



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

***DERMESTES ATER* PUPASINDAN ELDE EDİLEN KİTOSANIN  
DERİ KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Betül ÇAKMAK**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Murat KAYA**

**AKSARAY, 2021**

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 192330402 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Betül ÇAKMAK tarafından hazırlanan “**DERMESTES ATER PUPASINDAN ELDE EDİLEN KİTOSANIN DERİ KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA**

Aksaray Üniversitesi

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

**Üye: Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN**

Ankara Üniversitesi

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

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

Aksaray Üniversitesi

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

Tez Savunma Tarihi: 22/06/2021

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 düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden olduğunu, 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.

**Betül ÇAKMAK**

## TEŞEKKÜR

Aydınlığım ışığı, 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 yürütülmesine danışmanlık eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında yer alan antikanser çalışmalarının deney ve yorumlama aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN ve Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisansım boyunca ve bu tez çalışmasında, bana öğretmiş olduğu bilgilerini, tecrübelerini, yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi İsmail BİLİCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım süresince, benden desteğini, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen grup arkadaşlarım Ar. Gör. Behlül Koç Bilican ve Ar. Gör. Bahar Akyüz Yılmaz'a teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca yanımda destek ve yardımlarını eksik etmeyen arkadaşlarım; Rumeysa Sarıgöl, Büşra Ünal ve Rabia Betül Aygün'e, tez yazım aşamasında desteğini, tezimde yer alan görsellerde de emeğini esirgemeyen değerli arkadaşım Recep Altın'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda bana güvenen, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, büyük sabır gösteren ve bugünlere gelmemi sağlayan başta annem ve babam olmak üzere, ablalarım; Aslı, Emine, Esra, Bedia ve kardeşim Şevval'e çok teşekkür ederim.

Son olarak buraya kadar gelmemi sağlayan, her bir çalışmamda emeği ve sevgisini eksik etmeyen sevgili annem Sultan Çakmak'a ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Betül ÇAKMAK  
AKSARAY, 2021

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>5</b>
2.1 Kitosanın özellikleri ve Uygulamaları .....	5
2.2 <i>Dermestes ater</i> De Geer, 1774 .....	7
2.3 Kitosan ve Antikanser Etkisi .....	7
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>12</b>
3.1 Malzeme Temini.....	12
3.2 Kitin ve Kitosanın Eldesi .....	12
3.2.1 Demineralizasyon işlemi .....	13
3.2.2 Deproteinizasyon işlemi .....	13
3.3 Kitosan Eldesi.....	13
3.4 Karakterizasyon.....	14
3.4.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	14
3.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR) .....	14
3.4.3 Termogravimetrik analiz (TGA), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) .....	14
3.4.4 X-ışını difraktometresi (XRD).....	15
3.4.5 Elemental analiz (EA) .....	15
3.5 Kitin İçeriğinin Belirlenmesi.....	15
3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları .....	16
3.6.1 Hücre hatları .....	16
3.6.2 Kitosan çözeltilerinin hazırlanması .....	16
3.6.3 Hücre sitotoksitesite deneyi.....	16
3.6.4 İstatiksel analiz .....	17
3.6.5 xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi.....	17
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>18</b>
4.1 Kitin İçeriği .....	18
4.2 Elemental Analiz .....	18
4.3 TGA/DSC.....	19
4.4 XRD.....	23
4.5 FT-IR .....	24
4.6 <i>D. ater</i> Kitin ve Kitosana ait Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri .....	27
4.7 <i>D. ater</i> Kitosanınin Sitotoksitesite ve Antikanser Etkisinin LMW Kitosan ile Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi.....	31
4.8 xCELLigence Cihazı ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi .....	34
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>37</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>45</b>

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### **DERMESTES ATER PUPASINDAN ELDE EDİLEN KİTOSANIN DERİ KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Betül ÇAKMAK**

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

**Danışman: Prof. Dr. Murat KAYA**

### ÖZET

Kitin  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) bağlantılı iki N-asetil D Glukozamin birimlerinden meydana gelen polisakkarit esaslı bir biyopolimerdir. Selülozdan sonra dünya genelinde en bol bulunan polimerdir. Kitosan ve türevleri; antikanser, toksik olmama, biyolojik olarak parçalanabilirlik, antioksidan, biyoyumlu, antimikrobiyal özellikleri sayesinde tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. *Dermestes ater*, Dermestidae ailesine ait bir böcek türüdür. Siyah larder böceği olarak da bilinen bu böcekler hayvansal kaynaklı organik maddeyle beslenirler. Melanom, bilinen adıyla cilt kanseri yüksek ölüm oranına, yüksek çoklu ilaç direncine ve düşük hayatta kalma oranına sahip bir kanser türüdür.

Yapılan bu çalışmada, belirli oranlarda asit ve alkali muamelesi yapılarak *D. ater* böceği pupa kabuğundan kitin izole edilmiştir. İzole edilen kitin örnekleri termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskobu (SEM), X-ışını difraktometresi (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve elemental analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Karakterize işleminden sonra kitin yapısından kitosan eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kitosan da FT-IR, XRD, SEM, TGA ve elemental analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyonların sonucunda, elde edilen kitin ve kitosanın literatürde ki veriler ile eş değer oranlarda olduğu ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada *Dermestes ater* pupasından kitin ve kitosan elde edilerek detaylı karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca elde edilen kitosan A-375 ve L929 hücre hatlarına uygulanarak cilt kanseri ve sağlıklı fare fibroblast hücrelerinin canlılığı etkisi belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kitin, Kitosan, *Dermestes ater*, Karakterizasyon, Kanser, Melanom.

**Haziran, 2021; 45 sayfa**

**M.Sc. THESIS**

**THE EFFECT OF CHITOSAN OBTAINED FROM *DERMESTES ATER*  
PUPA ON SKIN CANCER**

**Betül ÇAKMAK**

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

**Supervisor: Prof. Dr. Murat KAYA**

**ABSTRACT**

Chitin is a polysaccharide-based biopolymer comprising  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) linked N- acetyl-D-glucosamine units. It is the most abundant polymer worldwide, after cellulose. Chitosan and its derivatives; thanks to anticancer, non-toxicity, biodegradability, antioxidant, biocompatibility, antimicrobial properties are widely used in the medical field. *Dermestes ater* is a species of insect that belongs to the Dermestidae family. Also known as the black larder beetle, these insects feed on the organic matter of animal origin. Melanoma, known as skin cancer, is a type of cancer with a high mortality rate, high multi-drug resistance, and a low survival rate.

Herein, chitin was extracted from *D. ater* beetle pupa shell with certain amounts of acid and alkali treatment. Chitin samples were characterized by thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffractometer (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and elemental analysis methods. After the characterization process, chitosan was obtained from the chitin structure. The obtained chitosan was also characterized by FT-IR, XRD, SEM, TGA, and elemental analysis methods. As a result of these characterizations, it was revealed that the obtained chitin and chitosan were similar to the data in the literature. In the present work, chitin and chitosan were isolated from *Dermestes ater* pupa, and detailed characterization was made. The effect of the obtained chitosan on cell lines A-375 and L929 on skin cancer and viability of healthy mouse fibroblast cells was examined.

**Keywords:** Chitin, Chitosan, *Dermestes ater*, Characterization, Melanoma Cancer.

**June, 2021; 45 pages**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2. 2. <i>D. ater</i> pupasının mikroskop görüntüsü .....	7
Şekil 3. 1. Kültüre edilmiş <i>D. ater</i> pupası.....	13
Şekil 3. 2. Kitin ve kitosan eldesi .....	15
Şekil 4. 1. <i>D. ater</i> kitinine ait TG pikleri. ....	21
Şekil 4. 2. <i>D. ater</i> kitinine ait DSC pikleri. ....	21
Şekil 4. 3. <i>D. ater</i> kitosana ait TG sonuçları.....	22
Şekil 4. 4. <i>D. ater</i> kitosana ait DSC sonuçları. ....	22
Şekil 4. 5. <i>D. ater</i> kitin ve kitosana ait XRD kırınım pikleri. ....	24
Şekil 4. 6. <i>D. ater</i> kitinin FTIR spektrumları.....	25
Şekil 4. 7. <i>D. ater</i> kitosana ait FTIR spektrumları.....	26
Şekil 4. 8. a) Farklı büyütme ölçeklerinde <i>D. ater</i> kitini ve kitosana ait ışık mikroskobu görüntüleri. ....	28
Şekil 4. 8. b) Farklı büyütme ölçeklerinde <i>D. ater</i> kitini ve kitosana ait ışık mikroskobu görüntüleri. ....	29
Şekil 4.9. <i>D. ater</i> kitinine ait SEM görüntüleri.....	30
Şekil 4.10. <i>D. ater</i> kitosana ait SEM görüntüleri.....	31
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda <i>D. ater</i> ve LMW kitosan çözeltileri ile muamele edilen A-375 melanom hücrelerinin 24. (a), 48. (b) ve 72. (c) saatlerdeki hücre canlılık yüzdeleri (%). (%).....	32
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda <i>D. ater</i> ve LMW kitosan çözeltileri ile muamele edilen L929 fibroblast hücrelerinin 24. (a), 48. (b) ve 72. (c) saatlerdeki hücre canlılık yüzdeleri (%). (%).....	33
Şekil 4.13. <i>D. ater</i> kitosan ve LMW kitosan malzemelerinin L929 hücresi üzerine anti-proliferatif etkisinin Xcelligence cihazı ile gösterimi.....	35
Şekil 4.14. <i>D. ater</i> kitosan ve LMW kitosan malzemelerinin A-375 hücresi üzerine anti-proliferatif etkisinin Xcelligence cihazı ile gösterimi.....	36

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> <i>D. ater</i> pupasına ait kitin ve kitosanın asetilasyon derecesi (DA) ve kitin elemental analiz sonuçları.....	19
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>D. ater</i> pupasından elde edilen kitin ve kitosana ait TGA/DSC analizlerinin sonuçları. ....	20
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>D. ater</i> kitin ve kitosana ait FT-IR fonksiyonel grubu ve titreşim modları .....	27



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>C</b>	Karbon
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Kloroform
<b>cm</b>	Santimetre
<b>CrI</b>	Kristalinite İndeksi
<b>DA</b>	Asetilasyon Derecesi
<b>DTG</b>	Diferansiyel Termogravimetri
<b>EtOH</b>	Etil alkol
<b>FT-IR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>H</b>	Hidrojen
<b>HCl</b>	Hidroklorik Asit
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamper
<b>mm</b>	Milimetre
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
<b>N</b>	Azot
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>°</b>	Derece
<b>O</b>	Oksijen
<b>°C</b>	Santigrat
<b>pH</b>	Hidrojen Potansiyeli
<b>S</b>	Kükürt
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi
<b>SD</b>	Standart Sapma
<b>TGA</b>	Termogravimetrik Analiz
<b>XRD</b>	X-ışını Kırınımı Yöntemi
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>µM</b>	Mikrometre
<b>Θ</b>	Theta
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>γ</b>	Gama
<b>%</b>	Yüzde
<b>~</b>	Yaklaşık

## 1. GİRİŞ

Biyopolimerler; canlı organizmaların yaşam sürecinde kendiliğinden meydana gelen polimerlerdir. Doğada en bol bulunan biyopolimer selülozdur. Kitin ise selülozdan sonra doğada en bol bulunan ikinci polisakkarittir. Kitin, poli  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) bağlantılı iki N-asetil D Glukozamin birimlerinden oluşan bir polimerdir (Gortari ve Hours, 2013). İlk olarak mantarların hücre duvarında keşfedilen kitin daha sonra yengeç, karides, ıstakoz, kerevit gibi canlıların atık kabuklarında gözlenmiştir. Son yapılan incelemelerde ise kitin böceklerin de içinde yer aldığı tüm arthropoda şubesinde, örümceklerde, süngerlerde, mercanlarda, tardigradlarda, nematodlarda ve alglerde bulunduğu ortaya konmuştur (Al Sagheer vd., 2009; Ehrlich vd., 2010; Kaya, vd., 2014; Rinaudo vd., 2006). Kitin, biyolojik uyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve toksik olmama gibi birçok özelliğe sahiptir (Kumar vd., 2000). Elde edildiği kaynağa göre 3 farklı kristal formda bulunur. Bunlar  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ ' dir (Aranaz vd., 2018). Bu formlar arasında doğada en çok  $\alpha$ - formunda kitin bulunmaktadır ve bu form kitinin en stabil formudur (Struszczyk vd., 2019). Kitin kristal yapısı gereği hidrofobiktir, suda ve organik çözücülerde çözünemez. Kitinin birçok uygulama alanına sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar; atık su arıtımı, gıda endüstrisi, tarım, kozmetik malzemeleri ve biyomedikal uygulamalar şeklinde belli başlıklar altında toplanır (Jayakumar vd., 2010). Metal iyonlarının arıtımında kullanılmaktadır (Saravanan vd., 2013). Boyaların ve pigmentlerin arıtma işlemlerinde (El-Sawy vd., 2001). Kolesterol ve yağ bağlama uygulamalarında (Kong vd, 2011). Ambalaj yapımında sıkça kullanılmaktadır (Srinivasa ve Tharanathan, 2007). Koruyucu ve gıda katkı maddesi olarak birçok gıda içerisinde kullanılmaktadır (Agulló vd., 2003). Tohum ve gübre kaplama ile toprağa kontrollü gübre salınımını sağlamaktadır (Shamshina vd., 2020). Kontrollü ilaç salınımı çalışmalarında da sıkça kullanılmaktadır (Dev vd., 2010). Nemlendirici, vücut kremleri ve losyonların içeriğinde yer almaktadır (Aranaz vd., 2018). Doku mühendisliği çalışmalarında yoğun çalışılmaktadır (Jayakumar vd., 2011). Yara bantlarının yapımı ve kanser teşhisi gibi çok çeşitli çalışma ve uygulama alanına sahip olduğu görülmektedir (Bouhenna vd., 2015).

Kitin çok sayıda kullanım alanına sahip olsa da kristal yapısından dolayı çoğu çözücüde çözünmemektedir ve bu durum kitinin kullanım alanını kısıtlamaktadır. Bu

dezavantajları ortadan kaldırmak için uzun yıllardır kitinin deasetillenmiş formu olan kitosan tercih edilmektedir.

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polimerdir. Kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi birkaç parametreye bağlıdır. Bunlar; deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığıdır. Bu parametreler ise; kitinin elde edildiği kaynağa, izolasyon sırasında uygulanan ısıya ve kitin izolasyon çeşitlerinden hangisinin kullanıldığına bağlı olarak değişim göstermektedir (Guo vd., 2002). Kitin yapısı deasetillenerek kitosana dönüştüğünde molekül ağırlığı düşer ve kitosanın ortalama moleküler ağırlığı 5 ila 2000 kDa arasında olduğu bilinmektedir. Kitosanın viskozitesi deasetilasyon derecesi ile doğru oranda artış göstermektedir (Dash vd., 2011). Deasetilasyon derecesini artışıyla kitosan zinciri daha esnek bir yapıya sahip olur ve viskozitesi artar. Bununla birlikte viskozite konsantrasyona da bağlıdır. Konsantrasyonun artması da viskoziteyi artıran bir başka faktördür. Sıcaklık ise kitosan çözeltisinin viskozitesini düşüren etmenler arasında yer alır (Kofuji vd., 2005). Kitin ile kitosanın arasındaki en belirgin fark çözünürlükleridir. N - asetilasyon derecesi bu iki polimer arasındaki çözünürlük farkının belirleyen bir parametredir. Kitosanın deasetillenmesi sonucunda kitin yapısına göre daha aktif bir forma sahip olur. İki biyopolimerin yapısında da hidroksil ve amino grupları bulunmaktadır. Kitinin deasetillenmesi sonucu amino gruplarının artmasıyla birlikte kitosan zinciri boyunca asitler tarafından protonasyonuna bağlı olarak oluşan çok sayıda katyonik bölge, hem polariteyi hem de elektrostatik itme derecesini artırarak çözünürlüğünü artırır. Bu durum kitosanın çok daha fazla kullanım alanına sahip olmasına yol açar (Bakshi vd., 2020). Kitosan, su ve organik çözücülerde çözünmezken kitinin aksine düşük konsantrasyonlardaki asetik ve sitrik asit gibi seyreltik asitlerde çözünürler. Kitosan ve türevleri, biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama ve analjezik, anti tümör, hemostatik, hipokolesterolemik, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri gibi rekabetçi biyolojik özellikleri sayesinde tıbbi ve farmasötik alanlarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Kim vd., 2018).

*Dermestes ater*, Dermestidae ailesine ait bir böcek türüdür. Siyah larder böceği olarak da bilinen bu böcekler hayvansal kaynaklı organik maddeyle beslenirler (Kumara vd., 2009). Peynir, kümes hayvanları, deri, balık vb. depolanan gıdalara ciddi zarar verdikleri için bu canlı türünün genel özellikleri detaylı tanımlanmıştır (Charabidze

vd., 2014). *D. ater* böcek türü üzerinde literatürde kitin izolasyonu, karakterizasyonu ve kitosan eldesi ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır.

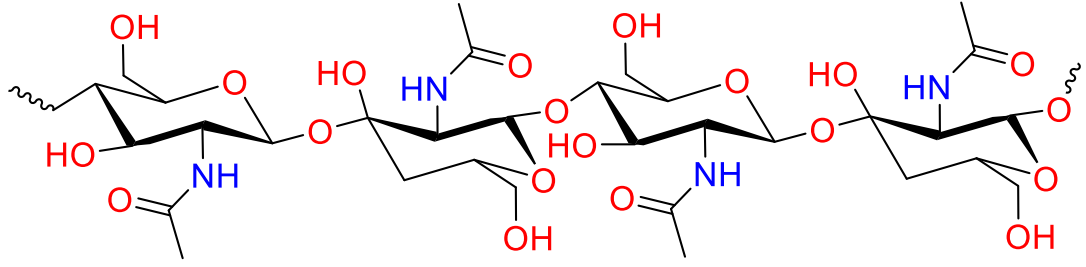
Kanser, vücudun diğer bölgelerine yayılma, istila etme potansiyeline sahip olan hücrelerin anormal olarak büyümesiyle meydana gelen bir hastalıktır. Günümüzde kanser hastalığının tedavisinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Cilt kanseri dünya genelinde çok yaygın olarak görülen bir kanser türüdür. Yüksek ölüm ve düşük hayatta kalma oranına sahip olan bu kanser tipinin bunlara ek olarak çoklu yüksek ilaç direnci de gösterdiği bilinmektedir (Rengifo vd., 2019). Deri kanserine yakalanmanın genetik ve çevresel olmak üzere birçok nedeni olduğu bilinse de en yaygın sebebinin ultraviyole (UV) ışınlarına uzun süre maruz kalınmasından kaynaklı olduğu bilinmektedir (Craythorne ve Al-Niami, 2017). Bu kanser tipi genel olarak iki gruba ayrılır. Bunlar; melanom ve melanom dışı deri kanseri şeklinde adlandırılır. Melanom, deri, göz gibi bölgelerde pigment üreten hücrelerin yani melanositlerde genetik mutasyonların ortaya çıkmasından kaynaklanır (Domingues vd., 2018). Melanom deri kanserinin en saldırgan türüdür. Bu sebepten ötürü kanser türlerinde erken teşhis ve ona uygun tedaviyi seçmek kanserin ilerleyen süreçleri için çok önemlidir. Cilt kanserinin tedavisinde kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında en güncel tedavi yöntemleri; cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, fotodinamik terapi, immünoterapi, biyokemoterapi ve hedefe yönelik tedavidir (Domingues vd., 2018). Bu tedavi yöntemleri arasından hangisinin uygulanacağını belirlemek tümörün bulunduğu bölgeye ve hangi evrede olduğuna bağlıdır. Uygulanılan bu tedavi metotlarının avantajlarına ek olarak dezavantajları da vardır. Bazı tedavi yöntemlerinin ciddi oranda yan etkisi bulunmaktadır. Tedavi yöntemlerinden bazıları çok uzun süreli olduğu için hastanın vücut direnciyle beraber psikolojik açıdan da yüksek oranda etkilenmesine sebep olmaktadır. Son yıllarda kanser tedavi yöntemlerine ek olarak alternatif tedavi metotları üzerine de birçok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birkaçı da kitosan ve kitosan temelli yapıların cilt kanseri üzerindeki etkisi ve mekanizmasına bakılarak kanserin tedavisi üzerine yapılan çalışmalardır (Rengifo vd., 2019; Balan vd., 2020). Kitosan ve türevlerinin antitümör, antikanser özelliklerinden faydalanarak kanser tedavisi üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Nam ve Shon, 2009; Zhang vd., 2016). Cilt kanseri üzerine de kitosan ve kitosan bazlı malzemeler ile tedavi yöntem ve teknikleri üzerine yapılan literatürde birçok çalışma yer almaktadır (Balan vd., 2020; Giacone vd., 2020).

Bu tez çalışmasında *D. ater* pupasından ilk kez kitin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen kitin örnekleri Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), termogravimetrik analiz (TGA), X-ışını difraktometresi (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elemental analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Karakterize işleminden sonra kitin yapısından kitosan eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kitosan da FT-IR, XRD, SEM, TGA ve elemental analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyonların sonucunda, elde edilen kitin ve kitosanın literatürdeki veriler ile uyumlu özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada *D. ater* pupasından kitin ve kitosan elde edilerek detaylı karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca, kitosanın cilt kanseri üzerine anti-proliferatif aktivitesini belirlemek için A-375 ve sağlıklı hücre hattında sitotoksik olup olmadığını belirlemek sağlıklı fare fibroblast hücrelerinin canlılığı hücre hattı L929 ile çalışılmıştır.

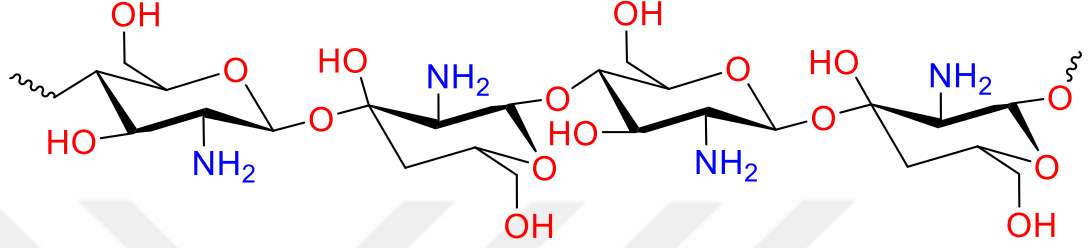
## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Kitosanın Özellikleri ve Uygulamaları

Kitosan kitinin deasetillenmesi sonucu ortaya çıkan yapıdır. Kimyasal yapısına bakıldığında  $\beta$ - (1 → 4) -2-asetamido-D-glikoz ve  $\beta$ - (1 → 4) -2-amino-D-glikoz birimlerinden oluştuğu görülmektedir. Kitosanın kimyasal yapısı incelendiğinde çok fazla özelliğe sahip bir polimer olduğu görülmektedir. Çapraz bağlama ve kimyasal aktivasyon için reaktif gruplardan oluşması, yüksek viskozitesi sayesinde seyreltik sulu asidik çözeltilerde çözünmesi, organik ve inorganik asitlerle tuzlar oluşturması, metal şelatlama özelliği, yüksek yük yoğunluğuna sahip katyonik bir biyopolimer olması, film oluşturma yeteneği gibi çeşitli özellikleri bulunmaktadır (Zargar vd., 2015). Bunlara ek olarak biyoyumlu, biyoaktif, toksik olmama, biyolojik olarak parçalanabilirlik, antimikrobiyal aktivite (mantarlar, bakteriler, virüsler), hipolipidemik aktivite ve antikanser aktivite gibi benzersiz özelliklere sahip bir biyopolimerdir. Kitosan; biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama ve analjezik, antikanser, gibi özellikleri sayesinde son yıllarda çok fazla çalışılmaktadır (Aranaz vd., 2018; Struszczyk vd., 2019; Balan vd., 2020). İlaç endüstrisinde, antiasit ve ülser önleyici özelliği sayesinde midede ilaç iritasyonunu önler. Midenin rahatlamasında görev alır ve ayrıca serbest mide asidini bağlar. Kozmetik ve eczacılıkta ise emülgatör olarak kullanılmaktadır (Baldrick vd., 2010).



Kitin



Kitosan

**Şekil 2. 1.** Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı.

Kozmetik alanında, hemen hemen çoğu üründe kitosan yer almaktadır. Makyaj malzemeleri, cilt losyonları, kremler gibi çoğu saç ve cilt ürünün içeriğindedir. Kitosan cilt yüzeyine uygulandığında nemlendirme ve koruyucu bir tabaka oluşturmasından ötürü birçok kozmetik ürünün vazgeçilmez nemlendirme ajanı olarak görev alır. Saç spreylelerinin içinde saç şekillendirici polimer olarak kullanılır. Bunlara ek olarak; güneş kremleri, dudak nemlendiricisi, antimikrobiyal özelliklerinden dolayı deodorantlarda aktif bileşen olarak kullanılmaktadır (Tzaneva vd., 2017).

Yara izi tedavisinde, Birçok çalışmanın sonucunda kitosanın yara izlerinin iyileşmesini hızlandığı, açık yaraların tedavisinde düzenli kullanımda iz bırakmadan cilt yenilenmesini sağladığı görülmüştür (Patrulea vd., 2015; Dai vd., 2011). Tümör nekroz faktörü gibi bazı enzimlerin salgılanmasında görev almasından kaynaklı kanser çalışmalarında etki mekanizmaları üzerine araştırmaların yapılmasını sağlayan bir polimerdir.

Bunlarla beraber kitosan; yeşil kimya, biyoteknoloji, atık su arıtımı, çevresel koruma, tarım, tekstil ve kâğıt endüstrisi, doku mühendisliği, tıbbi uygulamalar, kontrollü ilaç salınımı gibi birçok alanda aktif olarak kullanılmaktadır.

## 2.2 *Dermestes ater* De Geer, 1774

*D. ater* türü ekonomik açıdan birçok gıdaya zarar veren haşereler arasında yer alır. Menezes ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *Bombyx mori* ipek kozaları ile beslenen *D. ater* türünün ipek kozalarına hasar vererek ekonomik açıdan ipek üretimi üzerindeki ciddi tehdit oluşturduğunu bildirmişlerdir (Menezes vd., 2006). Charabidze ve ekip arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Dermestidae ailesine ait böceklerin insan kadavraları üzerinde gelişimini incelenmiştir (Charabidze vd., 2014). Hayvansal kaynaklı organik madde ile beslendikleri için *D. ater* canlısının gelişim evrelerine bakılarak bir canlıya ait cesetin ölümünden sonra ne kadar süre geçtiğine dair bilgi edinilmesine olanak sağladığı için adli entomoloji alanında önemli bir yere sahiptir.



**Şekil 2. 2.** *D. ater* pupasının mikroskop görüntüsü.

*D. ater* böcek türü üzerinde yapılan literatür taramasının sonucunda bu canlıya ait; gelişim aşamaları, üreme dönemleri, beslenmeleri ve canlının ekonomik açıdan önemi ile ilgili yapılan çalışmalar olduğu gözlemlenmiştir (Menezes vd., 2006; Charabidze vd., 2014). Yapılan tarama sonucunda bu canlıya ait pupadan kitin izolasyonu, karakterizasyonu ve kitosan eldesi ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında ilk kez canlının pupasından kitin izolasyonu, kitosan eldesi ve bu yapıların karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

## 2.3 Kitosan ve Antikanser Etkisi

Kitosan, biyouyumlu, biyobozunur, antikanser, antioksidan, toksik olmama gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip bir yapıdır. Kitosanın antikanser etkisini belirleyen birkaç

parametre bulunmaktadır. Bunlardan birisi öncelikle kitinin kaynağıdır. Kitinin hangi canlıdan izole edildiği ve bundan elde edilecek kitosanın deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı ve pH'sı elde edilen kitosanın hem antimikrobiyal hem de antikanser aktivitesini etkileyen parametreler olduğu önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (Chien vd., 2016).

Kitosanın antikanser etkisi ile ilgili; Howling ve arkadaşları, çeşitli deasetilasyon seviyeleri ve polimer uzunluklarına sahip kitin ve kitosan örneklerinin (kitin için; kitin-50, kitin-50A. Kitosan için; CL311, CL311A, CL313, CL313A), in vitro olarak insan dermal fibroblastlarının proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. Hem ölümsüzleştirilmiş bir insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) hem de ışınlanmış fibroblast besleyici katmanı olmadan kültürlenmiş birincil insan keratinositlerini kullanarak kitin ve kitosanın keratinosit proliferasyonu üzerindeki etkisini in vitro olarak araştırmıştır. Kitin ve kitosanların fibroblast proliferasyonu üzerindeki etkisi farklı konsantrasyonlarda (başlangıçta 5-500 µg/mL) araştırılmıştır. Kitosan klorür numuneleri CL313 ve daha kısa zincir uzunluğundaki fraksiyonu CL313A, test edilen tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu üzerinde en güçlü uyarıcı etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Daha yüksek seviyelerde deasetilasyon içeren kitosan örnekleri, deasetillenme dereceleri daha düşük kitin ve kitosan örneklerine göre fibroblast proliferasyonunu daha fazla uyarmıştır. Daha düşük moleküler ağırlık formu CL313A, daha yüksek proliferatif aktivite sergilemiştir. Sonuç olarak bu çalışmada; kitosan CL313A'nın, fibroblast proliferasyonu üzerinde uyarıcı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir ve bunun sebebinin ise daha yüksek asetillenme derecesine sahip olmasına atfedilmiştir. Kitin-50A (%37 deasetile edilmiş) hiçbir etki göstermezken CL313A (%89) proliferasyonu inhibe etmiştir. Kitosanın keratinositler üzerindeki etkisinin deasetilasyon derecesi ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Howling vd., 2001).

Qi, Li-Feng ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada kitosan nanopartiküllerini insan mide karsinom hücre hattı MGC803 üzerindeki etkilerini ve ilgili mekanizmaları incelemiştir. Hazırladıkları kitosan nanopartiküllerinin öncelikle zeta potansiyeli ve boyutları belirlenmiştir. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100 µg/mL) kitosan nanopartikülleri ile muamele edilmiştir. Bu işleme 24 veya 48 saat boyunca devam edilmiştir. Hücre canlılığını belirlemek için MTT testi ile ölçülmüştür. Hücrelerin kitosan nanopartikülleri ile muamelesi sonucunda hücre canlılığının inhibisyonu, doza ve zamana bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmiştir. Bu

çalışmanın sonucunda Qi, Li-Feng ve arkadaşları, kitosan nanopartiküllerinin MGC803 hücrelerinin hücre proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini rapor ederek kitosanın insan karsinomuna karşı yararlı bir ajan olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (Qi vd., 2005).

Gibot vd. (2015), yaptıkları çalışmada kitosanın kanser hücreleri üzerinde; uyum, proliferasyon ve apoptozunu detaylı olarak araştırmıştır. Kitosanın etki mekanizması üzerinde durarak insan melanomu üzerindeki antikanser etkisini araştırmak için A-375, SKMEL28 ve RPMI7951 hücre hatları üzerinde proliferasyon ve apoptotik etkisini incelemiştir. Çalışmada; hücre canlılığı, bağlanma kinetiği, büyüme hızı, yayılma oranı, apoptoz indüksiyonu, kaspaz aktivitesi, apoptozun spesifik inhibisyonu gibi parametrelere bakılmıştır. Araştırmalar sonucunda; kitosanın, melanom A-375 hücre hattının yapışmasını azalttığı rapor edilmiştir. Bununla beraber kitosanın melanom SKMEL28 hücre hattının proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir, ancak kitosanın metastatik melanom hücre hattı olan RPMI7951'e karşı güçlü pro-apoptotik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak, kitosanın melanomu hedef alan antitümör tedavilerinde daha ileri değerlendirmeler için umut verici bir ajan olabileceğini bildirmişlerdir (Gibot vd., 2015).

Kaya vd. (2016) yaptıkları çalışmada, diplopod türü olan *Julus terrestris*'ten üç boyutlu kitin ve kitosan halkaları elde etmiştir. Bu halkaların karakterizasyonunu yaparak farklı konsantrasyonlardaki kitosanın antikanser etkisini HeLa ve L929 hücre hattında test etmiştir. İlk olarak kitin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen kitin halkaları, 3 saat boyunca 150 °C'de %60'lık NaOH çözeltisi içerisinde kitosan haline getirilmiştir. MTT testi için; kuyucuk başına  $5 \times 10^3$  gelecek şekilde hücreler ekilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki kitosan eklenip 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, *J. terrestris* türünden elde edilen kitosanın L929 hücrelerine karşı toksik olmadığı bildirilmiştir. *J. terrestris* kitosanının 500 µg/mL konsantrasyonunda, 48. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla HeLa hücre büyümesinde önemli oranda azalmanın olduğu rapor edilmiştir (Kaya vd., 2016).

Chien vd. (2016), yengeç kabuğu ve mantardan kitosan elde ederek her ikisinin de antikanser etkilerini IMR 32 ve Hep G2 hücreleri üzerinde incelemiştir. Mantardan elde edilen kitosanın antikanser aktivitesinin, yengeç kabuğundan elde edilen kitosana göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada düşük moleküler

ağırlıklı kitosanın Hep G2 üzerinde, yüksek moleküler ağırlıklı kitosana göre daha çok antikanser aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Chien vd., 2016).

Srinivasan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada dev kaplan karidesi olarak da bilinen *Penaeus monodon* türüne ait olan karides kabuklarından elde ettikleri kitin ve kitosanın yumurtalık kanseri hücre hattında (PA-1) antikanser etkisini araştırmıştır. İlk olarak karides kabuklarından kitin izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde ettikleri kitini, 90 °C'de %50'lik NaOH ile birlikte bir saat boyunca muamele edilmiştir. MTT testi için; kuyucuk başına  $1 \times 10^6$  gelecek şekilde hücreler ekilip uygun şartlar altında 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuklara taze besiyeri ile beraber farklı konsantrasyonlardaki (5-50 µg/mL) kitin ve kitosan eklenip 24 saat inkübe edilmiştir. Sonuç olarak, kitinin 50 µg/mL konsantrasyonunun ve kitosanın 10 µg/mL'de düşük konsantrasyonun PA-1 tümör hücrelerinin büyümesini bastırma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Srinivasan vd., 2018).

Abedian vd. (2019) yaptıkları çalışmada ise; üç kanser hücre hattı üzerinde yüksek moleküler ağırlıklı (HMWC) ve düşük moleküler ağırlıklı olan kitosanın (LMWC) farklı konsantrasyonlarının antikanser etkisi araştırılmıştır. Farklı histolojik kökene sahip MCF-7 (insan meme kanseri), HeLa (insan epitelyal rahim ağzı kanseri) ve Saos-2 (osteosarkom). %75 - %85 deasetilasyon derecesine sahip iki farklı MW: 600-800 kDa ve 100-300 kDa kitosan kullanılmıştır. LMW ve HMW kitosan, %2'lik kitosan çözeltisi kullanılmıştır. MTT testi için; kuyucuk başına  $5 \times 10^3$  gelecek şekilde hücreler ekilip uygun şartlar altında 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücre kültürü ortamı, ayrı ayrı 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL konsantrasyonlarda HMW ve LMW kitosan içeren taze bir ortam ile değiştirilmiştir. HMW ve LMW kitosanın artan konsantrasyonu ile beraber inhibisyon oranı artmıştır ve hücrelerin canlılığı önemli ölçüde azalmıştır. HMW kitosanın Saos ve HeLa üzerindeki etkisi LMW kitosan'dan daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, farklı moleküler ağırlıklara ve deasetilasyon derecesine sahip iki tip kitosanın, kanser hücre hatları olan; HeLa, Saos-2 ve MCF-7'ye karşı büyümeyi önleyici etkiler sergilediği bildirilmiştir. Kitosanın daha az yan etkiye sahip olmasından dolayı kanser tedavisinde umut verici bir seçenek olabileceği düşünülmektedir (Abedian vd., 2019).

Park vd. (2011) ise, kitosanın moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesinin, üç farklı insan tümör hücre hattı (Hep G2, A549 ve PC3) üzerinde belirgin bir şekilde etkili olduğunu bildirmişlerdir (Park vd., 2011).

Younes vd. (2016), kitosanın moleküler ağırlığının mesane kanseri hücreleri üzerinde etkisi olmadığını ve kitosanın deasetilasyonu arttıkça antikanser aktivitesinin arttığını bulmuşlardır. Ayrıca antikanser aktivitenin düşük pH'da yüksek pH koşullarına göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Younes vd., 2016).



### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1 Malzeme Temini

*D. ater* pupası, Mamasın Baraj Gölü (Aksaray) yüzeyi üzerinde biriken *Daphnia magna* ve *D. longispina* su pirelerinin toplanmasından sonra Aksaray Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Genel Biyoloji Laboratuvarında kültüre edilen su pirelerinin bulunduğu kaplar içerisinde kendiliğinden gelişim göstermiştir. *D. ater* canlısına ait yumurtalar da su pirelerinin içerisinde ayrılarak başka bir kaptaki kültüre edilmiştir.



Şekil 3. 1. Kültüre edilmiş *Dermestes ater* pupası.

#### 3.2 Kitin ve Kitosan Eldesi

*Dermestes ater* pupasından kitin izolasyonunu gerçekleştirmek için örnekler üzerinde demineralizasyon ve deproteinizasyon aşamaları uygulanmıştır. İzole edilen kitinden ise deasetilasyon işlemi ile kitosan elde edilmiştir.

### **3.2.1 Demineralizasyon işlemi**

Demineralizasyon, canlıların yapısında bulunan minerallerin uzaklaştırılması için kullanılan bir aşamadır. Pupa örnekleri ilk önce temizleme işlemine tabii tutulduktan sonra ilk kuru ağırlığı hassas teraziyle tartılmıştır. Bu işlemden sonra 4 saat boyunca 50 °C'de 2M'lık HCl çözeltisi içerisinde karıştırılmıştır. HCl muamelesinden sonra pH nötr olana kadar saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan örnekler etüvde 50 °C'de 3 gün boyunca kurutulmuştur.

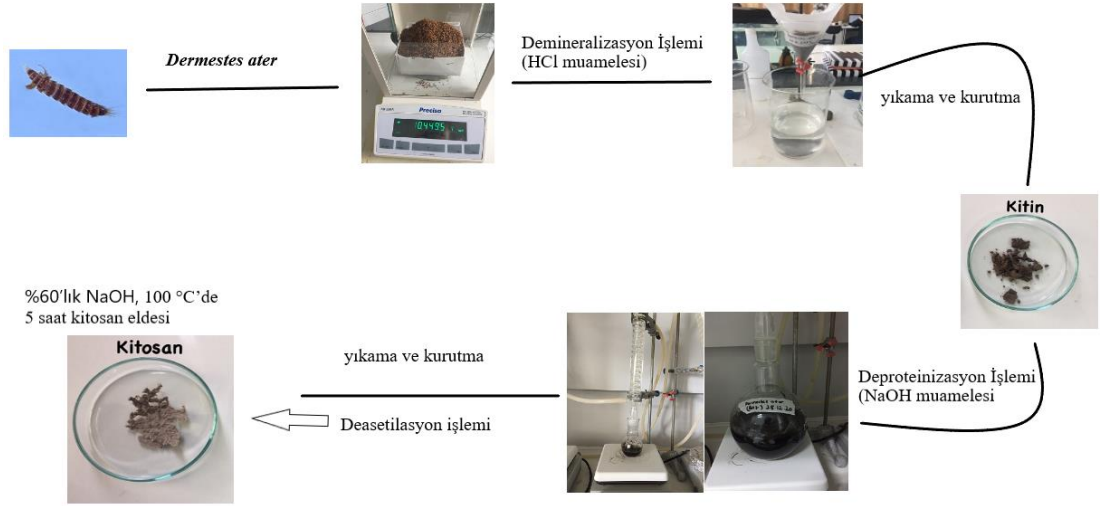
### **3.2.2 Deproteinizasyon işlemi**

Deproteinizasyon, yapıda bulunan proteinin uzaklaştırılmasını sağlayan aşamadır. Bu aşamada genellikle NaOH çözeltisi kullanılmaktadır. Asit işlemiyle minerallerinden uzaklaştırılan örneğinin kurutulmasından sonra deproteinizasyon işleminden önce kuru ağırlığı hassas terazi ile tartılmıştır. 2M'lık NaOH çözeltisi içinde kuru halde bulunan örnekler bu çözeltiliye eklenerek 24 saat boyunca ısıtmalı karıştırıcıda NaOH ile muamele edilmiştir. Bu işlemden sonra pH nötr hale gelene kadar saf su ile yıkanmıştır. Son olarak yıkanan örnekler etüvde 50 °C'de kuruma işlemine bırakılmıştır. Kuruyan kitin örnekleri tartılarak % kitin oranı belirlenmiştir.

Protein ve minerallerinden uzaklaştırılmış örnekler renk giderimi için %10'luk etil alkol ile muamele edilmiştir.

### **3.3 Kitosan Eldesi**

Kitosan, kitinin alkali şartlar altında yüksek sıcaklıkta deasetilasyonu ile elde edilir. Bu aşamada, elde ettiğimiz kitinin ilk olarak kuru ağırlığı tartıldıktan sonra hazırlanılan %60'lık NaOH çözeltisinde, 100 °C'de, 5 saat boyunca bir reflüks sisteminde karıştırılarak elde edilmiştir. Daha önceki aşamalarda olduğu gibi bu aşamada da pH nötr hale gelene kadar yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Yıkanan örnekler etüvde, 50 °C'de kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler hassas teraziyle tartılarak % kitosan oranı belirlenmiştir. Tüm aşamalar sonucunda elde edilen kitin ve kitosan karakterizasyon işlemlerine tabii tutulmuştur.



Şekil 3. 2. Kitin ve kitosan eldesi.

### 3.4 Karakterizasyon

Kitin film örnekleri: FT-IR, TGA, XRD, SEM ve Elemental analiz cihazları kullanılarak karakterize edilmiştir.

#### 3.4.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

*Dermestes ater* örneğinden elde edilen kitin ve kitosan örneklerinin yüzey morfolojileri, Sputter Coater (Cressingto Auto 108) tarafından altın / paladyum ile kaplanarak SEM (Zeiss, GEMINI 500) analiziyle görüntüleri çekilmiştir.

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

FT-IR spektroskopisi kitinin kristalin formunu belirlemek için kullanılan bir tekniktir. *Dermestes ater* örneğinden elde edilen kitin ve kitosan örneklerinin FT-IR spektrumlarını ölçülmek için 600-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda Thermo Fisher FT-IR Spektrometre kullanılmıştır.

#### 3.4.3 Termogravimetrik analiz (TGA), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

Elde edilen kitin ve kitosan örneklerinin termal özellikleri termogravimetrik analiz ile  $\text{N}_2$  atmosferi altında ve 10 °C/dk bir ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir. DSC analizleri ise; argon atmosferi altında, SETERAM DSC 131 EVO cihazı kullanılarak 30 ila 550 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.4 X-Işını difraktometresi (XRD)

XRD, X-ışınlarının karakteristik bir düzen içerisinde kırılması esasına dayanarak yapının kristalliğini belirleyen bir analizdir. XRD spektrumlar, GNR APD 2000 PRO X- ışını difraktometresi kullanılarak 40 kV, 30 mA ve  $5^\circ < 2\theta < 45$  den kırılma aralığında kaydedilmiştir. Elde edilen kitin ve kitosanın kristallinite indeksi, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

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

CrI: % yüzde kristaliniteyi gösterir,

$I_{110}$ :  $2\theta$   $20^\circ$  maksimum şiddeti değerini,

$I_{am}$ :  $2\theta$   $13^\circ$  de amorf pikinin maksimum şiddetini gösterir.

### 3.4.5 Elemental analizi (EA)

Elemental analiz, Kitin ve kitosan izolatlarının N, H, C ve O içerikleri belirlenmek için Thermo Flash 2000 kullanılmıştır. Aşağıda yer alan formülle hesaplanmıştır.

$$DA (\%) = [(C/N - 5.14) / 1.72] \times 100$$

### 3.5 Kitin İçeriğinin Belirlenmesi

*D. ater* pupasından elde edilen kitinin içeriğinin belirlenmesi için ilk olarak canlının işlem görmenden önceki kuru kütlesi belirlenmiştir. İzolasyon işlemlerinden sonra kurutulan kitin kütlesi tartılarak belirlenmiştir. Kitin içeriği bu iki veri arasındaki farklara göre aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Kitin İçeriği (\%)} = (m_{\text{son}}/m_{\text{ilk}}) \times 100$$

$M_{\text{son}}$ : İşlem görmeyen *D. ater* kitinin kütlesi,

$M_{\text{ilk}}$ : izolasyondan sonra kurutulan *D. ater* kitinin kütlesi.

### 3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

#### 3.6.1 Hücre hatları

Çalışma kapsamında *D. ater* ve LMW kitosan çözeltilerinin aktivitelerinin değerlendirilmesi için A-375 ve L929 hatları kullanılmıştır. İnsan cilt malign melanomdan türetilen hücre hattı A-375 (ATCC No. CRL-1619) ve fare fibroblast hattı olan L929 (HUKUK, Sap Institute, Ankara, Turkey), %10 FBS (Fetal Sığır Serumu), %1 penisilin / streptomisin içeren yüksek glukoz DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde (Sigma, Katalog No. D6429) kültür edilmiştir.

#### 3.6.2 Kitosan çözeltilerinin hazırlanması

*D. ater* ve LMW kitosan örnekleri %0.25 (v/v) glasiyel asetik asitte 8 mg/ml stok konsantrasyonda hazırlanmış ve partiküllerin dağılımı için 50°C'de gece boyu çözündürülmüştür. Ardından stok çözeltiler 0.2 µm'luk polikarbonat filtre ile sterilize edilmiş ve kullanım için DMEM besiyerinde seyreltilmiştir (4 mg/mL - 1 µg/mL aralığında).

#### 3.6.3 Hücre sitotoksite deneyi

Hücre canlılığı deneyi, hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenazın aktivitesini ölçen MTT testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre uygulaması için, her iki hücre hattı da 96 well plate'e  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiş ve plate %5 CO<sub>2</sub> 37 °C'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücre kültür ortamı 4 mg/mL - 1 µg/mL aralığında *D. ater* ve LMW kitosan içeren taze besiyeri ortamıyla değiştirilmiştir. Kontrol kuyucuklarının besiyerleri de değiştirilerek tazelenmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonra taze hazırlanmış MTT solüsyonu (5 mg/mL) final konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış ve her bir kuyucuğa eklenmiştir. İnkübasyondan üç saat sonra, oluşan formazan kristalleri DMSO içerisinde çözündürülmüş ve elde edilen renk, 492 nm'lik dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (ChroMate®ELISA reader). Her deney, üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Her iki tip kitosanın uygulanmadığı kuyucuklar kontrol görevi görmüş, yüzde hücre canlılığı, kontrol grubuna göre kıyaslanarak aşağıdaki formülasyonla belirlenmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = ((A_{\text{örnek}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}})) \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  kontrol kuyusunun absorbansını,  $A_{\text{örnek}}$  *kitosan uygulama* kuyu absorbansını,  $A_{\text{blank}}$  ise hücre içermeyen besiyeri absorbansını ifade etmektedir.

### 3.6.4 İstatiksel analiz

Elde edilen veriler GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar Two-way ANOVA ve Bonferroni posthoc test ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel fark ortalama ve ortalamanın standart hatası ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) olarak verilmiştir.  $p > 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını ifade ederken, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  ifadeleri de istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3.6.5 xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi

A-375 ve L929 hücreleri,  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 100  $\mu\text{l}$  besiyeri içeren bir 16 kuyulu plakalara (ACEA Biosciences, San Diego, CA) ekilmiş ve xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı ile izlenmiştir. Hücreler log fazına girdiği zaman kuyulara 1 - 2 mg/mL konsantrasyonlarında *D. ater* ve LMW kitosan ilave edilmiştir. Çalışma kapsamında kitosan uygulaması yapılmayan kontrol grubu da kullanılarak değerlendirme bu gruba göre yapılmıştır. Hücreler 96 saat malzeme ile muamele edilerek ve 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortama sahip inkübatörde proliferasyonları 15 dakikalık aralıklarla takip edilmiştir. Konsantrasyonların hücre proliferasyonları üzerindeki etkisi RTCA Software Lite yazılımı ile değerlendirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

*D. ater* canlısına ait pupadan kitin eldesi yapılarak FT-IR, TGA, XRD, EA ve SEM analizleri ile fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapıp karakterize edilen kitin yapısından kitosan eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kitosan FT-IR, TGA, XRD, EA ve SEM analizleri ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmada *D. ater* canlısının pupasından ilk kez kitin izolasyonu ve kitosan eldesi yapılarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemlerinden sonra, kitosan MTT testine tabii tutulmuştur. Toksisitesine bakılan kitosan daha sonra A-375 ve L929 hücre hatları üzerinde kültüre edilerek kitosanın deri kanseri üzerindeki proliferatif aktivitesi tespit edilmiştir.

### 4.1 Kitin İçeriği

Bu çalışmada, *D. ater* pupasından elde edilen kitinin içeriği demineralizasyon ve deproteinizasyon aşamalarından sonra % 14.35 olarak belirlenmiş, yapıdaki mineral ve proteinler uzaklaştırıldıktan sonra toplam kütle kaybı %80 olarak hesaplanmıştır.

### 4.2 Elemental Analiz

*D. ater* pupasından elde edilen kitin ve kitosana ait asetilasyon derecesi (DA) ve kitin elemental analiz verileri aşağıda çizelgede verilmiştir. *D. ater* kitini için element içeriği sırasıyla N (%6.91), C (%50.17) ve H (%7.60) şeklinde kaydedilmiştir. %DA değeri ise daha önce belirtilen formülle göre % 123.3 olarak hesaplanmıştır. Yapılan tez çalışmasında elde edilen kitin için %N literatürdeki verilerle uyumludur. Literatüre bakıldığında kitin için N içeriği %6,89'a yakın ve asetilasyon değeri %100'e yakın olması, elde edilen kitin yapısının yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir (Kaya vd., 2017). *D. ater* kitosana ait element verileri ise sırasıyla; N (%7.30), C (%50.94) ve H (%8.17) olarak ölçülmüştür. %DA değeri formüle göre hesaplanarak % 106.8 olarak belirlenmiştir. Literatürde kitosana ait %N içeriği ticari kitosan için %7.1 olarak rapor edilmiştir (Kaya vd., 2014) . *D. ater* kitosana ait %N azot içeriği de %7.3 olarak kaydedilmiş bu da literatürdeki verilerle eş değer aralıkta olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.1'de diğer önemli veriler yer almaktadır.

**Çizelge 4. 1.** *D. ater* pupasına ait kitin ve kitosanın asetilasyon derecesi (DA) ve kitin elemental analiz sonuçları.

<i>Dermestes ater</i>	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)	DA(%)
<i>D. ater</i> kitin	6.91	50.17	7.60	0	123.3
<i>D. ater</i> kitosan	7.30	50.94	8.17	0	106.8

### 4.3 TGA/DSC

*D. ater* pupasından izole edilen kitin numunelerinin termogravimetrik analizi yapılarak termal stabilitesi ve bozunma hızını belirlemek için termogramlar oluşturulmuştur (Şekil 4.1 – Şekil 4.2). TGA, *D. ater* kitini için iki degradasyon aşaması göstermiştir. İlk aşama TGA bozulması sırasındaki kütle kaybı 0-100 °C aralığında meydana gelen bu kayıp elde edilen kitinin içinden emilen su içeriğinin buharlaşmasından kaynaklanmıştır. Kütle kaybı oranı %7.24 ‘tür. Daha önceki çalışmalarda da kitinin ilk aşamadaki kütle kaybının su içeriğinden kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Ifuku vd., 2010; Purkayastha ve Sarkar, 2020). Kütle kaybının ikinci aşamasındaki kayıp ise şeker yapısının ayrışması, sakkarit halkasının dehidrasyonu ve 250-400 °C arasında meydana gelen asetile ve deasetile kitin birimlerinin bozunmasıdır (Shankar vd., 2015; Paulino vd., 2006). Buradaki kütle kaybı oran ise %92.68’ dir. *D. ater* ‘ e ait kitinin maksimum termal bozunma sıcaklığı 377.2 °C’dir.

Literatürde pupa üzerine yapılan çalışmaların taraması sonucunda *Vespa crabro* böceğine ait pupa kitini için DTGmax değeri 381.7 °C olarak rapor edilmiştir (Kaya vd., 2016), Black soldier pupa kitini için 371 °C olarak bildirilmiştir (Wang vd., 2020). Yine farklı bir wild Black soldier çalışmasında pupaya ait kitin değerlerini 363 °C ve 371 °C olarak belirtilmiştir (Purkayastha ve Sarkar, 2020). Literatüre göre çeşitli pupa kaynaklardan izole edilen kitin örnekleri için DTGmax değerlerinin çok yakın olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, *D. ater* pupasından izole edilen kitin numunelerinin termal açıdan oldukça kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir.

TGA, kitosan için; ilk degradasyon aşaması sırasındaki kütle kaybı% 5.95’ tir. Kütle kaybının ikinci aşamasındaki değeri %94.09, DTGmax değeri ise 306.4 °C olarak ölçülmüştür. DTGmax değerinin daha düşük olmasının sebebi, kitosanın kitin yapısına

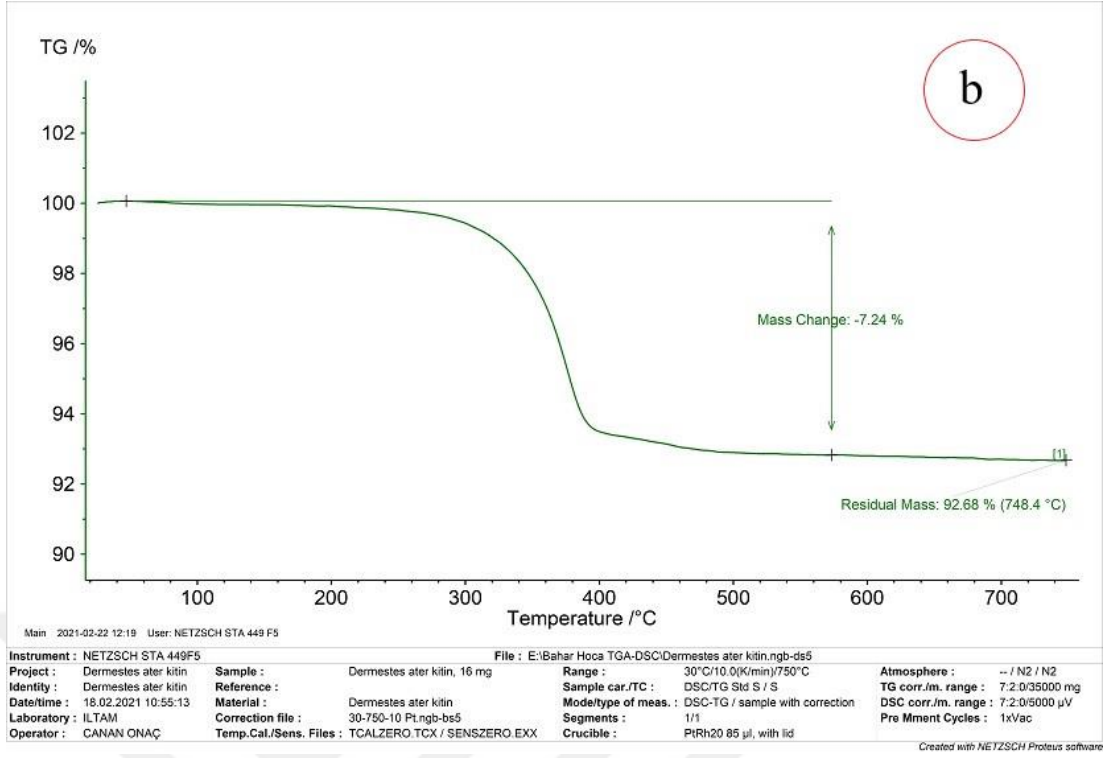
göre daha zayıf bir termal stabiliteye sahip olmasından kaynaklıdır. Literatürde kitosan için bildirilen değerlere yakın sonuçlar elde edilmiştir (Paulino vd., 2006).

DSC kitin için; alloformlarının termal stabiliteilerinin araştırılması için gerçekleştirilen bir diğer analiz olan diferansiyel taramalı kalorimetre pikleri şekil 4.2’de verilmiştir. DSC de *D. ater* kitini için temel iki pik gözlemlenmiştir. Bu piklerden ilki suyun degradasyonuna atfedilmektedir (Kaya vd., 2016). *D. ater* kitini için 83.0 °C’de kaydedilmiştir. 377.2 °C’de kaydedilen maksimum bozunma sıcaklığı kitinin degradasyonunu ifade etmektedir. Bu değer literatürde bulunan kitin çalışmaları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

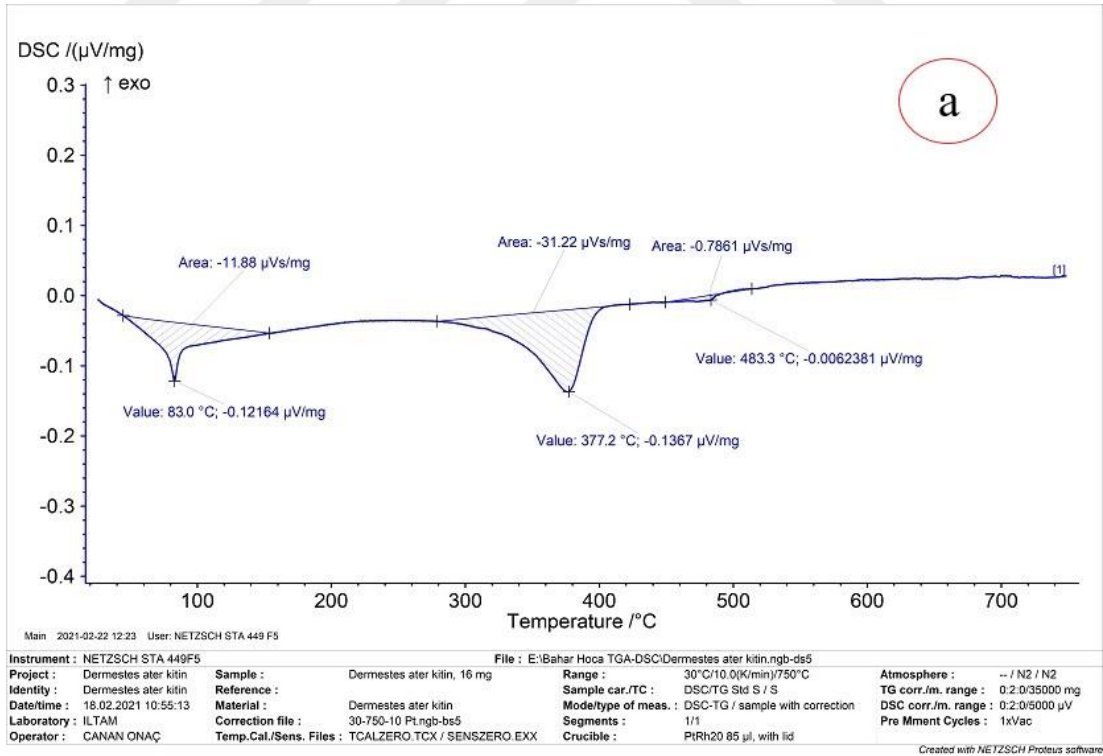
DSC kitosan için; diferansiyel taramalı kalorimetre pikleri şekil 4.3 ve 4.4’te verilmiştir. *D. ater* kitininde olduğu gibi 83.6 °C’de oluşan pik su kaybına atfedilir (Akyuz vd., 2017). İkinci termal olay, *D. ater* kitosana için 306.4 °C’de kaydedilen maksimum bozunma sıcaklığı kitosanın degradasyonunu ifade etmektedir. Kitosanın degradasyonuyla birlikte bu durum amin birimlerinin ayrışmasına atfedilebilir (Guinesi ve Cavalheiro, 2006).

**Çizelge 4.2.** *D. ater* pupasından elde edilen kitin ve kitosana ait TGA/DSC analizlerinin sonuçları.

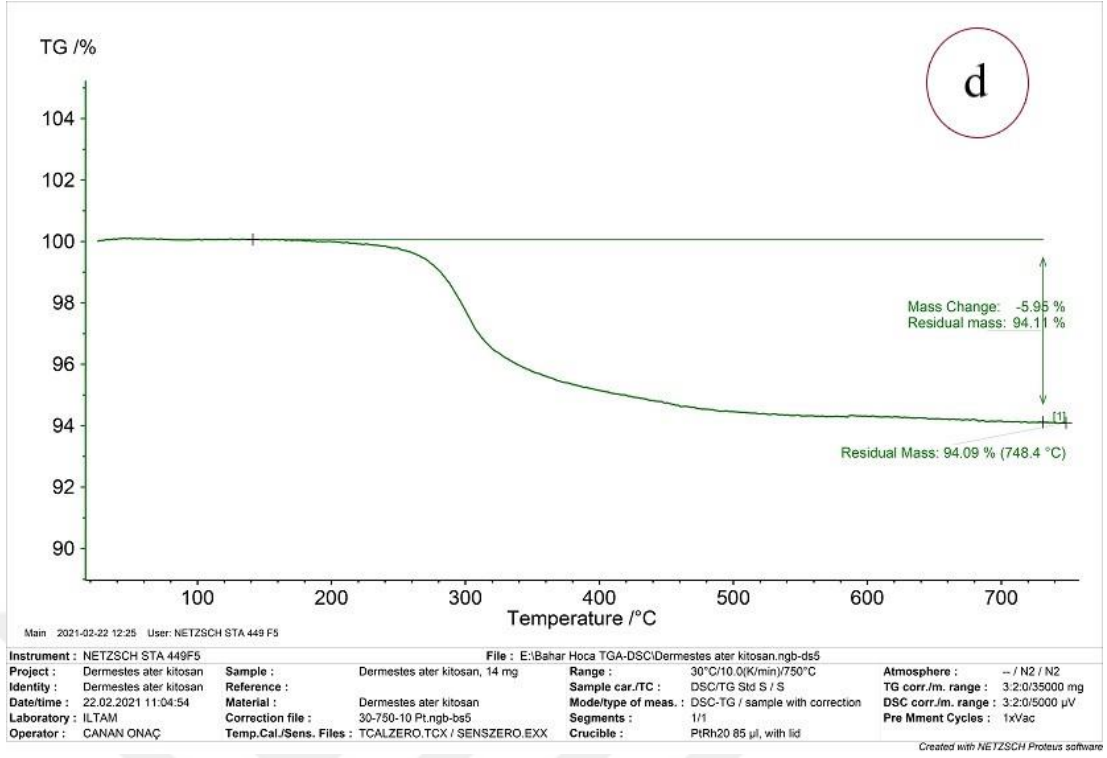
Tür	Sıcaklık oranı	Kütle kayıpları (%wt)	Toplam kütle kaybı (%wt)	DTGmax (°C)
<i>D. ater</i> kitin	0-700	7.24 - 92.6	99.84	377.2
<i>D. ater</i> kitosan	0-700	5.95 - 94.0	99.95	306.4



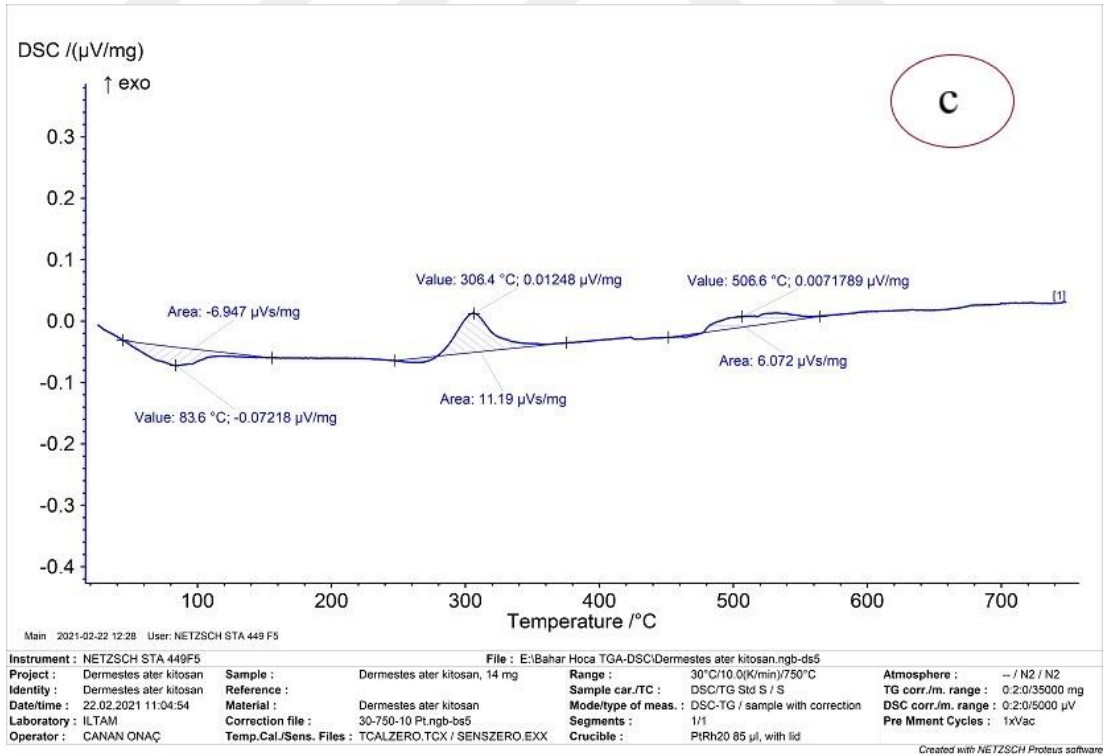
Şekil 4. 1. *D. ater* kitinine ait TG pikleri.



Şekil 4. 2. *D. ater* kitinine ait DSC pikleri.



Şekil 4. 3. *D. ater* kitosana ait TG sonuçları.

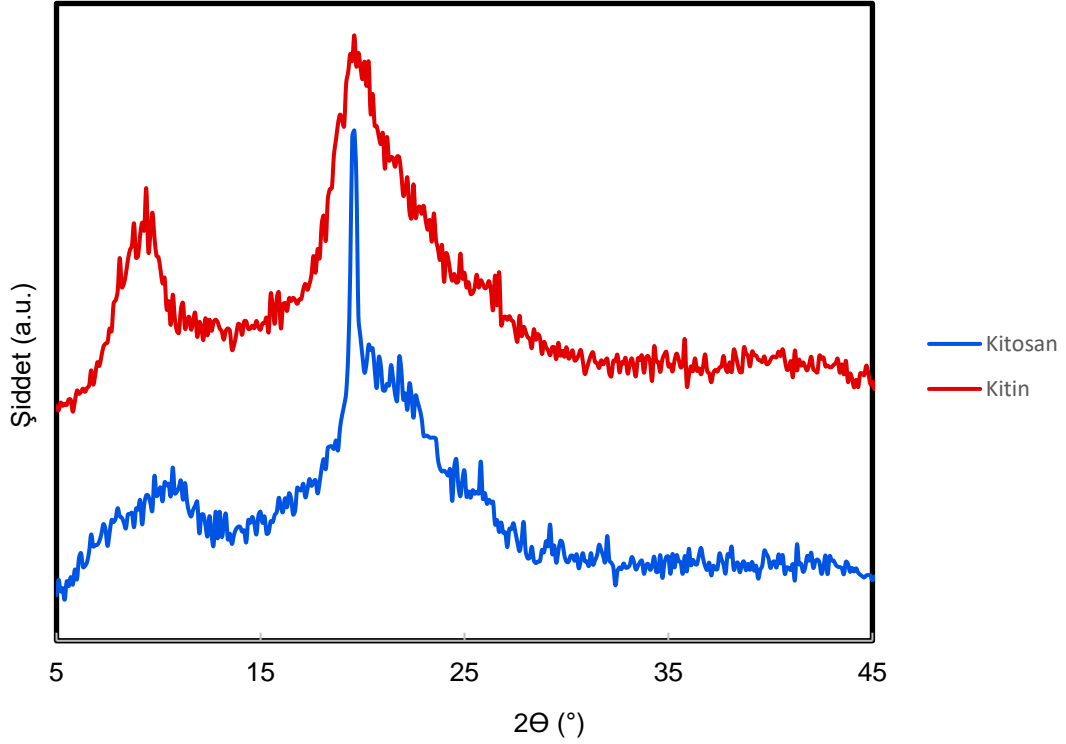


Şekil 4. 4. *D. ater* kitosana ait DSC sonuçları.

#### 4.4 XRD

Kristaliniteyi belirlemek için yapılan XRD analizinde, kitin allomorfuna bağı olarak karakteristik pikler gözlenmiştir. Literatüre göre, yaklaşık 9, 13, 19, 21 ve 23 ° 'de gözlemlenen pikler  $\alpha$ -kitini göstermektedir (Jang vd., 2004). Bu tez çalışmasında *Dermestes ater* pupasından izole edilen kitinin pikleri 9.4 ve 19.6° olarak kaydedilmiştir. Analizin sonucunda, *D. ater* kitininde elde edilen veriler, literatürde kitine ait XRD pikleriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Kucukgulmez vd., 2011). Analizi sonucunda piklerin şiddetinden yararlanarak % kristalinitesi belirlenmiştir. *D. ater* kitinin kristalinitesi % 81.34 olarak hesaplanmıştır.

Kitosanın literatüre göre XRD incelemesinde karakteristik pikleri 10 ve 20° arasında iki keskin tepe şeklinde gözlenmiştir (Yen vd., 2009). *D. ater*' den elde edilen kitosanın pikleri 10 ve 19.8° olarak kaydedilmiştir. Analizin sonucunda, *D. ater* kitosanından elde edilen veriler, literatürde kitosana ait XRD pikleriyle eş değer aralıkta çıkmıştır. Analizi sonucunda piklerin şiddetinden yararlanarak % kristalinitesi belirlenmiştir. *D. ater* kitosasının kristalliği %51.90 olarak hesaplanmıştır.



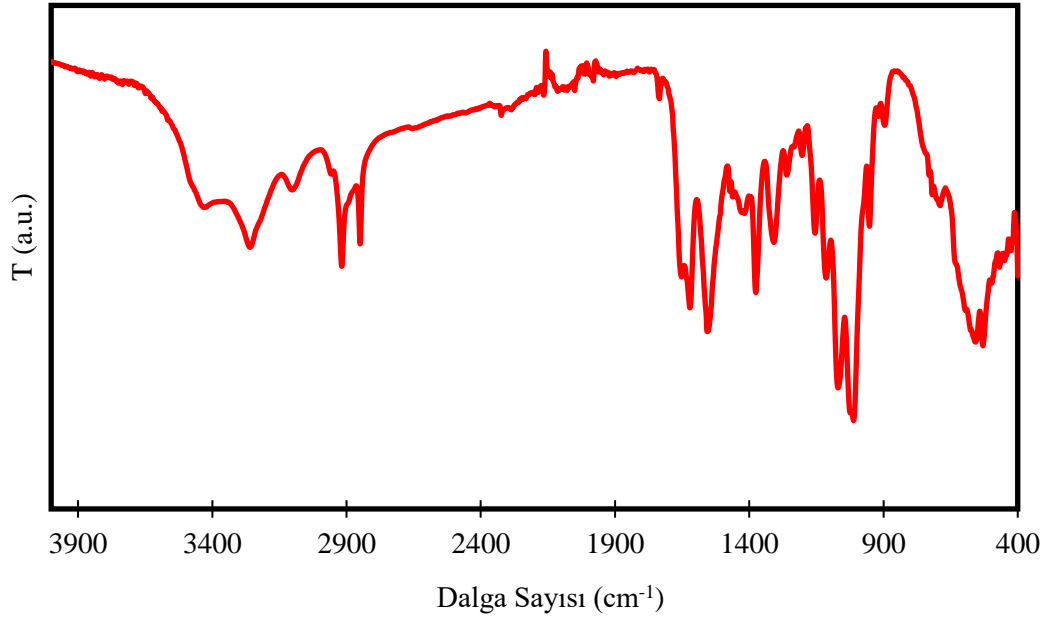
Şekil 4. 5. *D. ater* kitin ve kitosana ait XRD kırınım pikleri.

#### 4.5 FT-IR

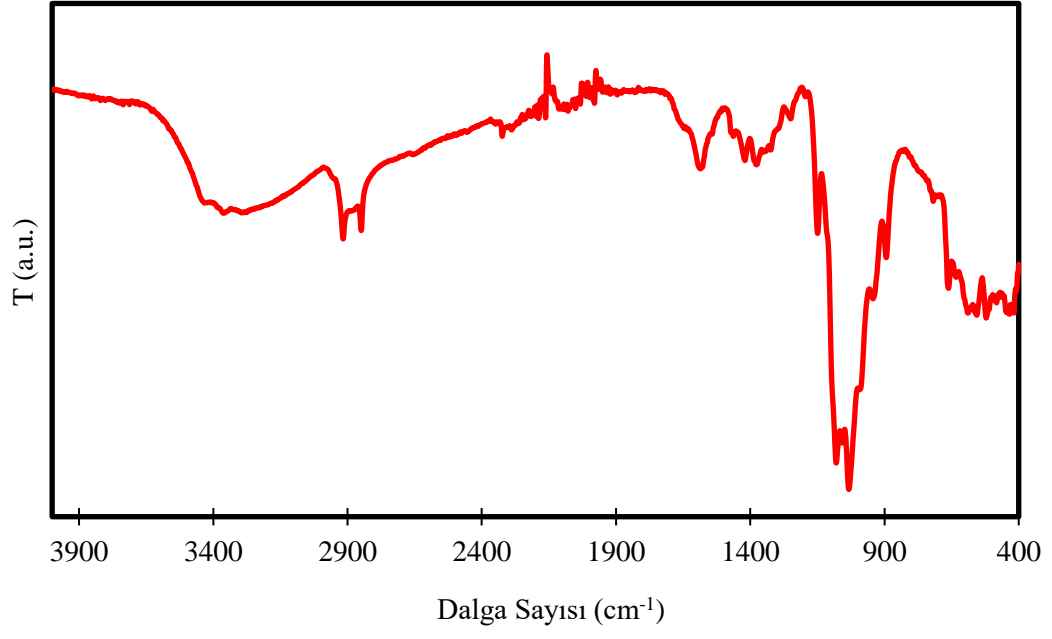
Literatürde bu zamana kadar kitinin üç farklı kristalin formuna sahip olduğu bilinmektedir. Bu formlar;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 'dır.  $\alpha$  formunun amid I bandı kendi içerisinde iki keskin banda sahiptir ve bunlar  $1660$  ve  $1620\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan karakteristik piklerdir (Kaya vd., 2017).  $\beta$  formu için ise  $1640\text{ cm}^{-1}$ ' ta bir tane karakteristik amid bandı bulunmaktadır (Jang vd., 2004). Yapmış olduğumuz bu mevcut çalışmada *Dermestes ater* pupasına ait FT-IR spektrumları elde edilmiştir ve bunlar Şekil 4.6' da verilmiştir. *D. ater* pupası örneklerinden izole edilen kitininin FT-IR spektrumu incelendiğinde amid I bandının  $1640$  ve  $1620\text{ cm}^{-1}$  de iki keskin banda bölündüğünü gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Çizelge 4.3'te elde edilen kitine ait diğer önemli pik zirveleri görülmektedir. *D. ater* kitini için;  $3418\text{ cm}^{-1}$  'de (O- H gerilme),  $3254\text{ cm}^{-1}$  (N- H gerilme),  $1306\text{ cm}^{-1}$  'de ( $\text{CH}_2$  titreşim).  $1152\text{ cm}^{-1}$  'de (asimetrik köprü oksijen gerilmesi),  $1111\text{ cm}^{-1}$  'de (halka fazında asimetrik esneme modü),  $952$  ve  $894\text{ cm}^{-1}$  'de (polisakkarit halkaları) ait olan bantların değerleri bulunmaktadır.

Literatüre göre kitin deasetillenmesinden sonra,  $1620\text{ cm}^{-1}$ 'de tek pik gözlenir,  $1550\text{ cm}^{-1}$ 'de yer alan bant ise  $1590\text{ cm}^{-1}$ 'e kayar (Kaya vd., 2016). *D. ater* kitosanınin FT-

IR spektrumu incelendiğinde kitosan için pikler sırasıyla; amid I (C=O gerilmesi) için  $1619\text{ cm}^{-1}$ , amid II (N-H eğilme) için  $1584\text{ cm}^{-1}$ , kitosanın asimetrik köprü oksijen gerilmesi  $1148\text{ cm}^{-1}$  şeklinde gözlemlenmiştir. -OH bağlarına karşılık gelen pik  $3439\text{ cm}^{-1}$  olarak kaydedilmiştir.  $\text{CH}_3$  sallanmaya karşılık gelen pik  $988\text{ cm}^{-1}$  ve CH halka gerilme ise  $891\text{ cm}^{-1}$  olarak rapor edilmiştir (Şekil 4.7). Çizelge 4.3'te elde edilen kitosana ait diğer önemli pik zirveleri de görülmektedir.



Şekil 4. 6. *D. ater* kitinin FTIR spektrumları.



**Şekil 4. 7.** *D. ater* kitosanına ait FTIR spektrumları.

**Çizelge 4.3.** *D. ater* kitin ve kitosana ait FT-IR fonksiyonel grubu ve titreşim modları. (Ticari kitin\*(Chen vd., 2021), ticari kitosan\*\*(Bilican vd., 2020)).

Fonksiyonel gruplar ve titreşim modları	Ticari kitin*	<i>D. ater</i> kitin cm <sup>-1</sup>	Ticari kitosan**	<i>D. ater</i> kitosan cm <sup>-1</sup>
O-H gerilme	3435	3418	3356	3439
N-H gerilme	3254	3254	-	-
CH <sub>3</sub> simetrik ve asimetrik gerilme	2933	2940	-	-
CH <sub>3</sub> simetrik gerilme	2876	2848	2871	2853
C=O ikincil amid gerilme	1650	1640	1650	1619
C=O ikincil amid gerilme	1622	1620	-	-
N-H band, C-N gerilme	1550	1550	1586	1584
CH <sub>2</sub> sonu ve CH <sub>3</sub> deformasyon	1421	1415	1420	1419
Son, CH <sub>3</sub> simetrik deformasyon	1372	1375	1375	1373
CH <sub>2</sub> sallanma	1307	1306	-	-
Asimetrik köprü oksijen gerilmesi	1153	1152	1149	1148
Asimetrik faz içi halka gerilme modu	1112	1111	-	-
C-O-C asimetrik faz halkasında gerilme	1065	1067	-	-
C-O asimetrik faz halkasında gerilme	1009	1009	1024	1031
CH <sub>3</sub> sallanma	951	952	988	988
CH halka gerilme	896	894	892	891

#### 4.6 *D. ater* Kitin ve Kitosana Ait Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

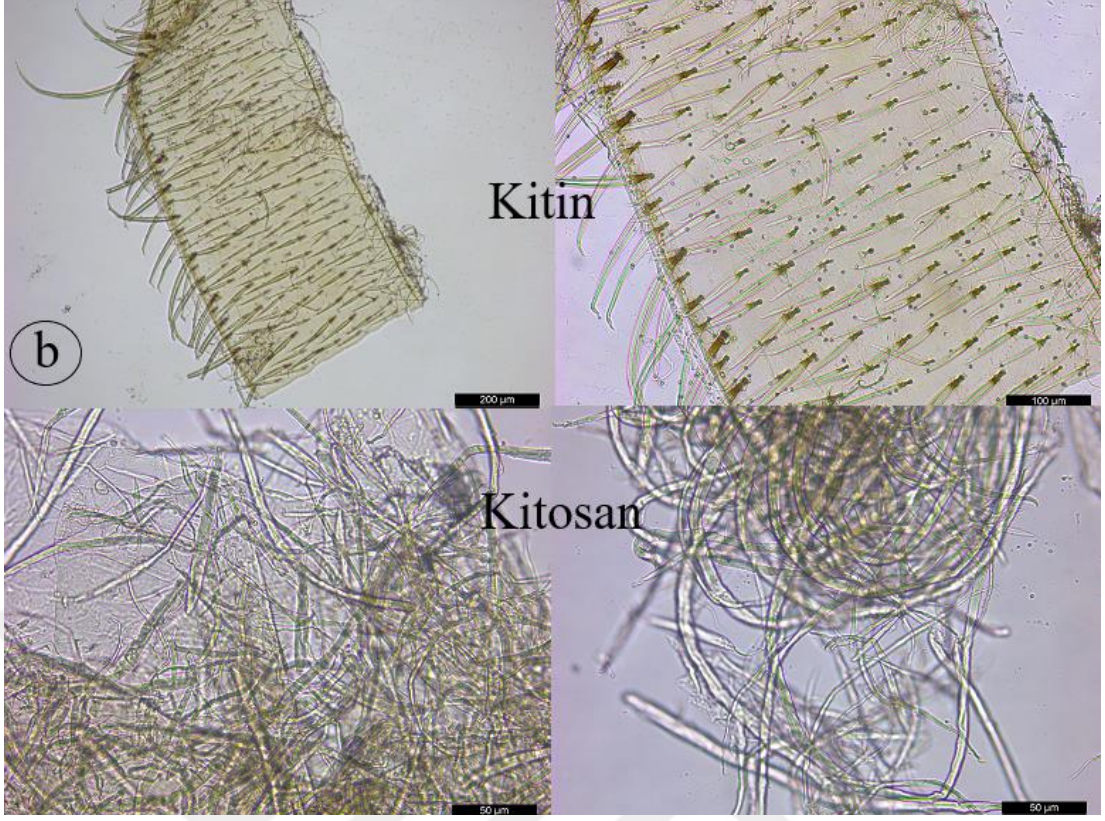
Işık mikroskobu görüntüleri şekil 4.8’de verilmiştir. *D. ater* pupasından izole edilen kitin ve kitosan yapılarının yüzey morfolojileri SEM analizi ile belirlenerek Şekil 4.9 ve 4.10’da gösterilmiştir. Literatürde kitin ve kitosan için yüzey morfolojileri üç şekilde sınıflandırılmıştır. Sırasıyla; gözenekli ve fiberli yapı, gözenek ve fiber içermeyen pürüzlü yapı ve sadece fibere sahip yapıdır (Kaya vd., 2014). Literatürde,

kitinin yüzey morfolojisinin, kaynağı ile son derece ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Zhang vd., 2000; Kaya vd., 2015). Kitinin yüzey morfoloji üzerine yapılan çalışmalar sonucunda şu ana kadar 5 farklı yüzey sahip olduğu rapor edilmiştir. Bunlar; gözenek veya lif içermeyen sert ve pürüzlü yüzey, sadece nanoliflerden oluşan yüzey, hem gözenekli hem de nanolifli yüzey, lif ve nano-mikro gözenekleri içeren yüzey ve son olarak sadece gözenekli yüzeydir (Kaya vd., 2013; Kaya vd., 2014; Kaya ve Baran, 2015). Analiz sonucu elde edilen görüntülerde, *D. ater* kitinin yüzeyinin mikro ve nano liflerden oluştuğu belirlenmiştir. Liflerin arasında mikro ve nano gözeneklerin yer aldığı farklı büyütmelelerde kaydedilen görüntüler ile ortaya konmuştur

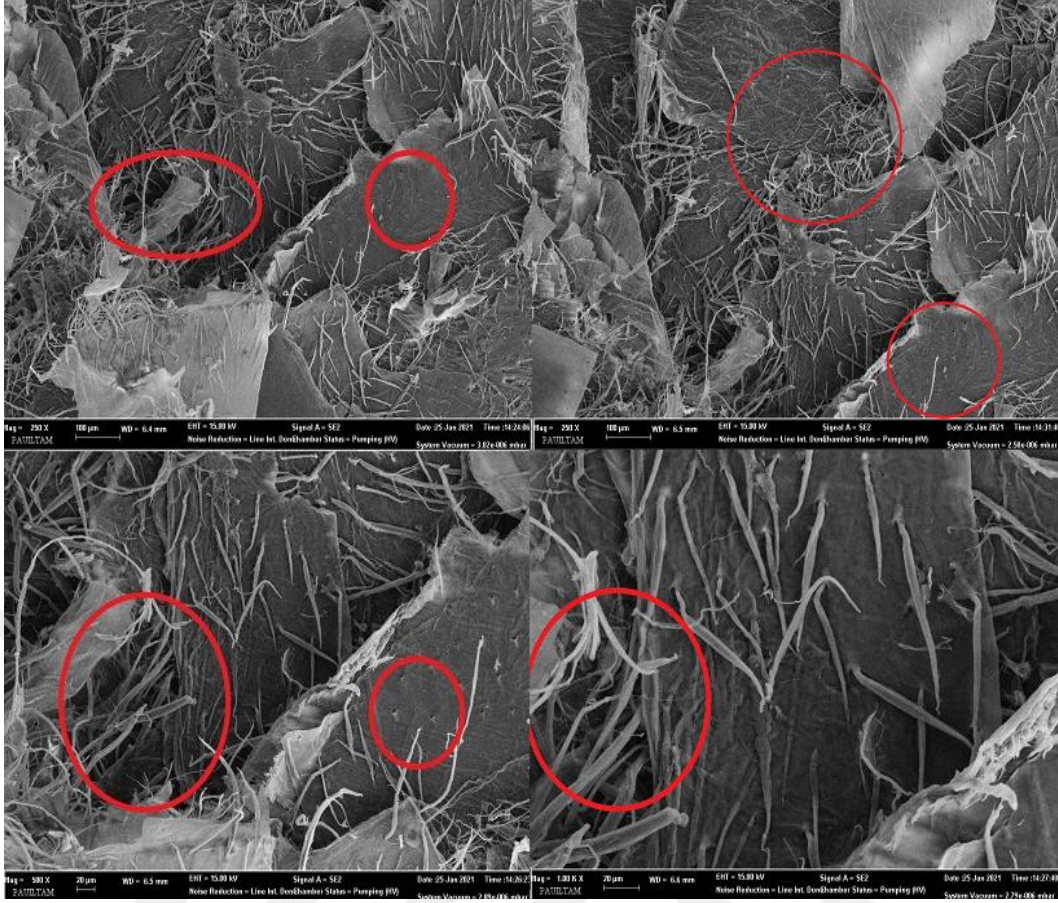
*D. ater* kitosanın SEM analizi sonucundan elde edilen görüntülerinde de kitine benzer yapıda olduğu görülmüştür. Kitine göre daha çok mikro ve nanolif içerdiği, gözenek sayısının ise kitine göre daha az olduğu gözlemlenmiştir.



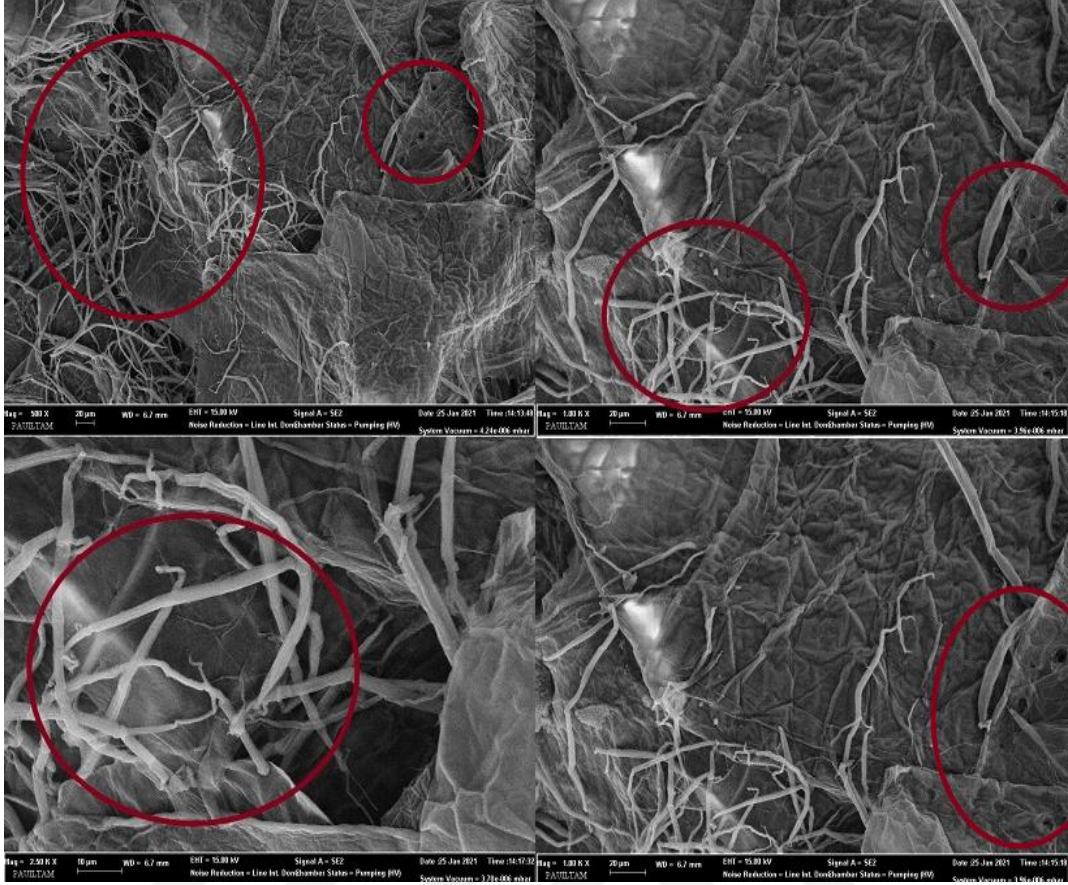
**Şekil 4. 8.** Farklı büyütmelelerde *D. ater* kitini ve kitosanına ait ışık mikroskobu görüntüleri.



**Şekil 4.8 (devam).** Farklı büyütmelerde *D. ater* kitini ve kitosanına ait ışık mikroskobu görüntüleri.



Şekil 4. 9. *D. ater* kitinine ait SEM görüntüleri.

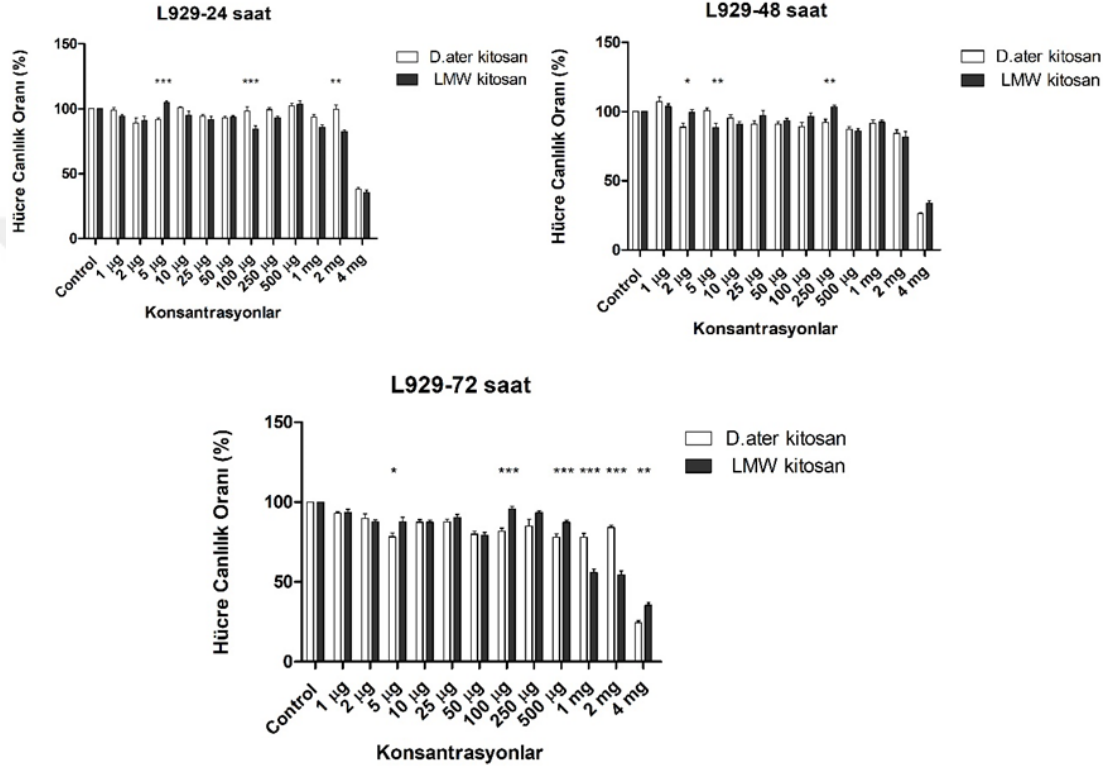


Şekil 4.10. *D. ater* kitosanına ait SEM görüntüleri.

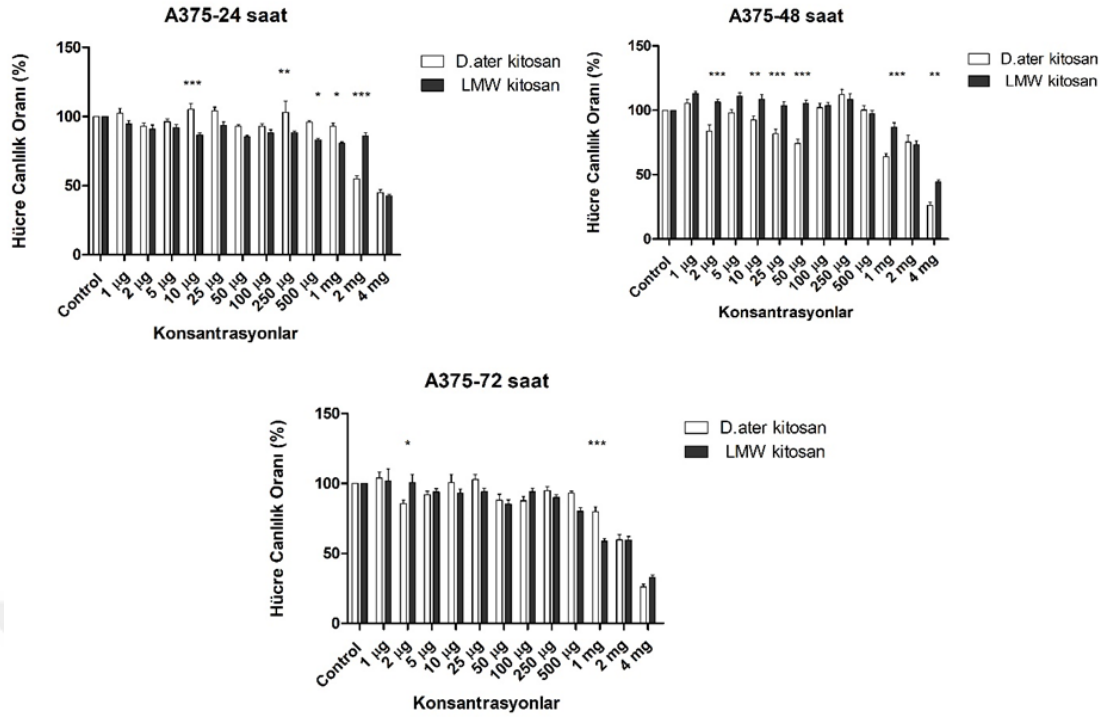
#### 4.7 *D. ater* kitosanının sitotoksinite ve antikanser etkisinin LMW Kitosan ile Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi

*D. ater* kitosanının sitotoksitesi L929 fare fibroblast hücreleri ile yapılan çalışma ile LMW kitosan ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen kitosanın, fibroblastlarda test edilip sitotoksik olmayan biyoyumlu malzemeler olduğu daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (Lim vd., 2007; Rasad vd., 2010). Şekil 4.11 *D. ater* ve LMW kitosanlarına 24, 48 ve 72 saat maruz kalan hücrelerin sitotoksinite sonuçlarını göstermektedir. Her iki kitosanın 4 mg'lık konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saatler için sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca LMW kitosanının 1 ve 2 mg konsantrasyonu ile uygulama yapılan hücrelerinin 72. saatte hücre canlılık düzeylerinin sırasıyla  $55.94 \pm 0.019$  ve  $54.57 \pm 0.021$  olduğu belirlenmiştir ( $<70$ ). Bununla birlikte her iki kitosan örneğinin yukarıda belirtilen durumlar dışında uygulanan konsantrasyonlarının (1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu$ g) L929 hücrelerinde üç zaman aralığında da canlılığa önemli düzeyde etki etmediği, hücrelerin

canlılığını %70 ve daha fazla düzeyde koruduğu gözlenmiştir. Hücre canlılık yüzdelерinin, karşılaştırma amaçlı kullanılan LMW kitosanla 24 saat için 5, 100 µg/mL ve 2 mg/mL; 48 saat için 2, 5 ve 250 µg/mL; 72 saat için ise 5, 100, 500 µg/mL ve 1, 2 ve 4 mg/mL uygulama konsantrasyonlarında anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği Two-way ANOVA ve Bonferroni posthoc test ile belirlenmiştir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** Farklı konsantrasyonlarda *D. ater* ve LMW kitosan çözeltileri ile muamele edilen A-375 melanom hücrelerinin 24. (a), 48. (b) ve 72. (c) saatlerdeki hücre canlılık yüzdeleri (%). (%) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Şekil 4.9.** Farklı konsantrasyonlarda *D. ater* ve LMW kitosan çözeltileri ile muamele edilen L929 fibroblast hücrelerinin 24. (a), 48. (b) ve 72. (c) saatlerdeki hücre canlılık yüzdeleri (%). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

*D. ater* kitosanın antiproliferatif aktivitesi *in vitro* olarak insan cilt malign melanomdan türetilen hücre hattı A-375’de LMW ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.12; 1 µg/mL ila 4 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda her iki tip kitosan ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilen hücrelerin canlılık yüzdesini göstermektedir. 24 saat için 10, 250, 500 µg/mL ve 1 - 2 mg/mL konsantrasyonda; 48 saat için 2, 10, 25, 50 µg/mL, 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonda; 72 saat için ise 2 µg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonda uygulama yapılan A-375 hücrelerinde kitosan türleri arasında hücre proliferasyonunu baskılama düzeyleri açısından fark anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

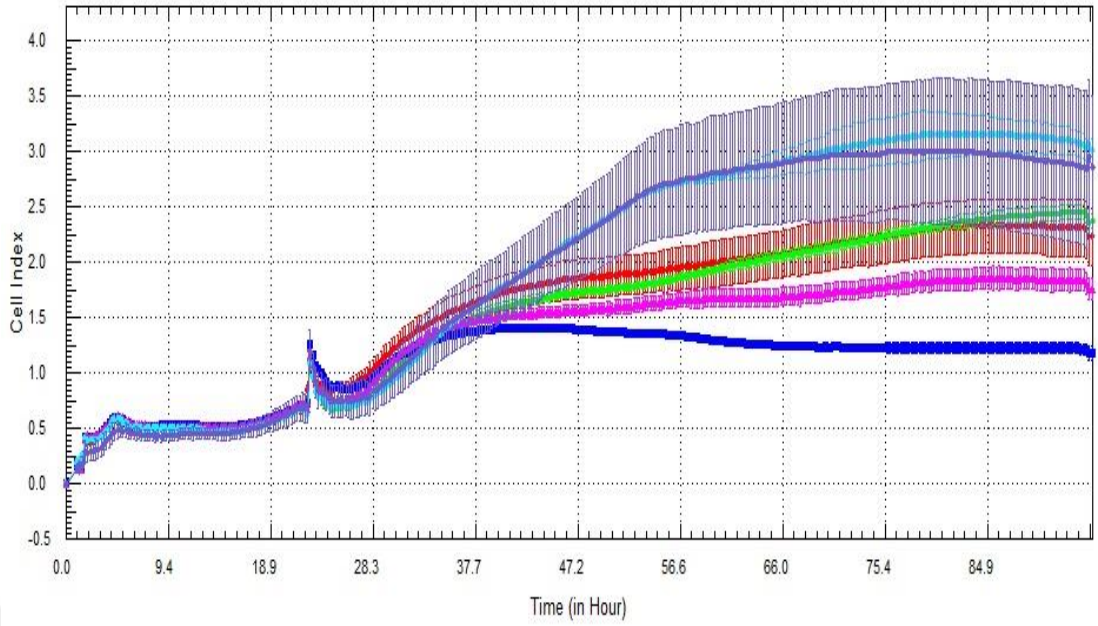
Ek olarak, *D. ater* kitosanlarının 1 - 2 mg/mL konsantrasyonlarının uygulandığı A-375 kanser hücrelerinde, sağlıklı L929 hücrelerindeki etkisinin üzerinde bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu görülmüş, hücre canlılık düzeyleri *D. ater* kitosanının 1 mg/mL konsantrasyonu için 48 saatlik uygulamada L929 hücrelerinde  $91.87 \pm 0.011$ ; A375 hücrelerinde  $63.77 \pm 0.035$  olarak belirlenmiştir. 2 mg/mL konsantrasyon uygulamasının 24 saatinde L929 için  $99.65 \pm 0.056$  olan canlılık, A-375 hücreleri için  $54.95 \pm 0.098$  olarak belirlenmiştir. 48 saat uygulaması için ise hücreler için

canlılık düzeyi sırasıyla  $84.48 \pm 0.038$  ve  $75.28 \pm 0.047$  olarak belirlenmiştir. 72. saatlik inkübasyon süresi sonunda L929 için  $84.13 \pm 0.012$  olarak belirlenen düzey, A-375 için  $59.83 \pm 0.017$  olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

Anlamlılığın ileri analizle değerlendirilmesi için belirtilen konsantrasyonlar ile muamele edilen L929 ve A-375 hücrelerinin çoğalma eğrisi xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı ile değerlendirilmiştir.

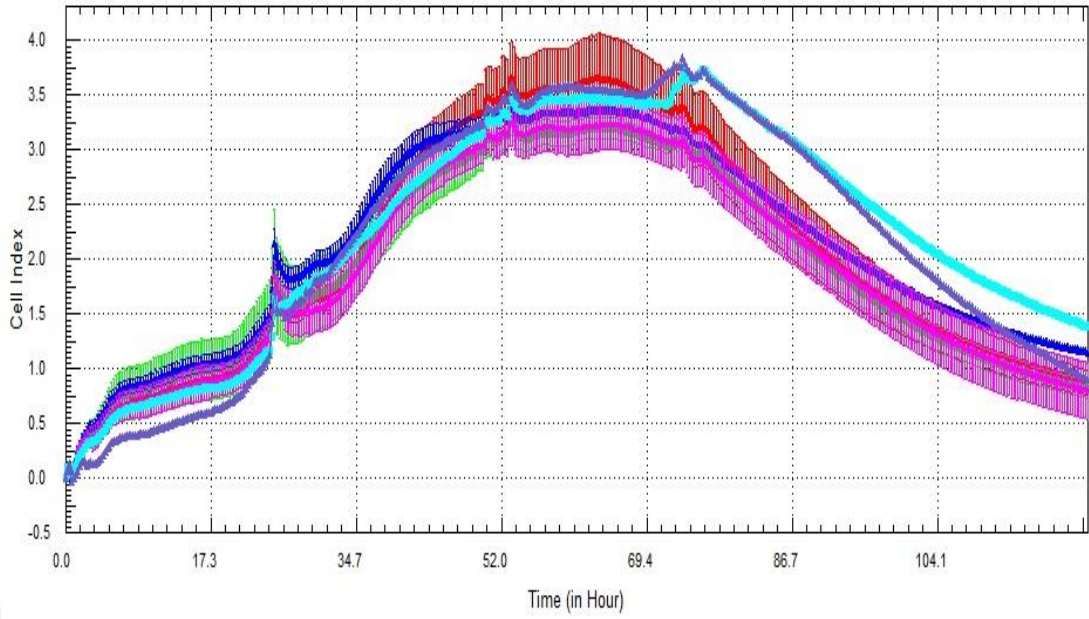
#### **4.8 xCELLigence Cihazı ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi**

*D. ater* kitosan ve LMW kitosan malzemelerinin L929 normal hücresi üzerine uygulanması sonrasında Xcelligence RTCA cihazı kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'te verilmiştir. Gerçekleştirilen analiz sonuçlarından elde edilen verilere göre kontrol olarak kullanılan DMEM besiyeri (turkuaz) ve malzeme çözücüsü olarak kullanılan asetik asit (mor) hücre canlılığı üzerine  $99.7 \pm 0.03$  oranında etki gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol örneklerine göre *D. ater* kitosan ve LMW kitosan örnekleri de hücre proliferasyon üzerine etkileri belirlenmiştir. 1 mg (yeşil) ve 2 mg LMW (kırmızı) örnekleri hücre canlılık düzeylerinin sırası ile  $81.3 \pm 0.02$  ve  $79.2 \pm 0.02$  oranında canlılığı koruduğunu göstermiştir ( $p < 0.05$ ). *D. ater* kitosan 1 mg (pembe) ve 2 mg (mavi) örnekleri de hücre canlılık düzeyleri  $77.3 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) ve  $36.7 \pm 0.02$  ( $p < 0.01$ ) oranında hücre canlılığını koruduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.10.** *D. ater* kitosan ve LMW kitosan malzemelerinin L929 hücresi üzerine anti-proliferatif etkisinin Xcelligence cihazı ile gösterimi. (Turkuaz: DMEM; Mor: DMEM+AA; Kırmızı: LMV 2; Yeşil: LMV 1; Pembe: *D. ater* 1; Mavi: *D. ater* 2) (\*p<0.05, \*\* p<0.01)

*D. ater* kitosan ve LMW kitosan malzemelerinin L929 normal hücresi üzerine sitotoksik etkisinin düşük oranda olduğunun belirlenmesinin ardından A-375 melanom kanseri üzerine anti-proliferatif etkisi belirlenmiştir. Şekil 4.14'te gösterilen Xcelligence cihazından elde edilen veriler analiz edildiğinde; *D. ater* kitosan malzemesinin normal hücre üzerine sitotoksik etkisi düşük oranda iken en agresif insan deri kanseri tiplerinden biri olan A-375 melanom hücresi üzerine proliferasyonu baskılayıcı etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 47. Saatte 1 mg *D. ater* kitosan melanom hücre canlılığını %  $72.6 \pm 0.02$  ( $p<0.05$ ) ve 2 mg *D. ater* kitosan ise %  $76.3 \pm 0.03$  ( $p<0.05$ ) baskıladığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.11.** *D. ater* kitosan ve LMW kitosan malzemelerinin A-375 hücresi üzerine anti-proliferatif etkisinin Xcelligence cihazı ile gösterimi. (Turkuaz: DMEM; Mor: DMEM+AA; Kırmızı: LMV 2; Yeşil: LMV 1; Pembe: *D. ater* 1; Mavi: *D. ater* 2) (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )

Literatürdeki verilere dayanarak kitosanın farklı kanser hücre hatları üzerinde önemli bir antikanser etkisine sahip olduğu daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Kitosanın antikanser aktivitesini etkileyen faktörleri şu şekilde rapor edilmiştir; moleküler ağırlık, deasetilasyon seviyesi, pH ve kitosan kaynağı (Chien vd., 2016). Sonuç olarak gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, daha önce farklı kaynaklardan elde edilen kitosanın antikanser etkisinin değerlendirildiği literatürde yer alan diğer çalışmalara benzer şekildedir (Gibot vd., 2015; Kaya vd., 2016; Younes vd., 2016; Abedian vd., 2019). Dermestidae ailesine ait *Dermestes ater* canlısının pupasından elde edilen kitosanın da antiproliferatif etkisinin olduğu kanıtlanmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile birlikte ilk kez, Dermestidae ailesine ait *Dermestes ater* canlısının pupasından kitin izolasyonu, kitosan eldesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kitin ve kitosanın karakterizasyonu sonucu literatüre uyumlu değerlerde olduğu kaydedilmiştir. Bu tez çalışmasının orijinalliği ise *D. ater* pupasına ait kitin ve kitosan ile ilgili bir çalışmanın literatürde yer almamasıdır. Bu çalışma sayesinde *D. ater* canlısının kitin ve kitosan çalışmaları için yeni bir kitin kaynağı olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Kitin kaynağı olarak günümüzde yengeç, karides, kerevit gibi deniz canlılarının atık kabukları değerlendirilmektedir. Et, balık, peynir, un işleme fabrikaları gibi gıda sektöründe önemli yere sahip, kiler haşereleri olarak da adlandırılan bu canlı dünya genelinde birçok gıda ürününe zarar vermektedir. Bunun yanı sıra ipek kozalarına ciddi zararlar vererek ipek üretiminde büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu canlının da alternatif bir kitin kaynağı olarak kullanılabilirliği ekonomik açıdan gıda ve tekstil alanındaki sorunlara yardımcı olabilir.

Kitosanın, anti-kanser etkisinin dışında kansere bağlı kayıp dokuların yenilenmesi için cilt komplikasyon tedavilerinde de tercih edilen yöntemler arasındadır. Çalışmada cilt kanserinin seçilmesinin sebeplerinden bir diğeri ise dünya genelinde çok yaygın olan bir kanser türü olmasıyla birlikte bu kanserin yüksek oranda çoklu ilaç direncine sahip olmasıdır. Bu dezavantajından kaynaklı olarak cilt kanserinin tedavisi için alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır. Literatürde bu zamana kadar kitosanın anti-kanser aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda genellikle ticari kitinden ya da deniz canlılarının atık kabuklarından elde edilen kitosanın kullanımı yer almaktadır. Bu tez çalışmasında ise, bir böcek türü olan *Dermestes ater* canlısına ait pupadan elde edilen kitosan kullanılmıştır. Kitin izolasyonu aşamasından sonra elde edilen bu kitosanın sitotoksitesi L929 fibroblast hücre hattında, cilt kanseri üzerine antiproliferatif aktivitesi ise A-375 hücre hattında değerlendirilmiştir.

*D. ater* ve LMW kitosanlarının 4 mg/mL'lik konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saatler için, ayrıca LMW kitosanın 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonlarının 72 saat için sitotoksik olduğu, belirlenmiştir (<70). Belirtilen durumlar dışındaki uygulamaların, üç zaman aralığında da canlılığa önemli düzeyde etki etmediği, hücrelerin canlılığını %70 ve daha fazla düzeyde koruduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların LMW kitosan ile karşılaştırılması istatistiksel olarak değerlendirilmiş olup, bazı konsantrasyonlarda

anlamli farkliliklar tespit edilmiştir. İnsan cilt malign melanomdan türetilen hücre hattı A-375’de elde edilen veriler doğrultusunda, *D. ater* ve LMW kitosanlarının 1-2 mg/mL konsantrasyonlarının, A375 kanser hücrelerinde, sağlıklı L929 hücrelerindeki etkisinin üzerinde bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile belirtilen konsantrasyonlarda uygulanan maddenin hücre proliferasyonuna olan etkisinin detaylı olarak ve label-free şekilde değerlendirilmiş, kalite ve güvenilirliği artırılmıştır. Sonuç olarak, *D. ater* ’den elde edilen kitosanın sitotoksik etkisi olmayan; ancak melanom kanseri üzerine anti-kanser etkinliği bulunarak yeni bir kaynak olabileceği LMW kitosana karşılaştırmalı verilerle belirlenmiştir.

Bu tez çalışması, kitosanın melanom kanser üzerine terapötik etkinliğini belirleyen yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Sonuç olarak, *D. ater* biyolojik organizmasından elde edilen yapıların ileride yapılacak olan kitin, kitosan eldesi ve kanser tedavisinde yeni alternatif terapötik potansiyele sahip bir malzeme olarak kullanılabilmesi literatüre kazandırılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abedian, Z., Moghadamnia, A.A., Zabihi, E., Pourbagher, R., Ghasemi, M., Nouri, H.R., Tashakorian, H. ve Jenabian, N., 2019. Anticancer properties of chitosan against osteosarcoma, breast cancer and cervical cancer cell lines, *Caspian journal of internal medicine*, 10, 4, 439.
- Agulló, E., Rodríguez, M.S., Ramos, V. ve Albertengo, L., 2003. Present and future role of chitin and chitosan in food, *Macromolecular bioscience*, 3, 10, 521-530.
- Akyuz, L., Kaya, M., Koc, B., Mujtaba, M., Ilk, S., Labidi, J., Salaberria, A.M., Cakmak, Y.S. ve Yildiz, A., 2017. Diatomite as a novel composite ingredient for chitosan film with enhanced physicochemical properties, *International journal of biological macromolecules*, 105, 1401-1411.
- Al Sagheer, F., Al-Sughayer, M., Muslim, S. ve Elsabee, M., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydrate polymers*, 77, 2, 410-419.
- Aranaz, I., Acosta, N., Civera, C., Elorza, B., Mingo, J., Castro, C., Gandía, M.D.I.L. ve Heras Caballero, A., 2018. Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives, *Polymers*, 10, 2, 213.
- Bakshi, P.S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K. ve Kumar, N., 2020. Chitosan as an environment friendly biomaterial-a review on recent modifications and applications, *International journal of biological macromolecules*, 150, 1072-1083.
- Balan, P., Indrakumar, J., Murali, P. ve Korrapati, P.S., 2020. Bi-faceted delivery of phytochemicals through chitosan nanoparticles impregnated nanofibers for cancer therapeutics, *International journal of biological macromolecules*, 142, 201-211.
- Baldrick, P., 2010. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 56, 3, 290-299.
- Bilican, I., Pekdemir, S., Onses, M.S., Akyuz, L., Altuner, E.M., Koc-Bilican, B., Zang, L. S., Mujtaba, M., Mulerčikas, P. ve Kaya, M., 2020. Chitosan Loses Innate Beneficial Properties after Being Dissolved in Acetic Acid: Supported by Detailed Molecular Modeling, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.
- Bouhenna, M., Salah, R., Bakour, R., Drouiche, N., Abdi, N., Grib, H., Lounici, H. ve Mameri, N., 2015. Effects of chitin and its derivatives on human cancer cells lines, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 20, 15579-15586.
- Charabidze, D., Colard, T., Vincent, B., Pasquerault, T. ve Hedouin, V., 2014. Involvement of larder beetles (Coleoptera: Dermestidae) on human cadavers: a review of 81 forensic cases, *International Journal of Legal Medicine*, 128, 6, 1021-1030.
- 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.

- 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.
- Craythorne, E. ve Al-Niami, F., 2017. Skin cancer, *Medicine*, 45, 7, 431-434.
- Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y. Y. ve Hamblin, M.R., 2011. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert review of anti-infective therapy*, 9, 7, 857-879.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M. ve Chiellini, E., 2011. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in polymer science*, 36, 8, 981-1014.
- Dev, A., Mohan, J.C., Sreeja, V., Tamura, H., Patzke, G.R., Hussain, F., Weyeneth, S., Nair, S. ve Jayakumar, R., 2010. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications, *Carbohydrate Polymers*, 79, 4, 1073-1079.
- Domingues, B., Lopes, J.M., Soares, P. ve Pópulo, H., 2018. Melanoma treatment in review, *ImmunoTargets and therapy*, 7, 35.
- Ehrlich, H., 2010. Chitin and collagen as universal and alternative templates in biomineralization, *International Geology Review*, 52, 7-8, 661-699.
- El-Sawy, S.M., Abu-Ayana, Y.M. ve Abdel-Mohdy, F.A., 2001. Some chitin/chitosan derivatives for corrosion protection and waste water treatments, *Anti-Corrosion Methods and Materials*.
- Giacone, D.V., Dartora, V.F., de Matos, J.K., Passos, J.S., Miranda, D.A., de Oliveira, E.A., Silveira, E.R., Costa-Lotufo, L.V., Maria-Engler, S.S. ve Lopes, L.B., 2020. Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models, *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1055-1065.
- Gibot, L., Chabaud, S., Bouhout, S., Bolduc, S., Auger, F.A. ve Moulin, V.J., 2015. Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent, *International journal of biological macromolecules*, 72, 370-379.
- Gortari, M.C. ve Hours, R.A., 2013. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: a mini-review, *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 3, 14-14.
- Guinesi, L.S. ve Cavaleiro, E.T.G., 2006. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples, *Thermochimica Acta*, 444, 2, 128-133.
- Guo, X.F., Kikuchi, K., Matahira, Y., Sakai, K. ve Ogawa, K., 2002. Water-soluble chitin of low degree of deacetylation, *Journal of carbohydrate chemistry*, 21, 1-2, 149-161.
- Howling, G.I., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Hampson, F.C., Dornish, M. ve Wood, E.J., 2001. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro, *Biomaterials*, 22, 22, 2959-2966.

- 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.
- 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., Chennazhi, K.P., Srinivasan, S., Nair, S.V., Furuike, T. ve Tamura, H., 2011. Chitin scaffolds in tissue engineering, *International journal of molecular sciences*, 12, 3, 1876-1887.
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S.V. ve Tamura, H., 2010. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review, *Carbohydrate polymers*, 82, 2, 227-232.
- 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.
- Kaya, M. ve Baran, T., 2015. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*), *International journal of biological macromolecules*, 75, 7-12.
- Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Menteş, A., Özüsağlam, M.A. ve Çakmak, Y.S., 2014. Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), *Materials Science and Engineering: C*, 45, 72-81.
- Kaya, M., Baran, T., Mentes, 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., Bitim, B., Mujtaba, M. ve Koyuncu, T., 2015. Surface morphology of chitin highly related with the isolated body part of butterfly (*Argynnis pandora*), *International journal of biological macromolecules*, 81, 443-449.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A.M., Baran, T., Amemiya, C.T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I. ve Labidi, J., 2017. On chemistry of  $\gamma$ -chitin, *Carbohydrate polymers*, 176, 177-186.
- Kaya, M., Sargin, I., Aylanc, V., Tomruk, M.N., Gevrek, S., Karatoprak, I., Colak, N., Sak, Y.G. ve Bulut, E., 2016. Comparison of bovine serum albumin adsorption capacities of  $\alpha$ -chitin isolated from an insect and  $\beta$ -chitin from cuttlebone, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 38, 146-156.
- Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I. ve Mujtaba, M., 2016. Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp), *Carbohydrate polymers*, 145, 64-70.
- Kaya, M., Tozak, K.Ö., Baran, T., Sezen, G. ve Sargin, I., 2013. Natural porous and nano fiber chitin structure from *Gammarus argaeus* (Gammaridae Crustacea), *Excli Journal*, 12, 503.

- Kim, S., 2018. Competitive biological activities of chitosan and its derivatives: antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities, *International journal of polymer science*, 2018.
- Kofuji, K., Qian, C. J., Nishimura, M., Sugiyama, I., Murata, Y. ve Kawashima, S., 2005. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan, *European Polymer Journal*, 41, 11, 2784-2791.
- Kong, C.-S., Kim, J. A., Bak, S. S., Byun, H. G. ve Kim, S. K., 2011. Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes, *The Journal of nutritional biochemistry*, 22, 3, 276-281.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H. ve Kadak, A.E., 2011. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells, *Food Chemistry*, 126, 3, 1144-1148.
- Kumar, M.N.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and functional polymers*, 46, 1, 1-27.
- Lim, C., Halim, A., Lau, H., Ujang, Z. ve Hazri, A., 2007. In vitro cytotoxicology model of oligo-chitosan and n, o-carboxymethyl chitosan using primary normal human epidermal keratinocyte cultures, *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 5, 2, 82-87.
- Menezes, L.C., Rossi, M.N. ve Godoy, W.A., 2006. The effect of refuge on *Dermestes ater* (Coleoptera: Dermestidae) predation on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): refuge for prey or the predator?, *Journal of insect behavior*, 19, 6, 717-729.
- Nam, K. S. ve Shon, Y. H., 2009. Suppression of metastasis of human breast cancer cells by chitosan oligosaccharides, *Journal of microbiology and biotechnology*, 19, 6, 629-633.
- 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.
- Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G. ve Jordan, O., 2015. Chitosan as a starting material for wound healing applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 417-426.
- 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.
- Purkayastha, D. ve Sarkar, S., 2020. Physicochemical structure analysis of chitin extracted from pupa exuviae and dead imago of wild black soldier fly (*Hermetia illucens*), *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 2, 445-457.
- Qi, L. F., Xu, Z. R., Li, Y., Jiang, X. ve Han, X. Y., 2005. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11, 33, 5136.
- 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.

- Rengifo, A.F.C., Stefanos, N.M., Toigo, J., Mendes, C., Argenta, D.F., Dotto, M.E.R., da Silva, M.C.S., Nunes, R.J., Caon, T. ve Parize, A.L., 2019. PEO-chitosan nanofibers containing carboxymethyl-hexanoyl chitosan/dodecyl sulfate nanoparticles loaded with pyrazoline for skin cancer treatment, *European Polymer Journal*, 119, 335-343.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in polymer science*, 31, 7, 603-632.
- Saravanan, D., Gomathi, T. ve Sudha, P., 2013. Sorption studies on heavy metal removal using chitin/bentonite biocomposite, *International journal of biological macromolecules*, 53, 67-71.
- Shamshina, J.L., Kelly, A., Oldham, T. ve Rogers, R.D., 2020. Agricultural uses of chitin polymers, *Environmental Chemistry Letters*, 18, 1, 53-60.
- 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.
- Srinivasa, P. ve Tharanathan, R., 2007. Chitin/chitosan-Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses, *Food reviews international*, 23, 1, 53-72.
- Srinivasan, H., Kanayairam, V. ve Ravichandran, R., 2018. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1, *International journal of biological macromolecules*, 107, 662-667.
- Struszczyk, M.H., Madej-Kielbik, L. ve Zielińska, D., 2019. The Application of Chitin and its Derivatives for the Design of Advanced Medical Devices, *Chitin and Chitosan: Properties and Applications*, 291-313.
- Tzaneva, D., Simitchiev, A., Petkova, N., Nenov, V., Stoyanova, A. ve Denev, P., 2017. Synthesis of carboxymethyl chitosan and its rheological behaviour in pharmaceutical and cosmetic emulsions, *J Appl Pharm Sci*, 7, 10, 70-78.
- Wang, H., ur Rehman, K., Feng, W., Yang, D., ur Rehman, R., Cai, M., Zhang, J., Yu, Z. ve Zheng, L., 2020. Physicochemical structure of chitin in the developing stages of black soldier fly, *International journal of biological macromolecules*, 149, 901-907.
- Yen, M. T., Yang, J. H. ve Mau, J. L., 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells, *Carbohydrate polymers*, 75, 1, 15-21.
- Younes, I., 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.
- Zargar, V., Asghari, M. ve Dashti, A., 2015. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications, *ChemBioEng Reviews*, 2, 3, 204-226.
- Zhang, H., Wu, F., Li, Y., Yang, X., Huang, J., Lv, T., Zhang, Y., Chen, J., Chen, H. ve Gao, Y., 2016. Chitosan-based nanoparticles for improved anticancer efficacy and bioavailability of mifepristone, *Beilstein journal of nanotechnology*, 7, 1, 1861-1870.

Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H. ve Hirano, S., 2000. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia, *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 1, 99-105.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Betül ÇAKMAK

### EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

**Lisans** : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler  
Bölümü, 2015-2019

**Yüksek Lisans** : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler  
ABD, 2019-2021

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

### TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

#### Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Çakmak B. 2021. Dermestes ater Pupasından Elde Edilen Kitosanın Deri Kanseri Üzerine Etkisi, USBIK 2021 Uluslararası Online Fen Bilimleri Kongresi, 26-28 Şubat 2021, Kayseri, Özet Kitabı, 15.