moleküller neden olur [82].

Kriyo-derişim, donmamış bir sıvı mikrofazın (ULMP), sıcaklığa-bağlı yüksek derişimde çözünen, yani minimum miktarda çözücü içinde başlatıcıların oluşumunu içeren bir olgudur. Bununla birlikte, bağlı fazdaki başlatıcı moleküllerin tepkimesini hızlandırarak, güçlü bir polimerik aę oluşumuna ve polimerizasyona yol açmıştır [81]. Başlatıcı çözeltilsinin içerisinde, dağılmış halde başlatıcılar ve çözücü bulunur. Bu çözeltilin, çözücü donma noktasına kriyojenik maruz kalması ile buz kristal oluşumu ve başlatıcı polimerizasyonu görülür. Polimerizasyondan daha önce buz kristal oluşumu başlar. Kriyo-derişimin iyi bir şekilde gerçekleştiği teknik olarak anlaşılır.

Ayrıca, bu süreç, başarılı kriyojellerin oluşumuna yol açan uygun kriyoyapıların geliştirilmesi için gereklidir. Eğer buz kristali oluşumundan önce başlatıcı polimerizasyonu gerçekleşirse, kriyo-derişim elde edilemeyecektir. Bunun sonucunda kriyojel yerine hidrojel oluşur. Son adım ise, donmuş fazın çözücü buz kristallerinden ve donmamış fazdan oluşan, çapraz-bağlama ve polimerizasyonun yani jelleşmenin meydana geldiği iki fazın oluşumudur. Sıfırın-altındaki kriyo-koşullar sağlansa da bağlı fazın donmadığı ve polimerizasyon ile sonuçlandığını da ilginçtir. Serbest çözücü molekülü hemen donar. Ardından büyüyüp çevreleyen buz kristalleri ile birleşir. Böylelikle, birbirine bağlı aę yapıda buz kristalleri elde edilir (Şekil 2.6). Polimerizasyondan sonra, sonraki çözülme, kriyojel adı verilen birbirine bağlı makro gözenekli çapraz bağlı yapıyı geride bırakarak buz kristallerini eritir. Kriyojellerdeki gözenekli aę şekli ve boyutu, çeşitli faktörler aracılığı ile değiştirilebilir. Bu faktörler için, buz kristali ağı, donma sıcaklığı ve yönü, polimerin ve çapraz-bağlayıcının derişimi, kullanılan çözücü türü örnek verilebilir. Bu faktörlerin kontrolü sağlandığında biyomedikal alanda umut verici materyaldir [76].

Sentetik polimer, doğal polimer ve sentetik ile doğal polimerin kombinasyonu ile çeşitli kriyojeller elde edilebilir [83]. Biyoyumlu, esnek, dayanıklı ve kararlı bir yapıya sahip olan PHEMA, hem toksik değildir hem de adsorpsiyon kapasitesi yüksektir [84,85]. Histidin amino asit içeren MAH monomerinin, hidrofiliği, ucuzluğu ve biyoyumluluğunun yanı sıra psödospesifik bir ligand ve ko-monomer olarak kullanılabilir [86,87].



Şekil 2.7. Kriyojelin çeşitli parametrelerine genel bakış.

Günümüzdeki ilerlemelerde çeşitli materyaller, polimerler ve yapılar ile sentezlenen çeşitli kriyojeller bulunmaktadır. Kontrollü kriyo-koşulları ile kriyojeller, farklı gözenek boyutlarında, geometrilere ve biçimlerde elde edilmiştir (Şekil 2.7). Kriyojellerin özellikleri, yüksek oranda gözenekli yapı, ayarlanabilir mekanik özellikler, birbirine bağlı gözenekler vb. gibi doku mühendisliği için yapı iskelelerinin gereklilikleriyle örtüşmektedir ve doğal dokuyu taklit etmektedir. Bahsedilen bu özelliklerle, çeşitli alanlarda kriyojel matrislerin önü açılmıştır [76].

2.4. Kromatografik Yöntemler

Aktif bileşiklerin keşfedilmesine, sentezlenmesine, kesin bir şekilde analiz edilmesine ve uygulanmasına yönelik tekniklerin araştırılması, kanserlerin teşhis edilmesinde, önlenmesinde ve tedavi edilmesinde çok etkili bulunmuştur. Bir karışım bileşenlerinin iki faz arasında sürekli dağılımları ile ayrılması için kullanılan teknikler grubu, kromatografi olarak tanımlanabilir. Kromatografinin temeli, yüzey üzerinde veya katı içinde kullanılan karışımdaki moleküller ile akışkan durağan fazın (kararlı faz) hareketli fazı kullanarak hareket ettiklerinde birbirlerinden ayrılması kavramıdır. Bu nedenle, ayırma tekniği

üzerindeki etkili parametreler, dağılma (sıvı-katı), adsorpsiyon (sıvı-katı), afinite veya ilgili moleküler ağırlık arasındaki fark ile ilişkili moleküler özellikleri içerir [88]. Karışım içerisinde bazı bileşenler sabit fazda daha uzun süre kalıp sistemde yavaş hareket ederken, bileşenlerin bazıları da hareketli faza hızlıca geçip sistemden de hızlıca çıkması bu farklılıktan kaynaklıdır [89].

Yukarıdaki strateji ile ilgili olarak, kromatografi üç unsura dayanmaktadır:

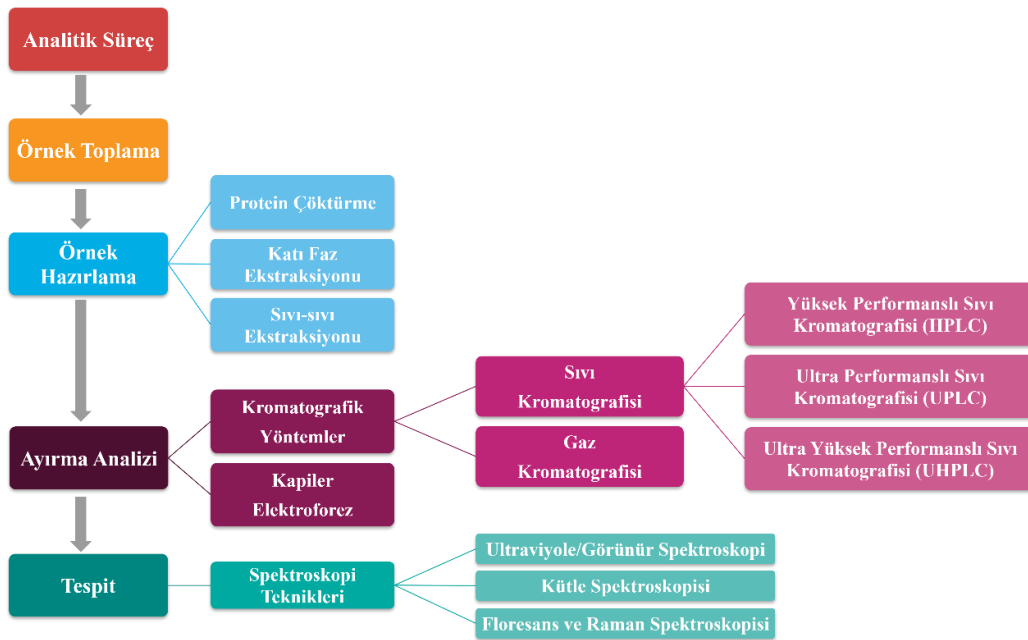
- Sabit faz: Bu faz sürekli olarak bir "katı" faz veya "yüzeyde katı bir destek üzerine adsorbe edilen bir sıvı tabakası" içermektedir.
- Mobil faz: "Sıvı" veya "gaz halinde bileşen" içeren fazdır.
- Ayrılmış moleküller.

Moleküllerin ayrılmasını sağlayan etken bileşenler, sabit ve hareketli fazın yanı sıra karışımın içerisindeki maddelerin birbiriyle etkileşim türüdür. Küçük moleküllerin ayrılmasında ve tanımlanmasında çok etkili olan, ayırmaya dayalı kromatografi teknikleridir. Ancak afinite kromatografileri (yani iyon-değişim kromatografisi), makromoleküllerin nükleik asitler ve proteinler olarak ayrılmasında daha etkilidir. Proteinlerin ayrılmasında ve sentezinde kağıt kromatografisi; alkol, ester, lipid ve amino gruplarının ayrılmasında ve enzimatik etkileşimlerin gözlemlenmesinde gaz-sıvı kromatografisi, özellikle proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde moleküler-elek kromatografisi tercih edilirken, agaroz-jel kromatografisi de RNA, DNA parçacıkları ve virüslerin saflaştırılmasında kullanılır [90].

Kromatografide bir katı fazın yüzeyine, kaplanan bir katı faz veya sıvı faz sabit faz olarak bilinmektedir. Sabit fazın üzerinden akan hareketli faz, gaz veya sıvı fazdır. Hareketli faza göre kromatografi teknikleri isimlendirilir. Faz, sıvı olduğunda sıvı kromatografisi (LC), gaz olduğunda da gaz kromatografisi (GC) olarak tanımlanır. Gazlar ve katı materyaller ve uçucu sıvıların karışımları için gaz kromatografisi seçilirken, termal kararsız ve uçucu-olmayan örnekler için sıvı kromatografisi seçilir [91].

Belirli bir zaman içerisinde iyi ayırım sağlayan ve nicel analiz yöntemi olarak kromatografi uygulanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen bazı kromatografi yöntemleri şunlardır: kolon kromatografisi, ince-tabaka kromatografisi (TLC), kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel geçirgenlik kromatografisi, yüksek-basınçlı sıvı kromatografisi ve afinite kromatografisi [92].

Biyolojik numuneler ve uygulanan analitik koşulları gösteren formülasyonlar gibi çeşitli matrislerde en büyük kullanımları olan analitik teknikleri ele almaktadır. Bu analitik tekniklerin basamakları Şekil 2.8'de özetlenmiştir.



Şekil 2.8. Kromatografik yöntemlerin analitik süreçleri [89].

2.4.1. Membran Bazlı Ayırma Teknikleri ve Membran Özellikleri

Membran ayırma, su arıtımı (ör. tuzdan arındırma ve atık su arıtımı), değerli metallerin geri kazanımı, farmasötiklerin ve diğer endüstriyel ürünlerin saflaştırılması gibi çeşitli teknik işlemlerde ve ayrıca tıbbi uygulamada, yani hemodiyalizde önemli bir rol oynar. IUPAC [93] tarafından membran-bazlı ayırma tekniklerinin terminolojisi henüz uyumlu hale getirilemediği için literatürde aynı tekniğin farklı terimler için veya aynı terimin farklı teknikler için kullanıldığı görülmektedir [94].

Sıvılardan parçacıkların ve koloidal maddelerin ayrılması, yüksek-molekül ağırlıklığına sahip bileşiklerin uzaklaştırılması, uçucu bileşiklerin ayrılması veya zıt yüklü iyonların ayrılması gibi verilen bu örneklerde membranlarla verim sağlanmaktadır. Membranların türüne göre, gözenek boyutuna, mikro yapıya (homojen, mikro gözenekli, fibröz), fizikokimyasal özelliklere (hidrofilik, hidrofobik), reaktiviteye (örn. apolar, polar ve iyon değişimi membranlar) ve şekle (düz ve boş-fiber membranlar) göre ayrımlar yapılır [94].

Farklı gözenek boyutuna sahip olduğu için hidrofilik fibröz ve mikro gözenekli membranlara, genellikle kaba veya mikrofiltrasyonda yer verilir. Hidrofilik homojen polimer membranlar ise ultrafiltrasyonda ve pasif diyalizde öne çıkar. Çizelge 2.2.'de tayin metodunda kullanılan yöntemleri sınıflandırmayı, ilgili temel ilkeleri ve tipik membran türleri ile verilmektedir.

Çizelge 2.2. Çeşitli tayin yöntemleri ve uygulama amacına göre kullanılan membran özellikleri [94].

Tayin	İtici Güç	Ayrılan	Uygulama amacı	Membran özellikleri
Mikro/Ultra-Filtrasyon	Basınç gradyanı, (pozitif veya negatif)	Çözünmüş analitler	Parçacıkların, koloidal maddenin ve yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin uzaklaştırılması	Hidrofilik (veya yaş) mikro- ve nano gözenekli polimerler
Pasif diyaliz	Değişim gradyanı; difüzyon kontrollü	Çözünmüş düşük molekül-ağırlıklı bileşikler	Parçacıkların, koloidal maddenin ve yüksek molekül-ağırlıklı bileşiklerin uzaklaştırılması	Hidrofilik nano gözenekli veya homojen polimerler

Donnan diyaliz	İyon değişimi; derişim gradyanı, difüzyon kontrollü	Membrana zıt yüklü iyonik türler	Membrana zıt yüklü iyonların uzaklaştırılması, (güçlü) asit ve bazların nötralizasyonu	Pozitif veya negatif yüklü gruplara sahip iyon değişim membranları
Elektrodiyaliz	İyon değişimi; elektriksel alan, göç	Membrana zıt yüklü iyonik türler	Membrana zıt yüklü iyonların uzaklaştırılması, (güçlü) asit ve bazların nötralizasyonu	Pozitif veya negatif yüklü gruplara sahip iyon değişim membranları
Gaz difüzyonu (Pervaporasyon)	Buhar basıncı ve çözünürlük farklılıkları; difüzyon kontrollü	Çözünmüş gazlar ve uçucu bileşikler	Parçacıkların, koloidal maddenin, uçucu-olmayan bileşiklerin uzaklaştırılması	Hidrofobik mikro gözenekli veya homojen polimerler

2.4.1.1. Membran Ayırma Sürecini Etkileyen Parametreler

Kesikli ve sürekli akış konfigürasyonlarında uygulama olarak kabul edilen membran tekniği türünden bağımsız olarak ayırt edilebilir. Bu iki sistem içerisinde yarı-geçirgen membran, bir itici güç ile analitleri veya istenmeyen matris bileşenlerini çözümlenenden ayırmayı sağlar. Basınç düşmesi, derişim gradyanı, elektrostatik etkileşimler, elektro-göç veya çözünürlük farklılıkları bu itici güç arasında sayılabilir. Birkaç durumda, iki veya daha fazla ayırma mekanizması aynı anda hareket edebilir.

Sürekli-akış olarak bu membran ayırma tekniklerinin uygulanması, teknik olarak kaygı sebebidir [94,95]. Optimal verimlilik geçmiş zamanda hedeflenip konfigürasyonlar geliştirilerek, sürekli akış ile membran ayrılması teoride gelişim sağlamıştır. Donanımın geometrik boyutları küçültülerek ve parametrelerde minyatür format kullanılarak uygulamalar aynı şekilde devam etmiştir. Sürekli akış sistemlerinde membran ayırma için, çözümleneni, valfleri ve itici güç için gerekli donanımları gerektirir. Kılcal borular ile

bileşenler çözeltiliye aktarılır. Akış sistemi konfigüre ve optimize edildikten sonra birçok numunenin otomatik işlenmesi için uygulanabilir. Örnek girişi, alıcı çözeltinin aktarımı ve akış kanallarının durulanması gibi çeşitli prosesler sıvı uygulamanın kolay yol olduğunu gösterir.

2.4.2. Filtrasyon ve Ultrafiltrasyon

Numune hazırlama aşaması olarak filtrasyonun amacı, sıvı numuneden iri parçacıklı maddeyi uzaklaştırmaktır. Çünkü bu parçacıklar, akış sistemindeki kılcal boruları tıkayıp artan geri basınca sebep olabilir veya kolonun kullanım ömrünü azaltabilir. 0.2 ila 0.45 µm aralığındaki gözenek boyutları, örnek hazırlama için filtrasyon membranlarında uygundur. Uygun filtre ortamı (ticari olarak çok çeşitlidir) ile ilgili olarak seçim, çözücü ile uyumluluk, boşlukların serbestliği, analitlerin filtre yüzeyinde olası adsorpsiyon riski, uygulanabilirlik ve maliyetler tarafından yönlendirilir [94].

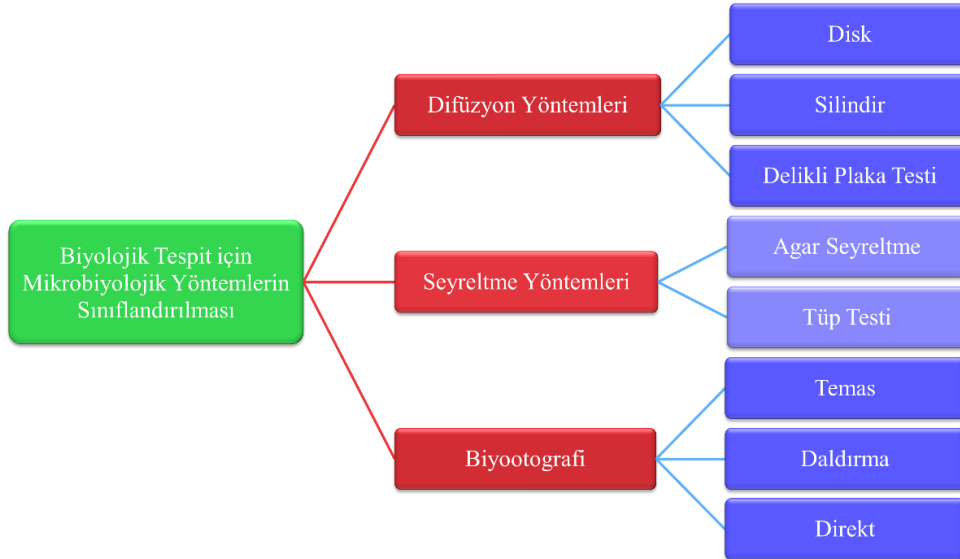
Kategori olarak spesifik molekül ağırlık sınırına (MWCO) göre yer alsa da yaklaşık 0.001–0.1 µm gözenek boyutuna sahip olan mikrofiltrasyondan daha küçük gözenek boyutlarına sahiptir. Bu, membrandan geçebilen veya geçemeyen bir bileşiğin moleküler ağırlığına (sırasıyla moleküler boyutla ilişkilidir) atıfta bulunan bir değerdir. Selüloz asetat, rejenere selüloz, selüloz ester, polikarbonat, polisülfon ve polietersülfon, UF için yaygın kullanılan membran materyalleridir ve aynı zamanda ticari UF membran sınır değerleri 1-1000 kDa aralığında yer almaktadır [94].

2.4.3. Biyootografi

Biyootografi, antimikrobiyal aktivitenin tespiti için yaygın olarak kullanılan mikrobiyolojik tarama yöntemlerine aittir (Şekil 2.9). Tarama, verilen analitlerin varlığını veya yokluğunu belirlemek için analiz edilen bir numuneye uygulanan ilk prosedür olarak tanımlanabilir [96]. Temel olarak, “evet/hayır” yanıtı veren basit bir ölçümdür [97]. Oldukça sık, tarama yöntemleri diğer yöntemlerden daha yüksek hassasiyet verir. Ayrıca, basit, ucuz, zaman-kazandırıcı ve karmaşık ekipman gerektirmezler. Biyootografi tarama yöntemleri biyolojik aktivitelere dayanmaktadır, örn. test edilen maddelerin antibakteriyel, antifungal, antitümör ve antiprotozoaları [98]. Bu saptama yöntemi, ince-

tabaka kromatografisi (TLC), yüksek-performanslı ince-tabaka kromatografisi (HPTLC), aşırı basınçlı-tabaka kromatografisi (OPLC) ve düzlemsel elektrokromatografi (PEC) gibi tabaka sıvı kromatografisi teknikleriyle başarılı bir şekilde birleştirilebilir. TLC-biyootografi adı, biyootografi ile bağlantılı herhangi bir düzlemsel teknikle ilgili olarak çoğunlukla geniş-kapsamlı anlamında kullanılmaktadır. Doğrudan biyootografi olarak adlandırılan, yani doğrudan ince-tabaka kromatografisi (TLC-DB) ile tirelenen biyootografi, aynı TLC plakası üzerinde hem ayırma hem de mikrobiyal algılama gerçekleştirilir.

Genel olarak yöntem, analiz edilen maddelerin antibakteriyel özelliklerini, yani bakteri üremesindeki değişiklikleri ölçer. Bununla birlikte, diğer etki mekanizmaları, örn. TLC-biyoluminesans yöntemi olarak adlandırılan, lüminesans-yapan bakteriler kullanılarak biyootografi yapıldığında meydana geldiği için rahatsız edici canlı hücre süreçleri [99,100]. Hem TLC-DB hem de TLC-biyoluminesans, biyolojik aktif maddelerin karmaşık karışımlarda ve matrislerde aranmasını sağlar ve biyolojik yanıtı dayalı çevresel ve tehlike yönetiminde yeni bir yaklaşım olan etkiye-yönelik analize (EDA) dahil edilebilir [101-103].



Şekil 2.9. Mikrobiyolojik yöntemlerin biyolojik olarak belirlenmesi için sınıflandırılma şeması [103].

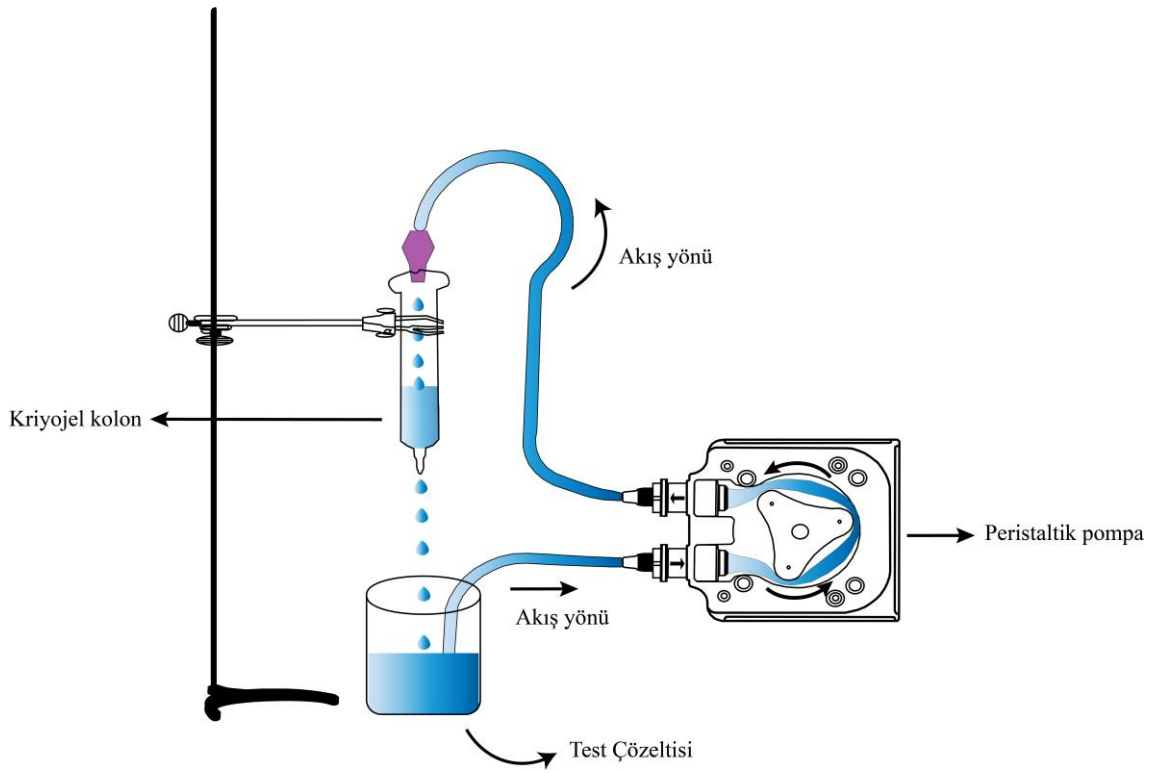
Pseudomonas aeruginosa'nın bakteri/mantar üzerindeki antibakteriyel ve antifungal biyolojik aktive başlığına dahil olduğu örneği ve kromatografi teknik ile incelenmesi Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Çeşitli bakterilerin/mantarların, TLC kromatografi tekniği kullanarak sadece antibakteriyel, sadece antifungal ve antibakteriyel ve antifungal analiz örneklerinin TLC kromatografi tekniğinin incelenmesi [103].

Biyolojik Aktivite	Madde	Bakteri/Mantar	Kromatografi Tekniği
Antibakteriyel ve antifungal	Özler: <i>Rhododendron</i> (<i>Ericaceae</i>), <i>Leonurus</i> (<i>Lamiaceae</i>), <i>Phlomis</i> (<i>Lamiaceae</i>), <i>Morina</i> (<i>Morinaceae</i>), <i>Asperula</i> (<i>Rubiaceae</i>), <i>Putoria</i> (<i>Rubiaceae</i>), <i>Wendlandia</i> (<i>Rubiaceae</i>), <i>Scrophularia</i> (<i>Scrophulariaceae</i>), <i>Urtica</i> (<i>Urticaceae</i>)	Bakteriler: <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; ve maya: <i>Candida albicans</i>	TLC
Antibakteriyel	Siprofloksasin, enrofloksasin	<i>Bacillus subtilis</i>	TLC
	Sefasetril	<i>Bacillus subtilis</i>	TLC
	Su	<i>Vibrio fischeri</i>	HPTLC
	Su	<i>Vibrio fischeri</i>	HPTLC
Antifungal	Tropik bitkiler	<i>Candida albicans</i> , <i>Cladosporium cucumerinum</i>	TLC

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneyde PHEMA-temelli kriyojelin yanı sıra *Pseudomonas aeruginosa* -baskılanmış PHEMA temelli kriyojel hazırlanmıştır. Ardından karakterizasyon çalışmaları her iki kriyojel için de gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar ortamında *in vitro* olarak yetiştirilmiş *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi baskılanmış olan kriyojelde adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 3.1. *Pseudomonas aeruginosa* adsorpsiyonu için kullanılan sistemin diyagramı.

3.1. Mikroorganizmalar

Pseudomonas aeruginosa (ATCC ® 39327), *Staphylococcus aureus* (ATCC ® 12600), *Salmonella paratyphi* (ATCC ® 9150) ve *Escherichia coli* (ATCC ® 11775) saf kültürleri, Amerika, Amerikan tipi kültür koleksiyonundan (ABD, American Type Culture Collection, ATCC) elde edilmiştir. Mikroorganizmaların saf kültürleri dondurularak kurutulmuş halleri kullanımına kadar 2-8°C sıcaklık aralığında soğutucuda saklanmıştır.

3.2. Kimyasal Malzemeler

N-Metakriloil-(L)-Histidin metil ester (MAH) monomeri laboratuvarında literatürde verilen yöntemle göre sentezlenmiştir. 2-hidroksetil metakrilat (HEMA), metilen bisakrilamid (MBAAm), amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) Sigma Chemical Co.'dan (St. Louis, MO, ABD) tedarik edilmiştir. Direnç değeri 18 MΩ/cm olan deiyonize su, deneysel çalışma sürecinde kullanılmıştır. Ultra saf su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.3. Deneysel Yöntemler

3.3.1. *Pseudomonas aeruginosa* 'nın Kültürlenmesi

Büyüme ortamı olarak Luria Bertani (LB) suyu kullanılmıştır. Bakteri ırkları 10 mL LB suyuna aşılandıktan sonra, örnekle bir inkübatör-çalkalayıcıda 37°C'de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra pelet elde etmek için bakteriler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan çözünmemiş kısım uzaklaştırılmıştır ve pelet için PBS tamponu ile süspansiyon işlemi yeniden gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Bakteri derişimini belirlemek için plaka sayımı yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, steril PBS tamponunda bakterilerin 10 kat seri dilüsyonları hazırlanmıştır ve 100 µL örnek, besleyici agar plakalarına inoküle edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra oluşan koloniler sayılmıştır ve derişimler mililitre (CFU/mL) cinsinden koloni oluşturan birimler olarak ifade edilmiştir [104].

3.3.2. Fonksiyonel Monomer Sentezi ve Karakterizasyonu

Deneyde kullanılmış olan fonksiyonel monomerin sentezlenmesi için literatürde verilen deney aşamaları izlenmiştir. N-metakriloil (L) histidinmetilester (MAH) monomeri ve Cu(II) iyonlarının etkileşimleri ile gerçekleştirilmiştir. 100 mL CH₂Cl₂ (diklorometan) çözeltisi içinde L-Histidin metil ester (5.0 g) ve 0.2 g hidrokinon çözüldürüldükten sonra 0°C'ye kadar soğutulup içerisine trietilamin (12.7 g) ilave edilmiştir. Azot atmosferi altında bu çözelti içerisine 5.0 mL Metakriloil klorür yavaşça dökülmüştür. Daha sonra

bu çözelti, oda sıcaklığında 2 saat manyetik olarak karıştırılmıştır. Hidrokinon ve tepkimeye girmemiş metakriloil klorür %10 NaOH ile kimyasal tepkime süresinin sonunda özütlenmiştir. Bir döner buharlaştırıcı içerisinde sulu faz buharlaştırılmıştır ve bir eter-sikloheksan karışımı içinde kalıntı (yani MAH) kristalleştirilmiştir. Ardından etil alkol içerisinde çözündürülmüştür. Sentezlenmiş olan fonksiyonel monomer, FTIR spektrometre cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemi sırasında fonksiyonel monomer, KBr ile hazır hale getirilerek ölçümler yapılmıştır [105].

3.3.3. Ön Kompleks Hazırlanması

Pseudomonas aeruginosa bakterisine seçici kavitelelerin oluşumu için uygun fonksiyonel monomer olarak MAH tercih edilmiştir. MAH amino asit temelli fonksiyonel monomeri ile Cu(II) iyonları arasında metal şelat koordinasyonu gerçekleşir. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi, oluşan metal-şelat koordinasyonuna spesifik olarak bağlanır. MAH monomeri ve Cu (II) iyonlarında hazırlanan süspansiyon ön-kompleks karışımı 1:1 molar oranı olarak seçilmiştir. Bu ön-kompleks karışımı rotatorda 20 rpm hızda 30 dakika karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*-Baskılanmış Kriyojellerin Hazırlanması

1.3 mL HEMA monomeri, 1.7 mL saf suyun olduğu bir beher içerisine ve ikinci bir behere ise 0.283 g N,N'-metilen-bis(akrilamit) (MBAAm) çapraz bağlayıcısı, 10 mL saf suya eklenip yaklaşık 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ön-kompleks oluşturmak için içerisine 14 uL MAH ve 2.4 mg Cu⁺² konulan üçüncü behere 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra 1 mL *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi ilave edilmiştir. İlk olarak birinci ve ikinci beher kendi aralarında karıştırılıp, ardından üçüncü beher içerisine eklenmiştir. Amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) serbest radikal başlatıcıları, son olarak karışım içerisine eklenmiştir. Polimerizasyon işlemimin başlaması ile Tek kullanımlık şırıngalar içerisine hızlıca aktarılarak +4 °C su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. Bir gün süren kriyojelasyon işlemi sonrası, oluşan buz kristallerinin oda sıcaklığında çözünmesi için bekletilmiştir. Ardından üzerinden saf su geçirilerek, *Pseudomonas aeruginosa* -baskılanmış kriyojelleri (MIP) hazır hale gelmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* -baskılanmamış kriyojeller (NIP) için ise, üçüncü beher içerisine bakteri eklenmemiş olarak prosedürün aynısı izlenmiştir.

3.4. Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.4.1. Yapı Analizi için FTIR

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) (Thermo Fisher Scientific, Nicolet is50, Waltham, MA, ABD) kullanılarak P(HEMA-MAH)-*Pseudomonas aeruginosa*-NIP ve P(HEMA-MAH)-*Pseudomonas aeruginosa*-MIP kriyojel membranların kimyasal yapısı analiz edilmiştir. Kurutulmuş NIP (moleküler baskılama yapılmamış) ve kurutulmuş MIP (moleküler baskılama yapılmış) kriyojeller için FTIR spektrumları, 4000–400 cm⁻¹ aralığında alınmıştır.

3.4.2. Yüzey Morfolojisi

NIP (moleküler baskılama yapılmamış polimer) ve MIP (moleküler baskılama yapılmış polimer), yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiş. Bir örnek plaka üzerine iletken bir yapıştırıcı malzeme ile tutturulan polimer membran kesiti SEM cihazı karakterizasyonuna hazır hale getirilmiştir. Örnek yüzeylerinin iletken hale getirilmesi için, vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanmıştır. Hazırlanan örnekler SEM görüntüleri, GAIA3 TESCAN cihazı ile çeşitli büyütme oranlarında alınmıştır.

3.4.3. Şişme Davranışları

MIP (moleküler baskılama yapılmış polimer) kolonu şişme oranlarının belirlenmesi için sabit tartıma getirilmek üzere kurutulmuştur. Üç farklı sıcaklıkta aynı süre içerisinde tartımları gerçekleştirilmiştir. Polimer membran şişme oranı ve makro-gözenekliliği sırasıyla Eşitlik (3.1) ve Eşitlik (3.2) kullanılarak aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \left[\frac{W_s - W_0}{W_0} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Makrogözeneklilik (\%)} = \left[\frac{W_{\text{şişmiş}} - W_{\text{sıkıştırılmış}}}{W_{\text{sıkıştırılmış}}} \right] \times 100 \quad (3.2)$$

Şişme deneyi üç farklı sıcaklık koşulunda (buz içerisinde, oda sıcaklığında ve yaklaşık 37°C de) gerçekleştirilmiştir. İlk olarak MIP kolon kurutulularak kuru ağırlığı (W_0) not edilmiştir. Aynı MIP kolon, farklı sıcaklık koşullarında sabit hacim saf suyun içerisinde 2 saat bekletilmiştir. 2 saatin sonunda süzgeç kâğıdı ile dış yüzeyinde kalan fazla sular alınarak, şişmiş MIP kolon ($W_{\text{şişmiş}}$) değeri hassas terazi kullanılarak bulunmuştur. Son aşama olarak, MIP kolon sıkıştırılarak ($W_{\text{sıkıştırılmış}}$) değeri elde edilerek hesaplamalar verilen denklemler ile % makrogözeneklilik ve %şişme oranı hesaplanmıştır.

3.5. MIP Kriyojellerin Adsorpsiyon Çalışmaları

3.5.1. Farklı Derişimlerde Adsorpsiyon Çalışmaları

Aynı hacimde farklı derişimlerde PBS tamponu içerisinde *Pseudomonas aeruginosa* hazırlanmıştır. Şırınga içerisinde yer alan MIP kolondan 2 saat boyunca peristaltik pompa kullanılarak oda sıcaklığında geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda MIP kolonda alıkonulmuş bakteriler, aynı hacimde 0.1 M NaOH geçirilerek MIP kolondan ayrılması sağlanmıştır. Derişim arttıkça aynı hacimde saf su farklı sürelerde geçirilmiştir. 1 OD = 1×10^8 CFU/mL'ye eşdeğerdir.

3.6. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

Aynı hacimde aynı derişimlerde PBS tamponu içerisinde 0.150 OD *Pseudomonas aeruginosa* hazırlanmıştır. Şırınga içerisinde yer alan MIP kolondan 2 saat boyunca peristaltik pompa kullanılarak oda sıcaklığında geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda MIP kolonda alıkonulmuş bakteriler, aynı hacimde 0.1 M NaOH ve aynı hacimde saf su geçirilerek MIP kolondan ayrılması sağlanmıştır. 1 OD = 1×10^8 CFU/mL'ye eşdeğerdir.

3.7. Seçicilik Çalışmaları

Aynı hacimde aynı derişimde PBS tamponu içerisinde *Pseudomonas aeruginosa* dahil dört bakteri kullanılmıştır. Diğer üç bakteri ise, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus subtilis*, *staphylococcus aureus*'dur Şırınga içerisinde yer alan MIP kolondan 2 saat boyunca peristaltik pompa kullanılarak oda sıcaklığında geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda MIP

kolonda alıkonulmuş bakteriler, aynı hacimde 0.1 M NaOH ve aynı hacimde saf su geçirilerek MIP kolondan ayrılması sağlanmıştır.

3.8. Mevcut Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Adsorpsiyon izotermi, adsorban üzerindeki adsorbe edilen sorbat miktarını, sabit bir sıcaklıkta çözünen maddenin denge derişimi ile ilişkilendirir. Adsorpsiyon izoterm modelleri de bu ilişkiyi anlatan modellerdir [106]. Bazı varsayımlara dayanarak modellerin çoğu elde edilir [107].

3.8.1. Langmuir İzoterm Modeli

Adsorpsiyonun belirli homojen adsorbent yüzeyinde meydana geldiğini varsayarak, en yaygın olarak bilinen izotermdir. Adsorbe edilmiş bir molekül bir bölgeye girerse, daha fazla adsorpsiyon meydana gelmez [108]. Böylece bir denge kalitesine ulaşılması ve doymuş tek-tabaka eğrisi tek-tabaka adsorpsiyonu için etkili olan aşağıdaki eşitlikle ifade edilir ve Langmuir modelinin lineer yapısı şu şekildedir [109].

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{c_e}{Q_0} + \frac{1}{bQ_0} \quad (3.3)$$

Burada C_e dengedeki derişim (mg/l), Q_e dengede soğurulan miktar (mg/g) ve Q_0 ve b sırasıyla adsorpsiyon verimlilik sabiti ve adsorpsiyon enerji sabitidir.

3.8.2. Freundlich İzoterm Modeli

Freundlich izoterm modeli, adsorpsiyonu, çok-katmanlı bir adsorpsiyon mekanizmasıyla heterojen yüzey boyunca meydana gelen olgular olarak tanımlar. Freundlich modeli lineer formu [110] olarak ifade edilir.

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log c_e \quad (3.4)$$

burada Q_e , adsorplanan adsorbat miktarıdır (mg/g), C_e , dengede çözültideki adsorbat derişimidir (mg/l), K_F ve n , sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon yoğunluğunu etkileyen tüm faktörleri entegre eden sabitlerdir.

3.8.3. Langmuir ile Freundlich İzoterm Modeli

Adsorbatın düşük derişiminde model olarak Freundlich izoterm kullanılırken, yüksek derişiminde Langmuir izotermine dönüşmesi bu izoterm ile açıklanır. Burada tanımlanan ise, adsorbanın heterojen yüzeyine adsorpsiyon enerjisi dağılımıdır [111,112]. Langmuir-Freundlich izoterm denklemi, [113,114] şu şekilde yazılabilir:

$$q_e = \frac{Q_{LFM}(K_{LFC_e})^{M_{LF}}}{1+(K_{LFC_e})^{M_{LF}}} \quad (3.5)$$

Q_{LFM} 'nin maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mgg^{-1}) olduğu yerde, K_{LF} , dengedeki heterojen katı sabitidir ve M_{LF} , heterojenlik parametresini temsil eder.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

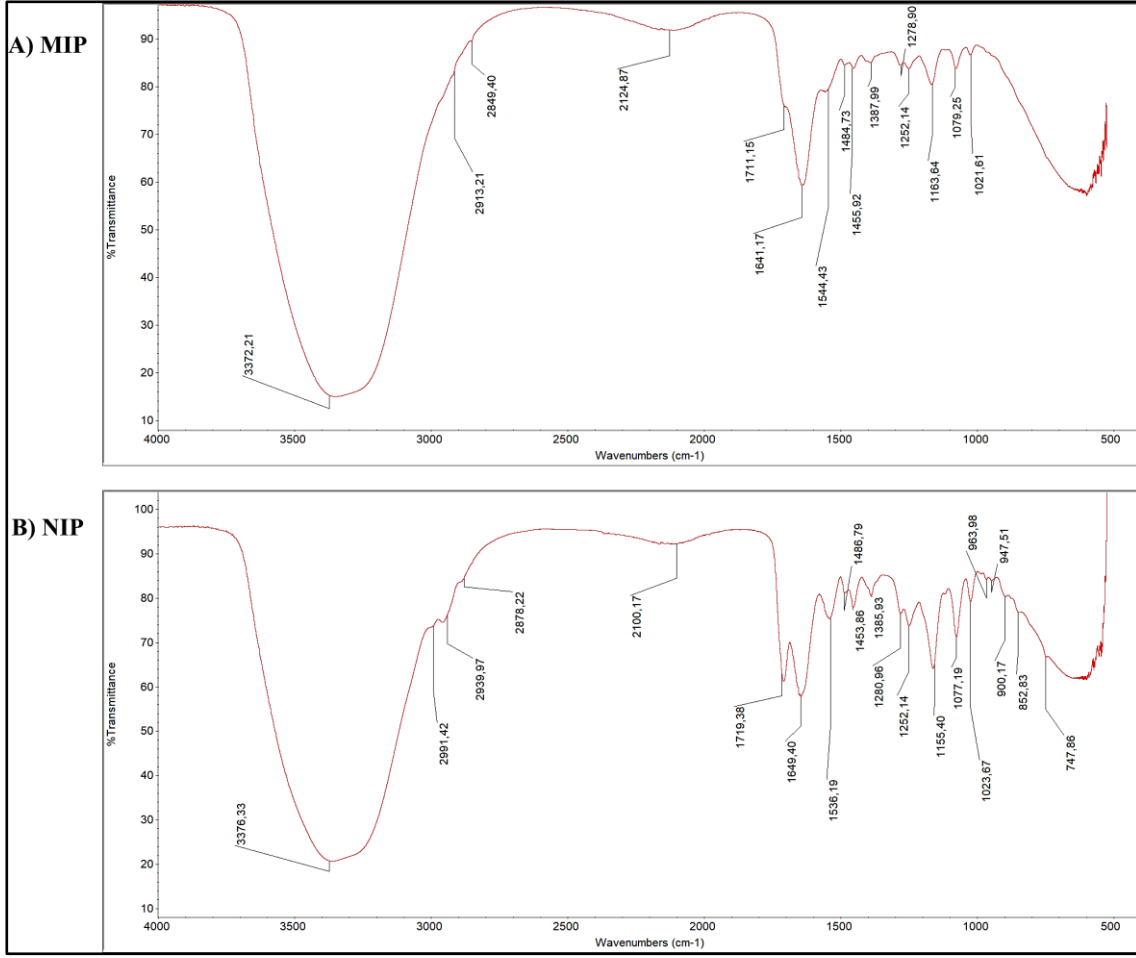
Sunulan tez çalışması dört temel başlıkta özetlemiştir, bu kapsamda

- 1) *Pseudomonas aeruginosa* ve MAH amino asit temelli fonksiyonel monomer ile Cu (II) iyonları metal şelat koordinasyonu yaparak ön kompleks oluşumunun sağlanmıştır.
- 2) Baskılanmış ve baskılama verimliliğinin ve seçiciliğinin belirlenmesi için aynı koşullarda baskılanmamış kriyojel membranlar hazırlanmıştır.
- 3) SEM, FTIR, gözeneklilik, şişme davranışı gibi çalışmalarla hazırlanan kriyojel membranlar karakterize edilmiştir.
- 4) Bakteri bağlanma davranışı, adsorpsiyon kinetikleri ve seçicilik çalışmaları bu aşamada gerçekleştirilmiştir.

4.1. Kriyojellerin Karakterizasyonu

4.1.1. FTIR ile Yapı Analizi

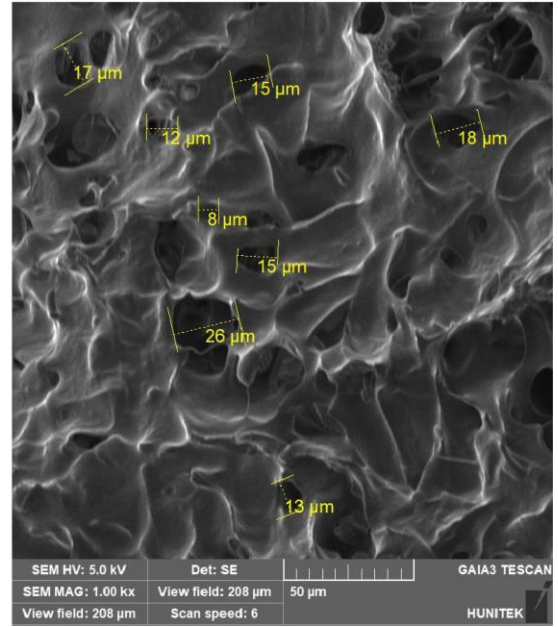
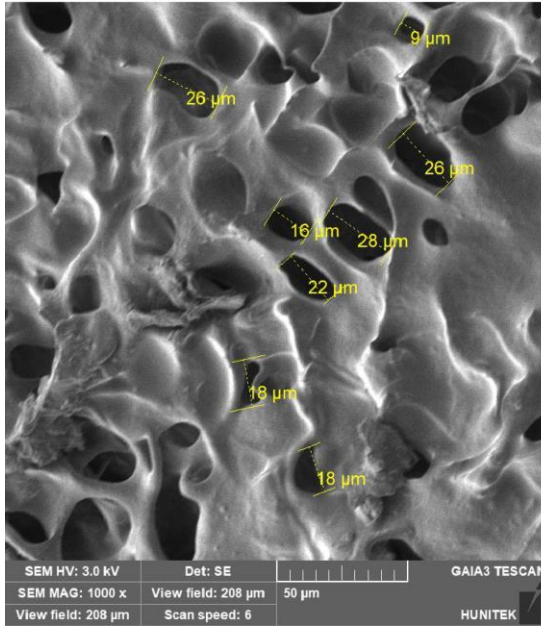
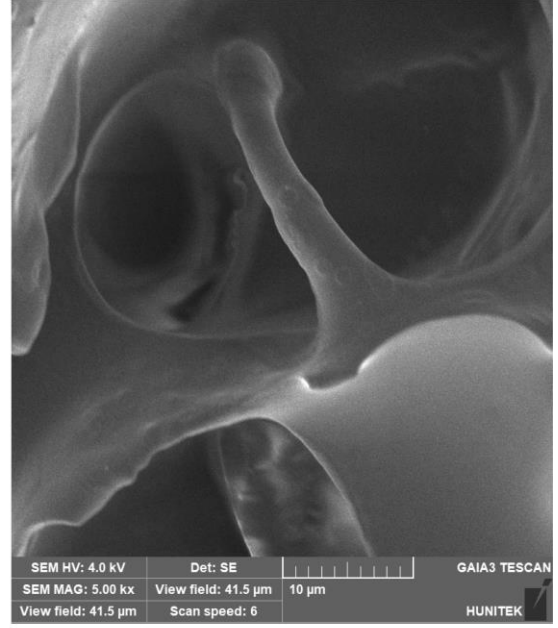
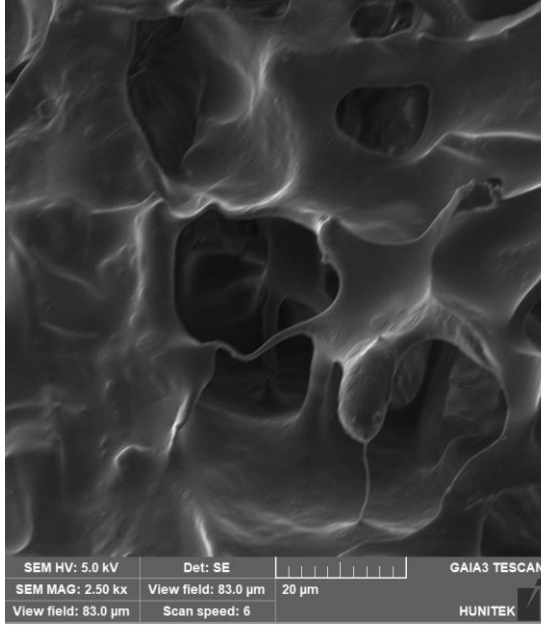
P(HEMA-MAH) *Pseudomonas aeruginosa*-NIP ve MIP kriyojel kolonların FTIR spektrumu, 1719, 1649 cm^{-1} ve 1711, 1641 cm^{-1} 'de amid bantları gösterir. Şekil 4.1 'de görüldüğü gibi, 2991–2939 ve 2913–2849 cm^{-1} değeri sırasıyla NIP ve MIP kriyojel membranlarındaki aromatik ve alifatik C–H gerilme bantlarına karşılık gelir. 3376 ve 3372 cm^{-1} bölgesinde bulunan geniş bantlar, P(HEMA-MAH) *Pseudomonas aeruginosa*-NIP ve MIP kriyojel membranlarındaki HEMA'nın O–H gerilme bantlarına karşılık gelir. Spektrumdaki amid bantları, metal-şelatlayıcı fonksiyonel monomerlerin P(HEMA-MAH) *Pseudomonas aeruginosa* -NIP ve MIP kriyojel membranlarının yapısına dahil edildiğini göstermektedir.



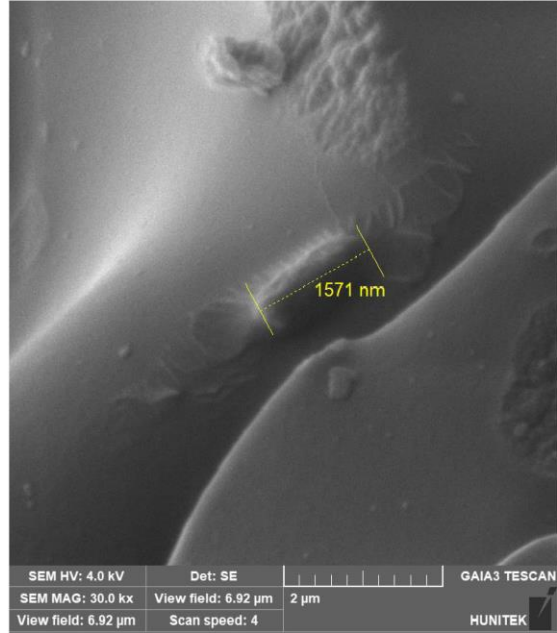
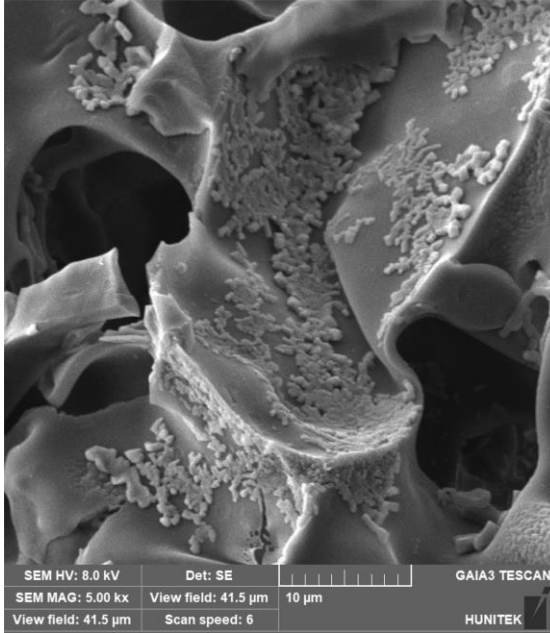
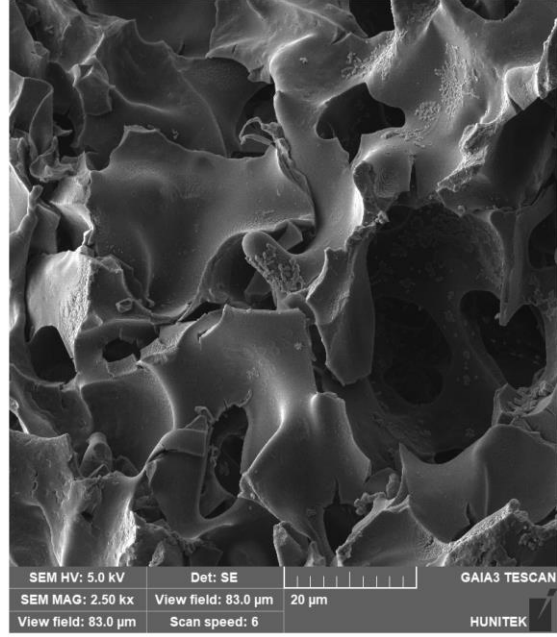
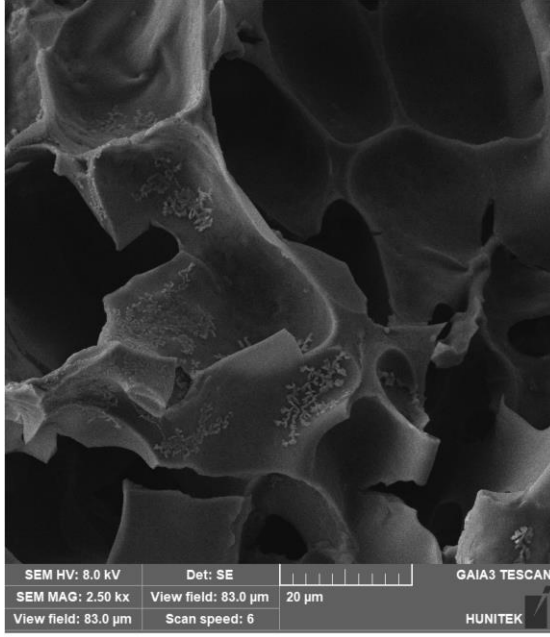
Şekil 4.1. a) *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel (MIP), b) *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmamış kriyojel (NIP).

4.1.2. Yüzey Morfolojisi

SEM ile kriyojellerin yüzey özellikleri incelenmiştir SEM analizi, GAIA3 Tescan cihazıyla gerçekleştirilmiştir. NIP ve MIP kriyojelinin farklı kısımlarından ve farklı um ölçeklendirmesi ile görüntüler elde edilmiştir. NIP kriyojellerin SEM görüntüleri (Şekil 4.2) ve MIP kriyojellerin SEM görüntüleri (Şekil 4.3) arasında morfolojik olarak aşırı farklılık bulunmamaktadır. Ancak MIP üzerinde baskılanmış bakteri boşlukları gözle görülebilmektedir. Bu boşluklara tutunan *Pseudomonas aeruginosa*'nın varlığı ve baskılanmış yüzeylere tutunduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 4.2. *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmamış kriyojel (NIP) SEM görüntüleri.



Şekil 4.3. *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel (MIP) SEM görüntüleri.

4.1.3. Şişme Davranışları

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere farklı ortam koşullarında gerçekleştirilmiş olan *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel (MIP) için %şişme ve %makrogözeneklilik sonuçları sırasıyla, 4 °C’de %383 ve %51, oda koşullarında %324 ve %21, yaklaşık 37°C’de %280 ve %0 sonuçları elde edilmiştir. Saf su ortamında gerçekleştirilen bu şişme ve makrogözeneklilik testi için en verimli sonuç, donma noktasında olduğu görülmüştür.

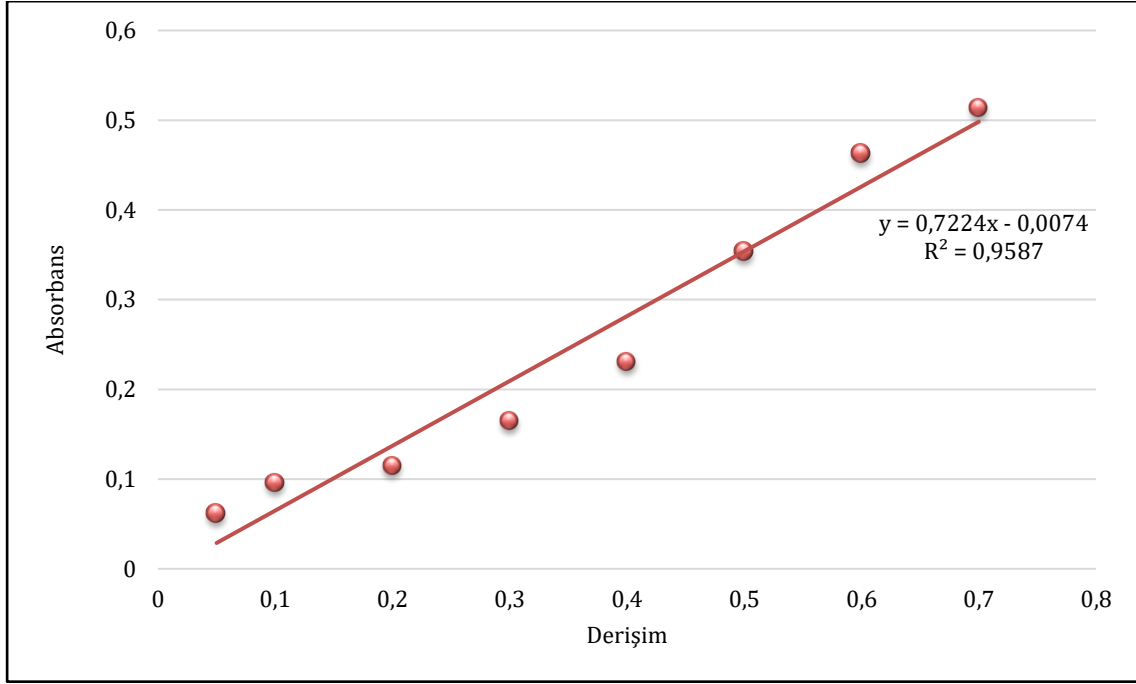
Çizelge 4.1. MIP ile farklı sıcaklıklar için % Makrogözeneklilik ve % Şişme sonuçları.

	$((W_{\text{şişmiş}} - W_{\text{sıkılmış}}) / W_{\text{sıkılmış}}) * 100$	$((W_{\text{şişmiş}} - W_0) / W_0) * 100$
Ortam koşulu	% Makrogözeneklilik	% Şişme
4 °C	50,9	382,6
25 °C	20,8	324,5
37 °C	0,1	279,7

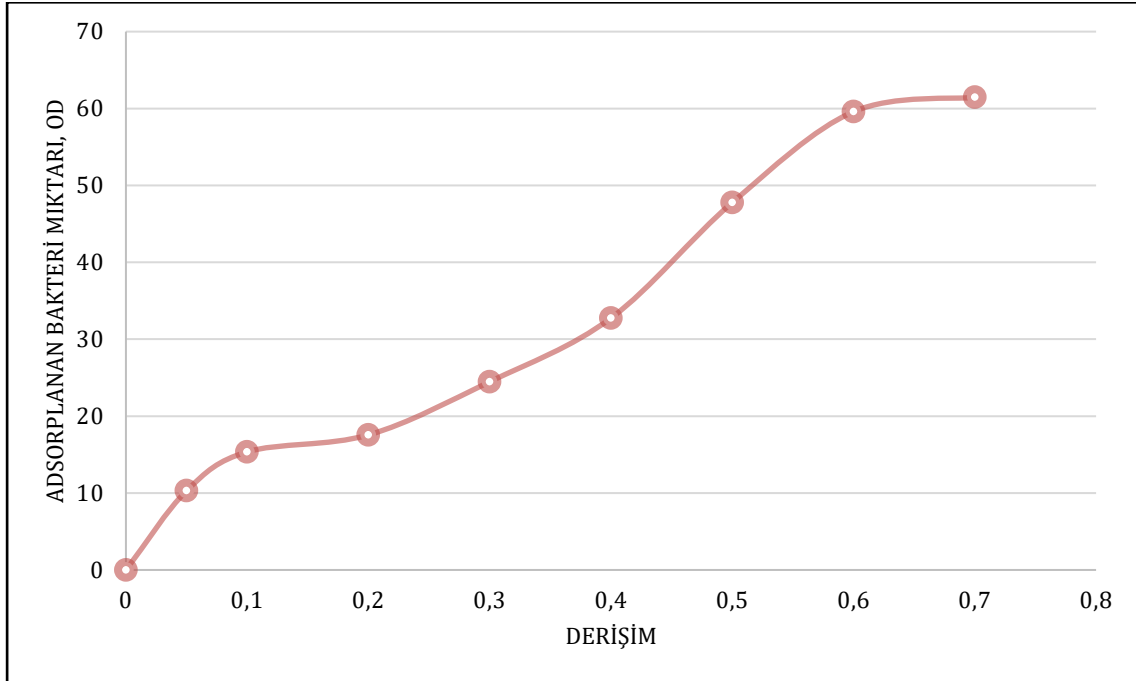
4.2. MIP Kriyojellerin Adsorpsiyon Çalışmaları

4.2.1. Farklı Derişimlerde Adsorpsiyon Çalışmaları

Şekil 4.5’te toplam bakteri sayımı birimi CFU/mL olan MIP kriyojeli üzerine adsorbe edilen bakteri miktarına karşı derişimler görülmektedir. pH 7.4 değerinde PBS tamponu ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki çözeltilerle adsorpsiyon çalışması gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel (MIP) ile yapılan bu adsorpsiyon çalışmasında baskılanmış-bölgeler ile etkileşime geçen bakteri miktarı arttığı için adsorpsiyon kapasitesi artmış ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin bağlanabileceği baskılanmış-bölgelerinin (*Pseudomonas aeruginosa*’ya özgü boşlukların) dolmasıyla dengeye ulaşmıştır. 1 OD = 1×10^8 CFU/mL’ye eşdeğerdir.



Şekil 4.4. *Pseudomonas aeruginosa* için UV – 600 nm ölçümündeki kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.5. *Pseudomonas aeruginosa* baskılanmış (MIP) kriyojelde *Pseudomonas aeruginosa*'nın CFU/mL birim derişime karşı adsorplanan bakteri miktarı.

4.2.2. Adsorpsiyon Kinetik Modellerinin İncelenmesi

Pseudomonas aeruginosa adsorpsiyonu için elde edilen deneysel veriler Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri ile incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Adsorpsiyon izoterm verileri bir adsorpsiyonun “tercihli” veya “tercihsiz” olması konusunda bilgi vermektedir. Langmuir adsorpsiyon izotermi boyutsuz ayırma faktörü veya denge parametresi, R_L , değeri ile ifade edilebilir;

$$R_L = 1 / (1 + b.C_0) \quad (4.1)$$

Eşitlikte C_0 başlangıç derişimi, b Langmuir adsorpsiyon denge sabitidir. R_L değerinin 1'den büyük olması adsorpsiyonun tercihsiz, 1'e eşit olması ile doğrusal, 0 ila 1 arasında olması ise tercihli olduğu bilinmektedir. Çizelgede görüldüğü üzere R_L değeri Langmuir izotermine göre adsorpsiyonun tercihli olduğunu göstermektedir.

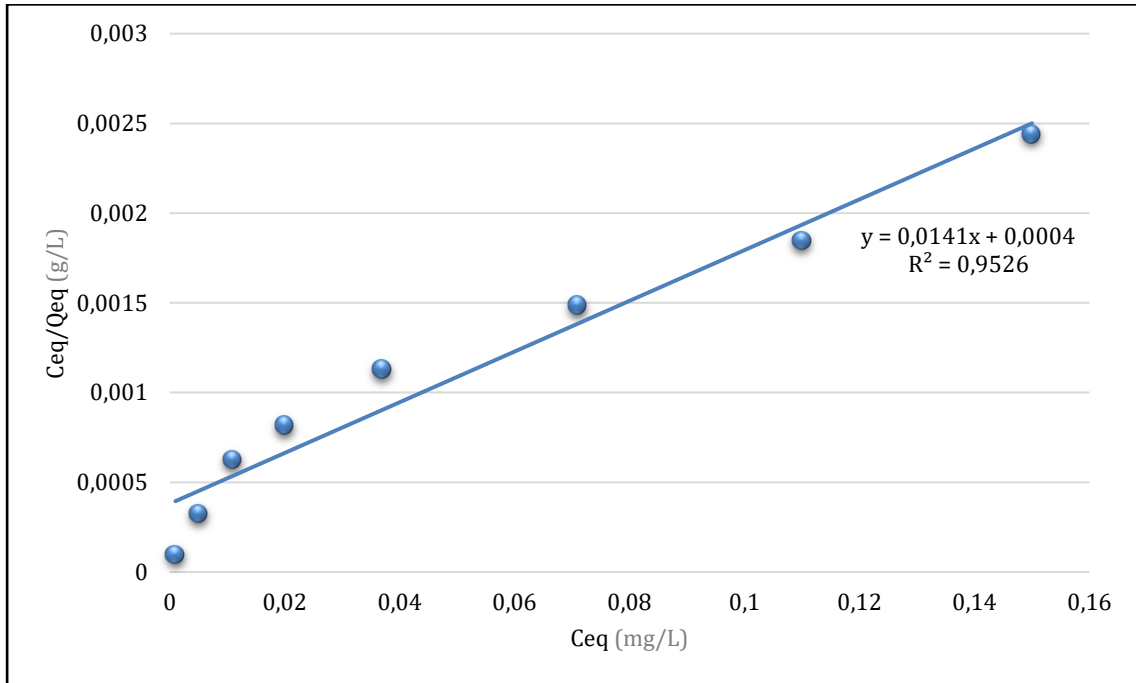
Çizelge 4.2. *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel kolon için Langmuir ve Freundlich izotermi.

Pseudomonas aeruginosa –baskılanmış kriyojel

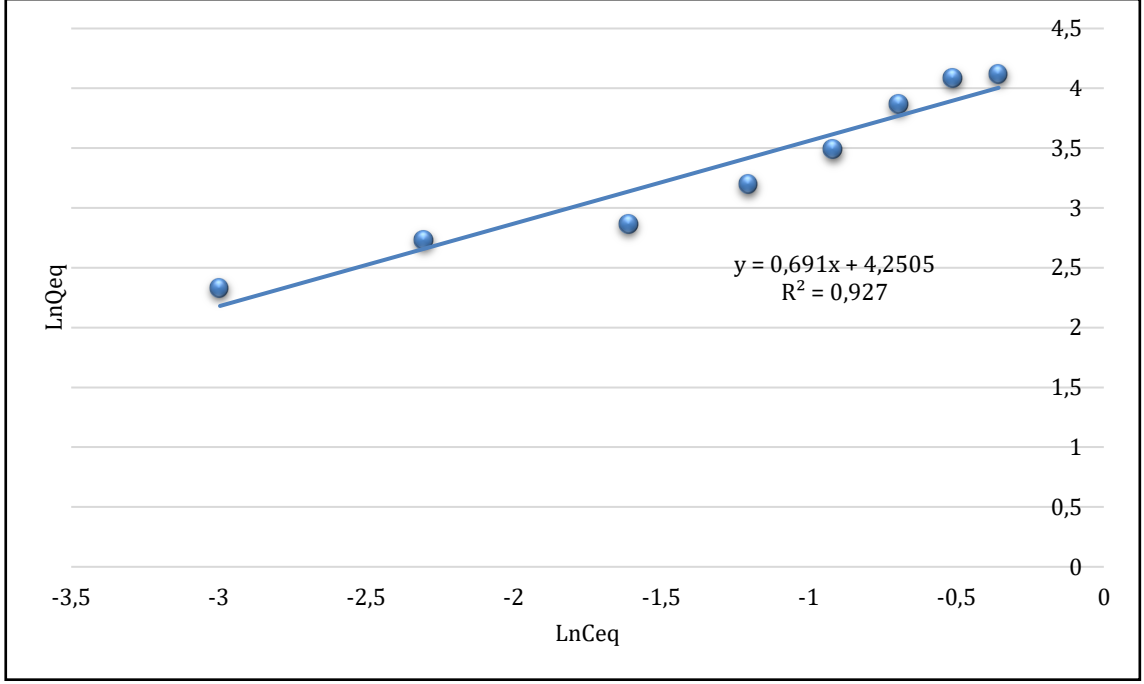
Deneysel	Q (mg/g)	61.45
Langmuir	Q_{max} (mg /g)	52.79
	b (mL/mg)	40.68
	R_L	0.04
	R^2	0.952
Freundlich	K_F	70.14
	1/n	0.69
	R^2	0.927

Bir diğerk adsorpsiyon izotermi Freundlich izotermdir. İzotermde $1/n$ değeri sistemin heterojenliğini ifade etmektedir. Langmuir izoterminin aksine Freundlich izotermi tek tabaka adsorpsiyonu ile sınırlı değildir. n değerinin bire yaklaşması daha homojen bir sistemi, sifira yaklaşması ise heterojen bir sistemi ifade etmektedir.

Elde edilen Langmuir izoterm grafiğı ile Freundlich izoterm grafiğı karşılaştırıldığında R^2 değeri 1'e yakın olan Langmuir Modeline daha uymuş olduğu görülmüştür. Çizelge 4.2'de görülen eğim $1/n$ değeri, 0.69 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre adsorpsiyonun tek tabakalı olduğu yorumu yapılabilir.



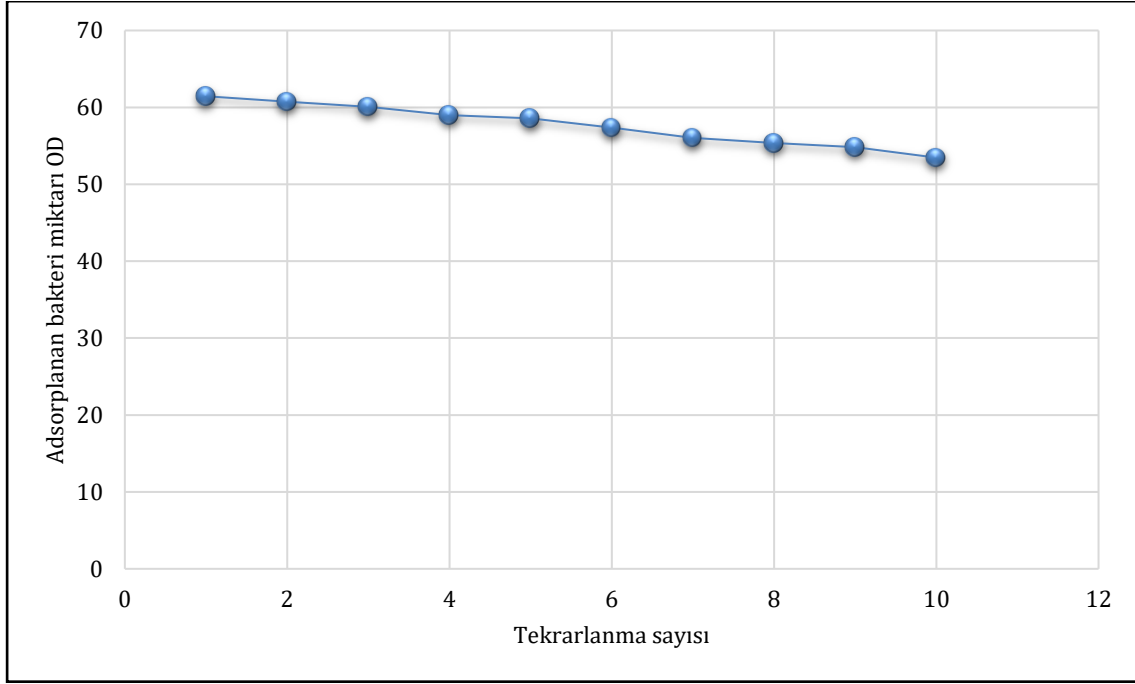
Şekil 4.6. Langmuir İzoterm grafiğı.



Şekil 4.7. Freundlich İzoterm grafiği.

4.3. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

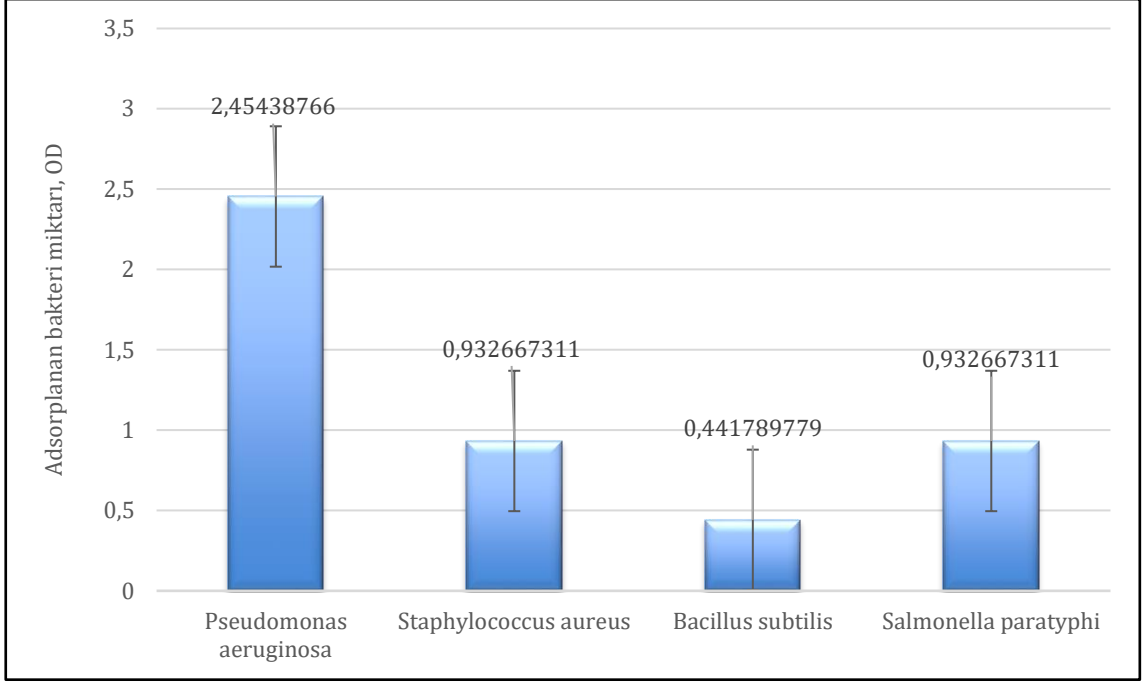
Bakteri baskılanmış aynı kriyojel kullanılarak 10 defa adsorpsiyon-desorpsiyon yapılarak tekrar kullanılabilirlik testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8 de görülmektedir. Tekrarlanan bu çalışmada, kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinin halen %90'ın üzerinde olması ile kapasitede önemli bir azalma olmadığı anlaşılmıştır.



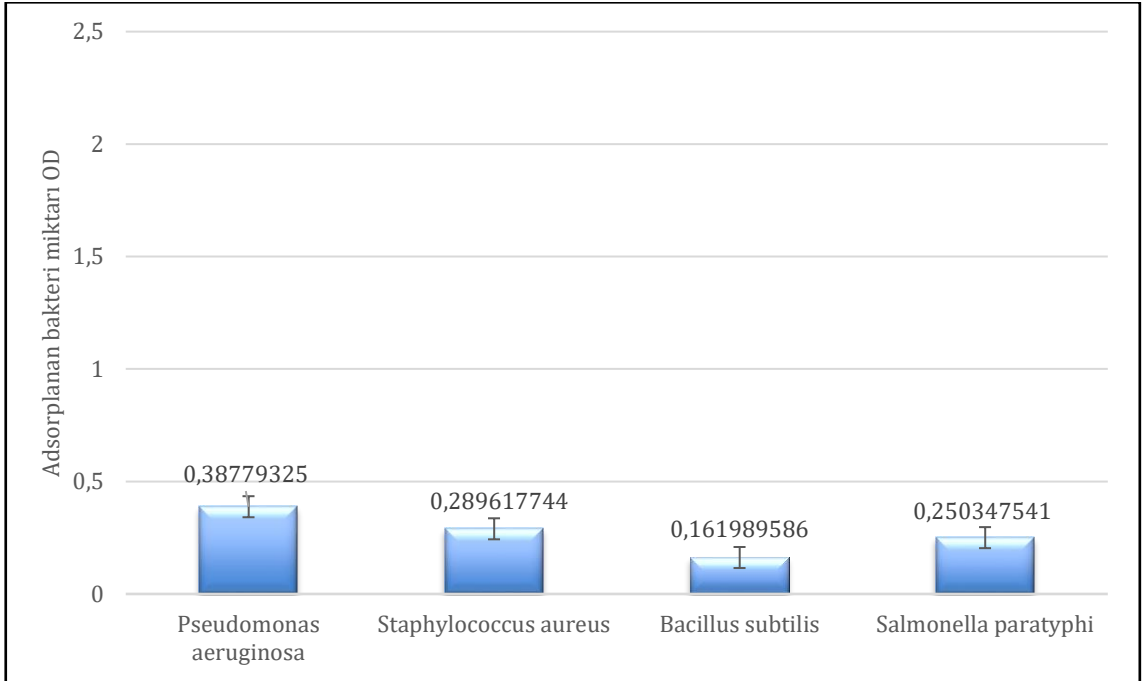
Şekil 4.8. Bakteri baskılanmış kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.

4.4. Seçicilik Çalışmaları

Seçicilik çalışması için *Pseudomonas aeruginosa* dahil dört bakteri kullanılmıştır. Diğer üç bakteri ise, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus subtilis*, *staphylococcus aureus*'dur. *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel kolonda en fazla *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi alıkonulmuştur. Diğer bakteriler arasında ise alıkonma sırası, *staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* ve en az alıkonulabilen *Bacillus subtilis* olmuştur. Gram-negatif ve çubuksu bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*, kriyojel yüzeyine yan tarafından veya uç kısmından da bağlanabilmesi ile verimli sonuç elde edilmiştir. Gram-pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* ise yuvarlak şekli ile gözeneklere tutunduğu öngörülmektedir. *Salmonella paratyphi* bakterisi gram-negatiftir, şekil olarak büyük yapıya sahip olduğundan hazırlamış olduğumuz kriyojel tarafından çok fazla alıkonulamamıştır. *Bacillus subtilis* ise gram-pozitif bakteridir, şekil olarak büyük olduğundan bizim baskılanmış kriyojelin gözeneklere tutunamamıştır.



Şekil 4.9. MIP seçicilik grafiği (Oda sıcaklığında, 2 saat, pH 7.4 PBS içerisinde).



Şekil 4.10. NIP seçicilik grafiği (Oda sıcaklığında, 2 saat, pH 7.4 PBS içerisinde).

Çizelge 4.3'te verilen seçicilik katsayısı (k) sonuçlarına göre,

MIP kriyojel kolonun *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine seçiciliği

- *Staphylococcus aureus* bakterisine göre yaklaşık 3 kat (k= 2,6)
- *Salmonella paratyphi* bakterisine göre yaklaşık 3 kat (k=2,6)
- *Bacillus subtilis* bakterilerine göre yaklaşık 6 kat (k=5,6) daha fazladır.

Bağıl seçicilik katsayısı (k') verilere göre;

- *Staphylococcus aureus* bakterisi için k'= 2,0
- *Salmonella paratyphi* bakterisi için k'= 1,7
- *Bacillus subtilis* bakterisi için k'= 2.3'tür.

Çizelge 4.3. MIP ve NIP kriyojel kolonun *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Salmonella paratyphi* bakterileri için seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları.

	Q _(mg/g) MIP	k	Q _(mg/g) NIP	k	k'
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,4	0	0,4	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,9	2,6	0,3	1,3	2,0
<i>Bacillus subtilis</i>	0,4	5,6	0,2	2,4	2,3
<i>Salmonella paratyphi</i>	0,9	2,6	0,2	1,6	1,7

4.5. Literatür Özeti

Bakteri ayrılması için moleküler baskılama temelli kriyojel membranlar geliştirilmesi ile yapılan çalışmalar ile tez kapsamında alınan sonuçlar değerlendirilmiştir. Geliştirilen tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında tez kapsamında elde edilen sonuçların uyumlu olduğu ve düşük bir tayin sınırı elde edildiği bir adsorpsiyon yaklaşımı geliştirildiği görülmektedir (Çizelge 4.4).

Zhao ve arkadaşları, 1–20 µm boyutunda, çoğunlukla 2–20 nm gözenekliliğe sahip çok-ışlevsel silika ve monomer olarak hidroksietil metakrilat ve dialildimetilamonyum klorürü donma noktasının altındaki suda yerinde kopolimerizasyon ile üreterek organik-inorganik kriyojel kompozit sunmuştur. Bu kompozit ile 17 kat spesifik yüzey alanı artırılmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı ile kriyojel kompozit bütünleştirildiğinde nükleosidlerde iyi seçicilik, 0.9-1.3 ng/mL alt tespit sınırları elde edilmiştir ve eklenmiş insan serumundan %80 üzerinde geri kazanım sağlanmıştır [115].

Bakhshpour ve arkadaşları, çalışmasında Tirozinin (Tyr) seçici bir şekilde tanınması için baskılama etkinliğini karşılaştırmak üzere birbirinden farklı iki fonksiyonel monomer ile spesifik molekül baskılanmış kriyojel kartuşları sentezlemişlerdir. Tyr-baskılanmış kriyojel kartuş (MIP1) için baskılamayı metal-şelat koordinasyonu kullanarak, Tyr-baskılanmış kriyojel kartuş (MIP2) için ise baskılamayı hidrofobik etkiler kullanarak aynı şekilde donmuş koşullar altında serbest radikal yığın polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Kriyojel kartuşlarının karakterizasyonu sonrası, akış hızı, ortamın pH değeri, başlangıç derişimleri ve sıcaklık gibi optimum koşulları belirlemişlerdir. MIP1 ve MIP2 kriyojel kartuşunun maksimum adsorpsiyon kapasitesinin pH 7.0 fosfat tamponda sırasıyla 10.6 ve 7,7 mg/g olarak hesaplanmıştır. MIP1 ve MIP2 kullanılarak elüe edilmiş Tyr için FLPC sisteminde ayrıca test etmişlerdir. Tekrarlanabilirlik deneyleri sonucu adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma gözlemlememişlerdir [116].

Bakhshpour ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında ise, poli(hidroksietil metakrilat) temelli bir immünoafinite p(HEMA-I) kriyojel kolonu sentezlemek için, siyanamid kullanarak insan immünoglobulin M (hIgM) antikorlarını saflaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre, hazırlanan bu kolonun önemli derecede kayıp olmadan 10 defadan fazla kullanılabilceğini göstermiştir. pH 5.75 [morfolino etansülfonik asit (MES tamponu)] içinde, 11.1 mg/g'ye karşılık gelen en fazla adsorbe edilmiş hIgM miktarı olmuştur [117].

Köse ve arkadaşları, adenin metakrilat (AdeM) adı verilen adenin polimerize olabilen türevini, adenin ve metakriloil klorür arasındaki yer değiştirme tepkimesi ile sentezlemişlerdir. 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) temelli kriyojeller, monomerler, AdeM ve HEMA'nın kopolimerizasyonu ile kısmen donmuş sulu bir ortamda hazırlanmış, ardından bu kriyojeller çeşitli karakterize edilmiştir. RNA adsorpsiyon deneylerini, kesikli sistemde farklı koşullarda gerçekleştirmişlerdir. Kriyojellerin yüksek RNA adsorpsiyon kapasitesini 11.86 mg/g olarak elde edip şişme oranını da yaklaşık %510 bulmuşlardır. Adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir azalma olmadan beş defadan fazla kriyojeller tekrar kullanılabilir [118].

Fariásab ve arkadaşları, cisplatin yakalama için makro gözenekli kriyojelleri, metakrilik asit ve 2-hidroksietil metakrilat ile polimerizasyon sonucu elde etmişlerdir. Bir gram kriyojel başına 150 mg'a kadar cisplatin adsorpsiyon kapasitesi ile kriyojelin çeşitli özellikleri incelenmiştir. Yapmış oldukları bu çalışmada, monomer bileşimi ile kriyojelin kapasitesi arasındaki ilişkiyi göz önüne almışlardır. Optimum kriyojel, kapasitede gözle görülür bir azalma olmaksızın sudan cisplatin uzaklaştırmak için en az 14 kez tekrar kullanılabilir [119].

Çizelge 4.4. Moleküler baskılama yöntemlerinin karşılaştırılması.

Kriyojeller	Ligandlar	Hedefler	Adsorpsiyon Kapasiteleri	Avantaj/dezavantajlar	Ref.
Organik-inorganik kriyojel kompozit	Boronik Asit	Nükleositler	0.9-1.3 ng/mL (Alt tespit sınırı)	Hafif koşullar altında sentez; yüksek yüzey alanı, basit sentez koşulları	[115]
Tirozin-baskılanmış kriyojel	Moleküler-Baskılanmış Polimer	Tirozin	10.6 mg/g (MIP1) 7.7 mg/g (MIP2)	Yüksek seçicilik ve iyi yeniden-kullanılabilirlik	[116]
Poli(Hidroksietil Metakrilat) kriyojel	Antikor	İnsan immüoglobülin M	11.1 mg/g	Yüksek özgülük ve biyouyumluluk. Yüksek-maliyet	[117]
PoliAdenin	Adenin Metakrilat	Rna	11.86 mg/g	Tek-adımlı sentez; yüksek RNA bağlama kapasiteleri, basit operasyon prosedürleri	[118]
poli(HEMA-ko-MAAc) kriyojel	İyon-Değişimi	Sis-Platin	650 mg cisplatin / g kriyojel	Yüksek hidrofilitiklik ve bağlama kapasiteleri. Seçicilik sınırlı	[119]
AG-alkin@polimer-pBA kriyojel	Boronik Asit	<i>E. Coli</i> , <i>S. Epidermidis</i>	2.15 x 10 ⁹ cfu/g (<i>E. coli</i>) 3.36 x 10 ⁹ cfu/g (<i>S. epidermidis</i>)	Yüksek ligand yoğunluğu, bakteri için yüksek bağlama kapasitesi, basit ve modüler sentez	[120]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>-baskılanmış kriyojel	Moleküler-Baskılanmış Polimer	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61.45 mg/g	Yüksek seçicilik, bakteri için yüksek bağlama kapasitesi, yeniden-kullanılabilirlik	Bu çalışma

Zheng ve arkadaşları, bakterilerin saflaştırma ve izolasyonu için boronik asit ligandlarına sahip kompozit kriyojeller sentezlemişlerdir. Mikrobiyal hücrelerin hızlı bir şekilde bağlanmasını ve salınmasını, kriyojellerin büyük ve birbirine bağlı gözenekleri sağlamıştır. Bakteriyel bağlanma kontrolü için, alkin-etiketli bir boronik asit ligandı, Cu(I)-katalizli azid-alkin siklokatalizasyon tepkimesi yoluyla azit-işlevli kriyojele konjuge edilmiştir. Boronik asit özellikli kriyojel, bakterileri pH ve basit monosakkaritler tarafından tersinir boronat ester bağlarıyla bağlamıştır. Afinite ayırma kapasitesini artırmak için, alkin-etiketli fenilboronik asidi, çoklu immobilizasyon bölgeleri sağlayan bir ara polimer tabakası yoluyla kriyojele bağlamak için yeni bir yaklaşım uygulamışlardır. Kompozit kriyojelin bağlanma kapasiteleri, *Escherichia coli* için 2.15×10^9 cfu/g ve *Staphylococcus epidermidis* için 3.36×10^9 cfu/g olarak bulunmuştur [120].

Bu tez kapsamında, ucuz maliyet ve spesifik bağlanma göz önüne alınarak moleküler baskılama temelli bir yaklaşım kullanılmıştır. Seçilen bakteri, *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Hazırlanmış olan *Pseudomonas aeruginosa*-baskılı kriyojel ile adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Derişim taraması gerçekleştirilirken, derişim arttıkça *Pseudomonas aeruginosa*-baskılı kriyojelde *Pseudomonas aeruginosa* için alıkonmanın arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda 61.45 mg/g adsorpsiyon kapasitesi hesaplanmıştır. Seçicilik deneyleri için, en yüksek *Pseudomonas aeruginosa* kriyojelde alıkonmuştur. Tekrar kullanılabilirlik açısından 10 defa test tekrarlanmıştır.

5. YORUM

- ❖ Bu çalışmada, ilk aşamada MAH amino asit temelli fonksiyonel monomer, metal-şelat koordinasyonunun sağlanması için Cu (II) iyonu ve *Pseudomonas aeruginosa* aynı ortamda karıştırılarak ön-kompleks oluşumu sağlanmıştır. Ardından bu ön-kompleks içerisine, HEMA monomeri ile MBAAm çapraz bağlayıcısı katılmıştır. APS ve TEMED serbest radikal başlatıcıları da ilave edilerek bir gün boyunca suyun donma sıcaklığı altında *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel kolon, seçici adsorpsiyon çalışmaları için sentezlenmiştir.
- ❖ P(HEMA-MAH) *Pseudomonas aeruginosa*-NIP (a) ve P(HEMA-MAH) *Pseudomonas aeruginosa*-MIP (b) kriyojel membranlarının FTIR spektrumu karakterize edilmiştir. Her iki spektrum da incelendiğinde *Pseudomonas aeruginosa*-NIP için 1719, 1649 cm^{-1} 'de ve *Pseudomonas aeruginosa*-MIP için 1711, 1641 cm^{-1} 'de amit bantları görülmüştür. 2991–2939 ve 2913–2849 cm^{-1} değeri sırasıyla (a) ve (b) kriyojel membranlarındaki aromatik ve alifatik C–H germe bantlarına karşılık gelir. 3376 ve 3372 cm^{-1} bölgesinde bulunan geniş bantlar, (a) ve (b) kriyojel membranlarındaki HEMA'nın O–H germe bantlarına karşılık gelir. Spektrumdaki amit bantları, metal-şelatlayıcı fonksiyonel monomerlerin (a) ve (b) kriyojel membranlarının yapısına dahil edildiğini göstermektedir.
- ❖ SEM ile karakterizyon sağlanmıştır. NIP ve MIP kriyojelinin farklı kısımlarından ve farklı μm ölçeklendirmesi ile elde edilen görüntülere göre, iki kriyojel kolon arasında morfolojik olarak fazla farklılık bulunmamaktadır. MIP üzerinde baskılanmış bakteri boşluklarına tutunan *Pseudomonas aeruginosa*'nın varlığı da açıkça görülmektedir.

- ❖ *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel (MIP) için sıcaklık azaldıkça makrogözeneklilik ve şişme yüzde değerinin arttığı verisi elde edilmiştir. Makrogözeneklilik ve şişme için yüzde değerlerinin doğru orantılı olarak değiştiği, sırasıyla, 4 °C'de %383 ve %51, oda koşullarında %324 ve %21, yaklaşık 37°C'de %280 ve %0 sonuçları ile desteklenmiştir. Bu üç sıcaklık arasında en yüksek değerin, donma noktasında bulunduğu görülmüştür. Bunun sebebinin sıcaklık arttıkça, yapı ile bakteri arasındaki etkileşimin azalmasıdır.
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojel (MIP) ile farklı derişimler için adsorpsiyon çalışması yapılmıştır. UV-Vis (ultraviyole-görünür bölge) cihazı ile 600 nm'de alınan ölçümler sonucu, *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi için derişimin artmasıyla absorbans değerinin arttığı cihazdan okunmuştur. Ancak *Pseudomonas aeruginosa*'nın kriyojel üzerinde bağlanabileceği boşlukları doldurması nedeniyle, yüksek derişimlerde absorbans değerlerinin birbirine yaklaştığı ve grafik üzerinde platoya ulaşp dengelendiği görülmüştür.
- ❖ Adsorpsiyon izoterm verileri bir adsorpsiyonun “tercihli” veya “tercihsiz” olması konusunda bilgi vermektedir. İzoterm modellerinden, Langmuir ve Freundlich izotermi kullanılmıştır. Langmuir adsorpsiyon izotermi boyutsuz ayırma faktörü veya denge parametresi olan R_L değerinin, $0 < R_L < 1$ olarak bulunmasıyla, Langmuir izotermine göre adsorpsiyonun tercihli olduğu görülmüştür. Bir diğer kullanılan adsorpsiyon izotermi, Freundlich izotermidir. İzotermde $1/n$ değeri sistemin heterojenliğini ifade etmektedir. Langmuir izotermine aksine Freundlich izotermi tek tabaka adsorpsiyonu ile sınırlı değildir. n değerinin bire yaklaşması daha homojen bir sistemi, sıfıra yaklaşması ise heterojen bir sistemi ifade etmektedir. Eğim $1/n$ değeri, 0.69 olarak bulunmuştur.

- ❖ *Pseudomonas aeruginosa*-baskılanmış kriyojelde, aynı derişimde hazırlanmış *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi için yeniden kullanılabilirlik deneyi yapılmıştır. Adsorpsiyon ve desorpsiyon deneyleri 10 kez gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, kullanılmış olan aynı kriyojel kolonun %90 üzerinde verimli bir şekilde kullanabildiğini göstermektedir.

- ❖ Seçicilik çalışması için kullanılmış olan baskılanmış kriyojel kolon, basillus formundaki gram-negatif bakteri *Pseudomonas aeruginosa* içindir. Çalışma için seçilmiş olan diğer üç bakteri ise gram-negatif *Salmonella paratyphi*, gram-pozitif *Bacillus subtilis* ve gram-pozitif *staphylococcus aureus*'dur. Elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas aeruginosa*'dan sonra ikinci en fazla tutulan yuvarlak şekle sahip olması nedeniyle *staphylococcus aureus*; üçüncü sırada, büyük yapıya sahip olduğu için çok fazla gözeneklere tutunamayan *Salmonella paratyphi* ve en az tutunmuş olan *Bacillus subtilis* olmuştur. Tüm bakterilerin şekilleri ve boyutlarının bu deneyde önemli olduğu görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- [1] World Health Organization, WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed, *Saudi Med J.* 38 (2017) 444–445. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Erişim tarihi: **6 Nisan 2023**).
- [2] N. Bereli, H. Yavuz, A. Denizli, Protein chromatography by molecular imprinted cryogels, *J Liq Chromatogr Relat Technol.* (2020) 657–670.
- [3] C.K. Stover, X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrener, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalk, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K.S. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Relzer, M.H. Saler, R.E.W. Hancock, S. Lory, M. V. Olson, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature.* 406 (2000) 959–964.
- [4] S.K. Remold, C.K. Brown, J.E. Farris, T.C. Hundley, J.A. Perpich, M.E. Purdy, Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes, *Microb Ecol.* 62 (2011) 505–517.
- [5] C.A. Hendrie, Naloxone-sensitive hyperalgesia follows analgesia induced by morphine and environmental stimulation, *Pharmacol Biochem Behav.* 32 (1989) 961–966.
- [6] A. Shariati, T. Azimi, A. Ardebili, A.S. Chirani, A. Bahramian, A. Pormohammad, M. Sadredinamin, S. Erfanimanesh, N. Bostanghadiri, S. Shams, A. Hashemi, Insertional inactivation of *oprD* in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran, *New Microbes New Infect.* 21 (2018) 75–80.
- [7] C.A.S. Ito, L. Bail, L.N.V.S. Arend, K. da S. Nogueira, F.F. Tuon, The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Dis.* 53 (2021) 386–389.
- [8] K.O. Kalluf, L.N. Arend, T.E. Wuicik, M. Pilonetto, F.F. Tuon, Molecular epidemiology of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil, *Infection, Genetics and Evolution.* 49 (2017) 130–133.

- [9] G.P. Ramos, J.L. Rocha, F.F. Tuon, Seasonal humidity may influence *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired infection rates, *International Journal of Infectious Diseases*. 17 (2013) e757–e761.
- [10] F.F. Tuon, L.W. Gortz, J.L. Rocha, Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 16 (2012) 351–356.
- [11] F.F. Tuon, L.R. Dantas, P.H. Suss, V.S. Tasca Ribeiro, Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review, *Pathogens*. 11 (2022) 300.
- [12] M. del M. Cendra, E. Torrents, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime, *Biotechnol Adv*. 49 (2021) 107734.
- [13] M.I. Gómez, A. Prince, Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis, *Curr Opin Pharmacol*. 7 (2007) 244–251.
- [14] M. Wu, X. Li, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, in: *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2014: pp. 1547–1564.
- [15] L.A. Robertson, R. Cornelisse, P. De Vos, R. Hadjoetomo, J.G. Kuenen, Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 56 (1989) 289–299.
- [16] M. Caldara, R.S. Friedlander, N.L. Kavanaugh, J. Aizenberg, K.R. Foster, K. Ribbeck, Mucin biopolymers prevent bacterial aggregation by retaining cells in the free-swimming state, *Current Biology*. 22 (2012) 2325–2330.
- [17] T.N. Nazina, D.S. Sokolova, N.M. Shestakova, A.A. Grigoryan, E.M. Mikhailova, T.L. Babich, A.M. Lysenko, T.P. Tourova, A.B. Poltarau, T. Feng, F. Ni, S.S. Belyaev, The phylogenetic diversity of aerobic organotrophic bacteria from the Dagan high-temperature oil field, *Mikrobiologiya*. 74 (2005) 401–409.
- [18] K. Kanthakumar, G. Taylor, K.W.T. Tsang, D.R. Cundell, A. Rutman, S. Smith, P.K. Jeffery, P.J. Cole, R. Wilson, Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro, *Infect Immun*. 61 (1993) 2848–2853.
- [19] A. Bashir, J.S. Brown, *Pseudomonas aeruginosa*, in: *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, Second Edition, Elsevier, 2021: pp. 14–22.

- [20] L. Ma, K.D. Jackson, R.M. Landry, M.R. Parsek, D.J. Wozniak, Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment, *J Bacteriol.* 188 (2006) 8213–8221.
- [21] P. Hinterdorfer, Y.F. Dufrêne, Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy, *Nature Methods* 3 (2006) 347–355.
- [22] L. Ye, K. Mosbach, Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors, *Chemistry of Materials.* 20 (2008) 859–868.
- [23] G. Wulff, A. Sarhan, Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung, *Angewandte Chemie.* 84 (1972) 364–364.
- [24] I.A. Nicholls, J.P. Rosengren, Molecular imprinting of surfaces, *Bioseparation.* 10 (2001) 301–305.
- [25] M. Singh, V.K. Rai, A. Rai, eds., *Nanocomposite Materials for Sensors*, Bentham Science Publishers Ltd., 2022.
- [26] A. Denizli, *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications*, 2021.
- [27] V. Pichon, N. Delaunay, A. Combès, Sample Preparation Using Molecularly Imprinted Polymers, *Anal Chem.* 92 (2020) 16–33.
- [28] T. Pap, V. Horváth, G. Horvai, Molecularly imprinted polymers for analytical chemistry, *Chem Analityczna.* 50 (2005) 129–137.
- [29] L. Chen, S. Xu, J. Li, Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chemical Society Reviews.* 40 (2011) 2922–2942.
- [30] J.J. Belbruno, Molecularly Imprinted Polymers, *Chem Rev.* 119 (2019) 94–119.
- [31] S. Xu, H. Lu, X. Zheng, L. Chen, Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers: versatile functional materials, *J Mater Chem C Mater.* 1 (2013) 4406.
- [32] G. Wulff, A. Sarhan, K. Zabrocki, Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates, *Tetrahedron Lett.* 14 (1973) 4329–4332.

- [33] G. Wulff, A. Sarhan, K. Zabrocki, Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates, *Tetrahedron Lett.* 14 (1973) 4329–4332.
- [34] H. Yan, H.R. Kyung, Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *Int J Mol Sci.* 7 (2006) 155–178.
- [35] C. Dong, H. Shi, Y. Han, Y. Yang, R. Wang, J. Men, Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique, *Eur Polym J.* 145 (2021) 110231.
- [36] G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature.* 361 (1993) 645–647.
- [37] L. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 5211–5214.
- [38] J. Zhou, X. He, Y. Li, An acrylamide-based molecularly imprinted polymer for the efficient recognition of optical amino acid hydantoins, *Analytical Communications.* 36 (1999) 243–246.
- [39] T. Takagishi, A. Hayashi, N. Kuroki, Cross-linked polyvinylpyrrolidones with increased affinity and specificity for methyl orange and its homologs, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition.* 20 (1982) 1533–1547.
- [40] K. Sreenivasan, On the feasibility of using molecularly imprinted poly (Hema) as a sensor component, *Talanta.* 44 (1997) 1137–1140.
- [41] 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, *Journal of Molecular Recognition.* 19 (2006) 106–180.
- [42] J. Svenson, J.G. Karlsson, I.A. Nicholls, ¹H Nuclear magnetic resonance study of the molecular imprinting of (-)-nicotine: Template self-association, a molecular basis for cooperative ligand binding, *J Chromatogr A.* 1024 (2004) 39–44.
- [43] B. Ekberg, K. Mosbach, Molecular imprinting: A technique for producing specific separation materials, *Trends Biotechnol.* 7 (1989) 92–96.
- [44] P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 804 (2004) 173–182.

- [45] B. Sellergren, A.J. Hall, *Molecularly Imprinted Polymers*, in: *Supramol Chem*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2012**.
- [46] B. Claude, P. Morin, S. Bayouhd, J. de Ceaurriz, Interest of molecularly imprinted polymers in the fight against doping. Extraction of tamoxifen and its main metabolite from urine followed by high-performance liquid chromatography with UV detection, *J Chromatogr A*. 1196–1197 (**2008**) 81–88.
- [47] S.E. Elugoke, A.S. Adekunle, O.E. Fayemi, E.D. Akpan, B.B. Mamba, E.-S.M. Sherif, E.E. Ebenso, Molecularly imprinted polymers (MIPs) based electrochemical sensors for the determination of catecholamine neurotransmitters – Review, *Electrochemical Science Advances*. 1 (**2021**) e2000026.
- [48] J.R. Qu, J.J. Zhang, Y.F. Gao, H. Yang, Synthesis and utilisation of molecular imprinting polymer for clean-up of propachlor in food and environmental media, *Food Chem*. 135 (**2012**) 1148–1156.
- [49] C.R. Teixeira Tarley, L.T. Kubota, Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry, *Anal Chim Acta*. 548 (**2005**) 11–19.
- [50] B.B. Prasad, S. Fatma, One MoNomer doubly imprinted dendrimer nanofilm modified pencil graphite electrode for simultaneous electrochemical determination of norepinephrine and uric acid, *Electrochim Acta*. 232 (**2017**) 474–483.
- [51] C. Dong, H. Shi, Y. Han, Y. Yang, R. Wang, J. Men, Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique, *Eur Polym J*. 145 (**2021**) 110231.
- [52] T.P. Huynh, C. Bikram K.C., W. Lisowski, F. D'Souza, W. Kutner, Molecularly imprinted polymer of bis(2,2'-bithienyl)methanes for selective determination of adrenaline, *Bioelectrochemistry*. 93 (**2013**) 37–45.
- [53] Á. Valero-Navarro, M. Gómez-Romero, J.F. Fernández-Sánchez, P.A.G. Cormack, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties, *J Chromatogr A*. 1218 (**2011**) 7289–7296.

- [54] S. Fatma, B.B. Prasad, S. Jaiswal, R. Singh, K. Singh, Electrochemical simultaneous analysis of dopamine and epinephrine using double imprinted One MoNomer acryloylated graphene oxide-carbon black composite polymer, *Biosens Bioelectron.* 135 (2019) 36–44.
- [55] K. Haupt, K. Mosbach, Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chem Rev.* 100 (2000) 2495–2504.
- [56] L.J. Eggermont, Z.J. Rogers, T. Colombani, A. Memic, S.A. Bencherif, Injectable Cryogels for Biomedical Applications, *Trends Biotechnol.* 38 (2020) 418–431.
- [57] V.I. Lozinsky, Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: Preparation, properties and application, *Usp Khim.* 71 (2002) 579–584.
- [58] V.I. Lozinsky, I.Y. Galaev, F.M. Plieva, I.N. Savina, H. Jungvid, B. Mattiasson, Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 445–451.
- [59] O. Okay, *Polymeric Cryogels*, Springer International Publishing, Cham, 2014.
- [60] V.I. Lozinsky, S.A. Morozova, E.S. Vainerman, E.F. Titova, M.I. Shtil’Man, E.M. Belavtseva, S. V. Rogozhin, Study of cryostructurization of polymer systems. VIII. Characteristic features of the formation of crosslinked poly(acryl amide) cryogels under different thermal conditions, *Acta Polymerica.* 40 (1989) 8–15.
- [61] V.I. Lozinsky, E.S. Vainerman, L. V. Domotenko, A.M. Mamtsis, E.F. Titova, E.M. Belavtseva, S. V. Rogozhin, Study of cryostructurization of polymer systems VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions, *Colloid Polym Sci.* 264 (1986) 19–24.
- [62] V.I. Lozinsky, E.S. Vainerman, G.F. Korotaeva, S. V. Rogozhin, Study of cryostructurization of polymer systems, *Colloid Polym Sci.* 262 (1984) 617–622.
- [63] V.I. Lozinsky, E.S. Vainerman, S.A. Ivanova, E.F. Titova, M.I. Shtil’man, E.M. Belavtseva, S. V. Rogozhin, Study of cryostructurization of polymer systems. VI. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels, *Acta Polymerica.* 37 (1986) 142–146.

- [64] E.S. Vainerman, V.I. Lozinsky, S. V. Rogozhin, Study of cryostructurization of polymer systems, *Colloid Polym Sci.* 259 (1981) 1198–1201.
- [65] V.I. Lozinsky, N.G. Faleev, A.L. Zubov, S.B. Ruvinov, T. V. Antonova, E.S. Vainerman, V.M. Belikov, S. V. Rogozhin, Use of PVA-cryogel entrapped *Citrobacter intermedius* cells for continuous production of 3-fluoro-L-tyrosine, *Biotechnol Lett.* 11 (1989) 43–48.
- [66] A. Kumar, ed., *Supermacroporous Cryogels*, CRC Press, 2016.
- [67] Y. Saylan, A. Denizli, Supermacroporous composite cryogels in biomedical applications, *Gels.* 5 (2019) 20.
- [68] A. Kumar, V. Bansal, J. Andersson, P.K. Roychoudhury, B. Mattiasson, Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation: Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line, *J Chromatogr A.* 1103 (2006) 35–42.
- [69] G. Ertürk, B. Mattiasson, Cryogels-versatile tools in bioseparation, *J Chromatogr A.* 1357 (2014) 24–35.
- [70] 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 (Weinh).* 2 (2019) 1800114.
- [71] P.A. Shiekh, A. Singh, A. Kumar, Oxygen-Releasing Antioxidant Cryogel Scaffolds with Sustained Oxygen Delivery for Tissue Engineering Applications, *ACS Appl Mater Interfaces.* 10 (2018) 18458–18469.
- [72] 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.
- [73] V.I. Lozinsky, A brief history of polymeric cryogels, *Advances in Polymer Science.* 263 (2014) 1–48.
- [74] S. Thönes, L.M. Kutz, S. Oehmichen, J. Becher, K. Heymann, A. Saalbach, W. Knolle, M. Schnabelrauch, S. Reichelt, U. Anderegg, New E-beam-initiated hyaluronan acrylate cryogels support growth and matrix deposition by dermal fibroblasts, *Int J Biol Macromol.* 94 (2017) 611–620.

- [75] I.N. Savina, G.C. Ingavle, A.B. Cundy, S. V. Mikhalovsky, A simple method for the production of large volume 3D macroporous hydrogels for advanced biotechnological, medical and environmental applications, *Sci Rep.* 6 (2016) 1–9.
- [76] 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.
- [77] F.M. Plieva, 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.
- [78] S. Muslumova, B. Yetiskin, O. Okay, Highly stretchable and rapid self-recoverable cryogels based on butyl rubber as reusable sorbent, *Gels.* 5 (2019) 1.
- [79] M. Razavi, Y. Qiao, A.S. Thakor, Three-dimensional cryogels for biomedical applications, *J Biomed Mater Res A.* 107 (2019) 2736–2755.
- [80] J. Wolfe, G. Bryant, K.L. Koster, What is “unfreezable water”, how unfreezable is it and how much is there?, *Cryo-Letters.* 23 (2002) 157–166.
- [81] A. Kumar, R. Mishra, Y. Reinwald, S. Bhat, Cryogels: Freezing unveiled by thawing, *Materials Today.* 13 (2010) 42–44.
- [82] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation.* 10 (2001) 163–188.
- [83] R. Qu, W. Zhang, N. Liu, Q. Zhang, Y. Liu, X. Li, Y. Wei, L. Feng, Antioil Ag₃PO₄ Nanoparticle/Polydopamine/Al₂O₃ Sandwich Structure for Complex Wastewater Treatment: Dynamic Catalysis under Natural Light, *ACS Sustain Chem Eng.* 6 (2018) 8019–8028.
- [84] L. García-Uriostegui, E. Delgado, H.I. Meléndez-Ortiz, T.A. Camacho-Villegas, H. Esquivel-Solís, P. Gatenholm, G. Toriz, Spruce xylan/HEMA-SBA15 hybrid hydrogels as a potential scaffold for fibroblast growth and attachment, *Carbohydr Polym.* 201 (2018) 490–499.
- [85] I. Perçin, E. Aksöz, A. Denizli, Gelatin-immobilised poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for affinity purification of fibronectin, *Appl Biochem Biotechnol.* 171 (2013) 352–365.

- [86] G. Bayrak, I. Perçin, A. Kılıç Süloğlu, A. Denizli, Amino acid functionalized macroporous gelatin cryogels: Characterization and effects on cell proliferation, *Process Biochemistry*. 110 (2021) 100–109.
- [87] T. Matsui, H. Ichikawa, T. Fujita, T. Takagi, M. Osada-Oka, Y. Minamiyama, Histidine deficiency attenuates cell viability in rat intestinal epithelial cells by apoptosis via mitochondrial dysfunction, *J Nutr Intermed Metab*. 8 (2017) 21–28.
- [88] A.L.M.C. da Cunha, A.C.P. Osorio, C.A.T. Toloza, J.M.S. Almeida, S. Khan, R.Q. Aucélio, Determination of varenicline after photochemical fluorescence enhancement using spectrofluorimetry and high-performance liquid chromatography, *Microchemical Journal*. 144 (2019) 172–179.
- [89] M. Safaei, M.R. Shishehbore, A review on analytical methods with special reference to electroanalytical methods for the determination of some anticancer drugs in pharmaceutical and biological samples, *Talanta*. 229 (2021) 122247.
- [90] S.J. Gerberding, C.H. Byers, Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey, *J Chromatogr A*. 808 (1998) 141–151.
- [91] D.L. Pavia, *Introduction to Organic Laboratory Techniques*, Thomson Brooks/Cole, 2006.
- [92] H. Lewis, C. Moody, *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice*, (1989) 159–173.
- [93] W.J. Koros, Y.H. Ma, T. Shimidzu, Terminology for membranes and membrane processes (IUPAC Recommendations 1996), *Pure and Applied Chemistry*. 68 (1996) 1479–1489.
- [94] E.A. Mason, L.A. Viehland, Statistical-mechanical theory of membrane transport for multicomponent systems: Passive transport through open membranes, *J Chem Phys*. 68 (1977) 3562–3573.
- [95] R.W. Baker, *Membrane Technology and Applications*, John Wiley and Sons, 2012.
- [96] M.M.L. Aerts, A.C. Hogenboom, U.A.T. Brinkman, Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 667 (1995) 1–40.

- [97] R. Muñoz-Olivas, Screening analysis: An overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 23 (2004) 203–216.
- [98] I. Choma, The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis, *LC GC Eur*. 18 (2005) 482–488.
- [99] C. Weins, H. Jork, Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography, *J Chromatogr A*. 750 (1996) 403–407.
- [100] G. Eberz, H.G. Rast, K. Burger, W. Kreiss, C. Weisemann, Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling, *Chromatographia*. 43 (1996) 5–9.
- [101] W. Brack, Effect-directed analysis: A promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?, *Anal Bioanal Chem*. 377 (2003) 397–407.
- [102] G. Morlock, W. Schwack, Hyphenations in planar chromatography, *J Chromatogr A*. 1217 (2010) 6600–6609.
- [103] I.M. Choma, E.M. Grzelak, Bioautography detection in thin-layer chromatography, *J Chromatogr A*. 1218 (2011) 2684–2691.
- [104] T. Takeuchi, G. Chen, K. Haupt, Introduction to New era in advanced functional materials emerging from molecular imprinting and related techniques, *J Mater Chem B*. 10 (2022) 6570.
- [105] S. Akgöl, D. Türkmen, A. Denizli, Cu(II)-incorporated, histidine-containing, magnetic-metal-complexing beads as specific sorbents for the metal chelate affinity of albumin, *J Appl Polym Sci*. 93 (2004) 2669–2677.
- [106] R. Gopinathan, A. Bhowal, C. Garlapati, Thermodynamic study of some basic dyes adsorption from aqueous solutions on activated carbon and new correlations, *Journal of Chemical Thermodynamics*. 107 (2017) 182–188.
- [107] G.K. Rajahmundry, C. Garlapati, P.S. Kumar, R.S. Alwi, D.V.N. Vo, Statistical analysis of adsorption isotherm models and its appropriate selection, *Chemosphere*. 276 (2021) 130176.

- [108] A. Günay, E. Arslankaya, I. Tosun, Lead removal from aqueous solution by natural and pretreated clinoptilolite: adsorption equilibrium and kinetics, *J Hazard Mater.* 146 (2007) 362–371.
- [109] I. Langmuir, The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids, *J Am Chem Soc.* 39 (1917) 1848–1906.
- [110] H. Freundlich, Über die Adsorption in Lösungen, *Zeitschrift Für Physikalische Chemie.* 57U (1907) 385–470.
- [111] R.A. Koble, T.E. Corrigan, Adsorption isotherms for pure hydrocarbons, *Ind Eng Chem.* 44 (1952) 383–387.
- [112] K. Vijayaraghavan, T.V.N. Padmesh, K. Palanivelu, M. Velan, Biosorption of nickel(II) ions onto *Sargassum wightii*: Application of two-parameter and three-parameter isotherm models, *J Hazard Mater.* 133 (2006) 304–308.
- [113] R. Sips, Combined form of Langmuir and Freundlich equations, *J Chem Phys.* 16 (1948) 490–495.
- [114] N. Ayawei, A.N. Ebelegi, D. Wankasi, Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms, *J Chem.* (2017).
- [115] S. Zhao, Y. Zou, Y. Wang, H. Zhang, X. Liu, Organized cryogel composites with 3D hierarchical porosity as an extraction adsorbent for nucleosides, *J Sep Sci.* 42 (2019) 2140–2147.
- [116] M. Bakhshpour, I. Göktürk, N. Bereli, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel cartridges for the selective recognition of tyrosine, *Biotechnol Prog.* 36 (2020) e3006.
- [117] M. Bakhshpour, A.A. Topcu, N. Bereli, H. Alkan, A. Denizli, Poly(Hydroxyethyl methacrylate) immunoaffinity cryogel column for the purification of human immunoglobulin M, *Gels.* 6 (2020) 4.
- [118] K. Köse, K. Erol, E. Özgür, L. Uzun, A. Denizli, PolyAdenine cryogels for fast and effective RNA purification, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 146 (2016) 678–686.

- [119] T. Fariás, S. Hajizadeh, L. Ye, Cryogels with high cisplatin adsorption capacity: Towards removal of cytotoxic drugs from wastewater, *Sep Purif Technol.* 235 (2020) 116203.
- [120] H. Zheng, S. Hajizadeh, H. Gong, H. Lin, L. Ye, Preparation of Boronic Acid-Functionalized Cryogels Using Modular and Clickable Building Blocks for Bacterial Separation, *J Agric Food Chem.* 69 (2021) 135–145.

EKLER