



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

***Bradyporus* sp. (Orthoptera, Insecta) KİTİN VE KİTOSAN FİLM
ÜRETİMİ VE İNSAN HÜCRE HATTI (HEK293) ÜZERİNE
SİTOTOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Rajaa Umran Mosa ALRUBAYE

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2023

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182362801 numaralı Doktora öğrencisi Rajaa Umran Mosa ALRUBAYE tarafından hazırlanan “*Bradyporus sp. (Orthoptera, Insecta) KİTİN VE KİTOSAN FİLM ÜRETİMİ VE İNSAN HÜCRE HATTI (HEK293) ÜZERİNE SİTOTOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

İstanbul Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Osman SEYYAR

Biyoloji Bölümü/Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Serkan GÜL

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Doç. Dr. Musa KAR

Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 28/12/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduđum bu çalıřmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yol ve yardıma bařvurmaksızın yazdıđımı, yararlandıđım eserlerin kaynakçada gűsterilenlerden olduđunu, çalıřmamda kullandıđım verilerin orijinalliđini ve her tűrlű intihalden uzak olduđunu beyan ederim.

Enstitű tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tűm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Rajaa Umran Mosa ALRUBAYE



TEŞEKKÜR

Biyoteknoloji alanına ilgi duymamı, sevmemi sağladığı, vizyonumu genişlettiği, bilgi birikimini esirgemediği, akademik tecrübelerinden ve fikirlerinden faydalandığım, doktora öğrenimimin en başından sonuna kadar bana göstermiş olduğu anlayış, manevi destek ve yardımları için, Doktora Tezimin yürütülmesine danışmanlık eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KAYA' ya çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen, yaptığım her işte arkamda duran babam Umran Mosa ve annem Ameera ile ablalarım Alaa, Amal, İsraa, Afrah ve Enaam'a sonsuz teşekkür ederim, hayatım boyunca minnettar kalacağım.

Enişterime manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Doktora tezim boyunca, bilgilerini, tecrübelerini, fikirlerinin ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK ve Prof. Dr. Osman SEYYAR'e en içten teşekkürlerimi ederim. Değerli hocam Dr. Ali AZ-ZAWRII'a, MTT uygulaması süresi sonuna kadar beni hiçbir aşamada yalnız bırakmayan ve MTT uygulama aşamasında bana destek olan Selçuk Üniversitesi'ndeki hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Kerbela Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bana destek ve güç veren arkadaşım ve ablam Doç. Dr. May Mohammed Ali' i asla unutmayacağım, bu yüzden ona özellikle teşekkür etmek isterim.

Tezimle meşgul olmamdan dolayı onlarla çalışmamda ihmalimi tolere eden Prof. Dr. Sawsan Al-Hasnawi'ye ve Kerbela Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm meslektaşlarıma teşekkür ederim.

Bana her zaman yardım ve destek sağlayan arkadaşlarım Ivan ALJAF ve Betül AKTAŞ'a özellikle teşekkür etmek isterim. Onların dostluğu benim için bir hazinedir.

Tezimin dil kontrolü yapmama destek olan arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe DURAN'ı unutmayacağım. Değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Bahar AKYÜZ YILMAZ, Arş. Gör. Behlül KOÇ BİLİCAN ve Ako DEKONİ'e doktora sürecim boyunca yaptıkları tüm yardımlar ve verdikleri bilgiler için çok teşekkür ederim. Sonunda tezin farklı aşamalarında görev alan diğer araştırmacılara da teşekkür etmek istiyorum

Rajaa Umran Mosa ALRUBAYE

AKSARAY, 2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Çalışmanın Amaçları	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Kitin ve Kitosan Kaynakları	3
2.1.1 Kitin	3
2.1.2 Kitosan	4
2.1.3 Kitin ve kitosan kaynakları	5
2.2 Biyofilm	7
2.3 Kitin ve Kitosan Film Yapımı ve Uygulamaları	7
2.3.1 Kitin ve kitosan biyomedikal uygulamaları	8
2.3.1.1 Doku mühendisliği	8
2.3.1.2 Yara iyileştirme	9
2.3.1.3 Kanser teşhisi	9
2.3.1.4 Antibakteriyel özellikler	10
2.3.1.5 Yaşlanma karşıtı-kozmetik	10
2.3.1.6 Aşı adjuvan	10
2.4 <i>Bradyporus</i> sp. (Orthoptera, Insecta)	11
2.4.1 <i>Bradyporus</i> sp. 'nin bilimsel sınıflandırılması	11
2.5 Böceklerden Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu	13
2.6 Kitosan Film Üretim Teknikleri	14
2.6.1 Kızılötesi analiz (FTIR)	15
2.6.2 Termogravimetrik analiz (TGA/DTG)	16
2.6.3 XRD teknikleri	16
2.6.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) teknikleri	16
2.7 Kitosan Filmlerin Biyomedikal Uygulamaları	17
2.8 İnsan Hücre Hattı (HEK293) ve İnsan Hücre Hatlarında Kitosanın Sitotoksikite Testi	18
2.8.1 İnsan hücre hattı (HEK293)	18
2.8.2 HEK293 hücre morfolojisi	19
2.8.3 Kitosanın sitotoksik özellikleri	19
2.9 Kitosanın İnsan Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkileri	21
2.9.1 Kitosanın HEK insan hücreleri üzerindeki toksik etkileri	22
2.9.2 Kitosan antimikrobiyal verimliliği	23
2.9.3 Kanser hücrelerine karşı kitosan nano polimerleri	24
2.9.4 Kitosan bazlı nanopartiküllere dayalı uyaranlara duyarlı malzemeler	25
2.10 Değiştirilmemiş (Modifiye Edilmemiş) Kitosanın Gıdayla İlgili Uygulamaları	27
2.10.1 Kitosan içeren doğal ekstraktlar	28
3. MALZEME VE YÖNTEM	30
3.1 Kitin ve Kitosan İzolasyonu	30
3.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopu (FT-IR)	31

3.3 Termogravimetrik Analiz (TGA)	31
3.4 X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)	32
3.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	32
3.6 Elementel Analiz (CHNS Analizi)	32
3.7 Hücre Kültürü	32
3.8 MTT Sitotoksisite Testi	33
3.9 İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1 Kitin ve Kitosan İzolasyonu	34
4.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskobu (FT-IR)	35
4.3 Termogravimetrik Analiz (TGA)	37
4.4 X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)	37
4.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	38
4.6 Elementel Analiz (CHNS Analizi)	39
4.7 Hücre Kültürü	40
4.8 MTT Sitotoksisite Testi	41
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	56

DOKTORA TEZİ

***Bradyporus* sp. (Orthoptera, Insecta) KİTİN VE KİTOSAN FİLM ÜRETİMİ VE İNSAN HÜCRE HATTI (HEK293) ÜZERİNE SİTOTOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Rajaa Umran Mosa ALRUBAYE

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA

ÖZET

Kitin, N-asetil-D-glukozamin bileşenlerinden (poli (β -(1->4)-N-asetil-D-glukozamin)) oluşan bir polisakkarittir, dünyada en çok bulunan ikinci biyopolimerdir. Bu önemli biyopolimerin doğada esas olarak omurgasızlar, eklembacaklılar, böcekler, algler, mantarlar ve ökaryotik mayalarda bulunduğu bildirilmektedir. Doğada en yaygın kitin kaynakları kabuklu deniz ürünleri ve suda yaşayan omurgasızlar olarak belirtilmektedir. Kitinin deasetillenmiş türevleri kitosandır. Bu çalışmada, kitin ve kitosan *Bradyporus* sp.'den izole edildi. (Orthoptera, Insecta). Elde edilen kitosan 3 boyutlu film yapısı FTIR, TGA, XRD, SEM, elementel analizlerle bozulmadan karakterize edildi. Kitosanın sitotoksik etkilerini belirlemek için MTT testi yapıldı. Optimum ve aşırı doz aralıklarında uygulanan kitosan, HEK293 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulandı. Kitosan FTIR spektrumları 4000 ile 400 cm^{-1} frekans aralığında karakteristik bantlar göstermiştir. TGA/DTG analizinden kitosanın DTGmax değeri 297,5 °C olarak belirlendi. XRD analizinde iki maksimum pik elde edildi ($2\theta=10.9$, $2\theta=19.6$). SEM analizi sonrasında yüksek büyütme gücünde gözenekli ve mikrofibriler yapı gözlemlendi. Element analizinde kükürt tespit edilmezken ~%41,10 karbon, ~%7,46 nitrojen ve ~%6,67 hidrojen tespit edildi. MTT sitotoksikite testinde kitosan'ın IC_{50} dozu 24. saatte 1427 μM , 48. saatte 808.9 μM ve 72. saatte 611.6 μM olarak belirlendi. Kitosan yapısıyla karakterize edilen bu tombul çekirge türü, çeşitli teknolojik ve endüstriyel amaçlar için potansiyel bir kitin ve kitosan kaynağı olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Kitin, Kitosan, HEK293, Sitotoksikite, *Bradyporus* sp.

Aralık, 2023; 56 sayfa

PhD. THESIS

***Bradyporus* sp. (Orthoptera, Insecta) CHITIN AND CHITOSAN FILM PRODUCTION AND INVESTIGATION OF THEIR CYTOTOXICITY ON HUMAN CELL LINE (HEK293)**

Rajaa Umran Mosa ALRUBAYE

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics**

Supervisor: Prof. Dr. Murat KAYA

ABSTRACT

Chitin, a polysaccharide composed of N-acetyl-D-glucosamine components (poly (β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucoseamine)), is the second most abundant biopolymer in the world. It is reported that this important biopolymer is found in nature mainly in invertebrates, arthropods, insects, algae, fungi and eukaryotic yeasts. Although the most common sources of chitin in nature are indicated as shellfish and aquatic invertebrates. The deacetylated derivatives of chitin are chitosan. In this study, Chitin and chitosan were isolated from *Bradyporus* sp. (Orthoptera, Insecta). The obtained chitosan 3D film structure was characterized by FTIR, TGA, XRD, SEM, elemental analysis without deteriorating. MTT test was performed to determine the cytotoxic effects of chitosan. Chitosan administered at optimal and overdose intervals was applied to HEK293 cells for 24, 48 and 72 hours. Chitosan FTIR spectra showed characteristic bands in the frequency range between 4000 and 400 cm^{-1} . DTGmax value of chitosan was determined as 297.5 $^{\circ}\text{C}$ from TGA/DTG analysis. Two maximum peaks were obtained in XRD analysis ($2\theta=10.9$, $2\theta=19.6$). After SEM analysis, porous and microfibrillar structure was observed at high magnification power. While no sulfur was detected in elemental analysis, ~41.10% carbon, ~7.46% nitrogen and ~6.67% hydrogen were detected. In the MTT cytotoxicity test, the IC_{50} dose of chitosan was 1427 μM at 24 hours, 808.9 μM at 48 hours, and 611.6 μM at 72 hours. Characterized by their chitosan structure, this plump grasshopper species can be used as a potential source of chitin and chitosan for various technological and industrial purposes.

Keywords: Chitin, Chitosan, HEK293, Cytotoxicity, *Bradyporus* sp.

December, 2023; 56 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kitin, N-asetil glukozamin birimlerinden yapılmış modifiye bir polisakkarittir	3
Şekil 2.2. Kitosanın kimyasal yapısı doğrusal bir polisakkarittir	5
Şekil 2.3. Kitin ve kitosan kaynakları	6
Şekil 2.4. <i>Bradyporus</i> sp.'nin vücut yapısı	12
Şekil 2.5. Kitosanın işlenmesi ve kitosan bazlı filmlerin hazırlanma yöntemleri	18
Şekil 2.6. Antikanser ilaçlarının kitosan nanotaşıyıcılarından dış veya iç uyaranlara yanıt olarak salınması	25
Şekil 2.7. Kitosan polimeri ile kapsüllenmiş antikanser ilaçlarının hazırlanmasının şematik gösterimi	27
Şekil 3.1. <i>Bradyporus</i> sp. yan profil görünümü ve kitin yapısı	30
Şekil 4.1. <i>Bradyporus</i> sp.'den izole edilen kitosan örnekleri.	34
Şekil 4.2. Kitosan spektrum analiz sonuçları	36
Şekil 4.3. SEM analizi sonucunda elde edilen görüntüler	39
Şekil 4.4. HEK293 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri	41
Şekil 4.5. HEK-293 hücrelerinin absorbands (570 nm) ve normalize absorbands (%) grafiği.	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kitosan film üretimi	8
Çizelge 4.1. Kitosan elementel analiz sonuçları.	40



SİMGELER VE KISALTMALAR

3D	Üç Boyutlu
C	Karbon
Ca	Kalsiyum
dH₂O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTG	Diferansiyel Termal Termogravimetrik
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS	Fetal Bovine Serumu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskobu
g	Gram
H	Hidrojen
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HNO₃	Nitrik Asit
kDa	Kilodalton
M	Molar
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mPA	Mega Paskal
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
mW/cm²	Miliwatt/Santimetrekare
nm	Nanometre
O	Oksijen
P	Fosfor
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
pH	Potansiyel Hidrojen
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Tga	Termogravimetrik Analiz
vd.	ve diğerleri
XRD	X-Işını Kırınım Yöntemi
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikrometre
°C	Santigrat Derece
θ	Theta
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Kitin, 1811'de Fransız Profesör Henri Braconnot tarafından "mantar" ve 1823'te Antoine Odier tarafından "kitin" olarak biliniyordu. Kitin, masif, kristalimsi nitrojen polisakkaritleri içerir. N-asetilglukozamin zincirleri polisakkaritler üretir (Bastiaens vd., 2019).

Kısmi deasetilasyona tabi tutulmuş bir kitinin türevi olan kitosan, gelişmiş suda çözünürlük ve gelişmiş işlenebilirlik sergiler. Bu nedenle kitosan, özellikle 1 ila 10 kDa arasındaki daha küçük oligomerler, tarım, su ve atık su arıtımı, kişisel bakım, yiyecek ve içecekler, kimyasallar, yem ve kozmetik alanında umut vaat etmektedir (Muzzarelli vd., 2012). Ek olarak, biyoaktif kitosan oligomerleri yara iyileşmesinde ve kozmetik bileşimlerde kullanım açısından ümit vericidir. Kitin ve kitosan çok yönlü biyomateriyallerdir ancak kitinin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve kitosan'a (oligomerler) dönüştürülmesi zor ve zaman alıcıdır. Bu prosedürler, yeterince kullanılmayan kitinin küresel kullanımını engellemektedir (Younes ve Rinaudo, 2015).

Porifera, Algler, Anthozoa, Mantarlar, Nematoda, Annelida, Insecta ve Mollusca, Crustacea ve Arachnida'da kitin bulunur. Kitin, selüloz benzeri doğal bir polisakkarittir. Bol miktarda bulunur ve tarım, sağlık, biyoteknoloji, kozmetik ve biyoihlamlı malzeme araştırmalarında kullanılır. Ticari kitin, en bol bulunan ikinci doğal polimer ve hayvan dış iskeletidir, ancak bunu yapmak için yalnızca birkaç yengeç, karides ve kril kullanılır. Bu nedenle kitin araştırmalarının çoğu bu organizmalara odaklanmıştır (Mujtaba vd., 2019). Çeşitli kozmopolit böcek türlerinde kitin ve kitosan içeriği araştırılmıştır (Kaya vd., 2015).

Kitin ve kitosan malzemelerini karakterize etmek için spektrum analizi, X-ışını kırınımı, element analizi, FTIR, SEM ve DSC kullanıldı. XRD, kitin ve kitosanın kristal yapıda olduğunu göstermektedir. Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) spektrumları, O-H, N-H ve CO bağının gerilmesi ve titreşiminden kitinle ilişkili tepe noktaları göstermektedir. Kumari vd. deasetilasyonu (DD) ölçmek için element analizi, potansiyometrik titrasyon ve FTIR'ı kullanmıştır (Kumari vd., 2015).

İnsan embriyonik böbrek hücre hattı HEK 293, biyofarma, temel tıbbi araştırma ve terapötik müdahale geliştirmede kullanılmaktadır. Hücre hattı 1973 yılında insan

embriyonik böbrek hücrelerinden oluşturuldu. Sürekli laboratuvar geliştirmeleri ve transfeksiyonları nedeniyle bu hücreler popülerdir. Hücre yüzeyi proteinleri hücrelerin plakalara yapışmasına yardımcı olur. Sağlıksız hücreler, eşit olmayan yüzey bağlanması nedeniyle süpernatantta asılı kalır. Tan vd. ölen hücrelerin sağlıklı olanlardan daha küçük ve daha koyu olduğunu buldu (Tan vd., 2021). Bu araştırma, *Bradyporus* sp.'den türetilmiş kitin ve kitosan filmlerini ilk kez FTIR, TGA, XRD ve SEM kullanarak karakterize edecektir. MTT testi, bu filmlerin insan embriyonik böbrek hücrelerini (HEK 293) etkileyip etkilemediğini tespit etmektedir.

Hipotez *Bradyporus* sp. kitin ve kitosan, *H. abietis*, *C. johnei* ve ticari olarak temin edilebilen türlere benzer fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Güçlü deasetilasyona sahip düşük moleküler ağırlıklı kitosan, HEK293 üzerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkiye sahiptir.

Kanserli olmayan insan embriyonik böbrek hücrelerinden üretilen HEK-293T, hücresel model olarak yaygın kullanımı nedeniyle seçilmiştir. Bunlar, klinik öncesi ve araştırma nedenleriyle terapötik proteinler ve viral vektörlerin üretilmesini ve antikanser ilaç seçiciliğinin ve böbrek toksisitesinin değerlendirilmesini içerir. Etkinliği değerlendirmek için HEK-293T hücre hattı sıklıkla kullanılır. Boroda vd. HEK-293T hücrelerinde *Bradyporus* sp.'den türetilmiş kitin ve kitosan'ı epitel bariyeri boyunca test etmiştir (Boroda vd., 2022).

1.1 Çalışmanın Amaçları

Bu çalışmanın amaçları ise şöyledir;

- Kitinin *Bradyporus* sp.'den ekstraksiyonu
- Kitosan filmin üretiminde, 3 boyutlu film yapısının FTIR, TGA, XRD, SEM, elementel analizlerle bozulmadan karakterizasyonu
- Kitosanın insan hücreleri (HEK293 hücreleri) üzerinde toksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi

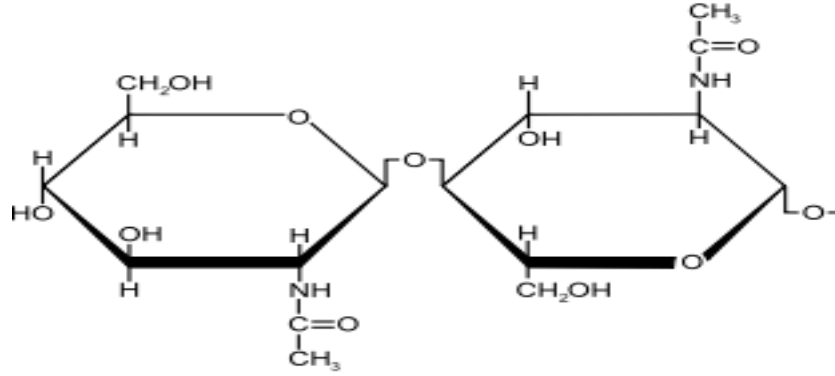
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kitin ve Kitosan Kaynakları

2.1.1 Kitin

Modifiye glikoz molekülleri büyük bir polimer olan kitini oluşturur. Böceklerin sert dış iskeletlerini ve tırtılların yumuşak gövdelerini oluşturur. Çeşitli türler farklı miktarlarda kitin içerir (Bastiaens vd., 2019). N-asetilglukozamin kalıntıları, büyük bir amino polisakkarit olan kitini oluşturur (Şekil 2.1). Dünyadaki en büyük ikinci doğal makromolekül olarak selülozdan sonra gelir. Kitin kelimesi Fransızca kaplama anlamına gelen kitinden gelmektedir. Kitin sıklıkla protein olarak yanlış teşhis edilir. Kitinin nitrojen yapısı buna neden olur. Kitin amino şekerlerden, proteinler ise amino asitlerden oluşur. Bu nedenle yapısal olarak selüloza, işlevsel olarak da keratine benzemektedir (Kaya vd., 2015).

Kitin organizmalara yapısal destek ve koruma sağlar. Yumuşak vücut dokularını kaplayarak hayvanları zarar görmekten korur. Ayrıca hayvanları formda tutar ve dokuları nemlendirir. Kalın kitin dış iskelet, hayvanları yırtıcı hayvanlardan korur (Younes ve Rinaudo, 2015).



Şekil 2.1. Kitin, N-asetil glukozamin birimlerinden yapılmış modifiye bir polisakkarittir (Bastiaens vd., 2019).

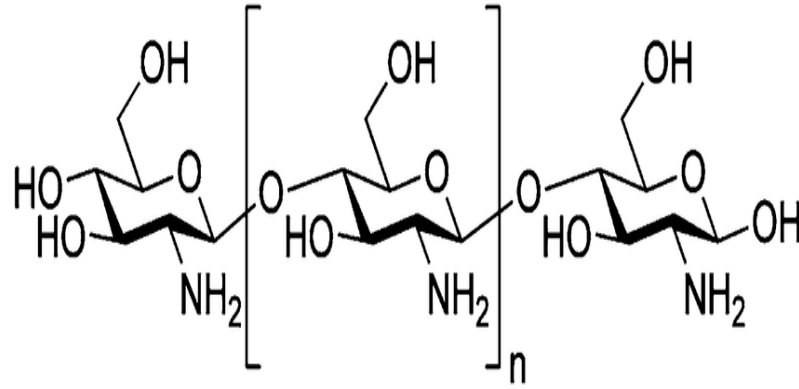
Kitin biyosentezi süreci, kitin sentaz olarak bilinen enzimin kolaylaştırdığı bir dizi katalitik süreci kapsar. Böcekler ve eklembacaklılar, sert bir dış iskelet oluşturmamanın bir yolu olarak kitin üretirler. Kitin, Kaya vd. tarafından tartışıldığı gibi eklembacaklılardan kimyasal ve biyolojik ekstraksiyon yöntemleriyle endüstriyel olarak sentezlenir (Kaya vd., 2015).

2.1.2 Kitosan

Kitosan, rastgele düzenlenmiş β -(1→4)-bağlı D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan doğrusal bir polisakkarittir (Şekil 2.2). Bu kimyasalın üretimi, sodyum hidroksit gibi alkalın bir bileşiğin, karides dahil kabuklu hayvanların kitin dış iskeletlerine uygulanmasını içerir. Kitosanın doğal biyokontrol kapasitesini gübrelerin veya pestisitlerin bitkiler ve çevre üzerindeki etkilerinden ayırmak önemlidir (Mujtaba vd., 2019).

Kitosan aktif biyopestisitler, tarım ve bahçecilik sektörlerinde biyolojik kontrol stratejilerinin uygulanması için yeni ve ekonomik açıdan uygun bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Kumari vd. kitosanın bitki yapraklarına veya toprağa uygulanması biyokontrol mekanizmasını tetikler (Kumari vd., 2015). Söz konusu süreç bitkilerde içsel savunma mekanizmalarını ortaya çıkarır, böylece patojenler, böcekler ve toprak kaynaklı hastalıklar gibi çeşitli organizma türleriyle mücadele etmelerini sağlar. Kitosanın bitki fizyolojisinin çeşitli yönleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Fotosentez sürecini güçlendirdiği, bitki gelişimini kolaylaştırdığı, besin alımını teşvik ettiği, çimlenmeyi ve filizlenmeyi teşvik ettiği ve genel bitki gücünü arttırdığı gözlemlenmiştir. Pamuk, mısır, tohumluk patates, soya fasulyesi, şeker pancarı, domates, buğday ve diğer çeşitler dâhil olmak üzere çeşitli tarımsal ürünlerde tohum muamelesi veya tohum kaplaması olarak kullanıldığında, gelişen kök sistemlerinde içsel bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarır. Bu bağışıklık tepkisi, faydalı nematodları ve diğer organizmaları korurken parazitik kist nematodlarını etkili bir şekilde ortadan kaldırır (Mujtaba vd., 2019; Tan vd., 2021).

Kitosan, zayıf asitlerde ($\text{pH} < 6$) çözünürlüğüne ve metal iyon kompleksleri oluşturma kapasitesine yol açan amino gruplarının varlığına dayanarak kitinden ayırt edilebilir. Yukarıda belirtilen özellikler, kitosani, atık su arıtımı ve saflaştırma dâhil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere çeşitli uygulamalar için uygun bir malzeme haline getirmektedir. Öte yandan, kitinin fiili kullanımı, eğer varsa, sınırlı çözünürlüğü nedeniyle önemli ölçüde sınırlandırılmıştır. Kitosanın sudaki çözünürlüğünün, yumuşak koşullar altında işlenebilirliğini mümkün kılan çözeltinin pH'ından etkilendiğini belirtmekte fayda vardır (Ardean vd., 2021).



Şekil 2.2. Kitosanın kimyasal yapısı doğrusal bir polisakkarittir (Hudson ve Jenkins, 2021).

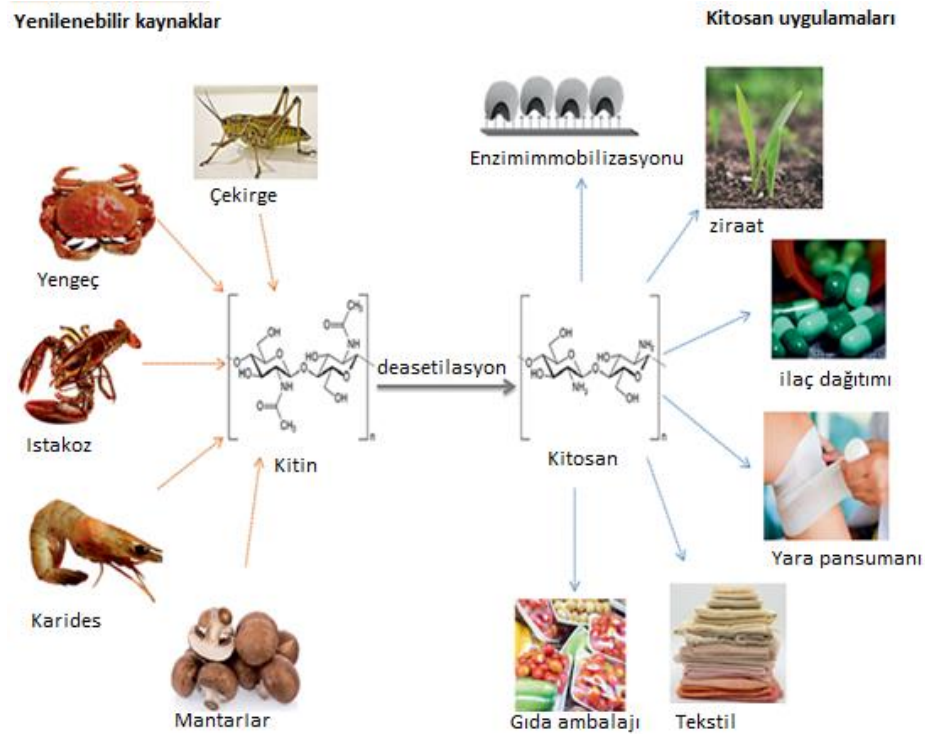
2.1.3 Kitin ve kitosan kaynakları

Kitinin bir asırdan fazla bir süredir çeşitli organizmalarda bulunduğu bilim insanları tarafından belgelenmiştir. İlk aşamalarda zoologlar, genellikle kimyasal analizler yapmadan tüm katı sarı-kahverengi oluşumlara "kitin" terimini atadılar. Bu uygulama zaman zaman yanlış veya aldatıcı verilerin üretilmesiyle sonuçlanmıştır (Bastiaens vd., 2019). Şu anda, biyosferde üretilen kitinin önemli bir kısmının deniz ortamlarında bulunduğu yönünde yaygın bir tahmin bulunmaktadır. Entoprocta, Cnidaria (mercanlar), Phoronida (at nalı kurtları), Brachiopoda (lamba kabukları), Ectoprocta, Bryozoa, Mollusca ve Porifera (süngerler) dâhil olmak üzere birçok su filumu bu özelliğe sahiptir. Kitin, mantarlar (mantarlar ve mayalar gibi), algler (diatomlar, koralin algler ve yeşil algler dâhil), Onychophora (genellikle kadife solucanlar olarak bilinir) ve protozoa dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda bulunur (Kaur ve Dhillon, 2014). Araknidler (örümcekler ve akrepler), böcekler, kabuklular (karides, kril, yengeç ve istakoz) ve çok ayaklılar (kırkayaklar ve çıyanlar) gibi Arthropoda'nın dış iskeletleri, en kolay erişilebilen kitin kaynaklarını temsil eder. Kitin, böceklerin dış iskeletlerinde ve beslenme kanalı ve trakeanın iç kütiküler astarlarında bulunur (Şekil 2.3). Böcek kütikülleri, yengeç dış iskeletlerinin aksine katekolaminler, kitin, proteinler, lipitler ve mineraller içerir (Kaya vd., 2014; Haryati vd., 2019).

Kitosan öncelikle kitinin kısmen deasetillenmiş bir türeği olarak tanınır; bununla birlikte biyokütlenin belirli formlarında doğal olarak oluştuğu da gözlemlenmiştir. Bazı mantarlar, yaşam döngülerinin farklı aşamalarında hücre duvarlarının önemli bir bileşeni olarak kitosan içerir. *Mucor*, *Cunninghamella*, *Absidia*, *Benjaminiella*, *Rhizopus* ve *Gongronella* gibi taksonları içeren Zygomycetes sınıfı, kitosan üretimine

önemli katkılarından dolayı iyi bilinmektedir. Al-Rooqi vd. kuru biyokütle bazında kitosan içeriğinin %1 ila %10 arasında değiştiğini ve buna %83 ila %94 arasında değişen bir deasetilasyon derecesinin eşlik ettiğini ortaya çıkarmıştır (Al-Rooqi vd., 2022). Kitosan doğrudan yollarla sentezlenmez; daha ziyade kitinden kitosan'a çok etkili bir dönüşüm sürecinden geçer. Bu sürecin kolaylaştırılması, bir deasetilaz enziminin varlığıyla arttırılır. Deasetilasyon enzimlerinin, kitinin plazma zarıyla kesiştiği yerlere yakın bir yerde bulunduğunu öne süren bir hipotez vardır. Kitin sentezi işlemi sırasında, deasetilazın enzimatik etkisi, kitinin kitosan'a dönüşümünü kolaylaştırır. Gelecekte mantar, daha az titiz tekniklerle izolasyon potansiyeli nedeniyle ümit verici bir kitosan kaynağı olarak ortaya çıkabilir (Parhi vd., 2020).

Ayrıca bakterilerin kitini enzimatik olarak deasetilasyon yeteneğine sahip olduğu ve böylece mantarlara benzer şekilde kitosan haline dönüştürdüğü belgelenmiştir. Kaur vd. toprak örneklerinden bakterileri (yani *Bacillus* sp. ve *Serratia* sp.) başarıyla geri kazanmıştır. Bu bakteriler kitin deasetilaz üretir ve kitosan salgılar. Bu teknik, kitinin doğal olarak parçalanmasına yardımcı olur, ancak çözünmezliği, kullanılabilirliğini sınırlar. Üstelik bu bakterilerin hızlı çoğalması ve enzimlerinin ekstraksiyonu, biyolojik kitosan sentezinin ilerlemesi için değerli bir kaynak sunar (Kaur vd., 2014).



Şekil 2.3. Kitin ve kitosan kaynakları (Bastiaens vd., 2019).

2.2 Biyofilm

Biyofilm, kendilerinin ürettikleri bir matrisin içine sıkı bir şekilde bağlanan birçok bakterinin karmaşık ve karmaşık bir topluluğu olarak tanımlanabilir. Bu matris, canlılara veya cansız yüzeylere bağlanma aracı olarak hizmet eder. Biyofilmler yüzeylere yapışan karmaşık mikrobiyal topluluklardır. Bu topluluklar hareketsiz bakteri ve/veya mantar hücrelerinden oluşur ve hücrelerin kendilerinin oluşturduğu bir matris ile çevrelenirler. Matris polisakkaritler, DNA ve diğer çeşitli bileşenlerden oluşur. Süspansiyon halinde bulunan hücreler olan planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında, sapsız hücreler antimikrobiyal maddelere karşı daha fazla direnç gösterir. Bu artan direnç, biyofilmle ilişkili enfeksiyonların yönetimini önemli ölçüde etkiler. (Bastiaens vd., 2019; Bao vd., 2022). Antimikrobiyal tedavinin başarısızlığı sıklıkla, tüm enfeksiyonların %65-80'ini oluşturduğu tahmin edilen biyofilmle ilişkili enfeksiyonların yüksek prevalansı nedeniyle önemli bir sorun teşkil eden biyofilmlerin gelişimine bağlanmaktadır (Meneses vd., 2023).

2.3 Kitin ve Kitosan Film Yapımı ve Uygulamaları

Kitin bazen selülozun bir türevi olarak da görülür; ancak selüloz üreten organizmalarda bulunmaz. Kitin ve türevlerinin N-deasetilasyonunun ortak bir adı yoktur. Kitosan ve kitin %6,89 nitrojene sahiptir, ancak sentetik olarak değiştirilmiş selüloz türevleri yalnızca %1,25 nitrojene sahip olabilir. Selüloz, dekstran, pektin, aljinik asit, agar, agaroz ve karragenan gibi doğal polisakkaritler nötr veya asidiktir. Kitosan temel bir polisakkarittir. Kitin ve kitosan polioksi tuzlar, filmler, biyoyumrluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama ve moleküler adsorpsiyon üretebilir. Çok sayıda makale, amino gruplarını kimyasal olarak değiştirerek fonksiyonelleştirilmiş kitosan türevlerinin sentezini açıklamaktadır. Bununla birlikte, yalnızca sınırlı sayıda bileşik, doğal veya ikili solvent sistemlerinde yüksek derecede çözünürlük sergiler. Lodhi vd. organik çözücülerde daha fazla çözünebilen, kimyasal olarak modifiye edilmiş kitin ve kitosan türevlerini bulmuşlardır (Lodhi vd., 2014).

Kitosanın asit çözünmesinden türetilen kitosan filmleri, bir dizi avantajlı fizikokimyasal ve biyolojik özellik sergiler (Bastiaens vd., 2019). Gözlenen özellikler, filmlerin diğer bileşenlerle birleştirilmesi amaçlandığında, asetilasyon derecesi, çözelti

viskozitesi, kurutma sıcaklığı, asit çözünme yüzdesi ve spesifik kompozit türü dahil olmak üzere çeşitli faktörlere yanıt olarak önemli değişkenlik sergiler (Çizelge 2.1). Yukarıda belirtilen parametreler, gerilme mukavemeti, gerinim, bariyer özellikleri, ıslanabilirlik, termal stabilite, pürüzlülüğün yanı sıra antibakteriyel ve antioksidan özellikler de dahil olmak üzere önemli fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerin çeşitliliğini etkilemede önemli bir rol oynar (Kerch ve Korkhov, 2021). Üstelik yukarıda bahsedilen özellikler, kitosan bazlı filmlerin, gıda paketlenme, adsorpsiyon araştırmaları, tıbbi uygulamalar (yani yara tedavisi) ve tarım dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere kullanım bulduğu çeşitli alanları tanımlamaktadır (Zhong ve Li, 2021).

Çizelge 2.1. Kitosan film üretimi (Zhong ve Li, 2021).

Matriks	Faktör/koşullar	Özellikler (arttırıldı/azaltıldı)
Kitosan Film	Deasetilasyon derecesi	Artırılmış çekme mukavemeti
	Kurutma sıcaklığı	Artırılmış mekanik özellikler
	Bağıl nem	Artırılmış bariyer özellikleri
	Asetik asit/oda sıcaklığında depolama	Daha yüksek çekme mukavemeti
	Laktik, malik veya sitrik asit	Daha düşük çekme mukavemeti
	Oleik asit	Daha düşük plastikleştirme verimliliği
	Gliserol	Daha yüksek plastikleştirme verimliliği
	Etanol	Kitosanın yağ zincirleriyle etkileşimini kolaylaştırır
	Tannik asit	Artırılmış çekme mukavemeti

2.3.1 Kitin ve kitosan biyomedikal uygulamaları

2.3.1.1 Doku mühendisliği

Doku mühendisliği, daha sonra insan vücuduna implante edilebilecek doku ikamelerini oluşturmak amacıyla, hücre dışı ortamlarında manipülasyona ve düzenlemeye tabi tutulan canlı hücrelerin kullanımını kapsar (Elieh vd., 2016). Doku mühendisliğinin temel amaçları, belirli bir doku veya organın işlevselliğinin onarılması, değiştirilmesi, korunması veya arttırılması olarak sınıflandırılabilir. Kitin bazlı malzemeler, boru şeklinde yapılar halinde şekillendirilebilme özelliğine sahiptir, bu da onları sinirler ve kan arterleriyle ilgili doku mühendisliği uygulamalarında kullanıma uygun hale getirir ve böylece hücresel büyüme için bir iskele görevi görür.

Kitin bazlı iskeleler yüksek derecede çok yönlülük sergiler ve çok çeşitli rejeneratif uygulamalar için etkili bir şekilde optimize edilebilir. Doku mühendisliği için polimer iskelelerin yapımında kitin ve kitosan kullanımının etkili olduğu kanıtlanmıştır. Polimer yapı iskelelerinin tasarımı, gözenek boyutlarının uygun bir dağılımı ile karakterize edilen yüksek gözenekliliğin varlığı da dâhil olmak üzere birçok temel kriteri gerektirir. Ek olarak, iskele, neo-doku oluşumu hızıyla uyumlu bozunma oranıyla biyolojik olarak parçalanabilirlik sergilemelidir. Neo-doku oluşumu sürecinde iskele gözeneklerinin çökmesini önlemek için yapısal bütünlük de çok önemlidir. Ayrıca iskelenin hücreler için toksik olmaması, biyouyumlu olması ve hücre yapışmasını kolaylaştırmak için hücrelerle etkileşime girebilmesi gerekir. Son olarak iskele, çoğalmayı, göçü ve farklılaşmayı kapsayan hücre fonksiyonunu desteklemelidir (Venkatesan vd., 2014).

2.3.1.2 Yara iyileştirme

Madhumathi vd. yaraların iyileşmesine yardımcı olmak için kullanılabilecek α -kitin/nanogümüş kompozit destekleri oluşturmuştur (Madhumathi vd., 2020). Bilim insanları bu yapı iskelelerinin *S. aureus* ve *E. coli* mikroplarını öldürebildiğini ve ayrıca kanın pıhtılaşmasına da yardımcı olabileceğini keşfetti. Bu nitelikleri nedeniyle onlardan yapılan nanopartiküller yaraların iyileşmesine yardımcı olabilir.

2.3.1.3 Kanser teşhisi

Kuantum noktaları olarak da bilinen yarı iletken nanokristaller, çeşitli biyolojik tanıma ligandlarıyla biyokonjugatlar oluşturma kapasitesine sahiptir. Sonuç olarak, immün boyama uygulamaları ve malign hücre ve dokuların biyogörüntülenmesi bağlamında geleneksel organik floresan boyaların yerine geçme potansiyeline sahiptirler. Bununla birlikte kuantum noktaları, sitotoksik ve potansiyel olarak tehlikeli özellikler sergileyebilecek diğerlerinin yanı sıra kadmiyum sülfid, kadmiyum selenit, çinko selenit gibi ağır metallere oluşur. Katkılı çinko sülfürden (ZnS) oluşan parlak bir kuantum noktası (QD), ağır metaller kullanılmadan başarıyla sentezlendi. QD daha sonra kanser hücrelerinin hedefe yönelik görüntülenmesini sağlamak için kanser hedefleyici bir ligand olan folik asit (FA) ile işlevselleştirildi. Folat reseptörleri, çok sayıda kanser hücresinde yüksek ekspresyon seviyeleri sergiler ve bu onların, folat-

konjuge nanopartiküller ile etkileşime girdikten sonra reseptör aracılı endositozu kolaylaştırmasını sağlar, dolayısıyla hücre içi alımı kolaylaştırır. (Elieh vd., 2016).

2.3.1.4 Antibakteriyel özellikler

Kitosanın antibakteriyel özellikliği literatürde ispatlanmıştır. %0,025'i aşan konsantrasyonlarda kitosan varlığında *Escherichia coli*'nin çoğalması engellenmiştir. Kitosan, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Helminthosporium* dâhil olmak üzere birçok mikrobiyolojik türün çoğalmasını engelleme kapasitesine sahiptir. Kitosanın içerdiği pozitif yüklü amino gruplarının bakteriler üzerindeki negatif yüklü gruplarla etkileşime girmesi ve dolayısıyla büyümelerini engellemesi muhtemeldir (Kumar vd., 2020).

2.3.1.5 Yaşlanma karşıtı-kozmetik

Morganti vd. fosfatidilkolin ve linoleik asitten, hyaluronan ve kitin nanofibrilleriyle nanokomplekslenmiş blok kopolimer nanopartiküller (BPN) oluşturdular. Nanoyapılar kapsüllenmiş kolesterol, kreatin, kafein, melatonin, E ve C vitaminleri ile glisin ve arginin içerir. Konsept, kurucu bileşenlerin her birinin bu alanda belirli bir etkinlik gösterdiği göz önüne alındığında, bu nanotaşıyıcıların cildin yenilenmesi amacıyla kullanılmasını içeriyordu. Yüklü BPN taşıyan kitin nanofibrillerin cildine uygulanan deneklerden oluşan deney grubu, bir aylık tedavi periyodunun ardından artan yumuşaklık ve hidrasyon seviyeleri sergiledi. Morganti vd. göre, BPN içeren enjekte edilebilir aktif kitin nanofibrilinin uygulanması, tedavinin ilk 15 günü içinde hem ince kırışıklıklarda hem de kırışıklık çizgilerinde önemli bir azalmayla sonuçlandı (Morganti vd., 2021). Ek olarak, telanjiektazi varlığında gözle görülür bir azalma olmuş, bu da yaşlanma döneminde genel yüz görünümünde belirgin bir iyileşmeye yol açmıştır.

2.3.1.6 Aşı adjuvan

Fareler ve kobaylar üzerinde yapılan araştırmalar, intranasal kitosan glutamat uygulamasının, difteri antijenine yanıt olarak antikor üretimini etkili bir şekilde artırabildiğine dair kanıtlar göstermiştir. CRM197 olarak bilinen bu antijen, çapraz reaktivite sergileyen, difteri toksininin toksik olmayan bir çeşididir. Mann vd. canlı virüs tehdidinin uygulandığı insan gripi için klinik öncesi model olarak gelinciklerin

kullanımını içeren bir çalışma yürütmüştür. Mann vd. kitosan glutamat ve N,N,N-trimetillenmiş kitosanın inaktive edilmiş bir alt birim antijeni için adjuvanlar olarak potansiyelini incelemiştir (Mann vd., 2014). Çalışmada kullanılan alt birim antijeni, influenza antijeni A/Vietnam/1194'ten üretildi. Bu çalışma, Mills vd. tarafından araştırıldığı gibi, kitosan adjuvanının bir difteri aşısının etkinliği üzerindeki etkisini incelemektedir (Mills vd., 2023).

2.4 *Bradyporus* sp. (Orthoptera, Insecta)

2.4.1 *Bradyporus* sp. 'nin bilimsel sınıflandırılması

Üst Alem	: Eukaryota
Alem	: Animalia
Şube	: Arthropoda
Sınıf	: Insecta
Takım	: Orthoptera
Alt takım	: Ensifera
Aile	: Tettigoniidae
Alt aile	: Bradyporinae
Oymak	: Bradyporini
Cins	: <i>Bradyporus</i>



Şekil 2.4. *Bradyporus* sp.'nin vücut yapısı (URL-1).

Bradyporus cinsinin güneydoğu Avrupa'nın yanı sıra batı ve orta Asya bölgelerinde de yaşadığı bilinmektedir (Şekil 2.4). Yukarıda bahsedilen taksonomik sınıflandırma, onu Bradyporinae alt ailesi ve Bradyporini kabilesi içindeki tip cinsi olarak belirtir. Böcekler, diyapoz olarak bilinen fizyolojik bir mekanizma yoluyla olumsuz iklim koşullarında hayatta kalabilmektedir (Duan vd., 2019). Bu süreç yumurta, larva, nimf, pupa veya yetişkin aşamaları dahil olmak üzere çeşitli aşamalarda gerçekleşebilir ve zorunlu veya isteğe bağlı özellikler sergileyebilir. Çoğu böcekte, olumsuz çevresel durumlara karşı güçlü uyum sağlama yeteneklerini gösteren aşamaların oluşumu tipik olarak gözlemlenir. Orthoptera böcek familyasında diyapoz oluşumu ağırlıklı olarak embriyonik diapoz olarak bilinen embriyonik aşamada gözlenir ve yetişkin dönemi boyunca ara sıra diyapoz örnekleri görülür. Orthoptera türleri arasında yumurtanın dinlenmesi şeklindeki diyapozun hakim bir özellik olması dikkat çekicidir. Bahsedilen fenomen, embriyonik gelişimin çeşitli dönemlerinde ortaya çıkabilen embriyonik diyapoz olarak bilinir (Haghighian vd., 2017). Tettigonidae ailesi, potansiyel olarak bir, iki veya üç yıl süren ve tek bir neslin oluşmasına neden olan çeşitli diyapoz modelleri sergiler. Tettigonidlerin embriyonik gelişimi, toplam 26 aşamadan oluşan bir dizi sekiz farklı aşamayla karakterize edilir. Diapoz olgusu embriyogenezin hem erken gelişimini hem de son aşamalarını etkileme potansiyeline sahiptir. Diapoz, gelişimin geçici olarak durdurulmasına neden olan, dolayısıyla olgun embriyonun ilerlemesini kesintiye uğratan bir olgudur. Tettigonidae'nin yaşam döngüsü, başlangıç ve nihai diyapozun oluşmasıyla belirlenir (Tougeron, 2019). Avrupa tettigoniidlerinin yaşam döngüsü, yumurta diyapoz döneminin uzunluğuna göre belirlenen üç gruba

ayrılır. Birinci tip yıllık yaşam döngüsünü kapsar. Bir organizmanın yıllık veya iki yılda bir gerçekleşen yaşam döngüsünü belirtir. Bitkiler veya hayvanlar gibi belirli organizmaların yaşam döngüsü her iki yılda bir veya daha uzun bir sürede gerçekleşir. Birinci türde başlangıçta diyapoz oluşmaz. İkinci tipte yumurtalar, isteğe bağlı olarak düşük sıcaklık ve/veya ebeveynin yaşadığı kısa fotoperiyodun neden olduğu başlangıç diyapozuna girme potansiyeline sahiptir. Üçüncü tipte, hem erken hem de son diyapozları sergiler; yaşam döngüsünün uzatılmış süresi öncelikle uzun süreli ilk diyapoza atfedilir. Birçok böcekte yumurta aşamasında diyapozun meydana gelmesi, kışlama öncesi düşük sıcaklık, yaz boyunca yüksek sıcaklık ve annenin fotoperiyod faktörü dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir. Döllerde diyapozun düzenlenmesi doğası gereği çoğunlukla anneseldir ve hem fotoperiyottan hem de sıcaklıktan etkilenir. Annenin fotoperiyodunun veya ebeveynlerin yaşadığı fotoperiyodun diyapozun oluşumu ve oranı üzerindeki etkisi büyük önem taşımaktadır (Haghighian vd., 2022).

2.5 Böceklerden Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu

Kitin, böcekler, kabuklular ve eklembacaklılar gibi çeşitli eklem bacaklıları kapsayan çok çeşitli canlıların dış iskeletlerinde bulunur. Kitin, selüloz ile yapısal benzerlikleri paylaşan, doğal olarak oluşan bir polisakkarittir. Doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve kozmetik, tarım, sağlık, biyolojik malzeme biliminin yanı sıra biyoteknoloji gibi çeşitli alanlarda yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Çeşitli canlı organizmaların dış iskeletinin yapısal bileşeni olarak hizmet veren kitin, en bol bulunan ikinci doğal polimer olmasına rağmen, ticari kitinin üretimi çoğunlukla yengeç, karides ve kril gibi sınırlı sayıda organizmaya dayanır. Sonuç olarak, kitin ve özellikleri üzerine yapılan önceki araştırmalar öncelikle bu organizmalara odaklanmıştır (Ehrlich vd., 2013; Kaya vd., 2015).

Bal arısı (*Apis mellifera*), ipekböceği, böcek larvası kütikül, karasinek ve yaban arısı dahil olmak üzere yaygın olarak dağıtılan Insecta türlerinin kitosan ve kitin kompozisyonunu değerlendirmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte, kitin bileşimi ve özellikleri henüz tam olarak incelenmemiş önemli sayıda sosyal organizma bulunmaktadır. Bazı türler dünyanın farklı bölgelerinde görülen aşırı üreme desenleri nedeniyle tarım alanları için tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca bu türler erken ölümlere yol açarak çevre kirliliğine de katkıda bulunmaktadır. Yengeç ve

karideslerin küresel ekonomik sömürüsü çoğunlukla kitin içeriğinden kaynaklanmaktadır (Majtan vd., 2017). Son yıllarda, tüm böceklerin kütiküllerini oluşturan kitinin ortak özelliği ile Insecta'nın yaklaşık iki milyon farklı türü küresel olarak tanınmaktadır. Bununla birlikte, kitin ekstraksiyonu için böcek sömürüsünün kapsamlı incelemesi mevcut literatürde yeterince araştırılmamıştır (Ai vd., 2018).

Son yıllarda, bir grup bilim insanı çeşitli böceklerin tırnak etleri üzerinde bir analiz gerçekleştirmiştir. Liu vd. bir böcek türü olan *Holotrichia paralela*'nın kitin içeriğini değerlendirmek için bir çalışma yapmış ve yaklaşık %15 oranında kitin içerdiğini keşfetmiştir. Bulguları, bu spesifik böcek türünün önemli bir kitin kaynağı olarak hizmet etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bu sosyal türlerin toplanıp değerli bir kitin kaynağı olarak kullanılma potansiyeli vardır. Bu organizmaların sosyal doğası, kitin ve türevlerinin üretiminde olası uygunluklarına dair kanıt sağlar (Liu vd., 2012).

Kitosanın antibakteriyel, antikanser ve hemostatik niteliklerin yanı sıra yara iyileşme sürecini hızlandırma yeteneği gibi bir dizi önemli biyolojik özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Salmabi ve Seema'ya göre Kitosan, diğer doğal antimikrobiyal formlarla karşılaştırıldığında çok sayıda avantaja sahiptir (Salmabi ve Seema, 2013). Bu faydalar arasında artan antimikrobiyal aktivite, daha geniş bir etkinlik aralığı, daha hızlı mikrobiyal yok etme ve daha düşük memeli hücre toksisitesi yer alır. İki çekirge türünün kitinlerinin analizi alfa konformasyonunu gösterdi. Bu önemli maddenin alternatif sağlayıcıları arasında bu çekirge türleri bulunmaktadır. Bu çalışmada iki sürü halinde yaşayan çekirge türünün kitosan ve kitin içeriği incelenmiştir. Son yıllarda kitosan türevlerinin antioksidan yeteneklerini inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmalarda kullanılan kitosan örnekleri karides, yengeç ve mantarlardan alınmıştır. Ortopteran kitosan'ın antioksidan özelliklerini çıkaran ve değerlendiren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Charernsriwilaiwat vd., 2020).

2.6 Kitosan Film Üretim Teknikleri

Kitosan filmleri, aglikon geniposidik asit ile çapraz bağlanma (Mi vd., 2006), üçlü kitosan-glukomann-nisin sistemleri (Mi vd., 2016), nişasta kitosanının ferulik asitle harmanlanması (Mathew vd., 2018) ve sarımsak yağı, potasyum sorbat ve nisin entegrasyonu dahil olmak üzere birçok yöntem kullanılarak üretilir. Doğal

dünyada en yaygın ikinci polisakkarit olan kitosan, toksik olmama, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve antibakteriyel özellikler gibi dikkate değer özelliklere sahiptir. Bu özellikler paketlenme uygulamaları alanında büyük ilgi görmüştür. Kitosan, kitinin deasetilasyonu işlemiyle elde edilen doğal olarak oluşan bir polimerdir. Kitinin kendisinin çoğu çözücünde çözünmediği bilinmektedir. Kullanıcının metni akademik anlamda yeniden yazılacak herhangi bir bilgi içermemektedir. Meyve yüzeyinde ince bir film oluşturmaları, nem ve aroma kaybını önlemesi, oksijenin bitki dokusuna nüfuzunu engellemesi veya mikroorganizmaların büyümesi ve uygulama güvenliği gibi olumlu özelliklerinden dolayı kitosan kaplamanın kullanımı büyük ilgi görmüştür. İki toplu Orthoptera türü, Khubiev ve diğerleri tarafından gösterildiği gibi FTIR, TGA, XRD, SEM tekniklerinin kullanımıyla etkili bir şekilde izole edilebilen ve tanımlanabilen kitin ve kitosan yapılarına sahiptir (Khubiev vd., 2017).

2.6.1 Kızılötesi analiz (FTIR)

Fourier Dönüşümü, frekans alanındaki fonksiyonları ve sinyalleri analiz etmek için kullanılan matematiksel bir tekniktir. Bir fonksiyonu veya sinyali kızılötesi spektroskopiye ayırıştırır, alternatif olarak “FTIR analizi” veya “FTIR spektroskopisi” olarak da anılır, organik bileşikler, polimerler ve bazen de inorganik maddeler de dahil olmak üzere birçok malzeme türünü tanımlamak amacıyla kullanılan bilimsel bir yöntemdir. FTIR analiz tekniği, test numunelerini sorgulamak ve kimyasal özelliklerini araştırmak için kızılötesi radyasyon kullanır (Griffiths vd., 2020). Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) cihazı, yaklaşık 10.000 ila 100 cm^{-1} aralığında kızılötesi radyasyon yayar ve bu daha sonra belirli bir numune aracılığıyla iletilir. Bu işlem sırasında radyasyonun bir kısmı numune tarafından emilirken geri kalan kısmı iletilir. Gelen radyasyon, numunede bulunan moleküllerle etkileşimler yoluyla dönme ve/veya titreşim enerjisine dönüştürülür. Dedektörde gözlemlenen sinyal, tipik olarak 4000 cm^{-1} ila 400 cm^{-1} aralığını kapsayan ve analiz edilen numunenin moleküler parmak izi görevi gören bir spektrum olarak ortaya çıkar. Her molekül veya kimyasal yapı tarafından üretilen benzersiz spektral parmak izi, FTIR analizini kimyasal tanımlama için değerli bir teknik haline getirir.

Doğal olarak oluşan kitinin üç farklı kristal formu vardır: α , β ve γ (Liu vd., 2020). Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) spektral analizi, kitinlerin kristal yapısına ilişkin değerli bilgiler vermektedir. β -kitinin FTIR spektrumu 1650 ve 1550/ cm^{-1} de bantlara

sahipken, α yapısı 1650 ve 1620/cm²'de farklı bantlarla ayırt edilir. Doğal kitinin baskın formu α -kitindir. *C. barbarus*'tan elde edilen kitinin FTIR spektrumları, 1652 ve 1621/cm dalga sayılarında görülen zirvelerle (tepe pik noktası) kanıtlandığı gibi, α formunun göstergesi olan bantlar sergileyerek de kanıtlanmıştır (Gomes vd., 2018).

2.6.2 Termogravimetrik analiz (TGA/DTG)

Termogravimetrik analiz (TGA), termal stabiliteyi belirlemek ve uçucu bileşenleri ölçmek için yaygın olarak kullanılır. Bu yöntem, kontrollü ısıtma sırasında numune ağırlığındaki değişiklikleri izler. Hızı, maliyeti ve kullanım kolaylığı nedeniyle TGA, lignoselülozik biyokütle kompozisyon analizi için umut verici bir yöntemdir. Gomes vd. α -selüloz ve hemiselüloz miktarlarını ölçmek için TGA'nın ıslak kimyasal yöntemlerden daha doğru olduğunu öne sürmüşlerdir (Gomes vd., 2018). Ön işlemden sonra Avicel, kayın ağacı, alkali lignin, dallı otu ve mısır sobası lignin de selüloz ve hemiselüloz açısından TGA kullanılarak test edilmiştir. Termogravimetrik analiz, yüksek verimi nedeniyle lignin değerlendirmesi için idealdir. Bu yöntem zarar vericidir ve sıcaklığın artması polimer analitlerini değiştirebilir (Lupoi vd., 2015).

2.6.3 XRD teknikleri

Yaygın olarak XRD olarak adlandırılan X-ışını kırınım analizi, malzeme bilimi alanında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Temel amacı belirli bir malzemenin kristalografik yapısını tespit etmektir. XRD, bir malzemenin gelen X ışınlarına maruz bırakılmasını ve ardından malzemedan yayılan X ışınlarının yoğunluklarının ve saçılma açılarının analiz edilmesini içeren bir tekniktir. *C. barbarus* ve *O. dekorus*'tan elde edilen alfa kitinler, $2\theta = 5^\circ$ ila 45° açısal aralığında X-ışını kırınım ölçümlerine tabi tutulmuştur (Kaya vd., 2015).

2.6.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) teknikleri

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), miligramlarca malzeme kullanarak parçacık boyutunu, şeklini ve dokusunu analiz eder. SEM, numuneyi paralel kanallar boyunca hareket ettirmek için dar bir elektron ışını kullanır. Bosch vd. *C. barbarus* ve *O. dekorus* kitin ve kitosanın yüzey morfolojilerini incelemiştir. Her iki türün kitinleri de pürüzsüz yüzeylere sahiptir (Bosch vd., 2023). Buna karşılık, her iki türden elde edilen kitosanların gözenekli, gözenek çapları 100 ila 200 nm arasında değişen değerlere

sahiptir ve nanofibriler, fibril boyutları 10 ila 60 nm arasında değişen bir yüzey yapısı görülmektedir. O. *Decorus*'tan elde edilen kitosan nanoliflerinin berraklığının, C. *barbarus*'tan elde edilen nanoliflerden daha üstün olduğu görülmüştür. İki Ortoptera türünden elde edilen kitosan ve kitinlerin SEM görüntüleri diğer organizmalarda gözlenenlerle benzerlikler göstermiştir (Kaya vd., 2015).

2.7 Kitosan Filmlerin Biyomedikal Uygulamaları

Kitosanın antibakteriyel film üretiminde kullanılması dikkat çekici bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır. Kritchenkov vd. yaptığı çalışmada bahsedilen filmler gıda ambalaj malzemesi olarak hizmet vermektedir (Kritchenkov vd., 2019). Başlıca işlevleri, gıdanın bozulmasından sorumlu bakterilerin çoğalmasını engelleyerek gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmaktır. Ayrıca, kitosan bazlı filmlerin tıbbi alanda yaraları sarmak için bir araç olarak kullanıldığı gözlemlenmektedir, bu nedenle bakteriyel enfeksiyonları engelleme ve yara iyileşme sürecini hızlandırma kabiliyeti sergiler (Muñoz-Tebar vd., 2023).

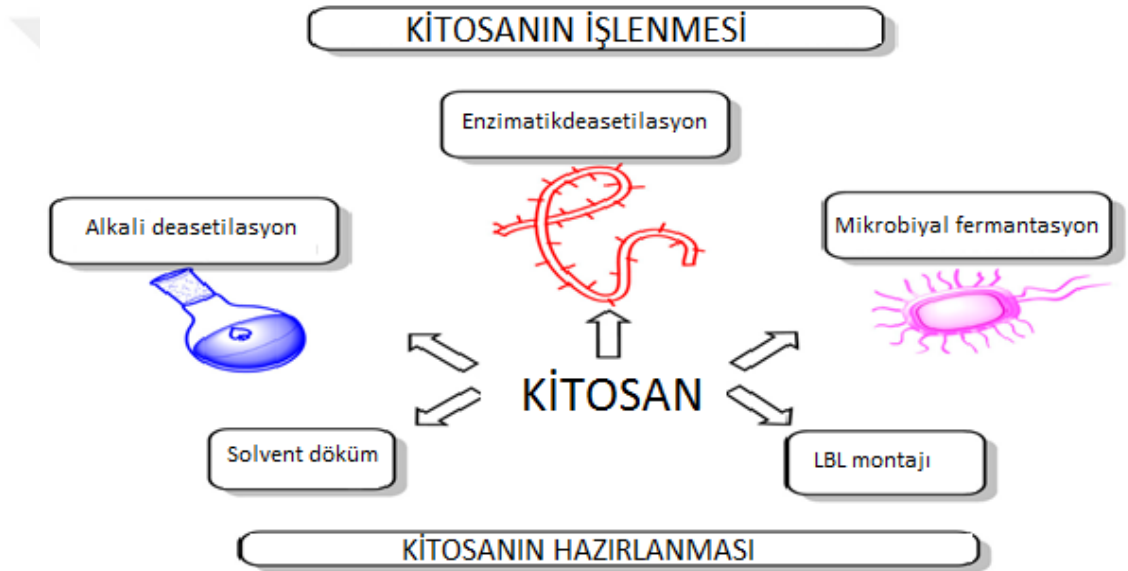
Kitosan filmleri, antibiyotiklerin veya diğer tıbbi maddelerin kontrollü salınımını kolaylaştıran ilaç dağıtım sistemleri olarak hizmet etme potansiyeline sahiptir. Kitosan filmlerin biyomedikal uygulamaları aşağıdaki gibi listelenebilir.

1. Kitosanın Kimyasal Yapısı ve Sentezi: Kitosanın moleküler bileşimine genel bakış, temel fonksiyonel grupları ve polimerizasyon derecesinin vurgulanması. Ayrıca, kitosan sentezi için kullanılan çeşitli teknikler, kitinin deasetilasyon prosesinin yanı sıra belirli enzimlerin veya mikroorganizmaların kullanımını da kapsamaktadır (Tang vd., 2023).
2. Kitosanın Antibakteriyel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları: Moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi ve çevresel faktörler dahil olmak üzere antimikrobiyal aktivitesini etkileyen çeşitli faktörlerin incelenmesi. Kitosan ayrıca hücre zarlarını parçalayarak, besin maddelerini şelatlayarak ve gen ifadesine müdahale ederek bakterileri öldürür (Tavakoli vd., 2023).
3. Antibakteriyel kitosan filmlerin sınıflandırılması: Kitosan, metal nanopartiküller, metal oksit nanopartiküller, grafen, fulleren veya türevleri ve bitki özlerinden yapılmış

filmler incelenmektedir. Khubiev vd. çeşitli filmlerin sentezini, özelliklerini ve tıbbi ve gıda uygulamalarını araştırmaktadır (Khubiev vd., 2023) (Şekil 2.5).

4. Gıda endüstrisinde kitosan bazlı filmlerin kullanımı, gıda güvenliğini ve kalitesini artırma potansiyelleri açısından araştırılmaktadır. Tavakoli vd. bu filmlerin, mikrobiyolojik kontaminasyonu önleme, oksidasyonu azaltma ve mekanik ve bariyer niteliklerini geliştirme yeteneklerini içeren çeşitli uygulamalarını araştırmıştır (Tavakoli vd., 2023).

5. Tang vd. kitosan filmin tıbbi kullanımlarını araştırmıştır. Yara pansumanlarında, ilaç dağıtımında ve doku mühendisliği iskelelerinde kullanılır (Tang vd., 2023)



Şekil 2.5. Kitosanın işlenmesi ve kitosan bazlı filmlerin hazırlanma yöntemleri (Khubiev vd., 2023).

2.8 İnsan Hücre Hattı (HEK293) ve İnsan Hücre Hatlarında Kitosanın Sitotoksisite Testi

2.8.1 İnsan hücre hattı (HEK293)

İnsan embriyonik böbreğinden elde edilen ölümsüzleştirilmiş hücreleri içeren HEK293 hücre hattı, bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhou vd., 2022). 1970'lerdeki başlangıcından bu yana, bu dirençli ve hızla genişleyen hücre hattı ve varyantları, reseptör sinyalleme çalışmalarında, kanser araştırmalarında ve büyük ölçekte protein üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde CRISPR-tabanlı genom mühendisliğine ilişkin araştırmalarda da sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Hücre hattı, soyu açıklanmayan, yalnız, sağlıklı, gönüllü olarak kürtaajla alınmış bir dişi fetüsten türetilmiştir. HEK hücre hattının ölümsüzleştirilmesi, Ad5, E1A ve E1B genlerinin genomuna dahil edilmesiyle sağlandı; bu, sırasıyla hücre döngüsü düzenlemesinin bozulmasına ve apoptozun inhibisyonuna yol açtı. Ad5'in dahil edilmesi, özellikle CMV promotörünü kapsayan plazmit vektörleri içinde barındırılan proteinler durumunda, yüksek miktarlarda rekombinant protein sentezinin elde edilmesini kolaylaştırır. Bu hücre hattının yaygın kullanımı, Malm vd. tarafından vurgulandığı gibi, rekombinant proteinlerin yüksek verimli üretim kapasitesine atfedilebilir (Malm vd., 2020).

2.8.2 HEK293 hücre morfolojisi

HEK293 hücrelerinin morfolojisi epitelyal olarak karakterize edilir. Bununla birlikte, fetal böbrekten türetilen spesifik hücresel soy, ölümsüzleştirilmesinden önce kapsamlı bir karakterizasyon eksikliği nedeniyle tanımlanamamıştır. Ad5'in hücresel genoma entegrasyonu, hem hücrenin fenotipi hem de genlerinin ekspresyonu üzerinde önemli bir etki yapmış olabilir (Gudmundsson vd., 2020).

Embriyonik böbrekler ağırlıklı olarak endotel, epitel ve fibroblast hücrelerinden oluşur. Bu nedenle HEK293 hücrelerinin bu hücresel kategorilerden birine ait olması kuvvetle muhtemeldir. Bununla birlikte, bu hücrelerin kimliğine ilişkin bazı mRNA ve gen ürünlerinin tespiti nedeniyle nöronal hücreler olabileceğini öne süren varsayımlar mevcuttur (Malm vd., 2020).

2.8.3 Kitosanın sitotoksik özellikleri

Kitosan biyolojik olarak parçalanabilir, biyouyumlu ve toksik olmayan özellikleriyle tanınmaktadır ve bu da onu ilaç ve gıda endüstrilerinde kullanım için uygun bir malzeme haline getirmektedir (Wimardhani vd., 2015). Egusa vd. yaptığı bir araştırmaya göre, kitosanın tümör hücreleri üzerinde otonom etkiler gösterdiği ve hücresel metabolizmayı bozarak apoptozu tetiklediği bulunmuştur (Egusa vd., 2015). Yara iyileşmesi ve osteogenezin desteklenmesiyle ilişkili bir bileşik olan hyaluronik asit ile benzerlik gösteren bir madde olan kitosan'ın kimyasal bileşimine önemli ölçüde odaklanılmıştır.

Kitosan mikroküreleri, mukoadezif ajanlar olarak potansiyellerini, yani canlılarda bulunan mukoza zarlarına yapışma yeteneklerini değerlendirmek amacıyla karakterizasyona tabi tutulmuştur. Aktifleştirilmiş makrofajlar ve nötrofillerde bulunan ve ayrıca karaciğer, akciğer, tiroid bezi, kalp ve mide gibi birçok organda ifade edilen kitinazlar, insan vücudundaki kitini hidrolize etme yeteneğine sahiptir (Ohno vd., 2023). Araştırmalar, insan makrofajlarındaki kitinin bozulmasının, istilacı patojenlerin kitinöz dış koruma yapılarına karşı bir bağışıklık tepkisi olarak kitosan'ın tahrip olmasına yol açtığını göstermiştir. Canlı organizmaların kitini ve kitosanı parçalama yeteneği, bunların tıbbi uygulamalarında, özellikle de canlı bir organizma içinde yeni oluşan dokunun yeniden şekillenmesinde ve değiştirilmesinde çok önemli bir rol oynar (Pradines vd., 2015; Li vd., 2021).

Kitosan konsantrasyonu ile malign ve kanserli olmayan hücrelerin davranışları arasındaki ilişkiyi incelerken iki üstel yasa gözlemlenebilir. Ek olarak Cheng vd. kitosan için çözücü olarak asetik asit kullanımının hayatta kalan fraksiyonlar üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını belirtmiştir (Cheng vd., 2016). Düşük molekül ağırlıklı kitosan filmlerinin sitotoksik etkisi konsantrasyona bağlıdır. Hücre kültürü süreci boyunca elde edilen normal ve seyrek koloniler olmak üzere iki farklı hücre kolonisi türü vardır. Yalnızca kitosan filmleri seyrek nüfuslu koloniler sergilemiştir. Ayrıca düşük kitosan konsantrasyonlarında hücre bölünmelerinin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu durumlarda hücreler, hücre bileşenlerinin "tomurcuklanma" olarak bilinen bir süreç yoluyla apoptotik cisimlere parçalanması gibi herhangi bir apoptoz belirtisi göstermezler. Bunun yerine hücreler Petri kaplarının yüzeylerinde aktif olarak çoğalır ve göç eder. Yukarıda belirtilen gözlemler, kitosan sitotoksitesinin birincil nedeninin yapışkanlık eksikliği olmadığını düşündürülebilir. Ancak daha sonraki araştırmalar, apoptoza benzeyen nekroz ve hücre ölümü örneklerini ortaya çıkarmıştır. Li vd. pozitif yüklere sahip kitosan molekülleri ile negatif yüklere sahip hücre zarları arasındaki etkileşime atfedilebilecek hücre zarının kırılmasından kaynaklanan hücre içi içerik sızıntısının oluşumunu destekleyen kanıtlar sunmuştur (Li vd., 2021). Ek olarak, nekrozun, özellikle malign hücrelerde, kitosan nanopartiküllerinin varlığında hücre ölümüne katkıda bulunan altta yatan mekanizmalardan biri olabileceği öne sürülmüştür (Pradines vd., 2015).

Bazı çalışmalar kitosan'ın normal hücelere karşı toksik olmayan veya daha az toksik yapısını vurgulamıştır (Pradines vd., 2015). Düşük kitosan konsantrasyonlarının hücre kültürleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı literatürde gösterilmiştir. Ancak yüksek konsantrasyondaki kitosanın hem kanserli hem de normal hücelere üzerinde zararlı etkiye sahip olabileceği gözlenmiştir. Sıkıca paketlenmiş membran lipidlerindeki birincil bağlanma mekanizması, ağırlıklı olarak kitosan moleküllerinin NH_3^+ grupları ile fosfolipidlerin negatif yüklü fosforil grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlere atfedilir. Cheng ve diğerlerine göre, fosfolipid içeriğinin hücresel dönüşüm ve tümörlerin ilerlemesi ile birlikte artış eğilimi gösterdiği gösterilmiştir (Cheng vd., 2016). Önceki yıllarda, meme kanseri dokusundan elde edilen örnekler üzerinde yapılan lipid testleri, kanserli olmayan komşu sağlıklı meme dokusuyla karşılaştırıldığında fosfolipit seviyelerinde kayda değer bir artış olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kanser hücrelerinin fosfolipid içeriğinin yüksek olması nedeniyle normal hücelere göre kitosan'a karşı daha fazla hassasiyet gösterdiği ileri sürülebilir. Ancak normal hücrelerin kitosan solüsyonlarına tamamen duyarsız olduğu iddia edilemez (Oberemko vd., 2019).

2.9 Kitosanın İnsan Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkileri

Kitosan nanopartikülleri, diğer nanopartikül çeşitleriyle birlikte kanser hücrelerine karşı sitotoksik özellikler gösterirken normal hücelere karşı sınırlı toksisite sergiler. Gözlemlenen fenomen, kitosan nanopartiküllerinin kanser tedavileri için bir dağıtım sistemi olarak kullanılmasına yönelik bazı çıkarımlar sunmaktadır. Zebra balığındaki nanopartiküllerin sitotoksitesi, sıvının konsantrasyonu, maruz kalma süresi ve pH'ı gibi faktörlerden etkilenebilir. Nanoparçacıklara maruz kalmanın, farklı hücre dizileri arasında çeşitli derecelerde toksisite ortaya çıkardığı bulunmuştur (Zoe vd., 2023).

Son dönemlerde birçok deneysel çalışmanın çok sayıda hücre hattı boyunca farklı parametrelerin incelenmesini, çeşitli bileşiklerin kitosan nanopartiküllerine yüklenmesini ve kitosan nanopartiküllerinin birden fazla formunun test edilmesini kapsamı dikkat çekicidir. Toksik, toksik olmayan veya belirlenemeyen dahil olmak üzere toksisite seviyelerinin sınıflandırması, toksisitenin görüldüğü testlere yönelik bağlamsal açıklamalarla birlikte atanır (Sahariah vd., 2017). Belirli bir deneyin hücresel etkileri bulurken açıkça toksik olmadığını iddia ettiği durumlarda, deney yalnızca yazarların gözlemlenen toksisitenin önemsizliğini göstermek için istatistiksel

bir analiz yapması durumunda "toksik olmayan" olarak sınıflandırılabilir. Özetle, incelenen organlar arasında gözler ve ağız en düşük düzeyde toksisite sergilemektedir. Çalışmalarda sunulan bulgular, kitosan'ın sadece gözleri tahriş etmeyen bir dağıtım sistemi olarak umut vaat ettiğini, aynı zamanda değiştirilmiş bir salım formülasyonu olarak da potansiyel gösterdiğini göstermektedir. Bu fenomenin kalp için de geçerli olduğu öngörülmektedir. Bununla birlikte, bu toksisiteyi destekleyen kanıtlar, in vivo bulgular sunan oküler çalışmaların aksine, esas olarak in vitro araştırmalardan kaynaklanmaktadır. Karaciğer, kolon, kaslar, akciğerler ve beyin durumunda, birçok organizma arasında bulgularda farklılıklar bulunmaktadır ve bu durum, toksisite kalıplarını açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir (Aranaz vd., 2018).

2.9.1 Kitosanın HEK insan hücreleri üzerindeki toksik etkileri

Modifiye edilmiş nanopartiküller alanındaki hızlandırılmış ilerlemeler, bunların özel olarak tasarlandıkları çeşitli patolojik bozuklukları ele almadaki doğal etkinliklerine atfedilebilir. Ancak yarattıkları olumsuz etkileri de göz ardı etmemek gerekir. Yürütülen bir çalışma, kurkumin (CU) içeren fosfatidilserin (PS) kaplı kitosan (CS) nanopartiküllerinin (NP'ler) etkisini araştırırken, bu nanopartiküllerin daha sonra insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK 293) üzerindeki potansiyel sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmektedir. Değerlendirmeler genellikle insan embriyonik böbreklerinden türetilen HEK 293 hücre hatları üzerinde kalorimetrik bir teknik olan MTT tahlili kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Metodolojinin temelindeki mekanizma, canlı hücrelerin MTT'yi farklı bir renk sergileyen formazana dönüştürme yeteneğinde yatmaktadır. Üretilen formazan miktarı hücre canlılığının bir göstergesi olarak hizmet etmektedir (Zheng vd., 2016).

Doğal olarak türetilmiş bir polimer olan kitosan, nanopartiküllerin (NP'ler) üretiminde kullanılmıştır. Bu NP'ler, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, azaltılmış toksisite, hazırlanma kolaylığı ve etkili ilaç dağıtım sistemleri (DDS'ler) olarak hizmet edebilme yeteneği gibi arzu edilen özelliklere sahiptir. Ayrıca kitosan'ın Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (ABD FDA) tarafından Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS) olarak sınıflandırıldığını da belirtmek gerekir. Kitosan nanopartikülleri (NP'ler), oral, oftalmik, pulmoner, nazal, mukozal, bukkal ve vajinal uygulama dahil olmak üzere çeşitli yollarla ilaç dağıtımı için kullanılmıştır. Ayrıca

gen transferi, aşı uygulaması ve ileri kanser tedavisindeki potansiyel kullanımları üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Kitosan nanopartiküllerinin (NP'ler) viral enfeksiyonlarla mücadelede yenilikçi terapötik ajanlar olarak hizmet etme potansiyeline sahip olduğunu gösteren çok sayıda bilgi bulunmaktadır (Boroumand vd., 2021).

CH bileşiği, sert ve esnek olmayan, farklı uzunluklarda ve moleköl ağırlıklarında nitrojen içeren polisakkarit zincirlerinden oluşan beyaz bir toz formunda elde edilebilir (Badawy ve Rabea, 2011). Ayrıca CH bileşiği, doğal toksik olmayan yapısı, doğal olarak bozunma kapasitesi ve kendine özgü antibakteriyel yeteneklere sahip olması nedeniyle çok çeşitli uygulamalara sahiptir. CH bileşiği biyomedikal preparatlar, genetik mühendisliği, tarım sektörü, çevre kirliliği yönetimi, gıda işleme, kağıt üretimi, fotoğrafçılık ve su arıtma gibi çeşitli alanlarda uygulama alanı bulmuştur (Cheba, 2011). Ingle ve diğerlerinin belirttiği gibi, CHNP'lerin küçük boyutu ilgi çekici arayüz ve yüzey etkilerine yol açmaktadır (Ingle vd., 2008). Birçok çalışma, karbon-hidrojen nanopartiküllerinin (CH NP'lerin) viral enfeksiyonlarla mücadelede yeni terapötik müdahaleler olarak umut vaat ettiğini öne sürmektedir.

2.9.2 Kitosan antimikrobiyal verimliliği

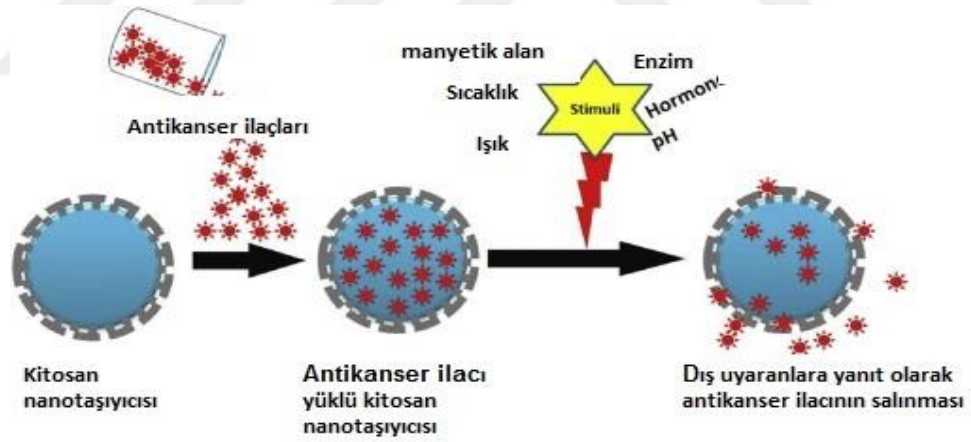
Kitosanın özellikle sulu ortamlarında belirgin olan doğal antibakteriyel özelliklere sahip olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Kitosanın antibakteriyel aktivitesi, pozitif yüklü kitosan molekülleri ile negatif yüklü bakteri zarı arasındaki etkileşimle açıklanabilir, bu da bakteri hücresinin parçalanmasına ve ardından ölümüne yol açar (Mujtaba vd., 2017). Disk difüzyon testinden elde edilen bulgulara dayanarak, kitosan/CNC kompozit filmlerin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı bakterisidal etki gösterdiği gözlenmiştir. Buna karşılık bu filmlerin *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ye karşı bakteriyostatik etki gösterdiği görülmüştür (Devlieghere vd., 2014). Değişen konsantrasyonlarda CNC içeren kitosan kompozit filmler hem insan hem de gıda patojenlerine karşı 6,31 ila 16,05 mm arasında değişen inhibisyon bölgesi değerleri sergilemiştir. Mujtaba vd. (2017), CS numunesinde *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı gözlemlenen inhibisyon bölgesinin bulunmadığını rapor etmişlerdir. Ancak incelenen diğer numuneler farklı inhibisyon bölgeleri sergilemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan

ampisiline maruz bırakıldığında değerlendirilen patojenik bakterilerin hiçbirinde inhibisyon bölgesi gözlenmemiştir. Gözlemlenen sonuç, ampisiline karşı teste tabi tutulan tüm bakterilerin direnç kazanmasına bağlanabilir. CS30CNC filmi, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'e karşı en güçlü antibakteriyel etkiyi sergilemiştir ancak *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı etkinliği nispeten daha düşüktür. CS'den oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, değişen oranlarda (%5, %10, %20 ve %30) CNC içeren diğer numuneler, antibakteriyel etkinliklerinde giderek artan bir artış sergilemiştir. Ouattara vd. keten selüloz nanokristallerinin dahil edilmesinin, kitosan kompozit filmlerin antibakteriyel etkinliğini önemli ölçüde arttırdığını belirtmektedir (Outtara vd., 2020).

2.9.3 Kanser hücrelerine karşı kitosan nano polimerleri

Nanopolimerler, öncelikle ağız yoluyla alınımı takiben gastrointestinal sistemdeki yüksek emilebilirlikleri nedeniyle, kanser tedavisinde ilaç taşıyıcıları olarak hizmet etmek için umut verici bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır (Shanmuganathan vd., 2019). Kanser terapötikleri, kapsülleme veya doğrudan bağlanma yöntemleriyle ChNP'lere dâhil edilebilir. İlaçlar tamamen kitosan çözeltisi ile birleştirilir ve daha sonra kendi kendine birleşmeye izin verilir. ChNP'ler, karışımın emülsifikasyon işlemiyle kapsüller, küreler veya miseller gibi yapılar oluşturmak için kendi kendine bir araya gelir. Kitosan nanosferi, hidrofobik ilaçları barındıracak şekilde özel olarak tasarlanmış katı bir çekirdek ile karakterize edilir. Şekil 2.6'da gösterildiği gibi, kitosan nanokürelerinin dâhil edilmesi, gelişmiş stabilite, homojen boyut ve düzenlenmiş ilaç hedefleme yetenekleri ile sonuçlanır. Bazı durumlarda ChNP'lerin hassasiyeti ve seçiciliği daha fazla arıtma yoluyla artırılabilir. Polietilen glikol (PEG), hedefleme ligandları ve pH'a duyarlı veya hipotermik polimer konjugatlarının eklenmesinin geçerli bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir (Fu vd., 2016). Kanser ilaçlarının kitosan polimerinden salınması hem dış uyaranlarla (ışık, ultrason, manyetik alan ve mekanik stres gibi) hem de iç uyaranlarla (pH veya sıcaklıktaki değişikliklerin yanı sıra biyomoleküler aktiviteler dahil) kolaylaştırılır (Key vd., 2017). Çevredeki yukarıda bahsedilen değişiklikler, sistemden bir tepki ortaya çıkarır ve kanserli hücreleri hedef alan farmasötik ajanların daha sonra salınmasına yol açar. ChNP'leri içeren kanser tedavisi sırasında kitosan, hücresel metabolizmayı ve proliferasyonu bozarak tümörün neden olduğu hücreleri spesifik olarak hedef alır ve

sonuçta tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesine yol açar. Buna ek olarak kitosanın ağız yoluyla uygulanmasının kolon kanserli bireylerde kanser öncesi lezyonların gelişimini azalttığı bulunmuştur (Shanmuganathan vd., 2019). Önceki araştırmalardan elde edilen bulgular, düşük moleküler ağırlıklı kitosan ve kito oligosakaritlerin kullanımıyla kanser hücrelerinin uyarılmasının gözlemlendiğini göstermektedir. Nanopartiküller genellikle insan antikorları tarafından ekzojen varlıklar olarak kabul edilir. Özellikle kan plazması ve lipoproteinler ve immünolojik proteinler gibi diğer doku bileşenleriyle ilişkili olarak adsorpsiyon süreci, retikuloendotelyal sistemin tanıma yeteneklerini artırır. ChNP'ler makrofajlar tarafından fagositoza uğrar ve daha sonra salındıktan sonra kan dolaşımına girer. ChNP'lerin yüzey yükü, plazma proteinlerinin adsorpsiyonunu kolaylaştırır, dolayısıyla bunların makrofajlar tarafından tespit edilmesine yardımcı olur (Fu vd., 2016). Bu süreç, ilaçların tümör dokusuna etkili bir şekilde sızmasını kolaylaştırır. Yüksek yüzey potansiyeli, belirgin polarite ve amfipatik veya hidrofilik özellikler sergileyen ChNP'ler, hücre alım ve dokularda uzun süreli tutulma için yüksek bir eğilim göstermektedir (Azhdarzadeh vd., 2016).



Şekil 2.6. Antikanser ilaçlarının kitosan nanotaşıyıcılarından dış veya iç uyarılara yanıt olarak salınması.

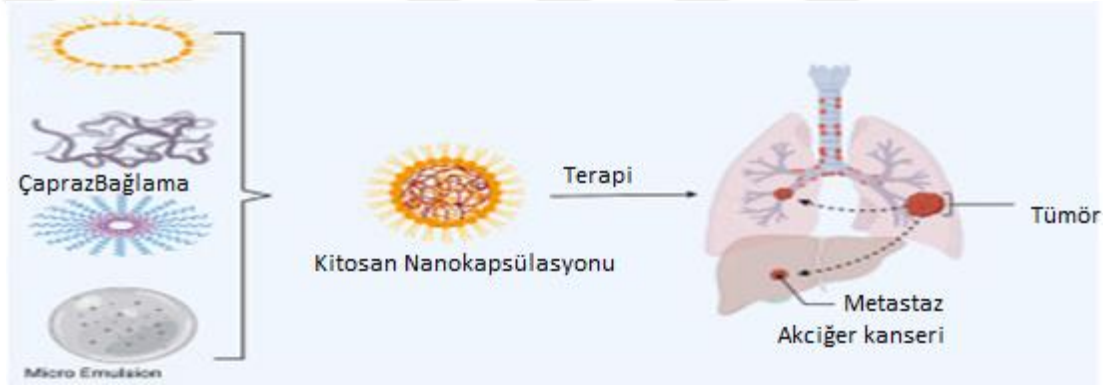
2.9.4 Kitosan bazlı nanopartiküllere dayalı uyarılara duyarlı malzemeler

Son zamanlarda, düzenlenmiş bir salım profili sergileyen hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde ilerlemeler olmuştur. Bununla birlikte, bu yöntemlerin in vivo etkinliği, kimyasal ajanların kanserli hedef hücreye erken ve yetersiz salınması gibi belirli sınırlamalar nedeniyle engellenebilir (Herdiana vd., 2021). Belirli dış veya iç uyarılara yanıt olarak ilaçların kontrollü salınımını mümkün kılmak ve isteğe bağlı

ilaç uygulamasına izin vermek için bir dizi gelişmiş ilaç dağıtım sistemi oluşturulmuştur (Akhtar vd., 2017). Kitosanın akıllı nanotaşıyıcılar olarak hizmet etme kapasitesi, polimerik matrisindeki fonksiyonel grupların varlığına atfedilebilir ve bu da onu umut verici bir seçim haline getirir. CS tabanlı hedefleme nanosistemlerinin konfigürasyonu hem pasif hem de tetiklenen hedefleme mekanizmalarının edinilmesine olanak tanıyarak endojen veya harici uyaranların eşzamanlı olarak tespit edilmesini sağlar. Herdiana vd. (2021), belirli çeşitli uyaranlara yanıt olarak kargo ilaç moleküllerini kontrollü bir şekilde salma yeteneği sergileyen, bilgisayar bilimi temelli, hedefe yönelik bir nanotaşıyıcının geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu uyaranlar arasında pH seviyeleri, redoks gradyanları, ultrason, ışık, sıcaklık, manyetik alanlar ve ikili (dual) uyaranlar yer alır.

Kitosan nanopartikülleri (ChNP)'lerin teknolojisi, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kanser hücreleri içinde ilaç birikimini arttırmayı, hücrel alımı kolaylaştırmayı, sitotoksiteyi arttırmayı ve normal hücrelere karşı seçiciliği geliştirmeyi amaçlayan ilaç geliştirme alanında çeşitli değişiklikleri kapsar (Şekil 2.7). Kitosan bazlı nanopartiküllerin kullanımının, aktif hedefleme bileşeninin yanı sıra arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkilerini de hesaba katarak istenen hedeflere etkili bir şekilde ulaşabileceğini belirtilmektedir (Thorat vd., 2014). ChNP'ler, antikanser ilaçlarını, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal reseptörü 2 (Her2) ve üçlü negatif meme eksprese edenler dahil olmak üzere çeşitli meme kanseri hücrelerine etkili bir şekilde taşıma potansiyeline sahiptir. Kitosan bazlı nanopartikül teknolojisinin kullanımı, meme kanseri hücrelerine yönelik antikanser ilaçlarının uygulanmasında arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkilerinin ve aktif hedefleme bileşeninin birleşik etkisini arttırdığını göstermektedir. Başlangıç olarak, nanopartiküllerin (NP'ler) boyutundaki azalmanın, ilacın çözünürlüğü ve stabilitesi bağlamında birçok faydalı etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak, Qian ve diğerlerinin bildirdiği gibi, NP'lerin yüzey yükünün arttığı ve bunun kan dolaşımı sırasında ilaç korumasının artmasına yol açtığı gözlemlenmiştir. (Qian vd., 2013). Dahası, NP'lerin küçültülmesi, özellikle kanser hücrelerinde ilaçların emiliminin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca biyolojik ligandın entegrasyonu, NP'lerin belirli kanser hücrelerine hedeflenmesini kolaylaştırır. Önerilen müdahalenin, kanser hücrelerinde ilaç birikimini artırması, hücrel emilimi artırması ve sitotoksik etkileri yoğunlaştırması beklenmektedir. Buna karşılık, kitosanın doğal olarak oluşan bir

polimer olarak kullanılması, akış P-gP pompalarının aktivitesini engeller. Hu ve diğerlerine göre, çeşitli fonksiyonel grupların kitosan'a dahil edilmesi, çeşitli değişikliklere izin verir (Hu vd., 2013). Kitosanın değiştirilmesi, çeşitli kanser hücrelerinin pH gradyanı, sıcaklık gradyanı ve redoks gibi benzersiz özelliklerini geliştirme potansiyeline sahiptir (Tekade vd., 2015). Kitosan, belirlenmiş bir konumdaki spesifik dış uyaranlara yanıt vererek, kanser teşhisi amacıyla bir kontrast fotoakustik ajanın seçici olarak iletilmesi ve salınması için kullanılabilen bir biyomateryaldir. Bu nedenle, kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlarının kullanımı, yukarıda belirtilen kısıtlamaların, yani yetersiz suda çözünürlük özelliklerinin ve belirli hücreleri hedefleme açısından antikanser ajanının sınırlı seçiciliğinin ele alınması için potansiyel bir çözüm olarak ortaya çıkmaktadır (Butt vd., 2016).



Şekil 2.7. Kitosan polimeri ile kapsüllenmiş antikanser ilaçlarının hazırlanmasının şematik gösterimi

2.10 Değiştirilmemiş (Modifiye Edilmemiş) Kitosanın Gıdayla İlgili Uygulamaları

Kitosan birçok gıda endüstrisindeki uygulamalarda kullanılabilmektedir. Orijinal olarak kullanılabilir veya kullanım amacına göre değiştirilerek kullanılabilir. Gıdayla ilgili birçok kullanımda, kitosan doğrudan kullanımı kimyasal yapılarında herhangi bir değişiklik yapılmadan gerçekleşir (Mujtaba vd., 2019).

Kitosanın bu özelliği, kuru kürlenen etlerin kitosanla kaplanması, duysal özelliklerin artırılması, nem düşüşlerinin azaltılması ve hafif kesme kuvveti değerlerinde antioksidan etkilerin yer aldığı bir çalışmada çemenle kaplanarak kullanılmıştır (Abdelmalek vd., 2019). Polisakkarit, β -kitin yapıları gösteren kalamarın (*Loligo vulgaris*) kaleminden alınır ve deasetilasyondan sonra kitosan haline dönüştürülür

(Abdelmalek vd., 2017; Abdou vd., 2018). Bu çalışmanın ürettiği kitosan, in vitro analizlerde görüldü ve bulgular, onu gıdalardaki alternatif olarak uygun doğal antioksidan ve antimikrobiyal bileşenler haline getiren iyi antioksidanlar ve antimikrobiyal aktiviteler göstermiştir. Ayrıca elma suyundaki berraklaştırma kabiliyeti açısından kitosan oranının yüksek olması nedeniyle, olumlu sonuçları meyve suyunun genel beslenmesini koruyan kitosanın iyi berraklaştırma kabiliyetini göstermiştir (Abdallah vd., 2017).

Mikroorganizma biyofilmleri bazı hücre dışı polimerik maddelere sabitlenmiş mikropılardan oluşur. Bu bileşim, bakterilerin şiddetli bir ortamda yaşamaya uygunluğunu arttırdığı ve son olarak antimikrobiyal maddelerin bakteriyel dirençlerini yoğunlaştırdığı için halk sağlığı açısından kritik bir risk taşımaktadır. Xie, Liao, Lei, Fang, Wang ve Zhong, gıda yoluyla doğan önemli bir patojen olan *Vibrio parahaemolyticus* için anti-biyofilm (antiquorum sensing) kitosanın etkilerini incelemişlerdir (Xie vd., 2017).

Kitosanın minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) 1,25 mg/mL'ye ulaşmaktadır. Kitosanın alt MIK'i biyofilm oluşumunu önemli ölçüde önleyebilir; metabolik aktiviteleri ve hücre dışı polisakkarit (EPS) salgılanmasını azaltır. Bulgulara göre, biyofilm büyümesinin engellenmesi, halihazırda gelişmiş ve olgunlaşmış *V. parahaemolyticus* biyofilmlerini de (%85,06) kitosanı ortadan kaldırmaktadır (Mujtaba vd., 2019).

2.10.1 Kitosan içeren doğal ekstraktlar

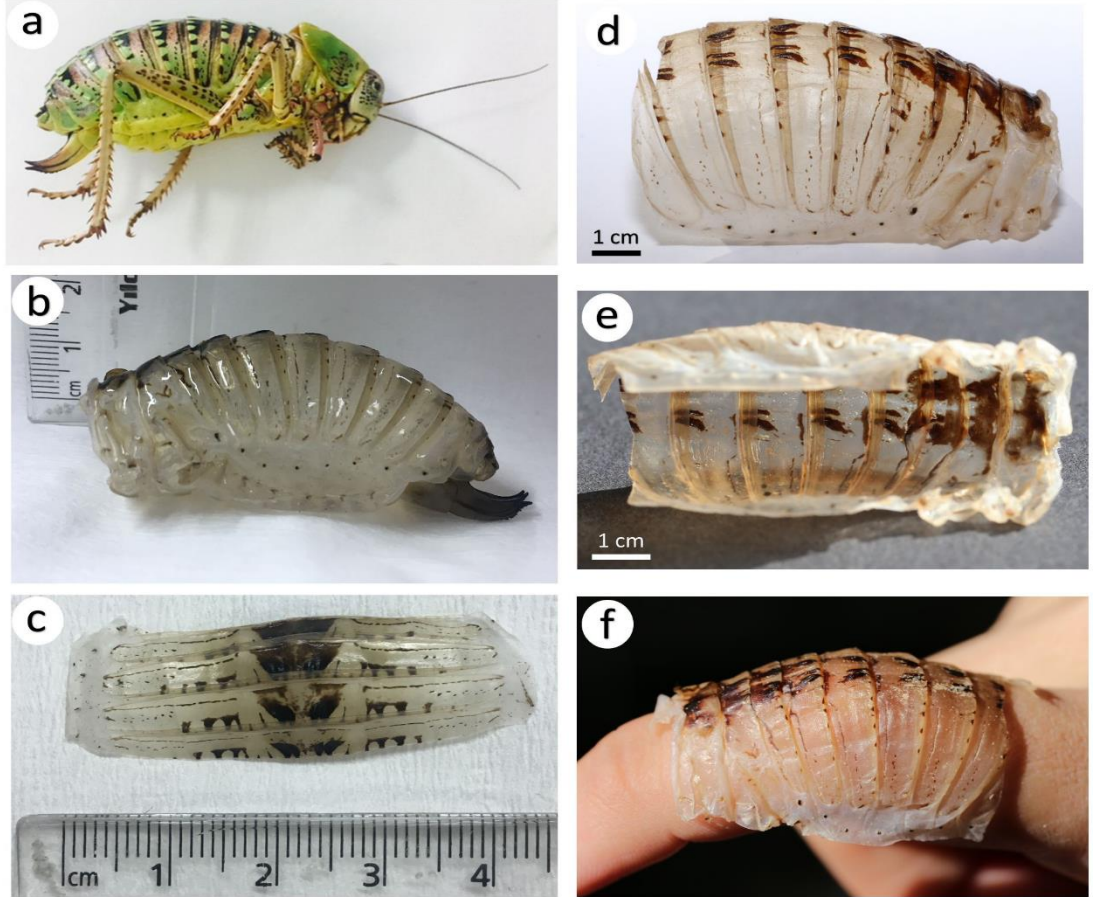
Kitosanın tek başına saf formda kullanılması dışında, fizyokimya ve biyolojinin iyileştirilmesi için bariyer (buhar, oksijen ve su geçirgenliği) olabilecek kitosan bazlı polimerik filmlerin iyileştirilmesi için çeşitli doğal ekstrakt türlerini mekanik (genç modül, çekme mukavemeti vb.) birleştirmeden birçok çalışma yapılmıştır. Souza, Fernando, Pires, Rodrigues, Lopes ve Fernandes doğal antioksidan elementlerin (beş temel madde: biberiye, zencefil, çay ağacı, adaçayı ve kekik) gibi yağlar ve altı hidro-alkolik) çeşitli etkilerini incelemişlerdir (Souza vd., 2017). Siyah çay, zencefil, adaçayı, yeşil çay, biberiye ve kenaf yaprakları gibi ekstraktların (HAE) (hem yağ hem de su bazlı dahil) kitosan matrisinde harmanlanması yoluyla kitosan kompozit filmlerine uygulandığı çalışmalar da mevcuttur (Mujtaba vd., 2019).

Kitosan matrisine her türlü katkı maddesinin eklenmesinin genel film kalınlığı üzerinde önemli bir etkisi yoktur (kompozit filmler; 52–71 μm , kitosan kontrol filmi; 67 μm) (Souza vd., 2018). Esansiyel yağların renk üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ve kontrol filmleriyle hemen hemen aynı olduğu ancak HAE ile yapılan filmlerin daha doygun ve daha az parlak olduğu görülmüştür. Takviyelerin, kitosan filminin EO geçirgenliği ve özellikle HAE'leri üzerinde önemli etkileri olmuştur (kontrol filmlerine kıyasla % 15-80 oranında azalmıştır), kitosan filmine oksidasyona karşı daha fazla koruyucu kalkan sağlayan daha fazla ışık bariyerine sahip filmlerle sonuçlanmıştır. Ortalama olarak, oluşturulan filmin gerilme mukavemeti 20 MPa'dan 26 MPa'ya yükselmiştir (Abdou vd., 2018).



3. MALZEME VE YÖNTEM

Bradyporus sp. (Orthoptera, Insecta) (Şekil 3.1a) örnekleri Aksaray, Türkiye'den toplanmıştır. Toplanan örneklerin türleri stereo mikroskopla doğrulandıktan sonra vücut parçaları olası kirlenmeye karşı %96'lık alkolde tespit edilerek bu çalışma için saklandı. Yapışan tüm kirletici parçacıklar gövdeden ayrıldı ve dış yüzeyden alkol ile durulandı.



Şekil 3.1. *Bradyporus* sp. yan profil görünümü ve kitin yapısı. a) *Bradyporus* sp. yan taraf. b) ve c) *Bradyporus* sp.'den üretilen 3D kitinin yapısı. d), e) ve f) Kitinden üretilen 3 boyutlu kitosanın yapısı.

3.1 Kitin ve Kitosan İzolasyonu

Tüm numuneler 1M HCl solüsyonunda 24 saat süreyle demineralize edildi. Numuneler pH nötr olana kadar dH₂O ile yıkandı. Daha sonra 1M NaOH çözeltisi kullanılarak 6 saat boyunca 150°C'de geri akıtıldı. Deproteinizasyon işlemi, numunelerin dH₂O ile nötr pH'a kadar yıkanması ve 60 °C'deki bir inkübatörde 4 saat süreyle kurutulmasıyla tamamlandı. Renk giderimi için kloroform, metanol ve dH₂O (1:2:4) içeren solüsyonla

1 saat inkübe edildikten sonra numuneler pH nötr olana kadar tekrar dH₂O ile yıkandı. Kitosan izolasyonu ise 50 °C'de 48 saat süreyle inkübatörde kurutulan kitin örneklerinin, 150 °C'de 6 saat %60'lık NaOH çözeltisi ilave edildikten sonra deasetilasyonu ile elde edildi (Şekil 3.1).

Literatürde, demineralizasyon adımında seyreltik hidroklorik asit HCl çözeltisi içinde gerçekleştirilir; kabukluların dış iskeletinin ana inorganik bileşimini oluşturan kalsiyum karbonat ve kalsiyum klorürün ortadan kaldırılmasını içerir. Parçalama reaksiyonu sırasında, CO₂ gazı emisyonu az çok mineral madde içeriğinin önemli bir göstergesidir. Ortaya çıkan malzemeler daha sonra filtrelenir, damıtılmış su ile nötr olarak yıkanır ve daha sonra bir gece fırında kurutulur.

Deproteinizasyon adımında proteinleri uzaklaştırmak için seyreltik sodyum hidroksit NaOH çözeltisi kullanılarak alkali işlem kullanılarak gerçekleştirilir. Karışım süzülür, fazla NaOH'yi uzaklaştırmak için birkaç kez deiyonize su ile yıkanır ve daha sonra bir gece fırında kurutulur. Elde edilen ürün, saflaştırılmış kitin olarak tanımlanır. Karides kabuğu atıklarından elde edilen proteinlerin mükemmel bir hayvan yemi kaynağı olabileceği bulunmuştur (Benhabiles vd., 2013).

Deasetilasyon adımı son adımdır ve asetil grubunun çıkarılmasıyla kitinin kitosan'a dönüştürülmesini içerir. Kitosanın hazırlanması genellikle konsantre sodyum veya potasyum hidroksit NaOH çözeltisi ile yükseltilmiş sıcaklıkta işleme tabi tutularak gerçekleştirilir. Reaksiyondan sonra, üretilen malzeme nötr hale gelinceye kadar birkaç kez damıtılmış su ile yıkanır ve daha sonra bir gece etüvde kurutulur.

3.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopu (FT-IR)

Elde edilen kitosan numunelerinin IR spektrumları 625-4000 cm⁻¹ aralığında, bir Perkin-Elmer FTIR spektrometresi ile elde edildi. Kitinlerin asetilasyon derecesi (DA), DA: [(A₁₆₅₈/A₃₄₅₀) x 100] /1,33 (Jang vd, 2004) olarak hesaplanmıştır. Kitosanların deasetilasyon derecesi (DD), DD (%) olarak hesaplanmıştır: 100- [A₁₆₅₈/A₃₄₅₀) x 115] (Felse ve Panda 1999; Kaya vd., 2014).

3.3 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Numunelerin dinamik bozunma çalışmaları (artan sıcaklığa ve zamana bağlı olarak değişecek ağırlık değişimleri, su içeriği ve kül içeriği) Hitachi EXSTAR S11 TG/DTA

7300 termal analiz cihazında eş zamanlı TGA/DTG (ısıtma hızı: 10°C dk⁻¹) ile gerçekleştirildi. Numuneler nitrojen atmosferi altında 30°C'den 700°C'ye ısıtıldı.

3.4 X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)

X-ışını toz kırınım ölçümleri, Rigaku D max 2000 sistemi (Harran Üniversitesi, HÜMEL) kullanılarak 40 kV, 30 mA ve 2θ'da 5° ila 45° tarama açısıyla elde edildi. *Bradyporus* sp.'den izole edilen kitosanın kristal indeksleri (CrI) $CrI_{110} = [(I_{110} - I_{am})/I_{110}] \times 100$ olarak hesaplandı (Rinaudo, 2006; Kaya vd., 2014). $I_{110}=2\theta \cong 20^\circ$ 'de maksimum yoğunluk, $I_{am}=2\theta \cong 13^\circ$ 'de amorf kırınım yoğunluğu dikkate alındı.

3.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Elde edilen 3D kitosan film örnekleri elektriksel olarak iletken çift taraflı yapışkan bant ile alüminyum bir tabla üzerine yapısı bozulmadan yapıştırıldıktan sonra altın kaplaması Sputter Coater (Cressingto Auto 108) ile yapıldı. Yüzey morfolojileri EVO LS 10 ZEISS taramalı elektron mikroskobu ile 5.000-40.000X büyütmede görselleştirildi.

3.6 Elementel Analiz (CHNS Analizi)

Kitosan nanoliflerinin amino grubunun DS değerleri, elemental analiz verisindeki C, S, N, O ve H içeriklerinden elemental analiz cihazı (Elementar Vario EL III, Elementar) kullanılarak hesaplandı. Yanıcı olarak oksijen gazı, taşıyıcı olarak ise helyum gazı kullanılarak, 950-1000°C sıcaklıkta ~2 mg'lık numuneler analiz edildi.

3.7 Hücre Kültürü

Amerikan Hücre Hattı Merkezi'nden (ATCC) elde edilen HEK293 (insan embriyosu böbrek) hücreleri, %10 fetal sıgır serumu (FBS: Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotik çözeltisi, %5 CO₂ içeren Dulbecco'nun Modifiye Eagle ortamı (DMEM) kültür ortamında ve 37°C'lik nemli bir inkübatörde kültürlendi. Kültür esnasında hücreler T25 ve T75 filtreli flaskların yüzeyini doldurunca, Tripsin-EDTA solüsyonu ile üzerini kaplayana kadar muamele edildi. 5 dk boyunca etüvde bekletilen adherent hücreler kaldırıldı. Ardından toplam hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dk boyunca 15 ml falkon tüpler içerisinde santrifüj edildi. Hücreler, taze DMEM mediumu ile yeniden süspanse edildikten sonra pasajlandı.

3.8 MTT Sitotoksitesite Testi

Kitosanın sitotoksitesitesi, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT; M2128, Sigma) boyası kullanılarak analiz edildi. Hücreler ($\sim 1 \times 10^4$ hücre) 96 oyuklu plakalarda farklı sürelerde (24, 48, 72 saat) ve farklı konsantrasyonlarda (0-1000 ve 1000-5000 $\mu\text{g/ml}$) kitosan ile inkübe edildikten sonra ortam uzaklaştırıldı. İnkübasyona 10 μL MTT (5 mg/mL) boya süspansiyonu ile 37°C'de 3-4 saat devam edildi. 100 μL DMSO (AppliChem, Almanya) eklendikten sonra formazan kristallerinin çözünmesi ile absorbans, CLARIOstar mikropilaka okuyucusunda 570 nm'de ölçüldü. Hücre canlılığı yüzdesi şu formül kullanılarak hesaplandı: [Hücre canlılığı % = (İşlem görmüş hücreler/İşlem görmemiş kontrol hücreleri) x 100] (Abdel-Moneim vd., 2020).

3.9 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi, GraphPad Prism 5.0 yazılımı (GraphPad Software®) kullanılarak yapıldı. Veriler, ortalama-standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel farklılıklar One-way ANOVA ve ardından Tukey post-hoc testi (%95 güven aralığı) ile değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kitin ve Kitosan İzolasyonu

Bu çalışmada toplanılan tombul çekirge türlerinin dış iskeletinden önce kitin daha sonra da başarı ile kitosan izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.1). Genellikle kitin ve kitosan iki tür ekstraksiyon işlemiyle elde edilir: kimyasal ve biyolojik yöntemler. Kimyasal yöntemler, sırasıyla kalsiyum karbonatları ve proteinleri çözmek için güçlü asitlerin ve bazların kullanımını içerir (El Knidri vd., 2018). Kimyasal yöntemlerin birçok avantajına rağmen, hızlı ekstraksiyonu, onu hala ticari olarak en yaygın kullanılan tedavi haline getirmektedir.



Şekil 4.1. *Bradyporus* sp.'den izole edilen kitosan örnekleri.

Literatürde, kitosanın kimyasal ekstraksiyon işlemi, demineralizasyon, deproteinizasyon ve deasetilasyon gibi üç ana adımı içerir. İsteğe bağlı bir adım olan renk giderme işlemi, sodyum hipoklorit, aseton ve hidrojen peroksit gibi çeşitli organik ve inorganik çözücüler kullanılarak başta Astaksantin ve beta-karoten olmak üzere pigmenti ortadan kaldırmak için eklenebilir (Kumari vd., 2015; Kumirska vd., 2010; Abdulkarim vd., 2013; Arancibia vd., 2014; Srinivasan vd., 2018).

Demineralizasyon adımıyla seyreltik hidroklorik asit HCl çözeltisi içinde gerçekleştirilir; kabukluların dış iskeletinin ana inorganik bileşimini oluşturan kalsiyum karbonat ve kalsiyum klorürün ortadan kaldırılmasını içerir. Parçalama reaksiyonu sırasında, CO₂ gazı emisyonu az çok mineral madde içeriğinin önemli bir göstergesidir. Ortaya çıkan malzemeler daha sonra filtrelenir, damıtılmış su ile nötr olarak yıkanır ve daha sonra bir gece fırında kurutulur.

Deproteinizasyon adımı proteinleri uzaklaştırmak için seyreltik sodyum hidroksit NaOH çözeltisi kullanılarak alkali işlem kullanılarak gerçekleştirilir. Karışım süzülür, fazla NaOH'yi uzaklaştırmak için birkaç kez deiyonize su ile yıkanır ve daha sonra bir gece fırında kurutulur. Elde edilen ürün, saflaştırılmış kitin olarak tanımlanır. Karides kabuğu atıklarından elde edilen proteinlerin mükemmel bir hayvan yemi kaynağı olabileceği bulunmuştur (Benhabiles vd., 2013).

Deasetilasyon adımı son adımdır ve asetil grubunun çıkarılmasıyla kitinin kitosan'a dönüştürülmesini içerir. Kitosanın hazırlanması genellikle konsantre sodyum veya potasyum hidroksit NaOH çözeltisi ile yükseltilmiş sıcaklıkta işleme tabi tutularak gerçekleştirilir. Reaksiyondan sonra, üretilen malzeme nötr hale gelinceye kadar birkaç kez damıtılmış su ile yıkanır ve daha sonra bir gece etüvde kurutulur.

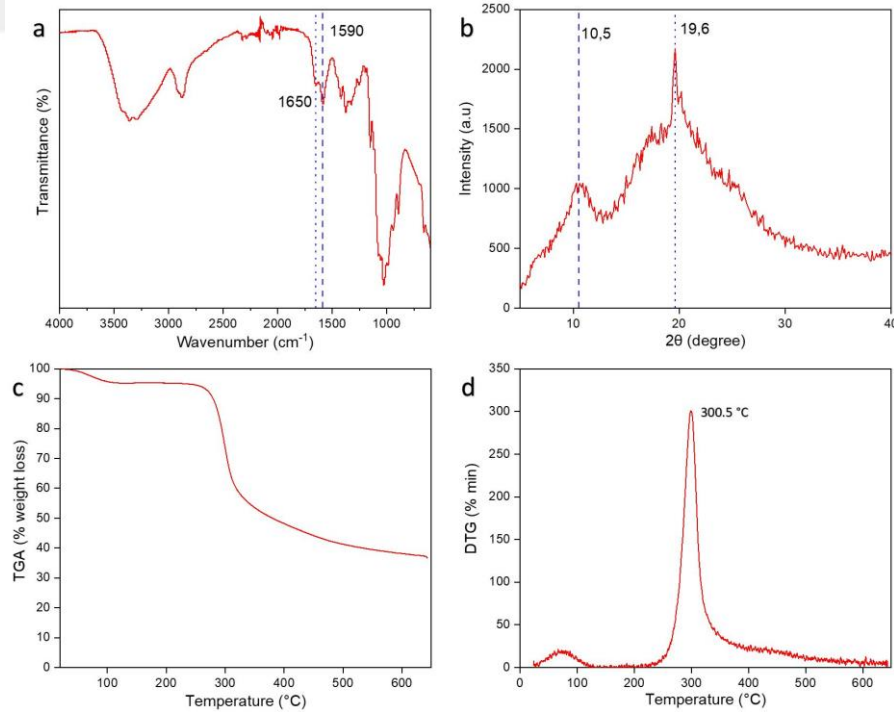
Çevreye son derece zararlı olan asidik ve alkali işlemlerden kaçınmak için biyolojik tedaviler, kitin ve kitosanın ekstraksiyonuna alternatif bir yol sunar. Laktik asit üreten bakteriler ve bakterilerden proteazlar, sırasıyla demineralizasyon ve deproteinizasyon adımları için kullanılmıştır. Kitin deasetilasyonu, kitindeasetilaz ile enzimatik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilirse daha çevreci ve biyolojik bir yaklaşım sergilenmiş olur.

4.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopu (FT-IR)

FT-IR spektroskopisi genellikle organik numunelerin tanımlanmasında kullanılır (Dukor vd., 1999; Story vd., 1999). Kitinin alfa, beta ve gama olmak üzere üç kristal formu vardır ancak gama formu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Jang vd., 2004). FT-IR spektrumları, amid I bandının varlığı veya yokluğunu kullanarak α -formu ile β -formu arasında ayırım yapılmasına yardımcı olur (Mohan vd., 2020). α -formunda amid I bandı yaklaşık 1650 ve 1620 cm^{-1} 'de iki banda ayrılırken (Wang vd., 2013), β -formunda ise 1656 cm^{-1} 'de sadece bir amid I bandı bulunmaktadır (1 bölge). Beta kitinler kalamar kalemlerinde bulunur (Jang vd., 2004), alfa kitin ise Arthropoda takımında bulunur (Al Sagheer vd., 2009; Sajomsang ve Gonil, 2010). *Holotrichia parallela* (Liu vd., 2012), *Zophobas morio* (Shin vd., 2019), *Periplaneta americana* (Kaya vd., 2015), *Hermetia illucens* (Waško vd., 2016) ve *Apis mellifera* (Kaya vd., 2015), amid I bandı sırasıyla 1654 cm^{-1} , 1663 ve 1618 cm^{-1} , 1647 ve 1654 cm^{-1} , 1654 ve 1621 cm^{-1} , 1654, 1617 ve 1550 cm^{-1} ve 1656 cm^{-1} 'de bölünmüştür. Squilla,

yengeç, konus kabuğu, kril, ıstakoz ve karidesten elde edilen kitosanın amid I bandının FT-IR spektrumları sırasıyla 1643 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , 1628 cm^{-1} 'e ve 1667 cm^{-1} 'e bölünmüştür (Anand vd., 2014; Mohan vd., 2019; Sayari vd., 2016; Srinivasan vd., 2018; Wang vd., 2013). Bu sonuçlar kabuklu hayvan kabuk atıklarından ve böceklerden izole edilen kitin ve kitosanın α -formunda olduğunu göstermektedir.

FTIR, simetrik COO^- toplama genişleyen titreşime göre $-\text{NH}_2$ grubuna karşılık gelen farklı bantlara dayanarak, Varma ve Vasudevan'a benzer şekilde kitosanı karakterize etmek için kullanılmıştır (Varma ve Vasudevan, 2020). Çalışmamızda kitosan FTIR spektrumları 4000 ile 400 cm^{-1} frekans aralığında karakteristik bantlar göstermiştir. Bu bantlar 552,32 cm^{-1} (düzlem dışı bükülme NH, düzlem dışı bükülme C–O) ve 892,29 cm^{-1} (düzlem dışı bükülme NH) değerlerinde düzlem dışı bükülmeler olarak görünürken; 1149,07 cm^{-1} (C–O–C bağı), 2875,83 cm^{-1} (CH_2 bağı) ve 3361,29 cm^{-1} 'de ($-\text{OH}$ bağı) keskin pikler halinde kendini gösterdi. Ayrıca amid C=O bağının titreşim modu 1586,30 cm^{-1} 'de belirlendi (Şekil 4.2a). Literatürde kitosan için; 1640 cm^{-1} (Amid I, C = O) (Chatterjee ve diğerleri 2005), 1590 cm^{-1} (Amid II, NH_2) (Peng vd., 1994) pikler karakteristik olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. Kitosan spektrum analiz sonuçları. a. *Bradyporus* sp.'den hazırlanan kitosan FTIR ve TGA/DTG spektrumları. b. XRD kırınım analizinden sonra verilerle çizilmiş yoğunluk/ $2\theta(^{\circ})$ grafiği. c. *Bradyporus* sp.'den hazırlanan kitosanın TGA spektrumları. d. Veri DTG analiziyle çizilmiş DTG (%min)/Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) grafiği.

4.3 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Bradyporus sp.'nin gövde kısmından elde edilen kitosan film örneklerinin üç boyutlu yapısı bozulmadan TGA ile termal stabilitesi analiz edildi. 30°C - 650°C sıcaklıkları arasında sıcaklık her 1 dakikada 10°C artırılarak numunelerin ısıl dayanıklılığı ile yapıdaki su ve kül içeriği test edildi.

Birinci fazdaki kütle kaybı (30 ile 73,3°C arası) suyun buharlaştığını göstermektedir. Kitosan membranlarının su içeriği %4,7 olarak belirlendi. Bu kayıp, toplam nem içeriğinin polimerik yapıdan buharlaşmasıyla ilgilidir (Şekil 4.2c). Bu bozulma, su moleküllerinin kaybına bağlanabilir çünkü kitin ve kitosan yapıları suya ve kurşun dehidrasyonuna karşı güçlü bir afiniteye sahiptir.

İkinci aşamadaki kütle kaybı (100 ila 599°C arası), karbonhidratların ve diğer moleküllerin bozunmasını gösterir. İkinci bozunma, kitin ve kitosanın termal ayrışmasına aittir. Hazırlanan kitin ve kitosan benzer termal bozunma eğrileri eğilimi gösterse de kitin, kitosanla karşılaştırıldığında daha büyük ayrışma hızına sahiptir (Abdou vd., 2008). Bu bozunma aralığında çalışmamızda kitosanın ağırlık kaybı %56,3 olarak kaydedildi. Kitosanın bozulmamış fraksiyonu (kül içeriği olarak bilinir) %38,1 olarak kaydedildi. Kitosanın maksimum bozunma sıcaklığı (DTGmax) 300,5°C olarak belirlendi (Şekil 4.2d).

Yenilebilir böceklerden elde edilen kitin ve kitosan içeriklerinin DTGmax değerleri sırasıyla kitin için 328,7°C, yemek kurdu ve ticari kitosan için 314,7°C ve 301,8°C olmuştur (da Silva Lucas vd., 2021). Önceki çalışmalarda yedi çekirge türünden (Orthoptera türü) izole edilen kitinin DTGmax değerlerinin 381-385°C aralığında olduğu gösterilmiştir (Kaya vd., 2015). Altı farklı suda yaşayan omurgasızdan (*Leptinotarsa decemlineata* türü) elde edilen kitinin DTGmax aralığı (350-393°C), kitosanın DTGmax aralığı (208-308°C)'dir (Kaya vd., 2014).

4.4 X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)

Kitosan örneklerinin benzersiz atom dizilerine dayanarak kristallik yapısını belirlemek üzere XRD analizi yapıldı. Bu analiz ile tombul çekirgelerden üretilen kitosan örneklerinin pik değerleri belirlendi. Kitosanın XRD analizi sonucunda $2\theta=10.2-10.9$ ve $2\theta=19.5-19.7$ aralığında iki pik tespit edilmiştir (Şekil 4.2b). XRD grafiğinde ilk

tepe noktası ikinci tepe noktasından daha zayıftır. Bu zirveler $2\theta=10.9$ ve $2\theta=19.6$ 'da maksimuma ulaşmıştır. Literatüre bakıldığında, çoğu XRD kitosan modelinin genellikle $2\theta=10$ ve $2\theta=20$ civarında olmak üzere iki karakteristik piki vardır (Yen vd., 2009). Bu tepe noktaları sıklıkla alfa kitin için referans tepe noktaları olarak kullanılır ve ticari kitosanın tepe noktaları ile benzerlik göstermektedir (Abdou vd., 2008; Ramasamy vd., 2014; Kaya vd., 2014). Çalışmamızda elde edilen XRD sonuçları literatürle uyumludur. Ayrıca çalışmamızdan elde edilen kitosanın artan bir 2θ noktasında üçüncü bir pik noktasını vermemesi, alfa kitinin zayıf bir yansımasının olmamasının göstergesidir ve bu durum kitinin kısmi bir deasetilasyonun olmaması ile ilişkilendirilebilir.

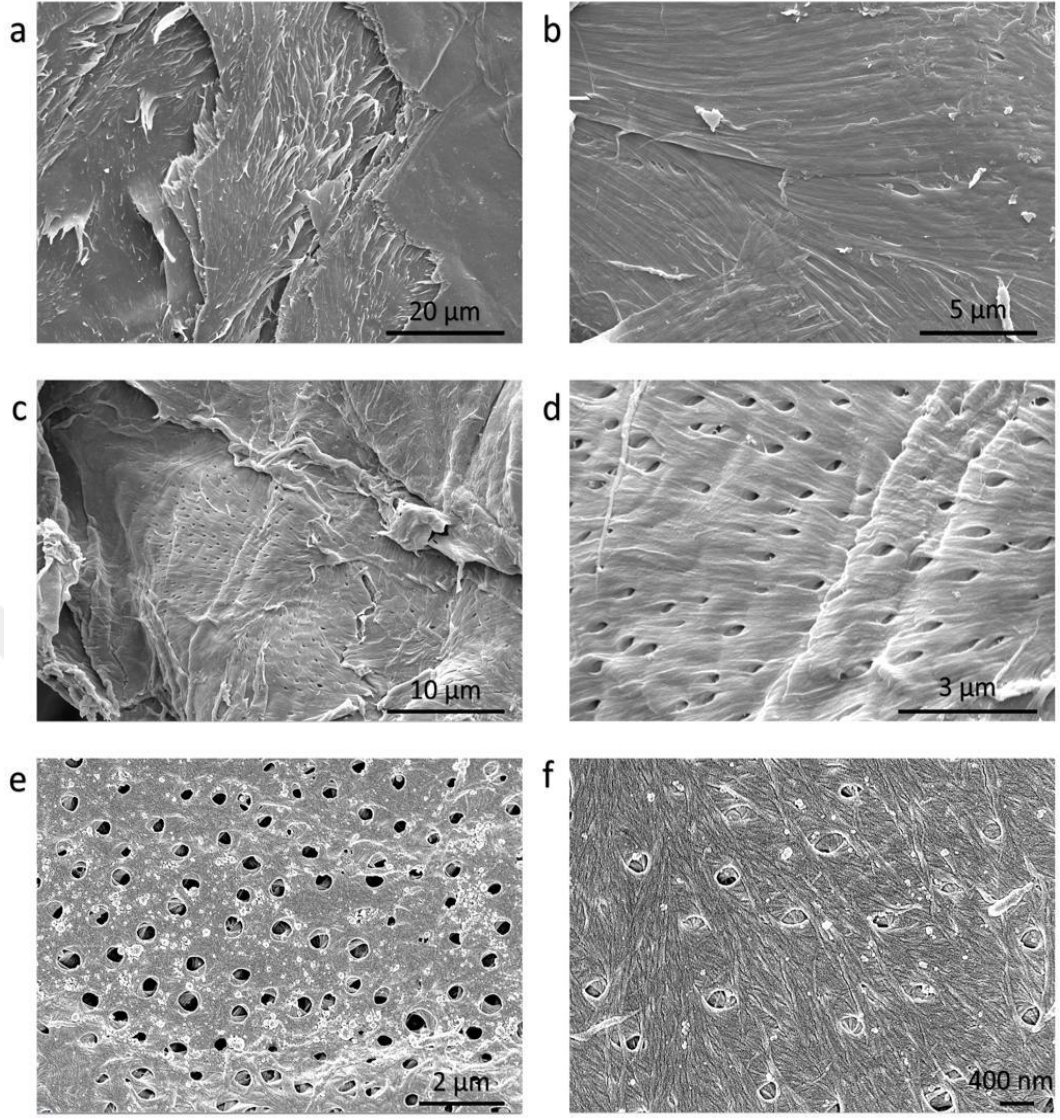
Bradyporus sp.'den izole edilen kitosanın kristal indeksleri (CrI), $I_{110}=2\theta\cong 20^\circ$ 'de maksimum yoğunluk, $I_{am}=2\theta\cong 11^\circ$ 'de amorf kırınım yoğunluğu dikkate alınarak aşağıdaki Denklem 4.1 (Rinaudo, 2006; Kaya vd., 2014) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$CrI_{110} = [(I_{110} - I_{am}) / I_{110}] \times 100 \quad (4.1)$$

Kitosanın CrI indeksi %45 olarak bulunmuştur.

4.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Farklı organizmalardan elde edilen kitin ve kitosan içeriklerinin yüzey morfolojileri farklılık gösterebilmektedir. SEM görüntülerine göre yüzey morfolojileri sadece mikrofibriler yapıda olabileceği gibi mikrofibriler yapıda ve gözenekli/gözeneksiz formda da olabilir (Kaya vd., 2014). Çalışmamızda elde edilen kitosan film örneklerinin yüzey morfolojileri farklı büyütme ölçeklerinde (5.000-40.000X) SEM analizi ile detaylı olarak incelenmiştir. Bazı bölgelerde pürüzlü, düzensiz membran çatlakları, düzensiz desenli, gözeneksiz ve kitosan nanopartikülleri içermeyen pürüzsüz yüzeyler de tespit edildi. Öte yandan bazı bölgelerde (yüksek büyütme gücünde) düzensiz mikro yapı ve çok küçük gözeneklerin varlığı da görülmektedir. Elde edilen kitosan içeriği *Bradyporus* sp.'nin vücut bölgesinden alındığından homojen olmayan yüzey morfolojileri tespit edilebilmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. SEM analizi sonucunda elde edilen görüntüler. a. 5.000X büyütme gücü ile elde edilen görüntü, b. 20.000X büyütme gücü ile elde edilen görüntüler, c. 20.000X büyütme gücü ile elde edilen görüntüler, d. 40.000X büyütme gücüyle elde edilen görüntüler, e. 40.000X büyütme gücü ile elde edilen görüntüler, f. 40.000X büyütme gücü ile elde edilen görüntüler.

4.6 Elementel Analiz (CHNS Analizi)

Elde edilen kitosanın yapısındaki karbon (C), kükürt (S), nitrojen (N), hidrojen (H) elementel yüzdelerinin yüksek hassasiyetle belirlenmesi için element analizi kullanıldı. Kitosanın içeriğinde kükürt bulunmazken ~%41,10 karbon, ~%7,46 nitrojen ve ~%6,67 hidrojen tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Kitosanın içeriğindeki ~%7.46 nitrojen literatürle tutarlıdır (Muzzareli vd., 1972) ve kitinden daha fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Kitosan elementel analiz sonuçları.

Polimer	%N	%C	%H	%S
Kitosan	7.469594479	41.10246277	6.670635223	0

Literatürde, *Portunus pelagicus*'dan elde edilen kitin ve kitosan ile ilgili yapılan bir elementel analiz sonucunda kitin ve kitosan karbon yüzdeleri sırası ile %77,67 ve %73,93 olarak bulunmuştur (Ahyat vd., 2017). Karbon yüzdesinin kitosanda azalması ve çalışmamızda ise daha az oranda bulunması kitinin yapısındaki asetil gruplarının uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Kaya vd. saf kitinin N yüzdesini %6.9 olarak bulmuşlardır (Kaya vd., 2014). Çalışmamızda bulunan N oranı %7.4 olup, bu çalışmaya yakın bir değere sahiptir. N değerinin nispeten yüksek olması örneklerde protein kalıntısının varlığına işaret edebilir.

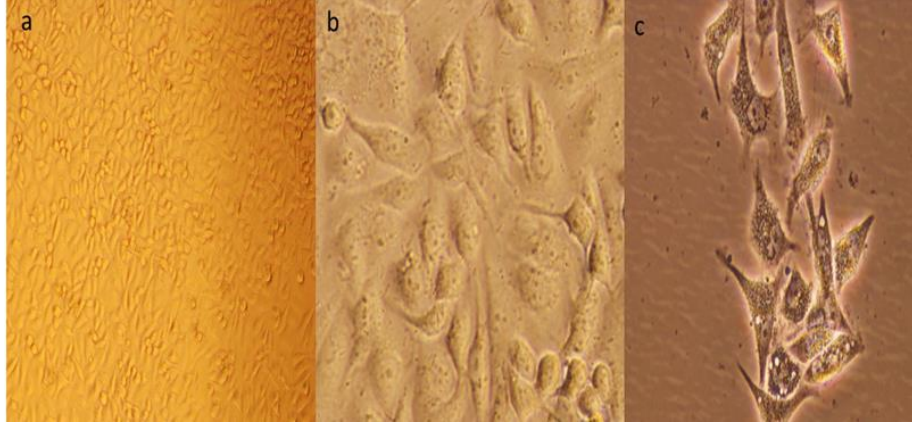
Ayrıca elementel analizde C ve N yüzdelerini belirlemek deasetilasyon düzeyi (DD) yüzdelerini belirlemek açısından değerlidir. DD ise aşağıdaki Denklem 4.2 (Younes vd., 2014) kullanılarak hesaplanabilir.

$$DD\% = [(6.857 - C / N) / 1.7143] \times 100 \quad (4.2)$$

Yukarıda verilen formüle göre çalışmamızdaki DD oranı %79 olarak bulunmuştur. Bu durum izole edilen kitin kitinin kısmen olmamakla birlikte başarılı bir şekilde deasetile olduğunun göstergesidir.

4.7 Hücre Kültürü

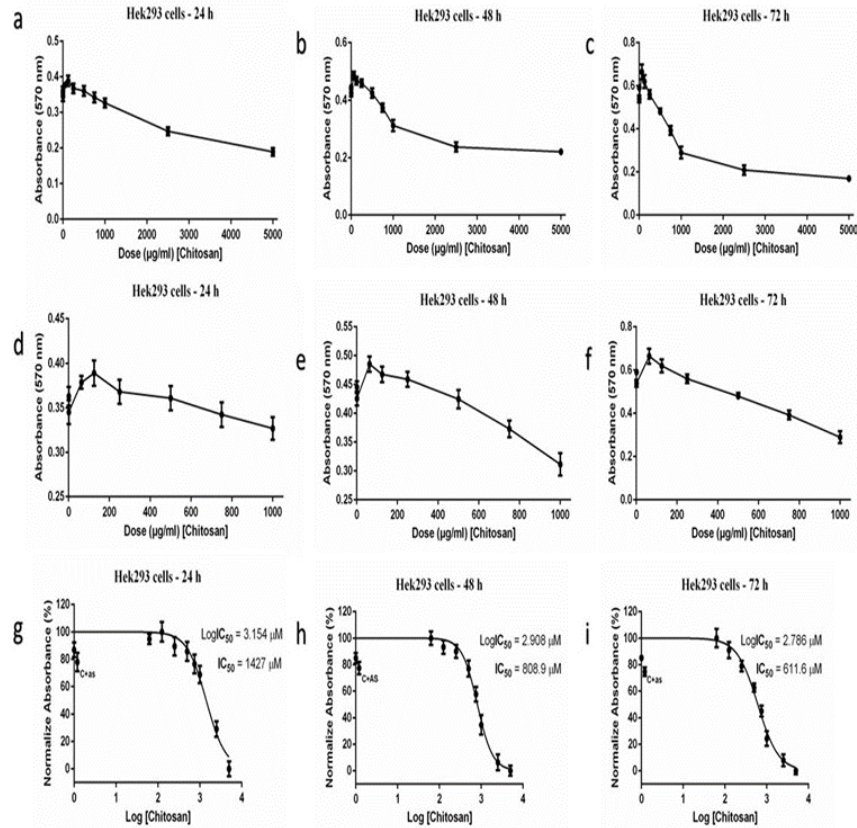
Çalışmanın bir sonraki adımında kullanılacak olan HEK293 hücre hattı, %10 fetal sıgır serumu (FBS: Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotik çözeltisi, %5 CO₂ içeren Dulbecco'nun Modifiye Eagle ortamı (DMEM) kültür ortamında ve 37°C'lik nemli bir inkübatörde kültürlendi. Kültür sonucunda hücrelerin morfolojileri invert mikroskop ile kayıt altına alındı. HEK293 hücre hattı başarılı bir şekilde ve kontaminasyona uğramadan kültüre edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. HEK293 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri. a. 4x büyütme gücündeki görüntü, b. 10x büyütme gücündeki görüntü c. 20x büyütme gücündeki görüntü.

4.8 MTT Sitotoksosite Testi

Karakterizasyonu tamamlanan kitosan'ın HEK293 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla optimal doz (0-1000 $\mu\text{g/ml}$) ve aşırı doz (1000-5000 $\mu\text{g/ml}$) aralığında farklı konsantrasyonlarda MTT testi yapıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. HEK-293 hücrelerinin absorbans (570 nm) ve normalize absorbans (%) grafiği. a., b., c.) aşırı doz aralığı; d., e., f.) optimal doz aralığı; g., h., i.) 0-5000 $\mu\text{g/ml}$ doz aralığında IC₅₀ değerleri.

Optimum doz aralığında 24 saatte hiçbir IC50 inhibisyonu gözlemlenmezken (Şekil 4.5d), aşırı doz aralığında (1427 μ M, Şekil 4.5g) 1000-2000 μ g/ml'lik bir başlangıç IC50 değeri tespit edildi. IC50 değerleri sırasıyla 48. ve 72. saatlerde optimal doz aralıklarında (800-1000 μ g/ml, 808,9 μ M) ve (600-800 μ g/ml, 611,6 μ M) belirlendi (Şekil 4.5h ve Şekil 4.5i).



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Böcekler erişim kolaylığı nedeniyle iyi bir kitin ve kitosan kaynağıdır. Ancak her böcek türünün kitin ve kitosan içerikleri birbirinden oldukça farklıdır. Genellikle kitosanın kimyasal ekstraksiyon işlemi, demineralizasyon, deproteinizasyon ve deasetilasyon gibi üç ana adımı içermektedir. Bu tez çalışmasında ele alınan *Bradyporus* cinsi gövde tombul çekirge türlerinden kitosan elde edilmiş ve farklı yöntemlerle bu kitosan karakterize edilmiştir. Organik kitosan ekstraktlarının tanımlanmasında kullanılan FTIR, simetrik COO- toplama genişleyen titreşime göre -NH₂ grubuna karşılık gelen farklı bantlara dayanarak, literatürle uyumlu şekilde kitosanı karakterize etmek için kullanılmıştır (Varma ve Vasudevan, 2020). Çalışmamızda kitosan FTIR spektrumları 4000 ile 400 cm⁻¹ frekans aralığında karakteristik bantlar göstermiştir (552,32 cm⁻¹, 892,29 cm⁻¹, 1149,07 cm⁻¹, 2875,83 cm⁻¹, 3361,29 cm⁻¹). Ayrıca amid C=O bağının titreşim modu 1586,30 cm⁻¹'de belirlenmiştir.

TGA analizi ile 30°C - 650 °C sıcaklıkları arasında sıcaklık her 1 dakikada 10 °C artırılarak numunelerin ısıl dayanıklılığı test edilmiştir. Birinci fazdaki kütle kaybı (30 ile 73,3°C arası) suyun buharlaştığını göstermekle birlikte, kitosan su içeriği %4,7 olarak tespit edilmiştir. Bu bozulma, kitin ve kitosan yapılarının suya ve kurşun dehidrasyonuna karşı güçlü bir afiniteye sahip olduğu ile ilişkilendirilmiştir. Kitosanın maksimum bozunma sıcaklığı (DTG_{max}) 300,5 °C olarak tespit edilmiştir. Elde edilen DTG_{max} değeri, literatürdeki diğer böcek ve çekirge türlerinin DTG_{max} değerlerine yakındır.

Kitosan örneklerinin (CrI indeksi=%45) kristalografik yapısını belirlemek üzere yapılan XRD analizinde, 2θ=10.2-10.9 ve 2θ=19.5-19.7 aralığında iki pik tespit edilmiştir. Bu durum, kitosanın literatürdeki 2θ=10 ve 20 değerlerindeki iki karakteristik piki ile yakın değerlerdedir. Ayrıca, artan bir 2θ noktasında üçüncü bir pik noktasını vermemesi, alfa kitinin zayıf bir yansımalarının olmaması ile ilişkilendirilmiştir.

Kitosan örneklerinin SEM analizinde, bazı bölgelerde pürüzlü, düzensiz membran çatlakları, düzensiz desenli, gözeneksiz ve kitosan nanopartikülleri içermeyen pürüzsüz yüzeyler tespit edilmiştir. Kitosan örneklerinin yüzey morfolojileri sadece

mikrofibriler yapıda olabileceği gibi mikrofibriler yapıda ve gözenekli/gözeneksiz formda da olabilir. Ayrıca elemental analiz sonrasında da, kitosan ekstraktı içeriğinde kükürt bulunmazken ~%41,10 karbon, ~%7,46 nitrojen ve ~%6,67 hidrojen tespit edilmiştir Bu oranlar literatür ile uyumlu bulunmuş olup, N değerinin nispeten yüksek olması örneklerde protein kalıntısının varlığına işaret edebilir.

MTT analizine dayanarak, elde edilen kitosan optimal dozlarda 24 saatte sitotoksik etki göstermemiştir. Bu açıdan bakıldığında elde edilen kitosan polimerinin doz aşımı aralığına kadar sitotoksik olmadığını, biyouyumlu olduğunu ve biyomedikal alanda kullanım potansiyeline sahip olduğunu söylemek mümkündür. Sonuç olarak, kitosan yapıları karakterize edilen bu tombul çekirge türü, kontrollü bir şekilde kültüre edilebilir ve çeşitli teknolojik ve endüstriyel amaçlar için potansiyel bir kitin ve kitosan kaynağı olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abdallah, M. R., Mohmaed, M. A., Mohamed, H. M. ve Emara, M. M., 2017. Improving the sensory, physicochemical and microbiological quality of pastirma (A traditional dry cured meat product) using chitosan coating, *LWT-Food Science and Technology*, 86, 247-253.
- Abdelmalek, A., Sila, A., Haddar, A. ve Bougatef, M. A., 2017. Ayadi, β -Chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice, *International journal of biological macromolecules*, 104, 953-962.
- Abdou, E. S., Nagy, K. S. ve Elsabee, M. Z., 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresource technology*, 99, 5, 1359-1367.
- Abdou, K. S., Nagy, M. Z. ve Elsabee, M. Z., 2018. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresource Technology*, 99, 5, 1359-1367.
- Abdulkarim, A., Isa, M. T., Abdulsalam, S., Muhammad, A. J. ve Ameh, A. O., 2013. Extraction and characterisation of chitin and chitosan from mussel Shell, *Extraction*, 3, 2, 108-114.
- Acosta, E. S., Anchez, L., Calderon, M., Cordoba-Diaz, D., Cordoba-Diaz, S., Dom, A. ve Heras, A., 2015. Physical stability studies of semi-solid formulations from natural compounds loaded with chitosan microspheres, *Marine Drugs*, 13, 9, 5901–5919.
- Ahyat, N. M., Mohamad, F., Ahmad, A. ve Azmi, A. A., 2017. Chitin and chitosan extraction from *Portunus pelagicus*, *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 21, 4, 770-777.
- Ai, H., Wang, F., Yang, Q., Zhu, F. ve Lei, C., 2018. Preparation and biological activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica*, *Carbohydrate polymers*, 72, 3, 419-423.
- Akhtar, S. ve Benter, I., 2017. Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity, *Advanced drug delivery reviews*, 59, 2–3, 164–182.
- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S. ve Elsabee, M. Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydrate polymers*, 77, 2, 410-419.
- Al-Rooqi, M. M., Hassan, M. M., Moussa, Z., Obaid, R. J., Suman, N. H., Wagner, M. H., Sameer, S. A. N. ve Ahmed, S. A., 2022. Advancement of chitin and chitosan as promising biomaterials, *Journal of Saudi Chemical Society*, 101561.

- Anand, M., Kalaivani, R., Maruthupandy, M., Kumaraguru, A. K. ve Suresh, S., 2014. Extraction and characterization of chitosan from marine crab and squilla collected from the Gulf of Mannar Region, South India. *Journal of chitin and chitosan science*, 2, 4, 280-287.
- Aranaz, I., Acosta, N., Civera, C., Elorza, B., Mingo, J., Castro, C., Gandía, M.L.L. ve Heras Caballero, A., 2018. Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives, *Polymers* 10, 2, 213.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P. ve Gómez-Guillén, M. C., 2014. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp, (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*, 35, 710-717.
- Ardean, C., Davidescu, C. M., Nemeş, N. S., Negrea, A., Ciopec, M., Duteanu, N., Negrea, P., Duda-Seiman, D. ve Musta, V., 2021. Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 14, 7449.
- Azhdarzadeh, F., Atyabi, A. A., Saei, B.S., Varnamkhasti, Y., Omid, M., Fateh, M., Ghavami, S., Shanehsazzadeh, R. ve Dinarvand, R. 2016. Theranostic MUC-1 aptamer targeted gold coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging and photothermal therapy of colon cancer, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 143, 224–232.
- Badawy, M. E. ve Rabea, E. I., 2011. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-29.
- Bao, X., Bové, M. ve Coenye, T., 2022. Organic acids and their salts potentiate the activity of selected antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown in a synthetic cystic fibrosis sputum medium, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 66, 1: e01875-21.
- Bastiaens, L., Soetemans, L., D'Hondt, E. ve Elst, K., 2019. Sources of chitin and chitosan and their isolation, *Chitin and chitosan: Properties and applications*, 1-34.
- Benhabiles, M. S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M. F. ve Mameri, N., 2013. Protein recovery by ultrafiltration during isolation of chitin from shrimp shells *Parapenaeus longirostris*, *Food Hydrocolloids*, 32, 1, 28-34.
- Boroda, A., Privar, Y., Maiorova, M., Beleneva, I., Eliseikina, M., Skatova, A., Marinin, D. ve Bratskaya, S., 2022. Chitosan versus Carboxymethyl Chitosan Cryogels: Bacterial Colonization, Human Embryonic Kidney 293T Cell Culturing and Co-Culturing, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 20, 12276.
- Boroumand, H., Badie, F., Mazaheri, S., Seyedi, Z. S., Nahand, J. S., Nejati, M., Baghi HB, Abbasi-Kolli, M., Badehnoosh, B., Ghandali, M., Hamblin, MR. ve Mirzaei, H., 2021. Chitosan-based nanoparticles against viral infections, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 643953.

- Bosch, A., Bott, J., Warfving, N. ve Nolde, J., 2023. Investigation on the skin penetration of synthetic amorphous silica (SAS) used in Cosmetic Products, *Toxicology Letters*.
- Butt, A. M., Amin, M. C. I. M., Katas, H., Abdul Murad, N. A., Jamal, R. ve Kesharwani, P., 2016. Doxorubicin and siRNA codelivery via chitosan-coated pH-responsive mixed micellar polyplexes for enhanced cancer therapy in multidrug-resistant tumors, *Molecular pharmaceutics*, 13, 12, 4179-4190.
- Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T. ve Ngawhirunpat, T., 2012. In vitro antioxidant activity of chitosan aqueous solution: effect of salt form, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11, 2, 235-242.
- Cheba, B. A., 2011. Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications, *Global Journal Biotechnol, Biochem.* 6, 149–153
- Cheng, M., Bhujwalla, Z. M. ve Glunde, K., 2016. Targeting phospholipid metabolism in Cancer, *Frontiers in Oncology*, 6, 266.
- da Silva Lucas, A. J., Oreste, E. Q., Costa, H. L. G., López, H. M., Saad, C. D. M. ve Prentice, C., 2021. Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects, *Food Chemistry*, 343, 128550.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. ve Debevere, J., 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food microbiology*, 21, 6, 703-714.
- Duan, J. J. ve Larson, K. M. 2019. Effects of chilling on diapause development and reproductive fitness of two congeneric species of encyrtid parasitoids (Hymenoptera: Encyrtidae) of the emerald ash borer, *Biological Control*, 134:163-169
- Dukor, R. K., Story, G. M. ve Marcott, C., 1999. A method for analysis of clinical tissue samples using FTIR microspectroscopic imaging. In *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions: 8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules*, 29 August–2 September 1999, Enschede, The Netherlands, 471-472. Springer Netherlands.
- Egusa, M., Iwamoto, R., Izawa, H., Morimoto, M., Saimoto, H., Kaminaka, H. ve Ifuku, S., 2015. Characterization of chitosan nanofiber sheets for antifungal application, *International Journal Mol Science*, 16, 11, 26202–26210.
- Ehrlich, H., Kaluzhnaya, O. V., Tsurkan, M. V., Ereskovsky, A., Tabachnick, K. R., Ilan, M., Stelling, A., Galli, R., Petrova, O.V., Nekipelov, S.V., Sivkov, V.N., Vyalikh, D., Born, R., Behm, T., Ehrlich, A., Chernogor, L.I., Belikov, S., Janussen, D., Bazhenov, V.V. ve Wörheide, G., 2013. First report on chitinous holdfast in sponges (Porifera), *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280, 1762, 20130339.

- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A. ve Lahsini, A., 2018. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181-1189.
- Elieh-Ali-Komi, D. ve Hamblin., M. R., 2016. Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials, *International Journal of Advanced Research* 4, 3, 411.
- Fu, S., Xia, J. ve Wu, J., 2016. Functional chitosan nanoparticles in cancer treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 12, 8, 1585-1603.
- Gomes, J., Batra, J., Chopda, V. R., Kathiresan, P. ve Rathore, A. S., 2018. Monitoring and control of bioethanol production from lignocellulosic biomass, In *Waste biorefinery*, 727-749 Elsevier.
- Griffiths, P. ve de Hasseth, J. A., 2020. *fourier transform infrared spectrometry*, Wiley-Blackwell, ISBN 978-0-471-19404-0.
- Gudmundsson, S. R., Kallio, K. A., Vihinen, H., Jokitalo, E., Ktistakis, N. ve Eskelinen, E. L., 2022. Morphology of Phagophore Precursors by Correlati and Light-Electron Microscopy. *Cells*, 11, 19, 3080.
- Haghighian, F., Mohammadi, M. ve Moniri, V. R., 2007. Biological study of *Bradyporus latipes* (Orthoptera: Tettigonidae) and determination of the best control method in rangelands of Chaharmahal and Bakhtiary Province, Iranian *Journal of Forest and Range Protection Research*, 5, 1, 1-16.
- Haghighian, F., Sendi, J. J. ve Rahimain, Y., 2022. The effect of photoperiod and temperature on hatching and egg development of *Bradyporus latipes* (Orthoptera: Tettigoniidae), *Arthropods*, 11, 4, 226.
- Haryati, R. P., Jayanegara, A., Laconi, E. B., Ridla, M. ve Suptijah, P., 2019, July. Evaluation of chitin and chitosan from insect as feed additives to mitigate ruminal methane emission, In *AIP Conference Proceedings*, 2120, 1, AIP Publishing.
- Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., Joni, I. M. ve Muchtaridi, M., 2021. Chitosan-based nanoparticles of targeted drug delivery system in breast cancer treatment. *Polymers*, 13, 11, 1717.
- Hu, Y. W., Du, Y. Z., Liu, N., Liu, X., Meng, T. T., Cheng, B. L., He J. B., You, J., Yuan, H. ve Hu, F. Q., 2015. Selective redox-responsive drug release in tumor cells mediated by chitosan based glycolipid-like nanocarrier, *Journal of controlled release*, 206, 91-100.
- Hudson, S. M. ve Jenkins, D. W., 2001. Chitin and chitosan, *encyclopedia of polymer science and technology*, New York: Wiley Interscience, DOI, 10, 0471440264.
- Ingle, A., Gade, A., Pierrat, S., Sonnichsen, C. ve Rai, M., 2008. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria, *Curr. Nanosci.* 4, 141–144. doi: 10.2174/157341308784340804

- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H. ve Nah, J. W., 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 14, 3423-3432.
- Kaur, K., Dattajirao, V., Shrivastava, V. ve Bhardwaj, U., 2012. Isolation and characterization of chitosan- producing bacteria from beaches of Chennai, India, *Enzyme Research*, volume, 2012, Article ID421683, 4. H. Merzendorfer.
- Kaur, S. ve Dhillon, G. S., 2014. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications, *Critical Reviews in Microbiology*, 40, 2, 155-175.
- Kaya, M., Baran, T. ve Karaarslan, M., 2015. A new method for fast chitin extraction from shells of crab, crayfish and shrimp, *Natural Product Research*, 29, 15, 1477-1480.
- Kaya, M., Baran, T. ve Mentesh, A., 2014. Extraction and characterization of α -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food Biophysics*, 145–157.
- Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Mentesh, A., Özüsağlam, M. A. ve Çakmak, Y. S., 2014. Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), *Materials Science and Engineering: C*, 45, 72-81.
- Kaya, M., Baublys, V., Can, E., Šatkauskienė, I., Bitim, B., Tubelytė, V. ve Baran, T., 2014. Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*) and a crustacean species (*Oniscus asellus*). *Zoomorphology*, 133, 285-293.
- Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A. ve Baran, T., 2015. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 797-805.
- Kaya, M., Lelešius, E., Nagrockaitė, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran, T., Can, E. ve Bitim, B., 2015. Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species, *PloS one*, 10, 1, e0115531.
- Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., Aşan Özüsağlam, M., Tozak, K. Ö., Mol, A., Mentesh, A. ve Sezen, G., 2015. A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: With new surface morphology, *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 553-558.
- Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Mentesh, A., Özüsağlam, M. A. ve Çakmak, Y. S., 2015. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta), *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20, 168-179.
- Kerch, G. ve Korkhov, V., 2011. Effect of storage time and temperature on structure, mechanical and barrier properties of chitosan-based films, *European Food Research and Technology*, 232, 17-22.

- Key, J. ve Park, K., 2017. Multicomponent, tumor-homing chitosan nanoparticles for cancer imaging and therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 3, 594.
- Khubiev, O. M., Egorov, A. R., Kirichuk, A. A., Khrustalev, V. N., Tskhovrebov, A. G. ve Kritchenkov, A. S., 2023. Chitosan-based antibacterial films for biomedical and food applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 13, 10738.
- Kritchenkov, A. S., Egorov, A. R., Dysin, A. P., Volkova, O. V., Zabodalova, L. A., Suchkova, E. P., Kurliuk, A. V. ve Shakola, T. V., 2019. Ultrasound-assisted Cu, I)-catalyzed azide-alkyne click cycloaddition as polymer-analogous transformation in chitosan chemistry, High antibacterial and transfection activity of novel triazol betaine chitosan derivatives and their nanoparticles, *International Journal Biological Macromol*, 137, 592–603
- Kumar, M. N. R., 2000. Kitin ve kitosan uygulamalarının gözden geçirilmesi, *Reaktif ve fonksiyonel polimerler* , 46, 1, 1-27.
- Kumari, S., Rath, P., Kumar, A. S. H. ve Tiwari, T. N., 2015. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method, *Environmental Technology ve Innovation*, 3, 77-85.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J. ve Stepnowski, P., 2010. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan, *Marine drugs*, 8, 5, 1567-1636.
- Li, P., Poon, Y. F., Li, W., Zhu, H. Y., Yeap, S. H. ve Cao, Y., 2021. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability, *Nature Materials*, 10, 2, 149–156.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C. ve Yang, Q., 2012. Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky, *Molecules*, 17, 4, 4604-4611.
- Lodhi, G., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Kim, S. K., Jeon, Y .J., Je, J. Y., Ahn, C. B., Moon S. H., Jeon, B. T. ve Park, P. J., 2014. Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications, *BioMed research international*, 2014, 654913.
- Lupoi, J. S., Singh, S., Parthasarathi, R., Simmons, B. A. ve Henry, R. J., 2015. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 49, 871-906.
- Madhumathi, K., Binulal, N. S., Nagahama, H., Tamura, H., Shalumon, K. T., Selvamurugan, N., Nair S.V. ve Jayakumar, R., 2020. Preparation and characterization of novel beta-chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 1, 1– 5.

- Majtán, J., Bíliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G. ve Šimúth, J., 2007. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 3, 237-241.
- Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J. ve Rockberg, J., 2020. Evolution from adherent to suspension: systems Biology of HEK293 cell line development, *Scientific Reports* 10, 1, 18996.
- Mann, A.J., Noulin, N., Catchpole, A., Stittelaar, K. J., de Waal, L., Veldhuis Kroeze, E., Hinchcliffe, M., Smith, A., Montomoli, E., Piccirella, S., Osterhaus, A., Knight, A., Oxford, J., Lapini, G., Cox, R. ve Lambkin-Williams, R., 2014. Intranasal H5N1 vaccines, adjuvanted with chitosan derivatives, protect ferrets against highly pathogenic influenza intranasal and intratracheal challenge, *PLoS One*, 9, 5, e93761.
- Meneses, L., Brandão, A. C., Coenye, T., Braga, A. C., Pires, D. P. ve Azeredo, J., 2023. A systematic review of the use of bacteriophages for in vitro biofilm control, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42, 8, 919-928.
- Mi, F. L., Huang, C. T., Liang, H. F., Chen, M. C., Chiu, Y. L., Chen, C. H. ve Sung, H. W., 2006. Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9, 3290-3296.
- Mills, K. H., Cosgrove, C., McNeela, E. A., Sexton, A., Giemza, R., Jabbal-Gill, I., Church, A., Lin, W., Illum, L., Podda, A., Rappuoli, R., Pizza, M., Griffin, G. E. ve Lewis, D. J., 2003. Protective levels of diphtheria-neutralizing antibody induced in healthy volunteers by unilateral priming-boosting intranasal immunization associated with restricted ipsilateral mucosal secretory immunoglobulin a, *Infection and Immunity*, 71, 2, 726-732.
- Mohan, K., Ganesan, A. R., Muralisankar, T., Jayakumar, R., Sathishkumar, P., Uthayakumar, V., Chandrasekar, R. ve Revathi, N., 2020. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects, *Trends in Food Science ve Technology*, 105, 17-42.
- Mohan, K., Ravichandran, S., Muralisankar, T., Uthayakumar, V., Chandrasekar, R., Rajeevgandhi, C., Rajan D.K. ve Seedeve, P., 2019. Extraction and characterization of chitin from sea snail *Conus inscriptus* (Reeve, 1843), *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 555-560.
- Morganti, P., Palombo, P., Palombo, M., Fabrizi, G., Cardillo, A., Svolacchia, F., Guevara, L. ve Mezzana, P., 2012. A phosphatidylcholine hyaluronic acid chitin–nanofibrils complex for a fast skin remodeling and a rejuvenating look, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 213-220.

- Mujtaba, M., Morsi, R. E., Kerch, G., Elsabee, M. Z., Kaya, M., Labidi, J. ve Khawar, K. M., 2019. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review, *International journal of biological macromolecules*, 121, 889-904.
- Mujtaba, M., Morsi, R. E., Kerch, G., Elsabee, M. Z., Kaya, M., Labidi, J. ve Khawar, K. M., 2019. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 889-904.
- Mujtaba, M., Salaberria, A. M., Andres, M. A., Kaya, M., Gunyakti, A. ve Labidi, J., 2017. Utilization of flax, (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 944-952.
- Muñoz-Tebar, N., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J. ve Viuda-Martos, M., 2023. Chitosan Edible Films and Coatings with Added Bioactive Compounds: Antibacterial and Antioxidant Properties and Their Application to Food Products: A Review. *Polymers*, 15, 396
- Muzzareli, R. A., Ferrero, A. ve Pizzoli, M., 1972. Light-scattering, X-ray diffraction, elemental analysis and infrared spectro-photometry characterization of chitosan, a chelating polymer, *Talanta*, 19, 10, 1222-1226.
- Muzzarelli, R. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M. ve Paoletti, M. G., 2012. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate polymers*, 87, 2, 995-1012.
- Oberemko, A., Salaberria, A. M., Saule, R., Saulis, G., Kaya, M., Labidi, J. ve Baublys, V., 2019. Physicochemical and in vitro cytotoxic properties of chitosan from mushroom species (*Boletus bovinus* and *Laccaria laccata*), *Carbohydrate polymers*, 221, 1-9.
- Ohno, M., Togashi, Y., Tsuda, K., Okawa, K., Kamaya, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. ve Oyama, F., 2013. Quantification of chitinase mRNA levels in human and mouse tissues by real-time PCR: species-specific expression of acidic mammalian chitinase in stomach tissues. *PLoS One*, 8, 6, e67399.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Bégin, A. ve Holley, R. A., 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan, *International Journal of Food Microbiology*, 62, 1-2, 139-148.
- Parhi, R., 2020. Drug delivery applications of chitin and chitosan: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 3, 577-594.
- Peng, T., Yao, K. D., Yuan, C. ve Goosen, M. F., 1994. Structural changes of pH-sensitive chitosan/polyether hydrogels in different pH solution, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 32, 3, 591-596.

- Pradines, B., Lievin-Le, M., Vauthier, C., Ponchel, G., Loiseau, P. M. ve Bouchemal, K., 2015. Cell line-dependent cytotoxicity of poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles coated with chitosan and thiolated chitosan: Insights from cultured human epithelial HeLa, Caco2/TC7 and HT-29/MTX cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 491, 1-2, 17–20.
- Qian, L., Zheng, J., Wang, K., Tang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Huang, F., Pei, Y. ve Jiang, Y., 2013. Cationic core–shell nanoparticles with carmustine contained within O6- benzylguanine shell for glioma therapy, *Biomaterials*, 34, 35, 8968–8978.
- Ramasamy, P., Subhapradha, N., Shanmugam, V. ve Shanmugam, A., 2014. Extraction, characterization and antioxidant property of chitosan from cuttlebone *Sepia kobeensis* (Hoyle 1885), *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 202 – 212.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in polymer science*, 31, 7, 603-632.
- Sahariah, P. ve Másson, M., 2017. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure–activity relationship, *Biomacromolecules*, 18, 11, 3846-3868.
- Sajomsang, W. ve Gonil, P., 2010. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs, *Materials Science and Engineering*, 30, 3, 357-363.
- Salmabi, K. A. ve Seema, P. N., 2013. Antibacterial potential of chitosan on pathogenic Gram positive cocci, *Advanced Biotechnology*, 12, 10-13.
- Sayari, N., Sila, A., Abdelmalek, B. E., Abdallah, R. B., Ellouz-Chaabouni, S., Bougatef, A. ve Balti, R., 2016. Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 163-171.
- Shanmuganathan, R., Edison, T. N. J. I., Lewis Oscar, F., Kumar, P., Shanmugam, S. ve Pugazhendhi, A., 2019. Chitosan nanopolymers: an overview of drug delivery against cancer, *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 727-736.
- Shin, C. S., Kim, D. Y. ve Shin, W. S., 2019. Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 72-77.
- Sindhu, M. ve Abraham, T. E., 2018. Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films, *Food hydrocolloids* 22, 5, 826-835.
- Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A. ve Fernandes, F. M. B., 2017. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants, *Industrial Crops and Products*, 107, 565-572.

- Srinivasan, H., Kanayairam, V. ve Ravichandran, R., 2018. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 662-667.
- Srinivasan, H., Kanayairam, V. ve Ravichandran, R., 2018. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 662-667.
- Story, G. M., Marcott, C. ve Dukor, R. K., 1999. A method for analysis of clinical tissue samples using ft-ir microspectroscopic imaging, *Microscopy and Microanalysis*, 5, 2, 68-69.
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S. ve Ng, S. K., 2021. HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 796991.
- Tang, W., Wang, J., Hou, H., Li, Y., Wang, J., Fu, J., Lu, L., Gao, D., Liu, Z., Zhao, F., Gao, X., Ling, L., Wang F. S., Güneşi, F. ve Tan H., 2023. Application of chitosan and its derivatives in medical materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 240, 124398.
- Tavakoli, M., Labbaf, S., Mirhaj, M., Salehi, S., Seifalian, A. M. ve Firuzeh, M., 2023. Natural polymers in wound healing: From academic studies to commercial products, *Journal of Applied Polymer Science*, 140, e53910.
- Tekade, S. R., Youngren-Ortiz, H., Yang, R. ve Haware, M. B., 2015. Chougule, Albumin Chitosan Hybrid Onconase Nanocarriers for Mesothelioma Therapy, *AACR*.
- Thorat, N. D., Otari, S. V., Patil, R. M., Bohara, R. A., Yadav, H. M., Koli, V. B., Chaurasia, A. K. ve Ningthoujam, R. S., 2014. Synthesis, characterization and biocompatibility of chitosan functionalized superparamagnetic nanoparticles for heat activated curing of cancer cells, *Dalton Transactions*, 43, 46, 17343-17351.
- Tougeron, K., 2019. Diapause research in insects: historical review and recent work perspectives. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167, 1, 27-36.
- Varma, R. ve Vasudevan, S., 2020. Extraction, Characterization, and Antimicrobial Activity of Chitosan from Horse Mussel *Modiolus modiolus*, *ACS omega*, 5, 32, 20224-20230.
- Venkatesan, J., Vinodhini, P. A, Sudha, P. N ve Kim, S. K., 2014. Chitin and chitosan composites for bone tissue regeneration, *Advances in food and nutrition research*, 73, 59–81.
- Vlacha, M., Giannakas, A., Katapodis, P., Stamatis, H., Ladavos, A. ve Barkoula, N. M., 2016. On the efficiency of oleic acid as plasticizer of chitosan/clay nanocomposites and its role on thermo-mechanical, barrier and antimicrobial properties–Comparison with glycerol. *Food Hydrocolloids*, 57, 10-19.

- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z. ve Xue, C., 2013. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*), *Carbohydrate polymers*, 92, 1, 90-97.
- Waśko, A., Bulak, P., Polak-Berecka, M., Nowak, K., Polakowski, C. ve Bieganski, A., 2016. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 316-320.
- Wimardhani, Y. S., Suniarti, D. F., Freisleben, H. J., Wanandi, S. I., Siregar, N. C. ve Ikeda, M. A., 2014. Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells, *Journal of Oral Science*, 56, 2, 119-126.
- Xie, T., Liao, Z., Lei, H., Fang, X., Wang, J. ve Zhong, Q., 2017. Antibacterial activity of food-grade chitosan against *Vibrio parahaemolyticus* biofilms, *Microbial Pathogenesis*, 110, 291-297.
- Yen, M. T., Yang, J. H. ve Mau, J. L., 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells, *Carbohydrate Polymers*, 75, 1, 15-21.
- Younes, I. ve Rinaudo, M., 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Marine Drugs*, 13, 3, 1133-1174.
- Younes, I., Hajji, S., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K. ve Nasri, M., 2014. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment, Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 489-498.
- Zheng, Y., Chen, Y., Jin, L. W., Ye, H. Y. ve Liu, G., 2016. Cytotoxicity and genotoxicity in human embryonic kidney cells exposed to surface modify chitosan nanoparticles loaded with curcumin, *AAPS PharmSciTech*, 17, 1347-1352.
- Zhong, Y. ve Li, Y., 2021. Effects of storage conditions and acid solvent types on structural, mechanical and physical properties of kudzu starch (*Pueraria lobata*)-chitosan composite films, *Starch-Stärke*, 63, 9, 579-586.
- Zhou, M. L., Ma, J. N. ve Xue, L., 2022. Effect of Protein Arginine Methyltransferase 1 Gene Knockout on the Proliferation of Human Embryonic Kidney 293T Cells. *Biology Bulletin*, 49, Suppl 2, 1-11.
- Zoe, L. H., David, S. R. ve Rajabalaya, R., 2023. Chitosan Nanoparticle Toxicity: A Comprehensive Literature Review of In vivo and In vitro Assessments for Medical Applications, *Toxicology Reports*.
- URL-1 <<https://en.wikipedia.org/wiki/Bradyporus>>, Erişim Tarihi: 20/10/2023.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Rajaa Umran Mosa ALRUBAYE

EĞİTİM BİLGİLERİ:

Lisans : Kerbala Üniversitesi (Irak), Biyoloji Bölümü, 2006-2009

Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi, Tıbbi Genetik, 2014-2017

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Umran, R., Mol, A., Umran Mosa, A. ve Kaya, M., 2023. Characterization of intact chitosan obtained from *Bradyporus* sp. (Orthoptera, Insecta) and its cytotoxicity on human cell line (HEK293), Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.