



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**DİPLOPOD VÜCUT SEGMENTLERİNDEN 3 BOYUTLU
KİTOSAN ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahar AKYÜZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2017



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**DİPLOPOD VÜCUT SEGMENTLERİNDEN 3 BOYUTLU
KİTOSAN ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahar AKYÜZ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat KAYA**

AKSARAY, 2017

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330406 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, “BAHAR AKYÜZ”, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “DİPLOPOD VÜCUT SEGMENTLERİNDEN 3 BOYUTLU KİTOSAN ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Murat KAYA**
Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Osman SEYYAR**
Ömer Halisdemir Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Lalehan AKYÜZ**
Aksaray Üniversitesi

Teslim Tarihi: 17 Nisan 2017

Savunma Tarihi: 05 Mayıs 2017

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım. Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Bahar AKYÜZ

ÖNSÖZ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, üç boyutlu olarak elde edilen kitinlerin doku mühendisliği, ağır metal giderimi gibi alanlarda alternatif biyo-malzeme olarak kullanımı önem kazanmıştır. Fakat kitinin türevi olan kitosandan üç boyutlu olarak üretimi olmamıştır. Kitosanın sahip olduğu, biyo-uyumluluk, biyo- bozunabilirlik, toksik olmama, termal kararlılık, yüksek antitümör, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gibi özelliklere sahip olması ve kaynağa bağlı olarak farklı kullanım alanlarında tercih edilen elverişli bir biyo-materyal yapmaktadır. Son yıllarda kitosana olan ilginin artması ile kitosanın antimikrobiyal, antitümör aktivitesinin diğer materyallere göre üstünlüğünü ortaya koymuştur.

Bu çalışmada ise ilk kez kırkayakgillerden *Julus terrestris*'den 3D kitin ve kitosan halkaların eldesi gerçekleştirilmiştir. *J. terrestris* örnekleri Bakırdağı, Develi, Kayseri'den 29.01.2015 tarihinde toplanmıştır. Elde edilen 3D kitin ve kitosan halkalar, fiziko-kimyasal karakterizasyonları yapılmış ve ticari kitin ve kitosan ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca *J. terrestris*'den elde edilen kitosanın DNA etkileşimi, HeLa ve L929 hücre hatları üzerine antitümör aktivitesi, sitotoksitesi ve bazı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Analiz sonuçlarında, 3D kitin ve kitosanın yüksek termal kararlılığa ve porlu yüzey yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. 3D kitosanın sahip olduğu düşük molekül ağırlığı (4.31 kDa) sayesinde, hücre hatları üzerine antiproliferatif ajan olarak kullanılabilecektir. Ayrıca kitosanın kitine göre daha yüksek antimikrobiyal özelliğe sahip olmasından dolayı 3D kitosanların gıda, medikal ve tıp gibi alanlarda tercih edilebilecektir.

Bu tez çalışması, Aksaray Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Genel Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

TEŞEKKÜR

Aydınlığın ışıǒı, Yüksek Lisans sürecimde benden yardım ve bilgi birikimini esirgemeyen, akademik tecrübelerinden ve fikirlerinden faydalandığım, her zaman bana göstermiş olduğu anlayış, manevi destek, hoşgörü, sabır ve yardımları için, Yüksek Lisans Bitirme Tezimin yürütölmesine danışmanlık eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca ve bu tez çalışmasında, bana öğretmiş olduğu bilgilerini, tecrübelerini, yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen Dr. İdris SARGIN'a en içten teşekkürlerimi ederim.

Bu tez çalışmasının antimikrobiyal aktivitenin deney ve yorumlama aşamasında bana değerli bilgileri öğreten ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Demet ERDÖNMEZ'e, antitümör aktivite çalışmalarında yardımcı olan ve yorumlamasını öğrenmemde büyük katkısı olan Dr. Gamze TAN'a bilgileri ve yardımları için teşekkür ederim. DNA etkileşim çalışmasında katkılarından dolayı Saulius SATKAUSKAS, Saulius MICKEVIČIUS ve Mansi MAHETA'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisansım süresince beraber ortak çalışmalar yaptığımız, birbirimizden desteğimizi, bilgilerimizi ve yardımlarımızı esirgemediğimiz grup arkadaşlarım Behlül KOÇ, Esra BULUT, Ivan AL-JAF, Karwan SOFİ ve Muhammad MUJTABA'ya teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca bana saygı duyan, desteğini esirgemeyen, beni anlayışla karşılayan, manevi desteğim sevgili eşim Hasan YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda bana güvenen, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, büyük sabır gösteren ve bugünlere gelmemi sağlayan aileme en içten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT	ivvi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Kitin ve Kitosan.....	3
2.2 Farklı Canlılardan Kitin ve Kitosan Eldesi ve Uygulama Alanları.....	3
2.3 Üç Boyutlu Kitin İzolasyonu ve Uygulama Alanları.....	6
2.4 Kitosanın DNA ile Adsorpsiyon Kapasitelerin Belirlenmesi	7
2.5 Kitosanın Sitotoksosite ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi.....	8
2.6 Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	8
3. MALZEME VE YÖNTEM	10
3.1 Diplopod Örneklerin Toplanması.....	10
3.2 Kullanılan Materyaller.....	10
3.3 Kitin İzolasyonu.....	10
3.3.1 Beyazlatma işlemi.....	11
3.3.2 Minerallerin uzaklaştırılması	11
3.3.3 Proteinlerin uzaklaştırılması	11
3.4 Kitosan Eldesi.....	11
3.5 Karakterizasyon.....	12
3.5.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR).....	12
3.5.2 Taramalı elektron mikroskopu (SEM).....	12
3.5.3 Termogravimetrik analiz (TGA).....	13
3.5.4 X-Işını kırınım yöntemi (XRD).....	13
3.5.5 Molekül ağırlığı belirleme ve elemental analiz.....	13
3.6 Kitosan Çözeltisi Hazırlama.....	14
3.7 <i>J. terrestris</i> Kitosanın DNA Etkileşim Kapasitesinin Belirlenmesi	14
3.8 <i>J. terrestris</i> Kitosanın Sitotoksitesitesi ve Antitümör Etkisi.....	14
3.9 <i>J. terrestris</i> Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi.....	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1 Yeni üretilen <i>J. terrestris</i> kitosanının eşsiz özellikleri.....	16
4.2 FT-IR.....	16
4.3 SEM	17

4.4 TGA	22
4.5 XRD.....	23
4.6 Kitosanın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi ve Elemental Analizi.....	24
4.7 <i>J. terrestris</i> Kitosan ile Plazmid DNA Etkileşimi.....	25
4.8 <i>J. terrestris</i> Kitosanının Sitotoksitesi ve Antitümör Etkisi.....	25
4.9 <i>J. terrestris</i> Kitosanının Antimikrobiyal Aktivitesi.....	27
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	28
KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	37



ÖZET

DİPLOPOD VÜCUT SEGMENTLERİNDEN 3 BOYUTLU KİTOSAN ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Ticari olarak elde edilen kitin ve farklı kaynaklardan izole edilen kitin (mantar, böcek, yengeç, karides ve kerevit) toz, granül veya yaprak şeklinde literatürde rapor edilmiştir. Üç boyutlu (3D) olarak üretilen kitinin ise sadece süngerden elde edildiği bilinmektedir, fakat üç boyutlu kitosan henüz rapor edilmemiştir. Bu çalışmada, diplopod olarak bilinen kırkayakgillerden bir türün (*Julus terrestris*) gövde segmentlerinin yapısı korunarak halka şeklinde ilk kez 3D kitin ve kitosan üretilmiştir. Elde edilen 3D kitin ve kitosan halkaların FT-IR, SEM, TGA, XRD ve Elemental Analiz cihazları kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır ve kitosanın molekül ağırlığı belirlenmiştir. Karakterize edilen 3D kitin ve kitosan ticari kitin ve kitosan ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen kitosan halkaların asetik asitte (% 1'lik) çözünmesiyle elde edilen kitosan çözeltisi; plazmid DNA etkileşimi, antitümör aktivitesi ve antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. *J. terrestris*' den elde edilen kitosan çözeltisi plazmid DNA ile etkileşimi için farklı konsantrasyondaki çözeltilerin (0.04, 0.4 ve 4mg/mL) konsantrasyonu arttıkça tutma kapasitesini artırdığı gözlenmiştir. Elde edilen kitosan çözeltisi HeLa ve L929 hücre hatları üzerine, düşük sitotoksitesi ve antiproliferatif aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. *J. terrestris*' den elde edilen kitosanın antimikrobiyal aktivitesi 12 mikroorganizma üzerine araştırılmıştır ve yaygın olarak bulunan insan patojeni *Staphylococcus aureus* için yüksek inhibisyon (15.6 ± 1.154 mm) gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: HeLa hücre hattı, milipede, biyopolimer, sitotoksite.

ABSTRACT

PRODUCTION OF 3 DIMENSIONAL CHITOSAN FROM BODY SEGMENTS OF DIPLOPODA AND ITS BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Commercially available chitins and the chitin isolates (from mushrooms, insect cuticles, shells of shrimp, crab and crayfish) reported in the literature are in forms of powder, flake or granule. Three-dimensional chitins have been only known from the sponges but still three-dimensional chitosan has not been reported yet. In this study, we produced three-dimensional chitin and chitosan rings from the body segments of diplopod *Julus terrestris*. Obtained chitin and chitosan rings were characterized by FTIR, SEM, TGA, XRD, Dilute solution viscometry and Elemental Analysis and compared with commercial chitin and chitosan. The interactions chitosan with plasmid DNA was studied at varying concentrations (0.04, 0.4 and 4mg/mL). Antitumor activity tests were conducted (L929 and HeLa) and low cytotoxicity and high antiproliferative activity was observed. Antimicrobial activities of *J. terrestris* chitosan were investigated on twelve organisms and highest growth inhibition was recorded for common human pathogen *Staphylococcus aureus*.

Keywords: HeLa cell line, millipede, biopolymer, cytotoxicity.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1:	<i>Julus terrestris</i> diplopod'un vücut segmentlerinden 3D kitin ve kitosan halkaların izolasyon basamakları.....	12
Şekil 4.1:	FT-IR spektrumları: a) <i>J.terrestris</i> 3D kitin halkalar, b) Sigma-Aldrich kitin, c) <i>J. terrestris</i> 3D kitosan halkalar ve d) Sigma-Aldrich kitosan.....	17
Şekil 4.2:	SEM görüntüleri: a, b, c ve d) <i>J. terrestris</i> 'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitin; e, f) <i>J. terrestris</i> 'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitosan.....	18
Şekil 4.3:	<i>J. terrestris</i> ' den elde edilen 3D kitin halkaların SEM resimleri: a, b, c ve d) iç katlanmış kısım; e, f) dış düz kenar.....	20
Şekil 4.4:	<i>J. terrestris</i> ' den elde edilen 3D kitosan halkaların SEM resimleri: a, b, c ve d) iç katlanmış kısım; e, f) dış düz kenar.....	21
Şekil 4.5:	TGA eğrileri: a) <i>J. terrestris</i> 3D kitin halkalar, b) Sigma-Aldrich kitin, c) <i>J. terrestris</i> 3D kitosan halkalar ve d) Sigma-Aldrich kitosan.....	22
Şekil 4.6:	XRD kırınım görüntüsü; a) <i>J. terrestris</i> 'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitin ve b) <i>J. terrestris</i> 'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitosan.....	24
Şekil 4.7:	<i>J. terrestris</i> ' den elde edilen 3D kitosanın 24 ve 48 saat için a) L929 hücre hattının hücre yaşayabilirliği, b) HeLa hücrelerinin MTT sonuçları. Sonuçlar, en azından üç tekrarlı olarak ortalama±SD ortalaması olarak gösterilir (** p < 0.01).....	26

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
γ	Gama
g	Gram
kDa	Kilodalton
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovin Serum Albumin
CO₂	Karbondioksit
CrI	Kristalinite
DA	Deasetilasyon Derecesi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTG_{max}	Maksimum Bozunma Sıcaklığı
EtOH	Etil alkol
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HCl	Hidroklorik Asit
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NaClO	Sodyum Hipoklorid
NaOH	Sodyum Hidroksit
pH	Hidrojen Potansiyeli
SD	Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termal Gravimetrik Analizi
XRD	X-ışını Kırınımı Yöntemi
3D	Üç Boyutlu

1. GİRİŞ

Çeşitli kaynaklardan izole edilen kitin genellikle toz, yaprak ve granül halde bulunmaktadır. Ancak son yıllarda süngerlerden iki veya üç boyutlu yapıları korunarak izole edilen kitinler rapor edilmiştir (Brunner vd., 2009; Ehrlich vd., 2013; Ehrlich vd., 2007; Ehrlich vd., 2010a; Wysokowski vd., 2013a; Wysokowski vd., 2013b). Fakat ham madde olarak süngerlerden başka bir canlının yapısından üç boyutlu kitin ve kitosan üretimi literatürde bulunmamaktadır.

Kitin ve kitosan, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu, antimikrobiyal ve antitümör özellikleri (Rinaudo, 2006) sayesinde tıp, eczacılık, biyomühendislik ve su arıtma gibi alanlarda cazip biyopolimerler haline gelmiştir (Anitha vd., 2014; Park ve Kim, 2010; Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003; Wysokowski, vd., 2015; Zhao, vd., 2010). İzole edilen iki ya da üç boyutlu kitin, başarılı bir şekilde doku mühendisliğinde kullanılmıştır ve ayrıca kompozit üretimi, zirkonyum depolama, uranyum adsorpsiyonu ve biyomimetik için (Ehrlich, vd., 2010b; Bazhenov vd., 2015; Wysokowski vd., 2013a; Wysokowski vd., 2013b Wysokowski vd., 2013c; Wysokowski, vd., 2015) önerilmiştir. Kaynak organizmadan üç boyutlu kitin/ kitosan üretimi nispeten yeni bir alan olup, potansiyelini ortaya çıkarmak için daha fazla araştırma gerektiği görülmektedir.

Diplopod, Arthropoda'nın en büyük sınıflarından biridir ve 80.000 kadar türü bulunmaktadır (Sierwald ve Bond, 2007). Juliformia ve Polydesmida takımındaki diplopodların, segmentli olan silindirik dış iskeletleri kitinden oluşmaktadır (Blower, 1951; Cong, vd., 2009).

Mevcut çalışmada ise dünya genelinde ilk kez üç boyutlu kitosan üretimi yapılacaktır. Bu çalışmada diplopod olarak bilinen kırkayakgillerden bir türün (*Julus terrestris*) gövde segmentlerinin yüzük şeklindeki üç boyutlu yapısını koruyarak yeni bir kitosan malzemesi üretilecektir. Çalışmanın ön denemesi yapılmış ve bu üretimin başarılı bir şekilde yapılabildiği ortaya konmuştur. Elde edilen üç boyutlu kitin ve

kitosan örnekleri FT-IR, SEM, TGA, XRD ve elemental analiz ile karakterize edilerek hem deasetilasyon derecesi (DA) hem de molekül ağırlığı belirlenip ticari kitin ve kitosan ile kıyaslanacaktır. Sonraki aşama olarak fizikokimyasal özelliği belirlenen kitosanın antimikrobiyal özelliği çeşitli insan patojenlerine karşı belirlenecektir. İzole edilen kitosanların, uygun besiyerinde çoğaltılması sağlanan 6 farklı gram-negatif, 5 farklı gram-pozitif ve bir maya mikroorganizmaları üzerine etkili olup olmadığı disk difüzyon yöntemi ile kontrol edilecektir. Ayrıca kitosan konsantrasyonlarının MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri belirlenecektir. Bu kitosanın antimikrobiyal etki gösterebilmesi için gerekli olan minimum konsantrasyon belirlenecektir. Böylece bu doğal biyopolimerler özellikle sağlık ve gıda alanlarında kullanılma fırsatı bulacaktır. Bu çalışma ile dünya genelinde farklı disiplinlerde geniş kullanım alanına sahip kitosan biyopolimerinin yeni bir formu (üç boyutlusu) sentezlenecektir. Üç boyutlu (3D) kitosanın diğer toz haldeki örneklerle göre avantajı; daha büyük yapıda ve yüzük şeklinde olması, üç boyutlu hücre kültürüne model olması ve sitotoksik etkisinin düşük olmasıdır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kitin ve Kitosan

Kitin, N-Asetil-D-glukozamin monomerlerinin β -(1,4) bağlanması ile oluşan, ilk kez 1881'te Brannot tarafından mantarlarda kitin varlığı tanımlanan doğal bir biyopolimerdir. Böceklerde ise ilk kez Odier 1823' te kitinin varlığını ispat etmiştir. Kitin yapısal olarak 3 forma sahiptir; α form (anti-paralel zincirler), β form (paralel zincirler) ve γ form (paralel ve anti-paralel zincirlerin kompozit)' dur (Jang vd., 2004). Doğada dominant olarak bulunan formu (α kitin) ise böceklerde, deniz kabuklularında ve mantarlarda, süngerlerde bulunmaktadır (Kaya vd., 2016a; Al Sagheer vd., 2009; Abdou vd., 2008; Ifuku vd., 2011; Ehrlich vd., 2007). β formu ise kalamar ve deniz diatomlarında bulunmaktadır (Lavall vd., 2007; Brunner vd., 2009).

Kitinin deasetillenmesi sonucu biyouyumlu, biyobozunabilir, toksik olmayan, antibakteriyel, antitümör gibi özelliklere sahip olan kitosan elde edilir. Bu özelliklerinden dolayı; doku mühendisliği (Hutmacher, 2000), kontrollü ilaç salınımı (Agnihotri vd., 2004), protein ve boya adsorpsiyonu (Wong vd., 2003), gen terapisi (Jayakumar vd., 2010), tekstil (Jayakumar vd., 2011), ağır metal giderimi (Rorrer vd., 1993) gibi geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Son yıllarda farklı özelliklere sahip kitin ve kitosanın yeni uygulamalarda da kullanımı giderek artmaktadır.

2.2 Farklı Canlılardan Kitin ve Kitosan Eldesi ve Uygulama Alanları

Genellikle kitin denildiği zaman ilk olarak Arthropoda şubesi ve Mantarlar alemi akla gelmektedir. Fakat son çalışmalara bakıldığında farklı şubelere ait canlıların da kitin içerdiği belirlenmiştir. Kaya ve ark. (2015a), ilk kez farklı bir şubenin (Bryozoa) kitin içerdiğini belirlemişlerdir ve yine ilk kez kitin izolasyonu için Bryozoa şubesinden (*Plumatella repens*), Arthropoda şubesinden (*Palomena prasina*)

ve mantarlar aleminden (*Fomes fomentarius*) birer tür seçilerek karakterize etmişler ve elde edilen kitinlerin fizikokimyasal özellikleri karşılaştırmışlardır. Analiz sonuçlarına bakıldığında; FT-IR spektrumlarına göre elde edilen üç kitinin de α formu için karakteristik olduğunu belirlemişlerdir. XRD analizi verilerine göre CrI değerleri sırasıyla; *P. prasina* (% 84.9), *P. repens* (% 60.1) ve *F. fomentarius* (% 58.5) olarak kaydetmişlerdir. TGA sonuçları ise termal kararlılığı en yüksek böcek kitini (386 °C) olduğu belirlemiş ve bunu sırasıyla bryozoan kitini (355 °C) ve mantar kitininin (334 °C) takip ettiğini gözlemişlerdir. SEM analizinde ise yüzey morfolojinde bryozoan ve böcek kitinin nanofiber ve porlardan oluştuğu, mantarın ise fiber ve por içermediği gözlenmiştir. *P. repens*, *P. prasina* ve *F. fomentarius* için kitin içeriklerinin ise sırasıyla % 13.3, % 10.8 ve % 2.4 olduğu kaydedilmiştir. Bryoza şubesinde yer alan türlerinde kitin içeriklerinin yüksek olduğu ve alternatif bir kitin kaynağı olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Kitinin fizikokimyasal özelliğinin kaynağa göre değiştiği bilinmektedir. Fakat bir canlının farklı vücut bölgelerindeki kitinin içeriğinin ve fizikokimyasal özelliklerinin ne şekilde değiştiği bilinmemektedir. Kaya ve ark. (2015b), bal arısını beş farklı bölgeye (kafa, boyun, karın, ayak ve kanat) ayırarak kitin izolasyonu yapmıştır ve herbir bölgeden elde edilen kitinleri FT-IR, SEM ve TGA cihazları kullanılarak fizikokimyasal özellikleri karşılaştırılarak belirlemişlerdir. Beş farklı bölgeden elde edilen kitinlerin α forma sahip olduğu bulunmuştur. SEM analizi sonucunda sadece karın bölgesinden elde edilen kitinin üç farklı yüzey morfolojisine (normal fiber, sadece por ve sadece yapı iskelesi şeklinde) sahip olduğu gözlenmiştir. Kanatdan izole edilen kitin ise yoğun ve düz bir yüzeye sahipken kafa ve ayakdan elde edilen kitinler çok fiberli ve nadir porlu bir yüzey morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. Boyun kısmında ise diğer kısımlara göre çok farklı bir yüzey morfolojisi (sıralı üst üste çakışan kefe şeklinde düz yüzey ve kırık fiberler) bulunmuştur. DTGmax değerleri sırasıyla; karın (367 °C), kafa (360 °C), ayak ve kanat (359 °C) ve boyun (308 °C) olarak kaydedilmiştir. En yüksek kitin içeriği ayak (% 13.25)' ta iken en düşük boyun (% 6.79) bölgesinde olduğunu görmüşlerdir. Bu sonuçlara bakıldığında fizikokimyasal özelliklerin sadece kaynağa bağlı olmadığını bir canlının farklı vücut bölgelerine de bağlı olduğu bu çalışma ile kanıtlanmıştır.

Kitinin gelişimsel süreçte fizikokimyasal özelliklerinin ve kitin içeriklerinin ne şekilde değiştiği kesin olarak bilinmemektedir. Kaya vd., (2016b), *Vespa crabro*' nun larva, pupa ve yetişkin gelişimsel sürecinde kitinin fizikokimyasal özelliğinin ve kitin içeriklerini belirlenmesi ile literatürdeki boşluğa ışık tutmuşlardır. Kitinaz testi ile elde edilen kitinlerin saf olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan deneyler sonucunda kitin içeriğinin gelişimsel süreçte (larva % 2.2, pupa % 6.2 ve yetişkin % 10.3) kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. Yüzey morfolojileri ise farklılık gösterdiği ve yetişkin kitinde dört farklı yüzey (mikropor (3-4µm), düz yüzey, balık pulu şeklinde nanofiber yüzey, nanopor ile birlikte sıkı fiberler ve nano por ile birlikte ayrılmış fiberler), pupa kitininde iki farklı yüzey (altıgen şeklinde nanofiberli yüzey ve nanofiber ile nanoporlu yüzey) ve larva kitinin de iki farklı yüzey (por ve fiberli yüzey ve fiberli porsuz yüzey) morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. FT-IR analizi sonucu tüm kitinlerin α forma sahip olduğu bulunmuştur. Larva, pupa ve yetişkin kitinlerin DTGmax değerleri sırasıyla; 384.8 °C, 381.7 °C ve 382.4 °C olduğu belirlenmiştir. Bu analizler sonucu gelişimsel sürecin kitinin yüzey morfolojisinde farklı değişimlere neden olduğu ve kitin içeriğinin de gelişimsel süreç ilerledikçe arttığını belirlemişlerdir.

Kitinin eklem bacaklıların görme sisteminin bir parçası olduğu bilinmektedir fakat korneal kitinin detaylı karakterizasyonu araştırılmamıştır. Yapılan bir çalışma ile yusufçuk böceğinin (*Sympetrum fonscolombii*) bileşik gözlerinin korneal lensinde bulunan kitinin izolasyonu ve karakterizasyonu (FT-IR, XRD, SEM, TGA ve kitinaz testi) yaparak *S. fonscolombii*'nin korneal lensinin kitin içeriği % 20.3±0.85 olarak belirlemişlerdir. Kitinaz testi sonucunda elde edilen kitinin saf olduğu belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında, korneal lens kitinin α forma sahip olduğu, kristallinitesinin % 96.4 olduğu, DTGmax değerinin ise 369.2 °C olduğu gözlenmiştir. SEM analizi sonucunda ise yüzey morfolojilerinde farklılık gözlenmiştir. Korneal lens kitinin iç kısmı aralıklı altıgen şekle sahip kısa nanofiberlerden, dış kısmı ise sıra halinde dizilmiş altıgen şekle ve uzun fibrillere sahip olduğunu gözlemişlerdir (Kaya vd., 2016c). Kaya ve ark. (2016c) tarafından yapılan bu çalışma ile bir canlının sahip olduğu bileşik gözlerindeki korneal lens kitini karakterize edilerek biyomalzemeye farklı bir bakış açısı getirilmiştir.

2.3 Üç Boyutlu Kitin İzolasyonu ve Uygulama Alanları

Kitin genellikle toz ve granül halinde elde edilmektedir ve ticari olarak satılmaktadır. Fakat son zamanlarda kitin izolasyonunda üç boyutlu kitin elde edilmesi ilgi çekmektedir. İlk olarak 3D kitin, süngerlerden (Porifera) 2010 yılında izole edilmiştir. İzole edilen 3D kitinler; biyomedikal, doku mühendisliği ve materyal bilimi gibi kullanım alanlarında uygulanmıştır.

Ehrlich ve ark. (2010a) denizel süngerlerin Verongida sınıfında yer alan 5 farklı *A. crassa*, *A. aerophoba*, *A. cauliformis*, *A. cavernicola* ve *A. fulva*'nın yapısal ve fizikokimyasal özelliklerini detaylı bir şekilde araştırmışlardır. Bu çalışma ile ilk kez süngerin yapı iskeleti korunarak üç boyutlu kitin elde etmişlerdir. Karakterizasyonlar sonucunda 3D kitinlerin katmandan oluştuğu ve fiberli bir yapıya sahip olduğu ışık mikroskobu ve SEM ile gözlenmiştir. Kitinaz testi ile kitinin saf olduğu belirlenmiştir. Bütün kitinlerin α formda olduğunu ispatlamışlardır. 5 farklı süngerden elde edilen 3D kitin iskelet malzemelerinin doku mühendisliğinde kullanılabilirliği araştırılmıştır (Ehrlich vd., 2010b). Yapılan araştırmalar sonucunda ise elde edilen 3D kitinlerin hücre kültürü için oldukça uygun olduğunu tespit etmişlerdir.

Kaya ve Sargin (2016), yaptıkları çalışmada ilk kez *Oniscus* sp' nin vücut şeklini koruyarak 3D kitin izolasyonu yapmışlardır ve FT-IR, XRD, TGA, SEM ve kitinaz testi kullanarak karakterize etmişlerdir. *Oniscus* sp'den elde edilen 3D kitinin, kitinaz testi sonucunda yüksek saflıkta ve kitin içeriği % 29.6 $\pm$ 4.2 olduğunu belirlemişlerdir. FT-IR analizi sonucu α forma sahip olduğu, XRD analizi sonucu düşük kristaliteye (CrI: % 51) sahip olduğu, TGA analizi sonucu ise düşük termal kararlılıkta (DTGmax değeri 328.8 °C) olduğu, SEM analizi sonucunda ise 3D kitinin, nanofiber (9–17nm) ve nanopor (23–47nm)' lu bir yüzey morfolojisine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Karakterize edilen 3D kitinin bovin serum albümin (BSA) proteini ile etkileşimi farklı pH (4.0-6.0 10mM asetat buffer ve 7.0- 8.0 10mM fosfat buffer)'da test etmişler ve 3D kitinin şeklinden ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı pH 4.0 ve 5.0'in pH 6.0 ve 8.0'e göre daha yüksek protein etkileşimi gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ehrlich ve ark. (2013), süngerden (*A. Cauliformis*) 3D olarak izole ettikleri boru şeklindeki kitin matriksi ekstrem şartlar (150 °C) altında zirkonyum dioksit nanofazların oluşumunda kullanmışlardır. 3D kitin matriksin yüksek termal stabilitesi, onun hidrotermal sentez çalışmasında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda, biyouyumlu zirkonyum-kitin kompozitinin kemik ve diş implantı gibi alanlarda kullanılabileceğini öngörmüşlerdir.

Schleuter ve ark. (2013), Verongida sınıfında yer alan denizel bir süngerden (*A. aerophoba*) mekanik olarak kararlı ve esnek özelliklere sahip 3D kitinin uranyum adsorpsiyonu için ilk kez çalışmışlardır. Bu 3D kitin oldukça etkin (288 mg/g) uranyum adsorpsiyonu olduğu ve uranilin % 90'ını seyreltilmiş HCl kullanarak desorbe edebildiği gözlemlenmiştir.

Norman ve ark. (2014), spongin içeren denizel sünger olan *Hippospongia communis*’ den 3D kitin izole edilmiş ve fiberli yüzeyi sayesinde karmen boya (C.I. natural red 4) adsorpsiyonu için kullanmışlardır. Bu çalışma ile, boya konsantrasyonu, zaman, sıcaklık ve pH’nın etkisi gibi parametreler araştırılmıştır. Adsorpsiyon kinetik sonuçlarının ($r^2=0.979-0.999$), psödo-ikinci-dereceden kinetik modele uyduğu görülmüştür. 3D kitin ve karmen boyası arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etki ile sağlandığı düşünülmektedir. Sonuçlara bakıldığında, boya adsorpsiyonu için boya-biyopolimer hibrid materyalinin etkinliğini yüksek olduğu ve kullanılabilirliğini göstermiştir.

2.4 Kitosanın DNA ile Adsorpsiyon Kapasitelerinin belirlenmesi

Kitosanın anyonik DNA molekülü ile etkileşimi, polielektrolit kompleks oluşumuna bağlıdır. Polikasyonik kitosan, anyonik DNA molekülünün yüzeyine bağlanmaktadır (Hu vd., 2014; Sarkar ve Kundu, 2012). Kitosanın polimerik halkaları üzerinde bulunan amino gruplar, DNA molekülleri ile etkileşimini göstermiştir (Kurita, 2006). Daha önceki çalışmalar kitosanın ilaç taşınımı (Yadollahi vd., 2015), doku mühendisliği (Kim vd., 2015) ve gen taşınımı (Nam ve Nah, 2016) gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır.

2.5 Kitosanın Sitotoksikite ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi

Younes ve ark. (2016), kitosanın molekül ağırlığının mesane kanseri hücreleri üzerine etkisinin olmadığını fakat kitosanın DA'nın artmasıyla antitümör aktivitenin arttığını bulmuşlardır. Ayrıca antitümör aktivitenin düşük pH' da yüksek pH' ya göre daha yüksek aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Shen ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada düşük molekül ağırlığa sahip kitosan oligosakkaritlerin Hep G2 üzerinde önemli bir anti-tümör aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Daha önceki çalışmalarda ideal özelliklere sahip biyoyumlu kitosan türevleri, birincil normal insan epidermal fibroblastlar ve keratinositler üzerine test edilmiştir (Lim vd., 2006; Rasad vd., 2010).

Maeda ve Kimura (2004), Sarkoma 180 hücre hattı üzerinde farklı molekül ağırlığına sahip kitosanın antitümör aktivitesini incelemişlerdir. Düşük molekül ağırlıklı kitosanın daha yüksek antitümör aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Park ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise, kitosanın molekül ağırlığı ve DA'nın üç farklı insan tümör hücre hatları (Hep G2, A549 ve PC3) üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Jiang ve ark. (2011), MCF-7 hücre hattı üzerinde iki farklı kitosan türevinin (sülfatlı kitosan ve sülfatlı benzaldehid kitosan) antitümör aktivitesi analiz etmişlerdir. Yapılan bu çalışma sonucunda sülfatlı kitosanın yüksek antitümör aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.

2.6 Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Kitin ve kitosan, geniş bir yelpazede yosun, bakteri, maya ve mantar gibi hedef organizmalara karşı antimikrobiyal bir ajan olarak araştırılmıştır. Çeşitli kaynaklardan üretilen kitin ve kitosan farklı fiziko-kimyasal, antimikrobiyal aktiviteler sergilemiştir.

Chien ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada bir mantar (shiitake stipes) ve yengeç kabuklarından kitosan elde etmiş ve bunların antimikrobiyal özellikleri karşılaştırmıştır. Mantar ve yengeç kabuklarından elde edilen kitosan, 3 Gram pozitif (*B. cereus*, *L. Monocytogenes* ve *S. aureus*) ve 5 gram negatif (*E. coli*, *Flavobacterium sp.*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* ve *V. parahaemolyticus*) patojen bakteri türüne karşı mükemmel antimikrobiyal aktivite (0.5 mg / ml'de 11.4-26.8 mm'lik inhibisyon zon) sergilediğini belirlemişlerdir. Shiitake kitosanının yengeç kitosanına kıyasla daha iyi antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Tsai ve Su (1999), farklı DA'sine sahip üç çeşit kitosanın (% 50, 75 ve 95) antimikrobiyal etkisini *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. dysenteriae*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ve *C. albicans* patojenleri üzerine büyüme inhibisyonu üzerine araştırmışlardır. DA'sı yüksek olan kitosanın daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Diplopod Örneklerin Toplanması

Tez danışmanının özel bahçesinden (Bakırdağı, Develi, Kayseri, 29.01.2015) Diplopod örnekleri (*Julus terrestris*) toplanmıştır ve üzerindeki herhangi kir veya toprak kalıntılarını uzaklaştırmak için distile su ile defalarca yıkanmıştır. Daha sonra örnekler, 2 gün boyunca 50 °C' de etüvde kurutulmuştur. Ardından % 70' lik EtOH solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2 Kullanılan Materyaller

J. terrestris'den elde edilen üç boyutlu (3D) kitin ve kitosanın tanımlanması ve karşılaştırılması için ticari karides kabuğu kitini; Sigma-Aldrich (kodu: 1001416772) ve düşük moleküler ağırlıklı kitosan; Sigma-Aldrich (448869-50G, CAS: 9012-76-4)' den satın alınmıştır. Kitin ve kitosan izolasyonu için kullanılan kimyasallar; Sodyum hipoklorid (NaClO) yerel marketten, sodyum hidroksit (NaOH) ve etanol, Sigma-Aldrich' den; metanol, kloroform ve hidroklorik asit (HCl), Brain Heart Infusion (BHI) Broth besiyeri, Sabouraud dextrose agar ise Merck' ten temin edilmiştir. DNA etkileşimi için plazmid DNA ise pGL4.13 (Promega, Madison, WI) kullanılmıştır.

3.3 Kitin İzolasyonu

Julus terrestris örneklerinden kitin izole etmek için bir seri kimyasal işlem den geçirilerek saf olarak kitin elde edilmiştir. Yapılan kitin izolasyon yöntemi aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

3.3.1 Beyazlatma işlemi

İlk olarak koyu renkli diplopod örnekleri üzerine % 4' lük NaClO çözeltisi eklenerek 70 °C' de 20 dakika bekletilmiştir. Ardından saf su ile pH nötr oluncaya dek yıkama yapılmıştır. Bu işlemde diplopod örneklerinin rengi beyazlamış ve vücut segmentlerinin şekli korunarak birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır.

3.3.2 Minerallerin uzaklaştırılması

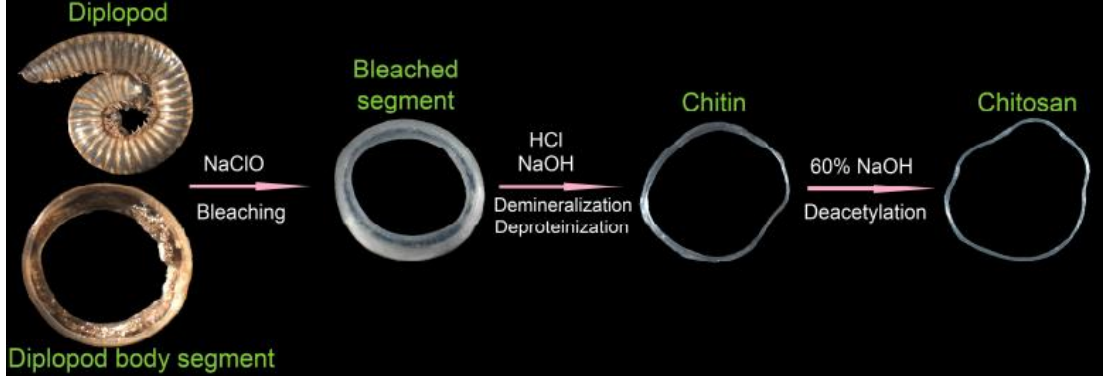
Rengi beyazlamış ve halka şekline sahip olan vücut segmentleri ayrılmış olan örneklerin üzerine 2M HCl çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek yapıdaki minerallerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından saf su ile pH nötr oluncaya kadar yıkama yapılmıştır. Bu işlem sonrasında da halka şeklindeki örneklerin yapısı korunmuştur.

3.3.3 Proteinlerin uzaklaştırılması

Demineralize olmuş halka şeklindeki örneklerin yapısından proteinleri uzaklaştırmak için 2M NaOH çözeltisi 100 °C' de 20 dakika boyunca reflux edilmiştir. Ardından, saf su ile yıkama yapılmıştır. Elde edilen 3D kitin örnekleri oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.4 Kitosan Eldesi

Üç boyutlu kitin örneklerinin üzerine % 60' lık NaOH çözeltisi eklenerek 150°C' de 3 saat boyunca kitinin deasetilenmesiyle üç boyutlu yapısı korunmuş olan kitosan üretilmiştir. Elde edilen 3D kitosan örnekleri oda sıcaklığında kurutulmuştur. 3D kitin ve kitosan üretimi Şekil 3.1. 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: *Julus terrestris* diplopod’un vücut segmentlerinden 3D kitin ve kitosan halkaların izolasyon basamakları.

3.5 Karakterizasyon

Üç boyutlu kitin ve kitosan örnekleri ve Sigma-Aldrich kitin ve kitosan örnekleri; Fourier dönüşümlü infrared spektrometre (FT-IR), Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Termogravimetrik analiz (TGA), X-Işını Kırınım yöntemi (XRD) ve Elemental analiz cihazları kullanılarak fiziko-kimyasal özellikleri karakterize edilmiştir ve kitosanın molekül ağırlığı belirlenmiştir.

3.5.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR)

Kitin ve kitosan halkaların FT-IR spektrumları, Perkin-Elmer FT-IR spektrometre cihazı kullanılarak $4000-625\text{cm}^{-1}$ frekans aralığında kaydedilmiştir. Ayrıca ticari kitin ve kitosan örneklerinin de FT-IR bantları belirlenerek *J. terrestris*’ den elde edilen 3D kitin ve kitosan halkalarla karşılaştırması yapılmıştır.

3.5.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

3D kitin ve kitosan halkaların genel görünümü ve yüzey özelliklerini belirlemek için ilk olarak Gatan Hassas Gravür Kaplama Sistemi kullanılarak numunelerin altın kaplaması yapılmıştır. Ardından Quanta FEG 200 marka taramalı elektron mikroskobu cihazı ile örneklerin yüzey morfolojileri incelenmiştir.

3.5.3 Termogravimetrik analiz (TGA)

3D kitin ve kitosan halkaların termogramları, inert bir azot atmosferinde 25 °C' den 650 °C' ye kadar ve dakika başına 10 °C' lık sıcaklık artışı ile EXSTAR S11 7300 cihazı kullanılarak kaydedilmiştir.

3.5.4 X-Işını kırınım yöntemi (XRD)

XRD difraktogramlardaki kitinin iki keskin piki yaklaşık 9 ve 19° civarında ve 12, 21, 23 ve 26° de görülen dört geniş pikin α kitin için karakteristik olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan, kitosanın difraktogramında ise iki keskin tepe noktası yaklaşık 9 ve 19° de görülmektedir. XRD tepe noktalarının yoğunlukları kitin ve kitosanın yüzde kristallinitesini hesaplamayı sağlar. Aşağıdaki ifade kristalinite indeksini hesaplamak için kullanılmıştır:

$$CrI_{110} (\%) = [(I_{110} - I_{am}) / I_{110}] \times 100 \quad (1)$$

CrI= % yüzde kristaliniteyi gösterir; I_{110} 2 θ 20° maksimum şiddeti değeri; I_{am} ise 2 θ 13° de amorf pikinin maksimum şiddetini gösterir.

3.5.5 Molekül ağırlığı belirleme ve elemental analiz

3D kitosan halkaların viskozite-ortalama molekül ağırlığı, yaygın bir prosedür izlenerek Ubbelohde Seyreltme Viskometresi ile belirlenmiştir (Roberts ve Domszy, 1982; Wang, vd., 1991). Beş farklı konsantrasyonda hazırlanan kitosan solüsyonu, 25 °C' de bir çözücü sistemi (0.1M Asetik asit ve 0.2M Sodyum klorür, 1:1 hacim/hacim) kullanılarak molekül ağırlığın belirlenmesi için kullanılmıştır. Her prosedür üç tekrar ile yapılmıştır. Mark-Houwink-Sakurada denklemi 3D kitosanın molekül ağırlığını belirlemek için kullanılmıştır (Jung ve Zhao, 2012):

$$[\eta] = k (M_v)^\alpha \quad (2)$$

$[\eta]$ esas viskoziteyi gösterir, M_v viskozite ortalama molekül ağırlığı, k (1.81×10^{-3}) ve α (0.93) sabiti gösterir.

Elemental analiz (FLASH-2000), 3D kitosan halkaların C, H ve N içeriğini belirlemek için kullanılmıştır. Kitosanın DA'sı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Abdou, vd., 2008):

$$DA (\%) = [(6.857 - C/N) / 1.7143] \times 100 \quad (3)$$

3.6 Kitosan Çözeltisi Hazırlama

Elde edilen 3D kitosan halkalar (4 mg), 1 mL' lik asetik asit çözeltisinde (% 1) çözümüştür ve bu çözelti, kitosanın tam olarak çözünmesini sağlamak için bir çalkalayıcıda 48 saat karıştırılmıştır. Elde edilen kitosan solüsyonu DNA etkileşimi, antitümör ve antimikrobiyal etki çalışmalarında kullanılmıştır.

3.7 *J. terrestris* Kitosanın DNA Etkileşim Kapasitesinin Belirlenmesi

1 µg/µL konsantrasyondaki plazmit DNA pGL4.13 (Promega, Madison, WI)' ün 10 µL'si, değişen konsantrasyonlarda hazırlanan kitosan çözeltisinin (0.04, 0.4 ve 4 mg/mL) 40 µL' sinin içine konulmuştur. Kontrol testleri, ayrıca kör örnekler ile 40 µL saf su içerisine 10 µL plazmid DNA eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Karışımlar vortex edilerek, 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 2 dakika boyunca 5000rpm' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmın içindeki DNA konsantrasyonu NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

3.8 *J. terrestris* Kitosanın Sitotoksitesi ve Antitümör Etkisi

J. terrestris kitosanının HeLa ve fibroblast L929 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi ve antitümör aktivitesi Mosmann (1983) tarafından tanımlanan MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] metodu kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler, 96 kuyulu plateler içine kuyucuk başına 5×10^3 olacak şekilde ayrı ayrı ekim yapılmıştır ve % 5' lik CO₂ atmosferinde 37 °C' de inkübe edilmiştir. Sonra, hücreler 37 °C' de gece boyunca inkübasyona bırakılarak üst faz uzaklaştırılmıştır ve 200µL geliştirme besiyerinde (DMEM) ve kitosan çözeltilerin

farklı konsantrasyonları her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Örnekler ayrıca fazladan 24 saat ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saat ve 48 saat inkübasyondan sonra besiyeri (üst faz) uzaklaştırılarak ve MTT' nin 5 mg/mL içeren serumsuz besiyeri 100 µL olacak şekilde her bir kuyucuğa eklenmiştir. Karanlıkta 37 °C sıcaklıkta inkübasyonun 4 saat sonrasında, reaksiyona girmemiş MTT içeren besiyeri dikkatlice uzaklaştırılarak, 100 µL izopropil alkol, formazan kristallerinin çözünmesi için her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Platelere, 10 dakika boyunca çalkalanmıştır ve absorbansı plaka-okuma spektrofotometresi (Biochrom EZ Read 400) ile 570 nm' de ölçüm alınmıştır. Muamele edilen hücrelerin absorbansı kontrol ile karşılaştırılmıştır ve yalnızca normal bir besiyerine maruz kalan hücreler % 100 canlı olarak kabul edilmiştir.

Tüm deneysel veriler ortalama±standart sapma (SD) olarak temsil edilmiştir. Grafikler, Y-ekseninde % hücre canlılığı ve X-ekseninde ise örneğin konsantrasyonu kullanılarak çizilmiştir. Veriler istatistiksel anlamlılık gösteren $p < 0.01$ ile öğrenci t-testi veya Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Deneyler en az üç tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

3.9 J. terrestris Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi

Bu tez çalışmasında, *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Candida albicans* (ATCC 10231), *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Salmonella typhimurium* 14074, *Bacillus subtilis* 6633, *Staphylococcus epidermidis* wt, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes* organizmaları kullanılmıştır. Bakteriler BHI Broth besiyerinde, maya türü Sabouraud dextrose agar besiyerlerinde uygun inkübasyon koşullarında üretimleri gerçekleştirilmiştir. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi CLSI (Wikler) tarafından tanımlanan agar disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Kısaca, taze 24 saatlik kültürün 100 µL' si Mueller-Hinton Agar üzerine eküvyon çubukla inoküle edilmiştir ve ardından 20 dakika süre ile kurumaya bırakılmıştır. Steril koşullar altında kültür plateleri içine diskler yerleştirilerek her bir disk için hazırlanan kitosan çözeltisi 20µl olarak yüklenmiştir ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler üç tekrar olarak yapılmıştır. Ortalama inhibisyon zon çapı mm olarak ölçülmüştür.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

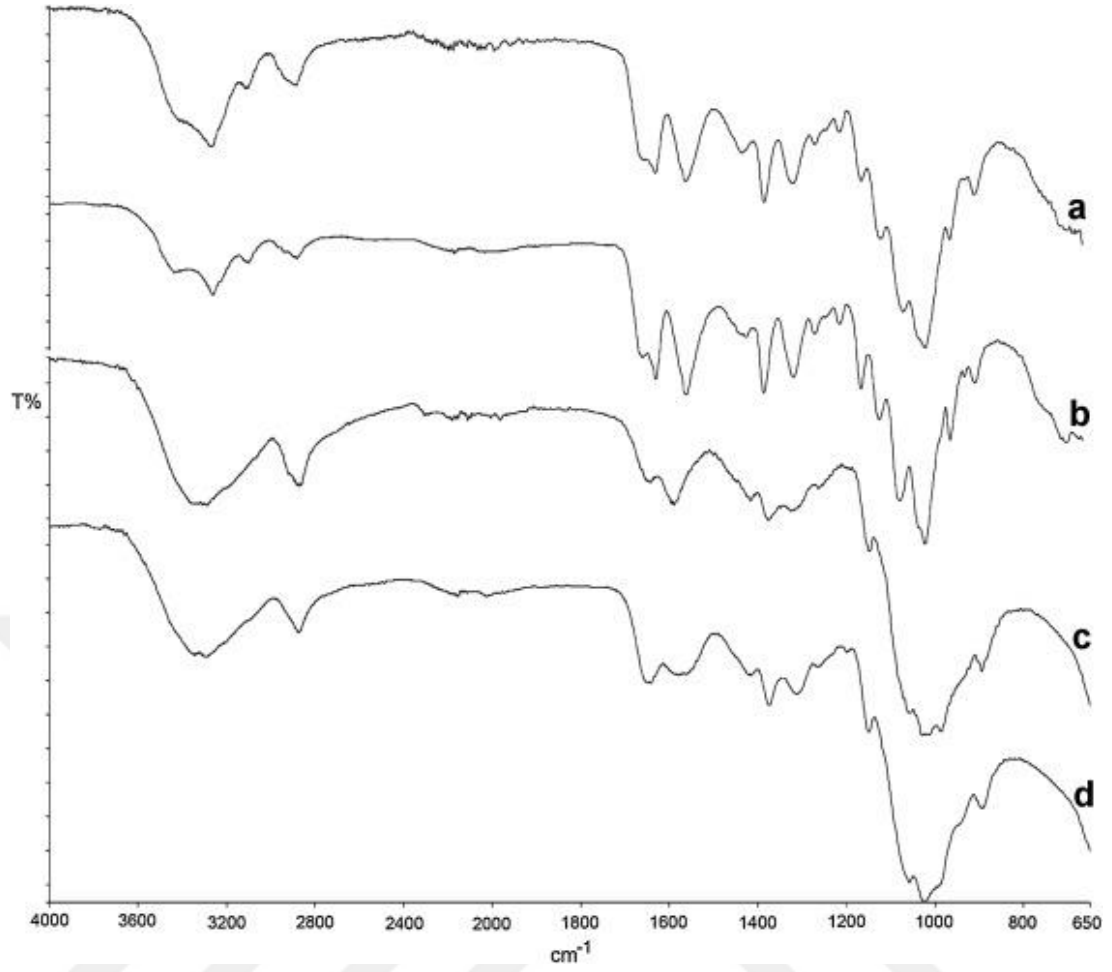
4.1 Yeni üretilen *J. terrestris* kitosanının eşsiz özellikleri

Normalde kitin örneğini kitosana çevirirken yüksek sıcaklıkta bazik bir ortam gibi zorlu şartlar gerekmektedir. Zorlu deasetilasyon işlemi boyunca kitinin orijinal şeklini koruması çok zordur. Bu çalışmada, kitin halkalarından kitosan halkalarının üretimi sert deasetilasyon koşullarına rağmen başarılmıştır. Bu da organizmadaki *J. terrestris*'deki kitinin doğasından kaynaklanmaktadır.

4.2 FT-IR

J. terrestris 3D kitin ve ticari kitinin amid II bandı (N-H, C-N gerilimi) 1551cm^{-1} olarak kaydedilmiştir. *J. terrestris* 3D kitin ve ticari kitinin diğer bantları sırasıyla 3437 ve 3448cm^{-1} (O-H gerilimi); 3265 ve 3254cm^{-1} (asimetrik N-H gerilimi); 1151 ve 1154cm^{-1} (C-O-C asimetrik gerilimi); ve 1113 ve 1115cm^{-1} (C-O-C simetrik gerilimi) olarak gözlenmiştir.

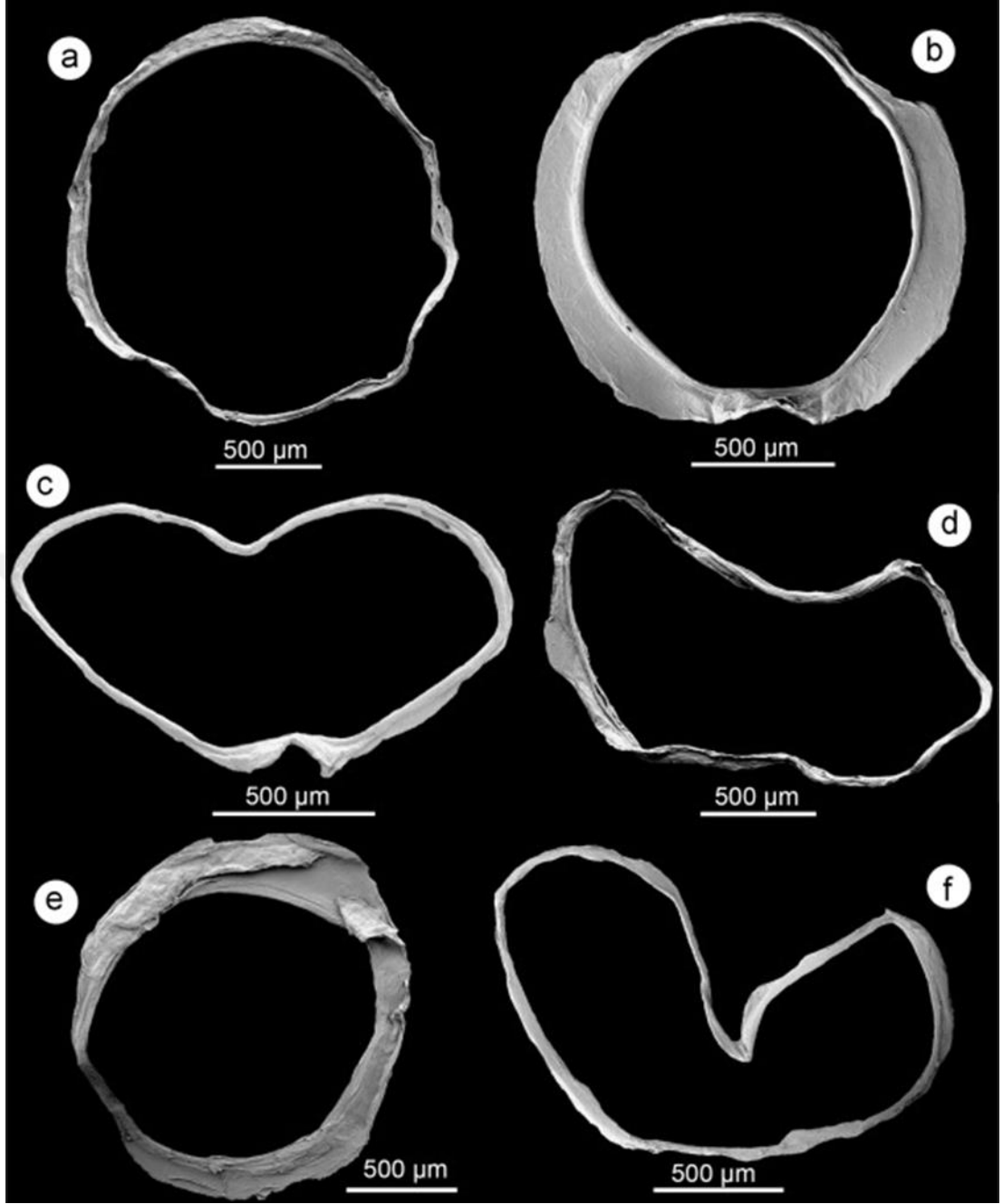
Kitinin deasetillenmesinden sonra 1620cm^{-1} bandı kaybolmuştur ve 1550cm^{-1} bandı 1590cm^{-1} bandına dönüşmüştür (Al Sagheer vd., 2009). Bu çalışmada ise *J. terrestris* 3D kitosan ve ticari kitosan için karakteristik bantlar sırasıyla 1646 ve 1647cm^{-1} (amid I, karbonil $\nu(\text{C} = \text{O})$); 1593 ve 1586cm^{-1} (amid II, amin $\nu(\text{NH}_2)$) olarak kaydedilmiştir. Şekil 4.1.c,d' de görüldüğü üzere *J. terrestris* 3D kitosan ile ticari kitosanın tüm bantları birbirine çok yakın bantlara sahip olduğu kaydedilmiştir. Bu sonuçlara göre *J. terrestris*' den elde edilen 3D kitinin başarılı bir şekilde deasetillenerek 3D kitosan elde edildiği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.1: FT-IR spektrumları: a) *J.terrestris* 3D kitin halkalar, b) Sigma-Aldrich kitin, c) *J. terrestris* 3D kitosan halkalar ve d) Sigma-Aldrich kitosan.

4.3 SEM görüntüleri

J. terrestris' den elde edilen 3D kitin halkaların SEM görüntüleri Şekil 4.2.' te gösterilmiştir. Islak kitin örnekleri esnek yapıya sahip olduklarından (Şekil 4.2.a,b) kolayca şekil verilebilmiştir (Şekil 4.2.c,d). Ayrıca 3D kitosanlar da ıslak formda esnek yapıya sahiptir (Şekil 4.2.e,f).



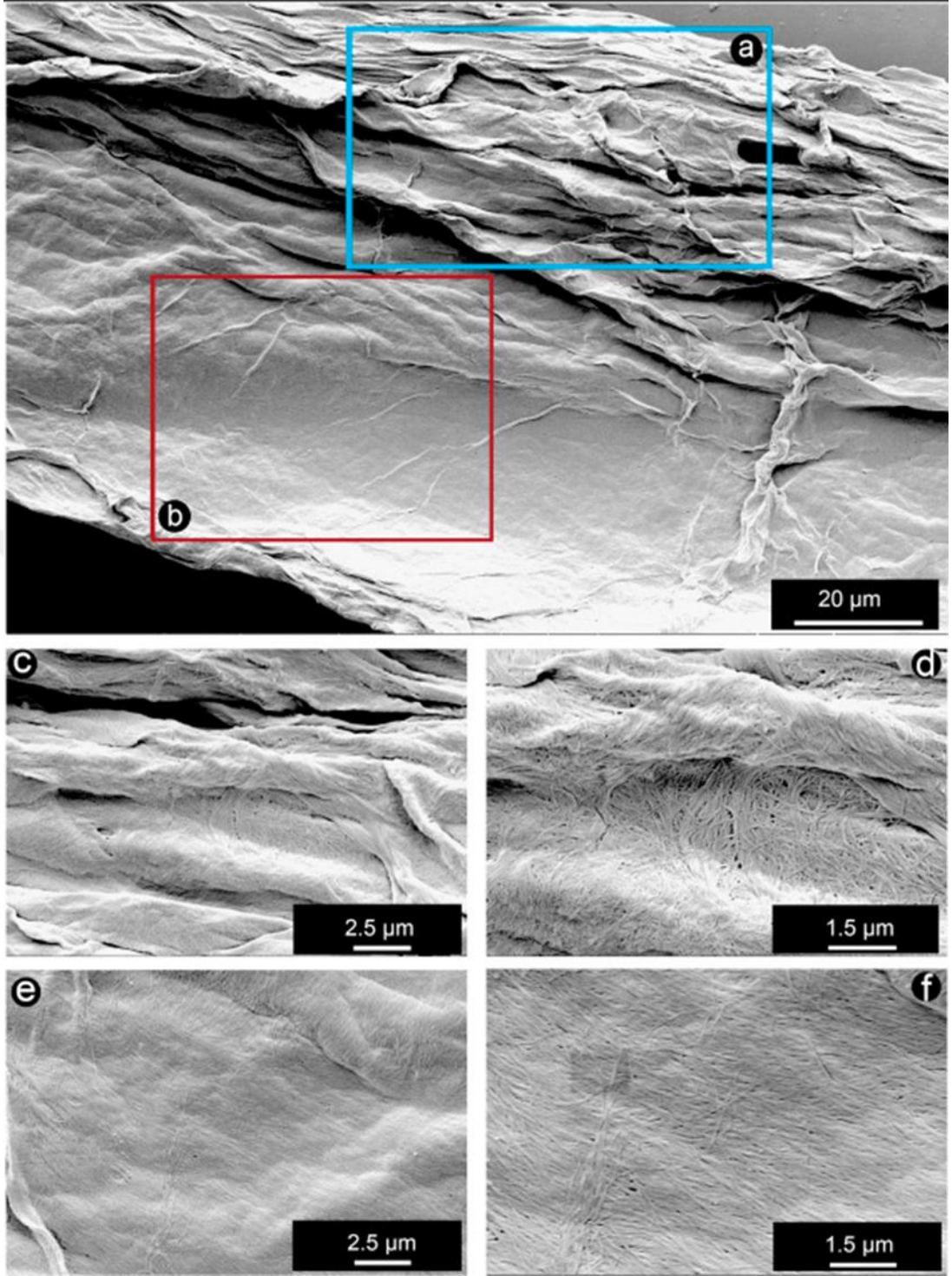
Şekil 4.2: SEM görüntüleri: a, b, c ve d) *J. terrestris*'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitin; e, f) *J. terrestris*'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitosan.

SEM görüntüsünde 3D kitin halkaların iki tip kenarı vardır; (1) iç katlanmış kısım (Şekil 4.3.a), (2) dış düz yüzeyli kısım (Şekil 4.3.b). Dış düz yüzey, nanofiber ile birlikte düz bir yapıya (Şekil 4.3.e,f) sahipken iç katlanmış kısım nanofiber içeren pürüzlü bir yapıya (Şekil 4.3.c,d) sahip olduğu gözlenmiştir. 3D kitin halkalar gibi 3D kitosan halkalar da iki tip kenara sahip olduğu bulunmuştur; (1) iç katlanmış pürüzlü yüzey (Şekil 4.4.a) ve (2) dış düz yüzey (Şekil 4.4.b), fakat kitinden farklı

olarak kitosan halkaların 2 tipinde de çok fazla por olduğu görülmüştür (Şekil 4.4.c,d). Kitin halkalarda bulunan nanofiberlerin boyutu 14.3-38.4 nm aralığında olduğu belirlenirken kitosan halkaların ise 7.9-33.1 nm aralığında olduğu belirlenmiştir.

3D halkaların çapları 0.35 ± 1.4 mm olarak ölçülmüştür. 3D halkalar 2 farklı boyuta sahiptir. İlki, dar boyut 19.8 ± 87 μm aralığında (Şekil 4.2.a,c,d,f) iken ikincisinin geniş boyutu 36.2 ± 139 μm aralığında değişen (Şekil 4.2.b,e) boyutlara sahip olduğu bulunmuştur.

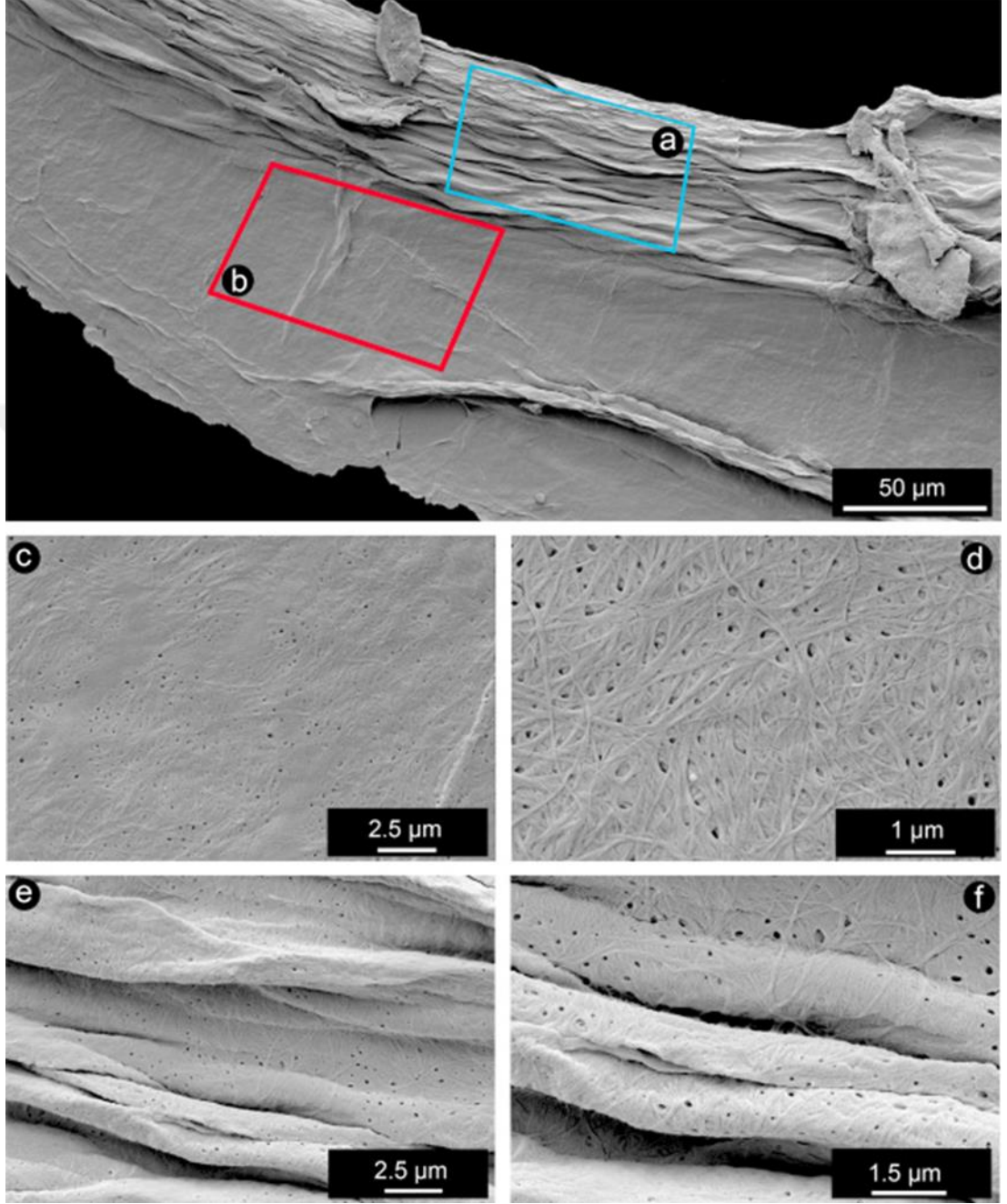




Şekil 4.3: *J. terrestris*' den elde edilen 3D kitin halkaların SEM resimleri: a, b, c ve d) iç katlanmış kısım; e, f) dış düz kenar.

Bu çalışmada *J. terrestris*' den elde edilen 3D kitin, fiberli bir yüzey sergilemiştir ve bu tip yüzey morfoloji daha önceki çalışmamızda da rapor edilmiştir (Kaya vd., 2014). Diğer taraftan 3D kitosan halkaların fiber ve porlu bir yüzeye sahip olduğu

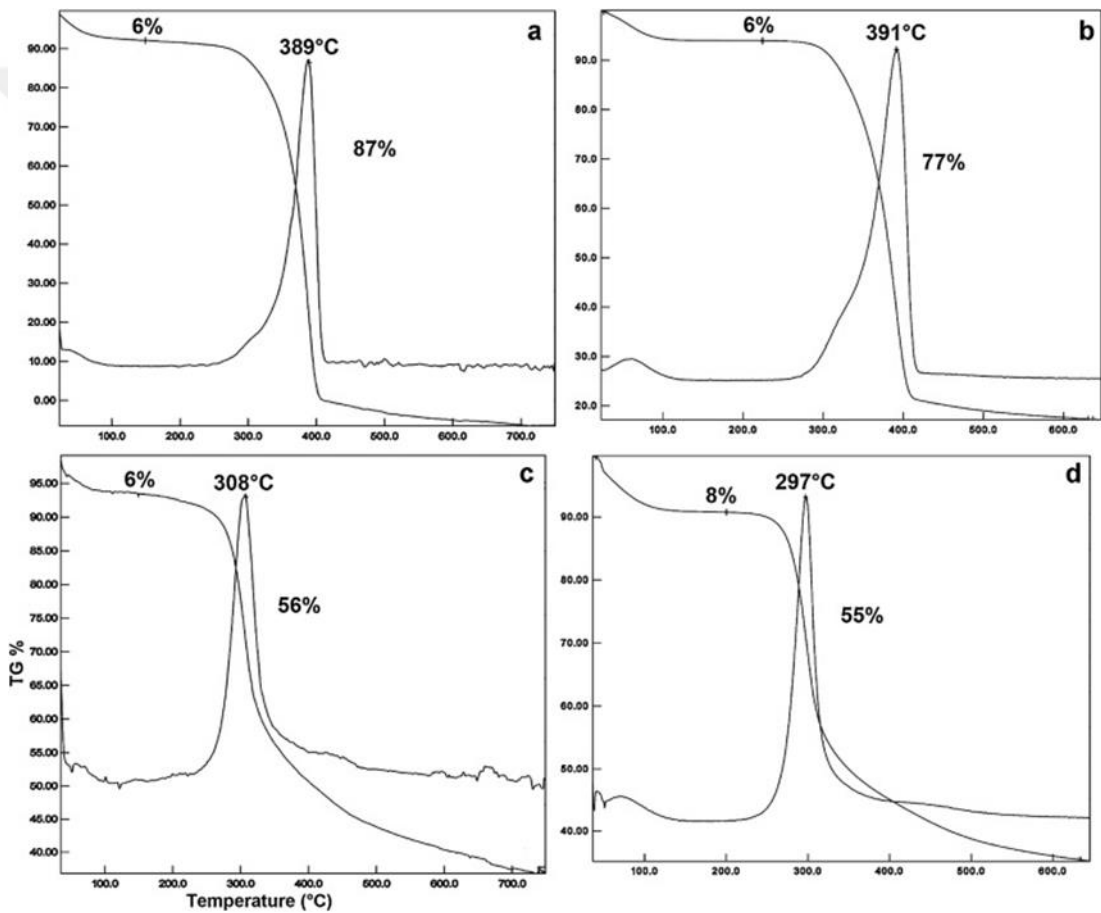
gözenmiştir. Bu çeşit yüzey morfolojileri de önceki çalışmamızda kaydedilmiştir (Kaya vd., 2014).



Şekil 4.4: *J. terrestris* 'den elde edilen 3D kitosan halkaların SEM resimleri: a, b, c ve d) iç katlanmış kısım; e, f) dış düz kenar.

4.4 TGA

J. terrestris’ den elde edilen 3D kitin ve kitosanların termal bozunmaları 2 basamakta gerçekleşmiştir. İlk basamakta biyopolimerin yapısındaki suyun buharlaşması, ikinci basamakta ise biyopolimerin termal bozunması ile ilgili olduğu Tang ve arkadaşları tarafından 2005 yılında kaydedilmiştir (Tang vd., 2005). DTG_{max} değeri, 3D kitin için 389 °C, ticari kitin için ise 391 °C olarak bulunmuştur (Şekil 4.5.a,b). 3D kitosanın ve ticari kitosanın DTG_{max} değeri sırasıyla 308 °C ve 297 °C olarak gözlenmiştir (Şekil 4.5.c,d).



Şekil 4.5: TGA eğrileri: a) *J. terrestris* 3D kitin halkalar, b) Sigma-Aldrich kitin, c) *J. terrestris* 3D kitosan halkalar ve d) Sigma-Aldrich kitosan.

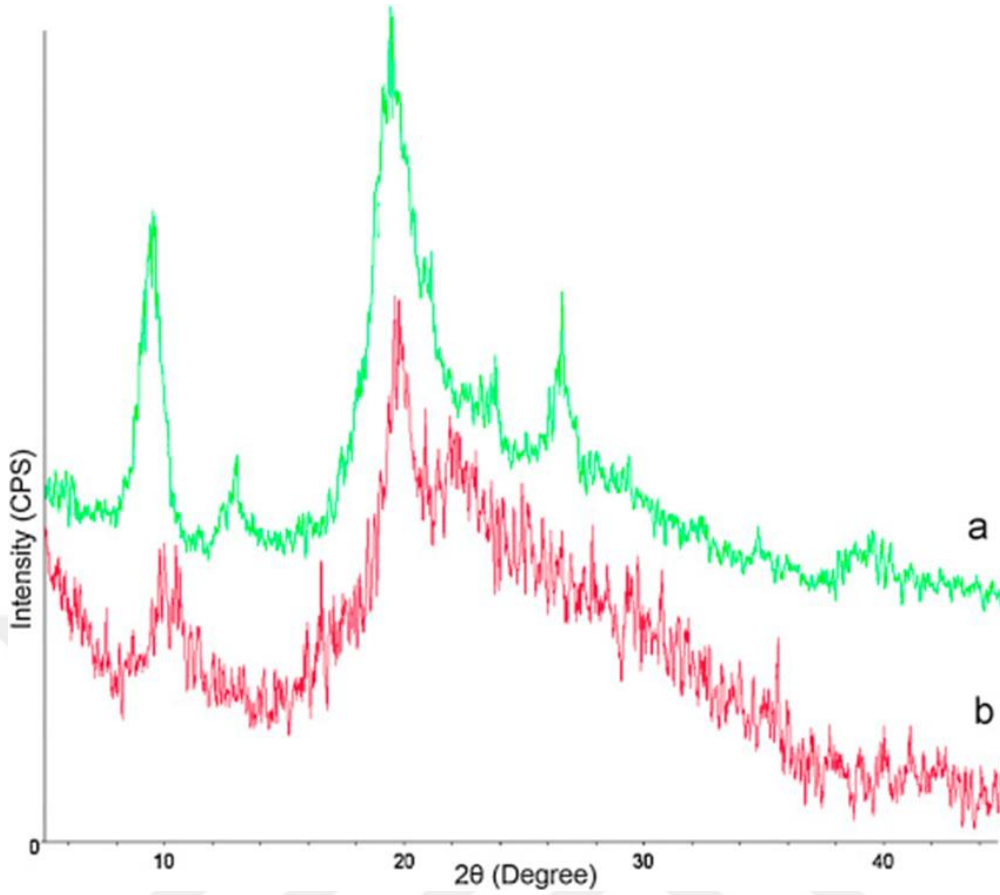
Kitin ve kitosanın termal kararlılığı kullanılan kitin temelli örneğin özelliklerinin belirlenmesinde kullanışlı bir yöntemdir (Wysokowski vd., 2013c). Kitin ve türevlerinin kütle kaybının iki basamakta olduğu daha önceki çalışmada rapor edilmiştir (Paulino vd., 2006). Literatüre bakıldığında, kitinin DTG_{max} değeri 380 °C

civarında ve kitosanın DTG_{max} değeri ise 300 °C civarında olduğu rapor edilmiştir (Jang vd., 2004; Paulino vd., 2006). Bu sonuçlar göz önüne alındığında 3D kitinin DTG_{max} değerinin ticari kitin ile 3D kitosanın ise ticari kitosan ile DTG_{max} değerinin çok yakın olduğu bulunmuştur.

4.5 XRD

3D kitinin XRD pikleri 9.58, 13.04, 19.46, 20.98, 23.66 ve 26.62° olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.6.) ve Jang ve arkadaşlarına (2004) göre tüm bu piklerin α -kitin için karakteristiktir (Jang vd., 2004). 3D kitosanın XRD pikleri ise 9.86 ve 19.66° olarak bulunmuştur (Şekil 4.6.) ve tüm pikler Al Sagheer ve arkadaşlarına (2009) göre 10° ve 20° civarındaki piklerin kitinden başarılı bir şekilde kitosan elde edildiğini göstermektedir (Al Sagheer vd., 2009).

3D kitin ve kitosanın CrI değerleri sırasıyla % 64.7 ve % 50.4 olarak hesaplanmıştır. Önceki çalışmalarda, farklı kabukluların kabuğundan elde edilen kitin örneklerinin CrI değerleri % 80-90 aralığında kaydedilmiştir (Al Sagheer vd., 2009; Sajomsang ve Gonil, 2010). Bu çalışmada 3D kitin ve kitosanın CrI değerleri önceki çalışmalardaki sonuçlar ile daha düşük bulunmuştur. 3D kitosanın CrI değerinin 3D kitine göre daha düşük olması kitinin deasetilasyonundan kaynaklanabilir. Kitin deasetillendikten sonra tabakalar arası hidrojen bağlarının arasındaki bozulmasının bir sonucu olarak kristalinite azalmaktadır (Al Sagheer vd., 2009).



Şekil 4.6: XRD kırınım görüntüsü; a) *J. terrestris*'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitin ve b) *J. terrestris*'in vücut segmentlerinden elde edilen 3D kitosan.

4.6 Kitosanın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi ve Elemental Analizi

Kitosan, molekül ağırlığı bakımından üç gruba ayrılmaktadır; (1) düşük molekül ağırlıklı kitosan (50 kDa' dan daha düşük), (2) orta molekül ağırlıklı kitosan (50-150 kDa), (3) yüksek molekül ağırlıklı kitosan (150 kDa' dan daha yüksek) (Goy vd., 2009). Bu çalışmada yeni elde edilen 3D kitosanların molekül ağırlığı 4.31 kDa olarak belirlenmiştir. Bu sonuç 3D kitosanların düşük molekül ağırlığına sahip olduğunu göstermiştir. Aranaz ve ark. (2009), düşük molekül ağırlıklı kitosanlar, gen taşıma, gıda kaplama ve yara iyileşmesi gibi uygulama alanları için tercih edilmeye uygun olduğunu göstermiştir (Aranaz vd., 2009). Düşük molekül ağırlıklı kitosanların ayrıca elektrospınleme ile nanofiber üretiminde kullanılmıştır (Homayoni vd., 2009). Elemental analiz sonuçlarına bakıldığında 3D kitosanın, N, C ve H içeriği sırasıyla % 7.96, % 45.12 ve %6.52 olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar kullanılarak 3D kitosanın DA'sı % 69.13 olarak hesaplanmıştır.

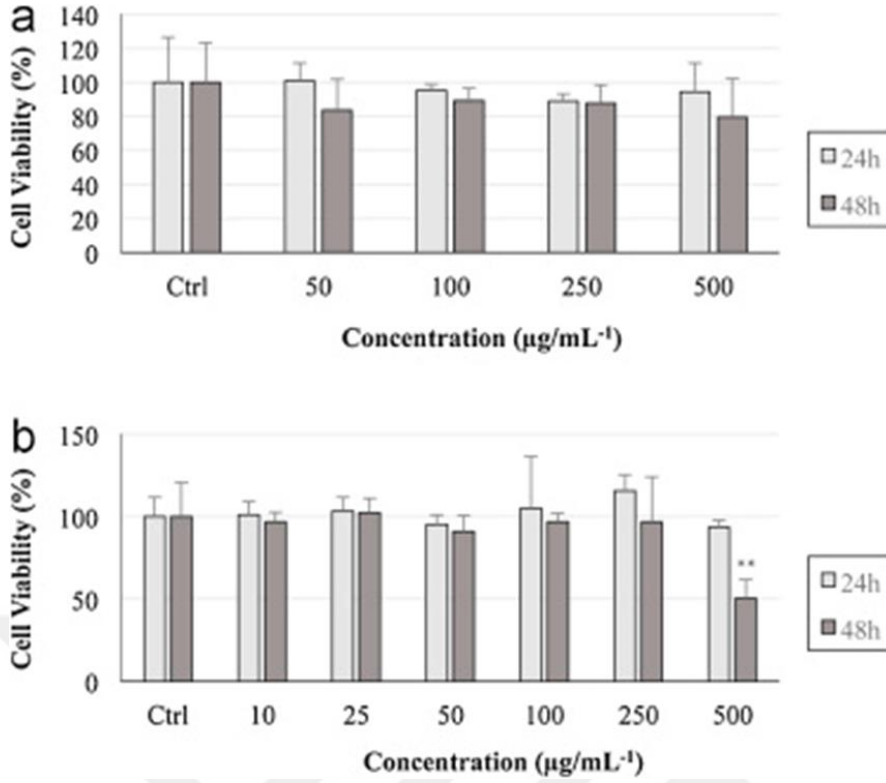
4.7 *J. terrestris* Kitosan ile Plazmid DNA Etkileşimi

Anyonik plazmid DNA'nın katyonik polisakkaritler ile bağ yapabilme kapasitesi yüksektir. Katyonik bir biyopolimer olan kitosan gen transfeksiyonu için DNA polimer kompleksi ürünlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (de İlarduya vd., 2010). Bu çalışmada ise çeşitli konsantrasyonlarda (0, 0.4, 0.04 ve 4 mg/mL) hazırlanan *J. terrestris* kitosan çözeltileri test edilmiştir ve plazmid DNA konsantrasyonu sonunda her bir kitosan çözeltisi için 10 dakika inkübasyon sonunda sonuçlar; 0 mg/mL (kontrol): 199.5 ± 8.6 , 0.04 mg/mL: 174.9 ± 5.6 , 0.4 mg/mL: 81.6 ± 16.5 , 4 mg/mL: 47.1 ± 12.1 ng/ μ L olarak kaydedilmiştir. En yüksek kitosan çözeltisi (4 mg/mL) için kontrole göre plazmid DNA konsantrasyonu 4 kat azalmıştır, plazmid DNA için kitosan yüksek aktivite göstermiştir.

Bu çalışmada ise *J. terrestris*' den elde edilen kitosanın DNA etkileşimi için kullanılabilir olduğu ve bu kitosanın biyomedikal mühendisliğinde uygulanmak için bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

4.8 *J. terrestris* Kitosanın Sitotoksitesi ve Antitümör Etkisi

J. terrestris kitosanın fibroblast hücreleri (L929) için nantoksik olduğu bulunmuştur. Fibroblast (L929) hücrelerinin 24 ve 48 saat kitosan çözeltisi ile maruz bırakılarak sitotoksite sonuçları Şekil 4.7.a' da gösterilmiştir. L929 hücrelerine karşı test edilen tüm kitosan çözeltileri 24 ve 48 saat maruz bırakıldıklarında yüksek canlılık seviyesi (% 80) sergilerken yüksek oranda hücre canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Kitosanın antitümör aktivitesini incelemek için invitro HeLa hücre hattına karşı MTT analizi kullanılmıştır. 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerin çoğalmaya karşı aktivitesi 10-500 μ g/mL aralığında kullanılan kitosan konsantrasyonunun hücre hattı üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.7.b). *J. terrestris* kitosanının 500 μ g/mL konsantrasyonu, 48 saatin sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında HeLa hücrelerinin büyümesinde önemli bir şekilde azalma göstermiştir (Şekil 4.7.b).



Şekil 4.7: *J. terrestris*’ den elde edilen 3D kitosanın 24 ve 48 saat için a) L929 hücre hattının hücre yaşayabilirliği, b) HeLa hücrelerinin MTT sonuçları. Sonuçlar, en azından üç tekrarlı olarak ortalama±SD ortalaması olarak gösterilir (** p < 0.01).

Önceki çalışmalarda kitosanın farklı kanser hücre hatlarına önemli bir antitümör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Kitosanın antitümör aktivitesi üzerine; molekül ağırlığı, DA, pH ve kitosanın elde edildiği kaynak gibi dört farklı karakteristik özeliği vardır.

Chien ve ark. (2016), yengeç kabuğu ve mantardan kitosan elde etmişlerdir ve ikisinden elde edilen kitosanların antitümör etkilerini analiz etmişlerdir. Mantardan elde edilen kitosanın antitümör aktivitesinin yengeç kabuğundan elde edilen kitosandan biraz daha yüksek olduğunu görmüşlerdir. Bu sonuç da kitosanın antitümör aktivitesinin kaynağına göre değiştiğini göstermektedir. Ayrıca, düşük molekül ağırlığına sahip kitosanın yüksek molekül ağırlıklı kitosana göre daha yüksek bir anti-tümör aktiviteye (Hep G2 üzerine) sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmalar, genellikle düşük molekül ağırlıklı kitosanın yüksek molekül ağırlıklı kitosana göre daha yüksek antitümöraktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışması aynı zamanda diplopod vücut segmentlerinden elde edilen düşük molekül ağırlıklı kitosanın (4.31 kDa) HeLa hücre hattı üzerine yüksek antiproliferatif etkinliği olduğunu göstermiştir. Düşük sitotoksosite, *J. terrestris* kitosanının HeLa hücrelerine karşı önemli bir antiproliferatif ajan olduğu göstermiştir.

4.9 *J. terrestris* Kitosanının Antimikrobiyal Aktivitesi

J. terrestris kitosanının 11 bakteri ve bir maya (*C. albicans*) üzerine antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır ve *J. terrestris* kitosanının en yüksek *S. aureus* 29213 ($15.6 \pm 1.154\text{mm}$) ve *K. pneumoniae* 700603 ($6.3 \pm 0.574\text{mm}$)' e karşı en düşük aktivite göstermiştir. *E. coli* 25922, *E. faecalis* 29212, *P. vulgaris* ve *L. monocytogenes* 19117 üzerinde antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir. *J. terrestris* kitosanının diğer organizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin inhibisyon zon çaplarındaki azalmaya göre sırasıyla şu şekilde kaydedilmiştir; *E. aerogenes* ($14.3 \pm 1.154\text{mm}$), *S. epidermidis* wt ($14 \pm 1\text{mm}$), *B. subtilis* 6633 ($13 \pm 0.577\text{mm}$), *S. typhimurium* 14074 ($12.6 \pm 0.577\text{mm}$), *C. albicans* 10231 ($12.3 \pm 0.577\text{mm}$) ve *P. aeruginosa* 27853 ($9 \pm 1.732\text{mm}$).

S. aureus, insanlarda sık sık enfeksiyonlara neden olan yaygın bir insan patojendir (Campanile vd., 2015). Bu tez çalışmasında kullanılan düşük molekül ağırlıklı *J. terrestris* kitosan (4.31 kDa)' nın *S. aureus* bakterisine karşı çok etkili olduğu dikkat çekicidir. Bu sonuçların aksine önceki çalışmada yüksek molekül ağırlığına sahip kitosanın (>300 kDa) *S. aureus* bakterisine karşı çok yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Zheng ve Zhu, 2003). Ayrıca *J. terrestris* kitosan düşük DA (% 69.13)'ya sahip olduğu bulunmuştur. Önceki yapılan bir çalışma ile *S. aureus*' a karşı düşük DA' ya sahip kitosanın daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Hongpattarakere ve Riyaphan, 2008).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Bu tez çalışmasında, 3D kitin ve kitosan halkaların üretimi ilk kez *J. terrestris* diplopod'un vücut segmentlerinden elde edilmiştir.
2. Elde edilen ürünlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi çeşitli analitik cihazlar (FT-IR, SEM, TGA, XRD, seyreltilmiş çözelti viskometre ve elemental analiz) kullanılarak yapılmıştır ve sonuçlar 3D kitin ve kitosan halkalar ile ticari olarak temin edilen kitin ve kitosan ile karşılaştırılmıştır.
3. Bu tez çalışmasının önceki çalışmalardan farklı olarak ilk kez Diplopoda türünden basit bir işlem uygulanarak belirgin bir şekle sahip 3D kitosan halkaların üretilmesi olmuştur.
4. İlk kez elde edilen *J. terrestris* kitosan ile plazmid DNA (pGL4.13)' nın etkileşimi belirlenmiştir.
5. *J. terrestris* kitosan ile fibroblast L929 ve HeLa hücre hatları üzerinde sitotoksosite ve antiproliferatif aktivitesi belirlenmiştir.
6. 3D kitosanın sahip olduğu düşük molekül ağırlığı (4.31 kDa) nedeniyle hücre hatları (HeLa ve L929) üzerine antiproliferatif ajan olarak kullanılabilir bir biyomalzeme olduğu bu tez çalışması ile belirlenmiştir.
7. *J. terrestris* kitosanının disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes* suşları ile antimikrobiyal aktivitelerinin nasıl olduğu bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

8. Daha önceki çalışmalarda süngerden elde edilen 3D kitinlerin doku mühendisliği, hücre kültürü çalışmaları, uranyum adsorpsiyonu ve zirkonyum depolaması çalışmalarında kullanılarak önemli sonuçlar alınmıştır ve 3D kitin malzemenin elde edilmesine zemin sağlamıştır.

9. Ayrıca kitosanın kitine göre daha yüksek antimikrobiyal özelliğe sahip olmasından dolayı 3D kitosanların gıda, medikal ve tıp gibi mikrobiyal oluşumun istenmediği alanlarda tercih edilebilecektir.

10. 3D kitosanın sahip olduğu yüzey morfolojisinin sıkı nanofiber ve nanoporlu yapısından dolayı filtreleme ve adsorpsiyon çalışmaları için uygun işleve sahiptir.

Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, uygulama alanlarında yeni, kullanışlı ve etkisi yüksek olan 3D kitosan üretimi farklı canlılar kullanılarak ileriki çalışmalar için temel sağlayabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdou, E. S., Nagy, K. S. A. ve Elsabee, M. Z., 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresource Technology*, 99, 5, 1359-1367.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N. ve Aminabhavi, T. M., 2004. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 1, 5-28.
- 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.
- Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P. T. S., Deepthi, S., Chennazhi, K. P., Ehrlich, H., Tsurkan, M. ve Jayakumar, R., 2014. Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 39, 9, 1644-1667.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. ve Heras, A., 2009. Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.
- Bazhenov, V. V., Wysokowski, M., Petrenko, I., Stawski, D., Sapozhnikov, P., Born, R., Stelling, A. L., Kaiser, S. ve Jesionowski, T., 2015. Preparation of monolithic silica-chitin composite under extreme biomimetic conditions, *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 33-38.
- Blower, G., 1951. A comparative study of the chilopod and diplopod cuticle, *Journal of Cell Science*, 3, 18, 141-161.
- Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P., Hedrich, R., Hunoldt, S., Kammer, M., Machill, S., Paasch, S., Bazhenov, V. V., Kurek, D. V., Arnold, T., Brockmann, S., Ruhnow, M. ve Born, R., 2009. Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*, *Journal of Structural Biology*, 168, 3, 539-547.
- Campanile, F., Bongiorno, D., Perez, M., Mongelli, G., Sessa, L., Benvenuto, S., Gona, F., Varaldo, P. E. ve Stefani, S., 2015. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in

- Italy: first nationwide survey, 2012, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 3, 4, 247-254.
- Chien, R.-C., Yen, M.-T. ve Mau, J.-L., 2016. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells, *Carbohydrate Polymers*, 138, 259-264.
- Cong, P. Y., Xia, X. H. ve Yang, Q., 2009. Monophyly of the ring-forming group in Diplopoda (Myriapoda, Arthropoda) based on SSU and LSU ribosomal RNA sequences, *Progress in Natural Science-Materials International*, 19, 10, 1297-1303.
- De Ilarduya, C. T., Sun, Y. ve Düzgüneş, N., 2010. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 3, 159-170.
- Ehrlich, H., Kaluzhnaya, O. V., Brunner, E., Tsurkan, M. V., Ereskovsky, A., Ilan, M., Tabachnick, K. R., Bazhenov, V. V., Paasch, S., Kammer, M., Born, R., Stelling, A., Galli, R., Belikov, S., Petrova, O. V., Sivkov, V. V., Vyalikh, D., Hunoldt, S. ve Worheide, G., 2013. Identification and first insights into the structure and biosynthesis of chitin from the freshwater sponge *Spongilla lacustris*, *Journal of Structural Biology*, 183, 3, 474-483.
- Ehrlich, H., Maldonado, M., Spindler, K. D., Eckert, C., Hanke, T., Born, R., Goebel, C., Simon, P., Heinemann, S. ve Worch, H., 2007. First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (Demospongia: porifera), *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution*, 308B, 4, 347-356.
- Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z. ve Born, R., 2010a. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 2, 132-140.
- Ehrlich, H., Steck, E., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z., Carballo, J. L., Schiaparelli, S., Ereskovsky, A., Schupp, P., Born, R., Worch, H., Bazhenov, V. V., Kurek, D., Varlamov, V., Vyalikh, D., Kummer, K., Sivkov, V. V., Molodtsov, S. L., Meissner, H., Richter, G., Hunoldt, S., Kammer, M., Paasch, S., Krasokhin, V., Patzke, G., Brunner, E. ve Richter, W., 2010b. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part II: Biomimetic potential and applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 2, 141-145.

- Goy, R. C., de Britto, D. ve Assis, O. B. G., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan, *Polimeros-Ciencia E Tecnologia*, 19, 3, 241-247.
- Homayoni, H., Ravandi, S. A. H. ve Valizadeh, M., 2009. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization, *Carbohydrate Polymers*, 77, 3, 656-661.
- Hongpattarakere, T. ve Riyaphan, O., 2008. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 1, 1.
- Hu, W. W., Chen, Y. J., Ruaan, R. C., Chen, W. Y., Cheng, Y. C. ve Chien, C. C., 2014. The regulation of DNA adsorption and release through chitosan multilayers, *Carbohydrate Polymers*, 99, 394-402.
- Hutmacher, D. W., 2000, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage., *Biomaterials*, 21, 24, 2529-2543.
- Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., & Saimoto, H., 2011, Preparation of chitin nanofibers from mushrooms, *Materials*, 4, 12, 1417-1425.
- 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.
- Jayakumar, R., Chennazhi, K. P., Muzzarelli, R. A. A., Tamura, H., Nair, S. V. ve Selvamurugan, N., 2010. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy, *Carbohydrate Polymers*, 79, 1, 1-8.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. S., Nair, S. V., Furuike, T. ve Tamura, H., 2011. Novel chitin and chitosan materials in wound dressing, In *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*. InTech.
- Jiang, M., Ouyang, H., Ruan, P., Zhao, H., Pi, Z., Huang, S., Yi, P. ve Crepin, M., 2011. Chitosan derivatives inhibit cell proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells, *Anticancer Research*, 31, 4, 1321-1328.
- Jung, J. ve Zhao, Y., 2012. Comparison in antioxidant action between α -chitosan and β -chitosan at a wide range of molecular weight and chitosan concentration, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 9, 2905-2911.
- Kaya, M., Baran, T., Menten, A., Asaroglu, M., Sezen, G. ve Tozak, K. O., 2014. Extraction and characterization of α -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food Biophysics*, 9, 2, 145-157.

- Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E. ve Tubelytė, V., 2015a, First chitin extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 126-132.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L. ve Sofi, K., 2015b, Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee, *Carbohydrate Polymers*, 132, 9-16.
- Kaya, M., Baublys, V., Sargin, I., Šatkauskienė, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelytė, V., Baran, T., Seyyar, O., Kabalak, M. ve Yurtmen, H., 2016a, How Taxonomic Relations Affect the Physicochemical Properties of Chitin, *Food Biophysics*, 11, 1, 10-19.
- Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I. ve Mujtaba, M., 2016b., Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp). *Carbohydrate Polymers*, 145, 64-70.
- Kaya, M., Sargin, I., Al-jaf, I., Erdogan, S. ve Arslan, G., 2016c., Characteristics of corneal lens chitin in dragonfly compound eyes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 54-61.
- Kaya, M. ve Sargin, I., 2016. Highly Fibrous and Porous Raw Material Shaped Chitin Isolated from *Oniscus* sp.(Crustacea), *Food Biophysics*, 11, 1, 101-107.
- Kim, H. L., Jung, G. Y., Yoon, J. H., Han, J. S., Park, Y. J., Kim, D. G., Zhang, M. ve Kim, D. J., 2015. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 54, 20-25.
- Kurita, K., 2006. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans, *Marine Biotechnology*, 8, 3, 203-226.
- Lavall, R. L., Assis, O. B., & Campana-Filho, S. P., 2007, β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization, *Bioresource Technology*, 98, 13, 2465-2472.
- Lim, C., Halim, A., Lau, H., Ujang, Z. ve Hazri, A., 2006. In vitro cytotoxicology model of oligo-chitosan and N,O-carboxymethyl chitosan using primary normal human epidermal keratinocyte cultures, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics: JABB*, 5, 2, 82-87.
- Maeda, Y. ve Kimura, Y., 2004. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial

- lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice, *The Journal of Nutrition*, 134, 4, 945-950.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 1, 55-63.
- Nam, J. P. ve Nah, J. W., 2016. Target gene delivery from targeting ligand conjugated chitosan-PEI copolymer for cancer therapy, *Carbohydrate Polymers*, 135, 153-161.
- Norman, M., Bartczak, P., Zdarta, J., Tylus, W., Szatkowski, T., Stelling, A. L. ve Jesionowski, T., 2014. Adsorption of CI Natural Red 4 onto spongin skeleton of marine demosponge, *Materials*, 8, 1, 96-116.
- Park, B. K. ve Kim, M. M., 2010. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 12, 5152-5164.
- Park, J. K., Chung, M. J., Choi, H. N. ve Park, Y. I., 2011. Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 1, 266-277.
- Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C. ve Nozaki, J., 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydrate Polymers*, 64, 1, 98-103.
- Rasad, M. S. B. A., Halim, A. S., Hashim, K., Rashid, A. H. A., Yusof, N. ve Shamsuddin, S., 2010. In vitro evaluation of novel chitosan derivatives sheet and paste cytocompatibility on human dermal fibroblasts, *Carbohydrate Polymers*, 79, 4, 1094-1100.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 7, 603-632.
- Roberts, G. A. F. ve Domszy, J. G., 1982. Determination of the viscometric constants for chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 4, 6, 374-377.
- Rorrer, G. L., Hsien, T. Y. ve Way, J. D., 1993. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from wastewater, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 32, 9, 2170-2178.
- Sajomsang, W. ve Gonil, P., 2010. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs, *Materials Science and Engineering C*, 30, 3, 357-363.
- Sarkar, K. ve Kundu, P. P., 2012. Preparation of low molecular weight N-maleated chitosan-graft-PAMAM copolymer for enhanced DNA complexation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 5, 859-867.

- Schleuter, D., Günther, A., Paasch, S., Ehrlich, H., Kljajić, Z., Hanke, T. ve Brunner, E., 2013. Chitin-based renewable materials from marine sponges for uranium adsorption, *Carbohydrate Polymers*, 92, 1, 712-718.
- Shen, K. T., Chen, M. H., Chan, H. Y., Jeng, J. H. ve Wang, Y. J., 2009. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 8, 1864-1871.
- Sierwald, P. ve Bond, J. E., 2007. Current status of the myriapod class diplopoda (Millipedes): Taxonomic diversity and phylogeny, *Annual Review of Entomology*, 52, 401-420.
- Synowiecki, J. ve Al-Khateeb, N. A., 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 2, 145-171.
- Tang, W. J., Wang, C. X. ve Chen, D. H., 2005. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan, *Polymer Degradation and Stability*, 87, 3, 389-394.
- Tsai, G. J. ve Su, W. H., 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*, *Journal of Food Protection*, 62, 3, 239-243.
- Wang, W., Qin, W. ve Bo, S. Q., 1991. Influence of the degree of deacetylation of chitosan on its Mark-Houwink equation parameters, *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications*, 12, 9, 559-561.
- Wikler, M., 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard, 10th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Wong, Y. C., Szeto, Y. S., Cheung, W. H. ve McKay, G., 2003. Equilibrium studies for acid dye adsorption onto chitosan, *Langmuir*, 19, 19, 7888-7894.
- Wysokowski, M., Bazhenov, V. V., Tsurkan, M. V., Galli, R., Stelling, A. L., Stocker, H., Kaiser, S., Niederschlag, E., Gartner, G., Behm, T., Ilan, M., Petrenko, A. Y., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2013a. Isolation and identification of chitin in three-dimensional skeleton of *Aplysina fistularis* marine sponge, *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 94-100.
- Wysokowski, M., Behm, T., Born, R., Bazhenov, V. V., Meissner, H., Richter, G., Szwarc-Rzepka, K., Makarova, A., Vyalikh, D., Schupp, P., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2013b. Preparation of chitin-silica composites by in vitro silicification of two-dimensional *Ianthella basta* demosponge chitinous scaffolds under modified

- Stober conditions, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 33, 7, 3935-3941.
- Wysokowski, M., Motylenko, M., Bazhenov, V. V., Stawski, D., Petrenko, I., Ehrlich, A., Behm, T., Kljajic, Z., Stelling, A. L., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2013c. Poriferan chitin as a template for hydrothermal zirconia deposition, *Frontiers of Materials Science*, 7, 3, 248-260.
- Wysokowski, M., Petrenko, I., Stelling, A. L., Stawski, D., Jesionowski, T. ve Ehrlich, H., 2015. Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics, *Polymers*, 7, 2, 235-265.
- Yadollahi, M., Farhoudian, S. ve Namazi, H., 2015. One-pot synthesis of antibacterial chitosan/silver bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems, *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 37-43.
- Younes, I., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K. ve Nasri, M., 2016. Cytotoxicity of chitosans with different acetylation degrees and molecular weights on bladder carcinoma cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 200-207.
- Zhao, Y., Park, R. D. ve Muzzarelli, R. A., 2010. Chitin deacetylases: properties and applications, *Marine Drugs*, 8, 1, 24-46.
- Zheng, L. Y. ve Zhu, J. F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers*, 54, 4, 527-530.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Bahar Akyüz Yılmaz
Doğum Tarihi ve Yeri : 08.03.1990 Aksaray/ TÜRKİYE
E-posta adresi : baharakyuz90@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi, 2010-2014
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Sivas/ TÜRKİYE

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2014-2017
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü
Aksaray/ TÜRKİYE

YURTDIŞI DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Erasmus Staj Programı (21.07.2015-21.09.2015), TU Bergakademia Üniversitesi, Freiberg /ALMANYA

YAYINLAR

1.1 SCI, SCI Expanded Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

Kaya, M., Mujtaba, M., Bulut, E., **Akyuz, B.**, Zelencova, L., & Sofi, K. (2015). Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee. Carbohydrate polymers, 132, 9-16.

Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., **Akyuz, B.**, Bulut, E., & Tubelytė, V. (2015). First chitin extraction from Plumatella repens (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin. International journal of biological macromolecules, 79, 126-132.

Kaya, M., Odabasi, M., Mujtaba, M., Sen, M., Bulut, E., & **Akyuz, B.** (2016). Novel three-dimensional cellulose produced from trunk of Astragalus gummifer (Fabaceae) tested for protein adsorption performance. Materials Science and Engineering: C, 62, 144-151.

- Kaya, M., **Akyuz, B.**, Bulut, E., Sargin, I., Tan, G., Erdonmez, D., Maheta, M., Satkauskas, S., & Mickevičius, S. (2016). DNA interaction, antitumor and antimicrobial activities of three-dimensional chitosan ring produced from the body segments of a diplopod. *Carbohydrate polymers*, 146, 80-89.
- Kaya, M., **Akyuz, B.**, Bulut, E., Sargin, I., Eroglu, F., & Tan, G. (2016). Chitosan nanofiber production from *Drosophila* by electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 49-55.
- Bulut, E., Sargin, I., Arslan, O., Odabasi, M., **Akyuz, B.**, & Kaya, M. (2017). In situ chitin isolation from body parts of a centipede and lysozyme adsorption studies. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 552-563.
- Kaya, M., Mulerčikas, P., Sargin, I., Kazlauskaitė, S., Baublys, V., **Akyuz, B.**, Bulut, E., & Tubelytė, V. (2016). Three-dimensional chitin rings from body segments of a pet diplopod species: Characterization and protein interaction studies. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 716-722.
- Kaya, M., Bulut, E., Mujtaba, M., Sivickis, K., Sargin, I., **Akyuz, B.**, & Erdogan, S. (2016). Gender influences differentiation of chitin among body parts. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 93(2), 96-109.
- Kaya, M., Baublys, V., Sargin, I., Šatkauskienė, I., Paulauskas, A., **Akyuz, B.**, Bulut, E., Tubelytė, V., Baran, T., Seyyar, O. ve Kabalak, M., & Yurtmen, H., 2016, How Taxonomic Relations Affect the Physicochemical Properties of Chitin, *Food Biophysics*, 11(1), 10-19.
- Mujtaba, M., Kaya, M., Akyuz, L., Erdonmez, D., **Akyuz, B.**, & Sargin, I., 2017. Detailed adsorption mechanism of plasmid DNA by newly isolated cellulose from waste flower spikes of *Thypha latifolia* using quantum chemical calculations, *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 914-923.

1.2 Uluslararası Sempozyumda Sunulan ve Tam Metin Olarak Basılan Yayınlar

Kaya, M., Muhammad, M., Bulut, E., **Akyuz, B.**, “Recycling and physicochemical characterization of pomegranate waste peels into a green material (cellulose)” International conference on Natural Science and Engineering (ICNASE’16), DOI: 10.13140/RG.2.1.4844.8405 , 19-20 March 2015, Kilis, TURKEY.

1.3 Uluslararası Sempozyumda Sunulan Bildiriler

Kaya, M., Muhammad, M., Bulut, E., **Akyuz, B.**, Zelencova, L., ve Sofi, K., “Extraction and characterization of chitins from coachroach *Ootheca*” 9th International Scientific Conference, The Vital Nature Sign-9, DOI: 10.13140/RG.2.1.4307.4405, May 2015, Kaunas, LITHUANIA.

Sargin, I., Kaya, M., **Akyüz B.**, Bulut, E. and Arslan, G., “Macroalgal bloom biomass for congo red removal: equilibrium, kinetic, thermodynamic and competitor ions effects studies.” ECOLOGY 2017, 11-13 May, Kayseri/TURKEY.

Akyuz, L., Kaya, M., İlk, S., Cakmak, Y. S., Salaberria, A. M., Labidi, J., **Akyuz, B.**, Sargin, I., “Effect of different animal and plant oil additives on physicochemical, mechanical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films” International Conference, Smart Bio, 18-20 May 2017, Kaunas/LITHUANIA.

Ulusal Sempozyumda Sunulan Bildiriler

Bulut, E., Kaya, M., Sargin İ., **Akyuz, B.**, Muhtaba, M., “Kitosan Mikrokapsül Hazırlanması ve Karakterizasyonu” 1. Yaşam Bilimleri Sempozyumu, 23-24 Şubat 2016, Kayseri, TÜRKİYE.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Kaya, M., **Akyuz, B.**, Bulut, E., Sargin, I., Tan, G., Erdonmez, D., Maheta, M., Satkauskas, S. ve Mickevičius, S., 2016. DNA interaction, antitumor and antimicrobial activities of three-dimensional chitosan ring produced from the body segments of a diplopod. Carbohydrate Polymers, 146, 80-89.