

# Bilirubin Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryalinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Bilirubin Uzaklaştırılmasında Kullanımı

Arzu KAYA KOÇDOĞAN\*, Sema ÇETİN\*\*

## Öz

**Amaç:** Bilirubin damgalı kitosan-agaroz biyomateryalinin; sentezi, karakterizasyonu ve bilirubin uzaklaştırılmasında kullanımının önemini tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

**Yöntem:** Kitosan ve agaroz doğal polimerleri materyal olarak seçilmiştir. Bilirubin damgalı kitosan-agaroz biyomateryalinin bilirubin uzaklaştırma kapasitesinin belirlenmesi için insan plazması kullanılmıştır.

**Bulgular:** Bilirubin uzaklaştırılması için pH 7.0, sıcaklık 37°C ve başlangıç bilirubin konsantrasyonu 40 mg/g optimum şartlar olarak belirlenmiştir. NaCl konsantrasyonunun arttırılması ile bilirubin için iyonik şiddetin azaldığı tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Etkileşim öncesi ve sonrasında alınan serum örneklerinde bilirubin analizi gerçekleştirildi ve moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryalleri ile %87'lik bir uzaklaştırma oranı elde edildi. Sulu çözeltilerden bilirubin adsorpsiyonu ile insan plazmasından bilirubin adsorpsiyonu kıyaslandığında, plazmada adsorpsiyon kapasitesinin çok az miktarda azaldığı gözlemlendi.

**Anahtar Sözcükler:** Moleküler damga, bilirubin, kitosan-agaroz, biyomateryaller.

---

## Özgün Araştırma Makalesi (Original Research Article)

**Geliş / Received:** 17.05.2018 & **Kabul / Accepted:** 24.05.2018

\* Öğr. Gör., İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Patoloji Laboratuvar Teknikleri Programı, İstanbul, Türkiye, E-posta: [arzukayakocdogan@gmail.com](mailto:arzukayakocdogan@gmail.com)

**ORCID ID** <https://orcid.org/0000-0002-3689-3061>

\*\* Prof. Dr., Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale, Türkiye, E-posta: [sematan2003@yahoo.com](mailto:sematan2003@yahoo.com) **ORCID ID** <https://orcid.org/0000-0001-8442-4019>

## **Bilirubin Imprinting Chitosan-Agarose Biomaterial Synthesis, Characterization and Use to Bilirubin Removal**

### **Abstract**

**Aim:** This study was conducted to synthesize and characterize bilirubin imprinted chitosan-agarose biomaterial and to determine its significance on bilirubin removal.

**Method:** Natural Chitosan and agarose polymers were chosen as materials. Human plasma was used to determine the capacity of bilirubin imprinted chitosan-agarose biomaterial for bilirubin removal.

**Findings:** The optimum conditions for bilirubin removal were determined as pH 7.0 at 37°C with a starting concentration of 40 mg/g. An increase in NaCl concentration was shown to decrease the ionic strength for bilirubin.

**Conclusion:** Bilirubin analysis was performed on serum samples taken before and after the interaction. A suspension rate of 87% was obtained by using molecular imprinted chitosan-agarose biomaterials. When bilirubin adsorption from aqueous solutions was compared to the adsorption of bilirubin from human plasma it was observed that the adsorption capacity of plasma was slightly decreased.

**Keywords:** Molecular imprinting, bilirubin, agarose-chitosan, biomaterials.

### **Giriş**

Moleküler damgalama işlemi; çözültide uygun fonksiyonel monomerlerin hedef molekül etrafında toplanması (hedef molekül-fonksiyonel monomer kompleksinin oluşumu), üç boyutlu polimerik materyal içerisinde polimerizasyonun gerçekleştirilmesi ve oluşan polimerden hedef molekülün uzaklaştırılmasıyla polimerik materyalde hedef molekülün kalıbının oluşması gibi basamakları içermektedir<sup>1,2</sup>. Son yıllarda biyolojik sıvılardan toksik maddelerin arıtımında da moleküler damgalanmış materyaller kullanılmaktadır<sup>3,4</sup>. Hedef molekülün bir karışımdan bilinen ayırma işlemlerine göre daha kısa sürede ve düşük maliyetle, üstelik yüksek basınç ve sıcaklığa gerek duymadan güvenilir bir şekilde ayrılabilmesi, moleküler damgalanmış materyallerin bilinen en önemli avantajları arasında sayılabilir<sup>5,6</sup>.

Serumda bilirubin analizi sırasında delta bilirubin (Albumine kovalent bağlı konjuge bilirubin) ölçülemez. Konjuge bilirubin direkt bilirubin (D-Bil) olarak ölçülürken, albumine bağlı ve serbest olan konjuge olmamış bilirubinün tamamı indirekt bilirubin

(T-Bil) olarak ölçülür. Bu çalışmada hiperbilirubinemi tedavisine yeni bir yaklaşım olarak moleküler damgalı biyomateryallerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hidrojel yapıdaki kitosan, biyotıp uygulamalarında kullanılması düşünülen materyallerde olması istenilen özelliklerin hemen hemen tamamını bünyesinde bulunduran doğal bir polimerdir. Agaroz ise nötral özellikte bir polisakkarittir ve jel oluşturma özelliği ile farmakoloji ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki polimerin olumlu özellikleri bir araya getirilerek oluşturulan materyale yüksek seçicilik özelliği kazandırmak amacı ile bilirubinün moleküler damgalanması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada geliştirilen bu materyaller biyoyuymuluk derecesi, Scanning Electron Microscope (SEM) ve denge su içeriği çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Biyomateryallerin biyomedikal alanda uzun süreli kullanımında, kan ile biyomateryalin teması sonucu önce biyomateryal yüzeyinde pek çok biyolojik reaksiyon oluşmaktadır. Bu nedenle agaroz-kitosan biyomateryallerinin kan uyumluluk özellikleri, plazma proteinleri ve platelet adezyonu, hemoliz gibi testlerle belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının tamamlanması sonrasında biyomateryalin bilirubin uzaklaştırma kapasitesi sulu çözeltilerde değerlendirilmiş ve pH, sıcaklık, zaman, iyonik şiddet gibi çeşitli sistem parametrelerinin etkisi de test edilmiş ve bu yolla bilirubin uzaklaştırma prosesi için optimum koşullar belirlenmiştir. Çalışmamızın son aşamasında elde edilen optimum koşullar ile insan plazması modifiye edilmiş ve bilirubin damgalı kitosan-agaroz materyalleri ile plazmadan bilirubin giderimi sağlanmıştır.

## **Gereç ve Yöntem**

### **Kitosan-Agaroz Biyomateryalinin Hazırlanması**

%1 oranında agaroz ve %1 oranında kitosan (%2 (v/v) asetik asit içerisinde) ısıtılarak çözüldü ve karıştırılarak cam bir kalıp içerisine aktarıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra perforator ile materyal, diskler halinde kesildi. Reaksiyona girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması amacı ile tüm biyomateryaller etanol:su karışımı (70/30, v/v) ile yıkandı ve +4 °C'de saklandı.

### **Moleküler Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryalinin Sentezlenmesi**

%1 oranında agaroz ve %1 oranında kitosan (%2 (v/v) asetik asit içerisinde) ısıtılarak çözüldü ve karışım 25°C'ye kadar soğutuldu ve hedef molekül olan bilirubin 20mg/L oranında karışıma ilave edildi. Polimerizasyonun tamamlanması için karışım cam bir

kalıba aktarıldı ve materyal perforatör yardımıyla diskler halinde kesildi. Kitosan-agaroz materyalinden bilirubin uzaklaştırılması için materyaller 1N NaOH ile 24 saat boyunca yıkandı. Uzaklaştırma işlemleri sonrasında polimerik materyaller, etanol: su serilerinde yıkandı ve +4 °C'de saklandı.

### **Denge Su İçeriği**

Kitosan-agaroz biyomateryalinin su içeriği gravimetrik yöntem kullanılarak belirlendi ve su alma kapasiteleri 1 no'lu eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$Denge\ Su\ İçeriği\ \% = [(Ws - Wd) / Wd] \times 100.....(1)$$

Wd, biyomateryalin kuru ağırlığını; Ws, biyomateryalin şişmiş ağırlığını ifade etmektedir.

### **Yüzey Analizleri**

Biyomateryallerin moleküler damgalama öncesinde ve sonrasında yüzey analizlerini belirlemek için SEM mikrografları alındı. Azaltılmış basınç altında, altın ile kaplanan biyomateryallerin SEM mikrografları Kırıkkale Üniversitesi bünyesinde bulunan JEOL (JSM 5600) Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak elde edildi.

### **Kan Uyumluluk Testleri**

Bilirubin damgalı kitosan-agaroz (BD-KA) hidrojellerinin protein adsorpsiyonuna direnç gösterme özelliğini belirlemek için, insan serum proteinlerinin (HSA,  $\gamma$ -globulin, fibrinojen) adsorpsiyonu çalışıldı. Bu amaçla biyomateryaller ile insan serumu 5 saat etkileştirildi.

### **Hemoliz Testi**

Hemolitik aktivite, hemoglobin salımı ile belirlendi. Bu amaçla 4.0 ml insan kanı 5.0 ml fizyolojik çözelti ile seyreltildi. Biyomateryaller insan kanı ile 37°C'de 12 saat etkileştirildi. İnkübasyon sonrasında insan kanı 750 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatanda hemoglobin analizi yapıldı.

### **İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması**

Biyomateryaller (0.5g) Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden temin edilen hiperbilirubinemik plazma ile 37°C'de 4 saat boyunca etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında plazma içerisindeki bilirubin seviyesi otoanalizör (Konelab60i) ile belirlendi.

## İstatistiksel Analiz Yöntemi

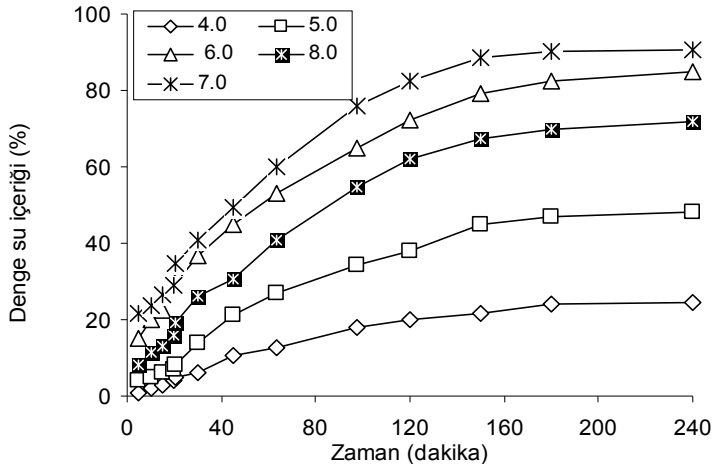
Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak bildirildi. Bilirubin uzaklaştırılmasında pH etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı. Absorbans t:9.548, df: 4,  $p > .001$ ; Derişim t:9.550, df:4,  $p > .001$ , bilirubin derişiminin etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı, t:2.547, df:6,  $p > 0.044$ . Başlangıç derişim etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı, t:11.245, df:4,  $p > .000$ . İyonik şiddet etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı, t:8.351, df:4,  $p > 0.001$ .

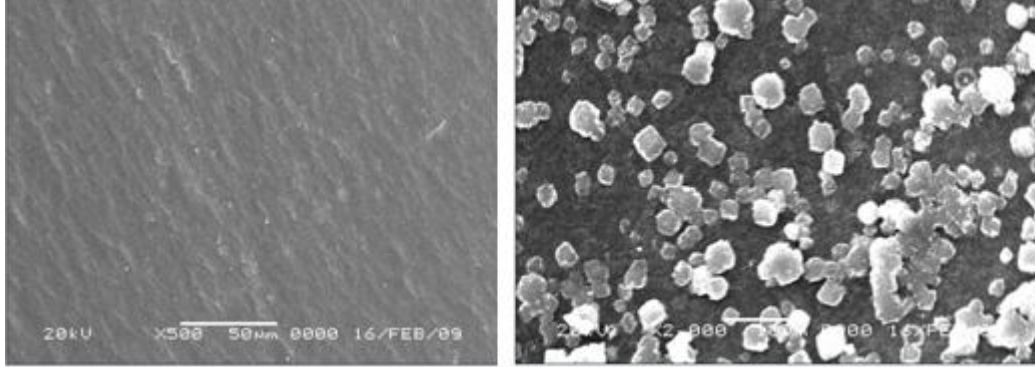
## Bulgular

Kitosan-agaroz biyomateryalleri ile bilirubin adsorpsiyonu öncesi biyomateryallerin denge su içeriği, SEM mikrografları ve kan uyumluluk parametreleri ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Kitosan ve agaroz kullanılarak sentezlenen kitosan-agaroz materyalleri hidrofilik yapıdadır ve sulu çözeltilerde yüksek derecede şişme özelliği gösteren hidrojellerdir. Kitosan-agaroz hidrojellerinin denge su içeriği gravimetrik yöntemle farklı pH ortamlarında belirlendi (Şekil 1). Ortam pH'sı nötrleştikçe su alma kapasitesinin de arttığı tespit edildi. Kitosan-agaroz hidrojellerinin su alma kapasitesi pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de sırası ile % 24.3, % 48, % 84.9, % 90 ve % 72 olarak bulundu. Kitosan-agaroz (KA) biyomateryalleri ile bilirubin damgalı kitosan-agaroz (BD-KA) biyomateryallerinin SEM mikrografları Şekil 2.'de verilmiştir.

**Şekil 1:** Farklı pH'larda (4.0-8.0) kitosan-agaroz biyomateryallerinin denge su içeriği



**Şekil 2:** KA ve BD-KA biyomateryallerinin SEM mikrografları

Biyomateryal ile 5 saat etkileştirilen insan serumunda albumin, globulin ve fibrinojen adsorpsiyon değerleri Tablo 1’de verildi. Tablodan da görüldüğü gibi biyomateryel ile serum proteinleri adsorpsiyonu oldukça düşüktür. Lökosit ve eritrosit adezyonunun ise sırası ile 0.10 K/uL ve 0.14 M/uL seviyelerinde olduğu belirlendi. Biyomateryal yüzeyine kan hücreleri adezyonunun oldukça düşük seviyelerde kaldığı ve ihmal edilebilir derecede olduğu belirlendi.

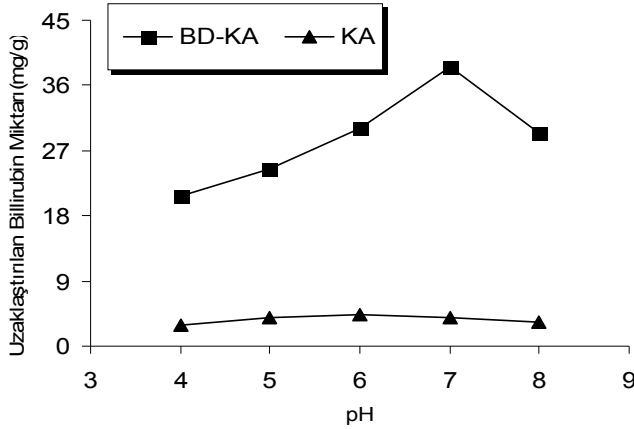
**Tablo 1:** BD-KA biyomateryalinin kan uyumluluk parametreleri

	Referans	Başlangıç	Final
Platelet	150-400	296	326
Lökosit (K/uL)	4.0-11.0	5.3	5.2
Eritrosit M/uL	3.8-5.8	4.99	4.85
Hemoglobin g/dL	11.4-16.5	9.4	9.2
Total Protein g/dL	6.4-8.3	6.8	6.6
Albumin g/dL	3.5-5.5	4.2	4.3
Fibrinojen g/dL	3.02 ± 0.05	3.13	3.09

pH, adsorpsiyon ya da giderim çalışmalarında adsorpsiyon kapasitesini etkileyen önemli bir parametredir. Bilirubin molekülünün çözünürlüğünde ve konformasyonunda da pH’ın rolü büyüktür. Çalışmalarımız boyunca bilirubin molekülünün özellikle nötr ve bazik ortamlarda kolaylıkla çözündüğü belirlendi. KA ve BD-KA biyomateryalleri üzerine bilirubin adsorpsiyon çalışmaları pH 4.0-8.0 aralığında incelendi ve pH 7.0 noktasında maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşıldı (Şekil 3). Doğal biyomateryal ile 6.7 mg/g, moleküler damgalanmış biyomateryal ile

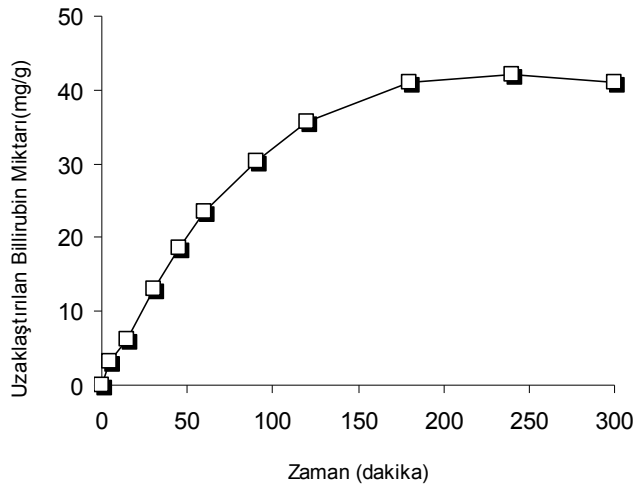
38.55 mg/g bilirubin giderimine ulaşıldı ve moleküler damgalamanın, performansı 5.7 kat arttırdığı belirlendi.

**şekil 3:** Bilirubin adsorpsiyonu üzerine pH'ın etkisi



Adsorpsiyon kapasitesini etkileyen diğer bir parametre ise adsorpsiyon zamanıdır. Moleküler damgalanmış KA biyomateriyalleri üzerine bilirubin adsorpsiyonu 300 dakika izlendi ve adsorpsiyonun 180 dakika içerisinde dengeye ulaştığı belirlendi. (şekil 4).

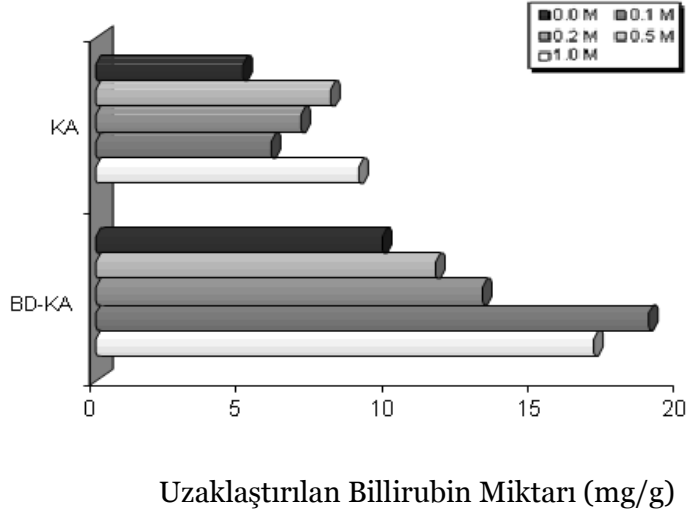
**şekil 4:** Bilirubin adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisi



İyonik şiddet etkisi de pek çok adsorpsiyon ve uzaklaştırma çalışmalarında performansı etkileyen önemli bir parametredir. Çalışmamızda iyonik şiddet etkisi 0.0-1.0 M NaCl

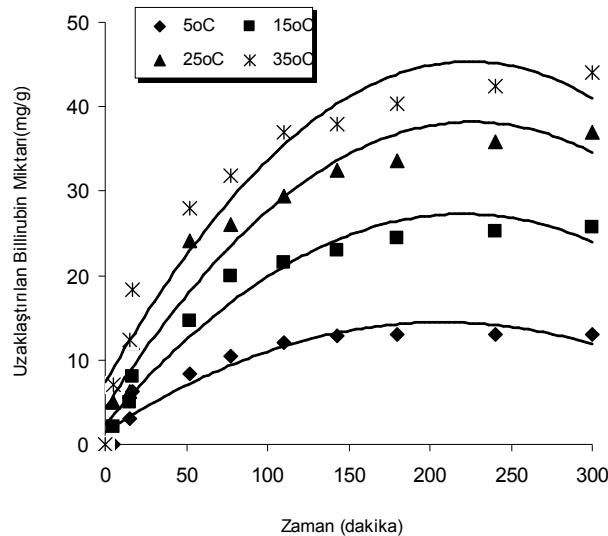
varlığı ile test edildi ve her iki materyal için iyonik şiddetin artması ile bilirubin uzaklaştırma oranının azaldığı belirlendi (Şekil 5).

**Şekil 5:** Bilirubin adsorpsiyonu İyonik şiddetin üzerine etkisi



Sıcaklık, moleküllerin hızını ve hareketliliğini arttıran önemli bir faktördür. Sıcaklığın, moleküler damgalı KA biyomateryallerinin bilirubin uzaklaştırma performansı üzerine etkisi 5-50 °C aralığında incelendi. Ortam sıcaklığının 5°C'den 35°C'ye artırılması ile adsorpsiyon kapasitesinin 3.79 kat artışı belirlendi ve en yüksek uzaklaştırma verimi 35°C'de elde edildi (Şekil 6).

**Şekil 6:** Bilirubin adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi





Moleküler damgalı KA biyomateryalleri ile sulu çözeltilerden bilirubin uzaklaştırma çalışmalarında elde edilen optimum koşullar ile insan serumundan bilirubin uzaklaştırılması çalışıldı. Bu amaçla en yüksek giderimin sağlandığı 0.5 g biyomateryal dozu ile pH 7.0'da insan serumu ve biyomateryaller etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında alınan serum örneklerinde bilirubin analizi gerçekleştirildi ve moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryalleri ile % 87'lik bir uzaklaştırma oranı elde edildi. Sulu bilirubin çözeltilerinde elde edilen uzaklaştırma kapasitesi % 96 olarak bulundu ve aynı koşullar plazma üzerine uygulandığında adsorpsiyon kapasitesinin sulu çözelti uygulamalarına kıyasla 1.1 kat azaldığı belirlendi.

**Tablo 2:** Moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryali ile insan plazmasından bilirubin uzaklaştırılması

	Referans	Başlangıç	Final
T BİL	0.2-1.3 mg/dL	15.0 mg/dL	1.6 mg/dL
D BİL	0-0.4 mg/dL	1.8 mg/dL	0.9 mg/dL

## Tartışma ve Sonuç

Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda hem bilimsel, hem de teknolojik açıdan önemi gittikçe artan hidrojellerin biyomalzeme olarak kullanımı pek çok çalışmada rapor edilmektedir. Hidrojeller, çözünmeyen ancak şişebilen yapıda olup tıbbi uygulamalar açısından sahip oldukları üstün özellikler bakımından son 30 yıldır dikkat çeken biyomalzemelerdir. Hidrojeller, yapılarında çok fazla miktarda su içermeleri, yumuşak ve esnek yapıda olmaları gibi taşıdıkları birçok fiziksel özellik açısından canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük benzerlik göstermektedirler<sup>7,8</sup>.

Baydemir ve ark. (2009) yaptıkları moleküler damgalı partiküllerle yaptıkları çalışmada insan plazmasından bilirubin uzaklaştırmaya çalışmışlardır ve absorpsiyon ve deabsorpsiyonu önemsiz bir miktarda azaltarak başarmışlardır<sup>9</sup>.

Denizli ve ark. (1998) yılında yaptıkları Congo Red damgalı mikro partiküllerle hiperbilirubin olan insan serum plazmasından bilirubin miktarını azaltmayı amaçlardır ve bilirubin absorpsiyonunun artan sıcaklıkla arttığını bildirmişlerdir<sup>10</sup>. Demirci ve ark. (2015) yaptıkları moleküler damgalama yöntemiyle asetil kolin esteraz enziminin immobilizasyonu incelemiş ve asetilkolin esteraz enzimini moleküler damgalama yöntemiyle polimere başarıyla immobilize etmişlerdir<sup>11</sup>.

Derazshamshir ve ark. (2010) yaptıkları moleküler baskılanmış karyojele kanın farklı plazma proteinleri damgalayarak uzaklaştırmaya çalışmışlar ve bu durumda kanda yer alan düşük derişimli proteinlerin proteom analizlerini yapmasını mümkün kılmışlardır<sup>12</sup>.

Yavuz ve ark. (2005) yaptıkları moleküler damgalama yöntemiyle insan plazmasından demir iyonunu damgalanmış moleküle aktarmış ve bu polimerin absorpsiyon kapasitesini azaltmadığını açıklamışlardır<sup>13</sup>.

Biyomateryal ile kan etkileşiminde beklenmedik problemler ortaya çıkabilir. Kanda bulunan diğer bileşenler biyomateryal yüzeyine yapışarak matris-hedef molekül etkileşimini azaltabilir ve adsorpsiyon kapasitesini önemli ölçüde düşürebilir. Bu nedenle kanda bulunan bir molekül çalışılacağı zaman, biyomateryalin kan uyumluluğu mutlaka araştırılmalıdır. Çalışmamızda da biyomateryallerin kan uyumluluğu ve kandan bilirubin uzaklaştırma kapasiteleri araştırılmış, bilirubin damgalanması ile birlikte materyal performansının da önemli derecede arttığı ve materyallerin yüksek biyoyuymulukta olduğu belirlenmiştir.

Bilirubin damgalama çalışmalarında çok çeşitli materyal kullanılmasına rağmen çalışmamızda tamamen doğal malzemeler kullanılmıştır. Doğal polimerler biyomalzeme alanının vazgeçilmez öğeleridir ve biyolojik ortamdaki makromoleküllerle benzer yapıda olduklarından canlı dokularla temas ettiklerinde toksik etki, iltihaplanma gibi istenmeyen reaksiyonlar oluşmamaktadır. Ayrıca biyomateryal yüzeyinin protein adsorpsiyonu ve hücre adezyonuna dirençli olması, kan uyumlu implantların geliştirilmesinde önemli bir parametredir<sup>3,5</sup>. Bununla birlikte doğal polimerler, yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve güçlkle şekillendirilmeleri gibi çeşitli dezavantajlara da sahiptir. Ancak bu çalışmada kullanılan kitosan ve agarozun yüksek sıcaklıklara da dayanıklı oldukları belirlenmiştir.

Çalışmamızda geliştirilen biyomalzemelerin ihmal edilebilir derecede hemolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Moleküler damgalama işlemi biyomateryal yüzeyinde kalıp oluşturarak hedef molekül için spesifikliğini arttırmaktadır. Doğal biyomateryal ile 6.7 mg/g, moleküler damgalanmış biyomateryal ile 38.55 mg/g bilirubin giderimine ulaşılmış ve moleküler damgalamanın performansı 5.7 kat arttırdığı belirlenmiştir.

Biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarda kullanılan biyomateryallerin, biyolojik çevreyle iyi uyuşması, doku ile temas ettiğinde enfeksiyona yol açmaması, kanserojenik etki göstermemesi gibi başlıca temel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Ayrıca biyomateryal yüzeyinin protein adsorpsiyonu ve hücre adhezyonuna dirençli olması, kan uyumlu implantların geliştirilmesinde önemli bir parametredir<sup>3,5</sup>.

Biyomateryallerin kan ile etkileşiminde hemolize sebep olmaları, istenmeyen bir durumdur. Biyomalzemelerin kan hücreleri ile etkileşimi yapısal özellik, konsantrasyon ve saturasyon gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Biyomalzemeler, hücre zarında hasara yol açarak litik etki gösterebilmektedir. Lipid yapıdaki nanopartiküler malzemeler membran yapısına katılarak membran büyüklüğünü arttırmakta ve baloncuk oluşumuna neden olabilmektedir. Hücre zarında oluşabilecek böyle bir değişiklik hücre zarı, iskeleti ve stoplazma arasındaki etkileşimde aksamalara neden olmaktadır<sup>15</sup>. Çalışmamızda KA biyomateryalinin hemoliz özelliğine sahip olup olmadığı da araştırıldı ve kan ile etkileşim sonrasında çok düşük miktarda (0.2g/dL) hemoglobinin seruma geçtiği tespit edildi. Bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda geliştirilen biyomalzemelerin düşük ve ihmal edilebilir derecede hemolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Deng J, Nian Y, Syu M. Investigation of binding specificity of PMAA toward  $\alpha$ -bilirubin. In: The 1st imprinted International Meeting on Microsensors and Microsystems; January, 12-14, 2003; National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan.

2. Syu MJ, Deng JH, Nian YM, Chiu TC, Wu AH. Chiu binding specificity of alpha-bilirubin-imprinted poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethylacrylate) toward alpha-bilirubin. *Biomaterials*. 2005;26(22):4684-4692.
3. Kwok AY, Qiao GG, Solomon DH. Synthetic hydrogels 3. Solvent effects on poly (2-hydroxyethyl methacrylate) networks. *Polymer*. 2004;45(12):4017-4027.
4. Ma Q, Wooley KL. The preparation of *t*-butyl acrylate, methyl acrylate, and styrene block copolymers by atom transfer radical polymerization: Precursors to amphiphilic and hydrophilic block copolymers and conversion to complex nanostructured materials. *Polymer Chemistry*. 2000;38(S1):4805-4820. doi: 10.1002/1099-0518(200012)38:1+<4805::AID-POLA180>3.0.CO;2-O.
5. Asayama S, Kawakami H, Nagaoka S. Design of a poly (L-histidine)-carbohydrate conjugate for a new pH-sensitive drug carrier. *Polymers for Advanced Technologies*. 2004;15(8):439-444. doi: 10.1002/pat.493.
6. Yang Z, Si S, Fung Y. Bilirubin adsorption on nanocrystalline titania films. *Thin Solid Films*. 2007;515(7-8):3344-3351. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2006.09.018>.
7. Yurdakök M. Hiperbilirubinemi ışık ve ilaç tedavisi. *Katkı Pediatri Dergisi*. 1995;(5):725-733.
8. Trotta F, Baggiani C, Luda MP, Drioli E, Massari T. A molecular imprinted membrane for molecular discrimination of tetracycline hydrochloride. *Journal of Membrane Science*. 2005;254(1-2):13-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.11.013>.
9. Baydemir G, Bereli N, Andaç M, Say R, Galaev IY, Denizli A. Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;68(1):33-38.
10. Denizli A, Kocakulak M, Pişkin E. Specific sorbents for bilirubin removal from human plasma: Congo red-modified poly (EGDMA/HEMA) microbeads. *Applied Polymer Science*. 1998;68(3):373-380.
11. Demirci G, Doğaç Yİ, Teke M. A selective molecularly imprinted polymer for immobilization of acetylcholinesterase (AChE): An active enzyme targeted and efficient method. *J Mol Recognit*. 2015;28(11):645-650. doi: 10.1002/jmr.2475.

12. Derazshamshir A, Baydemir G, Yilmaz F, Bereli N, Denizli A. Preparation of cryogel columns for depletion of hemoglobin from human blood. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2016;44(3):792-799. doi: 10.3109/21691401.2015.1129623.
13. Yavuz H, Say R, Denizli A. Iron removal from human plasma based on molecular recognition using imprinted beads. *Materials Science and Engineering: C*. 2005;25(4):521-528. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.04.005>.
14. McClure CD, Schiller NL. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 1992;51(2):97-102.