

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARA YÖNELİK  
KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MESBAHULDİN MESBAH

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2024

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI



BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARA YÖNELİK  
KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MESBAHULDİN MESBAH

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2024

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**MESBAHULDIN MESBAH**

## ÖZET

**BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARA YÖNELİK  
KRIYOJELLERİN HAZIRLANMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MESBAHULDİN MESBAH  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ KORAY ŞARKAYA)  
DENİZLİ, AĞUSTOS - 2024**

Sunulan bu tez çalışmasında metal şelatlaştırıcı ligand immobilize edilmiş kriyojeller hazırlandı, fiziksel ve kimyasal olarak karakterize edildikten sonra çeşitli uygulamalardaki performansı incelendi. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak poli(HEMA-GMA) kriyojelleri sentezlendi. Sonrasında ise bu kriyojeller metal şelatlaştırıcı özellikli N-Vinil formamit ligandı ile fonksiyonlandırılarak, metal iyonları ile koordinasyona uygun hale getirildi. Bu aşamadan sonra polimerik kriyojeller ilk olarak bakır ve çinko iyonları ile yüklendi. İmmobilize metal afinite temelli kriyojel kolonların (poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup>) kromatografik performansı BSA proteini adsorpsiyonu ve sonrasında sulu çözeltilisinden saflaştırılması şeklinde incelendi. Saflık testinde SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi. Bir diğer uygulamada ise bu kez kriyojellerin içerisinde farklı yöntemler ile gümüş partikülleri büyütülmesi yöntemi ile kriyojellere antibakteriyel özelliklerinin geliştirilmesi amaçlandı. Gümüş partikül içerikli kompozit poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojelleri *E. Coli* ve *B. Subtilis* karşısında antibakteriyel teste tabi tutuldu. Sonuç olarak gümüş partikül içeren kriyojellerin antibakteriyel performansının, poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojellerine göre geliştirildiği tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda tez çalışması kapsamında hazırlanan kriyojellerin böylece çeşitli biyoteknolojik yönleri değerlendirilmiş oldu.

**ANAHTAR KELİMELER:** Kriyojel, N-Vinil formamit, Sığır Serum Albumin, Adsorpsiyon, Antibakteriyel,

## ABSTRACT

**CRYOGELS FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS**  
**MSC THESIS**  
**MESBAHULDIN MESBAH**  
**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**  
**CHEMISTRY**

**(SUPERVISOR: ASST. PROF. KORAY ŞARKAYA)**

**DENİZLİ, AUGUST 2024**

In this thesis, metal chelating ligand immobilized cryogels were prepared, physically and chemically characterized, and their performance in various applications was examined. For this purpose, poly(HEMA-GMA) cryogels were synthesized, firstly. Then, these cryogels were functionalized with metal chelating N-Vinyl formamide ligand and made suitable for coordination with metal ions. After this stage, polymeric cryogels were first loaded with copper and zinc ions. The chromatographic performance of immobilized metal affinity-based cryogel columns (poly(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> and poly(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup>) was examined as BSA protein adsorption and then purification from aqueous solution. SDS-PAGE analysis was performed using a purity test. Another application, this time, was aimed at developing the antibacterial properties of cryogels by growing silver particles in cryogels with different methods. Composite poly(HEMA-GMA)-NVF cryogels containing silver particles were subjected to antibacterial tests against *E.Coli* and *B.Subtilis*. As a result, it was determined that the antibacterial performance of cryogels containing silver particles was improved compared to poly(HEMA-GMA)-NVF cryogels. In line with these results, various biotechnological aspects of the cryogels prepared within the scope of the thesis study were thus evaluated.

**KEYWORDS:** Hydrogels, Cryogels, Hemoglobin, Adsorption, Affinity Chromatography

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
Sayfa .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. POLİMERİK JELLER.....	4
2.1 Jeller .....	4
2.2 Hidrojeller .....	5
2.2.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması .....	5
2.2.2 Hidrojellerin Uygulama Alanları .....	7
2.3 Kriyojeller .....	8
2.3.1 Kriyojellerin Hazırlanması .....	9
2.3.2 Kriyojellerin Hazırlanmasında Kullanılan Öncüller ve İşlevleri ..	10
2.3.3 Kriyojellerin Fiziksel Özellikleri .....	11
2.3.4 Kriyojellerin Fiziksel Yapısını Etkileyen Faktörler .....	13
2.3.4.1 Polimer Derişimi.....	14
2.3.4.2 Polimerizasyon Sıcaklığı.....	14
2.3.4.3 Soğutma Hızı .....	14
2.3.5 Kriyojellerin Kullanım Alanları.....	15
2.3.5.1 Kriyojellerin Biyomedikal Uygulamaları .....	16
2.3.5.2 Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü .....	16
2.3.5.3 Salım Sistemleri.....	17
2.3.5.4 Biyoayırma ve Saflaştırma .....	18
3. KROMATOĞRAFI.....	20
3.1 Kromatografi Yöntemlerinin Sınıflandırılması .....	20
3.1.1 Afinite Kromatografisi .....	21
3.1.1.1 Afinite Kromatografisinin Uygulanışı .....	22
3.1.2 Afinite Kromatografisi Yöntem Çeşitleri .....	23
3.1.2.1 İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi .....	23
4. SIĞIR SERUM ALBUMİN .....	26
4.1 Sığır Serum Albuminin Yapısal Özellikleri .....	26
4.2 Sığır Serum Albuminin Biyolojik Fonksiyonları .....	27
4.3 Sığır Serum Albumin ile Metal Komplekslerin Etkileşimi .....	28
4.4 Sığır Serum Albuminin Kullanımı .....	29
5. ANTİMİKROBİYAL JELLER.....	30
5.1 Hidrojellerin Antibakteriyel Mekanizması .....	31
5.2 Kriyojellerin Antibakteriyel Aktivitesi .....	32
6. DENEYSEL BÖLÜM .....	33
6.1 Kimyasal Reaktifler .....	33
6.2 Kriyojellerin Hazırlanması .....	33

6.3	Metlal Şelatlaştıracı Ligand İmmobilizasyonu ve Metal İyonu Yüklemeesi .....	34
6.4	Kriyojellerin Karakterizasyonu .....	34
6.4.1	Kriyojellerin Fiziksel Karakterizasyonu .....	34
6.4.1.1	Jelleşme Verimi .....	34
6.4.1.2	Su Tutma Davranışları .....	35
6.4.1.3	Kriyojellerin Mekanik Dayanıklılık Testi .....	35
6.4.1.4	Kriyojellerin Yoğunluklarının Tespiti .....	36
6.5	Kriyojellerin Kimyasal Karakterizasyonu.....	36
6.5.1	FTIR-ATR Analizi .....	36
6.5.2	Yüzey ve Gözenek Morfolojisi .....	36
6.5.3	Elementel Analiz .....	36
6.5.4	Termogravimetrik Analiz .....	37
6.6	Kriyojellerin Adsorpsiyon Performansı.....	37
6.7	Desorpsiyon- Tekrar Kullanılabilir Çalışmaları.....	38
6.8	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE) Görüntüleme.....	39
6.9	Antibakteriyel Çalışması.....	39
6.9.1	Antibakteriyel Kriyojellerin Hazırlanması .....	39
6.9.2	Antibakteriyel Çalışma Yöntemi.....	40
6.10	İstatiksel Analiz .....	41
<b>7.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>42</b>
7.1	Kriyojellerin Hazırlanması .....	42
7.2	Kriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları .....	43
7.3	Kriyojellerin Adsorpsiyon Sonuçları.....	49
7.3.1	BSA Kalibrasyon Eğrileri .....	50
7.3.2	pH Etkisi .....	51
7.3.3	Akış Hızı Etkisi .....	52
7.3.4	Başlangıç Derişimi Etkisi .....	53
7.3.5	İyonik Şiddet (Tuz ) Etkisi.....	54
7.4	Adsorpsiyon İzotermi .....	55
7.5	SDS-PAGE Analizi .....	59
7.6	Desorpsiyon-Tekrar Kullanılabilirlik .....	60
7.7	Antibakteriyel Test Sonuçları.....	61
7.7.1	poli(HEMA-GMA)-NVF-Ag NP Kriyojellerin Karakterizasyonu	61
7.7.2	poli(HEMA-GMA)-NVF-Ag-Serisi kriyojellerin Antibakteriyel Performansı .....	65
<b>8.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>92</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 2.1:</b> Afinite saflaştırmasının şematik gösterimi.....	4
<b>Şekil 2.2:</b> Afinite kromatografi sistemlerinin kullanılan immobilize liganda göre sınıflandırılması.....	7
<b>Şekil 2.3:</b> Kriyojellerin hazırlanma aşamaları.....	10
<b>Şekil 2.4:</b> Sıcaklık ve soğutma hızının buz kristallerinin boyutuna ve sayısına etkisi.....	15
<b>Şekil 2.5:</b> Kriyojellerin biyoteknolojik uygulamaları.....	19
<b>Şekil 3.1:</b> Afinite kromatografisi genel prensibi.....	24
<b>Şekil 4.1:</b> BSA'nın üç boyutlu yapısı.....	27
<b>Şekil 6.1:</b> Adsorpsiyon çalışmalarının yürütüldüğü peristaltik pompalı sürekli sistem.....	38
<b>Şekil 7.1:</b> poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn <sup>2+</sup> kriyojelin sentez mekanizmasının şematik gösterimi.....	42
<b>Şekil 7.2:</b> BSA adsorpsiyonunda kullanılmak üzere hazırlanmış kriyojellerin optik görüntüsü.....	43
<b>Şekil 7.3:</b> Kriyojellerin FT-IR spektrumları.....	45
<b>Şekil 7.4:</b> Kriyojellerin FE-SEM görüntüleri ve EDS Analizleri.....	47
<b>Şekil 7.5:</b> Kriyojellere ait TGA profilleri.....	48
<b>Şekil 7.6:</b> poli(HEMA-GMA) kriyojelinin DSC diyagramı.....	49
<b>Şekil 7.7:</b> poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojelinin DSC diyagramı.....	49
<b>Şekil 7.8:</b> poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu <sup>2+</sup> kriyojellerinin DSC diyagramı.....	50
<b>Şekil 7.9:</b> poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn <sup>2+</sup> kriyojellerinin DSC diyagramı.....	50
<b>Şekil 7.10:</b> Bradford testi için uygulanan BSA kalibrasyon eğrisi.....	52
<b>Şekil 7.11:</b> poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin BSA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi.....	53
<b>Şekil 7.12:</b> Farklı akış hızlarının BSA adsorpsiyonuna etkisi.....	54



<b>Şekil 7.13:</b>	poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu <sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn <sup>2+</sup> kriyojellerinin BSA adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi.....	<b>55</b>
<b>Şekil 7.14:</b>	İyonik şiddet etkisinin BSA adsorpsiyonuna etkisi.....	<b>56</b>
<b>Şekil 7.15:</b>	poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu <sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonu langmuir izoterm modeli.....	<b>57</b>
<b>Şekil 7.16:</b>	poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn <sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonu langmuir izoterm modeli.....	<b>58</b>
<b>Şekil 7.17:</b>	poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu <sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonu Freundlich izoterm modeli.....	<b>59</b>
<b>Şekil 7.18:</b>	poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn <sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonu Freundlich izoterm modeli.....	<b>59</b>
<b>Şekil 7.19:</b>	Kriyojel kolonlarda saflaştırılan BSA çözeltisi için SDS-PAGE analizi.....	<b>60</b>
<b>Şekil 7.20:</b>	Kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği.....	<b>61</b>
<b>Şekil 7.21:</b>	Gümüş partikül içeren poly(HEMA-GMA)-NVF-Ag(n) kriyojellerinin optik resimleri ve buldukları çözelti ortamı.....	<b>62</b>
<b>Şekil 7.22:</b>	Ag serisi kriyojellerin FTIR spektrumları.....	<b>63</b>
<b>Şekil 7.23:</b>	Antibakteriyel özellikleri incelenen kriyojellerin FE-SEM görüntüleri ve EDS analizleri.....	<b>64</b>
<b>Şekil 7.24:</b>	Kriyojel kullanılan çalışmalarda agar üzerinde bakteriyel inhibisyon zonlarının görünümü.....	<b>66</b>
<b>Şekil 7.25:</b>	Kriyojelleri içeren çözeltilerin kullanıldığı çalışmalarda agar üzerinde bakteriyel inhibisyon zonlarının görünümü....	<b>66</b>
<b>Şekil 7.26:</b>	Farklı kriyojellerin <i>E. coli</i> üzerindeki zon indeks değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>67</b>
<b>Şekil 7.27:</b>	Farklı kriyojellerin <i>B. subtilis</i> üzerindeki zon indeks değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>67</b>
<b>Şekil 7.28:</b>	Kriyojellerin bulunduğu çözeltilerin <i>E. coli</i> üzerindeki zon indeks değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>68</b>
<b>Şekil 7.29:</b>	Kriyojellerin bulunduğu çözeltilerin <i>E. coli</i> hücrelerinin toplam canlılık sayıları üzerine etkilerinin karşılaştırılması...	<b>68</b>

**Şekil 7.30:** Kriyojellerin bulunduğu çözeltilerin *B. subtilis* hüclerinin toplam canlılık sayıları üzerine etkilerinin karşılaştırılması... **69**

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 7.1:</b> Kriyojellerin fiziksel karakterizasyon sonuçları.....	<b>44</b>
<b>Tablo 7.2:</b> Ag-Serisi kriyojellerin elementel analiz içeriği sonuçları.....	<b>65</b>
<b>Tablo 7.3:</b> poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu <sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonuna göre Langmuir ve Freundlich İzotermi	<b>59</b>
<b>Tablo 7.4:</b> poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn <sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonuna göre Langmuir ve Freundlich İzotermi	<b>59</b>
<b>Tablo 7.5:</b> Disk difüzyon verilerine ilişkin özet tablo.....	<b>69</b>
<b>Tablo 7.6:</b> Toplam canlılık sayılarına ilişkin özet tablo.....	<b>69</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Aam</b>	Akrilamit
<b>HEMA</b>	2-Hidroksietil Metakrilat
<b>IMAK</b>	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
<b>MBA</b>	Metilenbisakrilamit
<b>GMA</b>	Glisidil Metakrilat
<b>EGDMA</b>	Etilen Glikol Dimetakrilat
<b>NVF</b>	N-Vinil Formamit
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albumin
<b>PEG</b>	Poli Etilen Glikol
<b>PVA</b>	Poli Vini Alkol
<b>APS</b>	Amonyum persülfat
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamin
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektroforezi

## ÖNSÖZ

Bu tez, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Dr. Öğretim Üyesi Koray ŞARKAYA'nın danışmanlığında yüksek lisans derecesi almak üzere hazırlanmıştır. Tez çalışmam boyunca, edindiğim bilgi ve deneyimlerin yanı sıra araştırma yapma becerilerimi de geliştirme fırsatı buldum.

Öncelikle, tez çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Koray ŞARKAYA'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin sabrı, anlayışı ve bilimsel rehberliği, bu çalışmanın tamamlanmasında büyük rol oynamıştır.

Yüksek Lisans savunma sınavımda jüri görevini üstlenen, sayın Doç. Dr. Berna KAVAKCIOĞLU YARDIMCI ve sayın Doç. Dr. Ercan Selçuk ÜNLÜ değerli görüşleri ve yapıcı eleştirileri ile çalışmamı daha iyi bir noktaya taşıdıkları için teşekkür ederim.

Tezim çalışmalarım bana desteklerini esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi'nin değerli Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Rafet KILINÇARSLAN, Prof. Dr. Ayşen HÖL, Doç. Dr. Berna KAVAKÇIOĞLU YARDIMCI, Doç. Dr. Ahmet KAYA, Dr. Öğr. Üyesi Sevil SÖYLEYİCİ, Doç. Dr. Sevilay CENGİZ ŞAHİN ve Dr. Öğr. Üyesi Nurettin İlter SEVER'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana destek olan arkadaşlarım Halime GÜNAYDIN, Mert KORKUT ve Emin HAFEZ ABDULLSALAM'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu uzun ve zorlu süreç boyunca yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim aileme, özellikle sevgeli annem, ağabeylerim ve sevgili neşanım gösterdikleri sabır ve anlayış için en içten dileklerle teşekkür ederim. Aynı şekilde, bu süreçte yanımda olan ve bana moral veren sevgili arkadaşlarım Mohammad Nazir MALEKZADA, Abdul Ali ZURMATAI, Abdul Rahman HAZİQ HELMAND, Nazrgül NAZARİ, Farid Mohmmad ATALL, Farid Mohammad ZAKİ, Hamza AMİN ve değerli tüm arkadaşlarıma teşekkür bir borç bilirim.

Son olarak, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tüm hocalarıma ve üniversite personeline teşekkür ederim. Onların desteği olmadan bu çalışma mümkün olamazdı.

MESBAHULDİN MESBAH

# 1. GİRİŞ

Kriyojeller, çözücünün donma noktası altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilen çeşitli polimerizasyon yöntemleriyle suda çözünen monomerler ve çapraz bağlayıcıların sentezlenmesiyle oluşturulan gözenekli üç boyutlu (3D) malzemelerdir. Kriyojellerin yapısal özellikleri, malzeme seçimi ve kullanılan özel polimerizasyon tekniğinden büyük ölçüde etkilenir. Bununla birlikte, kriyojellerin ayırt edici süpergözenekli ve süngerimsi morfolojisi, polimerizasyon işlemi sırasında su moleküllerinin kristal diziliminden kaynaklanır [1]. Süpergözeneklilik, geniş yüzey alanı ve mekanik kararlılık gibi yapısal ve işlevsel özellikleri nedeniyle kriyojeller, yalnızca yüksek verimli adsorbanlar olarak değil, aynı zamanda nanopartiküller [2], karbon temelli malzemeler [3] ve metal-organik kafesler [4] gibi çeşitli malzemeleri matrisleri içinde hapsedmek için polimerik destekler olarak da ortaya çıkmış ve istenen özelliklere sahip kompozit kriyojeller oluşturulabilmektedir. Kriyojel matrislerinin adsorban malzemelerle bu sinerjik kombinasyonu, iyileştirilmiş sorpsiyon kapasitesi, kolay kullanım ve antimikrobial özellikler gibi avantajlar sunar [5]. Uygulamalar noktasında gıda analizi, biyolojik araştırma ve çevre çalışmaları gibi konularda sahip oldukları ayırt edici yapısal özelliklerine ek olarak, dış değişikliklere hızlı tepki verme, minimum basınç düşüşü ve hızlı difüzyon süreleri gibi özellikler sayesinde, kriyojelleri çeşitli uygulamalarda (özellikle geleneksel hidrojelere kıyasla) adsorban malzemeler olarak oldukça etkili hale getirir [6].

Afinite kromatografisi, sabit faz olarak biyolojik olarak ilişkili bir dolgu malzemesi niteliğinde kullanan bir sıvı kromatografisi biçimidir [7]. Bu teknik, seçici ve geri dönüşümlü bağlanmanın birçok biyolojik etkileşimde meydana gelmesinden yararlanılarak belirli hedeflerin ayrımı ve saflaştırılması için uzun bir süredir kullanılmaktadır [8]. Bu etkileşimlere örnek olarak bir antikor ve antijen, enzim ve substrat veya hormon ve reseptör arasında meydana gelenler verilebilir [9]. Afinite kromatografisi, bir çift etkileşimli maddeyi bir kromatografik destek üzerine hareketsizleştirerek bu sistemleri kullanır. Destek üzerine hareketsizleştirilen maddeye "afinite ligandı" denir ve bu bileşik karmaşık bir karışımda mevcut olduğunda bile tamamlayıcı hedefi seçici bir şekilde tutma yeteneğine sahip bir kolon sağlar [10].

Son yıllarda afinite kromatografisinde gelişmişliğin bir ölçüsü de monolit desteklerin oluşturulması ve kullanımı olmuştur [11]. 90'lı yılların başında diğer kromatografi biçimleri için geliştirilen monolit destek malzemeleri, geleneksel partikül muadillerine göre çeşitli avantajlar sunmaktadır [12]. Bu avantajlar arasında düşük geri basınçları, yüksek geçirgenlikleri, iyi ayırma verimlilikleri ve çeşitli boyut ve şekillerde hazırlanabilmeleri yer alır [13]. Organik polimerlerden silika, agaroz ve kriyojellere kadar çeşitli monolit türleri afinite kromatografisinde kullanılmıştır [14]. Afinite kromatografisinde kullanılan birçok monolit, antikorlar, enzimler ve peptitler içeren immobilize ajanlarla kullanılan glisidil metakrilat (GMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) bazlı polimerlerdir [15]. Bunlara, büyük biyolojik etkenlerin (örneğin DNA, proteinler ve virüsler) saflaştırılmasından antikor bazlı ayırmalara ve immobilize metal-iyon afinite kromatografisine (IMAK) kadar uzanan uygulamalarda kullanılan konvektif etkileşim ortamı olarak bilinen polimetakrilat monolitler de dahildir [16,17].

Afinite kromatografisinde uygun immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi, yeni uygulamaların geliştirilmesiyle ilişkilidir. Bir afinite kolonu hazırlanırken immobilizasyon sürecinin doğru taarlanabilmesi, afinite ligandının nihai aktivitesi üzerinde önemli bir faktördür. İlk olarak 1936'da Landsteiner ve van der Scheer ve 1951'de Campbell ve arkadaşları tarafından kullanılan kovalent immobilizasyon [18], bir afinite ligandını bir desteğe yerleştirmek için en sık kullanılan yöntem olmaya devam etmektedir. Desteğin ve/veya ligandın aktivasyonu, genellikle bu yaklaşım için bir ön koşuldur [10]. Bununla beraber, afinite ligandları, kovalent bağlanma dışındaki yöntemlerle de bir desteğe yerleştirilebilir.

Metal şelatlaştırıcı özelliğe sahip ligandlar, afinite kromatografisinde kullanılabilen biyolojik olmayan bağlayıcı reaktiflerin önemli bir örneğidir. Bu yaklaşım, aynı zamanda IMAK yönteminin de temelini oluşturur. 1975'te Porath ve diğerleri, IMAK'ın ilk uygulamasını yayınlamak bu yöntemi albüminin saflaştırılmasında kullanımıyla göstermiştir [19]. IMAK genellikle, sistein, histidin veya triptofan kalıntıları gibi elektron verici gruplar olarak hareket edebilen hedef analit üzerindeki immobilize metal iyonları ve amino asitler arasındaki etkileşime dayanır [20]. Bu şelat oluşturan ligandlar, silika, agaroz ve kriyojeller dahil olmak üzere çeşitli destek tiplerine immobilize edilerek uygulanabilmektedir [21]. IMAK



yönteminde çeşitli metal iyonları da kullanılmaktadır.  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Hg}^{2+}$  gibi metal iyonları kükürt içeren hedeflere bağlanma eğilimindeyken,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  gibi metal iyonları azot, kükürt veya oksijen içeren erişilebilir gruplara sahip hedeflerle koordine olma eğilimindedir [22].

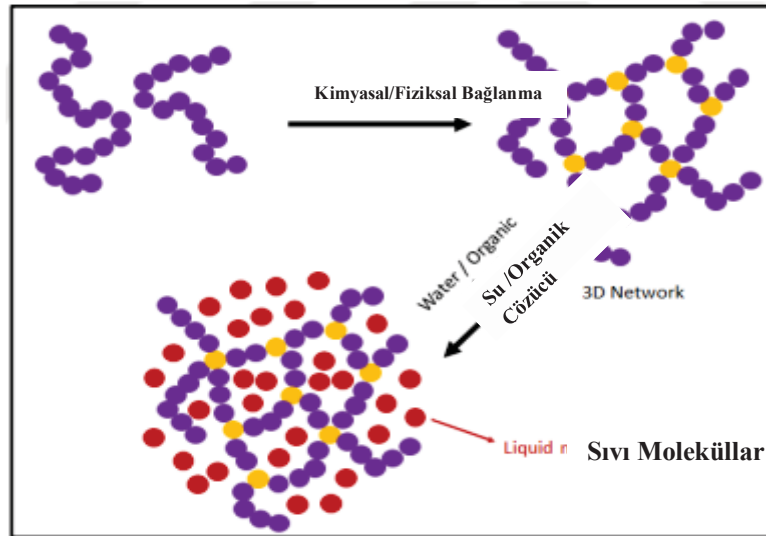
N-vinil formamid (NVF), Metil vinil amit sınıfının bir monomer türevidir olup aynı zamanda akrilamid (Aam) ile bir izomerdir. NVF'nin molekül ağırlığı 71.08 g mol<sup>-1</sup>'dir. NVF'nin normal sıcaklık ve basınç altında kaynama noktası 210 °C'dir. Basınç 5.5 mmHg'ye düşürüldüğünde kaynama noktası 82.5 °C olur. NVF'nin 25 °C'deki buhar basıncı 27 Pa'dır. 25 °C'deki polimerizasyonun molar ısı 82 kJ mol<sup>-1</sup>'dir. 20 °C'deki yüzey gerilimi 37.1 mN m<sup>-1</sup>'dir [23]. Vinil ve amit gibi oldukça reaktif fonksiyonel gruplar içeren NVF, yeni bir fonksiyonel monomer türüdür [24]. Amid sırasıyla sekonder amino grupları ve aldehit grupları içerir. Diğer amid ve ester monomerleriyle karşılaştırıldığında NVF daha iyi polimerizasyon derecesine sahiptir. Akrilonitril asetat, akrilamid, stiren, vinil asetat ve akrilat gibi çeşitli kimyasal monomerlerle kopolimerize edilebilir [25]. NVF ayrıca amino ve metakrilat grupları içeren bazı fonksiyonel organik monomerler ve polimerler hazırlamak için bir öncül olarak da kullanılabilir [26,27]. Bununla beraber yakın dönemde yapılan çalışmalarda ise kriyojel oluşumunda NVF katılımının antimikrobial etkinliği de mayalanma mekanizması üzerinden incelenmiştir [28].

Antibakteriyel jeller, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaları öldüren polimerik jellerdir. Bu polimerler, bağışıklık sistemi tarafından bakterileri öldürmek ve onlarla savaşmak için kullanılan antibakteriyel peptidlere benzer şekilde davranacak şekilde tasarlanmıştır [29]. Antibakteriyel polimerler, genellikle alkil veya asetil bağlayıcılar kullanılarak polimerik malzemenin ana zincirine bir antibakteriyel madde eklenerek veya yerleştirilerek üretilir [30]. Antibakteriyel polimerler, uygulanan antimikrobiyal maddelerin etkinliğini ve özgüllüğünü artırırken ilişkili çevresel riskleri azaltabilir çünkü bu polimerler geçirgen olmayan özelliklere sahiptir ve kimyasal olarak kararlıdır [31]. Bununla beraber bu malzemeler, enfeksiyonla savaşmak için ilaç üretimi veya bakteriyel kontaminasyonu ve suda büyümelerini önlemek için suyu dezenfekte etmek için gıda endüstrisi için oldukça kullanışlı malzemelerdir [32].

## 2. POLİMERİK JELLER

### 2.1 Jeller

Jeller, polimer ve immobilize edilmiş çözücünden oluşan ve makromoleküler zincirlerin kimyasal veya fiziksel bağlar aracılığıyla birbirine bağlantılı, 3 boyutlu bir ağ oluşturan sistemlerdir [33]. Jeller, içerdikleri sıvıya göre genellikle iki sınıfa ayrılmaktadır. Organik çözücüler içeren jellere "organojel" denirken, su içinde bulunanlara ise "hidrojel" adı verilir [34]. Gözenek boyutlarına göre, jeller genellikle gözeneksiz, mikro gözenekli, mezogözenekli ve makrogözenekli olarak sınıflandırılabilir [35]. Jeller kimyasal olarak iki veya daha fazla bileşenden oluşmaktadır. Jeller katı ve sıvı faz arasında dururlar, yani hem katı hem sıvı özelliği sahiptir. Bu özellik nedeniyle elastik ve viskoz özelliği bulundurlar. Jellerin oluşumunda, bileşenler arasında çeşitli bağ türleri kurulabilir. Örneğin, kimyasal bağlar (kovalent), iyonik bağlar ve kovalent olmayan (fiziksel) bağlar şeklinde sıralanabilirler [33]. Jelin genel morfolojisi, bileşen polimerlerin (homofaz veya heterofaz) kimyasal yapısı ve jel hazırlama yöntemi tarafından belirlenir. Bu bağlamda, kriyojeller, jel oluşturabilme potansiyeline sahip öncüllerin orta derecede donmuş çözeltilerinde veya kolloidal dispersiyonlarında oluşan jel sistemleridir [36].



Şekil 2.1: Kimyasal veya fiziksel bağlanma ile jel oluşması

## 2.2 Hidrojeller

Hidrojeller, kuru ağırlıklarının yaklaşık %10'un çok daha fazlasına kadar yapılarına su alıp şişebilen hidrofilik polimerik ağlardır. Kovalent olarak çapraz bağlı ağlar olduklarında "kalıcı" veya "kimyasal" jeller olarak adlandırılırlar. Polimer-su etkileşim parametresine ve çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olan bir denge şişme durumuna ulaşırlar. Buna göre, ağlar iyonik, H-bağı veya hidrofobik etkileşimler dahil olmak üzere moleküler etkileşimler ve/veya ikincil kuvvetler tarafından bir arada tutulduğunda "geri dönüşümlü" veya "fiziksel" jeller olarak adlandırılırlar. Bu etkileşimlerin tümü geri dönüşümlüdür ve fiziksel koşullardaki değişiklikler veya stres uygulanmasıyla bozulabilir [37]. Yıllar boyunca araştırmacılar hidrojelleri birçok farklı şekilde tanımladılar. En yaygın olanı, hidrojin bir veya daha fazla monomerin basit reaksiyonuyla üretilen suyla şişmiş ve çapraz bağlı polimerik bir ağ olmasıdır. Başka bir tanım ise doğal veya sentetik polimerlerden oluşturulabilir, genellikle suyun büyük bir kısmını içinde tutma özelliğine sahiptirler, ancak suda çözünmezler [38]. "Hidrojel" terimi ilk kez 90'lı yıllarda literatürde adlandırıldı ve bu terim, anorganik tuzların koloidal jelini tanımlamak için kullanıldı. 1960 yılında, ilk önce Wichterle ve Lim tarafından bugün bildiğimiz hidrojeller hakkında bir çalışma yapılmış. Bu çalışmada, ilk kez sentetik hidrojel sentezlenmiş ve poli(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA) jeller, yumuşak kontakt lens üretiminde kullanılmıştır [39].

### 2.2.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması

Hidrojeller, benzersiz özellikleri sayesinde geniş bir uygulama yelpazesine sahip polimerik malzemelerdir. Çeşitli parametrelere göre sınıflandırılmaları, onların özelliklerini ve uygulama potansiyellerini daha fazla ortaya çıkarmaktadır. Hidrojeller en geniş sınıflandırma başlıkları altında; kaynaklarına, polimerik bileşimlerine, yapılandırmalarına, fiziksel görünümüne, çapraz bağlama türlerine ve ağ elektrik yüküne göre değerlendirilebilir [40].

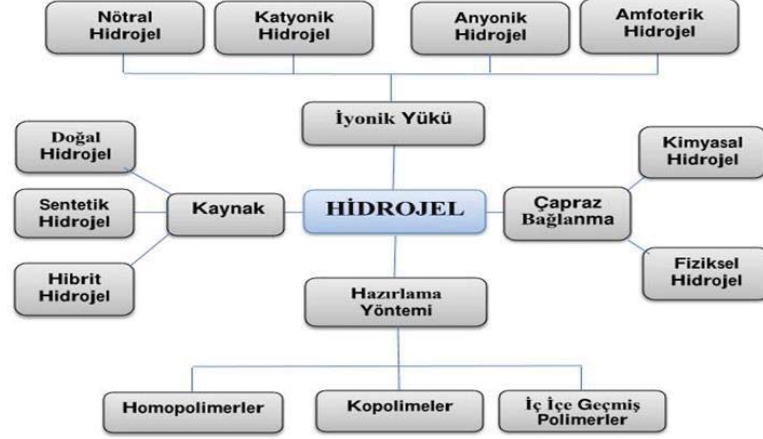
Kaynaklarına göre, hidrojeller doğal, sentetik ve hibrit (doğal-sentetik) olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılabilir. Doğal hidrojeller, biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi avantajlara sahiptir ancak mekanik özellikleri yetersizdir. Bunlara örnek olarak kollajen, jelatinin yanı sıra aljinat, kitosan ve agaroz gibi polisakkaritler

de örnek verilebilir [41]. Yaklaşık son yirmi yılda, doğal hidrojel yavaş yavaş yerini uzun raf ömrüne, yüksek su tutma kapasitesine, yüksek jel mukavemetine ve geniş çeşitlilikte ham kimyasal kaynaklara sahip sentetik hidrojellere bıraktı [38]. Sentetik hidrojeller, kimyasal polimerizasyon yoluyla hazırlanır ve yeterli mekanik özelliklere sahip olmaları, doğal biyoaktif özellikler içermemeleri gibi avantajlara sahiptir. Akrilik asit (AA), akrilamid (AAm) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), polietilen gikol (PEG), polivinil alkol (PVA) bu gruba örneklerdendir [42]. Sentetik temelli hidrojellerin dezavantajları arasında geliştirilmesi gereken biyouyumluluk eksikliği ve doğal muadillerine göre daha yavaş biyobozunma oranları yer alır. Fiziksel özelliklerin kontrolü ve uygun biyolojik uyum gerektiğinde yalnızca doğal veya sentetik hidrojellerin uygulanması uygulanabilirliklerini sınırlayabilir [40]. Nanokompozit biyomalzemeler olarak da bilinen hibrit hidrojeller, iki geleneksel hidrojin avantajlı özelliklerinden yararlanmak için ortaya çıkmıştır. Buna göre, geliştirilmiş biyouyumluluk hedefli kimyasal ve mekanik özelliklerin ayarlanabilirliğini koruma ihtiyacına yanıt olarak tasarlanmaktadır [43].

Polimerik kompozisyona göre hidrojeller, homopolimerik, kopolimerik ve multipolimerik olmak üzere üç gruba ayrılır. Homopolimerik hidrojeller, tek bir monomer türünden oluşurken, kopolimerik hidrojeller iki veya daha fazla farklı monomer türünden oluşur ve multipolimerik hidrojeller, iki bağımsız sentetik ve/veya doğal bileşenden oluşur ve ağ formunda bulunur. Yarı IPN (iç içe geçmiş) hidrojellerde, bir bileşen çapraz bağlı bir polimerken, diğer bileşen çapraz bağlı olmayan bir polimerdir [44].

Hidrojeller, yapılandırmalarına göre amorf, kristalin veya yarı kristalin olabilir. Amorf hidrojeller, moleküler düzeyde rastgele ağ yapılarıdır. Kristalin hidrojeller, kristalleşme sırasına sahip sıkı bir şekilde paketlenmiş polimer ağ yapısından oluşur. Amorf ve kristalin bölgeler içeren yarı kristalin hidrojeller, 1994 yılında kimyasal çapraz bağlama ile geliştirilmiştir [45]. Bu tarihten sonra, toplu ve misel polimerizasyonu ile fiziksel çapraz bağlanmış yarı kristalin hidrojeller hazırlanmıştır [46]. Yarı kristalin fiziksel hidrojeller, enjekte edilebilir hidrojeller ve şekil hafızalı hidrojeller hazırlamada yaygın olarak kullanılan yarı kristalin kimyasal hidrojellere kıyasla hızla katı benzeri bir durumdan sıvı benzeri bir duruma geçer ve geri dönüşümlüdür [47]. Bu sınıflandırma dışında, hidrojeller monomerlerin yük tipine,

çapraz bağlanma tipine ve gözenek boyutlarına göre de ayrılabilirler [48]. İyonik olmayan, anyonik, katyonik ve zwitter iyonik gibi farklı yük tiplerine; kimyasal veya fiziksel çapraz bağlayıcı türlerine; ve mikrogözenekli, makrogözenekli, hem mikro hem makrogözenekli ve süpermakrogözenekli gibi farklı gözenek boyutlarına göre sınıflandırılırlar [49].



Şekil 2.2: Hidrojellerin Sınıflandırılması

## 2.2.2 Hidrojellerin Uygulama Alanları

Hidrojeller, nispeten büyük miktarlarda sıvı hapsedebilen üç boyutlu polimerik ağ yapılarına sahip çapraz bağlı polimer zincirleridir [50]. Hidrojellerin yüksek su içeriği, yumuşak yapısı ve gözenekliliği nedeniyle canlı dokulara çok benzerler. Son yıllarda yapılan araştırmalar, hidrojellerin tarım, biyomalzemeler, gıda endüstrisi, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp gibi çeşitli alanlarda uygulandığını göstermektedir [51]. Hidrojellerin biyomateryal özelliği; biyotıp, eczacılık, veterinerlik gibi alanlarda çeşitli uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar. Bu uygulamalar arasında kontrollü ilaç salım sistemleri, yapay organlar, kontak lenslerin üretimi, enzim tutuklama sistemleri, ilaç taşıyıcı sistemler, kulak içi uygulamalar ve ameliyat iplikleri, kemik hastalıklarının tedavisi için malzeme olarak kullanım ve benzeri birçok uygulama bulunmaktadır [52,53]. Ayrıca, yüksek su tutma kapasitesi sayesinde adsorpsiyon, su arıtma, endüstriyel atık sulardan ağır metallerin ve boyar maddelerin uzaklaştırılması, sensör teknolojileri için uyarı-cevap malzemeleri olarak, iyon değişim ve kromatografik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [54,55].

### 2.3 Kriyojeller

'Kriyojeller' veya 'kriyoyapılar' kelimelerinin anlamı, 'kriyo' hecesini (Yunanca κρύος (kryos) don anlamına gelir) içeren, kriyojenik işlem yoluyla oluşan polimer jeller ve 3 boyutlu yapılar olarak açıklanır. Bu bağlamda, kriyojeller, termal olarak indüklenen faz ayrımı ile jelleşme potansiyeline sahip öncül varlıkların orta derecede donmuş çözeltilerinde gelişen jel sistemleridir [56]. Bu terim ilk kez 1980 yılında kullanılmıştır ve temel olarak soğukta oluşturulan bir jel anlamına gelmektedir. Kriyojeller (kriyo-hidrojel), hidrojel sınıfının bir başka hidrofilik özellikli polimerik ağlar üyesidir. Ancak, tipik olarak, çözücünün donma sıcaklığının altında bir hidrojel öncül çözeltisini polimerize ederek (kriyojelasyon/kopolimerizasyon) oluşturulan birbirine bağlı (açık hücreli) bir makro gözenekli yapı sergilerler. Gözenek oluşturucu görevi gören buz kristallerinin oluşumu, öncül çözeltiyi çapraz bağlamanın gerçekleştiği yoğun bir monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı açısından zengin faza (donmamış sıvı mikrofaz) yoğunlaştırır. Çapraz bağlamadan sonra, çözülme sırasında büyük, heterojen ve birbirine bağlı gözenekler oluşur ve dondurma işlemi sırasında oluşan bağlı buz kristallerinin bir benzeri gerçekleşir [57]. Kriyojellerin fizikokimyasal ve mekanik özellikleri, kriyojelasyon sıcaklığının, soğutma hızının ve monomer/çözücü tipi ve derişiminin optimize edilerek kontrol edilebilir [58].

Kriyojellerle karşılaştırıldığında, hidrojel bazı uygulamalar için doğal dezavantajlar sergiler. Hidrojellerin jelleşme süreci tamamlandıktan sonra kurutma aşamasında gözenekler oluşurken, kriyojellerde gözenekler jelleşme sürecinden hemen önce oluşur. Bu farklılık, kriyojellerin daha homojen ve düzenli gözenek yapısına sahip olmalarını sağlar. Ayrıca, kriyojellerin gözenek duvarları, hidrojel gözenek duvarlarından daha yüksek bir polimer derişimine sahiptir [59]. Bu durum, kriyojellerin daha sıkı ve sağlam bir yapıya sahip olmalarını sağlar. Hidrojel, içerdiği suyu çok hızlı kaybederken, susuz ortamda şekil-boyutlarını yine çok hızlı kaybedebilirler ve kriyojellere göre geç şişerler [60]. Ayrıca, mekanik kararlılıkları ve bütünlükleri genellikle düşüktür (örneğin, mikro hidrojel (alt mikron veya mikro mühendislikli (0,1–100 µm) hidrojel, mekanik kırılmadan önce yalnızca %20 gerilmeye dayanabilirken, mikro kristaller yıkım olmadan %70 gerilme sergilemiştir) [61]. Dahası, su içeriği de mekanik kararlılığı büyük ölçüde etkileyerek hidrojel taşınmasını/hareket ettirilmesini zorlaştırır [62].

Hidrojelleri, metakrilatlanmış aljinat bazlı kriyojellerle karşılaştırdığımızda, hidrojeller kriyojellerden ( $4 \pm 2$  kPa) daha yüksek bir Young modülüne ( $42 \pm 2$  kPa) sahiptir [63]. Kriyojellerin daha düşük Young modülü, onları yumuşak doku içeren uygulamalar için daha uygun hale getirir. Ek olarak, bu, önceden oluşturulmuş, çapraz bağlı hidrojellerin ince bir iğne aracılığıyla uygulanmasını olanaksız hale getirir, çünkü enjeksiyondan sonra yapılarını kaybederler [64]. Ayrıca, hidrojeller gözenekli olsa da makro gözenekleri olmamasına rağmen, hücre penetrasyonunu veya moleküllerin (oksijen, besin maddeleri veya atık) iskele yapısı boyunca difüzyonunu engelleyebilirler [65]. Kriyojellerin, hidrojellere göre üstün yönleri genel olarak; i) mekanik sağlamlıkları ve süngerimsi yapıları nedeniyle geliştirilmiş kullanıcı dostu kullanım, ii) kullanımdan önce saklama kolaylığı ve iii) otoklavlanabilir sterilizasyon mümkündür [66]. Özellikle, susuz hallerinde otoklavlanabilen kriyojellerin aksine, geleneksel hidrojeller ağ kararlılığını korumak için sürekli nemlendirmeye ihtiyaç duyar ve termal sterilizasyon işlemi geri döndürülemez ve yıkıcı bir ağ büzülmesine neden olduğundan otoklavlamayı sürdüremezler [67].

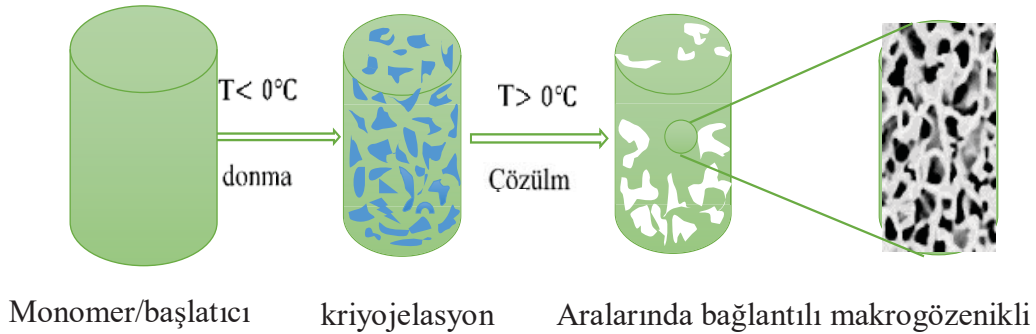
Kriyojeller genellikle birbirine bağlı makrogözenekli veya süpermakrogözenekli yapıda olup, sünger morfolojiye sahiptirler, Bu sünger yapıdaki gözenek sistemi, çözünen maddelerin kriyojellerin içinden madde kaybı olmadan geçişini sağlar [68].

### 2.3.1 Kriyojellerin Hazırlanması

Kriyojeller, kriyopolimerizasyon veya kriyojelleşme (kriyojelasyon) olarak bilinen bir işlemle üretilirler [69]. Bu süreç, kullanılan monomerin/polimerin türü ve içeriği veya çapraz bağlayıcının varlığı gibi faktörlere göre düzenlenebilmektedir, ancak temel adımlar genellikle benzerdir. İlk olarak, monomerlerin/polimerlerin öncülleri ve çapraz bağlayıcılar bir çözücüde (genellikle suda) çözülür. Kriyojelleşme sürecinde, reaktifler genellikle reaksiyon karışımının sadece %5 ila %20'sini oluşturur [70]. Buna ek olarak, bu çözeltiyi polimerizasyonu başlatmak için monomerlerin yanı sıra bazı diğer küçük öncülleri de bir başlatıcı ve aktivatör olarak eklenir. Daha sonra çözelti, suyun donma noktasının altına (genellikle -5 ile -20 arası) soğutularak buz kristallerinin oluşumu başlatılır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, donmuş

karişım oda sıcaklığına getirilir. Daha sonra, buz kristalleri erir ve "kriyojel" olarak adlandırılan gözenekli polimer ağı elde edilir. Buz kristalleri gözenek oluşturan ajanlar olarak görev yaparlar [71].

Polimerizasyon aşamasında oluşturulmuş gözeneklerin şekli ve boyutu, monomerlerin derişimi ve polimerizasyonun gerçekleştiği sıcaklık gibi birçok faktöre bağlıdır. Kriyojellerin yapısındaki süpermakrogözeneklerin boyutları 10 ile 200 mikrometre arasında değişir. Ayrıca, kriyojellerin gözenek boyutu, gözenek duvarlarının kalınlığı ve yoğunluğu, kriyojellerin performansını etkileyen parametrelerdir. Gözenek boyutu akış direncini etkiler. Gözenek duvarlarının kalınlığı ve yoğunluğu ise, kriyojellerin makroskopik mekanik özelliklerini belirler [72]. Kriyojellerde önemli bir nokta, toksik veya uzaklaştırılması zor olan projenler yerine doğrudan buz kristallerinin kullanılmasıdır [70]. Polimer ağı bu kristaller etrafında oluşturulduğu için buz kristalleri, kriyojelin makrogözeneklerinin bir kalıbı olarak görev yaparlar. Kimyasal olarak çapraz bağlı kriyojellerde, monomerler polimerleşir ve çapraz bağlayıcı mevcut olduğunda buz kristallerinin etrafında çapraz bağlanarak bir ağ oluşturulur [73].



Şekil 2.3: Kriyojellerin Hazırlanma Aşamaları

### 2.3.2 Kriyojellerin Hazırlanmasında Kullanılan Öncüller ve İşlevleri

Kriyojellerin hazırlanmasında dört temel bileşen (monomer/polimer, çapraz bağlayıcı, reaksiyon başlatıcı/hızlandırıcı ve çözücü) kullanılmaktadır. Monomerler/polimerler, kriyojellerin polimer matriksinin oluşumunu başlatan ana bileşenlerdir. Polimer zincirlerinin oluşumu için başlangıç malzemesi olarak kullanılırlar. Doğal kaynaklı monomerler/polimerler (selüloz, aljinat, kitosan, agaroz



vb.), sentetik monomerler/polimerler; Aam, N,N -dietilakrilamid (DEM), akrilikasit(AAc), HEMA, N-izopropil akrilamid (NIPAM) vb. Monomerler yaygın olarak kriyojellerin hazırlanmasında kullanılmaktadır [74].

Çapraz bağlayıcılar kriyojellerin hazırlanmasında değer önemli bileşenlerdir. Çapraz bağlayıcılar polimer zincirlerini birbirine bağlayarak ağ yapısının oluşmasını sağlar ve kriyojelin mekanik dayanıklılığını artırır. Metilenbisakrilamid (MBA), Tetraetilen glikol dimetakrilat (TEGDMA), Glutaraldehit, Etilenglikol Dimetakrilat (EGDMA) vb. kriyojellerin hazırlanmasında kullanımı yaygın çapraz bağlayıcılardır [74].

APS (Amonyum persülfat) ve TEMED (kombinasyonu, kriyojel oluşumunda sıkça tercih edilen bir başlatıcı/hızlandırıcı sistemdir. Bununla birlikte, kullanılacak başlatıcı ve hızlandırıcıların seçimi, kullanılan monomerlerin özelliklerine, polimerizasyon şartlarına ve hedeflenen kriyojel özelliklerine bağlı olarak değişebilir [75].

Kriyojellerin hazırlanmasında kullanılan değer önemli kimyasal çözücü olarak sudur. Suyun dışında bazı organik çözücüler de kullanılabilir; örneğin, Etanol, Metanol, dimetilsafoksit (DMSO), dioksan, formamid, nitrobenzen vb. ve organik çözücü ile hazırlanan kriyojellere “organojeller” denilmektedir. Su, kriyojel hazırlama sürecinde en yaygın kullanılan çözücüdür. Su, monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların çözünmesini ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için gerekli ortamı sağlar [33]. Çözücü olarak kullanılan su ile beraber donan buzun erimesi ile oluşan iç içe geçmiş polimerik ağlar, kriyojellerin kristalizasyonunu teşkil eder.

### 2.3.3 Kriyojellerin Fiziksel Özellikleri

Kriyojeller, düşük sıcaklıklarda polimerizasyonun gerçekleştiği hidrojel materyalleridir. Bu materyaller; makrogözenekli yapısı, büyük bir yüzey alanı, elastik ve esneklik, büyük miktar su tutma kapasitesi, kimyasal dayanıklılıkları ve değer birçok önemli özelliklere sahiptirler [76]. Diğer hidrojellere kıyasla, kriyojellerin bu üstünlükleri onların, biyomedikal, biyoteknoloji, ilaç salım sistemleri ve biyoayırma teknolojisinde geniş bir kullanım potansiyeline sahip olmasını sağlar [65].

Kriyojellerin özellikleri, gözenek yapısına (gözenek boyutu, gözenek boyutu dağılımı), gözenek duvarı kalınlığı ve şişmiş, gözenek duvarlarında polimer derişimi gibi faktörlere bağlıdır. Gözenek boyutu, gözenek toplam hacmini tanımlar ve gözenekler arasında bağlantı ile birlikte, jel içindeki kütle taşınımı kontrol eder. Gözenek duvarı kalınlığı ve yoğunluğu ise, kriyojellerin makroskopik mekanik özelliklerini belirler [77].

Kriyojellerin fiziksel özellikleri genel olarak aşağıdaki gibi açıklanabilir;

i. Mekanik Dayanıklılık: Kriyojellerin mekanik dayanıklılığı, duvar kalınlığı, duvar yoğunluğu ve gözenek boyutu gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Genel olarak, duvar kalınlığını ve yoğunluğunu artırmak, kriyojellerin mekanik özelliklerinin gelişmesini sağlamaktadır [78].

ii. Gözenek Boyutu ve Morfolojisi: Kriyojellerin gözenek boyutu, monomer/polimer öncüllerinin derişimi ve çapraz bağlama türü ve miktarı gibi faktörlere bağlıdır. Bu parametreleri kontrol ederek, kriyojellerin gözenek boyutunu belirli uygulamalara uygun hale getirmek mümkündür. Ayrıca, kriyojellerin morfolojisi, donma hızı ve jelleşme sıcaklığı gibi kriyopolimerizasyon koşullarından etkilenir. Hızlı donma ve az miktarda kristal büyümesi, daha küçük gözenek boyutlarına ve daha homojen bir gözenek yapısına yol açabilir [79].

iii. Su İçeriği ve Şişme Davranışı: Kriyojeller genellikle bir çözücü olan su nedeniyle yüksek bir su içeriğine sahiptir. Bu su içeriği, kriyojellerin büyük miktarda sıvı veya çözücü emebilme ve tutabilme yeteneğine katkıda bulunur. Şişme davranışını kontrol etmek, ilaç taşıma sistemleri veya doku mühendisliği iskeleleri gibi uygulamalarda önemlidir [80].

iv. Yüzey Alanı ve Biyolojik Uyumluluk: Kriyojeller, yüksek gözenekli yapısı nedeniyle geniş bir yüzey alanına sahiptir. Bu özellik, adsorpsiyon, ayırma veya kataliz gibi yüksek yüzey-hacim oranı gerektiren uygulamalar için kriyojellerin tercih edilmesini sağlar. Ayrıca, kriyojeller biyolojik olarak uyumlu özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanabilir [73].

v. Termal ve Kimyasal Dayanıklılık: Kriyojeller genellikle düşük sıcaklıklarda oluşturulduğu için iyi bir termal dayanıklılığa sahiptir. Yapısal bozunma olmadan geniş bir sıcaklık aralığına dayanabilirler. Ayrıca, kriyojellerin kimyasal dayanıklılığı, monomer/polimer öncüllerinin ve çapraz bağlayıcı maddelerin seçimine bağlıdır ve istenen kimyasal dirence göre özelleştirilebilir [81].

Genel olarak, kriyojellerin mekanik dayanıklılığı, gözenek boyutu, su içeriği ve biyolojik uyumluluk gibi ayarlanabilir özellikleri, biyoteknoloji, çevre bilimi, enerji depolama ve biyomedikal mühendislik gibi çeşitli alanlarda kullanılan çok yönlü malzemeler olduğunu göstermektedir [82].

### 2.3.4 Kriyojellerin Fiziksel Yapısını Etkileyen Faktörler

Kriyojeller, genellikle yüksek derecede su tutma (şişme) derecesine sahip, elastikiyet ve birbirine bağlı makrogözenekli yapılarıyla dikkat çekmektedir. Kriyojelasyon sırasında, belirli özelliklere sahip kriyojeller üretmek için optimize edilebilecek birçok kritik parametreler (örneğin, polimerizasyon sıcaklığı, soğutma hızı, polimer içeriği ve çözücü içeriği) bulunmaktadır [83]. Bu parametrelerin değiştirilmesiyle kriyojellerin esnekliği, gözenek boyutu ve dağılımı, duvar kalınlığı, mekanik ve termal özellikleri, biyobozunurluğu ve biyoyuumluluğu gibi özellikleri ayarlanabilir [79].

Kriyojellerin mekanik dayanımını etkileyen özellikler arasında duvar kalınlığı, duvar yoğunluğu ve gözenek boyutu gibi parametreler yer almaktadır. Duvar kalınlığı ve yoğunluğu artırmak, kriyojellerin mekanik özelliklerinin gelişmesi sağlamaktadır. Monomer/polimer öncüllerin derişim, çapraz bağlam tipi ve miktarında değişkenlik, kriyojellerin duvar kalınlığı ve yoğunluğu etkilenebilmektedir. Ayrıca kriyojellerin morfolojisi, kriyojellerin sentezlenme koşullarına da bağlıdır. Örneğin, donma hızının artması veya jelleşme sıcaklığının düşmesi, çözücünün hızlı donmasına ve az miktarda kristal büyümesine yol açar. Bu da kriyojelin daha küçük gözenek olmasına neden olur [33].

Kriyojellerin yapısına etkileyen faktörler şu başlıklar altında değerlendirilebilir:

#### **2.3.4.1 Polimer Derişimi**

Kriyojellerin yapısına etkileyen birçok faktörlerden bulunmaktadır. Onlardan bir tanesi, kriyojellerin sentezleme esnasında kullanılan monomer/polimer DERİŞİMİ ve polimerin moleköl ağırlığıdır. Daha düşük moleköl ağırlıklı monomerlerin, daha büyük moleköl ağırlıklı monomerlerle karşılaştırıldığında daha büyük gözenekler oluşturması beklenmektedir. Ayrıca, reaksiyon bileşenlerinin miktarının artması, kriyojellerin rijitliğini, kriyojel duvarlarının kalınlığını ve elastikiyetini artırır. Polimer derişiminin azalmasıyla kriyojellerin yumuşaklığın artmasına sebep olur [84].

Aynı kütle derişimine sahip olan yüksek moleköl ağırlıklı polimer çözeltileri ile düşük moleköl ağırlıklı polimer çözeltileri karşılaştırıldığında, genellikle daha küçük gözenek boyutuna sahip kriyojellerin oluşumu gözlenmektedir. Bu durumun temel nedeni, düşük moleköl ağırlıklı polimer çözeltilerinin, çözeltide kristalleşebilen, nispeten daha yüksek bir serbest su hacmi taşımasıdır [85].

#### **2.3.4.2 Polimerizasyon Sıcaklığı**

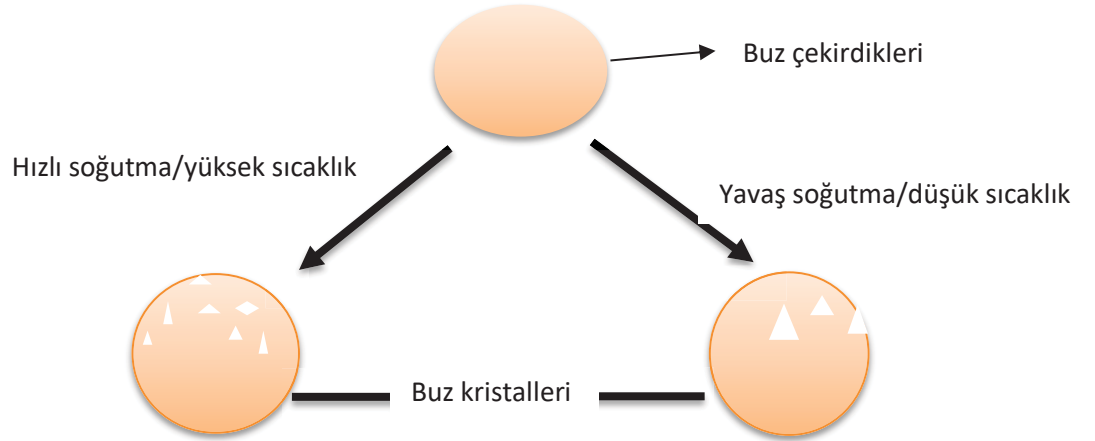
Polimerizasyonun gerçekleştiği sıcaklık, kriyojellerin özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Farklı polimerizasyon sıcaklıkları kullanarak, gözenek boyutu, dağılımı ve bağlantılılık ile polimer duvar kalınlığı kontrol edilebilir. Daha spesifik olarak, sıcaklık, kriyojelasyon sırasında faz ayrılmasının nasıl gerçekleştiğini etkiler, bu da doğrudan kriyojellerin fiziksel özelliklerini belirler. Örneğin, genellikle daha düşük sıcaklıklar daha büyük buz kristalleri oluştururken, daha yüksek sıcaklıklar daha küçük buz kristalleri oluşturur. Buz kristallerinin boyutu ve sayısı, kriyojellerin gözenek boyutu, gözenek dağılımı, yüzey alanı ve mekanik özelliklerini etkiler [86,87].

#### **2.3.4.3 Soğutma Hızı**

Kriyojellerin yapısı üzerinde etkileyen değir faktör soğutma hızıdır. Soğutma hızı arttıkkça, çözeltideki su molekülleri daha hızlı kristalleşir ve daha küçük kristallerin oluşmasına sebep olur. Bu durum, kriyojellerin daha küçük gözenek boyutlarına ve

daha homojen bir yapıya sahip olmasına neden olabilir. Öte yandan, daha yavaş bir öğütme hızıyla, genellikle daha büyük gözenek boyutlarına ve daha heterojen bir yapıya sahip kriyojellerin oluşmasına neden olabilmektedir [73].

Diğer bir açıdan bakıldığında, eğer çözücünün kristallenme hızı, polimerizasyon/çapraz bağlanma hızından düşükse, polimerizasyon ortamında istenilen büyüklükte porojen yani çözücü kristalleri oluşmayabilir. Bu durumda, kriyojeller istenilen makrogözeneklere sahip olmayacaktır. Dolayısıyla, homojen bir makrogözenekli kriyojel elde etmek için, çapraz bağlanma hızının çözücünün kristalleşme hızından daha düşük olması gerekmektedir [84].



Şekil 2.4: Sıcaklık ve soğutma hızının buz kristallerinin boyutuna ve sayısına etkisi

Çapraz bağlayıcının kriyojellerin yapısına önemli etkisi vardır. Çapraz bağlayıcılar, polimer zincirlerini birbirine bağlayarak ağ yapısının oluşmasını sağlamaktadır. Bu bağlayıcılar, kriyojelin gözenekli yapısını kararlı kılar ve mekanik dayanıklılığını artırır. Ayrıca, çapraz bağlayıcı miktarı, kriyojelin gözenek boyutunu ve dağılımını da etkileyebilir. Örneğin, daha fazla çapraz bağlayıcı kullanıldığında, gözenek boyutu genellikle küçülür ve daha homojen bir yapı elde edilir. Dolayısıyla, uygun çapraz bağlayıcı seçilmesi, istenilen kriyojel elde edilmesinde kritik bir rol oynamaktadır [88].

### 2.3.5 Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojeller, biyoteknoloji alanında önemli bir yer edinmiş yüksek performanslı malzemelerdir. Bu özel yapılar, çeşitli biyolojik moleküllerin saflaştırılması,

depolanması ve taşınması gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kritik bir rol oynamaktadır [89]. Özellikle proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler gibi biyolojik bileşenlerin ayrılması, saflaştırılması, immobilizasyonu ve analizi gibi süreçlerde kullanılmaktadır [90]. Kriyojellerin benzersiz yapısı, yüksek porozite oranları ve mükemmel mekanik dayanıklılığı, biyoteknolojik uygulamalar için ideal özellikler sunar. Bu özellikler, hücre kültürü, doku mühendisliği, ilaç salım sistemleri ve biyosensörler gibi çeşitli alanlarda kriyojellerin başarılı bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır [91]. Bu nedenle, kriyojeller biyoteknolojik araştırma ve endüstriyel uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

### **2.3.5.1 Kriyojellerin Biyomedikal Uygulamaları**

Memeli hücrelerinin büyümesi ve çoğalması için destek malzemesi olarak hidrojellerin kullanımı, herhangi bir biyolojik dokunun hücrelerini doğal olarak çevreleyen ekstraselüler matrisin (ECM) jel benzeri özelliklerini ve bazı durumlarda kimyasal özelliklerini taklit edebildikleri için için karakterize edilebilmektedir [92]. Çözücünün donma noktasının altına yerleştirilen makro gözenekli hidrojeller, yani 'kriyojeller', diğer makro gözenek oluşturma tekniklerine kıyasla içsel olarak birbirine bağlı makro gözenekli yapıları ve oluşumlarının kolaylığı sayesinde son zamanlarda doku mühendisliği ve *in vitro* hücre kültürü alanlarında önemli ilgi görmüştür,

### **2.3.5.2 Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü**

Kriyojeller, hücre kültürü ve doku mühendisliği uygulamaları için umut verici malzemelerdir. Kriyojeller, polimer çözeltilerinin veya süspansiyonlarının kriyojenik dondurulmasıyla oluşan üç boyutlu gözenekli yapılarıdır. Bu malzemeler, birbirine bağlı gözeneklerle karakterize edilir ve hücre infiltrasyonuna, besin difüzyonuna ve atık uzaklaştırmaya olanak sağlar [92].

Hücre kültürü için kriyojellerin birçok avantajı vardır. Yüksek gözeneklilikleri ve geniş yüzey alanları, hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması için uygun bir ortam sağlar. kriyojellerin birbirine bağlı gözenekli yapısı, hücrelerin materyal içinde yayılmasını ve göç etmesini sağlar, böylece doğal hücre dışı matriks ortamını taklit

eder. Ayrıca, kriyojeller belirli gözenek boyutları ve geometrilerine göre tasarlanabilir, bu da hücre davranışını kontrol etmek ve doku oluşumunu yönlendirmek için kullanılabilir [93].

Kriyojellerin bir başka avantajı da biyoaktif moleküllerle işlevlendirilebilmesidir. Büyüme faktörleri, peptidler veya proteinler gibi biyoaktif moleküller kriyojel matrisine veya yüzeyine immobilize edilebilir. Bu, hücre davranışını yönlendiren sinyallerin sağlanmasına ve doku regenerasyonunu teşvik etmeye yardımcı olur [94].

Ayrıca, kriyojellerin mekanik özellikleri ayarlanabilir. Sertlik ve elastikiyet gibi mekanik özellikler, farklı dokuların veya organların gereksinimlerine uyacak şekilde ayarlanabilir. Bu, hücrelerin doğru şekilde işlev görmesi ve farklılaşması için önemlidir, çünkü mekanik ipuçları doku mühendisliği uygulamalarında kritik bir rol oynamaktadır [95].

Kriyojeller biyoyumluluk ve düşük toksisite sahiptir. Bu, kriyojellerin hücre kapsülleme ve nakliyat için uygun olmasını sağlar. kriyojeller, hücre büyümesini desteklemek ve fonksiyonel dokuların oluşumunu kolaylaştırmak için bir iskele görevi görebilir. Çeşitli formlarda şekillendirilebilirler, bu da farklı doku mühendisliği yaklaşımlarına uyum sağlar [96].

Sonuç olarak, kriyojeller yüksek gözeneklilik, ayarlanabilir mekanik özellikler ve biyoaktif moleküllerin immobilizasyonu gibi özellikleri nedeniyle hücre kültürü ve doku mühendisliği alanında büyük potansiyele sahiptir. Bu alandaki ileri araştırmalar ve gelişmeler, rejeneratif tıp uygulamaları için gelecek vaat etmektedir [97].

### **2.3.5.3 Salım Sistemleri**

Polymerik taşıyıcılar kullanılarak ilaç taşıma sistemleri, çeşitli ilaçların belirli ve özel bölgelere teslim edilmesi için tasarlanmıştır [98]. Supermakrogözenekli kriyojeller, ilaçların insan vücuduna iletilmesi için geliştirilen süpermakrogözenekli malzemelerden bir tanesidir. Kriyojellerin biyoyumluluğu ve kontrol edilebilir geçirgenliği, son birkaç on yılda biyoaktif bileşikler (protein, ilaç vb.) için ilaç taşıma

sistemlerinde yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır [99]. Uyarıya duyarlı kriyojeller, çeşitli fiziksel ve kimyasal değişikliklere hassas tepki vermesi nedeniyle araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir. Kriyojellerin yapısı, istenen ilaç salınım profillerini gerçekleştirmek için kontrollü ilaç taşıma sistemleri olarak tanımlanmıştır [100]. Supermakrogözenekli polimerik yapılar, yüksek su içeriği, toksik olmaması, kullanıcı dostu, hafif ve verimli doğası gibi önemli avantajlara sahiptir. Tekrar kullanılabilirlik ve kolay depolama da ek avantajlar sunar. Bu nedenle, bu malzemeler, mekanik ve kimyasal dayanıklılıkları, kolay üretilmesi, mekanik dayanıklılıkları ve düşük maliyetleri nedeniyle ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilir [100]. Kriyojeller, terapötik ilaçların lokal teslimi için de uygun yapı sunar. Yüksek kan uyumluluğu ve bozunmaya karşı direnç, bu malzemelerin mükemmel özellikleridir. Bu malzemeleri, sürekli ilaç taşıma için tümöre yakın büyük bir ilaç dozu teslim etmek için implant sistemlerine iyi bir alternatif sunar. Ayrıca, bu malzemeler ilacın toksik etkilerini büyük ölçüde azaltır ve kemoterapinin terapötik etkisini artırır [101].

#### **2.3.5.4 Biyoayırma ve Saflaştırma**

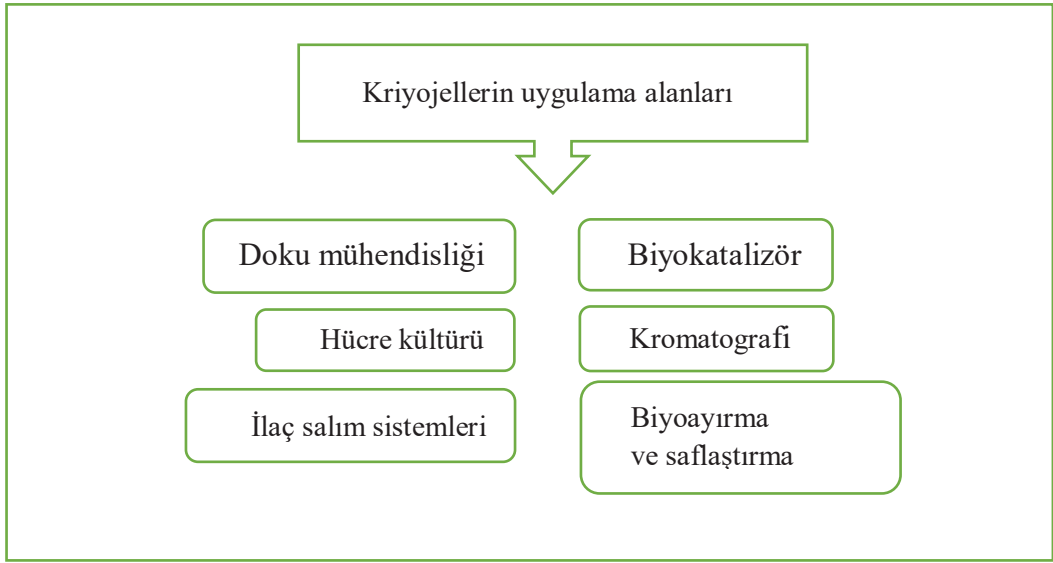
Biyoteknolojik uygulamaların en önemli unsuru, fermantasyon karışımından veya hücre parçalanma süpernatantından hedef ürünün ayrılması ve saflaştırılmasıdır [102]. Peptitler, büyük proteinler, membran parçacıkları, virüsler veya hücre organelleri gibi biyomoleküllerin etkili bir şekilde ayrılması için afinite temelli adsorbentlerin belirli gereksinimleri karşılaması gerekmektedir [103]. Örneğin, parçacıkların engelsiz taşınımı için büyük makro gözeneklere sahip olmaları gerekmektedir. İşlem sırasında uzun süreli fiziksel ve kimyasal stabiliteye sahip olmalı ve temizlik ve arındırma süreçlerinde zorlu koşullara dayanıklı olmalıdırlar [1].

Kriyojellerin benzersiz yapısal özellikleri, adsorpsiyon yetenekleri, hızlı difüzyon süreleri, ince yüzey filmleri ve düşük geri basıncı gibi özelliklerinin sonucu olarak kriyojeller, kromatografik adsorbent malzemeleri olarak biyoteknolojideki en önemli uygulamalarından biri olan ham ekstraktlardan ve fermentasyon karışımından proteinlerin ve peptitlerin ayrılması ve saflaştırılması çalışmalarında tercih edilebilir [104]. Kriyojel kromatografik malzemesi olarak, peptitlerin, proteinlerin, nükleotidlerin, virüslerin, mikrobiyal hücrelerin ve hatta memeli hücrelerin



kromatografik yöntemlerle izolasyonu ve ayrılması gibi biyoayırma ve saflaştırmanın neredeyse tüm alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [105].

Sonuç olarak, kriyojellerin biyoteknolojik uygulamaları, biyomoleküllerin ayrılması, saflaştırılması, immobilizasyonu ve biyokataliz gibi bir dizi işlemde önemli avantajlar sunar. Bu malzemeler, biyoteknoloji alanında daha etkili ve verimli çalışmaları teşvik ederek ilaç keşfi, biyofarmasötik üretim ve gen terapisi gibi alanlarda büyük potansiyele sahiptir.



Şekil 2.5 Kriyojellerin Biyoteknolojik Uygulamaları

### 3. KROMATOGRAFI

Kromatografi, analitik bir yöntemi olup, bir karışım içindeki bileşenlerin ayrılması ve tanımlanması için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, bir mobil faz ve bir sabit fazın etkileşimine dayanır. Mobil faz, örnekteki bileşenleri taşıyan bir akışkan veya gazdır; sabit faz ise, örnekteki bileşenlerin hareketini yavaşlatan ve ayırma sürecini sağlayan bir materyaldir. Kromatografik ayırma süreci, analitlerin mobil faz içindeki hareketleri ve sabit faz ile etkileşimleri üzerine dayanır. Analitler, mobil faz tarafından taşınırken sabit fazla etkileşime girer ve bu etkileşimlerin gücüne bağlı olarak farklı hızlarda hareket eder. Analitlerin farklı hızlarda hareket etmesi, onların ayrışmasını ve bu şekilde karışımdaki bileşiklerin tanımlanmasını ve miktarlarının belirlenmesini sağlar [106].

Kromatografi terimi, Yunanca kökenli "chroma" (renk) ve "graphein" (yazmak) kelimelerinden türetilmiştir. Bu terim, ilk olarak Mikhail Tsvet tarafından 1906'da, bitkilerdeki pigmentleri ayırmak için kullanılan bir yöntemi tanımlamak için kullanılmıştır. Tsvet'in çalışmaları, kromatografinin temel prensiplerini oluşturmuş ve modern kromatografi tekniklerinin gelişimine öncülük etmiştir [107].

Günümüzde ise kromatografi, analitik kimyanın temel bir aracı olarak kabul edilmektedir. Bilimsel ve endüstriyel alanlarda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. İlaç keşfi, kimyasal analiz, gıda ve içecek endüstrisi, çevre analizi, biyokimya, biyoteknoloji gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [108].

#### 3.1 Kromatografi Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografi yöntemleri farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Genellikle sıvı kromatografisi (LC), gaz kromatografisi (GC), iyon değişim kromatografisi (IEC), boyut dışlama kromatografisi (SEC) ve afiniti kromatografisi olmak üzere beş temel kategoriye ayrılır [109].

Sıvı kromatografisi, bir sıvı fazın kullanıldığı bir yöntemdir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) gibi alt kategorilere ayrılır. HPLC, yüksek çözünürlük ve hassasiyet gerektiren analizlerde tercih edilirken,

ince tabaka kromatografisi daha hızlı ve basit analizlerde kullanılmaktadır. Gaz kromatografisi ise, gaz fazının mobil faz olarak kullanılmaktadır. Gaz halindeki analitler, bir kolon içinde sabit faz olarak kullanılan bir matris üzerinde ayrışır. Gaz kromatografisi, uçucu veya gaz fazında olan bileşiklerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır [110].

Kromatografi diğer bir yöntem, iyon değişim kromatografisidir. İyon değişim kromatografisinde sabit faz olarak iyonik yüklü gruplar içeren bir materyal kullanılır. Bu yöntemde, analitlerin iyonik yüklere bağlı olarak ayrılması sağlanır. Pozitif veya negatif yüklü iyonlar, sabit fazdaki iyonik gruplarla etkileşime girer ve birbirinden ayrılırlar [111].

Boyut dışlama kromatografisi, bir jel matrisi veya gözenekli bir malzeme kullanır. Analitler, moleküler boyutlarına bağlı olarak ayrılırlar. Büyük moleküller, jel matrisinde daha hızlı hareket ederken küçük moleküller matris içinde daha fazla hapsedilir [112].

Biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için uygulanan afiniti kromatografisi önemli bir tekniktir. Afiniti kromatografide, analitlerin hedeflenen bir hedef moleküle spesifik olarak bağlanmasını sağlayan bir ligand içeren sabit faz kullanılmaktadır. Bu yöntem, spesifik bağlanma etkileşimi sayesinde analitin ayrılmasını sağlar. Proteinlerin, enzimlerin ve biyolojik bileşiklerin saflaştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır [10].

Bu şekilde kromatografi yöntemleri, analitlerin farklı özelliklerine ve hedeflere bağlı olarak kullanılan çeşitli teknikleri içerir. Her yöntem, belirli bir ayrıştırma veya saflaştırma ihtiyacını karşılamak için benzersiz özelliklere sahiptir.

### **3.1.1 Afinite Kromatografisi**

Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği'ne göre, afinite kromatografisi, örnek içinde belirli analitlerin ayrılması ve analiz edilmesi için bir "biyolojik etkileşim" kullanan bir sıvı kromatografisi tekniği olarak tanımlanmaktadır. Afinite kromatografisi, iki molekül arasındaki yüksek derecede spesifik biyolojik etkileşime

dayalı olarak çok sayıda tür içeren bir karışımdan bir molekülün veya molekül grubunun seçici olarak saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir [113]. Bu yöntemde, analit karışımı mobil faz olarak kullanılır ve sabit faz üzerindeki ligand ile etkileşime girer. Ligand, hedef molekülle spesifik bir bağlanma etkileşimi sağlar, diğer bileşikler ise zayıf veya hiçbir etkileşim göstermezler. Bu etkileşim sayesinde, hedef molekül immobilize edilmiş ligand üzerinde tutulurken diğer bileşikler geçici olarak geçerler [114].

Afiniti kromatografisi, proteinler, enzimler, DNA ve RNA gibi biyolojik moleküllerin saflaştırılması için sıkça kullanılan bir tekniktir. Proteinler, doğal olarak birçok başka bileşikle hücre sıvısı ya da farklı bir ortam içerisinde bulunabilir. Afinitite kromatografisi, bir proteinin spesifik bir antikor veya diğer moleküler ligandla etkileşimine dayanarak, proteinin diğer bileşiklerden ayrıştırılmasını sağlar [115]. Bu yöntem, yüksek saflıkta ve yüksek verimlilikte protein eldesi sağlayarak biyokimyasal ve biyoteknolojik çalışmalarda önemli bir araç haline gelmiştir.

### **3.1.1.1 Afinitite Kromatografisinin Uygulanışı**

Afinitite kromatografisinin uygulanması aşağıdaki önemli adımları içerir:

i. Ligand Seçimi: Hedef molekül ile spesifik bir etkileşime girebilecek bir ligandın seçilmesi gerekmektedir. Ligand, hedef molekülün tanıyıcı bölgeleriyle uyumlu olmalı ve güçlü bir bağlanma sağlamalıdır. Ligand genellikle antikor, reseptör veya bağlanma proteininden oluşur.

ii. Sabit Faz Hazırlama: Seçilen ligand, sabit faz olarak kullanılmak üzere bir taşıyıcı matris veya yüzeye immobilize edilmelidir. Bu immobilizasyon, ligandın hedef molekülü seçici olarak tutmasını sağlar.

iii. Numune Hazırlama: Karmaşık bir karışımdan hedef molekül içeren numune hazırlanır. Numune genellikle bir çözelti içinde bulunur ve mobil faz olarak kullanılır.

iv. Numunenin Uygulanması: Numune, immobilize edilmiş ligand ile temas ettirilir. Hedef molekül, ligand ile spesifik bir etkileşim kurar ve immobilize edilmiş ligand üzerinde tutulurken diğer bileşikler geçer.

v. Yıkama: İlk adımda hedef molekül dışındaki diğer bağlanmayan bileşiklerin uzaklaştırılması için bir yıkama adımı gerçekleştirilir. Bu adım, spesifik olmayan bağlanma veya zayıf etkileşim gösteren bileşiklerin sabit fazdan uzaklaştırılmasını sağlar.

vi. Elüsyon: Hedef molekülün immobilize edilmiş ligand ile olan bağının kırılması ve saflaştırılmış hedef molekülün elde edilmesi için bir elüsyon adımı gerçekleştirilir [10,116].

### **3.1.2 Afinite Kromatografisi Yöntem Çeşitleri**

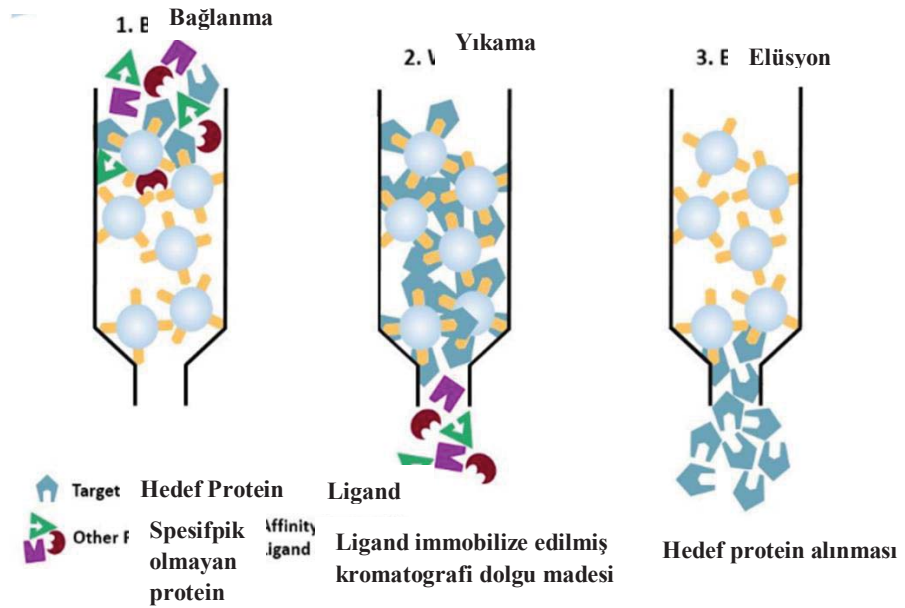
Afinite kromatografisi, çeşitli alt türleriyle bilinir. Bunlar arasında İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC), Metal Oksit Afinite Kromatografisi (MOAC), Boronat Afinite Kromatografisi (BAC), Protein A Afinite Kromatografisi (PAAC), Boya-Ligand Afinite Kromatografisi (DLAC), Hücre Yakalama Afinite Kromatografisi (CAC) ve Pseudospesifik Ligand Afinite Kromatografisi (PLAC) bulunmaktadır. Son zamanlarda, toplu uygulamalarda ve kolonlarda kullanılan sabit fazlar ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmeler, analitik amaçlarla numunelerin hazırlanması ve karmaşık numunelerden biyomoleküllerin saflaştırılmasını hedefleyerek özel olarak tasarlanmıştır [117].

#### **3.1.2.1 İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi**

İmmobilize meta afinite kromatografisi yönteminde, proteinlerin adsorpsiyonu, immobilize edilmiş bir metal iyonu ile proteinlerin yüzeyinde bulunan elektron verici gruplar arasındaki etkileşime dayanır. Elektron vericileri (ligantlar) Lewis bazları ve elektron alıcıları (metal iyonları) Lewis asitleridir. Bir elektron vericisi çok sayıda elektrona sahip olduğunda ve bir metale bağlandığında, güçlü bir şelat bağı oluşturur. Proteinlerin yüzeyinde histidin, triptofan ve sistein olarak bilinen ve IMAC

kolonundaki metal iyonuna karşı bir afinitesi olan birkaç molekül bulunur. Her proteinin farklı sayıda bağlanma birimi olduğundan ve bağlanma birimleri molekülün yüzeyinde eşit aralıklarla olmadığından, uygun koşulların seçilmesi bağlanma afinitesinin optimize edilmesini sağlar ve ayırma sağlanabilir. IMAC'nın ayırma prensibi, proteinlerin veya diğer biyomoleküllerin immobilize edilmiş metal iyonlarına olan farklı bağlanma affinitelerini kullanarak ayırma işlemi gerçekleşir [118]. Kromatografik destek üzerine bağlanmış olan şelatlaştırıcı bileşiklerindeki elektron verici atomlar (N, S ve O), metal iyonlarını koordine ederek metal şelatlar oluşturabilir. Genellikle, metal koordinasyon bölgelerindeki yer alan su veya tampon molekülleri, protein yüzeyindeki elektron verici gruplarla yer değiştirebilir [119]. Bu immobilize metal iyonları, örnek içindeki hedef moleküllerle seçici olarak etkileşime girer ve diğer bileşenlerin uzaklaştırılmasını sağlar. Ardından hedef moleküller, uygun koşullar altında immobilize metal iyonlarından ayrıştırılır ve toplanır [120].

IMAC, protein saflaştırma, analiz ve biyomoleküler araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Metal iyonlarının immobilize edildiği matris, bağlanma ve elüsyon koşulları, analiz edilen hedef molekül ve kullanılan metal iyonuna bağlı olarak optimize edilir. Bu yöntem, biyolojik örneklerin karmaşıklığını azaltarak, hedef moleküllerin yüksek saflıkta saflaştırılmasını sağlar ve biyokimyasal çalışmalarda önemli bir araç olarak değerlendirilir [121].



Şekil 3.1: Afinitite Kromatografisi Genel prensibi

IMAC yönteminde, ligand olarak nitrilotriasetik asit (NTA) ve immobilize metal olarak  $Ni^{2+}$  iyonları kullanmak yaygındır [122]. İminodiasetik asit (IDA) veya 1,4,7-triazasiklononan (TACN) gibi diğer ligandlar kimyasal olarak benzerdir, ancak kompleksleşme bölgelerinde farklılık gösterir [123]. Sonuç olarak bu reaksiyon, immobilize metal iyonlarıyla bağlanmayı ve etkileşimi etkiler.  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  gibi diğer metal iyonları, farklı bağlanma kuvvetleri ve seçicilik sunabilir. Özellikle  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Co^{2+}$ 'dan daha düşük toksisite nedeniyle  $Ni^{2+}$ 'ye değerli alternatifler olacaktır [124]. tris(karboksümetil) etilendiamin (TED) en yaygın metal şelatlayıcı ajanlardan bir tanesidir [125].

IMAC, Histidine zengin proteinleri saflaştırmak için de oldukça etkili kullanılan bir yöntemdir. Histidin, içerdiği imidazol halkasındaki elektron verici gruplar nedeniyle immobilize metal iyon içeren matrislerle (örn.  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ ) güçlü etkileşimlere sahiptir. Sonunda, histidin-etiketli proteinler, elüsyon tamponununun pH'ını veya imidazol derişimini değiştirerek ayrılabilir [126]. Bunların yanı sıra, amino asit temelli monomerler, örneğin N-Metakriloil Histidin gibi monomer, içerdiği histidin sayesinde pseudo-spesifik ligand olarak ffinite özelliği gösterebildiği hibi, sahip olduğu imidazol halkası sayesinde metal iyonlarıyla oldukça güçlü koordine kovalent bağlar yaparak metal iyonlarının kuvvetli bir şekilde immobilizasyonuna olanak sağlar, böylece birçok biyolojik molekülün ayırım ve saflaştırma çalışmalarında uygulanmaktadır [127,128].

## 4. SIĞIR SERUM ALBÜMİN

Serum albüminler kan plazmasındaki proteinlerin en bol olanlarıdır ve albümin, serum albümin ailesinde en çok çalışılan proteinlerden biridir [129]. Serum albümin, vücutta karaciğer tarafından üretilen ana plazma proteinlerinden biridir. Kan dolaşımındaki en bol bulunan çözünür protein olması nedeniyle, ozmotik basıncın ve kan pH'sının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Homeostazın (iç dengenin) korunmasında kritik rol oynar ve vücutta pek çok işlevleri bulunmaktadır [130]. Serum albüminin hücre kültürü, bloklama ajanları ve protein bağlanması yanı sıra, farmasötik ilaçların taşınmasında da kullanılır. Albüminler metal iyonları, toksinler ve metabolitlerin bağlanıp taşınması, kan damarlarının ozmotik basıncının düzenlenmesi gibi kritik fonksiyonlarına da sorumludur [131]. Serum albümini, sadece biyokimyasal testlerde standart protein, hücre kültürü ortamlarında besin kaynağı ve biyoanalizlerde bloklama ajanı olarak değil, aynı zamanda ilaç taşıma uygulamalarında da önemli bir rol oynar. İlaçların hedef dokulara etkin bir şekilde ulaştırılmasında serum albümini kullanışlı bir taşıyıcı molekül olarak hizmet vermektedir [132]. Serum albümin, diğer proteinleri çözeltide stabilize edebilme yeteneği nedeniyle sıklıkla farmasötik ürünlerin yardımcı bileşeni olarak kullanılır. Ayrıca serum albümin yanık hastalarında, kanama, yetersiz beslenme bozuklukları ve organ yetmezliği gibi durumlarda terapötik amaçlı kullanılabilir [130,133]. Serum albümin bir kaç çeşidi vardır. İnsan serum albümin (HSA), sığır serum albümin (BSA), köpek serum albümin (DSA) ve rat serum albümin (RSA) en yaygın kullanılan türlerdir.

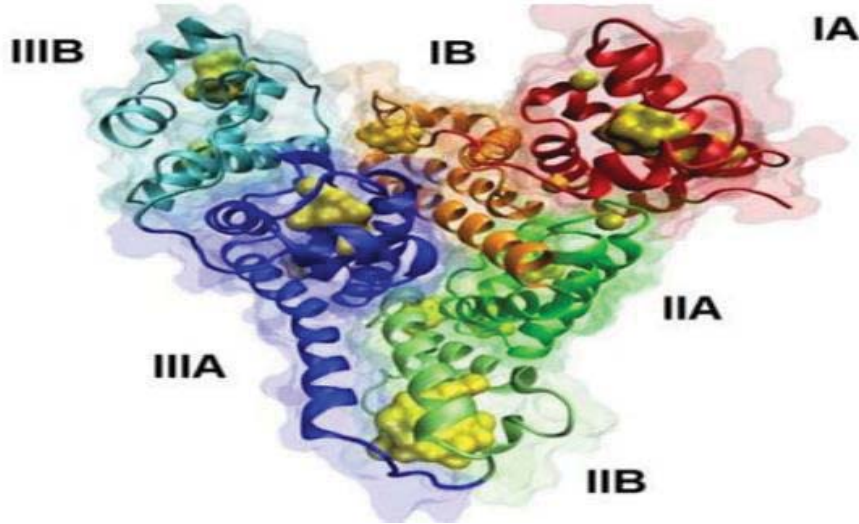
### 4.1 Sığır Serum Albuminin Yapısal Özellikleri

Sığır serum albümin (BSA) ve insan serum albümin amino asit dizilimleri arasında yaklaşık %76 oranında benzerlik vardır [134]. BSA, tek bir polipeptid zinciri olan asidik bir proteindir ve memelilerin vücut sıvıları ve dokularında bol miktarda bulunur. BSA, oldukça uzun bir yarı ömre sahip olan globüler bir proteindir ve yarı ömrü 19 gündür [135]. BSA molekülü 583 amino asitten oluşur, tek bir zincir halinde bağlanmış ve 17 sistein kalıntıları (sekiz disülfür bağı ve bir serbest sülfid grubu) ile çapraz bağlanmıştır, ve moleküler ağırlığı 66400 Dalton'dur. Amino asit zinciri, disülfür bağları tarafından dokuz loba bölünmüş üç benzer ama yapısal olarak farklı



domain (I, II ve III)'den oluşur ve kalp şeklindeki bir molekül oluşturur. Her domain, A ve B olmak üzere iki alt-domaininden meydana gelir. Proteinin ikincil yapısı ağırlıklı olarak (%74)  $\alpha$ -heliks yapısındadır, geri kalan polipeptit zinciri ise dönüşler, uzatılmış veya alt-domainleri arasındaki esnek bölgelerde yer alırlar [136].

BSA'nın karakteristik yapısal özelliklerinden biri, triptofan, metiyonin, glisin ve izolösin içeriğinin düşük olması, buna karşın glutamik asit ve lizin gibi iyonik amino asitlerin bol miktarda bulunmasıdır. İyonlaşmış bu kalıntıları, proteinin nötr pH'da molekül başına 185 iyon yüküne sahip olmasına ve dolayısıyla yüksek çözünürlüğüne katkıda bulunur. BSA, bir globüler glikozilasyonu olmayıp; karbonhidrat gruplarını eksik olan nadir kan plazması proteinlerinden biridir, çünkü karaciğerde protez grupları veya diğer katkı maddeleri olmadan sentezlenir [137].



Şekil 4.1: BSA'nın üç boyutlu yapısı [130]

## 4.2 Sığır Serum Albuminin Biyolojik Fonksiyonları

Sığır serum albümin (BSA), birçok biyolojik fonksiyona sahip olup, çok yönlü bir proteindir. Birçok endojen ve eksojen bileşik (ilaçlar, hormonlar, yabancı maddeler ve yağ asitleri dahil olmak üzere), kan dolaşımına girdikten sonra, serum albüminleri ile kompleks oluşturarak taşınırlar. Bu protein sınıfı, aynı zamanda kolloid osmotik kan basıncına ve kan pH'sının korunmasına da katkıda bulunur, ancak albüminlerin en önemli özelliği, farklı bileşiklere geri dönüşümlü olarak bağlanabilmeleridir [138].

Serum albümin, plazma içindeki hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırır ve ilaçların dolaşımını, metabolizmasını ve etkinliğini de etkiler [139]. Serum albüminleri ayrıca, memelilerdeki  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlaşmış veya biyolojik olarak aktif derişimlerinin kontrolünde de rol oynamaktadır [140].

İlaçların plazma proteinlerine olan bağlanma affinitesi, ilacın kan dolaşımındaki derişiminin ve biyolojik etkisini doğrudan etkilemesi bilinmektedir. Genellikle, zayıf protein bağlanmasının etkisi kısa ömür veya zayıf dağılım ile sonuçlanırken, güçlü bağlanma ise ilaç derişiminde azalmaya neden olur; çünkü farmakolojik aktivite gösteren ilacın bağlanmamış kısmıdır [141].

BSA ayrıca antioksidan etkiye sahiptir. Oksidatif stres ile ilişkili serbest radikalleri nütürleştirerek hücrelere koruma sağlar. Bu, hücre hasarının önlenmesine yardımcı olur ve genel sağlık durumunu destekler. Bağışıklık sistemi desteği de BSA'nın önemli bir işlevidir. BSA, bağışıklık sistemi hücrelerinin uygun fonksiyon gösterebilmesi için gerekli olan besinleri ve sinyal moleküllerini taşır. Bu, bağışıklık tepkilerinin etkinliğini artırır ve enfeksiyonlara karşı koruyucu bir rol oynar [142]. BSA, amino asit kaynağı olarak da görev yapar. Hücre büyümesi, onarımı ve yeniden yapılanması için gerekli olan amino asitlerin sağlanmasında önemli bir rol oynar [143].

Bu şekilde, BSA'nın çok yönlü biyolojik fonksiyonları, vücutta çeşitli süreçlere katkıda bulunduğunu ve farmasötik araştırmalarda ilaç taşıma ve etkileşim çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir protein olduğunu göstermektedir [144].

### **4.3 Sığır Serum Albumin ile Metal Komplekslerin Etkileşimi**

Metal komplekslerinin BSA ile etkileşimi, biyolojik sistemlerde önemli bir konudur. BSA, çok çeşitli endojen ve ekzojen bileşikleri taşıyabilen ve farklı fonksiyonlara sahip bir proteindir. Metal gruplarıyla kompleks yapmış BSA'nın, dağılımı, taşınması, metabolizması ve biyolojik aktivitelerini önemli ölçüde etkileyebilir. Bu etkileşimler, metal komplekslerinin yapısal özellikleri, yükleri, lipofilisite ve koordinasyon özellikleri gibi faktörlere bağlıdır. Örneğin, pozitif yüklü metal kompleksleri, negatif yüklü aminoasit kalıntılarına (aspartat ve glutamat)

güçlü elektrostatik etkileşimler kurarken, hidrofobik metal kompleksleri de BSA'nın hidrofobik bölgelerine bağlanabilir [145].

Metal komplekslerin BSA'ya bağlanması, komplekslerin çözünürlüğünü, stabilitesini, hücre içi taşınmasını ve hedef bölgelere ulaşmasını etkileyebilir. Bu etkileşimler, metal komplekslerinin biyolojik sistemlerdeki dağılımı, metabolizması ve toksisitesi üzerinde kritik rol oynar. Ayrıca, metal komplekslerinin BSA ile etkileşimi, bu proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinde de değişikliklere neden olabilir. Örneğin, metal bağlanması, BSA'nın ikincil ve üçüncül yapısını, enzim aktivitesini veya antioksidan özelliklerini etkileyebilir [146]. Bu nedenle, metal kompleksleri ile BSA arasındaki etkileşimlerin anlaşılması, metal komplekslerinin biyolojik sistemlerdeki davranışlarını anlamamız ve ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmaları için önemlidir. Bu tür çalışmalar, metal komplekslerinin terapötik potansiyellerinin daha iyi değerlendirilmesine ve öngörülebilirliğinin artırılmasına katkı sağlamaktadır [147].

#### **4.4 Sığır Serum Albuminin Kullanımı**

BSA, küçük, kararlı ve nispeten reaktif olmayan bir plazma proteindir. BSA'nın benzersiz fizikokimyasal özellikleri, onu çeşitli biyokimyasal ve tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan önemli bir molekül haline getirmektedir. ELISA (Enzime Bağlı İmmüno-sorbent Analiz), immüno-blot ve immünohistokimya gibi çeşitli biyokimyasal uygulamalarda mevcuttur [148–150]. İmmünohistokimya (antijenlerin hücrelerde tanınması için antikorların kullanıldığı süreç) sırasında, doku kesiti tipik olarak spesifik olmayan bağlanma bölgelerini bloke etmek için BSA bloklayıcıları ile inkübe edilir. Bu işlem, antikor-antijen bağlanmasının spesifitesini ve duyarlılığını artırır. BSA, hücre kültürü ortamlarına eklenerek hücre büyümesi ve çoğalmasını destekler [150–152]. Enzimleri stabilize etmek, protein miktarını belirlemek ve ilaç dağıtımı için nanopartikül taşıyıcılar sentezlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [153,154].

## 5. ANTİMİKROBİAL JELLER

Tıbbi uygulamalar için yeni biyomalzeme geliştirme ihtiyacı giderek artmaktadır. Uygun yapısal özelliklere sahip modifiye biyomateryallerin keşfi, farklı biyomedikal disiplinlerde kullanım için önem kazanmaktadır.

Antimikrobiyal ajanlar arasında, polimerik jeller antibiyotiklere iyi bir alternatif olabilir. Bunun nedeni, polimer jellerin çoklu biyolojik işlevlere sahip olması ve biyolojik uyumluluk göstermesidir. Böylece polimer jeller, antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra vücut ile uyumlu olma özelliği sergileyebilmektedir. Hidrojellerin yapısı gözenekli, oldukça esnektir ve belirli miktarda su tutar. Bu özellikler nemli ve canlı bir vücut dokusu benzeri ortam sağlar ve dolayısıyla onu biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere uygun bir biyomalzeme haline getirir [155].

Antimikrobiyal özellikler gösteren hidrojeller modifiye edilmiş türüne antimikrobiyal hidrojel denir. Antimikrobiyal kriyojelin antimikrobiyal özellikleri, antimikrobiyal monomerlerin/polimerlerin kalıtımından veya metal nanopartikül, metal oksit, antibiyotikler ve diğer sentetik ilaç molekülleri gibi antimikrobiyal ajanların dâhil edilmesiyle oluşur [156].

Antimikrobiyal hidrojeller, çeşitli biyomedikal uygulamalar için önemli bir biyomalzemedir. Antibiyotiklerin aşırı kullanımını nedeniyle bakteriler antibiyotiklere karşı savunmak için alternatif bir mekanizma geliştirir. İlaç ve biyomedikal alanlar ilaç direnci sorunuyla karşı karşıya kaldıkça antimikrobiyal hidrojele daha fazla ilgi gösterilmiştir. Bu nedenle antibiyotik direnci, farmasötik ve biyomedikal bilim için ciddi bir sorun haline gelir. Son birkaç yıldır biyomedikal araştırmacılar, antibiyotiklere uygun bir alternatif sağladığı ve hidrojin antimikrobiyal malzemesi esas olarak mikropların hücre zarına etki ederek onları yok ettiği için mikroplara karşı direnç geliştirme şansı sağladığı için antimikrobiyal hidrojele daha fazla dikkat etmektedir. Böylece, insan vücudunda ciddi yan etkilere neden olan birçok antibiyotiğin yerini başarıyla alır. Antimikrobiyal hidrojel, mikroorganizmanın hücre zarını hedef alır ve onu yok eder. Bu benzersiz hücre lizis mekanizması nedeniyle, mikroplar nadiren antimikrobiyal hidrojele karşı direnç geliştirebilirler [157].

Nişasta, selüloz, kitosan ve peptitler gibi doğal polimer bazlı hidrojellerin antimikrobiyal özelliklerinin keşfi ile bu tür malzemelere giderek artan bir ilgi vardır. Ayrıca, doğal polimerler, kitosan, modifiye edilmiş katyonik veya anyonik nişasta, selüloz ve peptit gibi antimikrobiyal özellikleri devamını getirmiş olarak ve antimikrobiyal özellikler sergiler [158].

pH, sıcaklık, ışık vb. gibi dış uyarılara verilen tepkiler üzerine çalışılan ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan çeşitli akıllı antimikrobiyal hidrojeller sentezlenmiştir. pH'a duyarlı hidrojeller, büyük ölçüde ilaç dağıtımının kontrolünde kullanılır çünkü dış pH'a yanıt olarak suyu emer ve yutar, hidrojelin ilacı belirli bir alanda salmasını kolaylaştırır [159].

Fotoaktif hidrojeller, antimikrobiyal aktivitelerini ışık varlığında gösterir ve antimikrobiyal pansuman, yara iyileştirme ve antimikrobiyal gıda kaplaması hazırlama gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır [160].

Ayrıca, mükemmel su emme ve şişme özelliklerine sahip antimikrobiyal hidrojeller, tarımsal kullanım için ortaya çıkan yumuşak malzemelerdir [161,162].

## **5.1 Hidrojellerin Antibakteriyel Mekanizması**

Antibakteriyel ajanlar, hedef aldıkları bakteri türüne göre farklı mekanizmalar aracılığıyla bakterileri öldürebilirler. Örneğin, hücre duvarı veya zarının bozulması, oksidatif stres oluşturulması, besin kaynaklarının engellenmesi gibi çeşitli yollarla bakterilerin eliminasyonu sağlanabilir. Ayrıca, ışık destekli antibakteriyel özellikler de polimer jellerde görülebilir. Bu durumda, jel matrisine eklenen fotoaktif bileşikler, ışık uygulaması ile reaktif oksijen türevleri üretebilir ve bakterileri öldürebilir [163].

Çoğu dezenfektan ve antibakteriyel ajan, temas yoluyla veya bakteriyel hücrenin şişmesi sonucu patojenleri öldürür. Ayrıca, bakterilerin besin kaynaklarını da yok ederek çoğalmalarını önleyebilirler [164]. Antibakteriyel polimerler tipik olarak ilk yöntemle, yani çoklu adımlar içeren bir mekanizma ile bakterileri öldürür. İlk aşamada, polimerik malzeme bakteriyel hücre duvarına yapışmalıdır. Çoğu bakteri yüzeyinin negatif yüklü olması nedeniyle, polimerik katyonların adsorpsiyonu,

polimerik anyonlara göre daha etkili olabilir. Daha sonra, antibakteriyel ajanlar hücre duvarına difüze olmalı ve sitoplazma membranı tarafından emilmelidir. Daha düşük molekül ağırlığına sahip bazı küçük antibakteriyel moleküller, difüzyon aşamasında daha hızlı ilerler, ancak antibakteriyel polimerler tarafından adsorpsiyon daha verimlidir. Son olarak, sitoplazma membranının bozulması ve sitoplazma bileşenlerinin dışarı sızması hücre ölümüne yol açar [165,166].

Özetle, antibakteriyel polimerler, hücre duvarına adsorpsiyon, antibakteriyel ajanların difüzyonu ve sitoplazma membranının bozulması gibi çoklu adımlar içeren bir mekanizma aracılığıyla bakterileri öldürürler.

## 5.2 Kriyojellerin Antibakteriyel Aktivitesi

Daha önce de bahsedildiği gibi, doğal olarak antimikrobiyal özelliklere sahip hidrojel, bakterilerle fiziksel temas halinde bakterileri öldürmek için önemli bir potansiyel göstermektedir. Bu polimerler, katyonik yapıları nedeniyle bakteriyel hücre duvarına nüfuz edebilir ve hücre ölümüne yol açabilirler. Bununla birlikte, bu polimerik jellerin sert yapısı nedeniyle, uygulama alanları sınırlıdır [167].

Kriyojellerin, geleneksel hidrojelere göre önemli avantajlar sunar. Yüksek derecede birbirine bağlı gözenekli yapıları sayesinde, kriyojeller yüksek şişme kapasitesi ve üstün mekanik özelliklere sahiptir. Kriyojellerin antimikrobiyal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar, bu jellerin antimikrobiyal aktivitesinin, polimerin metal, iyonik sıvılar veya ilaçlar gibi diğer bakterisidal maddelerle kombinasyonundan kaynaklandığını göstermektedir [168,169]. Bu platformların antimikrobiyal aktivitesine rağmen, salınan metal ve ilaçlar gibi maddelerin biyolojik ve çevresel kontaminasyon riski bulunmaktadır. Kriyojel temelli antibakteriyel platformlar, yeterli antibakteriyel etkinlik için ek antibakteriyel ajanlarla (ör. Antibiyotikler) modifikasyona ihtiyaç duymaktadır [170]. Ancak, antibiyotiklerin kullanılarak antimikrobiyal aktivitenin artırılması, ilaç direnci gibi önemli bir dezavantaja sahiptir. Bu nedenle, biyomedikal uygulamalarda, antibiyotik olmayan bir yöntem acilen ihtiyaç duyulmaktadır [29].

## 6. DENEYSEL BÖLÜM

### 6.1 Kimyasal Reaktifler

BSA ve kriyojellerin hazırlanması için kullanılan kimyasallar; ana monomer (2-Hidroksietil metakrilat, HEMA), fonksiyonel monomer (glisidil metakrilat, GMA) ve çapraz bağlayıcı (etilen glikol dimetakrilat, EGDMA), başlatıcı, amonyum persülfat (APS), redoks çifti, N, N, N', N'-tetrametilen diamin (TEMED) ve yüzey aktif madde (sodyum dodesil sülfat, SLS) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, ABD) temin edildi. Tüm kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Tüm deneylerde, distillenmiş su kullanıldı.

### 6.2 Kriyojellerin Hazırlanması

poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin hazırlanmasında literatürde yer alan sentez prosedürü uygulanmıştır [171]. Buna göre, HEMA ve GMA'dan oluşan süpermakrogözenekli poli(HEMA-GMA) kriyojeli kısmen dondurulmuş koşullar altında çapraz bağlayıcı EGDMA varlığında kopolimerize edilerek oluşturuldu. Bu amaca ulaşmak için, 2,25 mL HEMA ve 0,50 mL GMA'yı 3,25 mL deiyonize suda çözerek bir monomer fazı hazırlandı. Eş zamanlı olarak, EGDMA (1,2 mL) ve SDS (0,5 g), 12,8 mL suda çözülerek hazırlandı ve çapraz bağlayıcı fazı oluşturuldu. Ardından, her iki faz birleştirildi ve belirli bir süre karıştırılmaya bırakıldı. Elde edilen karışım belli bir süre +4°C'de soğumaya bırakıldı. Daha sonra, reaksiyon başlatıcısı olarak 20 mg APS ve reaksiyon hızlandırıcısı olarak 30 µL TEMED çözeltiye ilave edilip, reaksiyon karışımı yaklaşık 1 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra hızlıca 5 mL hacimli ve 0,8 cm iç çaplı, plastik şırıngaya aktarıldı. Şırıngada bulunan polimerizasyon çözeltisi ise 24 saat boyunca buzlukta dondurulmaya tabi tutuldu. 24 saatin ardından buzluktan çıkarılan kriyojeller oda koşullarına getirilerek önce, freeze-thawing işlemine tabi tutuldu. Daha sonra ise herhangi bir safsızlık ya da reaksiyona dail olmamış polimer öncüllerinin reaksiyon ortamından uzaklaştırılması amacıyla kriyojeller distillenmiş su ile birkaç kez yıkandıktan sonra kullanılmaya hazır olana kadar deney koşullarına uygun tampon çözelti ile şişirilmiş halde tutuldular.

### **6.3 Metlal Şelatlaştırıcı Ligand İmmobilizasyonu ve Metal İyonu Yükleme**

Kriyojellerin immobilize metal affinite kromatografisinde kullanım özgülüğünü arttırabilmek için, GMA monomerinin epoksi grupları bazik ortamda NVF moleküllerinin fonksiyonel amino grubuyla reaksiyona sokularak metal affinite ligandı, kimyasal olarak polimerik kriyojel matriksine tutturulmuş oldu (poli(HEMA-GMA)-NVF). Kriyojeller bu aşamada 2 saat boyunca 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile ön işleme tabi tutuldu. Ardından, kriyojel, 1 saat boyunca seçilen pH tamponu içeren çözelti kriyojel kolonlardan geçirilerek polimerlerin dengeye gelmesi sağlandı. İmmobilizasyon amacıyla derişimi 10 mg/mL olan NVF'nin sulu çözeltisi, 24 saat boyunca peristaltik bir pompa (Watson Marlow, 400B Serisi, Falmouth, İngiltere) kullanılarak 6 saat boyunca kriyojel kolondan geçirildi. Bu işlemin sonrasında ise hazırlanan 1000 ppm derişimli metal iyonu çözeltileri kriyojel kolondan geçirilerek metal iyonu yüklemesi tamamlanmış oldu.

### **6.4 Kriyojellerin Karakterizasyonu**

#### **6.4.1 Kriyojellerin Fiziksel Karakterizasyonu**

##### **6.4.1.1 Jelleşme Verimi**

Kriyojellerin jelleşme verimliliği (G) Eşitlik 5.1'deki bağıntıya göre hesaplanmıştır. Buna göre, kriyojeller ilk olarak kurutulmuş ve tartımı alınmıştır ( $W_D$ ). Ardından ise polimerizasyona dahil olan monomerlerin toplam kütesine ( $W_t$ ) oranlanarak G değeri hesaplanmıştır.

$$G = \frac{W_D}{W_t} \times 100 \quad (5.1)$$



#### 6.4.1.2 Su Tutma Davranışları

Kriyojellerin su tutma davranışları aynı zamanda su içerisinde bekletilerek yapılan şişme testi sonucunda hesaplanmıştır. Şişme derecesi (S.D.), şişme oranı (S.R.), makrogözeneklilik (M), gözeneklilik (P), gözeneklilik hacmi (P.V.) aşağıdaki eşitlikler aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$S. D. = \frac{W_1}{W_D} \quad (5.2)$$

$$S. R. = \frac{W_1 - W_D}{W_D} \times 100 \quad (5.3)$$

$$M(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_2} \times 100 \quad (5.4)$$

$$P (\%) = \frac{W_1 - W_D}{W_1 - W_2} \quad (5.5)$$

$$P. V. (\%) = \frac{W_3 - W_D}{W_D} \quad (5.6)$$

İki saat süre boyunca su içerisinde bekletilen kriyojelin kütlesi ( $W_1$ ), suda bekletildikten sonra mekanik sıkıştırma yöntemi ile gözeneklerindeki su uzaklaştırılmış kriyojelin kütlesi ( $W_2$ ), kurutulmuş kriyojelin N-Hekzan içerisinde bekletildikten sonraki kütlesi ise ( $W_3$ ) olarak sembolize edilmiştir.

#### 6.4.1.3 Kriyojellerin Mekanik Dayanıklılık Testi

Kriyojellerin mekanik dayanıklılığını test etmek amacıyla gerçekleştirilen deneyde, kriyojeller ilk olarak kurutulmuş tartılmıştır ( $W_D$ ). Buna karşılık, distillenmiş su içerisinde şişmeye bırakılan kriyojeller, 24 saat boyunca dakikada 250 rpm hızda karıştırılmaya bırakıldı. Bu işlem sonucunda kriyojeller sulu ortamdan çıkarılarak tekrar kurutulmuş ve kuru haliyle tekrar tartım alınmıştır ( $W_S$ ). Bu işlemlere bağlı olarak kriyojellerin mekanik dayanıklılık testi sonucu (ST) aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır.

$$ST = \frac{W_S}{W_D} \quad (5.7)$$

#### 6.4.1.4 Kriyojellerin Yoğunluklarının Tespiti

Kriyojellerin yoğunluklarının tespitinde ilk olarak numunelerin boyutları, hacimlerinin belirlenebilmesi amacıyla kullanıldı. Elde edilen veriler ile birlikte silindirik boyutlardaki kriyojellerin hacimlerine göre ıslak-kuru ağırlık oranı sayesinde kriyojel numunelerin ıslak ve kuru yoğunlukları ayrı ayrı elde etmek için Eşitlik 5.8 aracılığıyla hesaplandı.

$$\rho = \frac{W}{(\pi r^2 H)} \quad (5.8)$$

Bu eşitlikte, “ $\rho$ ” yoğunluktur ( $g/cm^3$ ), “W” kriyojel numunesinin ağırlığıdır (g). Bununla birlikte “r” kriyojelin yarı çapı (cm) ve “H” numunenin kalınlığıdır (cm).

### 6.5 Kriyojellerin Kimyasal Karakterizasyonu

#### 6.5.1 FTIR-ATR Analizi

Fonksiyonel grup analizi amacıyla kriyojeller FTIR analizine tabi tutulmuştur. Kurutulmuş kriyojeller ATR (Nicolet iS10 ATR-FTIR, Thermo Scientific, Madison, WI, ABD) probu üzerine yerleştirilerek  $500-4500 \text{ cm}^{-1}$  frekans aralığında FTIR spektrumları elde edildi.

#### 6.5.2 Yüzey ve Gözenek Morfolojisi

Kriyojellerin yüzey ve gözenek morfolojisi Alan Taramalı- Elektron Mikroskopisi (FE-SEM) (ZEISS GeminiSEM 500) ile analiz edildi. Kurutulan kriyojeller, FESEM numune tutucusu üzerinde moleküler altın-paladyum karışımı ile 15 dakika süreyle kaplandı ve ardından kriyojellerin çeşitli büyütme oranlarında FESEM görüntüleri elde edildi.

#### 6.5.3 Elementel Analiz

Kriyojellerin element içeriklerinin belirlenmesi amacıyla EDX analizi yapılmış olup, özellikle metal iyonlarının immobilize olduğunu desteklemek amacıyla bu teste başvurulmuştur. Kriyojellerin (poli(HEMA-GMA) ve poli(HEMA-GMA)-NVF) yapısında yer alan komonomerlerin yüzde karbon (C), oksijen (O) ve (N) içeriklerinin yanısıra Cu ve Zn elementlerinin varlığı belirlenmiştir. Bu amaçla kriyojellerin EDX analizleri (Quorum, Q150R) cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

#### 6.5.4 Termogravimetrik Analiz

Artan sıcaklık ve zamana bağlı olarak kriyojellerin kütle değişimleri termogravimetrik analiz (TGA) yöntemiyle araştırıldı. Yaklaşık 10 mg kurutularak toz haline gelen kriyojel numunelerinin artan sıcaklık derecelerine karşı stabilitesi Termogravimetrik Analizör cihazı (DTG 60 H – DSC 60, Shimadzu, Japonya) ile azot gazı atmosferinde 25–800°C sıcaklık aralığında, 100 mL/dak akış hızında, ısıtma hızı 10°C/dk olarak tayin edildi.

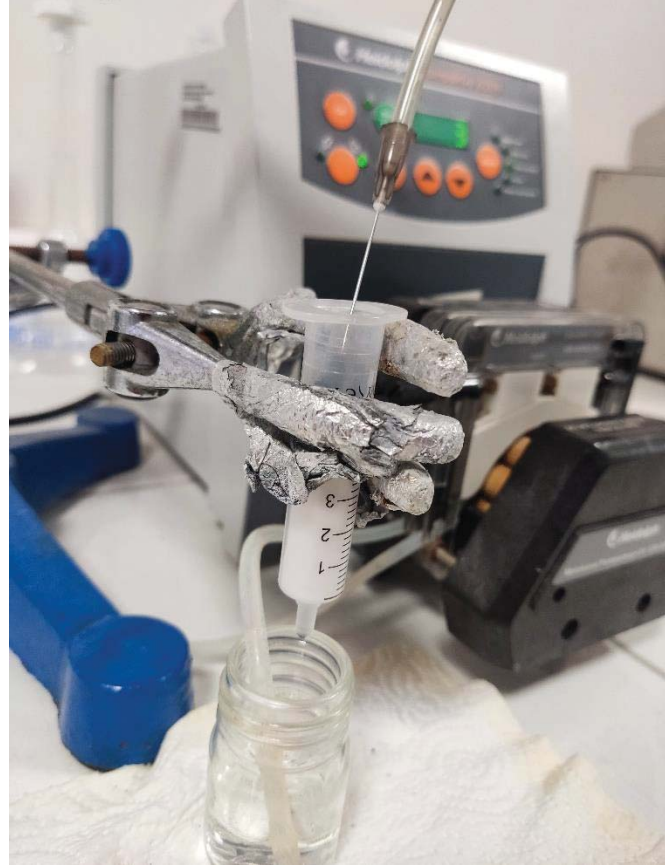
#### 6.6 Kriyojellerin Adsorpsiyon Performansı

Model protein olarak BSA'nın tercih edildiği tüm adsorpsiyon çalışmaları peristaltik pompa (Pumpdrive 5201, Heidolph) aracılığıyla sürekli sistemde (Şekil 5.1) polimerik kriyojel kolonlarla gerçekleştirilmiştir. Cu<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonlarının immobilize edildiği kriyojeller için BSA adsorpsiyonu için en uygun ve maksimum performans göstereceği çalışma koşulları pH, akış hızı, başlangıç derişimi taraması, sıcaklık, akış hızı, iyonik şiddet etkisi ve sıcaklık çalışmaları ile belirlendi. Bradford yöntemini kullanarak 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek BSA konsantrasyonu belirlendi. (Denklem 5.7) adsorbe edilmiş BSA derişiminin hesaplanması için kullanıldı.

$$Q = \frac{c_i - c_f}{m} \times V \quad (5.8)$$

Q, kriyojelin birim kütlesi (mg/g) üzerinde adsorbe edilen BSA miktarıdır; c<sub>i</sub> ve c<sub>f</sub>, sırasıyla başlangıç çözeltisindeki ve belirli bir süre sonraki sulu fazdaki BSA

derişimleridir (mg/mL). Ayrıca V, sulu fazın hacmidir (mL); ve m, kullanılan kriyojelin kütlesidir (g).



Şekil 6.1: Adsorpsiyon çalışmalarının yürütüldüğü peristaltik pompalı sürekli sistem

### 6.7 Desorpsiyon- Tekrar Kullanılabilir Çalışmaları

Oda sıcaklığında 1,0 mL/dakika akış hızında BSA adsorbe edilmiş kriyojellerden sodyum klorür çözeltisi (0,5 M) geçirilerek 595 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler ile BSA desorpsiyonu gerçekleştirildi. Eşitlik 5.9 kullanılarak desorbe edilmiş BSA miktarını hesaplamak için kullanıldı.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = \frac{Q_r}{Q_a} \times 100 \quad (5.8)$$

Eşitliğe göre,  $Q_r$ , salınan BSA miktarını,  $Q_a$  ise adsorbe edilmiş BSA miktarını sembolleştirmektedir.

Kriyojellerin yeniden kullanılabilirliğini değerlendirmek için aynı koşullar altında ardışık adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü için aynı kriyojel beş kez kullanıldı.

## **6.8 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE) Görüntüleme**

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) % 8.5 akrilamid jeli (1.5 M Tris-HCl pH 8.8 içinde) ile hazırlandı. İlk, son ve desorbe edilen numuneler (15 µL) alındı ve 15 µL bromofenol (%1 sulu metaminoetanol içeren %50 sulu gliserol içinde %0.002 bromofenol mavisi) ile karıştırıldı. Her bir kuyucuğa 15'ar µL hazırlanan çözeltilerden yüklendi. Protein standardı olarak, geniş spektrumlu Ladders protein marker (işaretleyici referans) (10- 70 kDa) kullanıldı. Elektroforez jeli % 0.1 SDS içeren yürütme tamponu (Tris-glisin, pH 6.8) varlığında yaklaşık 3.5 saat boyunca 120 V güç uygulanarak yürütüldü.

Yürütme işleminin ardından Coomassie Blue G-250 içeren çözeltiye sırasıyla hacimce (%0.2 Coomassie Blue G-250, %40 metanol, %10 asetik asit ve % 50 su) alınarak bu çözelti içerisinde 1 gün boyunca bekletildi. Ardından ise, Coomassie Blue G içermeyen sırasıyla 10-40 ve 50'lik hacimlerce asetik asit, metanol ve su içeren yıkama çözeltisi ile her 30 dakikada bir çözelti değiştirilerek, reaktif boyanın ortmanda uzaklaştırılması sağlandı.

## **6.9 Antibakteriyel Çalışması**

### **6.9.1 Antibakteriyel Kriyojellerin Hazırlanması**

Bu tez çalışmasının sırasıyla 6.2 ve 6.3 kısımlarında poli(HEMA-GMA) ve poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojellerinin elde edilişi anlatılmaktadır. Gümüş nanopartiküllerin elde edilmesi için 4 farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler sırasıyla şu şekildedir:

I: 490 mL 0,3 mM trisodyum sitrat ve 1 mM sodyum bor hidrür çözeltisi hazırlandı ve bir buz banyosuna yerleştirildi. 10 mL 10 mM gümüş nitrat çözeltisi buz banyosundaki çözeltiliye eklendi ve 1 saat karıştırıldı [172].

II: 50 mL  $1 \times 10^{-3}$  M gümüş nitrat çözeltisi kaynama noktasına kadar ısıtıldı. 5 mL %1 trisodyum sitrat çözeltisi damla damla eklendi. Isıtma, çözeltinin rengi soluk sarı olana kadar devam etti [173].

III: 200 mL 1 mM gümüş nitrat çözeltisi kaynama noktasına kadar ısıtıldı. 8 mL trisodyum sitrat çözeltisi hızlıca eklendi. Çözeltinin rengi yeşil-sarı renge dönmesinin sonrasında 1 saat daha kaynatıldı ve çözeltinin rengi soluk sarı oldu [174].

IV: 450 mL 0,3 mM askorbik asit ve 1 mM sodyum bor hidrür çözeltisi buz banyosunda hazırlandı. Bu karışımın üzerine 10 mL 10 mM gümüş nitrat çözeltisi eklendi. Soluk sarı bir renk görülürken, çözelti yaklaşık 1 saat daha karıştırılmaya devam edildi [168].

Yukarıda bahsedilen 4 farklı sentez yöntemi ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin yer aldığı çözeltilerin içerisine, kurutulmuş haldeki poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojelleri atıldı ve 1 gün boyunca çözeltilerde bekletildi. Bu işlem sırasında kriyojeller, belirli zama aralıklarında ultrasonik su banyosunda sonikasyona tabi tutularak gümüş nanopartiküllerin kriyojellere gömme yöntemiyle difüzyon sağlandı. Sentezlenen gümüş nanopartikül içeri gömülü kriyojeller, yukarıda belirtilen sentez yöntemleri sırasına göre I, II, III ve IV olarak adlandırıldı.

### 6.9.2 Antibakteriyel Çalışma Yöntemi

Kriyojellerin antibakteriyel aktivitesi, Gram-negatif *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) ve Gram-pozitif *Bacillus subtilis strain* ESU181 kullanılarak test edilmiştir. İnhibisyon zonların belirlenmesi amacıyla agar difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Test mikroorganizmalarının taze kültürleri, Luria Bertani besiyerinde 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Kültürlere ait süspansiyonlar yaklaşık olarak  $1 \times 10^8$  CFU/mL'ye seyreltilmiş ve ardından seyreltilmiş bakteri süspansiyonları LB agar plakalarına eşit şekilde yayılmıştır. Farklı tipte nanoparçacıklar içeren mikro-

kriyojeller ile negatif kontrol olarak sade kriyojeller LB plakalarına yerleştirilmiştir. Ayrıca, mikro-kriyojellerin süspansiyon halinde bulunduğu 10 µl çözeltiler, kağıt diskler (çapı 0.6 cm) üzerinde emdirilmişlerdir. Plakalar 37°C'de 18 saat inkübe edilmiş ve mikro-kriyojellerin ve çözeltilerin antimikrobiyal performansı, inhibisyon bölgelerinin ve uygulanan örneklerin alanlarının Fiji yazılımı kullanılarak ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Hesaplamalar Eşitlik 5.9'daki yaklaşım kullanılarak yapılmıştır:

$$Zon İndeksi = \frac{Inhibisyon Alanı}{Uygulama Alanı} \quad (5.9)$$

Toplam canlılık sayıları, kriyojellerin süspansiyon halinde bulunduğu çözeltilerin etkilerini değerlendirmek için test edilmiştir. Kriyojellerin kalıntılarını içeren çözeltiler, yaklaşık olarak  $1.0 \times 10^8$  bakteri hücresi ile 1:1 oranında karıştırılmış ve karışımlar 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, bakteriyel hücrelerin koloni oluşturma birimi (CFU) değerleri, karışımların 100 µl'si LB agar plakalarına dökülerek belirlenmiştir. Plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra koloni sayımları Fiji yazılımı kullanılarak yapılmış ve CFU/ml değerleri belirlenmiştir.

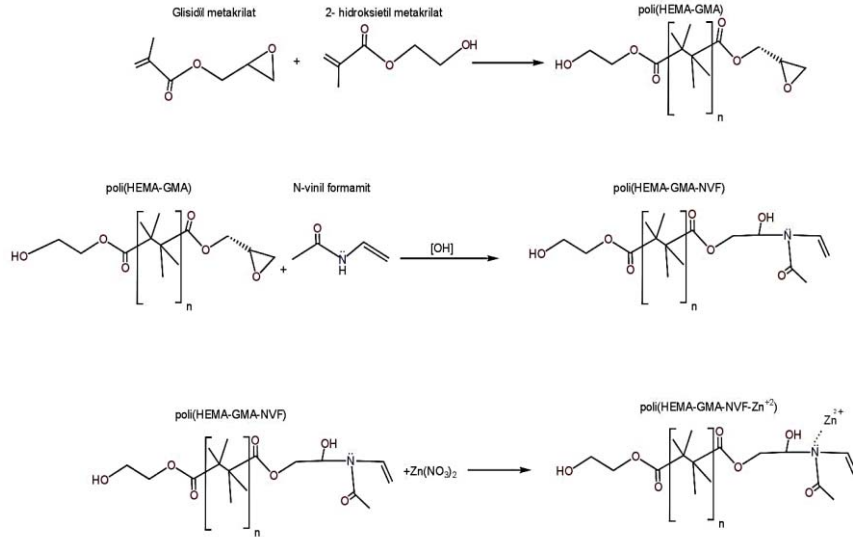
## 6.10 İstatiksel Analiz

Antibakteriyel aktivite testleri altı tekrar, toplam canlılık sayıları ise üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve örnekler arasındaki farkların önemi, tek yönlü ANOVA ve Dunnet yöntemi kullanılarak yapılan post hoc analizi ile çoklu karşılaştırmalı varyans analizi ile analiz edilmiştir.

## 7. BULGULAR

### 7.1 Kriyojellerin Hazırlanması

Bu tez çalışmasında, biyoteknolojik uygulamalara yönelik kriyojellerin hazırlanmasında immobilize metal afinite kromatografisi yaklaşımı tercih edildi. Bu kapsamda, ilk olarak protein adsorpsiyonu için Glisidil metakrilat (GMA) içeren 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) temelli kriyojel hazırlandı. Polimerik iskelete glisidil gruplarının dahil edilmesinde amaç metal şelatlaştırıcı özelliğine sahip N-Vinil formamit (NVF) ligandı ile bazik ortamda gerçekleştirilen reaksiyonda GMA'ya ait epoksi halkasının açılıp, NVF'nin amino grupları ile nükleofilik katılma tepkimesinin ardından NVF grubunun polimere immobilizasyonunun sağlanmasıydı (Şekil 7.1). Bu işlemin ardından ise  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  iyonlarının yüklenmesi sağlandı. Serbest radikalik polimerizasyon tepkimesi için amonyum persülfat (APS) ve TEMED'den oluşan redoks başlatma sistemi kullanıldı ve monomerlerin serbest radikal polimerizasyonu -16 °C'de gerçekleştirildi.



Şekil 7.1: poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojelin sentez mekanizmasının şematik gösterimi



## 7.2 Kriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları

Protein adsorpsiyonuna yönelik hazırlanan kriyojeller kolon tipi-silindirik şekillidir. İlk olarak elde edilen poli(HEMA-GMA) kriyojelleri (Şekil 7.2.a.) opak ve süngerimsi bir yapıya sahiptir. İmmobilizasyon işlemi sonrası elde edilen poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojeli ise, NVF ligandının orjinal rengi olan açık sarı renge büründüğü gözlemlendi (Şekil 7.2.b.). Metal iyonları yüklemesi sonrasında ise bakırla yüklenen kriyojellerin sarı renk sonrasında mavi rengin etkisi ile açık yeşil renge (Şekil 7.2.b) ve çinko yüklü kriyojellerin ise koyu beyaz renge büründüğü gözlemlendi (Şekil 7.2.c.).



Şekil 7.2: BSA adsorpsiyonunda kullanılmak üzere hazırlanmış kriyojellerin optik görüntüsü: a) poli(HEMA-GMA), b) poli(HEMA-GMA)-NVF, c) poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup>, d) poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup>

Kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki farklı başlık altında gerçekleştirildi. Fiziksel karakterizasyon çalışmalarında kriyojellerin su tutma davranışlarının yanı sıra mekanik kararlılıkları ve görünür yoğunlukları ölçümlendi. Kriyojellerin en tipik özelliklerinden biri, makro gözeneklerin ve süngerimsi morfolojik yapıların birbirine bağlı olmasıdır. Süngerimsi kriyojellerde bulunan suyun çoğu makro gözeneklerde ve mekanik sıkıştırma ile makro gözeneklerden uzaklaştırılabilir. Su kaybederek büzülen kriyojeller tekrar su içinde tutulduğunda, kısa sürede orijinal boyutlarına ve görünümüne kavuşurlar. Kurutma ve yeniden şişirme, kriyojellerin makro gözenekli yapılarına zarar vermeden tekrarlanabilir. Bu nedenle, bu özellikler bu makro gözenekli polimerlerin kromatografik uygulamaları için iyi bir avantaj sağlar [68].

Kriyojellerin gözenek hacmi, özgül yüzey alanı, gözenek boyutu dağılımı, yapısal özellikleri deneysel koşulları optimize etmek açısından önemlidir. Poli(HEMA-GMA) ve poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojellerinin şişme davranışını

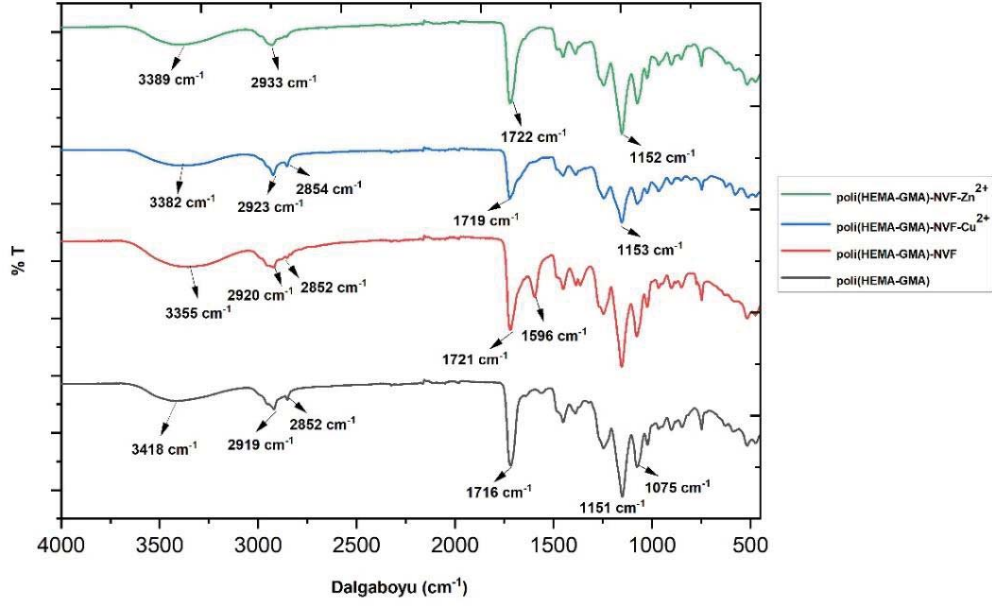
göstermek için polar (su) ve polar olmayan (hekzan) çözücülerin emilimi-bırakma deneyleri gerçekleştirildi. Kriyojellere ait şişme derecesi, gözeneklilik, makrogözeneklilik, gözenek hacmi sonuçları Tablo 7.1.'de gösterilmektedir. Bu sonuçlar neticesinde kriyojellerin büyük miktarda suyu hızlı bir şekilde emebildiği ve kendi ağırlıklarından çok daha fazlasını sıvı türler olarak adsorplayarak şişebildikleri anlaşılabilmektedir. Bununla birlikte poli(HEMA-GMA) kriyojellerine hidrofilik karakterli NVF monomer-ligandın kimyasal immobilizasyonu sonrası HEMA-temelli kriyojellerin su tutma davranışlarına ilişkin paramterelerinde artış gözlemlenmiştir.

**Tablo 7.1:** Kriyojellerin Fiziksel Karakterizasyon Sonuçları

Kriyojel	G (%)	S.D. (mg/g)	S.R. (%)	M (%)	P (%)	P.V. (%)
poli(HEMA-GMA)	92.2	5.41	441.15	173.72	128.44	84.79
poli(HEMA-GMA)-NVF	93.7	6.47	547.93	194.73	127.94	187.41

poli(HEMA-GMA) ve poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojellerinin mekanik dayanım ve yoğunluk ölçüm testleri sonrasında elde edilen veriler, NVF molekülünün polimerik yapıya dahil olmasıyla poli(HEMA-GMA) kriyojeline kıyasla poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojellerinin stabilitesi ve elastikiyetinin daha yüksek, görünür yoğunluğunun ise artmış olduğunu işaret etmektedir. Buna göre kriyojellerin karşılaştırmalı mekanik dayanım tes sonuçlarına göre poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin ‘‘ ST’’ değeri 0.966 iken bu değer poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojelleri için ise 0.968’dir. Kriyojellerin kuru ve suda şişmiş hallerine göre görünür yoğunlukları kıyaslandığında ise sonuçlar şekildedir: poli(HEMA-GMA) kriyojeli için kuru polimerin yoğunluğu  $0.202 \text{ g/cm}^3$  ve aynı polimerin suda şişmiş haldeki yoğunluğu ise  $0.868 \text{ g/cm}^3$ . Buna karşılık, poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojelleri için ise kuru ve suda şişmiş haldeki yoğunlukları sırasıyla  $0.1931$  ve  $0.908 \text{ g/cm}^3$  tür.

Kriyojellerin FT-IR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 7.3’de gösterilmektedir. Buna göre, poli(HEMA-GMA) temelli kriyojeller için O-H gerilme pikleri  $3300 \text{ cm}^{-1}$  civarında, alifatik C-H gerilmeleri  $2946 \text{ cm}^{-1}$  ve  $2850 \text{ cm}^{-1}$  civarlarında, karbonil grubuna ait (C=O) gerilme  $1715-1720 \text{ cm}^{-1}$  civarında gözlemlenirken, bu bantlara ek olarak, NVF immobilize edilmiş kriyojel için, N-Vinil formamitde bulunan amid bağlarından kaynaklanan yaklaşık  $1596 \text{ cm}^{-1}$  civarında ekstra gerilme piklerine sahiptir.

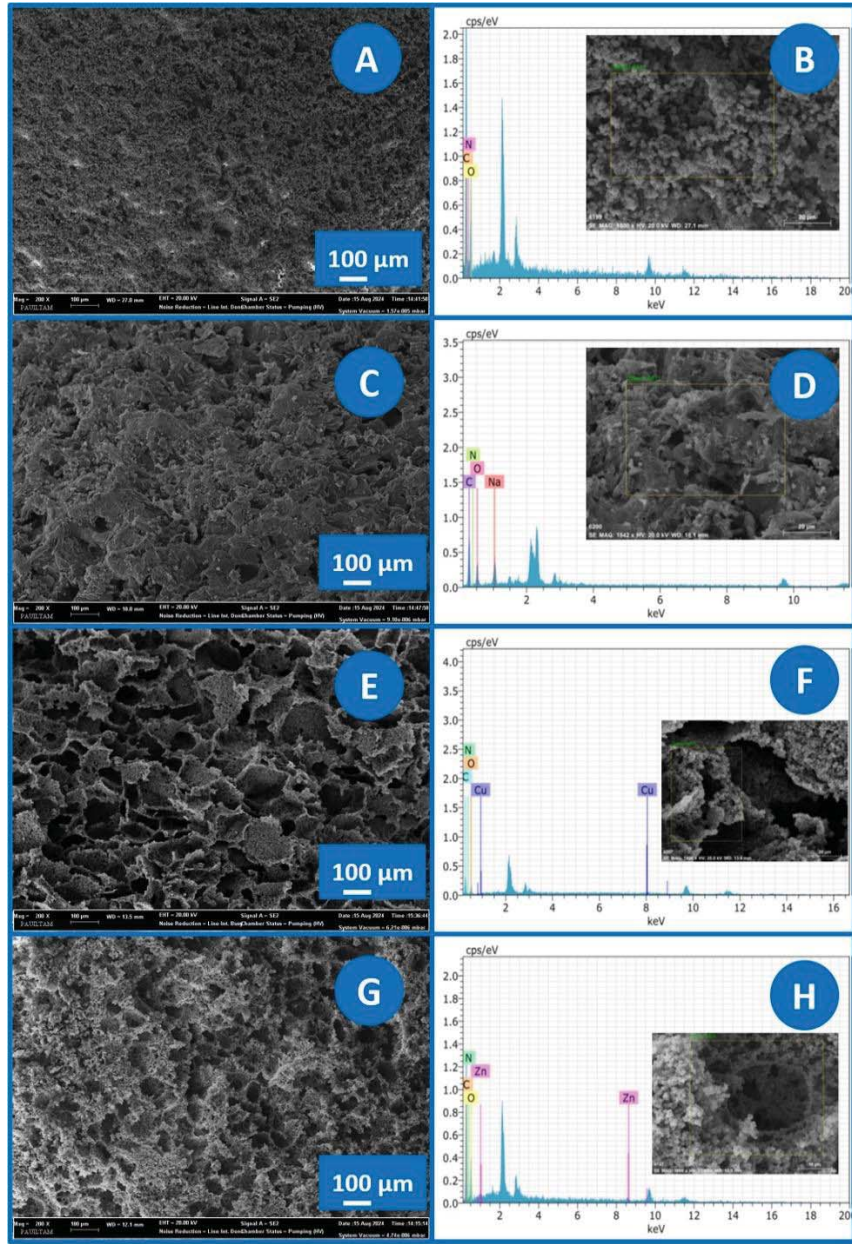


Şekil 7.3: Kriyojellerin FT-IR Spektrumları

Kriyojellerin yüzey morfolojisinin incelenebilmesi ve elementel içeriğinin belirlenebilmesi için sırasıyla FE-SEM ve EDS analizleri gerçekleştirildi. Makrogözenekli malzemeler olarak bilinen kriyojeller, yalnızca düşük moleküllü çözünen maddelerin değil aynı zamanda makromoleküllerin ve hücrelerin de engelsiz difüzyonuna izin verdikleri için gerek doku iskelesi için matris olarak, gerekse kromatografik amaçlı biyomoleküllerin ayırma ve saflaştırmasında kromatografik dolgu malzemeleri (adsorbant) olarak ilgi çekici malzemelerdir [175]. Bu ayrıcalık, makrogözeneklerin birbirine bağlı sisteminden ve kriyojellerin bir bütün olarak süngerimsi ve elastik morfolojisinden kaynaklanmaktadır [176]. Kriyojeller, belirli uygulamalar için uyarlanabilen geniş bir morfoloji ve özellik yelpazesıyla üretilir. Bunlar, makro gözenekler (1 ila yaklaşık 200  $\mu\text{m}$ ) gösteren heterofazlı, homojen olmayan malzemelerdir. Özellikleri, gözenek yapısına (boyut, dağılım ve birbirine bağlılık) ve gözenek duvarının kalınlığına ve şişmiş gözenek duvarlarındaki polimer derişimi olarak ifade edilen yoğunluğa bağlıdır. Matris içindeki kütle aktarımı, gözenek boyutu ve birbirine bağlılık tarafından kontrol edilir. Öte yandan, kriyojel duvarının kalınlığı ve yoğunluğu, mekanik özelliklerini belirler [177].

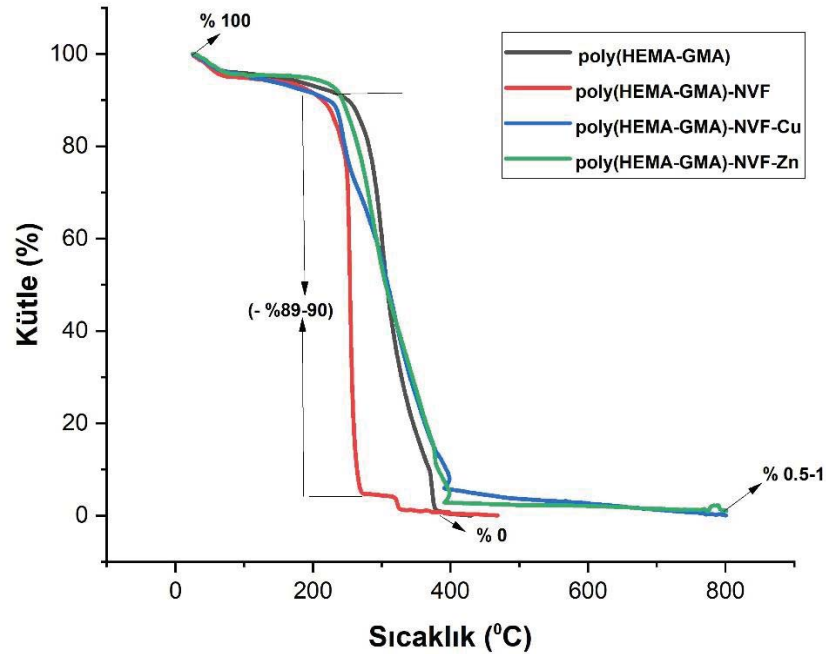
BSA adsorpsiyonu çalışmasında kullanılan kriyojellerin FE-SEM görüntüleri ve EDS analiz sonuçları sırasıyla Figür 7'de gösterilmektedir. Görüntülerden anlaşılacağı üzere kriyojellerin, literatür içinde bahsi geçen birbiri ile iç içe geçmiş ağ gözenekli morfolojisini koruduğu, bu sayede biyolojik moleküllerin taşınımı ve kütle

aktarımı sırasında herhangi bir direnç ile karşılaşmasının beklenmemesi öngörülebilmektedir. Bununla birlikte, kriyojellere uygulanan immobilizasyon ve metal iyonu yüklemesi işlemlerinin de kriyojellerin yüzey morfolojisinde dramatik bir değişiklik meydana getirmediği anlaşılabilir gibi, NVF ligandının immobilizasyonu sonrası gözene boyutunun arttığı tahmin edilmektedir. Bu sonuçlar, şişme testlerindeki su tutma kapasitesi sonuçlarıyla desteklenir niteliktedir. Ayrıca, EDS analizlerinde  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  iyonlarının varlığı, metal immobilizasyonu sonrası kriyojellerin fonksiyonlandırılmasını başarıyla sağladığı anlaşılmaktadır.



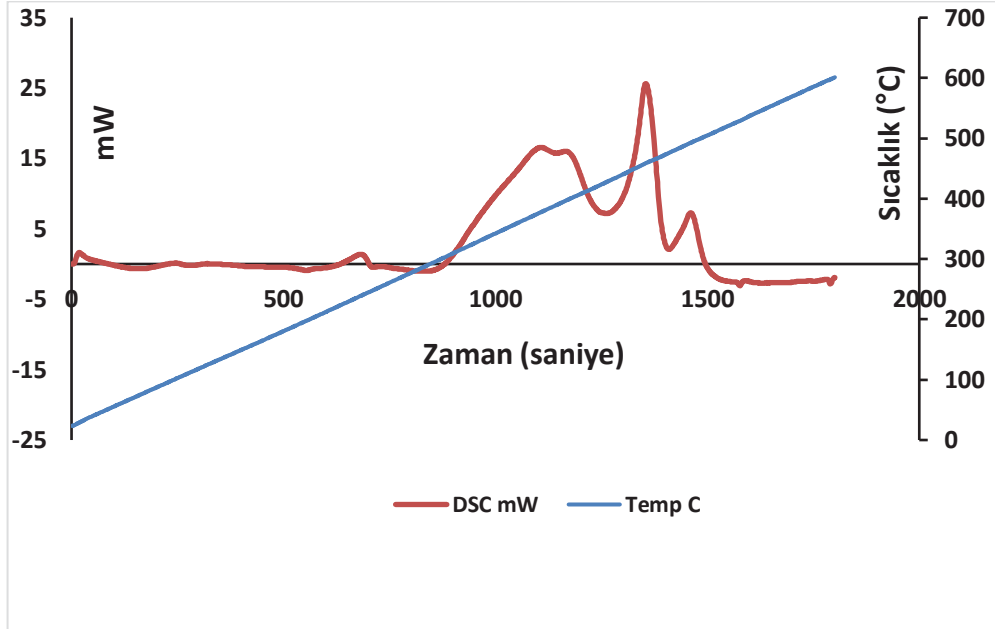
**Şekil 7.4:** Kriyojellerin FE-SEM Görüntüleri ve EDS Analizleri: (A-B: poly(HEMA-GMA), (C-D: poly(HEMA-GMA-NVF), (E-F: poly(HEMA-GMA)-NVF- $\text{Cu}^{2+}$ , (G-H: poly(HEMA-GMA)-NVF- $\text{Zn}^{2+}$

Kriyojellere ilişkin TGA-DSC diagramları sırasıyla Şekil 7.5-7.9'da sunulmaktadır. Elde edilen sonuçlar neticesinde ilk olarak TGA diagramına baktığımızda kriyojellerin sıcaklığa karşı kütle kaybı davranışının belli bir sıcaklık noktasına kadar benzer devam ettiğini söyleyebiliriz. poli(HEMA-GMA) kriyojelinin içerdiği organik kütle bakımından en küçük kütleli polimer numunesi olmasından dolayı termal ömrü en kısa olan bu serirdeki kriyojeldir. Kriyojellerin madde kaybının büyük bir kısmı 240-380°C aralığında, kendi kütlelerinin yaklaşık %90lık bir kısmına yakın bir değerde gerçekleşmiştir. Yaklaşık 430°C civarında poli(HEMA-GMA) kriyojelinin tükendiği anlaşılmaktadır. Buna karşılık, NVF immobilize edilmiş poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojellerinin ise poli(HEMA-GMA)'ya kıyasla bir miktar daha organik kalıntı fazlalığı sebebiyle kriyojelin termal ömrünün yaklaşık 470°C'ye uzadığı gözlenmektedir. Tüm bunların karşısında ise metal yüklü kriyojeller poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> için içerdikleri inorganik kalıntılar olan metal iyonlarının varlığı sebebi ile daha yüksek sıcaklıklara kadar (800°C) seviyesinde henüz termogravimetrik açıdan tükenmedikleri gözlenmektedir.

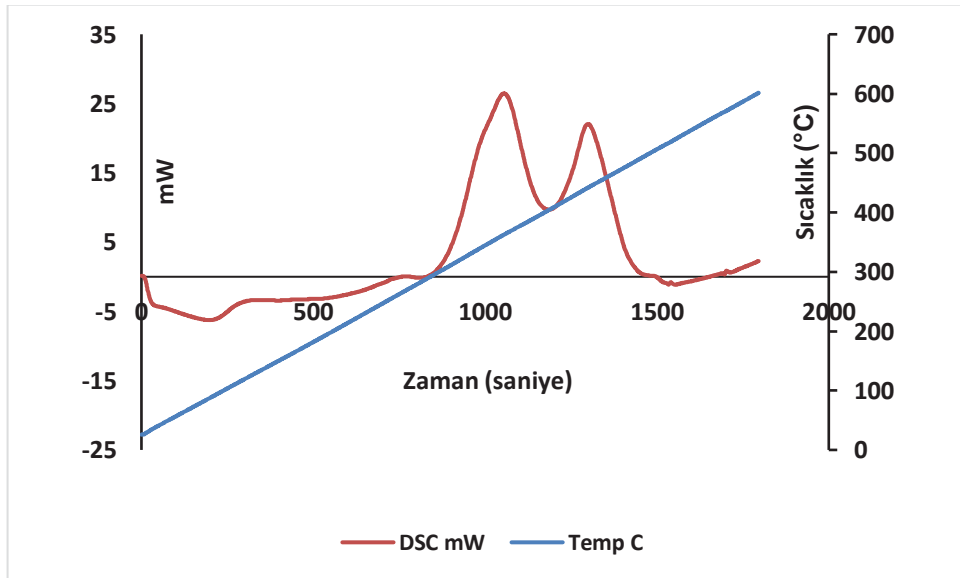


Şekil 7.5: Kriyojellere ait TGA profilleri

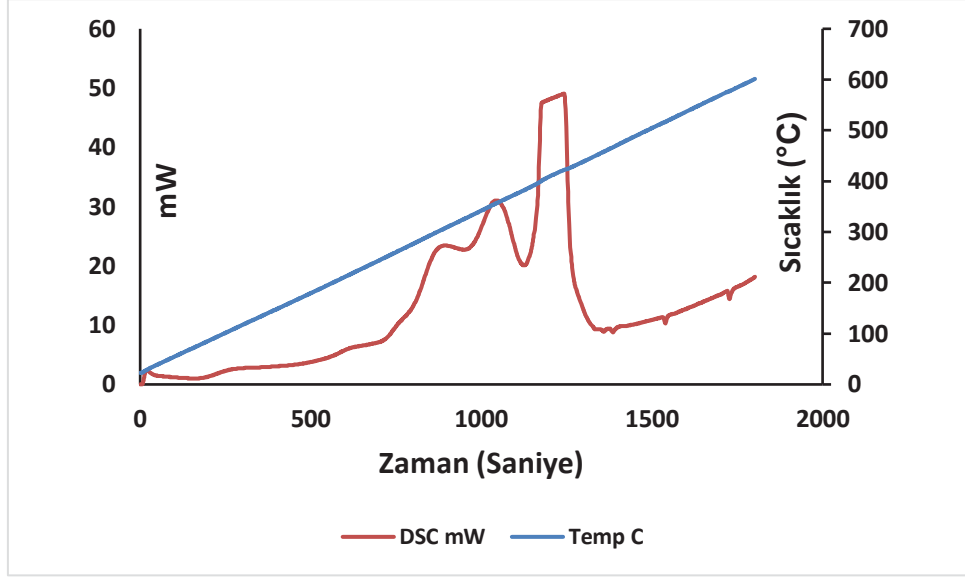
Kriyojellere ilişkin DSC profilleri, her bir termal ayrışma aşamasına özgü toplam dört endotermik-ekzotermik işlemler sergilemiştir. Tüm kriyojellerin DSC pikleri birbiri ile uyumludur. Bunlar içerisinde metal yüklü kriyojellerin DSC eğrileri en yüksek sıcaklıklara ulaştığı gözlemlenmektedir.



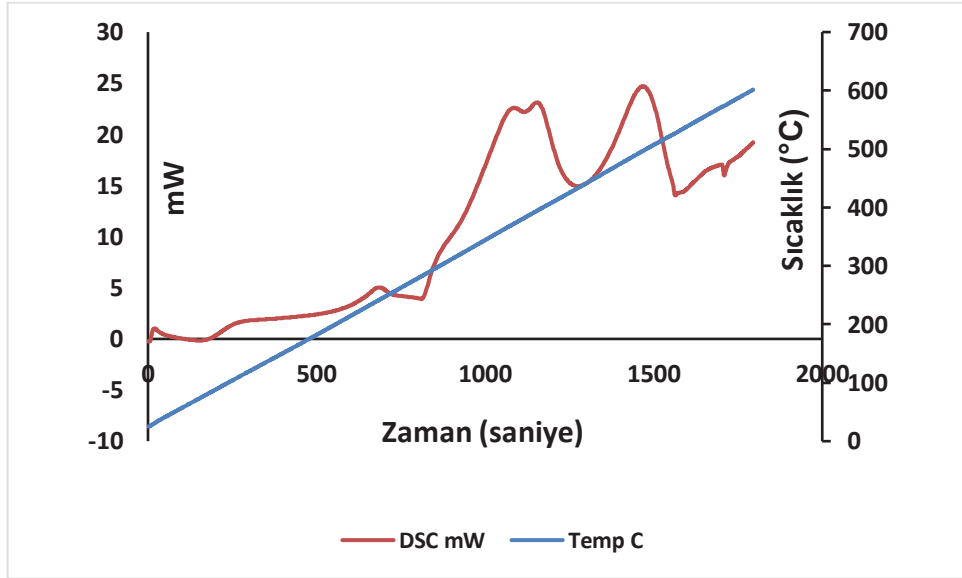
Şekil 7.6: poli(HEMA-GMA) kriyojelinin DSC diagramı



Şekil 7.7: poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojelinin DSC diagramı



Şekil 7.8: poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> Kriyojellerinin DSC Diagramı



Şekil 7.9: poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> Kriyojellerinin DSC Diagramı

### 7.3 Kriyojellerin Adsorpsiyon Sonuçları

Kromatografi bilimi, biyoayırım çalışmalarında, düzenli gözenekli parçacıklardan (yani boncuklardan) oluşan sabit bir faz kullanımlı önemli bir tekniktir. Moleküllerin boncuk gözeneklerine difüze olduğu mekanizma nedeniyle, bu ortam önemli bir difüzyon direncine sahiptir ve bu da ayırma hızını sınırlar. Bir diğer sınırlama, bant genişlemesi nedeniyle ayırma verimliliğini düşüren sıkı istifli

düzenlenmiş parçacıklar arası boşluk hacmidir [178]. Öte yandan, bu sınırlamalara bertaraf edebilecek malzemeler olarak kriyojel monolitleri, parçacıklar arası boşluklar olmadan tamamen konvektif taşıma sağlayan tek, büyük bir parçacık olarak bulunur [179]. Kriyojeller, diğer jellerdekilere kıyasla 100 ila 1000 kat daha büyük olan 10–100 µm aralığında gözenek boyutlarına ulaşan en yeni nesil monolitleri temsil eder [7].

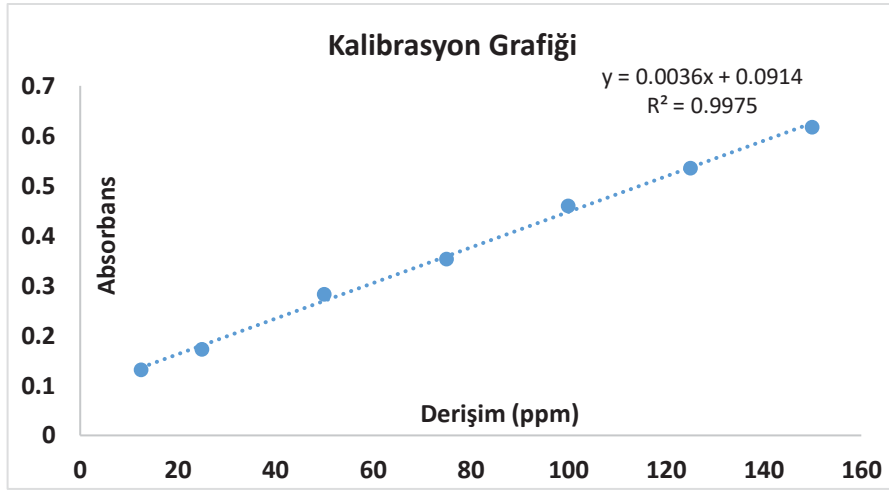
Bu tez çalışmasında, sulu bir çözeltilen BSA adsorpsiyonu için bir metal şelatlaştırıcı immobiize edilmiş kriyojel hazırlandı. Bu amaçla, metaller ile kompleks yapma özelliğine sahip N-Vinil formamit (NVF) moleküllerini glisidil metakrilat bazlı kriyojellere bazik koşullarda ilk olarak immobilize edildi. Daha sonra ise bakır ve çinko iyonlarının yüklemesi kriyojel kolona gerçekleştirilerek immobiize metal afinite kromatografisinin uygulaması ile poli(HEMA-GMA) temelli kriyojellerin BSA adsorpsiyonu karşılaştırmalı olarak gerçekleştirmeye hazır hale geldi. Kimyasal immobilizasyon ve karakterizasyon çalışmalarından sonra, pH, BSA derişimi, akış hızı, tuz derişimi (iyonik şiddet) ve sıcaklık gibi etkili faktörleri göz önünde bulundurarak BSA adsorpsiyon koşulları optimize edildi. Bundan sonra, metal iyonu immobilize edilmiş kriyojellerinin yeniden kullanılabilirliği, BSA moleküllerinin kriyojellerden desorpsiyonundan elde edilen veriler ışığında incelendi.

### **7.3.1 BSA Kalibrasyon Eğrileri**

Absorbans değerleri ile BSA proteininin farklı derişimlerdeki çözeltileri arasında bir lineer bir ilişki kurabilmek için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu (Şekil 7.10). Elde edilen kalibrasyon eğrisi neticesinde BSA adsorpsiyonu çalışmalarındaki derişimler hesaplanmıştır. Adsorpsiyon çalışmaları neticesinde protein derişimlerinin spektrofotometrik olarak tayin edilebilmesi için Bradord yöntemi (595 nm) kullanıldı. UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak her bir BSA çözeltilisinin absorbansı, 595 nm'lik spesifik bir dalga boyunda ölçüldü. Absorbans değerlerinin BSA çözeltilerinin karşılık gelen derişimlerine (mg/ml) karşı grafiğinin çizilmesiyle bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu kalibrasyon eğrileri, absorbans değerleri ile BSA çözeltilerinin konsantrasyonu arasında niceliksel bir ilişki kuran referans araçları



olarak değerlendirilmektedir. Bu aşamadan itibaren BSA derişimi tayinleri ve spektrofotometrik analiz için güvenilir bir referans niteliğindedir.



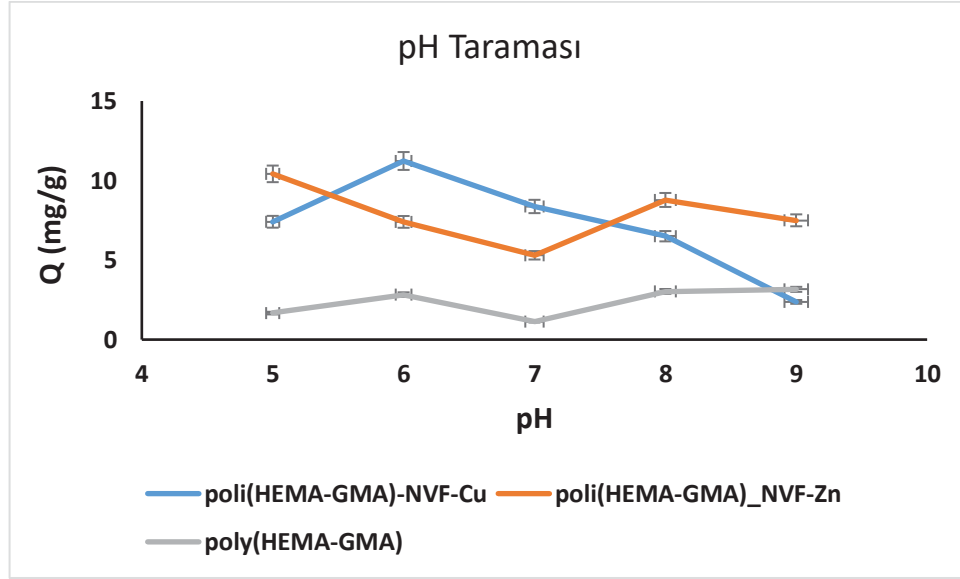
Şekil 7.10: Bradford Testi için Uygulanan BSA Kalibrasyon Eğrisi

### 7.3.2 pH Etkisi

pH'in, NVF aracılığıyla  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  immobilize edilmiş poli(HEMA-GMA) kriyojellerine BSA adsorpsiyonu üzerindeki etkisi Şekil 7.11'de gösterilmektedir. BSA (66 430 Da, Sigma) pH 5,1 ile 5,5 arasında değişen bir izoelektrik noktaya (pI) sahiptir. pH taraması sonuçlarına baktığımızda ise BSA proteininin maksimum adsorpsiyonu, BSA'nın izoelektrik noktasına yakın değerler olan pH 5.0 ve pH 6.0'da sırasıyla  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  yüklü poli(HEMA-GMA) kriyojeller için gözlemlenmektedir. Bununla birlikte, NVF'nin katyonik (protonlanabilen) bir monomer-ligand oluşu, bu sonuçları teşvik eder niteliktedir. Buna karşılık, BSA adsorpsiyon kapasitesi, grafikte gözlemlenen diğer pH 6.0 değerleri için elektrostatik etkileşim parametrelerine göre artış gösterdiği noktalar gözlemlense de, BSA proteininin izoelektrik noktasına yakın olan pH değerlerindeki adsorpsiyon kapasitesi sonuçlarının altında kalmaktadır.

Bu sebeple, sulu çözeltilerden maksimum BSA adsorpsiyonu genellikle bu izoelektrik noktaya yakın değerlerde gözlemlenmiştir. Ayrıca, NVF ile fonksiyonlandırılmayıp metal iyonları (Cu ve Zn) içermeyen saf poli(HEMA-GMA) kriyojelinin BSA adsorpsiyonununun pH etkisi de incelenmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere, asidik ve bazik bölgelerde GMA monomerinin içerdiği epoksi halkasının

açılmasıyla oluşacak elektrostatik etkileşimler sebebi ile bu noktalarda BSA adsorpsiyon kapasitesi artış gözükse de, metal iyonu içeren diğer kriyojel örneklerinin adsorpsiyon kapasiteleri ile kıyaslandığında ise daha az olduğu saptanmıştır. Bundan sonraki çalışmalar için poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> için pH 6.0 (20 Mm fosfat tamponu), poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojeli için ise pH 5.0 (20 Mm asetat tamponu) tercih edilmiştir.

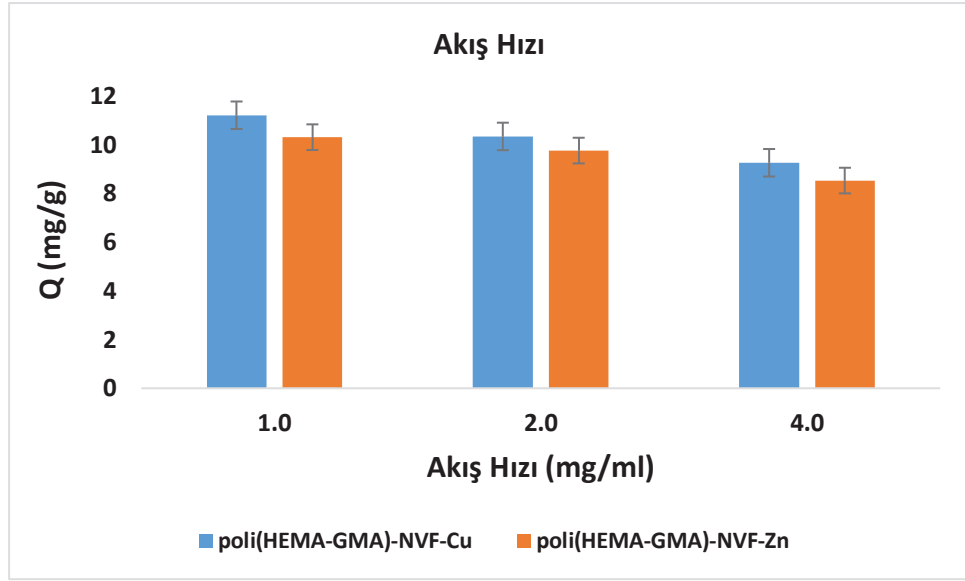


Şekil 7.11: poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin BSA Adsorpsiyonuna pH'nın Etkisi (T: 25°C, BSA derişimi: 1.0 mg/ml, t: 2 saat)

### 7.3.3 Akış Hızı Etkisi

Bu çalışmada kullanılan poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojel kolonların farklı akış hızlarındaki BSA adsorpsiyon miktarı Şeki 7.12'de verilmiştir. Akış hızı arttıkça, kromatografide sabit faz ile hareket faz arasındaki etkileşimin azalacağı öngörüsüyle kolonların adsorpsiyon kapasitesi miktarlarının azalacağı öngörülebilmektedir. Bunun tersi olarak ise, kolonda akış hızının azalmasıyla afinite temelli kromatografi kolonu ile analit arasındaki etkileşim, artan temas süresi ile daha yüksek olur. Böylece hedef moleküllerinin kriyojelin gözenek duvarlarına difüzyonu ve moleküler boşluklara bağlanması daha geniş ve ayrıntılı bir şekilde gerçekleşerek, dolayısıyla daha iyi bir adsorpsiyon kapasitesi elde edilir. Bu tez çalışmasındaki deneysel çalışmalar da bu

fikri desteklemektedir. Sonuçlar, kolondaki akış hızı arttığında metal iyonları immobilize edilmiş kriyojel kolonların BSA adsorpsiyon kapasitelerinin azaldığını göstermektedir. Akış hızının 1.0 ml/dakikadan 3,0 ml/dak'ya arttırılmasıyla adsorpsiyon kapasitesi  $\text{Cu}^{2+}$  immobilize edilmiş poli(HEMA-GMA) temelli kriyojel kolon için 11.2 mg/g polimerden 9.25 mg/g olarak azalmıştır. poli(HEMA-GMA)-NVF- $\text{Zn}^{2+}$  kolonunda ise adsorpsiyon kapasitesindeki azalmanın akış hızının artmasıyla yaklaşık %15-20 arasında bir seviyede gerçekleştiği gözlenmiştir.

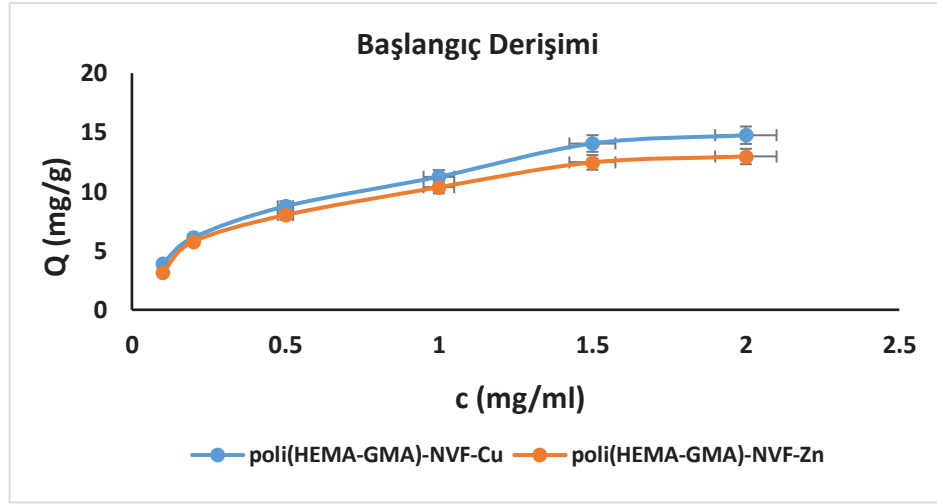


**Şekil 7.12:** Farklı akış hızlarının BSA adsorpsiyonuna etkisi: BSA derişimi: 1.0 mg/ml, pH: (pH:5 (poli(HEMA)-NVF- $\text{Cu}^{2+}$  için, (pH 6 (poli(HEMA-GMA)-NVF- $\text{Cu}^{2+}$ ), v: 10 ml t: 2 saat, T: 25°C

### 7.3.4 Başlangıç Derişimi Etkisi

BSA'nın başlangıç derişiminin poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn kriyojellerinin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi Şekil 7.13'de gösterilmektedir. Adsorbe edilen BSA miktarının, BSA derişiminin artmasıyla yükseldiği görülmektedir. Yürtücü kuvvet olarak protein ile kriyojelin temelini oluşturan ligandların arasındaki etkileşimin de artmış olması buna sebep olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık 1.0 mg/ml derişiminin ardından incelenen 1.5 ve 2.0 mg/ml BSA derişimlerine karşılık kriyojellerin BSA adsorpsiyon kapasitelerinin birbirine yakın oluşu, kriyojellerin adsorpsiyon aşamasında dengeye geldiğini (doyum

noktasına ulaşıldığı) şeklinde yorumlanabilir. Diğer bir deyişle, bu değerde poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojelleri üzerindeki metal iyonlarının proteinler ile immobilize metal afinitesi prensipleri doğrultusunda karşılıklı bağlanma bölgelerinin doygunluğa ulaştığı söylenebilir. poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> kriyojeli için için maksimum BSA adsorpsiyon kapasitesi 14.76 mg/g polimer olarak bulunurken, poli(HEM-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> için ise mg/g olarak hesaplanmıştır.

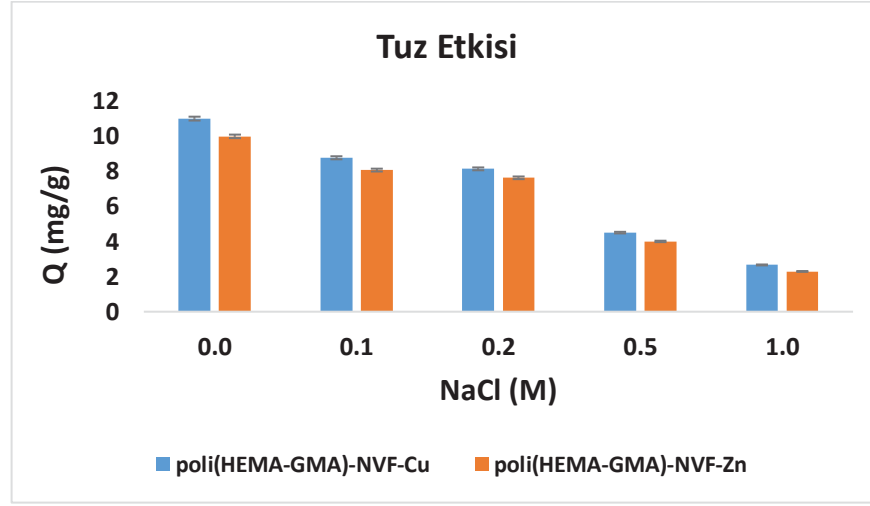


Şekil 7.13: poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojellerinin BSA Adsorpsiyonuna Başlangıç Derişiminin Etkisi: v: 10 mL, T: 25°C, BSA derişimi: 1.0 mg/mL

### 7.3.5 İyonik Şiddet (Tuz) Etkisi

İyonik şiddet etkisinin poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn kriyojel kolonlarında BSA adsorpsiyonuna BSA adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 7.14). Bu kapsamda 1.0 mg/ml BSA derişimine sahip pH 5 ve pH 6 tamponlarında hazırlanmış içerdikleri derişimleri sırasıyla 0.1-0.2-0.5 ve 1.0 M NaCl derişimi aralığındaki dört farklı konsantrasyonda tuz iyonları içerikli BSA çözeltisi immobilize metala finite temelli kriyojel kolonlarından iki saat süresince geçirildi. Tuz derişiminin artması, diğer bir deyişle iyonik şiddeti arttırmış ve iyonik kuvvetin artması ise protein moleküllerinin kolona tutunma-bağlanma eğilimini azaltmıştır (tuzdan kaçış etkisi-salting out). Bu durum, adsorpsiyon

kapasitesine etki ederek poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> kolonunda tuz derişiminin artmasıyla BSA adsorpsiyon miktarı yaklaşık 11.00 mg/g'dan 2.66 mg/g'a düşmüştür. Diğer yandan, benzer şekilde tuz derişiminin artmasına paralel olarak poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kolonunda ise BSA adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık 9.99 mg/g'dan 2.29 mg/g'a azalmıştır. Böylece iyonik etkileşimler, proteinler ile metal ligandının birbirilerine tanınma ve bağlanma sürecine azaltıcı etki göstermiştir. Buna sebep olarak, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin aynı anda meydana gelmesi durumunda, çözeltinin iyonik kuvvetinin artması önceki türdeki etkileşimi azaltması ile açıklanabilir. Netice itibari ile tuz çözeltisi derişiminin artması ile protein çözünürlüğünün azaldığı bilinen bir gerçektir [180].



Şekil 7.14: İyonik şiddet etkisinin BSA adsorpsiyonuna etkisi: pH 6 (poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu ve pH 5 (poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn, v: 10.0 ml, t: 2 saat, T: 25°C, akış hızı: 0.5 ml/ dk

#### 7.4 Adsorpsiyon İzotermi

"Adsorpsiyon izotermi" terimi tipik olarak adsorpsiyon verilerini tanımlamak için kullanılır. "Adsorpsiyon izotermi", sabit sıcaklıkta bir birim adsorban miktarı tarafından adsorbe edilen adsorban miktarı ile denge çözeltisi derişimi (veya basıncı) arasında var olan ilişkidir. Uygulamalar açısından Langmuir ve Freundlich izotermi, adsorpsiyon izotermilerinin hesaplanabilmesi açısından en yaygın olarak kullanılan başlıca iki matematiksel modelledir.

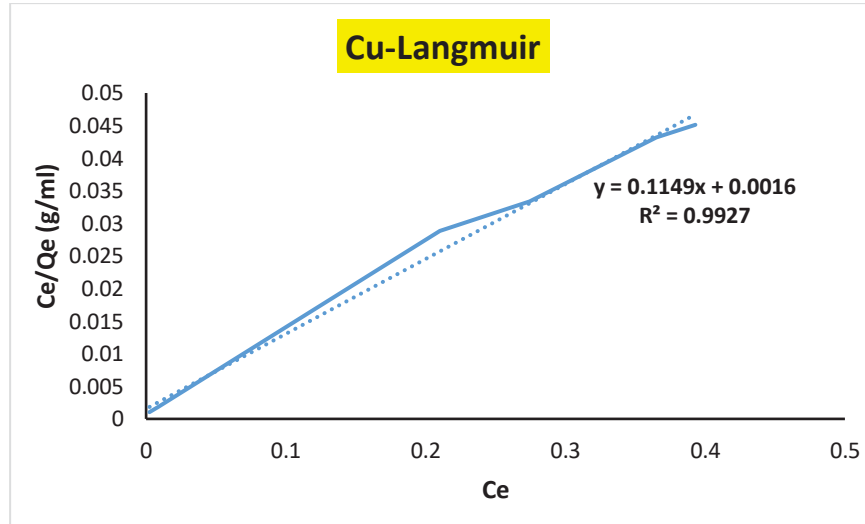
Langmuir izotermine göre, yüzeyde adsorplanan moleküllerin tek tabaka halinde adsorplandığı, yani yüzeyi homojen olduğu ve adsorplanan komşu moleküllerle olan etkileşimin ihmal edildiği için enerji dağılımının her noktada aynı olduğu kabul edilir. Langmuir izotermi aşağıdaki denklemle (Eşitlik 6.1) ifade edilir;

$$Q_e = \frac{q_m \times K_L \times c_e}{1 + K_L \times c_e} \quad (\text{Eşitlik 7.1})$$

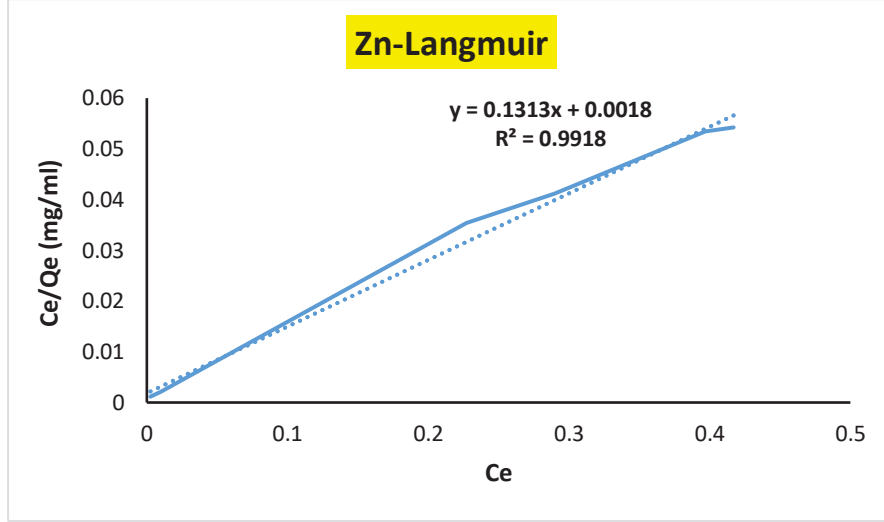
Eşitlik 6.1'deki denkleme göre " $q_m$ ", adsorbentin maksimum adsorplama kapasitesi, Langmuir adsorpsiyon sabiti " $K_L$ " olarak tanımlanır. Eşitlik 6.1'in lineerleştirilmesi sonrasında aşağıdaki bağıntı (Eşitlik 6.2) elde edilmiştir.

$$\frac{c_e}{q_e} = \frac{1}{q_m \times K_L} + \frac{1}{q_m} \times c_e \quad (\text{Eşitlik 7.2})$$

Eşitlik 6.2'deki bağıntıya göre  $c_e$ 'ye karşı  $\frac{c_e}{q_e}$  grafiğe geçirilmesi ile doğrunun eğiminden  $1/(q_m \times K_L)$  değerini, y ekseninin kesim noktası ise  $\frac{1}{q_m}$  değerini verir.



Şekil 7.15: poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> Kriyojeli ile BSA Adsorpsiyonu Langmuir İzoterm Modeli



Şekil 7.16: poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup>Kriyojeli ile BSA Adsorpsiyonu Langmuir İzoterm Modeli

Langmuir izoterm modelinde ayırma faktörü olarak bilinen denge parametresi  $R_L$  cinsinden Eşitlik 6.3'deki bağıntıyla hesaplanır.

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \times c_0} \quad (\text{Eşitlik 7.3})$$

Eşitlik 7.3'e göre  $c_0$ , başlangıç BSA derişimini (mg/mL) ve  $K_L$ , Langmuir adsorpsiyon denge sabitini (mL/mg) sembollendirir.  $R_L$  değerleri elverişsiz olarak kabul edilirse ( $R_L > 1$ ), eğer doğrusal ise ( $R_L = 1$ ), elverişli olarak kabul edilebileceği değer aralığı ( $0 < R_L < 1$ ) ve tersinmez ise ( $R_L = 0$ ) durumlara göre izoterm şeklini gösterir.

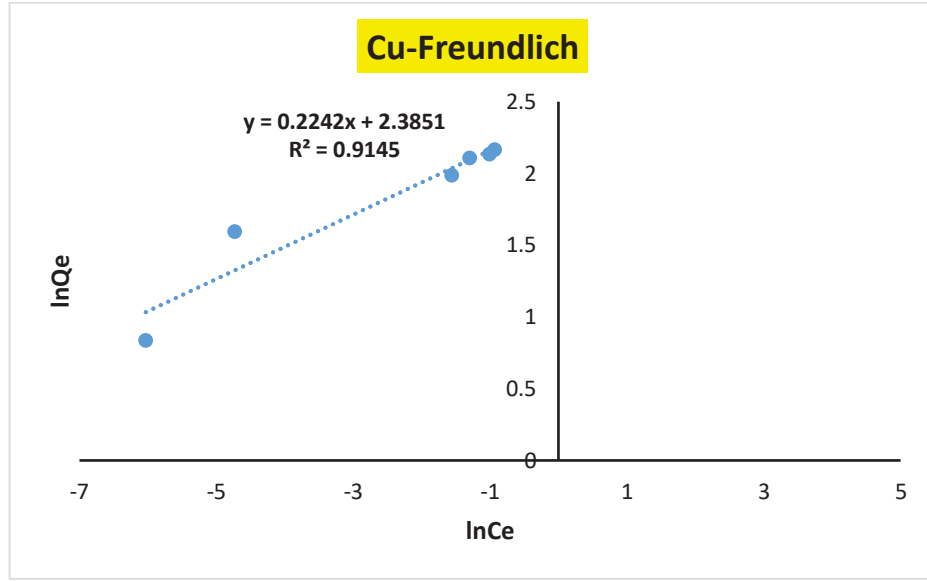
Freundlich izoterm modeli (Eşitlik 7.4), adsorpsiyonun çok tabakalı olduğunu kabul ederken. Langmuir modelinin aksine adsorbent yüzeyinin, adsorpsiyon alanları ve enerjisi bakımından aynı olmadığını, diğer bir deyişle heterojen olduğunu kabul eder.

$$Q_e = K_F \times C_e^{\left(\frac{1}{n}\right)} \quad (\text{Eşitlik 7.4})$$

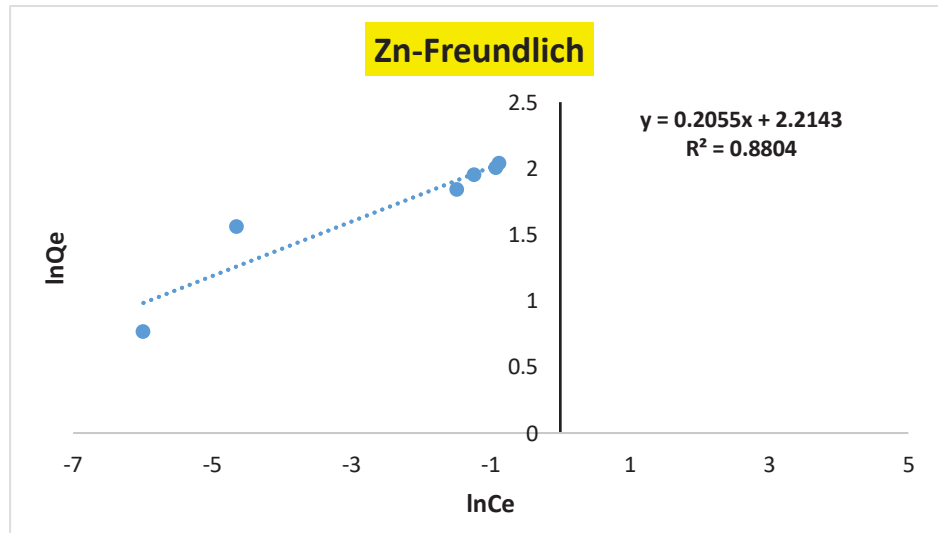
Eşitlik 6.4'te " $K_F$ " adsorpsiyon kapasitesini ifade ederken,  $(1/n)$  ise Freundlich üssü olarak kabul edilir ve sistemin homojen olmayışının bir temsil eder.  $K_F$  değerinin artması, adsorpsiyon kapasitesinin artışı olarak tanımlanabilirken,  $(1/n)$

değerinin azalıyor olması ise adsorpsiyona karşı olan direncin azalması olarak değerlendirilir. Eşitlik 7.4'te bağıntıdaki eşitliğin her iki tarafının logaritmasının alınması ile Eşitlik 7.5'deki bağıntı elde edilir. Buradan,  $\ln C_e$ 'ye karşı  $\ln Q_e$  grafiğinin çizilmesiyle doğrunun eğiminden  $(1/n)$  değerini, doğrunun y eksenini kesim noktası ise  $\ln K_F$  değerini verir.

$$\ln Q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (\text{Eşitlik 7.5})$$



Şekil 7.17: poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup>Kriyojeli ile BSA Adsorpsiyonu Freundlich İzoterm Modeli



Şekil 7.18: poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup>Kriyojeli ile BSA Adsorpsiyonu Freundlich İzoterm Modeli



Langmuir ve Freundlich izoterm modellerinin uygulanması ile elde edilen veriler sonrasında regresyon ( $R^2$ ) değerleri karşılaştırıldığında gerek poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve gerekse poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojelleri ile yapılan BSA adsorpsiyonunun Langmuir izoterm modeli ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır (poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup>: 0.9927 > 0.9145) ve (poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup>: 0.9918 > 0.8804).

**Tablo 7.3:** poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonuna göre Langmuir ve Freundlich İzotermeleri

Langmuir				Freundlich		
Q <sub>max</sub>	K <sub>L</sub>	R <sub>L</sub>	R <sup>2</sup>	K <sub>F</sub>	n	R <sup>2</sup>
(mg/g)	(ml/mg)					
625.0	0.0139	0.986	0.9927	86.83	4.46	0.9145

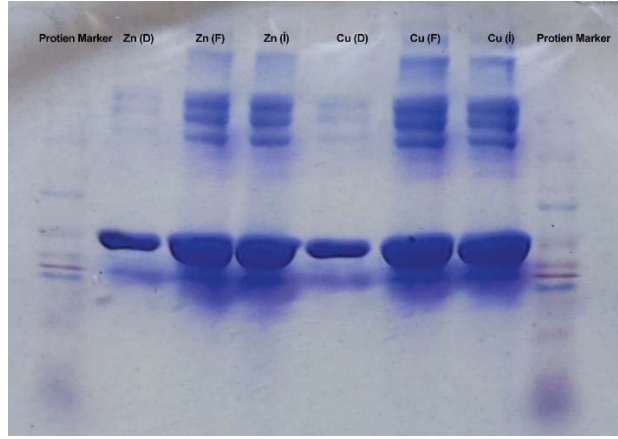
**Tablo 7.4:** poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojeli ile BSA adsorpsiyonuna göre Langmuir ve Freundlich İzotermeleri

Langmuir				Freundlich		
Q <sub>max</sub>	K <sub>L</sub>	R <sub>L</sub>	R <sup>2</sup>	K <sub>F</sub>	n	R <sup>2</sup>
(mg/g)	(ml/mg)					
555.55	0.013	0.987	0.9918	2.37	4.866	0.8804

## 7.5 SDS-PAGE Analizi

Sulu çözeltiden ekstrakte edilen BSA'nın saflığını ve molekül ağırlığını kontrol edebilmek için SDS-PAGE işlemi uygulandı. Bakır ve çinko yüklü kolonlardaki adsorpsiyon-desorpsiyon-elüsyon işlemleri sonrası elde edilen örneklerden alınan çözeltiler kuyucuklara yerleştirildi. Protein ayırıcı bileşiği referans olarak kabul edildiği işlemde kolona verilmeden önceki çözeltilere ait bantın, dengedeki çözelti ve desorbe edilen çözeltiye doğru geçişte gözlemlenen bantların yoğunluğunun (kalınlığının) azaldığı görüldü. Şekil 7.19'da gözlenen bantlarda Cu (i), BSA'nın

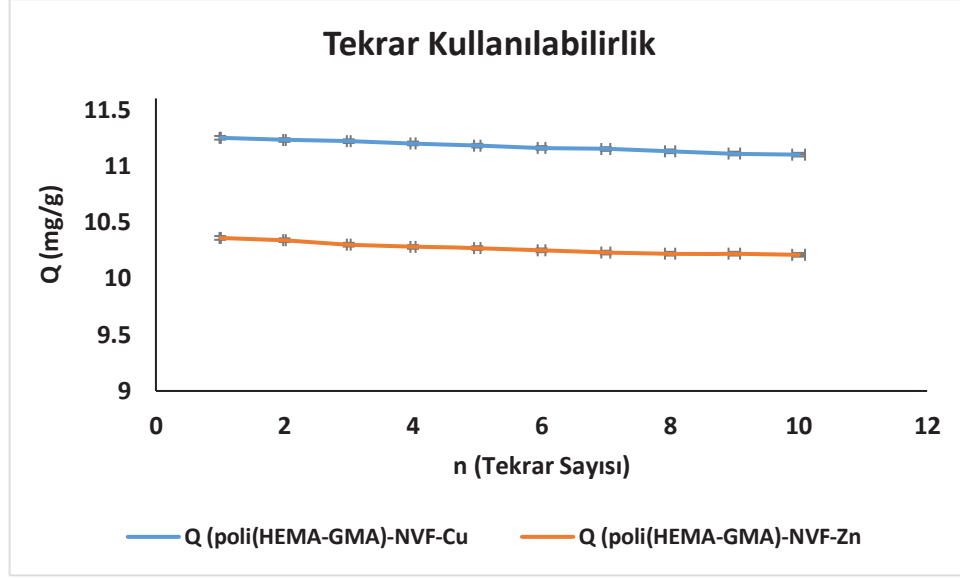
başlangıç çözeltisine, Cu(F), adsorpsiyon işlemi sonrası dengede kalan çözeltiye ve Cu (D) ise 0.5 M NaCl çözeltisi ile desorbe edilen BSA çözeltisine aittir. Benzer kodlama Çinko yüklü poli(HEMA-GMA) temelli afinite kolonu içinde geçerlidir. Uygulanan elektrik akımı sonrası yürütülen protein çözeltilerinin aynı seviyede pik vermiş olması, protein ayırma-safılaştırma işleminin poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn afinite kolonları ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilebildiğinin kanıtı olmuştur.



Şekil 7.19: Kriyojel kolonlarda saflaştırılan BSA çözeltisi için SDS-PAGE Analizi

## 7.6 Desorpsiyon-Tekrar Kullanılabilirlik

Kriyojellerin adsorban olarak kullanılmasının en önemli ön koşullarından bir tanesi tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi, bunların farklı ölçeklerde ve farklı alanlarda kullanılmalarında fikir vermesi açısından önemli bir adımdır. Bu amaç doğrultusunda bu tez kapsamında immobilize metal afinite temelli poli(HEMA-GMA) kriyojel kolonlar tekrar kullanılabilirlik amacıyla BSA adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı polimer kolonu kullanılarak 10 kez tekrar edilmiştir ve sonuçlar Şekil 7.20’de verilmiştir. Kriyojellerinin adsorplama kapasitelerinin hesaplanmasında kaydadeğer bir azalma gözlenmemiştir. Kriyojellerin birbiri ile iç içe geçmiş geniş yüzey alanına sahip ağ örgülü gözenekli yapıda olmaları kütle-aktarım direncinin ihmal edilerek adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün çok hızla gerçekleşmesine olanak sağlamıştır.



Şekil 7.20: Kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği: BSA derişimi: 1.0 mg/ml, pH: 5.0 ve 6.0, t: 2 saat, T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 0.5 M NaCl çözeltisi

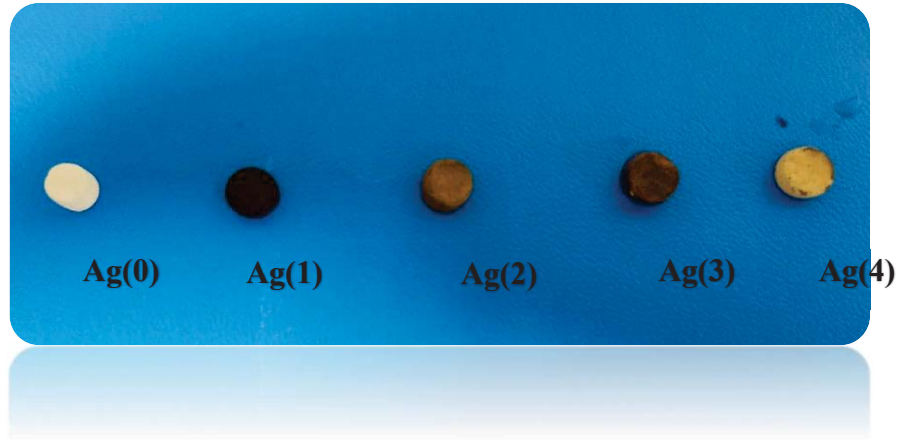
## 7.7 Antibakteriyel Test Sonuçları

Tez çalışmasının bu bölümünde poly(HEMA-GMA) kriyojellerinin antibakteriyel özelliklerinin geliştirilebilmesi amacıyla NVF ligandının, metal şelatlaştırıcı özelliğinden faydalanılarak ve literatürde antibakteriyel özelliği bilinen gümüş partiküllerinin oluşturulmasına dayanan bir uygulama gerçekleştirildi. Bu kapsamda, 4 farklı sentez yöntemi ile kriyojel içerisinde büyütülen gümüş partiküller ile fonksiyonlandırılmış poly(HEMA-GMA) kriyojellerinin (Ag(1), Ag(2), Ag(3) ve Ag(4)) antibakteriyel özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Kriyojellerin kısaltmaları bu paralellikte yapıldı). Çalışmalarda kriyojellerin antibakteriyel performansı *Escherichia coli* ve *Bacillus Subtilis* bakterileri kullanılmıştır.

### 7.7.1 poli(HEMA-GMA)-NVF-Ag NP Kriyojellerin Karakterizasyonu

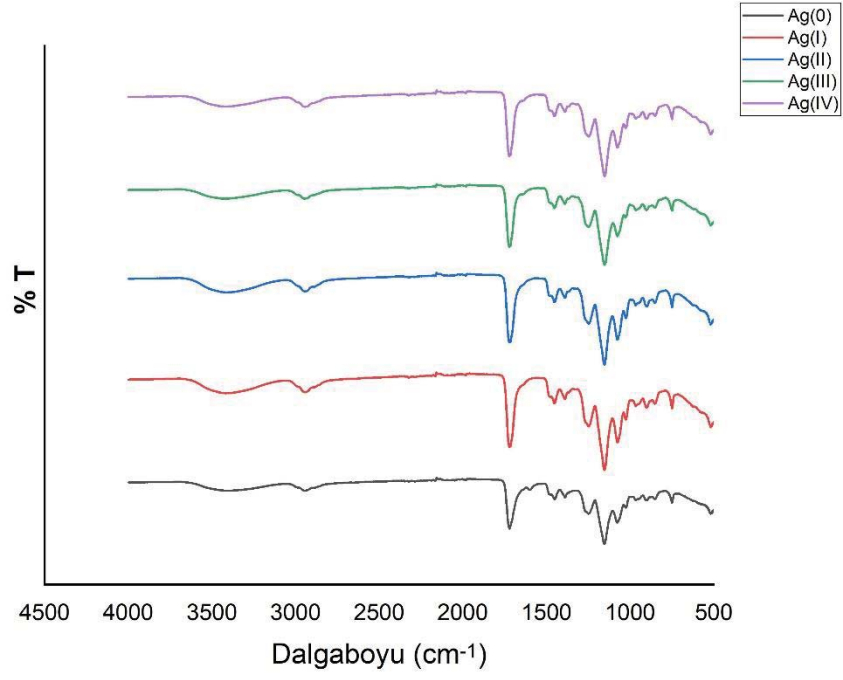
Sentezlenen disk boyutundaki kompozit kriyojellerin optik resimleri ve elde edildikleri çözelti ortamı Şekil 7.21’de sunulmuştur. Gümüş metalinin karakteristik rengini andıran türlerinin yanı sıra, elde edildikleri ortam neticesinde, kontrol grubu

olarak seçilmiş poly(HEMA-GMA)-NVF (Ag(0)) kriyojellerinin görünür farklılıkları net biçimde gözlenebilmektedir.



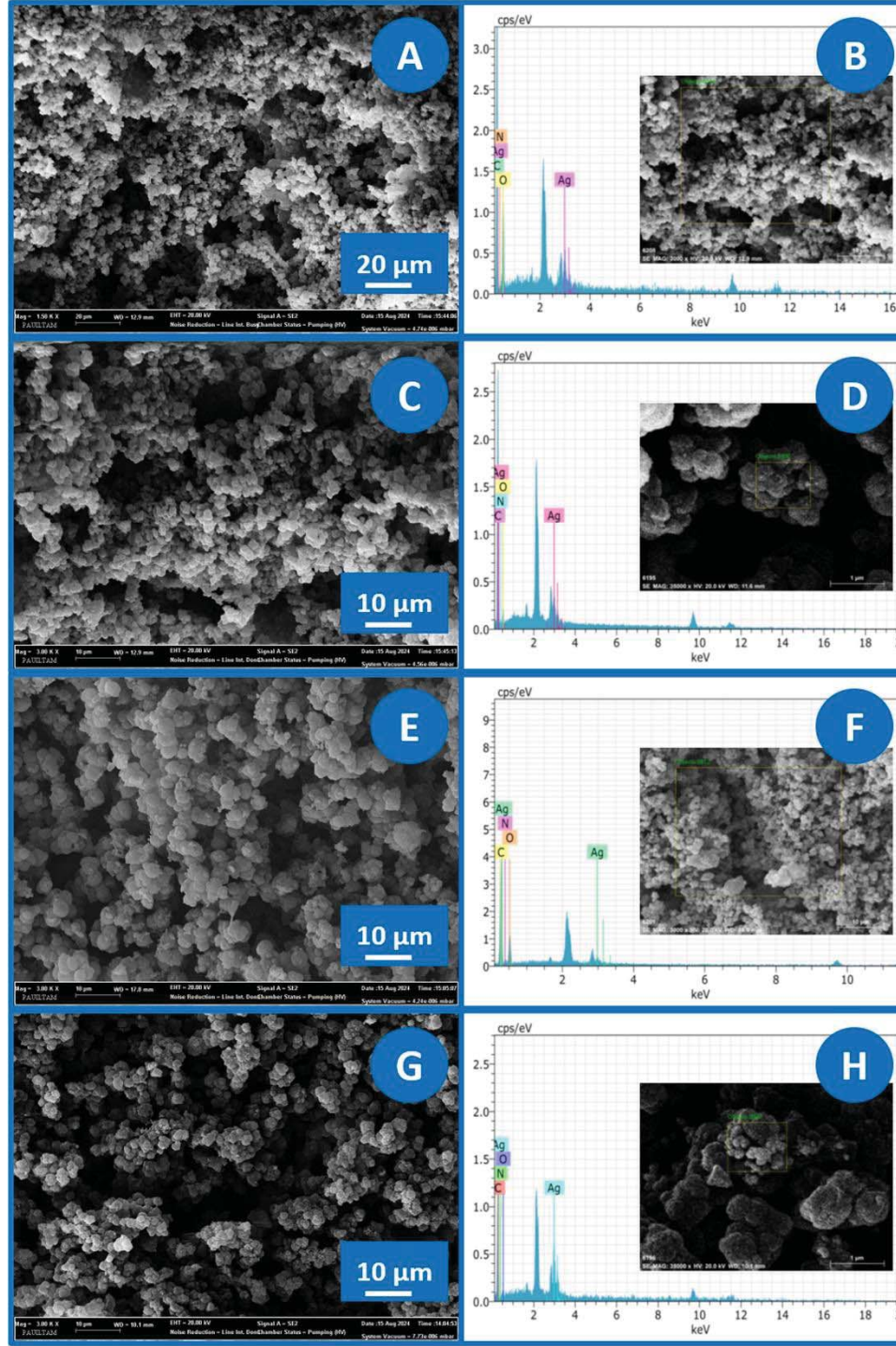
**Şekil 7.21:** Gümüş partikül içeren poly(HEMA-GMA)-NVF-Ag(n) kriyojellerinin optik resimleri ve buldukları çözelti ortamı ( $n = (1,2,3,4)$ )

Antibakteriyel uygulamalar için hazırlanmış Ag(n) serisi kriyojellerin FTIR spektrumları Şekil 7’de gösterilmektedir. Şekil 7.22’deki FTIR spektrumundan görüleceği üzere gümüş partikül ile fonksiyonlandırılmış her bir kriyojelin ve kontrol grubu olan poly(HEMA-GMA)-NVF kriyojelinin (Ag0)’dan elde edilen pikler ile bu tez çalışmasının 7.2 kısmında yer alan FTIR sonuçlarının uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 7.22: Ag serisi kriyojellerin FTIR spektrumları

Şekil 7.23’de kriyojellerin SEM görüntüleri gösterilmektedir. Başlangıçta sentezlenen disk boyutlarındaki Ag(0) kriyojelinin gözenekli morfolojisinin, bu tez çalışmasındaki kolon tipi formuyla karşılaştırıldığında da çok fazla değişiklik göstermediği anlaşılmaktadır.



**Şekil 7.23:** Antibakteriyel özellikleri incelenen kriyojellerin FE-SEM Görüntüleri ve EDS Analizleri:  
 (A-B): Ag (1) kriyojeli, (C-D): Ag (2) kriyojeli, (E-F): Ag (3) kriyojeli, (G-H): Ag (4) kriyojeli

Antibakteriyel testler için hazırlanmış Ag-serisi kriyojellerin SEM ve EDS görüntüleri aşağıda yer almaktadır. SEM görüntüleri, gümüş partiküllerin polimerik yapıya dahil olmasıyla kriyojelleri morfolojik yapısının değişmediğini ve gözenekli yapının sıvı ortamını hapsetmeye uygun olduğunu göstermekte iken, EDS sonuçlarındaki Ag elementinin varlığı ise yapıda Ag iyonlarının bulunduğunu isptlamaktadır.

**Tablo 7.2:** Ag-Serisi Kriyojellerin Elementel Analiz İçeriği Sonuçları

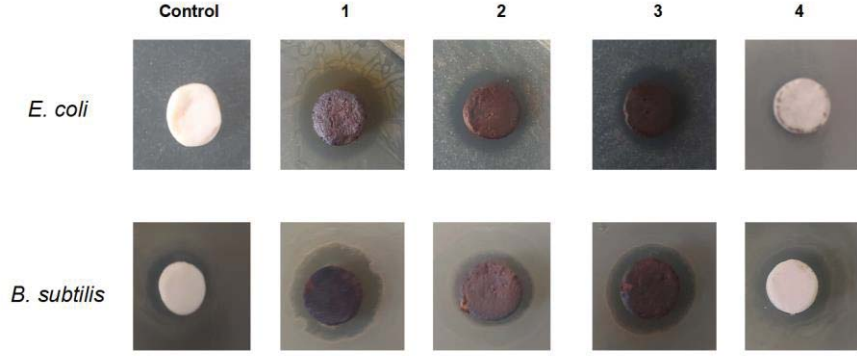
Kriyojel	C (%)	N (%)	O (%)	Ag (%)
Ag(0)	55.45	11.82	32.73	-
Ag(1)	51.44	4.09	37.91	6.56
Ag(2)	60.75	10.65	17.78	10.82
Ag(3)	51.58	9.44	36.89	2.08
Ag(4)	40.11	36.38	16.56	6.94

### 7.7.2 poli(HEMA-GMA-NVF-Ag-Serisi kriyojellerin Antibakteriyel Performansı

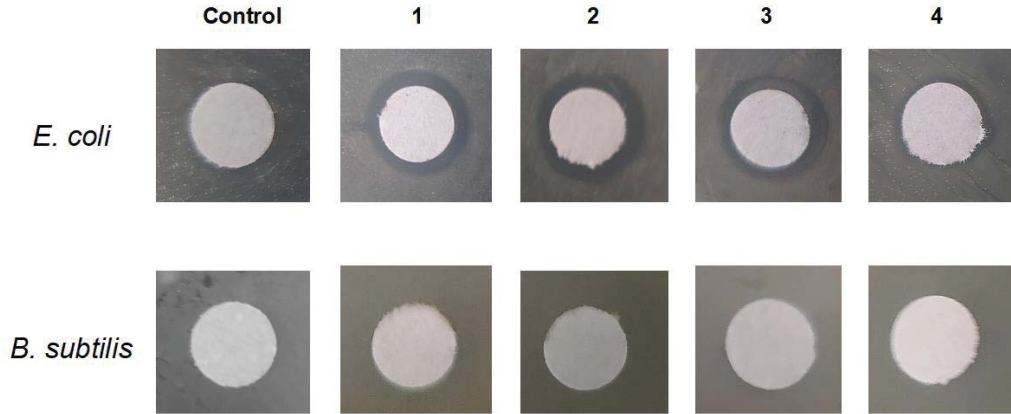
Bu çalışmada kriyojellerin antibakteriyel etkinlikleri agar difüzyon ve toplam canlılık sayılarına bakılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçların verileri Tablo 7'de sunulmuştur.

Çalışmada kriyojellerin kullanıldığı agar difüzyon çalışmalarında hem *E. coli* hem de *B. subtilis* için farklı kriyojel örnekleri için benzer inhibisyon profilleri elde edilmiştir (Şekil 7.24 - Şekil 7.30). Yapılan analizlerde kullanılan test edilen tüm kriyojellerin *E. coli* ve *B. subtilis* için kontrole göre anlamlı bir farklılık yarattığı gözlenmiştir. Kriyojellerin süspansiyon halinde bulunduğu çözeltilerin kağıt diskler üzerinde emdirilmesiyle yapılmış çalışmalarda ise *E. coli* üzerinde tüm derişimler için anlamlı bir fark gözlemlenmiş olsa da bu çözeltilerin *B. subtilis* suşu üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Tablo 7.5). Ancak bu çözeltilere 4 saat maruz bırakılan bakteriler ile yapılmış çalışmalarda gerek *E. coli* gerek ise *B. subtilis* bakterilerinde antimikrobiyal etkilerin oluştuğu gözlenmiştir. Çalışmada *E. coli* için sadece 1 numaralı kriyojel CFU değerlerinde kontrole karşı anlamlı bir fark yaratırken, *B. subtilis* üzerinde 4 numaralı kriyojel dışındaki tüm kriyojellerde kontrole karşı anlamlı

bir fark gözlemlenmiştir (Şekil 7.24- 7.30). Toplam canlılık sayılarına ilişkin veriler Tablo 7.5 ve Tablo 7.6’da sunulmuştur. Bu sonuçlara göre, gümüş partikül oluşturulmuş poly(HEMA-GMA)-NVF kriyojellerinin yapılan testler sonucunda antibakteriyel özelliklerinin arttırdığı gözlemlenmiştir.

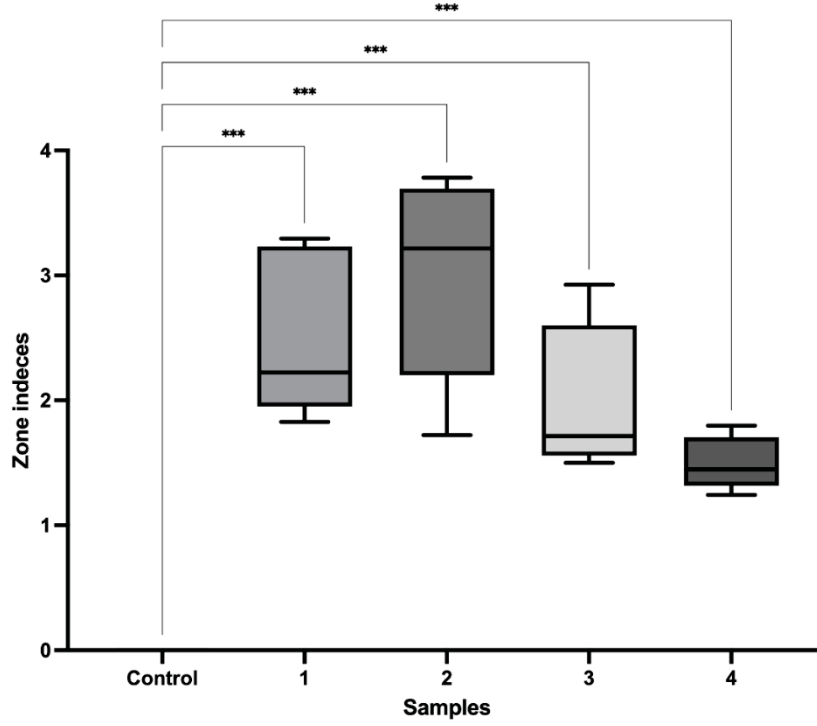


Şekil 7.24: Kriyojel kullanılan çalışmalarda agar üzerinde bakteriyel inhibisyon zonlarının görünümü

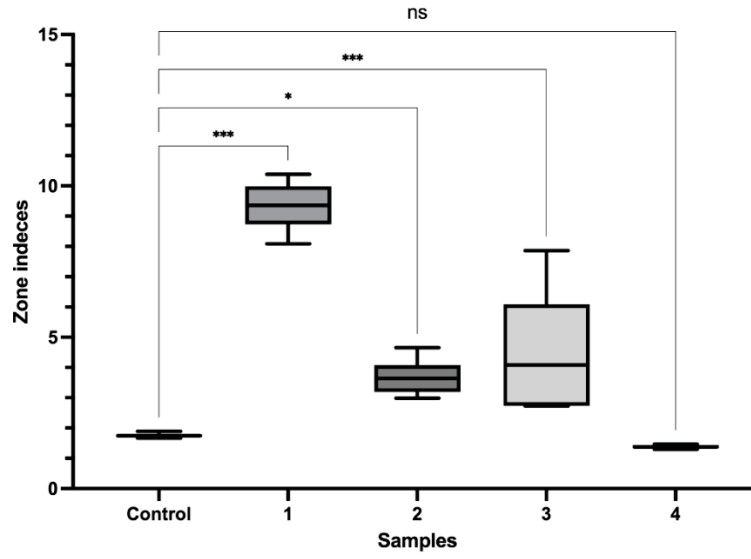


Şekil 7.25: Kriyojelleri içeren çözeltilerin kullanıldığı çalışmalarda agar üzerinde bakteriyel inhibisyon zonlarının görünümü

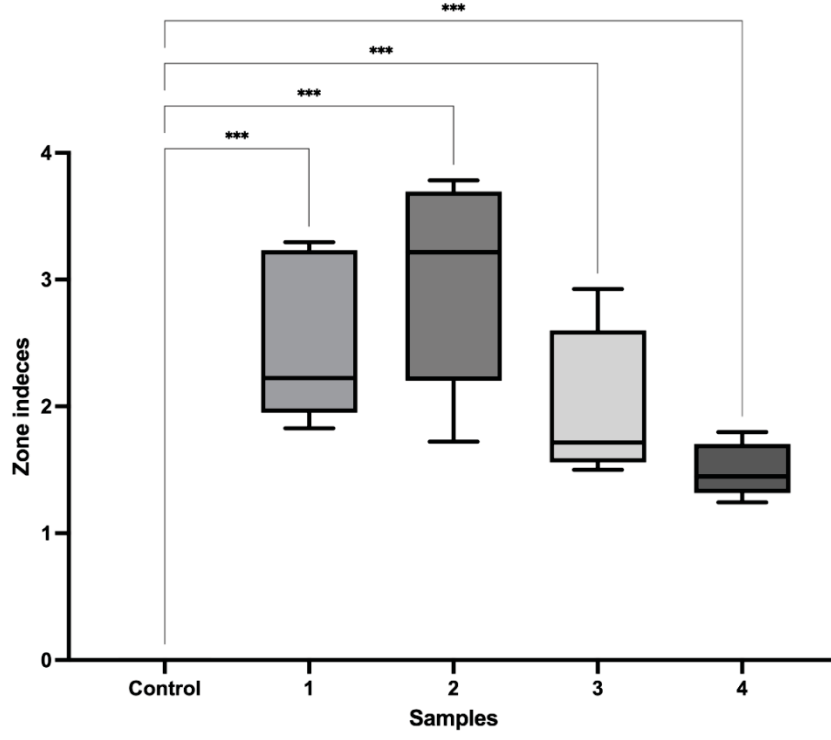




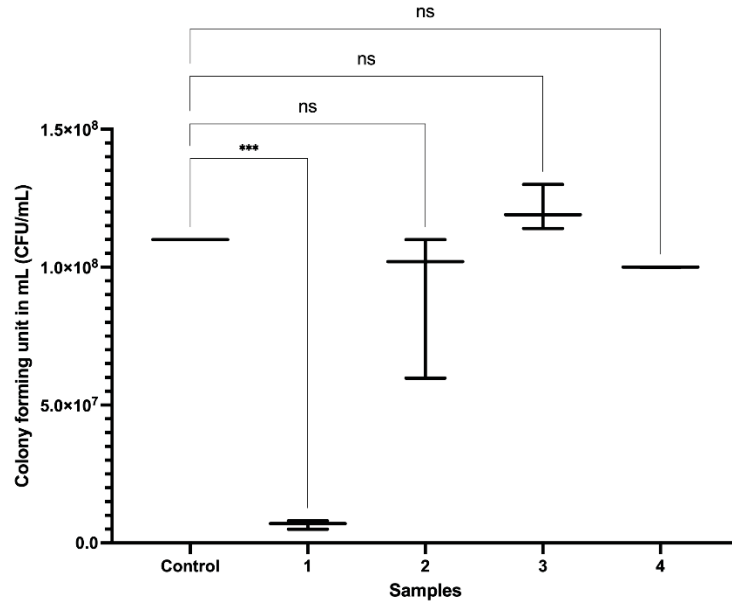
Şekil 7.26: Farklı kriyojellerin E. coli üzerindeki zon indeks değerlerinin karşılaştırılması. P value: .012 (ns), .033 (\*), .002 (\*\*), < .001(\*\*\*)



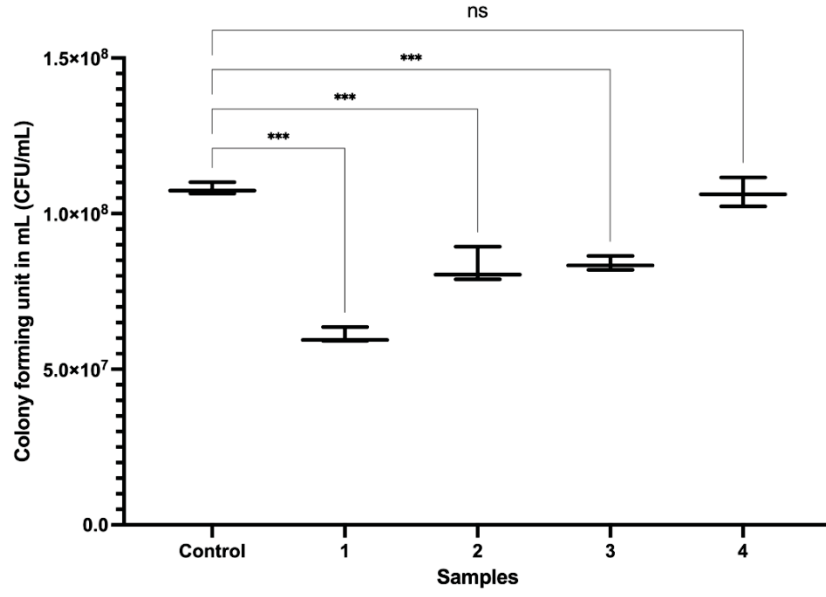
Şekil 7.27: Farklı kriyojellerin B. subtilis üzerindeki zon indeks değerlerinin karşılaştırılması. P value: .012 (ns), .033 (\*), .002 (\*\*), < .001(\*\*\*)



Şekil 7.28: Kriyojellerin bulunduğu çözeltilerin *E. coli* üzerindeki zon indeks değerlerinin karşılaştırılması. P value: .012 (ns), .033 (\*), .002 (\*\*), <.001 (\*\*\*)



Şekil 7.29: Kriyojellerin bulunduğu çözeltilerin *E. coli* hücrelerinin toplam canlılık sayıları üzerine etkilerinin karşılaştırılması. P value: .012 (ns), .033 (\*), .002 (\*\*), <.001 (\*\*\*)



Şekil 7.30: Kriyojellerin bulunduğu çözeltilerin *B. subtilis* hücrelerinin toplam canlılık sayıları üzerine etkilerinin karşılaştırılması. P value: .012 (ns), .033 (\*), .002 (\*\*), < .001 (\*\*\*)

Tablo 7.5: Disk difüzyon verilerine ilişkin özet tablo

Bakteri	Örnek tipi	Zon indeksleri				
		Kontrol	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	Kriyojel	0.000±0	9.704±2.269	4.475±0.552	4.07±0.794	1.405±0.144
<i>E. coli</i>	Solüsyon	0.000±0	2.462±0.632	2.994±0.845	1.988±0.582	1.492±0.211
<i>B. subtilis</i>	Kriyojel	1.755±0.074	9.333±0.804	3.675±0.578	4.497±2.062	1.383±0.062
<i>B. subtilis</i>	Solüsyon	0.000±0	0.000±0	0.000±0	0.000±0	0.000±0

Tablo 7.6: Toplam canlılık sayılarına ilişkin özet tablo

Bakteri	CFU/ml				
	Control	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	110±0.12	67±1.52	91±2.70	121±8.19	99±0.58
<i>B. subtilis</i>	108±1.87	61±2.51	83±5.68	84±2.29	107±4.67

## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan bu tez çalışması kapsamında metal şelatlaştırıcı özelliği bilinen N-Vinil formamit ile fonksiyonlandırılmış poli(HEMA-GMA) kriyojellerin kromatografik ve antibakteriyel performansı incelenmiştir. .

İlk olarak 2-Hidroksietil metakrilat ile Glisidil metakrilat monomerlerinin çapraz bağlayıcı olarak Etilen glikol dimetakrilat varlığında kriyojelasyon yöntemi ile poli(HEMA-GMA) kriyojeli elde edilmiştir. Bu kriyojel, sonrasında bazik ortamda glisidil metakrilat monomerinin sahip olduğu epoksi halkasının açılmasıyla N-Vinil formamit monomerinin nükleofilik katılma reaksiyonu ile fonksiyonlandırılarak poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojeli elde edilmiştir. Asidik ortamda protonlanabilme özelliğine de sahip N-Vinil formamit ligandı, içerdiği azot atomu üzerinden bakır ve çinko iyonları ile koordine kovalent bağ yapma yeteneği öngörülüp, kompleksleştirilerek, böylece immobilize metal afinite kolonuna dönüştürüldü.

Protein saflaştırma çalışmalarında etkili yöntemlerden bir tanesi olan immobilize metal afinite kromatografisinin bir uygulaması olarak bakır ve çinko yüklü kriyojeller ayrı ayrı elde edilerek öncelikle fiziksel ve kimyasal olarak karakterize edildi.

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında su tutma (şişme), mekanik dayanıklılık, FTIR, FESEM, elementel analiz, TGA ve DTA analizleri gerçekleştirildi. Sonuçların fiziksel karakteristiklerinin karşılaştırılabilir olması açısından bu testler tüm kriyojeller için uygulandı.

Şişme testleri sonucunda sentezlenen poli(HEMA-GMA) temelli tüm kriyojellerinin jelleşme verimleri, şişme derecesi-oranları, makrogözeneklilik, porozite ve gözenek hacmi gibi paramtereler hesaplanabilmiştir.

FTIR analizi neticesinde kriyojellere ait fonksiyonel gruplar teyit edilmiştir.

FESEM analizleri neticesinde kriyojellerin makrogözenekli morfolojik yapısı aydınlatılmış olup, elementel analiz ile de kriyojellerin sahip olduğu element içeriği de belirlenebilmiştir.

Kriyojellere ait sıcaklık arttıkça kütle değişiminin incelenebilmesi amacıyla TGA ve DSC analizleri gerçekleştirildi. Metal iyonu yüklü kriyojellerin termal ömrünün daha yüksek olduğu anlaşıldı.

poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojellerinin kromatografik performansı için en yaygın olarak bulunan serum proteinlerinden olan BSA model protein olarak seçilerek adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. Adsorpsiyon çalışmaları peristaltik pompa yardımcı ile sürekli sistemde incelenmiştir. Optimum koşulların belirlenmesinde ilk olarak çalışma pH'sı belirlendi. NVF ligandının katyonik bir monomer oluşunun da etkisiyle asidi ortamda çalışmalar yürütüldü. Adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi sonucunda Zn yüklü kriyojel için çalışma koşullarında pH 5.0 asetat tamponu tercih edilirken, Cu yüklü kriyojeller için ise pH 6.0 fosfat tamponu sistemi kullanıldı.

Optimum koşulların belirlenmesinde diğer parametreler olan başlangıç derişimi etkisi, iyonik şiddet (tuz etkisi), ve kolonun akış hızı gibi etkenlerde ayrı ayrı incelenmiştir. Bu sonuçların ardından adsorpsiyon izotermi incelendiğinde Langmuir izoterm modelinin, Freundlich izoterm modeline göre bu çalışmaya daha uyumlu olduğu hesaplanmıştır.

poli(HEMA-GMA) temelli metal iyonu immobilize edilmiş kriyojellerin BSA saflaştırmasına yönelik uygulamasında en önemli aşamalardan bir tanesi SDS-PAGE analizi olmuştur. SDS-PAGE ile gerçekleştirilen elektroforetik ayrımlarda kriyojel kolonların BSA'nın sulu çözeltiden ekstrakte edilmesinde etkili bir şekilde kullanılabileceği teyit edilmiştir.

poli(HEMA-GMA)-NVF-Cu<sup>2+</sup> ve poli(HEMA-GMA)-NVF-Zn<sup>2+</sup> kriyojellerinin tekrar kullanılabilirliklerinin incelenmesi için adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları 10 tekrar-döngü şeklinde gerçekleştirildi. İlk adsorpsiyon sonucu ile 10. tekrar sonucu arasında dramatik bir azalma gözlenmediği tespit edildi.

N-Vinil formamit ligandı üzerinden poli(HEMA-GMA) kriyojellerinin fonksiyonlandırılması işlemi sonrası bu kez gümüş iyonları ile reaktif olarak gümüş parçacıkların kriyojel içerisinde büyütülerek antibakteriyel özellikleri incelendi.

4 farklı yöntem ile hazırlanan gümüş parçacık içeren kompozit poli(HEMA-GMA) kriyojellerin yanı sıra poli(HEMA-GMA)-NVF kriyojelinin de antibakteriyel testlere tabi tutulması ardından, gümüş parçacık içeren kriyojellerin *E.Coli* ve *B.Subtilis* karşısında antibakteriyel özelliğinin geliştirilmiş olduğu tespit edildi.

Bu çalışmalar sonucunda bu tez kapsamında sentezlenen kriyojellerin kromatografi temelli Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE) şeklinde kullanılabileceği gibi antibakteriyel özellikleri ile de biyoteknolojik amaçlı çalışmalarda uygulanabileceği öngörülmektedir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Babanejad, N., Mfoafo, K., Zhang, E., Omidi, Y., Razeghifard, R., Omidian, H., Applications of Cryostructures in the Chromatographic Separation of Biomacromolecules, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2022.463546, 1683, 463546, 2022.
2. Khongkla, S., Phonchai, A., Nurerk, P., Bunkoed, O. A., Hierarchical Composite ZnO@Carbon Foam/PVA Cryogel Sorbent for the Extraction and Enrichment of Parabens and Synthetic Phenolic Antioxidant in Fruit Juice, *Microchem. J.*, doi:10.1016/J.MICROC.2021.107013, 173, 107013, 2022.
3. Charoenpornpukdee, K., Thammakhet, C., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Novel Pipette-Tip Graphene/Poly (Vinyl Alcohol) Cryogel Composite Extractor for the Analysis of Carbofuran and Carbaryl in Water, *J. Environ. Sci. Heal. Part B*, doi:10.1080/03601234.2014.929478, 49, 713–721, 2014.
4. Sillapawisut, S., Bunkoed, O., Llompart, M., Nurerk, P., In-Syringe Solid-Phase Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using an Iron–Carboxylate Metal–Organic Framework and Hypercrosslinked Polymer Composite Gelatin Cryogel–Modified Cellulose Acetate Adsorbent, *Microchim. Acta*, doi:10.1007/S00604-022-05276-8/TABLES/2, 2022, 189, 1–10, 2022.
5. Syed, M.H., Zahari, M.A.K.M., Khan, M.M.R., Beg, M.D.H., Abdullah, N., An Overview on Recent Biomedical Applications of Biopolymers: Their Role in Drug Delivery Systems and Comparison of Major Systems, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, doi:10.1016/J.JDDST.2022.104121, 80, 104121, 2023.
6. Asgari, S., Bagheri, H., Es-haghi, A., Super-Porous Semi-Interpenetrating Polymeric Composite Prepared in Straw for Micro Solid Phase Extraction of Antibiotics from Honey, Urine and Wastewater, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2020.461576, 1631, 461576, 2020.
7. Mallik, R., Hage, D.S., Affinity Monolith Chromatography, *J. Sep. Sci.*, doi:10.1002/JSSC.200600152, 29, 1686–1704, 2006.
8. Wilchek, M., Chaiken, I., An Overview of Affinity Chromatography. *Methods Mol. Biol.* doi:10.1007/978-1-60327-261-2\_1, 147, 1–6, 2000.
9. de Oliveira, A.C.F., Neves, I.C.O., Saraiva, J.A.M., de Carvalho, M.F.F., Batista, G.A., Veríssimo, L.A.A., Resende, J.V., Capture of Lysozyme on Macroporous Cryogels by Hydrophobic Affinity Chromatography, *Sep. Sci.*

- Technol*, doi:10.1080/01496395.2019.1617743, 55, 2012–2024, 2020.
10. Rodriguez, E.L., Poddar, S., Iftekhhar, S., Suh, K., Woolfork, A.G., Ovbude, S., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S., Hage, D.S., Affinity Chromatography: A Review of Trends and Developments over the Past 50 Years, *J. Chromatogr. B*, doi:10.1016/J.JCHROMB.2020.122332, 1157, 122332, 2020.
  11. Arora, S., Saxena, V., Ayyar, B.V., Affinity Chromatography: A Versatile Technique for Antibody Purification, *Methods*, doi:10.1016/J.YMETH.2016.12.010, 116, 84–94, 2017.
  12. Hollis, D.F., Suen, E., Shorr, R.G.L., Ralston, S., Cooke, N., Fast Affinity Chromatography Using Small Particle Silica-Based Packing Materials, *J. Liq. Chromatogr.*, doi:10.1080/01483918708068917, 10, 2349–2368, 1987.
  13. Jiang, T., Mallik, R., Hage, D.S., Affinity Monoliths for Ultrafast Immunoextraction, *Anal. Chem.*, doi:10.1021/AC0483668/ASSET/IMAGES/LARGE/AC0483668F00008.JPEG, 77, 2362–2372, 2005.
  14. Jandera, P., Advances in the Development of Organic Polymer Monolithic Columns and Their Applications in Food Analysis—A Review. *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2013.08.010, 1313, 37–53, 2013.
  15. Wan, B., Li, J., Ma, F., Yu, N., Zhang, W., Jiang, L., Wei, H., Preparation and Properties of Cryogel Based on Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate-Co-Glycidyl Methacrylate), *Langmuir*, doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.8B04021/ASSET/IMAGES/LARGE/LA-2018-04021J\_0009.JPEG, 35, 3284–3294, 2019.
  16. Saeed, A., Maya, F., Xiao, D.J., Najam-ul-Haq, M., Svec, F., Britt, D.K., Growth of a Highly Porous Coordination Polymer on a Macroporous Polymer Monolith Support for Enhanced Immobilized Metal Ion Affinity Chromatographic Enrichment of Phosphopeptides, *Adv. Funct. Mater.*, doi:10.1002/ADFM.201400116, 24, 5790–5797, 2014.
  17. Bandari, R., Kuballa, J., Buchmeiser, M.R., Ring-Opening Metathesis Polymerization-Derived, Lectin-Functionalized Monolithic Supports for Affinity Separation of Glycoproteins, *J. Sep. Sci.* doi:10.1002/JSSC.201201042, 36, 1169–1175, 2013.
  18. Campbell, D.H., Luescher, E., Lerman, L.S, Immunologic Adsorbents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/PNAS.37.9.575, 37, 575–578, 1951.



19. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation, *Nat.*, doi:10.1038/258598a0, 258, 598–599, **1975**.
20. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schäfer, F., Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. *Methods Enzymol.* doi:10.1016/S0076-6879(09)63027-5, 463, 439–473, 2009.
21. Bakhshpour, M., Derazshamshir, A., Bereli, N., Elkak, A., Denizli, A., [PHEMA/PEI]–Cu(II) Based Immobilized Metal Affinity Chromatography Cryogels: Application on the Separation of IgG from Human Plasma. *Mater. Sci. Eng. C*, doi:10.1016/J.MSEC.2016.01.005, 61, 824–831, 2016.
22. Cheung, R.C.F., Wong, J.H., Ng, T.B., Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: A Review on Its Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1007/S00253-012-4507-0/METRICS, 96, 1411–1420, 2012.
23. Hugel, T., Grosholz, M., Clausen-Schaumann, H., Pfau, A., Gaub, H., Seitz, M., Elasticity of Single Polyelectrolyte Chains and Their Desorption from Solid Supports Studied by AFM Based Single Molecule Force Spectroscopy, *Macromolecules*, doi:10.1021/MA0009404/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MA0009404E00007.GIF., 34, 1039–1047, 2001.
24. Yue, M.; Imai, K.; Miura, Y.; Hoshino, Y. Design and Preparation of Thermo-Responsive Vinylamine-Containing Micro-Gel Particles for Reversible Absorption of Carbon Dioxide. *Polym. J.* **2017**, 49, 601–606, doi:10.1038/pj.2017.28.
25. Yao, K., Wang, S., Wang, Q., Yang, X., Synthesis and Characterization of Functional Monomer N-Vinyl Formamide (NVF), *Macromol. Chem. Phys.* 223, 2100386, 2022..
26. Şarkaya, K.; Allı, A. Synthesis and Characterization of Cryogels of p(HEMA-N-Vinylformamide) and p(HEMA-N-Vinylpyrrolidone) for Chemical Release Behaviour, *J. Porous Mater.*, doi:10.1002/MACP.202100386, **2021**.
27. Şarkaya, K., Akıncıoğlu, G., Akıncıoğlu, S., Investigation of Tribological Properties of HEMA-Based Cryogels as Potential Articular Cartilage Biomaterials, doi:10.1080/25740881.2022.2039190, 2022.
28. Güler, A., Şarkaya, K., Kavakcıoğlu Yardımcı, B., Evaluation of the

- Antiproliferative and Oxidative Effects of HEMA Based Polymeric Cryogels Including N-Vinyl Formamide on the Model Eukaryotic Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*, *Biologia (Bratisl)*, doi:10.1007/S11756-024-01759-6/FIGURES/5, 79, 2933–2943, 2024.
29. Hamidi, S., Monajjemzadeh, F., Siahi-Shadbad, M., Khatibi, S.A., Farjami, A., Antibacterial Activity of Natural Polymer Gels and Potential Applications without Synthetic Antibiotics, *Polym. Eng. Sci*, doi:10.1002/PEN.26184, 63, 5–21, 2023..
  30. Alves, D., Olívia Pereira, M., Mini-Review: Antimicrobial Peptides and Enzymes as Promising Candidates to Functionalize Biomaterial Surfaces, <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.889120>, 30, 483–499, 2014.
  31. Dhanasekar, M., Jenefer, V., Nambiar, R.B., Babu, S.G., Selvam, S.P., Neppolian, B., Bhat, S.V., Ambient Light Antimicrobial Activity of Reduced Graphene Oxide Supported Metal Doped TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and Their PVA Based Polymer Nanocomposite Films, *Mater. Res. Bull.*, doi:10.1016/J.MATERRESBULL.2017.08.056, 97, 238–243, 2018.
  32. Zhong, Y., Xiao, H., Seidi, F., Jin, Y., Natural Polymer-Based Antimicrobial Hydrogels without Synthetic Antibiotics as Wound Dressings, *Biomacromolecules*, doi:10.1021/ACS.BIOMAC.0C00760/ASSET/IMAGES/LARGE/BM0C00760\_005.JPEG, 21, 2983–3006, 2020.
  33. Lozinsky, V.I., Okay, O., Basic Principles of Cryotropic Gelation, doi:10.1007/978-3-319-05846-7\_2, 2014.
  34. Kuzina, M.A., Kartsev, D.D., Stratonovich, A. V, Levkin, P.A., Kuzina, M.A., Levkin, P.A., Kartsev, D.D., Stratonovich, A. V., Organogels versus Hydrogels: Advantages, Challenges, and Applications. *Adv. Funct. Mater.*, doi:10.1002/ADFM.202301421, 33, 2301421, 2023.
  35. Alothman, Z.A., A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Mater.*, doi:10.3390/MA5122874, 5, 2874-2902 **2012**.
  36. Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., The Potential of Polymeric Cryogels in Bioseparation, *Bioseparation*, doi:10.1023/A:1016386902611/METRICS, 10, 163–188, 2001.
  37. Rosiak, J.M., Yoshii, F., Hydrogels and Their Medical Applications, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*,

doi:10.1016/S0168-583X(99)00118-4, 151, 56–64, 1999.

38. Ahmed, E.M., Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review, *J. Adv. Res.*, doi:10.1016/J.JARE.2013.07.006, 6, 105–121, 2015.
39. Buwalda, S.J., Boere, K.W.M., Dijkstra, P.J., Feijen, J., Vermonden, T., Hennink, W.E., Hydrogels in a Historical Perspective: From Simple Networks to Smart Materials, *J. Control. Release*, doi:10.1016/J.JCONREL.2014.03.052, 190, 254–273, 2014.
40. Khansari, M.M., Sorokina, L. V., Mukherjee, P., Mukhtar, F., Shirdar, M.R., Shahidi, M., Shokuhfar, T., Classification of Hydrogels Based on Their Source: A Review and Application in Stem Cell Regulation, *JOM*, doi:10.1007/S11837-017-2412-9/TABLES/1, 69, 1340–1347, 2017.
41. Zhu, J., Marchant, R.E., Design Properties of Hydrogel Tissue-Engineering Scaffolds, *Expert Rev. Med. Devices*, doi:10.1586/ERD.11.27, 8, 607–626, 2011.
42. Oyen, M.L., Mechanical Characterisation of Hydrogel Materials, *Int. Mater. Rev.*, doi:10.1179/1743280413Y.0000000022, 59, 44–59, 2014.
43. Wang, H., Bedford, F.K., Brandon, N.J., Moss, S.J., Olsen, R.W., GABAA-Receptor-Associated Protein Links GABAA Receptors and the Cytoskeleton, *Nat.*, doi:10.1038/16264, 397, 69–72, 1999.
44. Iizawa, T., Taketa, H., Maruta, M., Ishido, T., Gotoh, T., Sakohara, S., Synthesis of Porous Poly(N-Isopropylacrylamide) Gel Beads by Sedimentation Polymerization and Their Morphology, *J. Appl. Polym. Sci.*, doi:10.1002/APP.25605, 104, 842–850, 2007.
45. Osada, Y., Matsuda, A., Shape Memory in Hydrogels. *Nat.*, doi:10.1038/376219a0, 376, 219–219, 1995.
46. Matsuda, A., Sato, ichi, Yasunaga, H., Osada, Y., Order-Disorder Transition of a Hydrogel Containing an n-Alkyl Acrylate, *Macromolecules*, 27, 7695–7698, 1994.
47. Zhang, H., Han, D., Yan, Q., Fortin, D., Xia, H., Zhao, Y., Light-Healable Hard Hydrogels through Photothermally Induced Melting–Crystallization Phase Transition, *J. Mater. Chem. A*, doi:10.1039/C4TA02463J, 2, 13373–13379, 2014.
48. Shin, J., Braun, P. V., Lee, W., Fast Response Photonic Crystal pH Sensor Based on Templated Photo-Polymerized Hydrogel Inverse Opal. *Sensors*

- Actuators B Chem.*, doi:10.1016/J.SNB.2010.07.018, 150, 183–190, 2010.
49. Hacker, M.C., Nawaz, H.A, Multi-Functional Macromers for Hydrogel Design in Biomedical Engineering and Regenerative Medicine, *Int. J. Mol. Sci.*, doi:10.3390/IJMS161126056, 16, 27677-27706, **2015**.
  50. Peppas, N.A., Mikos, A.G, PREPARATION METHODS AND STRUCTURE OF HYDROGELS, *Hydrogels Med Pharm*, doi:10.1201/9780429285097-1/PREPARATION-METHODS-STRUCTURE-HYDROGELS-NIKOLAOS-PEPPAS-ANTONIOS-MIKOS, 1–26, 1986.
  51. Ho, T.C., Chang, C.C., Chan, H.P., Chung, T.W., Shu, C.W., Chuang, K.P., Duh, T.H., Yang, M.H., Tyan, Y.C., Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine, *Mol.*, doi:10.3390/MOLECULES27092902, 27, 2902 **2022**.
  52. Caló, E., Khutoryanskiy, V. V., Biomedical Applications of Hydrogels: A Review of Patents and Commercial Products, *Eur. Polym. J.*, doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2014.11.024, 65, 252–267, 2015.
  53. Chen, G., Tang, W., Wang, X., Zhao, X., Chen, C., Zhu, Z., Applications of Hydrogels with Special Physical Properties in Biomedicine, *Polym.*, doi:10.3390/POLYM11091420, 11, 1420, **2019**.
  54. Ambika, Singh, P.P., Natural Polymer-Based Hydrogels for Adsorption Applications, *Nat. Polym. Green Adsorbents Water Treat.*, doi:10.1016/B978-0-12-820541-9.00008-9, 267–306, 2021.
  55. Aswathy, S.H., Narendrakumar, U., Manjubala, I., Commercial Hydrogels for Biomedical Applications, *Heliyon*, doi:10.1016/J.HELİYON.2020.E03719, 6 **2020**.
  56. Kathuria, N., Tripathi, A., Kar, K.K., Kumar, A., Synthesis and Characterization of Elastic and Macroporous Chitosan–Gelatin Cryogels for Tissue Engineering, *Acta Biomater.*, doi:10.1016/J.ACTBIO.2008.07.009, 5, 406–418, 2009.
  57. Eigel, D., Werner, C., Newland, B., Cryogel Biomaterials for Neuroscience Applications, *Neurochem. Int.*, doi:10.1016/J.NEUINT.2021.105012, 147, 105012, 2021.
  58. Lozinsky, V., Cryostructuring of Polymeric Systems. 50.† Cryogels and Cryotropic Gel-Formation: Terms and Definitions, *Gels*, doi:10.3390/gels4030077, 4, 77, 2018.
  59. Ammar, N.E. Ben., Barbouche, M., Hamzaoui, A.H., Historical View of

- Hydrogel Characterization, *Hydrogels Based Nat. Polym.*, doi:10.1016/B978-0-12-816421-1.00017-3, 459–479, 2020.
60. Ahmed, E.M., Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review, *J. Adv. Res.*, 6, 105–121, 2015.\*
  61. Kawaguchi, H., Thermoresponsive Microhydrogels: Preparation, Properties and Applications, *Polym. Int.*, doi:10.1002/PI.4675, 63, 925–932, 2014.
  62. Hoffman, A.S., Hydrogels for Biomedical Applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, doi:10.1016/J.ADDR.2012.09.010, 64, 18–23, 2012.
  63. Bencherif, S.A., Sands, R.W., Bhatta, D., Arany, P., Verbeke, C.S., Edwards, D.A., Mooney, D.J., Injectable Preformed Scaffolds with Shape-Memory Properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, doi:10.1073/PNAS.1211516109/SUPPL\_FILE/SM04.MOV, 109, 19590–19595, 2012.
  64. Vogler, S., Prokoph, S., Freudenberg, U., Binner, M., Tsurkan, M., Werner, C., Kempermann, G., Defined Geldrop Cultures Maintain Neural Precursor Cells. *Sci. Reports*, doi:10.1038/s41598-018-26417-1, 8, 1–12, 2018.
  65. Memic, A., Colombani, T., Eggermont, L.J., Rezaeeyazdi, M., Steingold, J., Rogers, Z.J., Navare, K.J., Mohammed, H.S., Bencherif, S.A., Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications. *Adv. Ther.*, doi:10.1002/ADTP.201800114, 2, 1800114, 2019.
  66. Villard, P., Rezaeeyazdi, M., Colombani, T., Joshi-Navare, K., Rana, D., Memic, A., Bencherif, S.A., Autoclavable and Injectable Cryogels for Biomedical Applications, *Adv. Healthc. Mater.*, doi:10.1002/ADHM.201900679, 8, 1900679, 2019.
  67. Rizwan, M., Chan, S.W., Comeau, P.A., Willett, T.L., Yim, E.K.F., Effect of Sterilization Treatment on Mechanical Properties, Biodegradation, Bioactivity and Printability of GelMA Hydrogels, *Biomed. Mater.*, doi:10.1088/1748-605X/ABA40C, 15, 065017, 2020.
  68. Şarkaya, K., Allı, A., Synthesis and Characterization of Cryogels of p(HEMA-N-Vinylformamide) and p(HEMA-N-Vinylpyrrolidone) for Chemical Release Behaviour. *J. Porous Mater.*, doi:10.1007/S10934-021-01037-9/TABLES/4, 28, 853–865, 2021.
  69. Fan, J.P., Zhang, F.Y., Yang, X.M., Zhang, X.H., Cao, Y.H., Peng, H.L., Preparation of a Novel Supermacroporous Molecularly Imprinted Cryogel

- Membrane with a Specific Ionic Liquid for Protein Recognition and Permselectivity, *J. Appl. Polym. Sci.*, doi:10.1002/APP.46740, 135, 46740, 2018.
70. Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergenståhl, B., Mattiasson, B., Macroporous Elastic Polyacrylamide Gels Prepared at Subzero Temperatures: Control of Porous Structure, *J. Mater. Chem.*, doi:10.1039/B606734D, 16, 4065–4073, 2006.
  71. Mattiasson, B., Cryogels for Biotechnological Applications, *Adv. Polym. Sci.*, doi:10.1007/978-3-319-05846-7\_7/FIGURES/17, 263, 245–281, 2014.
  72. Bakhshpour, M., Idil, N., Perçin, I., Denizli, A., Biomedical Applications of Polymeric Cryogels, *Appl. Sci.*, doi:10.3390/APP9030553, 9, 553 2019.
  73. Ertürk, G., Mattiasson, B., Cryogels-Versatile Tools in Bioseparation, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2014.05.055, 1357, 24–35, 2014.
  74. Şarkaya, K., Allı, A., Synthesis and Characterization of Cryogels of p (HEMA-N-Vinylformamide) and p (HEMA-N-Vinylpyrrolidone) for Chemical Release Behaviour, *J. Porous Mater.*, 1–13, 2021.
  75. Lozinsky, V.I., A Brief History of Polymeric Cryogels, 1–48, 2014.
  76. Mikhalovsky, S. V., Savina, I.N., Dainiak, M., Ivanov, A.E., Galaev, I.Y., Biomaterials/Cryogels, *Compr. Biotechnol. Second Ed.* doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00432-3, 5, 11–22, 2011.
  77. Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I.Y., Pore Structure in Supermacroporous Polyacrylamide Based Cryogels, *Soft Matter*, doi:10.1039/b510010k, 1, 303–309, 2005.
  78. Bakhshpour, M., Idil, N., Perçin, I., Denizli, A., Biomedical Applications of Polymeric Cryogels, doi:10.3390/APP9030553, 9, 553, 2019.
  79. Zhang, H., Zhang, F., Wu, J., Physically Crosslinked Hydrogels from Polysaccharides Prepared by Freeze–Thaw Technique, *React. Funct. Polym.*, doi:10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2012.12.014, 73, 923–928, 2013.
  80. Gun'ko, V.M., Savina, I.N., Mikhalovsky, S. V., Cryogels: Morphological, Structural and Adsorption Characterisation, *Adv. Colloid Interface Sci.*, doi:10.1016/J.CIS.2012.11.001, 187–188, 1–46, 2013.
  81. Baimenov, A., Berillo, D.A., Pouloupoulos, S.G., Inglezakis, V.J., A Review of Cryogels Synthesis, Characterization and Applications on the Removal of Heavy Metals from Aqueous Solutions, *Adv. Colloid Interface Sci.*,

doi:10.1016/J.CIS.2019.102088, 276, 102088, 2020.

82. Bhat, S., Tripathi, A., Kumar, A., Supermacro porous Chitosan-Agarose-Gelatin Cryogels: In Vitro Characterization and in Vivo Assessment for Cartilage Tissue Engineering, *J. R. Soc. Interface*, doi:10.1098/rsif.2010.0455, 8, 540–554, 2011.
83. Memic, A., Alhadrami, H.A., Hussain, A., Synthesis and Characterization of GO-Hydrogels Composites Related Content Hydrogels 2.0: Improved Properties with Nanomaterial Composites for Biomedical Applications., doi:10.1088/1757-899X/258/1/012002.
84. Henderson, T.M.A., Ladewig, K., Haylock, D.N., McLean, K.M., O'Connor, A.J. Cryogels for Biomedical Applications, *J. Mater. Chem. B*, doi:10.1039/C3TB20280A, 1, 2682–2695, 2013.
85. Ivanov, R. V., Lozinsky, V.I., Noh, S.K., Han, S.S., Lyoo, W.S., Preparation and Characterization of Polyacrylamide Cryogels Produced from a High-Molecular-Weight Precursor. I. Influence of the Reaction Temperature and Concentration of the Crosslinking Agent, *J. Appl. Polym. Sci.*, doi:10.1002/APP.26559, 106, 1470–1475, 2007.
86. Rezaeeyazdi, M., Colombani, T., Memic, A., Bencherif, S.A. Injectable Hyaluronic Acid-Co-Gelatin Cryogels for Tissue-Engineering Applications, *Materials (Basel)*, doi:10.3390/MA11081374, 11, 2018.
87. Su, E., Okay, O., Cryogenic Formation-Structure-Property Relationships of Poly(2-Acrylamido-2-Methyl-1-Propanesulfonic Acid) Cryogels, *Polymer (Guildf)*, doi:10.1016/j.polymer.2019.121603, 178, 121603, 2019.
88. Ceylan, S., Göktürk, D., Bölgen, N., Effect of Crosslinking Methods on the Structure and Biocompatibility of Polyvinyl Alcohol/Gelatin Cryogels, *Biomed. Mater. Eng.*, doi:10.3233/BME-161589, 27, 327–340, 2016.
89. Idumah, C.I., Recently Emerging Advancements in Polymeric Cryogel Nanostructures and Biomedical Applications. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, doi:10.1080/00914037.2022.2097678, 72, 1307–1327, 2023.
90. Shiekh, P.A., Andrabi, S.M., Singh, A., Majumder, S., Kumar, A., Designing Cryogels through Cryostructuring of Polymeric Matrices for Biomedical Applications, *Eur. Polym. J.*, doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.110234, 144, 110234, 2021.
91. Okoye, I.J., Idumah, C.I., Ogbu, J.E.; Obi, C., Ezenkwa, O., Ogah, O.A., Ibenta,

- M., Development, Fabrication, Characterization, Features and Multifarious Applications of Cryogel Polymeric Nanoarchitectures: A Review, *Polym. Technol. Mater.*, doi:10.1080/25740881.2024.2310560, 63, 990–1010, 2024.
92. Şarkaya, K., Akıncioğlu, G., Akıncioğlu, S., Investigation of Tribological Properties of HEMA-Based Cryogels as Potential Articular Cartilage Biomaterials, <https://doi.org/10.1080/25740881.2022.2039190>, 61, 1174–1190, 2022.
93. Behrendt, F., Pretzel, D., Cseresnyés, Z., Kleinstaubler, M., Wloka, T., Radosa, L., Figge, M.T., Gottschaldt, M., Brakhage, A., Schubert, U.S., Hydrophilic Cryogels as Potential 3D Cell Culture Materials: Synthesis and Characterization of 2-(Methacrylamido) Glucopyranose-Based Polymer Scaffolds, *J. Polym. Sci.*, doi:10.1002/POL.20230499, 61, 3039–3054, 2023.
94. Calik, F., Degirmenci, A., Maouati, H., Sanyal, R., Sanyal, A., Redox-Responsive “Catch and Release” Cryogels: A Versatile Platform for Capture and Release of Proteins and Cells, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, doi:10.1021/ACSBIOMATERIALS.4C00239/ASSET/IMAGES/LARGE/AB4C00239\_0009.JPEG, 10, 3017–3028, 2024.
95. Carriero, V.C., Di Muzio, L., Petralito, S., Casadei, M.A., Paolicelli, P., Cryogel Scaffolds for Tissue-Engineering: Advances and Challenges for Effective Bone and Cartilage Regeneration, *Gels*, doi:10.3390/GELS9120979, 9, 979 2023.
96. Gürel, C.M., Bozbeyoğlu, N.N., Yardımcı, B.K., Şarkaya, K., Mutlu, D., Akıncioğlu, Sıtkı, Doğan, N.M., Arslan, Ş., Allı, A. Biosourced Polymeric Cryogels for Future Biomedical Applications with Remarkable Antimicrobial Activities and Tribological Properties, *Mater. Today Commun.*, doi:10.1016/J.MTCOMM.2024.108387, 38, 108387, 2024.
97. Nikhil, A., Kumar, A., Evaluating Potential of Tissue-Engineered Cryogels and Chondrocyte Derived Exosomes in Articular Cartilage Repair, *Biotechnol. Bioeng.*, doi:10.1002/BIT.27982, 119, 605–625, 2022.
98. Çetin, K., Şarkaya, K., Denizli, A., Clinical Applications and Future Clinical Trials of the Drug Delivery System, *Nanotechnol. Drug Deliv. Pharm.*, doi:10.1016/B978-0-323-95325-2.00020-1, 259–294, 2023.
99. Pacelli, S., Di Muzio, L., Paolicelli, P., Fortunati, V., Petralito, S., Trilli, J., Casadei, M.A., Dextran-Polyethylene Glycol Cryogels as Spongy Scaffolds for Drug Delivery, *Int. J. Biol. Macromol.*, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.273,



**2020,**

100. Çetin, K., Denizli, A., Polyethylenimine-Functionalized Microcryogels for Controlled Release of Diclofenac Sodium, *React. Funct. Polym.*, doi:10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2021.105125, 170, 105125, 2022.
101. Çetin, K., Denizli, A., 5-Fluorouracil Delivery from Metal-Ion Mediated Molecularly Imprinted Cryogel Discs, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, doi:10.1016/J.COLSURFB.2014.12.038, 126, 401–406, 2015.
102. Lee, S.Y., Chew, K.W., Show, P.L., Cell Separation and Disruption, Product Recovery, and Purification, doi:10.1007/978-3-030-16230-6\_8, 237–271, 2019.
103. Guzman, N.A., Guzman, D.E., A Two-Dimensional Affinity Capture and Separation Mini-Platform for the Isolation, Enrichment, and Quantification of Biomarkers and Its Potential Use for Liquid Biopsy, *Biomed.*, doi:10.3390/BIOMEDICINES8080255, 8, 255, 2020.
104. Ashyüce, S., Idil, N., Mattiasson, B., Upgrading of Bio-Separation and Bioanalysis Using Synthetic Polymers: Molecularly Imprinted Polymers (MIPs), Cryogels, Stimuli-Responsive Polymers, *Eng. Life Sci.*, doi:10.1002/ELSC.202100106, 22, 204–216, 2022.
105. Farías, T., Hajizadeh, S., Ye, L., Cryogels with High Cisplatin Adsorption Capacity: Towards Removal of Cytotoxic Drugs from Wastewater, *Sep. Purif. Technol.*, doi:10.1016/J.SEPPUR.2019.116203, 235, 116203, 2020.
106. Mallik, B., Chakravarti, B., Chakravarti, D.N., Principles of Chromatography, *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.*, doi:10.1002/CPET.7, 13, 6.1.1-6.1.23, 2016.
107. Lundanes, E., Reubsaet, L., Greibrokk, T., Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods, 207, 2014.
108. Li, L., Liu, Y., Wang, Z., Yang, L., Liu, H., Development and Applications of Deep Eutectic Solvent Derived Functional Materials in Chromatographic Separation, *J. Sep. Sci.*, doi:10.1002/JSSC.202000523, 44, 1098–1121, 2021.
109. Feng, K., Wang, S., Han, L., Qian, Y., Li, H., Li, X., Jia, L., Hu, Y., Wang, H., Liu, M., Configuration of the Ion Exchange Chromatography, Hydrophilic Interaction Chromatography, and Reversed-Phase Chromatography as off-Line Three-Dimensional Chromatography Coupled with High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry for the Multicomponent Characterization of *Uncaria Sessilifrutus*, *J. Chromatogr. A*,

- doi:10.1016/J.CHROMA.2021.462237, 1649, 462237, 2021.
110. Kanu, A.B., Recent Developments in Sample Preparation Techniques Combined with High-Performance Liquid Chromatography: A Critical Review, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2021.462444, 1654, 462444, 2021.
  111. Knežević, L., Cukrov, N., Bura-Nakić, E., Ion-Exchange Chromatography as a Tool for Investigating Vanadium Speciation in Sediments: Preliminary Studies, *J. Soils Sediments*, doi:10.1007/S11368-019-02484-3/TABLES/1, 20, 2733–2740, 2020.
  112. Striegel, A.M., Size-Exclusion Chromatography *Liq. Chromatogr. Fundam. Instrum*, doi:10.1016/B978-0-323-99968-7.00022-9, 1, 509-537, **2023**.
  113. Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X., Pharmaceutical and Biomedical Applications of Affinity Chromatography: Recent Trends and Developments, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, doi:10.1016/J.JPBA.2012.01.004, 69, 93–105, 2012.
  114. Urh, M., Simpson, D., Zhao, K., Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods, *Methods Enzymol.*, doi:10.1016/S0076-6879(09)63026-3, 463, 417–438, 2009.
  115. Lee, W.C., Lee, K.H., Applications of Affinity Chromatography in Proteomics, *Anal. Biochem.*, doi:10.1016/J.AB.2003.08.031, 324, 1–10, 2004.
  116. Parikh, I., Cuatrecasas, P., Affinity Chromatography, Principles and Applications, *Methods Protein Sep.*, doi:10.1007/978-1-4757-1257-5\_9, 255–276, 1975.
  117. Kip, C., Hamaloğlu, K.Ö., Demir, C., Tuncel, A., Recent Trends in Sorbents for Bioaffinity Chromatography, *J. Sep. Sci.*, doi:10.1002/JSSC.202001117, 44, 1273–1291, 2021.
  118. Wu, H., Bruley, D.F., Chelator, Metal Ion and Buffer Studies for Protein C Separation. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*, doi:10.1016/S1095-6433(01)00550-5, 132, 213–220, 2002.
  119. Chang, Y.Y., Li, H., Sun, H., Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) for Metalloproteomics and Phosphoproteomics, *Inorg. Organomet. Transit. Met. Complexes with Biol. Mol. Living Cells*, doi:10.1016/B978-0-12-803814-7.00009-5, 329–353, 2017.
  120. Cheung, R.C.F., Wong, J.H., Ng, T.B., Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: A Review on Its Applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,

doi:10.1007/S00253-012-4507-0/METRICS, 96, 1411–1420, 2012.

121. Loughran, S.T., Bree, R.T., Walls, D., Poly-Histidine-Tagged Protein Purification Using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), *Methods Mol. Biol.*, doi:10.1007/978-1-0716-3362-5\_11, 2699, 193–223, 2023.
122. Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A., New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptides Containing Neighbouring Histidine Residues, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/S0021-9673(00)93969-4, 411, 177–184, 1987.
123. Jiang, W., Graham, B., Spiccia, L., Hearn, M.T.W., Protein Selectivity with Immobilized Metal Ion-Tacn Sorbents: Chromatographic Studies with Human Serum Proteins and Several Other Globular Proteins, *Anal. Biochem.*, doi:10.1006/ABIO.1997.2395, 255, 47–58, 1998.
124. Lingg, N., Öhlknecht, C., Fischer, A., Mozgovicz, M., Scharl, T., Oostenbrink, C., Jungbauer, A., Proteomics Analysis of Host Cell Proteins after Immobilized Metal Affinity Chromatography: Influence of Ligand and Metal Ions, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2020.461649, 1633, 461649, 2020.
125. Jiang, L., Ye, L., Nanoparticle-Supported Temperature Responsive Polymer Brushes for Affinity Separation of Histidine-Tagged Recombinant Proteins, *Acta Biomater.*, doi:10.1016/J.ACTBIO.2019.04.056, 94, 447–458, 2019.
126. Rigüero, V., Clifford, R., Dawley, M., Dickson, M., Gastfriend, B., Thompson, C., Wang, S.C., O'Connor, E., Immobilized Metal Affinity Chromatography Optimization for Poly-Histidine Tagged Proteins, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/J.CHROMA.2020.461505, 1629, 461505, 2020.
127. Bereli, N., Ertürk, G., Denizli, A., Histidine Containing Macroporous Affinity Cryogels for Immunoglobulin G Purification. *Sep. Sci. Technol.*, doi:10.1080/01496395.2012.662258, 47, 1813–1820, 2012.
128. Asena Özbek, M., Çimen, D., Bereli, N., Denizli, A., Metal-Chelated Polyamide Hollow Fiber Membranes for Ovalbumin Purification from Egg White, *J. Chromatogr. B*, doi:10.1016/J.JCHROMB.2022.123293, 1203, 123293, 2022.
129. Rothschild, M.A., Oratz, M., Schreiber, S.S., Serum Albumin, *Hepatology*, doi:10.1002/HEP.1840080234, 8, 385–401, 1988.
130. Behera, S., Mohanty, P., Dash, P.P., Mohapatra, P., Shubhadarshinee, L., Behura, R., Kumar Barick, A., Mohapatra, P., Jali, B.R., Selective Binding of

- Bovine Serum Albumin (BSA): A Comprehensive Review, doi:10.33263/BRIAC136.555, 13, 555, 2023.
131. Bujacz, A., Talaj, J.A., Zielinski, K., Pietrzyk-Brzezinska, A.J., Neumann, P., Crystal Structures of Serum Albumins from Domesticated Ruminants and Their Complexes with 3,5-Diiodosalicylic Acid, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, doi:10.1107/S205979831701470X/DW5186SUP1.PDF, 73, 896–909, 2017.
  132. Du, C., Deng, D., Shan, L., Wan, S., Cao, J., Tian, J., Achilefu, S., Gu, Y. A, pH-Sensitive Doxorubicin Prodrug Based on Folate-Conjugated BSA for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Biomaterials*, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.01.041, 34, 3087–3097, 2013.
  133. Tuzmen, N., Kalburcu, T., Uygun, D.A., Akgol, S., Denizli, A., A Novel Affinity Disks for Bovine Serum Albumin Purification, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, doi:10.1007/S12010-014-1273-8/FIGURES/10, 175, 454–468, 2015.
  134. Ketrat, S., Japrun, D., Pongprayoon, P., Exploring How Structural and Dynamic Properties of Bovine and Canine Serum Albumins Differ from Human Serum Albumin, *J. Mol. Graph. Model.*, doi:10.1016/J.JMGM.2020.107601, 98, 107601, 2020.
  135. Solanki, R., Patel, K., Patel, S., Bovine Serum Albumin Nanoparticles for the Efficient Delivery of Berberine: Preparation, Characterization and *In Vitro* Biological Studies, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, doi:10.1016/J.COLSURFA.2020.125501, 608, 125501, 2021.
  136. Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., Amarowicz, R., Recent Developments in the Detection of Bovine Serum Albumin, *Int. J. Biol. Macromol.*, doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.096, 138, 602–617, 2019.
  137. Nehru, S., Anitha Priya, J.A., Hariharan, S., Vijay Solomon, R., Veeralakshmi, S., Impacts of Hydrophobicity and Ionicity of Phendione-Based Cobalt(II)/(III) Complexes on Binding with Bovine Serum Albumin, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, doi:10.1080/07391102.2019.1624195, 38, 2057–2067, 2020.
  138. Bercea, M., Plugariu, I.A, Associative Interactions between Pullulan and Negatively Charged Bovine Serum Albumin in Physiological Saline Solutions. *Carbohydr. Polym.*, doi:10.1016/J.CARBPOL.2020.116630, 246, 116630,

2020.

139. Spada, A., Emami, J., Tuszynski, J.A., Lavasanifar, A., The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery, *Mol. Pharm.*, doi:10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.1C00046/ASSET/IMAGES/LARGE/MPI00046\_0006.JPEG, 18, 1862–1894, 2021.
140. Wang, B.L., Kou, S.B., Lin, Z.Y., Shi, J.H., Investigation on the Binding Behavior between BSA and Lenvatinib with the Help of Various Spectroscopic and in Silico Methods, *J. Mol. Struct.*, doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2019.127521, 1204, 127521, 2020.
141. Töpala, T., Pascual-Álvarez, A., Moldes-Tolosa, M.Á., Bodoki, A., Castiñeiras, A., Torres, J., del Pozo, C., Borrás, J., Alzuet-Piña, G., New Sulfonamide Complexes with Essential Metal Ions [Cu (II), Co (II), Ni (II) and Zn (II)], Effect of the Geometry and the Metal Ion on DNA Binding and Nuclease Activity BSA Protein Interaction, *J. Inorg. Biochem.*, doi:10.1016/J.JINORGBIO.2019.110823, 202, 110823, 2020.
142. Zang, Z., Chou, S., Si, X., Cui, H., Tan, H., Ding, Y., Liu, Z., Wang, H., Lang, Y., Tang, S., Effect of Bovine Serum Albumin on the Stability and Antioxidant Activity of Blueberry Anthocyanins during Processing and in Vitro Simulated Digestion, *Food Chem.*, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.131496, 373, 131496, 2022.
143. Mishra, V., Heath, R.J., Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture, *Int. J. Mol. Sci.*, doi:10.3390/IJMS22168411, 22, 8411 2021.
144. Xu, X., Hu, J., Xue, H., Hu, Y., Liu, Y., nan; Lin, G., Liu, L., Xu, R., Applications of Human and Bovine Serum Albumins in Biomedical Engineering: A Review, *Int. J. Biol. Macromol.*, doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2023.126914, 253, 126914, 2023.
145. Topală, T., Bodoki, A., Oprean, L., Oprean, R., Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes, *Clujul Med.* doi:10.15386/CJMED-357, 87, 215, 2014.
146. Yan, G., He, Y., Li, G., Xiong, Y., Song, P. Wang, R.M., Bovine Serum Albumin Metal Complexes for Mimic of SOD, *J. Chem. Sci.*, doi:10.1007/S12039-016-1184-Z/SCHEMES/2.1, 28, 1783–1788, 2016.
147. da Silva, N.I.O., Salvador, E.A., Rodrigues Franco, I., de Souza, G.A.P., de

- Souza Morais, S.M., Prado Rocha, R., Dias Novaes, R., Paiva Corsetti, P., Malaquias, L.C.C., Leomil Coelho, L.F., Bovine Serum Albumin Nanoparticles Induce Histopathological Changes and Inflammatory Cell Recruitment in the Skin of Treated Mice, *Biomed. Pharmacother.*, doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.08.106, 107, 1311–1317, 2018.
148. Zhang, K., Song, C., Li, Q., Li, Y., Sun, Y., Yang, K., Jin, B., The Establishment of a Highly Sensitive ELISA for Detecting Bovine Serum Albumin (BSA) Based on a Specific Pair of Monoclonal Antibodies (MAb) and Its Application in Vaccine Quality Control, *Hum. Vaccin.*, doi:10.4161/HV.6.8.11935, 6, 652–658, 2010.
149. Xiao, Y., Isaacs, S.N., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Blocking with Bovine Serum Albumin (BSA)—Not All BSAs Are Alike, *J. Immunol. Methods*, doi:10.1016/J.JIM.2012.06.009, 384, 148–151, 2012.
150. Wang, Q.L., Li, J., Li, X. De; Tao, W.J.; Ding, L.S., Luo, P., Qing, L., Sen An Efficient Direct Competitive Nano-ELISA for Residual BSA Determination in Vaccines, *Anal. Bioanal. Chem.*, doi:10.1007/S00216-017-0403-X/FIGURES/4, 409, 4607–4614, 2017.
151. Buchwalow, I., Samoilova, V., Boecker, W., Tiemann, M., Non-Specific Binding of Antibodies in Immunohistochemistry: Fakes and Facts. *Nat. Preced*, doi:10.1038/npre.2011.5892.1, 1–1, 2011.
152. Nicholas, A.P., Whitaker, J.N., Preparation of a Monoclonal Antibody to Citrullinated Epitopes: Its Characterization and Some Applications to Immunohistochemistry in Human Brain, *Glia*, doi:10.1002/GLIA.10039, 37, 328–336, 2002.
153. Jahanshahi, M., Najafpour, G., Rahimnejad, M., Applying the Taguchi Method for Optimized Fabrication of Bovine Serum Albumin (BSA) Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles, *African J. Biotechnol*, 7, 362–367. 2008.
154. Futur Pharm Sci, Y.J., Yadav, P., Bihari Yadav, A., Preparation and Characterization of BSA as a Model Protein Loaded Chitosan Nanoparticles for the Development of Protein-/Peptide-Based Drug Delivery System, *Futur. J. Pharm. Sci.*, doi:10.1186/S43094-021-00345-W, 7, 1–9, 2021.
155. Olaleye, M., Bello-Michael, C., Comparative Antimicrobial Activities of Aloe Vera Gel and Leaf, *African J. Biotechnol.*, 4, 1413–1414. 2005.
156. Yang, K., Han, Q., Chen, B., Zheng, Y., Zhang, K., Li, Q., Wang, J.,

- Antimicrobial Hydrogels: Promising Materials for Medical Application, *Int. J. Nanomedicine*, doi:10.2147/IJN.S154748, 13, 2217–2263, 2018.
157. Veiga, A.S., Schneider, J.P., Antimicrobial Hydrogels for the Treatment of Infection, *Pept. Sci.*, doi:10.1002/BIP.22412, 100, 637–644, 2013.
  158. Kundu, R., Payal, P., Antimicrobial Hydrogels: Promising Soft Biomaterials. *ChemistrySelect*, doi:10.1002/SLCT.202003666, 5, 14800–14810, 2020.
  159. Hao, Z., Li, X., Zhang, R., Zhang, L., Stimuli-Responsive Hydrogels for Antibacterial Applications, *Adv. Healthc. Mater.*, doi:10.1002/ADHM.202400513, 2400513, 2024.
  160. Wang, X., Qiu, L., Wang, C., Gao, Z., Zhou, S., Cui, P., Jiang, P., Hu, H., Ni, X., Nanodot-Doped Peptide Hydrogels for Antibacterial Phototherapy and Wound Healing, *Biomater. Sci.*, doi:10.1039/D1BM01533H, 10, 654–664, 2022.
  161. Smagin, A., Sadovnikova, N., Smagina, M., Synthetic Gel Structures in Soils for Sustainable Potato Farming, *Sci. Reports*, doi:10.1038/s41598-019-55205-8, 9, 1–15, 2019.
  162. Rajasekaran, P., Santra, S., Hydrothermally Treated Chitosan Hydrogel Loaded with Copper and Zinc Particles as a Potential Micronutrient-Based Antimicrobial Feed Additive, *Front. Vet. Sci.*, doi:10.3389/FVETS.2015.00062/BIBTEX, 2, 167977, 2015.
  163. Kumar, A., Sharma, G., Naushad, M., Al-Muhtaseb, A.H., García-Peñas, A., Mola, G.T., Si, C., Stadler, F.J., Bio-Inspired and Biomaterials-Based Hybrid Photocatalysts for Environmental Detoxification: A Review. *Chem. Eng. J.*, doi:10.1016/J.CEJ.2019.122937, 382, 122937, 2020.
  164. Li, S., Dong, S., Xu, W., Tu, S., Yan, L., Zhao, C., Ding, J., Chen, X., Antibacterial Hydrogels, *Adv. Sci.*, doi:10.1002/ADVS.201700527, 5, 1700527, 2018.
  165. Liu, Y., Shamsi, S.A., Combined Use of Chiral Ionic Liquid Surfactants and Neutral Cyclodextrins: Evaluation of Ionic Liquid Head Groups for Enantioseparation of Neutral Compounds in Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/j.chroma.2014.07.047, 1360, 296–304, 2014.
  166. Wang, Y., Wang, Z., Lu, W., Hu, Y., Review on Chitosan-Based Antibacterial Hydrogels: Preparation, Mechanisms, and Applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2023.128080, 255, 128080, 2024.

167. Jia, B., Li, G., Cao, E., Luo, J., Zhao, X., Huang, H. Recent Progress of Antibacterial Hydrogels in Wound Dressings, *Mater. Today Bio*, doi:10.1016/J.MTBIO.2023.100582, 19, 100582, 2023.
168. Erol, K., Bolat, M., Tatar, D., Nigiz, C., Köse, D.A., Synthesis, Characterization and Antibacterial Application of Silver Nanoparticle Embedded Composite Cryogels, *J. Mol. Struct.*, doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2019.127060, 1200, 127060, 2020.
169. Yao, L., Gao, H., Lin, Z., Dai, Q., Zhu, S., Li, S., Liu, C., Feng, Q., Li, Q., Wang, G., A Shape Memory and Antibacterial Cryogel with Rapid Hemostasis for Noncompressible Hemorrhage and Wound Healing, *Chem. Eng. J.*, doi:10.1016/J.CEJ.2021.131005, 428, 131005, 2022.
170. Akin, B., Ozmen, M.M., Antimicrobial Cryogel Dressings towards Effective Wound Healing, *Prog. Biomater.*, doi:10.1007/S40204-022-00202-W, 11, 331–346, 2022.
171. Memmedova, T., Armutcu, C., Uzun, L., Denizli, A., Polyglycidyl Methacrylate Based Immunoaffinity Cryogels for Insulin Adsorption, *Mater. Sci. Eng. C*, doi:10.1016/J.MSEC.2015.03.048, 52, 178–185, 2015.
172. Loo, S.L., Krantz, W.B., Fane, A.G., Hu, X., Lim, T.T., Effect of Synthesis Routes on the Properties and Bactericidal Activity of Cryogels Incorporated with Silver Nanoparticles, *RSC Adv.*, doi:10.1039/C5RA08449K, 5, 44626–44635, 2015.
173. Gaafar, M.R., Mady, R.F., Diab, R.G., Shalaby, T.I., Chitosan and Silver Nanoparticles: Promising Anti-Toxoplasma Agents, *Exp. Parasitol*, doi:10.1016/J.EXPPARA.2014.05.005, 6630,01 jk 43, 30–38, 2014.
174. Yao, C., Cheng, F., Wang, C., Wang, Y., Guo, X., Gong, Z., Fan, M., Zhang, Z., Separation, Identification and Fast Determination of Organophosphate Pesticide Methidathion in Tea Leaves by Thin Layer Chromatography–Surface-Enhanced Raman Scattering, *Anal. Methods*, doi:10.1039/C3AY41152D, 5, 5560–5564, 2013.
175. Henderson, T.M.A., Ladewig, K., Haylock, D.N., McLean, K.M., O'Connor, A.J., Cryogels for Biomedical Applications, *J. Mater. Chem. B*, doi:10.1039/C3TB20280A, 1, 2682–2695, 2013.
176. Andaç, M., Galaev, I.Y., Denizli, A., Affinity Based and Molecularly Imprinted Cryogels: Applications in Biomacromolecule Purification. *J. Chromatogr. B*,



doi:10.1016/J.JCHROMB.2015.09.034, 1021, 69–80, 2016.

177. Coria-Hernández, J., Méndez-Albores, A., Meléndez-Pérez, R., Rosas-Mendoza, M.E., Arjona-Román, J.L., Thermal, Structural, and Rheological Characterization of Waxy Starch as a Cryogel for Its Application in Food Processing. *Polym.* doi:10.3390/POLYM10040359, 10, 359, **2018**.
178. Vlakh, E.G., Tennikova, T.B., Preparation of Methacrylate Monoliths, *J. Sep. Sci.*, doi:10.1002/JSSC.200700284, 30, 2801–2813, 2007.
179. Plieva, F.M., Seta, E. De, Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous Elastic Polyacrylamide Monolith Columns: Processing under Compression and Scale-Up, *Sep. Purif. Technol.*, doi:10.1016/J.SEPPUR.2008.03.026, 65, 110–116, 2009.
180. Çetin, K., Denizli, A., Microcryogels as Plastic Antibodies for Transferrin Purification, *Process Biochem.*, doi:10.1016/j.procbio.2018.12.020, 79, 174–184, 2019.