



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ**  
**ANABİLİM DALI**

***CALIGULA JAPONICA* KAFA YAPISINDAN KİTİN FİLM ÜRETİMİ,  
KARAKTERİZASYONU VE SİTOTOKSİSİTESİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Beyza FIRAT**

**DANIŞMAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN**

**AKSARAY, 2022**

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 202330007 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Beyza FIRAT tarafından hazırlanan “**CALIGULA JAPONICA KAFA YAPISINDAN KİTİN FİLM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE SİTOTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN**

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.....

**Üye: Prof. Dr. Murat KAYA**

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.....

**Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI**

Erzurum Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 21/01/2022

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

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## DOĐRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden olduğuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

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.

**Beyza FIRAT**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca benden yardım, bilgi ve birikimini esirgemeyen, tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, gösterdiği sabır ve anlayışı için, yüksek lisans tezimin yürütülmesine danışmanlık eden hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez sürecimde örneğin, çalışma perspektifinin sağlanmasına ve sonuçların yorumlanmasına katkılarından dolayı Prof. Dr. Murat KAYA'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez sürecimde benden bilgi, birikim ve tecrübelerini esirgemeyen Ar.Gör. Behlül KOÇ BİLİCAN ve Dr. Öğr. Üyesi İsmail BİLİCAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez sürecim boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Habibe ve Sinem' e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni hep destekleyen ve bugünlere gelmemi sağlayan, bana her zaman inanan sevgili annem ve babama teşekkür ederim.

Beyza FIRAT

Aksaray, 2022

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
1.GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	3
2.1 Kitin ve Özellikleri .....	3
2.2 Kitin Uygulama Alanları .....	4
2.2.1 Doku mühendisliği .....	4
2.2.2 Yapay böbrek membranı .....	6
2.2.3 Yara iyileştirme/Yara pansumanı .....	6
2.2.4 Suni deri .....	7
2.2.5 Kemik hasarı .....	7
2.2.6 Eklem kırırdağı .....	8
2.2.7 Karaciğer .....	9
2.2.8 Yapay tendon .....	10
2.2.9 Kan antikoagülasyonu .....	10
2.2.10 Fıtık uygulamaları .....	10
2.2.11 Antimikrobiyal uygulamalar .....	11
2.3 Kitin Film .....	11
2.4 <i>Caligula japonica</i> .....	12
3. MALZEME VE YÖNTEM .....	13
3.1 Malzeme Temini .....	13
3.2 Kitin İzolasyonu .....	13
3.3 Karakterizasyon Çalışmaları .....	14
3.3.1 Filmlerin kalınlığı ve görünümü .....	14
3.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR) .....	14
3.3.3 Termogravimetrik analiz (TGA) .....	14
3.3.4 X-Işını difraktometresi (XRD) .....	14
3.3.5 Elemental analiz .....	15
3.3.6 Taramalı elektron mikroskopu (SEM) .....	15
3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları .....	15
3.4.1 MTT analizi .....	15
3.4.2 İstatistiksel analiz .....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	17
4.1 Materyalin Kitin İçeriği .....	17
4.2 FT-IR .....	17
4.3 TGA .....	18
4.4 Elemental Analiz .....	20
4.5 XRD .....	20
4.6 SEM .....	21
4.7 Hücre Kültürü Çalışmaları .....	22
4.7.1 MTT analizi sonuçları .....	22
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	24
6. KAYNAKÇA .....	25

**ÖZGEÇMİŞ**..... 31



## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### **CALIGULA JAPONICA KAFA YAPISINDAN KİTİN FİLM ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE SİTOTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Beyza FIRAT**

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

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN**

#### ÖZET

Bazı bitkilere zararlı olarak kabul edilen böcekler, bitki koruma amaçlı toplandıktan sonra biyo-atık olarak kabul edilmektedir. Bu biyo-atıkları yakmak yerine teknolojik malzemelere dönüştürmek endüstriyel açıdan çok önemlidir. *Caligula japonica*, ceviz, kestane, elma gibi birçok bitkiye zarar vererek meyve verimini düşürmekte hatta ağacın ölmesine neden olmaktadır.

Bu çalışmada, doğadan bol miktarda toplanan *C. japonica* pupa kafa yapısından üç boyutlu doğal kitin filmi üretilmiştir. FTIR analizi sonucu, üretilen filmlerin alfa kitin formunda olduğu ve SEM analizine göre de çok net bir şekilde gözlenebilen nanofiberlerden oluştuğu ortaya konmuştur. Elde edilen kitin filmin maksimum bozulma sıcaklığının  $367,8^{\circ}\text{C}$  olduğu ölçülmüştür. XRD analizi sonucu kitin için karakteristik olan  $9,42^{\circ}$  ve  $19,52^{\circ}$  de iki keskin pik kaydedilmiştir. L929 fare fibroblast hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksikite analizine göre, kitin filmin 24, 48 ve 72 saatlerde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında ileriki biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere, doğal, üç boyutlu, nanoliflerden oluşan ve biyoyumlu özelliklere sahip bir film üretimi gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *C. japonica*, Kitin Film, Karakterizasyon, Biyomalzeme, Biyoyumluluk.

**Ocak, 2022; 31 sayfa**

**M.Sc. THESIS**

**CHITIN FILM PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND  
EVALUATION OF CYTOTOXICITY FROM *CALIGULA JAPONICA* HEAD**

**Beyza FIRAT**

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

**Supervisor: Assistant Prof. Tuğçe KARADUMAN**

**ABSTRACT**

Insects considered harmful to some plants become bio-waste after they are collected for plant protection purposes. It is very important industrially to transform these bio-wastes into technological materials rather than incineration. *Caligula japonica* damages many plants such as walnut, chestnut, apple, reduces fruit yield and even causes the tree to die.

In this study, a three-dimensional natural chitin film was produced from the head of the *C. japonica* pupa, which is collected in large quantities from nature. As a result of the FTIR analysis, it was revealed that the produced films were in the form of alpha chitin and consisted of nanofibers that could be observed very clearly according to SEM analysis. The maximum degradation temperature of the resulting chitin film was measured to be 367,8°C. As a result of XRD analysis, two sharp peaks were recorded in 9,42° and 19,52° which are characteristic for chitin. The cytotoxicity analysis performed on the L929 mouse fibroblast cell line revealed that the chitin film did not have any cytotoxic effect at 24, 48 and 72 hours. As a result, a natural, three-dimensional, nanofiber film with biocompatible properties was produced to be used in future biomedical applications.

**Keywords:** *C. japonica*, Chitin Film, Characterization, Biomaterial, Biocompatibility.

**January, 2022; 31 pages**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Selüloz polimerinin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2.2. Kitin kimyasal yapısı .....	3
Şekil 2.3. <i>C. japonica</i> kafa yapısının farklı büyütmelelerdeki mikroskopik görüntüsü	12
Şekil 4.1. <i>C. japonica</i> pupa kafa yapısından elde edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumu.....	18
Şekil 4.2. <i>C. japonica</i> pupa kafa yapısından elde edilen kitin örneklerinin TGA termogramı.....	19
Şekil 4.3. <i>C. japonica</i> pupa kafa yapısından elde edilen kitin örneklerinin X-ray difraksiyon eğrisi.....	21
Şekil 4.4. <i>C. japonica</i> pupa kafa yapısının SEM görüntüleri. a,b,c) <i>C. japonica</i> pupa kafa yapısından elde edilen kitin dorsal yandan görünüşleri. d,e,f) <i>C. japonica</i> pupa kafa yapısından elde edilen kitin ventral yandan görünüşleri.....	22
Şekil 4.5. <i>C. japonica</i> pupa kafa materyalinden elde edilen kitin filmlerin 24, 48 ve 72. saatteki sitotoksosite grafiği.....	23

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 <i>C. japonica</i> pupa kafa yapısından elde edilen kitinin elemental analiz ve asetilasyon derecesi.....	22
---	----



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>C</b>	Karbon
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>DA</b>	Asetilasyon Derecesi
<b>FT-IR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>H</b>	Hidrojen
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamper
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
<b>N</b>	Azot
<b>O</b>	Oksijen
<b>pH</b>	Hidrojen Potansiyeli
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi
<b>TGA</b>	Termogravimetrik Analiz
<b>UV</b>	Ultraviyole Işın
<b>XRD</b>	X-ışını Kırınımı Yöntemi
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>cm</b>	Santimetre
<b>nm</b>	Nanometre
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mg</b>	Miligram
<b>%</b>	Yüzde
<b>°</b>	Derece

## 1.GİRİŞ

Kitin, glikozidik bağlantı geometrisinde lineer bir  $\beta$ -1,4 bağı N-asetil D-glukozamin polimeridir (Shamshina vd., 2019). Bu polimer sahip olduğu güçlü antimikrobiyal, antioksidan aktivitesi, non-toksitite ve biyobozunurluk gibi özellikleri sayesinde tıp, eczacılık, doku mühendisliği, biyoteknoloji, biyomedikal endüstrisi, gıda, besin katkı maddesi olarak kullanım gibi geniş uygulama alanlarına sahiptir (Casadidio vd. 2019). Kitin başta mantarların hücre duvarında bulunmakla birlikte; dünyada Arthropoda, Bryozoa, Mollusca gibi şubelerde yer alan canlıların %70'inden fazlasının yapısında bulunduğu bilinmektedir. Literatürde yer alan pek çok çalışmada kitinin, yengeç, karides ve ıstakoz gibi canlı gruplarının dış kabuklarından; mantar ve bazı alglerin hücre duvarından; bazı canlı gruplarının (mercan, sünger ve böcekler gibi) ise tüm vücut yapısından izole edildiği bildirilmiştir (Barikani vd., 2014; Kaya vd., 2015; Shamshina vd., 2019). Çalışmamızda yer alan dev ipek böceği pupa kafa yapısı kitin kaynağı olarak kullanılmıştır.

Önceleri *Dictyoploca japonica*, *Saturnia japonica* ve *Dictypoea japonica* olarak adlandırılan *Caligula japonica* (*C. japonica*), Caligula, Lepidoptera: Saturniidae cinsine aittir (Kawaguchi vd., 2003; Chen vd., 2020). Bu yerli böcek zararlısı, Çin'in yanı sıra Japonya, Kuzey Kore ve Rusya'da yaygın olarak dağılım göstermektedir (Youzhong, 2009; Xu vd., 2014).

*C. japonica*, 30 cins ve 20 familyaya ait geniş bir 38 konukçu bitki yelpazesine sahiptir. Konukçu bitkiler arasında ceviz yer almaktadır (Yang vd., 2008; Liu ve Feng, 2013) ve *C. japonica* larvaları çoğunlukla ceviz yapraklarıyla beslenir. Bu zararlının istilası bölgesel olarak tarım sektöründe ciddi sorunlara ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır, daha da yayılma olasılığı vardır (Yang vd., 2008; Liu ve Feng, 2013). Şu anda, bu zararlıyı kontrol etmek için kullanılan en yaygın yöntem kimyasal pestisitler olsa da, bu yöntemin olası kısıtlamalarından dolayı zararlının kontrolü için güvenli ve etkili önlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bu nedenlerle, *C. japonica* ile yapılan araştırmaların çoğu, ontogenezi ve üreme özellikleri gibi biyolojisine odaklanmıştır (Yang vd., 2008; Youzhong, 2009).

Çin'de, bir sonraki yılın ağustos ayından nisan ayına kadar yumurta olarak kışı geçirdikleri için bu haşerenin yılda sadece bir nesli meydana gelir (Yang vd., 2008).

Bu haşere, Nisan ortasından Haziran sonuna kadar larva aşamasında bulunur, pupa aşaması Haziran sonundan Eylül ortasına kadar gerçekleşir ve yetişkinler Longnan Bölgesi'nde Temmuz ayının sonundan Eylül ayının sonuna kadar ortaya çıkmaktadır (Xu vd., 2014). Yumurta parazitoitleri önemli ölüm faktörleri olabileceğinden, *C. japonica*'nın baskın yumurta parazitoitleri toplu olarak üretilirse, *C. japonica*'nın kontrolünde pestisitlere bir alternatif sağlayabileceği tahmin edilmektedir (Chen vd., 2020). Bu zararlı ile mücadele için bölgesel ceviz yetiştiricilerinden *C. japonica* kozası toplanarak yakılarak ya da gömülerek bertaraf edilmiştir (Xu vd., 2014). Ancak bu, kontrol için zahmetli ve maliyetli bir yaklaşımdır ve pek çok açıdan çevreye zararlıdır. Bu nedenle, *C. japonica* canlısının atık yapısının değerlendirilmesi için yapılan çalışmalar önemlidir. Chen ve arkadaşları 2021'de yapmış olduğu çalışmada bu böceklerin vücut yapısından doğal kitin film elde edilmiş, elde edilen filmlerin ayrıntılı karakterizasyonu gerçekleştirilerek yüzey morfolojileri belirlenmiştir. Ek olarak filmlerin her iki yüzeyinin (dorsal ve ventral) SERS aktivitesi çalışılmış, bu yapının malzeme bilimine katkı sağlayacağı öngörülmüştür. Bununla birlikte bu kitin filmin hücrel biyoyumluluğu çalışılmamıştır (Chen vd., 2021).

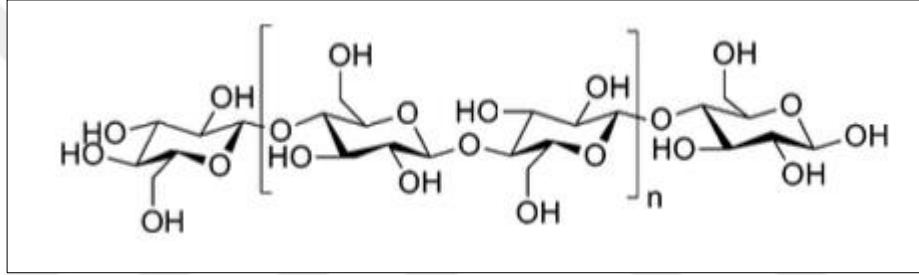
Bu çalışmada ilk kez *C. japonica* türünün pupa kafa yapısından kitin film izole edilerek, biyomalzeme FT-IR, TGA, XRD, elemental analiz ve SEM yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiş, malzemenin biyoyumluluğu L929 fare fibroblast hücrelerinde MTT yöntemi ile test edilmiştir. Bu sayede izole edilen yapının saf kitin olup olmadığı, kristal yapısı, termal kararlılığı ve yüzey morfolojileri net olarak ortaya konularak biyoyumluluğu belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Kitin ve Özellikleri

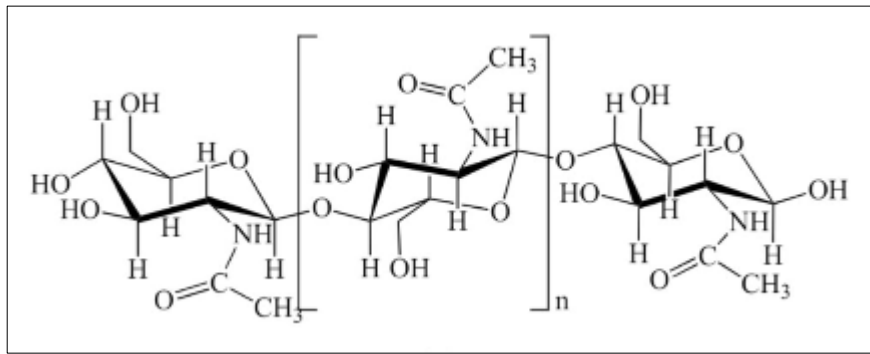
Kitin selülozdan sonra doğada en çok bulunan bir biyo-polisakkarittir. Kitinin  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere üç allomorfik formu bulunmaktadır. Kitin, karides, yengeç ve ıstakoz gibi canlıların kabuklarında, yumuşakçalar ve ıstakozların dış iskeletlerinde ve böceklerin yanı sıra bazı mantarların hücre duvarlarında bulunur.

Kitinin kimyasal yapısı, birkaç yüz ila binden fazla  $\beta$ -1,4 bağlantılı D-glikoz biriminden oluşan selülozunkine çok benzerdir. Kitin yapısında selülozun C-2 konumundaki hidroksilinin yerini bir asetamid grubu almıştır (Periyah vd., 2016; Alam ve Qiao, 2020).



Şekil 2.1. Selüloz polimerinin kimyasal yapısı.

Selülozdan farklı olarak, kitinde asetillenmiş amin grupları biçiminde %5-8 azot içerir, bu da kitini aminlerin tipik reaksiyonları için uygun hale getirir (Kurita, 2001).



Şekil 2.2. Kitin kimyasal yapısı.

Kitinde amin gruplarının varlığı, farklı biyolojik fonksiyonların yanı sıra modifikasyon reaksiyonlarının uygulanmasını mümkün kıldığı için büyük bir avantaj sağlar (Jayakumar vd., 2009). Bu polisakkaritlerin biyoyumurluk, biyobozunurluk, biyoaktivite, biyoemilebilirlik, toksik olmama ve iyi adsorpsiyon özellikleri gibi

mükemmel özellikleri, bu malzemeleri çok uygun ve temel biyomalzemeler yapar ve sentetik polimerlere olası alternatifler olarak büyük ölçüde endüstriyel dikkat çeker (Croisier ve Jérôme, 2013; Kaya vd., 2014).

Kitin, çok yönlü uygulamalar için uygun kılan bazı özel özelliklere sahiptir. Kitinin tıp ve ilaç sektöründe kullanımı hızla artmıştır ve güçlü antibakteriyel etki, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama ve yüksek nem gibi ilginç özelliklerinden dolayı şu anda dünya çapındaki araştırmacılardan büyük ilgi görmektedir (Periyah vd., 2016). Ayrıca analjezik, antitümör, hemostatik, hipokolesterolemik, antimikrobiyal ve antioksidan özellikler gibi diğer biyolojik özellikler de bazı son çalışmalarda çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Koide, 1998; Jayakumar vd., 2009).

Biyolojik özelliklerin çoğu, biyomedikal uygulama için kitinin fizikokimyasal özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Kitinin fizikokimyasal özellikleri arasında moleküler kütle, asetilasyon derecesi ve nem içeriği miktarı yer alır (Periyah vd., 2016).

## **2.2 Kitin Uygulama Alanları**

### **2.2.1 Doku mühendisliği**

Doku mühendisliği, malzeme mühendisliği ile biyotıbbı birleştiren bir bilim dalıdır; hasarlı dokuda ileri rejeneratif süreçleri ikame edebilen ve uyarabilen malzemelerin üretimi ile ilgilenir. Vücudun kusurlu veya hasarlı kısımlarının işlevini yerine getirecek veya destekleyecek şekilde laboratuvarında yetiştirilen hücrelerin, dokuların veya organların büyütülmesi ve manipülasyonu, doku mühendisliğinin ana işlevidir (Dutta vd., 2004). Vücuda implantasyon için biyolojik araçlar geliştirmek ve dokuların aktif bir şekilde yeniden şekillenmesini sağlamak için hücre dışı ortamları aracılığıyla veya genetik olarak manipüle edilen canlı hücrelerin kullanımını içerir. Doku mühendisliğinin amacı, belirli bir doku veya organın işlevini onarmak, değiştirmek, sürdürmek veya geliştirmektir (O'brien, 2011). Doku mühendisliğinin potansiyel uygulamaları, diz, kıkırdak, tendon ve vasküler replasmanda mevcut teknolojinin gelişimini veya devrimini içerir. Vücudun hasarlı bölgesinin yerine otolog veya sentetik bir greft implantasyonu, doku mühendisliğinin çağdaş uygulamasıdır. Vücut içinde implant, fonksiyonel ve mekanik stabilitenin yanı sıra biyouyumluluk ile ilgili

gereksinimleri karşılamalıdır (Dutta vd., 2004). Birçok malzeme vücut ile uyumlu reaksiyona girebilmekte ancak vücudun uzun süreli mekanik, geometrik ve fonksiyonel ihtiyacını karşılayamamaktadır. Bu nedenle doku mühendisliği teknolojisi, modüle edilmiş hücrelerle doğal ve sentetik polimerler dahil olmak üzere farklı yapı iskelesi malzemeleriyle birleştirilerek doğal dokuları taklit edebilen yapay dokular oluşturmak için gelişmiştir. Bu malzemeler arasında polilaktid (PLA), poliglikolid (PGA) ve bunların kopolimeri olan polilaktid-ko-glikolid (PLGA), biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve biyoyumlulukları nedeniyle doku mühendisliği için uygun adaylar olarak büyük ilgi görmüştür (Ravichandran vd., 2012).

Doku mühendisliği için polimer yapı iskelelerinin tasarımı, araştırmacılar tarafından yaygın olarak kabul edilen birkaç temel gereksinimi karşılamalıdır. Bir iskele, uygun bir gözenek boyutu dağılımı ve yüksek bir yüzey alanı ile yüksek bir gözenekliliğe sahip olmalıdır. Biyobozunurluk, neo-doku oluşum hızıyla eşleşen bozunma hızıyla birlikte başka bir gerekliliktir. Ayrıca, yeni doku oluşumu sırasında iskele gözeneklerinin çökmesini önlemek için iskele, uygun mekanik özelliklerle gerekli yapısal bütünlüğe sahip olmalıdır. Son olarak, yapı iskelesi hücreler için toksik olmamalı ve biyoyumlu olmalı, hücre yapışmasını, çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmış hücre fonksiyonunu teşvik etmek için hücrelerle pozitif etkileşim içinde olmalıdır (Yıldırım vd., 2015).

Kitini doku mühendisliğine uygun hale getirmek için birtakım çalışmalar yapılmaktadır. Hücre proliferasyonunun desteklenmesi için hazırlanan kitinlerde en çok denenilen yöntemlerden biri, önce tipik bir jel olan öncülünün oluşturulması, ardından çeşitli liyofilizasyon stratejilerinin gerçekleştirilmesidir. Chow ve arkadaşları, kitin çözeltilerinden kitin jelleri üreterek ve ardından gözenekli kitin matrisleri vermek üzere liyofilizasyon yaparak bir dizi gözenekli kitin matrisi geliştirmişlerdir (Chow vd., 2001). Liyofilizasyondan önce kitin jellerinin çeşitli ön-muamele prosedürlerine bağlı olarak 100 ila 500 mm arasında değişen matris gözenek boyutları elde edilebilmiştir. Bu kitin matrislerine maruz bırakılan fare ve insan fibroblast hücre kültürlerinin, dokuları yenilemek için hücre transplantasyonu uygulamaları için bu gözenekli kitin matrislerini kullanmanın fizibilitesini gösterilmiş hücrelerin ilgili yüzeylerde büyümekte ve çoğalmakta olduğu bulunmuştur. Benzer

şekilde, Wang ve arkadaşları, kitin-plazma püskürtülen kalsiyum HA matrislerinin hazırlandığını göstermiştir. Liyofilizasyon ile elde edilen kitin matrisleri için 500 mm'lik üst gözenek boyutu sınırını genişletmek amacıyla Chow ve arkadaşları, açık ve büyük gözenekli kitin matrisleri vermek için "iç kabarcıklanma işlemi" (IBP) olarak adlandırılan yeni bir yöntem geliştirmiştir (Chow vd., 2001).

### **2.2.2 Yapay böbrek membranı**

Son zamanlarda tekrarlayan hemodiyalizleri mümkün kılan ve kronik böbrek yetmezliği olan hastaların yaşamlarını sürdürmelerini sağlayan yapay böbrek membranı geliştirilmiştir. Ticari olarak rejenere edilmiş selüloz veya kupropan, iyi geçirgenliği ve mekanik mukavemeti nedeniyle yapay böbreğin yarı geçirgen zarı olarak kullanılır (Sevinç Özakar, 2010). Daha iyi hemodiyaliz zarlarının geliştirilmesi, ürik asit ve benzerleri gibi orta ve büyük boyutlu moleküller için daha fazla seçicilik ve daha yüksek diyaliz hızları gerektirir. Diyaliz uygulamalarının gereksinimlerini karşılamak için mevcut polimerik membranların modifikasyonu veya yeni polimerik membranların sentezi için birçok çalışma yapılmıştır (Yoon ve Jhon, 1982; Matsuyama vd., 1997). Bu aşamada kitin kullanımı; kitinin, üre ve üre geçirgenliğine ek olarak kendine özgü yüksek mekanik özellikleri nedeniyle yapay böbrek zarı olarak kullanımda avantaj sağlamıştır. Ayrıca, bu zarlar serum proteinlerine karşı geçirimsizdir.

### **2.2.3 Yara iyileştirme/Yara pansumanı**

Yaranın kısa sürede iyileşmesi her hasta için arzu edilen bir durumdur; ancak şeker hastalığı olan hastalarda iyileşme son derece yavaştır. Kitinin olası yara iyileştirici aktivatör olarak uygulanması, birçok araştırmacı tarafından uzun süredir çalışılmaktadır (Nishimura vd., 1986; Ataman, 2014). Kitin ve türevleri insanlara olduğu kadar hayvanlara da güvenle uygulanabilir. İnce bölünmüş toz, dokunmamış kumaşlar, gözenekli boncuklar, liyofilize yumuşak yünler veya jeller, lamine levhalar ve şeffaf filmler gibi tıbbi uygulamalar için geliştirilmiş çeşitli kitin bazlı ürünler mevcuttur (Yang, 2011).

Kitinin yara iyileştirici özelliklerinin en iyi örneklerinden biri, Dung ve diğerleri tarafından 8. Uluslararası Kitin ve Kitosan Konferansı'nda rapor edilmiştir (Islam vd.,

2017). Vinachitin TM adlı kitin zarları, pirinç tarlası yengeç kabuklarının kristalleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Derin yanıklar, ortopedik, travma ve ülser durumları için 300'den fazla hastayı tedavi eden 3 yıllık klinik deney çalışmasından iyi sonuçlar bildirilmiştir.

#### **2.2.4 Suni deri**

Ateşe maruziyet nedeniyle yoğun cilt kayıplarına maruz kalan kişiler büyük enfeksiyona ya da ciddi sıvı kaybına yenik düşme tehlikesi altındadır. Hastalar genellikle derin, şekil bozukluğu yaratan yara izleri ve sakat bırakan kontraktürlerden kaynaklanan rehabilitasyon sorunlarıyla baş etmek zorundadır. Yannas ve Burke, neodermal doku için biyolojik olarak parçalanabilen bir şablon olarak işlev gören antijenik olmayan bir zara odaklanarak, uzun süreli kronik kullanıma uygulanabilir yapay deri için bir tasarım önermiştir (Yannas ve Burke, 1980). Kifune ve arkadaşları ise yakın zamanda, klinik uygulamada faydalı olduğu bulunan dokusuz kitin kumaştan oluşan ticari bir ürün olan Beschitin W adlı yeni bir yara pansuman malzemesi geliştirdi (Islam vd., 2017).

#### **2.2.5 Kemik hasarı**

Kemik, başlıca hidroksiapatit [ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ] ile birlikte kolajen, kondroitin sülfat, keratin sülfat ve lipidler gibi diğer bazı maddelerden oluşur. Son yıllarda, kemik dokusunun kaybı veya yetersizliğinin tedavisi için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Hasar veya kırık kemiğin tedavisi, iskeletin kusurlu bölgelerine veya kayıp kemik bölgelerine yerleştirilen geçici bir iskelet görevi gören biyolojik olarak parçalanabilen malzemeler kullanılarak gerçekleştirilir. Bu geçici iskelet kemik dokusu rejenerasyonunu destekler ve uyarır. Bundan sonra yavaş yavaş bozulurlar ve yeni kemik dokusu ile değiştirilirler. Hem biyoaktif seramikler hem de polimerler, doku mühendisliği yapı iskeleleri olarak kullanılmak üzere geliştirilmiş ve analiz edilmiştir (Roether vd., 2002). Biyoaktif seramikler, osteogenezin oluşmasına izin veren ve konakçı kemikle kemik teması veya bağları sağlayabilen doğal kemiğe kimyasal olarak benzerdir (Hench ve Wilson, 1984). Ancak bu biyoseramiklerin ana sınırlaması, kırılabilirliği ve düşük biyo-bozunabilirliğidir. Kemik implantlarının bu dezavantajlarının üstesinden gelmek için bir dizi doğal ve sentetik polimer üzerinde çalışılmıştır. Özellikle kitosan, kültürde osteoblastlar tarafından büyümeyi ve mineral

açısından zengin matris birikimini teşvik etme kapasitesinin gözlemlenmesinden sonra kemik dokusu mühendisliğinde de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Kim vd., 2008). Son zamanlarda, bu kompozitlerin mekanik mukavemetini arttırmak için karbon nanotüplerle aşılınmış kitosan doğal polimeri dahil edilmiştir. Karbon nanotüpler, silindirik nano yapıya sahip karbon allotroplarındır ve uzunluk-çap oranı 28.000.000:1'e kadardır. Bu silindirik karbon molekülleri, yüksek Young modülü (1,0-1,8 TPa), yüksek gerilme mukavemeti (30-200 GPa) ve yüksek kopma uzaması (%10-30), son derece küçük boyut (yaklaşık 1-10 nm) gibi bazı yeni özelliklere sahiptir. Çap olarak, yüksek en-boy oranı (1000), yüksek yapısal ve kimyasal kararlılık ve sertlik (Dresselhaus vd., 2001; Samal ve Bal, 2008), bu da onları nanoteknoloji, elektronik, optik ve malzeme bilimlerindeki birçok uygulamada potansiyel olarak faydalı kılar. Karbon nanotüp ile kitosan kombinasyonunun, kompozitin mekanik mukavemetinde muazzam bir artışa yol açtığı gözlemlenmiştir (Wang vd., 2005).

### **2.2.6 Eklem kıkırdağı**

Eklem kıkırdağı, diartrodial eklemlerin oldukça özelleşmiş bağ dokusudur. Düşük sürtünme katsayısı ile yüklerin iletimini kolaylaştırır. Eklem kıkırdağı, *in vitro* olarak genişletilebilen ve daha sonra ekim ve daha sonra eklem içine implantasyon için biyouyumlu bir matris veya yapı iskelesine ekilebilen eklem kondrositlerinin veya öncü hücrelerinin izolasyonundan oluşur (Suh ve Matthew, 2000). Kıkırdak onarımının başarılı olması için en önemli faktör biyomateryal seçimidir (Grande vd., 1997). Mükemmel hücre taşıyıcı madde, eklem kıkırdak matrisinin doğal ortamında benzer olmalıdır. Kollajen ve glikozaminoglikanlar gibi kıkırdağa özgü hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinin, kondrositik fenotipin ekspresyonunun düzenlenmesinde ve *in vitro* olduğu kadar *in vivo* kondrojenezin desteklenmesinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Goessler vd., 2004; Varghese vd., 2008). Mattioli-Belmonte ve arkadaşları, N,N-dikarboksimetil kitosan ile ilişkili kemik morfogenetik proteini "BMP-7"nin tavşanlarda yapay kıkırdak lezyonlarının onarımını indüklediğini veya kolaylaştırdığını ve bunların karşılık gelen biyolojik sonuçlarının bir sinerjizm oluşturduğunu gösterdi (Mattioli-Belmonte vd., 1999).

### 2.2.7 Karaciğer

Karaciğer sorunu yaşayan hastalar her geçen gün artmaktadır ve bu hastaların tedavisi oldukça önemlidir. En akut sorunlardan biri, ortotopik karaciğer nakli için donör organ eksikliğidir. Bu faktör şimdi ciddi ve uzun süreli karaciğer hastalığı için yeni tedavilerin gerekliliğini artırmıştır (Kim vd., 2008). Biyoyapay karaciğer (BAL) ile fulminan karaciğer yetmezliğinin (FHF) tedavisi doku mühendisliğinin umut verici uygulamalarından biridir (Detry vd., 2000). Temel amaç, hasta plazmasının metabolik olarak aktif karaciğer hücrelerini barındıran bir biyoreaktör aracılığıyla vücut dışında dolaştırıldığı bir biyoyapay karaciğer cihazı geliştirmektir. Biyoyapay karaciğer cihazları için önemli konulardan biri, birincil hepatositler, karaciğer hücre dizileri ve karaciğer kök hücreleri gibi hücre kaynaklarının doğru seçimidir. Pek çok araştırmacı, hepatositlerin mümkün olduğu kadar çok faaliyette bulunabilmeleri için optimal olarak muhafaza edildiği biyoyapay karaciğer cihazları geliştirmeye çalışmaktadır (Hoekstra ve Chamuleau, 2002). Biyoyapay karaciğer cihazları, hepatosit kültürü için uygun bir hücre dışı matris (ECM) gerektirir, çünkü hepatositler ankraja bağımlı hücrelerdir ve canlılıklarının ve farklı fonksiyonlarının sürdürülmesi için hücre dışı matris ortamına oldukça duyarlıdır (Kang vd., 2005). Uygun bir biyomateryal olan kitosan, karaciğer doku mühendisliğinde uygulanabilir. Hepatosit kültürü için bir yapı iskelesi olarak kitosan seçilmesinin nedenlerinden biri, yapısının karaciğer hücre dışı matrisinin bileşenleri olan glikozaminoglikanlara benzer olmasıdır (Lindahl ve Hook, 1978; Li vd., 2003).

Chupa ve arkadaşları, glikozaminoglikanlarla kitosan ve kitosan komplekslerinin, vasküler endotelial ve düz kas hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* aktivitelerini modüle edebilen yeni bir biyolojik olarak aktif biyomateryal tasarımı için önemli bir potansiyele sahip olduğunu bildirmiştir (Chupa vd., 2000). Diğer çalışmalar, gözenekli yapı iskelelerinin mikro yapısının, hücrelerin yapışması için geniş bir yüzey alanı sağladığını ve besin ve oksijen taşınmasını kolaylaştırdığını ortaya koymuştur (Li vd., 2003). İmplant edilebilir biyoyapay karaciğer, karaciğer fonksiyonlarını eski haline getirebilir, koruyabilir veya iyileştirebilir veya kalıcı karaciğer replasmanı olasılığı sunabilir.

### **2.2.8 Yapay tendon**

Tendonda kırık veya hasar, kitin ve türevlerinin kullanımıyla çözülebilecek başka bir zorluk türüdür. Kitin-NWF (kitin bazlı biyomateryaller), fetlock eklemde eğilme deformitesi olan buzağılar için kullanılır (Itoh vd., 2003). Fetlock eklem deformitesi durumunda, uzama tekniğinde tendon ikamesi olarak kitin-NWF kullanılır. Yüzeysel ve derin dijital fleksör tendonlar kesilip fetlock eklemi normal pozisyona uzatıldığında, kesilen parçalar iki fleksör tendonun kasılma derecesine orantılı olarak ayrılır. Fetlock eklemde fleksör deformiteleri tüm olgularda komplikasyonsuz olarak tamamen iyileşir.

### **2.2.9 Kan antikoagülasyonu**

En yaygın kullanılan kan antikoagülanlarından biri heparindir; ancak maliyeti çok yüksektir. Maliyeti azaltmak için sentetik pıhtılaştırıcı hazırlamak için birçok çalışma yapılmıştır; ancak hiçbiri heparin kadar non-toksik değildir. Selüloz ve nişasta sülfürik asit esterlerinin toksik olduğu, kitin disülfürik asidin ise daha az toksik olduğu bildirilmiştir. Kitin içeren materyal daha yüksek hayvanların dokularına enjekte edildiğinde, kitin protein kısmının inflamatuvar yanıtta sorumlu olduğu da bildirilmiştir.

### **2.2.10 Fıtık uygulamaları**

Kitin göbek fıtığı tedavisinde kullanılır. Levha formuna sahip kitin-NWF (kitin bazlı biyomateryaller) uygulanarak tedavi gerçekleştirilir ve protez olarak fıtık halkasının dikişleri için deri altı kısmına gömülür ve tabakanın periferik kısmı bir iğne ile sabitlenir. Göbek fıtığının tedavisi herhangi bir komplikasyon olmaksızın belirtilen yöntemle başarılmıştır (Itoh vd., 2003). Kitin-NWF, bir köpekte perine fıtığının azaltılması için de uygulanmıştır. Kitin tarafından teşvik edilen deri altı yağının hızlı organizasyonunun etkisinden yararlanılmıştır. Bu kitin-NWF tekniği, geleneksel tekniklerle karşılaştırıldığında 20 dakikadan daha kısa bir operasyon süresi gerektirir ve tekrar ortaya çıkma belirtisi olmaksızın, ameliyat sonrası ilk gün diskeziya ortadan kalkar (Shigemasa ve Minami, 1996).

### 2.2.11 Antimikrobiyal uygulamalar

Kitin ve türevleri, bakteri ve mantarlara karşı koruma sağlayan güçlü antimikrobiyal aktivitelere sahiptir. Son zamanlarda yapılan bir dizi çalışma ayrıca kitosanın birçok mikroorganizmaya karşı antibakteriyel aktivitesini göstermektedir (Chung vd., 2003; Jayakumar vd., 2010). Evans ve Kent kitosanın çok çeşitli mikrobiyal hücre tiplerini aglutine edebildiğini gösterebildiler (Evans ve Kent, 1962). Kitosanın çeşitli mikroorganizmalara karşı mikrobiyal hücre bağlama özelliklerini araştırdılar. Çalışma, kitosan maruziyeti üzerine mikroorganizmaların büyümesinde önemli bir azalma olduğunu ortaya koydu. Tekstil lifinde kitosan varlığı nedeniyle *S. aureus* ve *K. pneumoniae*'nin bakteriyel büyümesinin baskılandığı gözlenmiştir (Bhuiyan vd., 2017). İncelenen diğer materyaller arasında, kitosan laktat ve glutamat gibi ticari olarak temin edilebilen bazı kitosan türevleri yer alır ve *E. coli*, *S. aureus* ve *S. cerevisiae*'ya karşı antagonistik etkiler gösterir. Kitosan ayrıca gıdaların muhafazası için de kullanılabilir (Youzhong, 2009).

### 2.3 Kitin Film

Kitin, biyolojik avantajları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda kullanılmak için film formuna dönüştürülür. Ancak, kitinin sert kristal yapısı nedeniyle yaygın çözücülerde çözülmesi çok zordur. Bazı çözücü sistemler kullanılarak kitinin hidrojel formu elde edilmiştir. Kitinin belirli çözücüler kullanılarak film formuna dönüşmesiyle karakteristik özelliklerinin çoğunu kaybettiği bilinmektedir (Nagahama vd., 2008).

Duan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kitin solüsyonu elde etmek için kitini dondurma  $-30^{\circ}\text{C}$ 'de döngülerle çözdürme yapıp %11 NaOH, %4 üre solüsyonunda çözündürülüp, ardından kitin film hazırlamak için etanol veya dimetilasetamid pıhtılaştırıcılarla rejenere edilerek şeffaf saf kitin filmler elde edilmiştir. Organik pıhtılaştırıcıdaki kitin solüsyonunun yavaş rejenerasyon sebebiyle kitin zincirlerinin homojen bir yapı oluşturması için düzenli hizalanması ve yeniden yapılandırılması gerekmektedir. Ayrıca baz-asit nötralizasyonu ve kitin çözeltisi ile sulu sülfürik asit pıhtılaştırıcı arasındaki hızlı değişim nedeniyle, kitin zincirleri gevşek bir hibrit yapı oluşturmak üzere hızla bir araya gelmesiyle kusurlu zayıf mekanik özelliklere sahip kitin filmi oluşumuna yol açar. Bu nedenle, pıhtılaştırıcı

türleri, kitin filmlerinin oluşumunu, yapısını ve özelliklerini etkilemiştir (Duan vd., 2013).

#### 2.4 *Caligula japonica*

Çalışmamızda yer alan dev ipek böceği pupa kafa yapısı kitin kaynağı olarak kullanılmıştır.

*Caligula japonica* (*C. japonica*), Caligula, Lepidoptera: Saturniidae cinsine aittir (Kawaguchi vd., 2003; Chen vd., 2020). Bu böcek, Çin'in yanı sıra Japonya, Kuzey Kore ve Rusya'da yaygın olarak dağılım göstermektedir (Youzhong, 2009; Xu vd., 2014). *C. japonica*, 30 cins ve 20 familyaya ait geniş bir 38 konukçu bitki yelpazesine sahiptir. Konukçu bitkiler arasında ceviz yer almaktadır (Yang vd., 2008; Liu ve Feng, 2013) ve *C. japonica* larvaları çoğunlukla ceviz yapraklarıyla beslenir.

Bu tez çalışmasında canlının pupa kafa yapısından kitin izolasyonu ve bu yapının karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3. *C. japonica* kafa yapısının farklı büyütmelerdeki mikroskopik görüntüsü.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1 Malzeme Temini

*C. japonica* örnekleri, Jilin Ziraat Üniversitesi'nden alındı ve kafa bölgesi ayrıldı. Örnekler kitin izolasyonuna kadar ısı ve ışık maruziyeti olmaksızın izole şekilde kuru materyal olarak saklandı. Kitin izolasyonu sırasında kullanılan tüm kimyasallar Sigma Aldrich'ten temin edildi. Çalışma boyunca distile su kullanıldı.

#### 3.2 Kitin İzolasyonu

Numuneler, kitin ekstraksiyonu öncesi üstlerinde bulunan olası kirliliklerin uzaklaştırılması amacı ile seri distile su yıkamalarından geçirildi, ardından etüvde 50°C'de 3-4 gün boyunca kurutuldu. *C. japonica* pupa kafa örneklerinin demineralizasyonu manyetik karıştırıcı kullanılarak 6 saat boyunca 50°C'de 2 M'lık HCl (50 ml) çözeltisi ile gerçekleştirildi. Asit muamelesinden sonra örnekler nötral pH'ya ulaşıncaya kadar saf su ile yıkandı ve etüvde 50°C'de 3 gün boyunca kurutuldu. Kurutulan örnekler, yapılarındaki proteinin uzaklaştırılması için 2M'lık NaOH (50 ml) çözeltisine aktarıldı ve 100°C'de 8 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra örnekler seri bir şekilde distile su ile nötr pH'ya gelene kadar yıkandı. İzolasyon sonunda *C. japonica* pupa kafa yapısının 3 boyutlu şekli korundu ve doğal bir kitin film oluşturuldu. Örnekler son olarak analiz için oda sıcaklığında bir hafta boyunca kurutuldu. *C. japonica* pupa kafa örneklerinin ilk ağırlıkları izolasyondan önce belirlendi. İzolasyon aşamalarından sonra tekrar tartılarak aşağıdaki formül ile kitin içeriği belirlendi.

$$\text{Kitin içeriği (\%)} = \left( \frac{m_{\text{son}}}{m_{\text{ilk}}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

$m_{\text{son}}$ : örneğin izolasyondan sonraki saf kitin ilk kütlesi

$m_{\text{ilk}}$ : örneğin izolasyondan önceki kütlesi

### 3.3 Karakterizasyon Çalışmaları

#### 3.3.1 Filmlerin kalınlığı ve görünümü

*C. japonica* pupa kafa yapısından izole edilen kitin filmin görüntüleri bir ışık mikroskobu yardımı ile çekildi (Leica Z6 APO). Filmlerin kalınlıkları dijital mikrometre Mitutoyo (Coolant Proof Micrometer-293) kullanılarak ölçüldü. Filmlerin kalınlığı, 10 farklı parçadan alınan ölçümlerin ortalaması ile hesaplandı. Kitin filmin kalınlığı  $0.120 \pm 0.0034$  mm olarak ölçüldü.

#### 3.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR)

*C. japonica* pupa kafa kitin izolatlarının kızıl ötesi spektrumları, Bruker/Vertex 70 HYPERION Spektrometresi kullanılarak  $4000-600 \text{ cm}^{-1}$  aralığında ve 64 scan,  $8 \text{ cm}^{-1}$  rezolüsyonda kaydedildi.

#### 3.3.3 Termogravimetrik analiz (TGA)

*C. japonica* pupa kafa yapısından izole edilen kitin örneklerinin termal stabilitesi, yapıdaki su içeriği ve kül içeriği analiz edildi (TGA Exstar-TG/DTA 7300 Instruments). Örnekler, azotlu bir atmosfer altında  $30^\circ\text{C}$ 'den  $700^\circ\text{C}$ 'ye kadar  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  sabit sıcaklıkta ısıtılarak test edildi.

#### 3.3.4 X-Işını difraktometresi (XRD)

Örneklerin karakteristik atomik dizilimlerine bağlı olarak X-ışınlarını özgün bir düzen içerisinde kırması temelinde çalışan bu analizin çekim işlemleri  $45 \text{ kV}$  ve  $30 \text{ mA}$  değerinde  $5-45^\circ$  aralığında Panalytical/ Empyrean ile gerçekleştirildi (Bruker AXS D8 Advance). XRD analizi sonucu elde edilen piklerin şiddetlerinden yararlanarak % kristalinite belirlendi. Kristalinite hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{CrI}_{110} = \left( \frac{I_{110} - I_{\text{am}}}{I_{110}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

CrI = % kristalinite değeri,

$I_{110}$  =  $2\theta$   $20^\circ$  deki maksimum şiddet değeri,

$I_{\text{am}}$  =  $2\theta$   $13^\circ$  de amorf pikinin maksimum şiddet değeri

### 3.3.5 Elemental analiz

Örneklerin yapısında bulunan C, N ve H element yüzdelерinin yüksek hassasiyette belirlenmesi için Thermo Flash 2000 ile bu analiz gerçekleştirildi. Belirlenen % element içeriklerine örneklerin DA derecesi aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$DA = \frac{\frac{C}{N} - 5,14}{1,72} \times 100 \quad (3.3)$$

C:N karbon nitrojen oranına işaret etmektedir(w/w).

### 3.3.6 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Kitin örneklerinin yüzey morfolojileri SEM analizi ile 5 kV ve 500X-30.000X aralığındaki farklı büyütmelelerde SEM analizi ortaya konuldu (JEOL JSM-6335F). Örnekler analizden önce altın/paladyum ile kaplandı (JEOL JFC-2300 HR).

## 3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

### 3.4.1 MTT analizi

*C. japonica* pupa kafa materyalinden izole edilen kitin film örneğinin, biyoyumluluğunu belirlemek için, L929 (Fare fibroblast, HUKUK, Sap Enstitüsü) hücreleri kullanıldı. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (FBS), penisilin (100 ünite/ml) ve streptomisin (100 µg/ml) ile desteklenmiş Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamında (DMEM) büyütüldü. MTT analizi için; hücreler, kuyucuk başına  $1 \times 10^4$  hücre (96 kuyucuklu) ekildi ve kültür plakaları %5 CO<sub>2</sub>'de nemlendirilmiş bir inkübatörde 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. 24 saat sonra, her kuyuya sterilize (%70 Etanol ve UV kombinasyonu ile) 2 mm çapında biyomateryal ilave edildi ve kültürler, ortam değişikliği yapılmadan inkübasyon süreleri boyunca (24, 48 ve 72 saat) daha önce belirtilen koşullardaki inkübatörde tutuldu. İşlem görmemiş (biyomateryal içermeyen) kontrol hücreleri de büyüme inhibisyonunu karşılaştırmak için muhafaza edildi. *C. japonica* pupa kafa materyalinden izole edilen kitin yapısının hücreler üzerindeki sitotoksitesi, klasik MTT testi ile değerlendirildi. Kuyucuklardaki biyomateryal inkübasyon süresinden sonra çıkarıldı ve tüm uygulama ve kontrol kuyucuklarına MTT solüsyonu (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) ilave edildi ve plakalar 3 saat 37°C'de karanlıkta bekletildi. Daha sonra lizat uzaklaştırıldı ve formazan kristallerini

çözmek için kuyucuklara DMSO ilave edildi. Rengin stabilizasyonu için 5 dakika beklendikten sonra, 492 nm’de ChroMate®ELISA okuyucu ile okundu. Biyomateryal içermeyen, işlem görmemiş hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edildi. Hücrelerin canlılık yüzdesi (%) aşağıdaki parametre baz alınarak hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık Yüzdesi} = \frac{A_{\text{örnek}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.4.2 İstatistiksel analiz

Veri analizi, GraphPad Prism yazılımı sürüm 8 (GraphPad Software®) kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama ile birlikte ortalamanın standart hatasını temsil eder. İstatistiksel farklılıklar, two-way ANOVA ve ardından post-hoc Bonferroni ile değerlendirildi. \* istatistiksel olarak fark olarak kabul edildi ( $p < 0.05$ ).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

*C. japonica* pupa kafa yapısından izolasyon yapılarak elde edilen kitin film elde edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen kitinin doğada bulunan  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere üç kristal kitin formundan hangi forma ait olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kitin filmin FT-IR, TGA, XRD, SEM, elemental analiz ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup MTT analizi ile sitotoksitesi değerlendirilmiştir.

### 4.1 Materyalin Kitin İçeriği

Bu çalışmada, *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitinin içeriği demineralizasyon ve deproteinizasyon aşamalarından sonra %79,7 olarak belirlenmiştir.

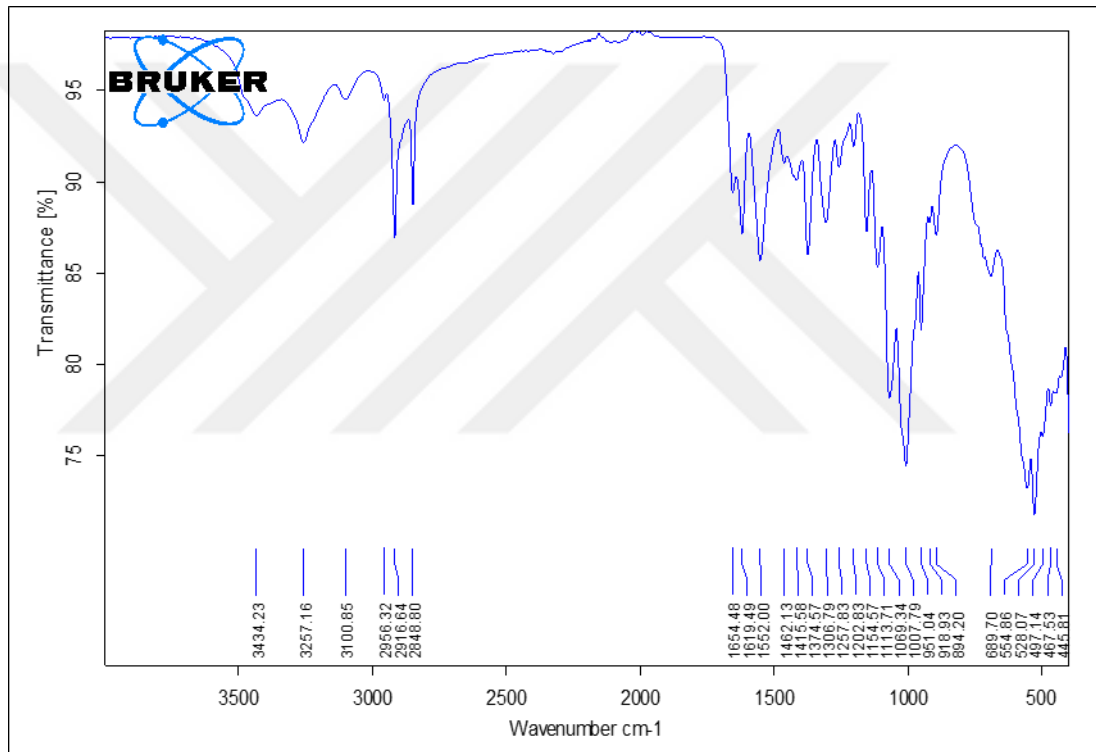
### 4.2 FT-IR

FT-IR spektroskopisi biyomalzemelerin tanımlanması ve karakterizasyonu, fonksiyonel grupların tespiti için kullanılan bir analiz yöntemidir. Malzeme bilimi, kimya, polimer testi, ilaç ve adli analizlerde de bu analiz yöntemi kullanılmaktadır (Noishiki vd., 2003).

*C. japonica* pupa kafa yapısından izole edilen kitinin FT-IR spektrumu Şekil 4.1’de verilmiştir. Kitin karakterizasyonunda önemli olan iki pik bulunmaktadır, bunlar Amid I ve Amid II’dir. Literatürde yer alan bilgilere göre 1660 ve 1620  $\text{cm}^{-1}$  civarında bölünmüş keskin iki pik, kitinin  $\alpha$ -formunu, 1640  $\text{cm}^{-1}$  civarında bölünmemiş bir pik kitinin  $\beta$ -formunu işaret etmektedir (Jang vd., 2004; Magnacca vd., 2018). *C. japonica* türünün pupa kafa yapısından elde edilen kitin izolatının FTIR spektrumunda Amide I bandının ikiye bölündüğü açıkça gözlenmektedir. Amid I piki kitin izolatının spektrumunda literatürle uyumlu şekilde 1654,48 ve 1619,49  $\text{cm}^{-1}$ ’de keskin bir şekilde kendini göstermektedir (Şekil 4.1). Kitin karakterizasyonunda önemli bir diğer pik ise Amide II bandıdır. Bu pik saf bir kitin için 1552  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülmektedir. *C. japonica* türünün pupa kafa yapısından elde edilen kitin izolatu için kaydedilen Amide II bandı 1552,00  $\text{cm}^{-1}$ ’dur. Amide II bandı da literatürle uyumlu olarak belirlenmiştir ve tüm bu spektrum verileri *C. japonica* pupa kafa yapısından izole edilen kitinin saflığını ortaya koymaktadır.

Kitin yapısına karakteristik Amid I bandı ikiye ayrılmış bir şekilde  $1619\text{ cm}^{-1}$ 'de ve  $1654\text{ cm}^{-1}$ 'de (C-O gerilme) olarak görülmektedir. Kitin yapısına karakteristik diğer bantlar olan Amid II bandı  $1552\text{ cm}^{-1}$ 'de (C-N gerilme ve N-H eğilme) ve Amid III bandı  $1306\text{ cm}^{-1}$ 'de (C-N gerilme ve N-H eğilme) görülmektedir.

*C. japonica* pupa kafa yapısından izole edilen kitinin FTIR spektrumu incelendiğinde  $3434\text{ cm}^{-1}$  (O-H gerilme),  $3261\text{ cm}^{-1}$  (N-H titreşimleri) ve  $3100\text{ cm}^{-1}$  (C-H gerilme) görülmektedir (Chen vd., 2015; Hong vd., 2018). Yapının FTIR analizine ilişkin sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.



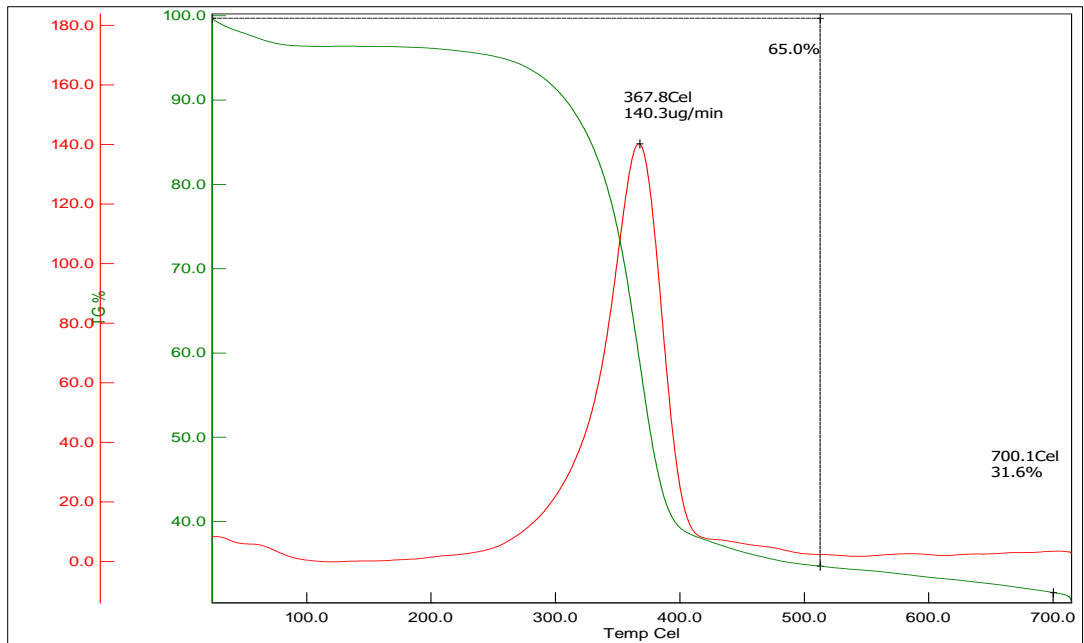
**Şekil 4.1.** *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitin örneklerinin FT-IR spektrumu.

### 4.3 TGA

Bu çalışmada *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitin örneklerinin sıcaklıkla olan bozulmalarını ortaya koymak için gerçekleştirilen TGA analizine ait termogramlar Şekil 4.2'de verilmiştir. Isıtma hızı arttıkça diferansiyel termogravimetri (DTG) termogramları çıkarılmıştır. Bu DTG eğrisinde termal bozunmayla iki

basamakta yapıdan kütle kaybı olduğu gözlemlendi. İlk basamakta 0-100°C aralığındaki kütle kayıpları biyopolimerin moleküller arası hapsolmuş suyun uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır (Jang vd., 2004). Burada kütle kaybı görülmemiştir. İkinci basamakta x-y aralığında gözlenen kütle kaybının ise kitin yapısının ve asetillenmiş kitin birimlerinin bozulması ve sakkarit halka dehidrasyonundan kaynaklandığı bilinmektedir (Wanjun vd., 2005; Paulino vd., 2006). Bu aşamadaki kütle kaybı ise %65 olarak belirlenmiştir. Farklı organizmalardan izole edilen kitinin mevcut çalışmadaki gibi iki aşamada kütle kaybı olduğu daha önce yapılan çalışmalarla literatüre kaydedilmiştir (Jang vd., 2004; Paulino vd., 2006; Jayakumar vd., 2009; Ifuku vd., 2010; Kaya vd., 2014; Shankar vd., 2015; Magnacca vd., 2018).

Bu sonuçlar *C. japonica* pupa kafa yapısından kitinin başarılı bir şekilde üretildiğini destekler niteliktedir. Literatürde  $\alpha$ -kitinin maksimum bozunma sıcaklığının 350°C'nin üzerinde olduğu rapor edilmiştir (Paulino vd., 2006; Abdou vd., 2008). Mevcut çalışmada *C. japonica* kafa kitin örneğinin sahip olduğu DTG<sub>max</sub> (°C) değeri 367,8°C'dir. Bulunan değer literatür ile uyumludur. Termal bozunma sıcaklığı arttıkça kitinin stabilitesi artar ve kitin gibi bir biyopolimerin uygulama alanı seçilirken dikkat edilen en önemli parametrelerden biri termal kararlılıktır (Wysokowski vd., 2015). Materyalin TGA termogramı Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitin örneklerinin TGA termogramı.

#### 4.4 Elemental Analiz

*C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitinin elemental analiz sonuçları ve asetilasyon derecesi (DA) Çizelge 4.1’de verilmiştir. Kitin izolatlarının N içeriği %6,74, C içeriği %48,23 ve H içeriği %6,84 olarak belirlenmiştir. Saf kitin için teorik N yüzdesinin %6,89 olduğu literatürde belirtilmiştir (Kaya vd., 2014). *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitin için kaydedilen N değeri literatür ile oldukça uyumludur. Elemental analiz verileri dikkate alınarak ince kitin filmin asetilasyon derecesi (%DA) %87,29 olarak belirlenmiştir. Elde edilen asetilasyon derecesi, saflaştırma işlemleri, analitik yöntemler ve kitin kaynakları gibi faktörlere bağlıdır (Kaczmarek vd. 2019). Asetilasyon derecesi ve N içeriği izole edilen kitin içeriğinin saflığını ortaya koymaktadır. Daha önce yapılan kitin çalışmaları ile asetilasyon dereceleri uyumlu bulunmuştur (Liu vd., 2006; Kaya vd., 2014; Han vd., 2015). İlişkili sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitinin elemental analiz ve asetilasyon derecesi.

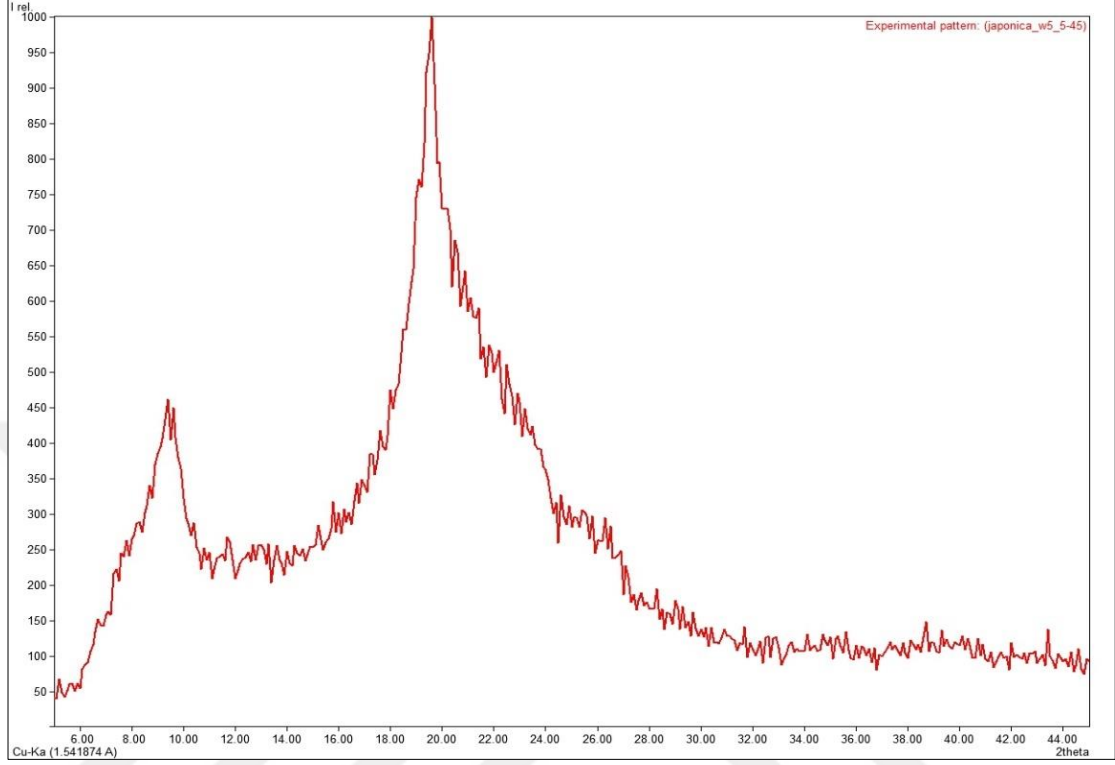
Kitin Numunesi	%N	%C	%H	% DA
<i>C. japonica</i> pupa kafa	6,74	48,23	6,84	87,29

#### 4.5 XRD

*C. japonica* pupa kafa yapısındaki kitin moleküllerinin üç farklı allomorfik formunu ( $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -kitin) ayırt etmek amacı ile XRD kullanıldı. Analiz standart toz kırınım prosedürleri ile gerçekleştirilmiş olup  $2\theta$  cinsinden  $5-90^\circ$  açı aralığında yapıldı. Literatür incelendiğinde saf kitin için XRD analizinde karakteristik pikler vardır. Bunlar  $9^\circ$  ile  $19^\circ$  civarında iki majör pik;  $21^\circ$  ile  $23^\circ$ , civarında da keskin olmayan iki tane minör pikleridir (Demir ve Seyyar, 2020).

*C. japonica* pupa kafa yapısındaki kitinin XRD analiz sonuçları Şekil 4.3’te gösterilmiştir. İzole edilen kitin ince filmin XRD kırınım majör pikleri  $9,42^\circ$  ve  $19,52^\circ$ ’de kaydedilmiştir. Bu pikler literatür ile birebir uyumludur ve izole edilen kitinin

saflığını destekler niteliktedir (Kaya vd., 2014). Elde edilen kitin örneği CrI değerleri formüle göre hesaplandığında %79,73 olduğu belirlenmiştir.

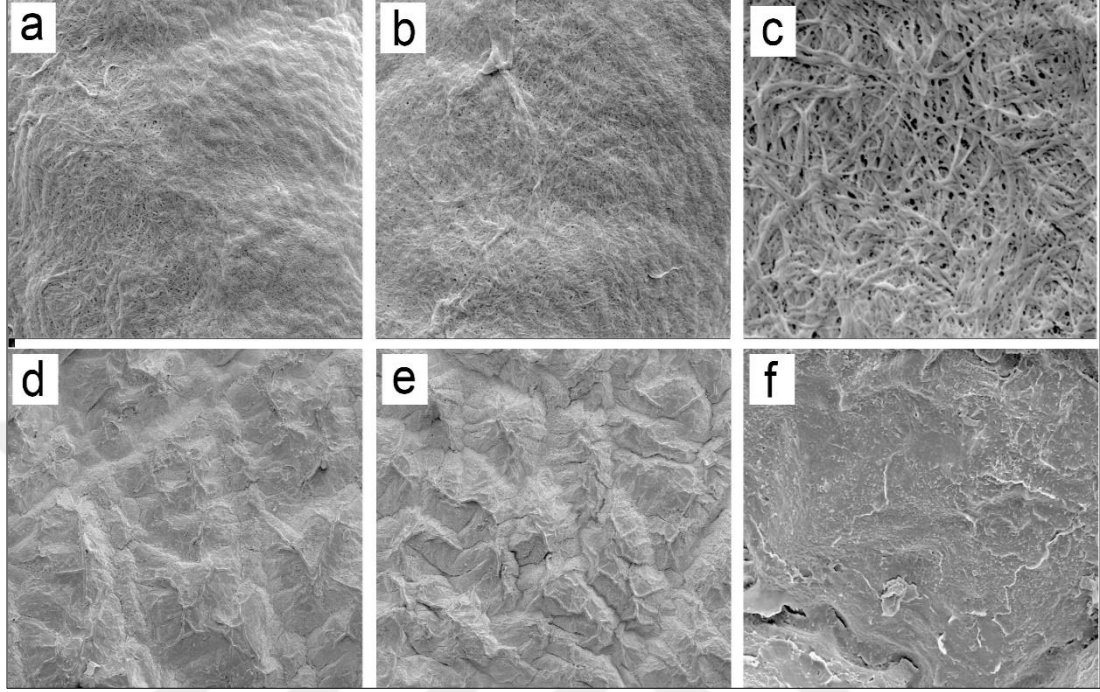


**Şekil 4.3.** *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitin örneklerinin X-ray difraksiyon eğrisi.

#### 4.6 SEM

Literatür incelendiğinde kitin yüzeylerinde, izole edilen canlı grubuna göre farklılıklar olduğu rapor edilmiştir. Kitinin köken aldığı canlıya göre, bir kısmının nanofiber yapıda olduğu, bazı canlılarda hem nanofiber hem de nanoporlara sahip olduğu, az bir canlı grubunda ise nanofiber, nanopor ve mikroporların beraber bulunduğu ve bunlara ek farklı kombinasyonların varlığı da yapılan çalışmalarda görülmüştür. İyi bilindiği gibi, nanofiberler kitin için karakteristiktir; ancak pürüzlü kitin yüzeyi literatürde de rapor edilmiştir. Bu çalışmada, doğal kitin filmin nano ölçekte çift yüzey özelliği gösterebileceği literatüre kazandırılmıştır. Kitin filmin her iki tarafında gözlemlenen bu varyasyonlar, daha sonraki çalışmalarda malzeme uygulamaları için kullanılabilir (Kaya vd., 2015).

*C. japonica*'nın kafa yapısından izole kitinin yüzey morfolojileri SEM aracılığıyla detaylı olarak incelenmiştir.



**Şekil 4.4.** *C. japonica* pupa kafa yapısının SEM görüntüleri. a,b,c) *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitin dorsal yandan görünüşleri. d,e,f) *C. japonica* pupa kafa yapısından elde edilen kitin ventral yandan görünüşleri.

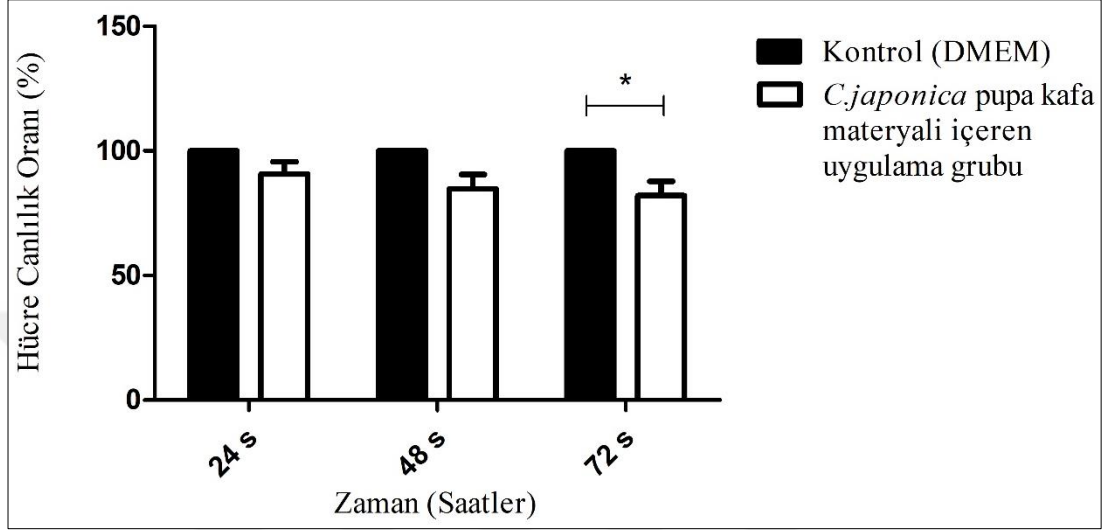
#### 4.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

##### 4.7.1 MTT analizi sonuçları

*C. japonica*'nın pupa kafa yapısından izole edilen kitin filmin sitotoksik aktivitesini değerlendirmek için MTT testi yapıldı. Filmin L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksitesini değerlendirmek ve hayatta kalan hücrelerin yüzdesini belirlemek için kolorimetrik yöntem kullanıldı. MTT testi, tetrazolyum tuzlarının, suda çözünmeyen formazan kristaline dönüştürülmesi esasına dayanır. DMSO ilave edildikten sonra formazan kristali çözülür ve elde edilen renk bir ELISA okuyucu ile ölçülür. Absorbans, yaşayan hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır.

MTT testi sonucunda hücre canlılığı film içermeyen kontrol ve film içeren uygulama gruplarında 24 saat içerisinde sırasıyla % 100 ve % 90,68 olarak kaydedilmiştir. 48. ve 72. saatlerde canlılık yüzdeleri ise sırasıyla % 84,86, % 82,08 olarak belirlenmiştir.

Hücre canlılığı sonuçları 2x2 mm boyutunda *C. japonica*'nın pupa kafa yapısından izole edilen kitinin belirtilen saatlerde L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Üç zaman diliminde de L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri %70'in üzerindedir).



**Şekil 4.5.** *C. japonica* pupa kafa materyalinden elde edilen kitin filmlerin 24, 48 ve 72. saatteki sitotoksosite grafiği (Bar, hücre canlılığının ortalamasını temsil eder  $\pm$  SEM; n=3 istatistiksel fark, \* p< 0.05 olarak gösterilmiştir).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

*C. japonica* türünün pupa kafa yapısından başarılı bir şekilde kitin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan FTIR analizi ile izole edilen kitinin  $\alpha$  formda olduğu ve literatürle oldukça uyumlu pikler sergilediği belirlenmiştir ve bu piklerin keskinliği kitinin saf bir şekilde izole edildiğini göstermiştir. Kafa yapısından izole edilen kitin yüksek termal stabilite sergilemiştir. TGA analizi kitinin  $\alpha$  formda olduğunu desteklemiştir. Elemental analiz ile belirlenen N içeriği ve hesaplanan DA derecesi kitinin saflığını ortaya koymuştur. Kitinin  $\alpha$  formda olduğu ve saf bir şekilde izole edildiği XRD analizi ile de desteklenmiştir. SEM analizi ile izole edilen kitinin fiberlerden ve porlardan oluştuğu ortaya konmuştur. Yapılan sitotoksitite analizlerine göre materyalin hücreler için toksik olmadığı, biyouyumlu olduğu belirlenmiş olup; bu avantajları göz önüne alındığında medikal alanda etkin olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

## 6. KAYNAKÇA

- 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.
- Alam, O. ve Qiao, X., 2020. An in-depth review on municipal solid waste management, treatment and disposal in Bangladesh, *Sustainable Cities and Society*, 52, 101775.
- Ataman, E.T., 2014. Bone Morfojenetik Protein-6 Ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I'in Kontrollü Ardışık Salımının Sementoblast Hücreleri Üzerine Etkileri.
- Barikani, M., Oliaei, E., Seddiqi, H. ve Honarkar, H., 2014. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review, *Iranian Polymer Journal*, 23, 4, 307-326.
- Bhuiyan, M.R., Hossain, M., Zakaria, M., Islam, M. ve Uddin, M.Z., 2017. Chitosan coated cotton fiber: physical and antimicrobial properties for apparel use, *Journal of Polymers and the Environment*, 25, 2, 334-342.
- Chen, X., Liu, Y., Kerton, F.M. ve Yan, N., 2015. Conversion of chitin and N-acetyl-d-glucosamine into a N-containing furan derivative in ionic liquids, *Rsc Advances*, 5, 26, 20073-20080.
- Chen, Y.-M., Pekdemir, S., Bilican, I., Koc-Bilican, B., Cakmak, B., Ali, A., Zang, L.-S., Onses, M.S. ve Kaya, M., 2021. Production of natural chitin film from pupal shell of moth: Fabrication of plasmonic surfaces for SERS-based sensing applications, *Carbohydrate Polymers*, 262, 117909.
- Chen, Y.-M., Sun, J.-W., Iqbal, A., Lv, R., Wang, H. ve Zang, L.-S., 2020. An investigation of *Caligula japonica* (Lepidoptera: Saturniidae) egg distribution and associated parasitoids on walnut trees (*Juglans regia* L.) in northwestern China, *International Journal of Pest Management*, 1-8.
- Chow, K.S., Khor, E. ve Wan, A.C.A., 2001. Porous chitin matrices for tissue engineering: fabrication and in vitro cytotoxic assessment, *Journal of Polymer Research*, 8, 1, 27-35.
- Chung, Y.-C., Wang, H.-L., Chen, Y.-M. ve Li, S.-L., 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens, *Bioresource technology*, 88, 3, 179-184.
- Chupa, J.M., Foster, A.M., Sumner, S.R., Madihally, S.V. ve Matthew, H.W., 2000. Vascular cell responses to polysaccharide materials:: in vitro and in vivo evaluations, *Biomaterials*, 21, 22, 2315-2322.

- Croisier, F. ve Jérôme, C., 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European polymer journal*, 49, 4, 780-792.
- Demir, Z. ve Seyyar, O., 2020. Isolation and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Aculepeira ceropegia* (Walckenaer, 1802), *Acta Biologica Turcica*, 33, 4, 252-257.
- Detry, O., Arkadopoulos, N., Kahaku, E., Watanabe, F.D., Rozga, J. ve Demetriou, A.A., 2000. Clinical use of a bioartificial liver to treat acetaminophen-induced fulminant hepatic failure, *Support of the acutely failing liver*.
- Dresselhaus, G., Dresselhaus, M. ve Avouris, P., 2001. CNTs: Synthesis, Structures, Properties and Applications, vol. 80 of, *Topics in Applied physics*.
- Dutta, P.K., Dutta, J. ve Tripathi, V., 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications.
- Evans, E.E. ve Kent, S.P., 1962. The use of basic polysaccharides in histochemistry and cytochemistry: IV. Precipitation and agglutination of biological materials by aspergillus polysaccharide and deacetylated chitin, *Journal of histochemistry & cytochemistry*, 10, 1, 24-28.
- Goessler, U.R., Hörmann, K. ve Riedel, F., 2004. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix, *International journal of molecular medicine*, 13, 4, 505-513.
- Grande, D., Halberstadt, C., Naughton, G., Schwartz, R. ve Manji, R., 1997. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 34, 2, 211-220.
- Han, Z., Zeng, Y., Lu, H. ve Zhang, L., 2015. Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products, *Carbohydrate research*, 413, 75-84.
- Hench, L.L. ve Wilson, J., 1984. Surface-active biomaterials, *Science*, 226, 4675, 630-636.
- Hoekstra, R. ve Chamuleau, R., 2002. Recent developments on human cell lines for the bioartificial liver, *The International journal of artificial organs*, 25, 3, 182-191.
- Hong, S., Yuan, Y., Yang, Q., Zhu, P. ve Lian, H., 2018. Versatile acid base sustainable solvent for fast extraction of various molecular weight chitin from lobster shell, *Carbohydrate polymers*, 201, 211-217.

- Ifuku, S., Nogi, M., Yoshioka, M., Morimoto, M., Yano, H. ve Saimoto, H., 2010. Fibrillation of dried chitin into 10–20 nm nanofibers by a simple grinding method under acidic conditions, *Carbohydrate Polymers*, 81, 1, 134-139.
- Islam, S., Bhuiyan, M.R. ve Islam, M., 2017. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering, *Journal of Polymers and the Environment*, 25, 3, 854-866.
- Itoh, S., Suzuki, M., Yamaguchi, I., Takakuda, K., Kobayashi, H., Shinomiya, K. ve Tanaka, J., 2003. Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube, *Artificial organs*, 27, 12, 1079-1088.
- Jang, M.K., Kong, B.G., Jeong, Y.I., Lee, C.H. ve Nah, J.W., 2004. Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 14, 3423-3432.
- Jayakumar, R., Egawa, T., Furuike, T., Nair, S. ve Tamura, H., 2009. Synthesis, characterization, and thermal properties of phosphorylated chitin for biomedical applications, *Polymer Engineering & Science*, 49, 5, 844-849.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S., Tokura, S., Tamura, H. ve Selvamurugan, N., 2010. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications, *Progress in Materials Science*, 55, 7, 675-709.
- Kang, I.-K., Moon, J.-S., Jeon, H.M., Meng, W., Kim, Y.I., Hwang, Y.J. ve Kim, S., 2005. Morphology and metabolism of Ba-alginate encapsulated hepatocytes with galactosylated poly (allyl amine) and poly (vinyl alcohol) as extracellular matrices, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16, 6, 533-539.
- Kawaguchi, Y., Ichida, M., Kusakabe, T. ve Koga, K., 2003. Chorion architecture in the Japanense giant silkworm, *Caligula japonica japonica* Moore, *Sericologia* (France).
- Kaya, M., Baran, T., Menten, A., Asaroglu, M., Sezen, G. ve Tozak, K.O., 2014. Extraction and characterization of  $\alpha$ -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food biophysics*, 9, 2, 145-157.
- 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. ve Turkes, T., 2014. Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source, *Frontiers in Zoology*, 11, 1, 1-10.
- Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C. ve Cho, C.-S., 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology advances*, 26, 1, 1-21.

- Koide, S., 1998. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks, *Nutrition research*, 18, 6, 1091-1101.
- Kurita, K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Progress in Polymer science*, 26, 9, 1921-1971.
- Li, J., Pan, J., Zhang, L. ve Yu, Y., 2003. Culture of hepatocytes on fructose-modified chitosan scaffolds, *Biomaterials*, 24, 13, 2317-2322.
- Lindahl, U. ve Hook, M., 1978. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules, *Annual review of biochemistry*, 47, 1, 385-417.
- Liu, D., Wei, Y., Yao, P. ve Jiang, L., 2006. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards, *Carbohydrate research*, 341, 6, 782-785.
- Liu, Y. ve Feng, W., 2013. Prevention and cure experiment of three kinds of pesticides to *Dictyoploca japonica* Moore, *Journal of Jilin Forestry Science and Technology*, 42, 23-26.
- Magnacca, G., Guerretta, F., Vizintin, A., Benzi, P., Valsania, M.C. ve Nisticò, R., 2018. Preparation, characterization and environmental/electrochemical energy storage testing of low-cost biochar from natural chitin obtained via pyrolysis at mild conditions, *Applied Surface Science*, 427, 883-893.
- Matsuyama, H., Teramoto, M. ve Urano, H., 1997. Analysis of solute diffusion in poly (vinyl alcohol) hydrogel membrane, *Journal of membrane science*, 126, 1, 151-160.
- Mattioli-Belmonte, M., Gigante, A., Muzzarelli, R., Politano, R., De Benedittis, A., Specchia, N., Buffa, A., Biagini, G. ve Greco, F., 1999. N, N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage, *Medical & biological engineering & computing*, 37, 1, 130-134.
- Nagahama, H., Nwe, N., Jayakumar, R., Koiwa, S., Furuike, T. ve Tamura, H., 2008. Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications, *Carbohydrate Polymers*, 73, 2, 295-302.
- Nishimura, K., Nishimura, S.I., Seo, H., Nishi, N., Tokura, S. ve Azuma, I., 1986. Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin, *Journal of biomedical materials research*, 20, 9, 1359-1372.
- Noishiki, Y., Takami, H., Nishiyama, Y., Wada, M., Okada, S. ve Kuga, S., 2003. Alkali-induced conversion of  $\beta$ -chitin to  $\alpha$ -chitin, *Biomacromolecules*, 4, 4, 896-899.
- O'brien, F.J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials today*, 14, 3, 88-95.

- 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.
- Periyah, M.H., Halim, A.S. ve Saad, A.Z.M., 2016. Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research, *Pharmacognosy reviews*, 10, 19, 39.
- Ravichandran, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J.R., Mukherjee, S. ve Ramakrishna, S., 2012. Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications, *Macromolecular bioscience*, 12, 3, 286-311.
- Roether, J., Boccaccini, A.R., Hench, L., Maquet, V., Gautier, S. ve Jérôme, R., 2002. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 23, 18, 3871-3878.
- Samal, S.S. ve Bal, S., 2008. Carbon nanotube reinforced ceramic matrix composites-a review.
- Sevinç Özakar, R., 2010, Periodontitis tedavisi için tetrasiklin HCl içeren kitosan boncuklarının hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Shamshina, J.L., Berton, P. ve Rogers, R.D., 2019. Advances in functional chitin materials: a review, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7, 7, 6444-6457.
- Shankar, S., Reddy, J.P., Rhim, J.-W. ve Kim, H.-Y., 2015. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of chitin nanofibrils reinforced carrageenan nanocomposite films, *Carbohydrate polymers*, 117, 468-475.
- Shigemasa, Y. ve Minami, S., 1996. Applications of chitin and chitosan for biomaterials, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13, 1, 383-420.
- Suh, J.-K.F. ve Matthew, H.W., 2000. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, 21, 24, 2589-2598.
- Varghese, S., Hwang, N.S., Canver, A.C., Theprungsirikul, P., Lin, D.W. ve Elisseeff, J., 2008. Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Matrix Biology*, 27, 1, 12-21.
- Wang, S.-F., Shen, L., Zhang, W.-D. ve Tong, Y.-J., 2005. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites, *Biomacromolecules*, 6, 6, 3067-3072.
- Wanjin, T., Cunxin, W. ve Donghua, C., 2005. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan, *Polymer Degradation and Stability*, 87, 3, 389-394.

- 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.
- Xu, Q., Yicun, W., Gang, W., Siyuan, W., Jizhou, H., Tiexin, L. ve Shanqin, F., 2014. Occurrence Reasons and Control Measures of *Caligula Japonica* in Longnan City of China, *Plant Diseases & Pests*, 5, 5.
- Yang, B., Cao, L., Li, J., Li, Y., Wang, Z. ve Qin, L., 2008. Genetic diversity assessment of *Dictyoploca japonica* from different areas, *Chinese Bulletin of Entomology*, 45, 418-421.
- Yang, B., Zhang, X. ve Cao, L., 2008. Biological characteristics of *Dictyoploca japonica* Moore and the technology for prevention and control, *PESTICIDES-SHENYANG-*, 47, 2, 153.
- Yang, T.-L., 2011. Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ, *International journal of molecular sciences*, 12, 3, 1936-1963.
- Yannas, I. ve Burke, J.F., 1980. Design of an artificial skin. I. Basic design principles, *Journal of biomedical materials research*, 14, 1, 65-81.
- Yıldırım, Z., Öncül, N. ve Yıldırım, M., 2015. Kitosan ve antimikrobiyal özellikleri, *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5, 1, 19-36.
- Yoon, S.C. ve Jhon, M.S., 1982. The transport phenomena of some model solutes through postcrosslinked poly (2-hydroxyethyl methacrylate) membranes with different tactic precursors, *Journal of Applied Polymer Science*, 27, 8, 3133-3149.
- Youzhong, L., 2009. Damage regularity and control techniques of *Dictyoploca japonica* [J], *Forest Pest and Disease*, 2.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Beyza Fırat

### EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

**Lisans** : Aksaray Üniversitesi, Hemşirelik Bölümü, 2015-2019

**Yüksek Lisans** :Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler  
Biyoloji Anabilim Dalı, 2020-2022

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

#### TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. *Caligula japonica* kafa yapısından kitin film üretimi, karakterizasyonu ve sitotoksitesinin değerlendirilmesi, Konya, ICAENS 2021