



**T. C.  
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ KİTOSAN MODİFİYE ÜRÜNLERİNİN ELDESİ VE BİYOLOJİK  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Samet KOCABAY  
(201592022177)**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birnur AKKAYA**

**SİVAS  
MAYIS 2020**

**Samet KOCABAY**'ın hazırladığı ve “**YENİ KİTOSAN MODİFİYE ÜRÜNLERİNİN ELDESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

<b>Tez Danışmanı</b>	<b>Prof. Dr. Birnur AKKAYA</b> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Prof. Dr. Ekrem ATALAN</b> İnönü Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Doç. Dr. Recep AKKAYA</b> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR</b> Bingöl Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Dr. Öğr. Üyesi Irmak İÇEN TAŞKIN</b> İnönü Üniversitesi	.....

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Özlem Pelin CAN**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



*Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-575 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır

Kaynak göstermek koşulu ile alıntı ve gönderme yapılabilir

© Samet KOCABAY, 2020

Çalışmalarım süresince maddi ve manevi destek olan Babam'a ve her şeye rağmen " Durmak yok yola devam" diyen Annem' e teşekkür ederim.

## ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada:

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı: beyan ederim.

11.05.2020

Samet KOCABAY

## **TEŞEKKÜR VE KATKI BELİRTME**

Öncelikle bu çalıőmamda bana güç, kuvvet veren Allah'a hamd ediyorum.

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danıőman hocam sayın Prof. Dr. Birnur AKKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Hücre kültür çalışmalarında katkılarından dolayı Tıp Fakültesi Biyofizik Ana bilim dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Recep AKKAYA hocama teşekkür ederim.



## ÖZET

# YENİ KİTOSAN MODİFİYE ÜRÜNLERİNİN ELDESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Samet KOCABAY

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birnur AKKAYA

2020, 71+ xviii sayfa

Kitosan (Cs) doğada en çok bulunan polisakkaritlerden birisidir. Kaynak olarak yengeç, böceklerin dış iskeleti, mantarlar, bazı fungus ve yeşil alglerin hücre duvar yapılarında bulunan kitinden elde edilmektedir. Biyouyumluluk, antimikrobiyal, antifungal, antikoagülant ve antikanser özelliklerinden dolayı ilaç sanayisinden gıda endüstrisi uygulamaları için ilgi odağıdır.

Bu nedenle metastazı önlemeye yönelik oleik asit sülfatlanmış kitosan (OlcShCs) hazırlanarak biyolojik ve kimyasal karakteristik özellikleri araştırıldı ve orijinal kitosan ile karşılaştırıldı. Bunun için kitosan ve türevi FTIR, NMR, DSC, TGA ve DTA analizleri yapıldı ve kimyasal karakterizasyonu yapıldı. Akabinde kitosan türevinin antimikrobiyal, antifungal ve antikanser aktiviteleri araştırıldı.

CS ve OlcShCs'nin FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında CS'nin karakteristik spektrumları;  $1646\text{ cm}^{-1}$  C=O amide-I gerilmesi (stretching),  $1568\text{ cm}^{-1}$  N-H amide-II bağlanması ve  $1374\text{ cm}^{-1}$  C-N amide-III gerilmesini göstermektedir. Modifikasyon sonrası açıl olmayan birincil amin grubuna karşılık gelen  $1568\text{ cm}^{-1}$  pik kaybolurken,  $1634\text{ cm}^{-1}$ 'de açığa çıkmaktadır. Bu durum modifiye kitosanda amid bağının varlığını göstermektedir. Ayrıca  $1732\text{ cm}^{-1}$  ester bağının karbonil grubunun karakteristik pikidir. Bu bağ kitosanın hidroksil grubu ile oleik asitin karboksil grubu arasında açığa çıkmaktadır. Dolayısıyla yapıda N-açilasyonun açığa çıktığını göstermektedir.  $788$  ve  $1207\text{ cm}^{-1}$ 'de yeni açığa çıkan FT-IR bantları ise sırasıyla sülfö



gruplarının C–O–S and O–S–O bağ gerginliğine karşılık gelmektedir.  $H^1$  NMR analiz sonucuna bakıldığında 2.4 ppm'deki pik N-asetil glukozamin grubunun N-asetil protonlarına karşılık gelmektedir. 3.6 ppm'deki pik ise deasetile glukozamin kalıntılarının H-2 protonuna denk gelmektedir. Kitosanın oleik asit ile kimyasal modifikasyonu [-CH<sub>2</sub>-CO] 1.4 ppm'deki pik ile doğrulandı. Cs molekülünün *E. coli* CICC 21524, *B. subtilis* ATCC 21332, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. albicans* ATCC 60193 türlerine karşı sırasıyla %99.18±3.09, %87.50 ± 0.48, %100 ± 0, %12.90 ±3.4 antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görüldü. Aynı konsantrasyonda OlcShCs molekülünün *E. coli* CICC 21524, *B. subtilis* ATCC 21332, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. albicans* ATCC 60193 türleri üzerine sırasıyla antimikrobiyal etkisi %0 ±6.69, %6.66 ±1.25, %59.13 ±4.97, %21.26 ±2.17 olarak saptandı. HeLa kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi 24 saat için IC<sub>50</sub> değeri 81.57±5.30 µg/ml bulundu. Sonuç olarak yeni sentezlediğimiz kitosan türevi molekül kitosana göre genel anlamda daha düşük antimikrobiyal etki gösterdiği, HeLa hücrelerine karşı kitosan türevinin sitotoksik etki gösterdiğinden dolayı potansiyel ilaç adayı olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Kitosan sülfat, sülfatit, yağ asitleri, antimikrobiyal, sitotoksikite.

## **ABSTRACT**

### **PREPARATION OF NEW CHITOSAN PRODUCTS AND INVESTIGATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVATIONS**

**Samet KOCABAY**

**PhD Thesis**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor: Prof. Dr. Birnur AKKAYA**

**2020, 71+ xviii pages**

Chitosan is one of the most abundant polysaccharide in nature. It is derived from chitin which is found in crustaceans, insects, mushrooms and cell walls of certain fungi and green algae and their mainly skeleton structures. Because of its functional properties such as biocompatibility, antimicrobial, antifungal, research scientists are interested to increasing the application area from medicine, drug to food industry.

We have prepared oleic acid sulfated chitosan (OlcShCs) to determine its characteristic properties such as chemicals and biologicals. Medium molecular weight chitosan was used to synthesis the oleic acid sulfated chitosan. The structure of the products was characterized using various spectroscopic and analytical methods such as FTIR, NMR, DTG, DSC and TGA. The new molecule was investigated in terms of antimicrobial, antifungal and anticancer activities.

We can compare the FT-IR spectra of chitosan (Cs) and OlcShCs. The FT-IR spectrum of Cs exhibited characteristic bands of  $1646\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching of amide-I),  $1568\text{ cm}^{-1}$  (N-H bending of amide-II) and  $1374\text{ cm}^{-1}$  (C-N stretching of amide-III). After modification, the vibrational band corresponding to the non-acylated primary amine group at  $1568\text{ cm}^{-1}$  disappeared and the peak at  $1634\text{ cm}^{-1}$  appeared which shows the presence of amide bond in the modified Cs. Furthermore, the peak which was observed at  $1732\text{ cm}^{-1}$  is the characteristic peak of carbonyl group of ester, which is formed between carboxyl groups of oleic acid and hydroxyl groups of Cs. That means N-acylation occurred in the structure. The new FT-IR spectrum bands at  $788$  and  $1207\text{ cm}^{-1}$ , are due to sulfo groups (C-O-S and O-S-O bond stretching, respectively). These

results show that the sulfate groups, oleic acid are introduced into chitosan successfully. The  $H^1$  NMR spectrum peak at 2.4 ppm was due to N-acetyl protons of N-acetyl glucosamine while the peak at 3.6 ppm was due to an H-2 proton deacetylated glucosamine residues. The chemical modification of chitosan by oleic acid was confirmed by the peaks at 1.4 ppm [-CH<sub>2</sub>-CO]. The chitosan showed 99.18%±3.09, 87.50% ±0.48, 100%± 0, 12.90% ±3.4 antimicrobial activity at 1% concentration for *E. coli* CICC 21524, *B. subtilis* ATCC 21332, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. albicans* ATCC 60193 strains respectively. The modified chitosan also showed 0% ±6.69, 6.66% ±1.25, 59.13% ±4.97, 21.26% ±2.17 antimicrobial activity at 1% concentration for *E. coli* CICC 21524, *B. subtilis* ATCC 21332, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. albicans* ATCC 60193 respectively. The IC<sub>50</sub> value was found 81.57±5.30 µg/ml at 24 hours for HeLa cancer cell line. The new synthesised molecule showed anticancer effect to HeLa cell line and showed antimicrobial activity. Depend on these properties, it can be candidate for drug in future.

**Key Words:** Chitosan sulfate, sulphatid, fatty acids, antimicrobial, cytotoxicity.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	vii
<b>ÖZET</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	xii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xvi
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	xvii
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xviii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1 Kitin ve Kitosan .....	1
1.1.1 Kitosan.....	1
1.1.2 Kitosanın kaynakları .....	2
1.1.3 Kitosanın kimyası.....	3
1.1.4 Kitosanın kimyasal özellikleri.....	3
1.1.5 Kitosanın biyolojik özellikleri.....	4
1.1.6 Kitosan ve türevlerinin antimikrobiyal özellikleri .....	4
1.1.7 Antimikrobiyal ajan olan kitosanın etki mekanizmaları .....	5
1.1.8 Kitosan ve türevlerinin antioksidan özellikleri .....	8
1.2. Kitosan Modifikasyonları Ve Uygulamaları .....	8
1.2.1 Kitosanın parçalanması ve oligomerleri.....	8
1.2.2 Yağ asitleri ve sülfatitler .....	10
1.2.3 Kitosan sülfat polimerleri ve kanser tedavisi .....	13
1.2.4 Antikoagülant ajanlar olarak kitosan.....	19
1.2.5 Metal iyonlarının absorblanması .....	20
1.2.6 Antimikrobiyal ajanlar .....	20
1.2.7 İlaç taşıma uygulamaları .....	21
<b>2. MATERYAL ve METOT</b> .....	22

2.1 Orta Dereceli Moleküler Ağırlıklı Kitosanın (Cs) Modifikasyonu .....	22
2.2 Modifiye Kitosanın Kimyasal Karakterizasyonu .....	26
2.2.1 FT-IR analizi .....	26
2.2.2 H <sup>1</sup> NMR analizi .....	26
2.2.3 DSC, TGA ve DTA analizi .....	26
2.3 Modifiye Kitosanların Biyolojik Karakterizasyonu .....	26
2.3.1 Antibakteriyal aktivite .....	26
2.3.2 Antifungal aktivite .....	27
2.3.3 Antikanser aktivite .....	28
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>29</b>
3.1 Cs ve OlcShCs Örneklerinin Kimyasal Karakterizasyonu .....	29
3.1.1 Cs ve OlcShCs örneklerinin FTIR analizi .....	29
3.1.2 H NMR analizi .....	30
3.1.3 DSC, DTA ve TGA analizleri .....	33
3.2 Biyolojik Karakterizasyon .....	33
3.2.1 Antibakteriyal aktivite .....	33
3.2.2 Antifungal aktivite .....	39
3.2.3 Antikanser aktivite .....	41
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR</b> .....	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>54</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>69</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Selüloz kitin ve kitosanın yapıları .....	2
Şekil 1.2: Kitin molekülünden kitosan molekülünün sentezlenme şeması.....	2
Şekil 1.3: Kitosan ve kito oligomerlerin antifungal etkisi .....	7
Şekil 1.4: Kitosan ve kito oligomerlerin gram(+) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi.....	7
Şekil 1.5: Kitosan ve kito oligomerlerin gram(-) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi.....	7
Şekil 1.6: Kitosanın fonksiyonel grupları .....	9
Şekil 1.7: Laurik asit ve mololaurin yağ asitinin çeşitli bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi .....	12
Şekil 1.8: Kitosan sülfatın kimyasal yapısı.....	15
Şekil 1.9: Lineloik asit ile sentezlenmiş kitosanın yapısı .....	15
Şekil 1.10: Sülfatlanmış kitosanın kullanım alanlarını göstermektedir .....	16
Şekil 1.11: Sülfatit kitosanın VEGF/VEGFR2 yolağı inhibisyon mekanizması .....	18
Şekil 1.12: Sülfatit polisakkaritlerin ümmin sistem üzerine etkisi .....	18
Şekil 1.13: Selektinlerin tümör adezyonundaki rolü.....	19
Şekil 2.1: Kitosan molekülünün oleik asit ile reaksiyonu .....	22
Şekil 2.2: Kitosan ile oleik asit ve sülfatın reaksiyonu.....	23
Şekil 2.3: Oleik asit ile EDC molekülünün etkileşimi.....	24
Şekil 2.4: Kitosan oleik asit ve sülfatit kompleksi.....	24
Şekil 2.5: Sentez aşamasında labaratuvarında kullanılan evaparatör (A, B), liyafilizatör (C, D) sitotoksisite deneylerinde kullanılan hücre kültür labaratuvarı (E).....	25
Şekil 3.1: Cs ve OlcShCs örneklerinin FTIR analizi .....	29
Şekil 3.2: Cs ve OlcShCs örneklerinin sadece ilgilenilen piklerin FTIR analizi.....	30
Şekil 3.3: Kitosanın (Cs) H <sup>1</sup> NMR (400 MHZ) analizi .....	31
Şekil 3.4: Modifiye kitosanın (OlcShCs) H <sup>1</sup> NMR (400 MHZ) analizi .....	31
Şekil 3.5: Cs ve OlcShCs'nin H <sup>1</sup> NMR elle karşılaştırma analizi .....	32
Şekil 3.6: OlcShCs için elde edilen H <sup>1</sup> NMR odaklanılan bölgenin büyütülmüş analizi .....	32
Şekil 3.7: Cs ve OlcShCs'nin termogravimetrik analizi .....	35
Şekil 3.8: Kitosan (Cs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen <i>E. coli</i> bakterisine karşı antibakteriyal etkisi. ....	36
Şekil 3.9: Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen <i>E. coli</i> bakterisine karşı antibakteriyal etkisi..	36
Şekil 3.10: Kitosan molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen <i>B. subtilis</i> bakterisine karşı antibakteriyal etkisi.....	37
Şekil 3.11: Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen <i>B. subtilis</i> bakterisine karşı antibakteriyal etkisi.....	37
Şekil 3.12: Kitosan (Cs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen <i>S. epidermidis</i> bakterisine karşı antibakteriyal etkisi .....	38

<b>Şekil 3.13:</b> Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen <i>S. epidermidis</i> bakterisine karşı antibakteriyal etkisi.....	38
<b>Şekil 3.14:</b> Kitosan (Cs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen <i>C. albicans</i> ’a karşı antifungal etkisi.....	39
<b>Şekil 3.15:</b> Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen <i>C. albicans</i> ’a karşı antifungal etkisi. ....	40
<b>Şekil 3.16:</b> HeLa kanser hücresine karşı OlcShCs molekülünün stotoksik etkisi .....	41



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 1.1:</b> Farklı bakteri türlerinin kitosanın farklı konsantrasyonlarına karşı inhibisyonu .....	4
<b>Çizelge 1.2:</b> Bazı bakteri ve fungus türlerine karşı kitosan molekülünün antimikrobiyal etkisi ....	5
<b>Çizelge 1.3:</b> Yağ asitleri ve monogliseritlerin bakterilere karşı öldürücü etkileri .....	14
<b>Çizelge 3.1:</b> Kitosan ve modifiye kitosanın <i>E. coli</i> türüne karşı antibakteriyal etkisi.....	34
<b>Çizelge 3.2:</b> Kitosan ve modifiye kitosanın <i>B. subtilis</i> türüne karşı antibakteriyal etkisi .....	34
<b>Çizelge 3.3:</b> Kitosan ve modifiye kitosanın <i>S. epidermidis</i> türüne karşı antibakteriyal etkisi .....	34
<b>Çizelge 3.4:</b> Kitosan ve modifiye kitosanın <i>C. albicans</i> türüne karşı antifungal etkisi.....	39
<b>Çizelge 3.5:</b> Cs molekülünün <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i> üzerine antimikrobiyal etkisi .....	40
<b>Çizelge 3.6:</b> OlcShCs molekülünün <i>S. epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i> üzerine antimikrobiyal etkisi .....	40
<b>Çizelge 3.7:</b> HeLa kanser hücrelerine karşı OlcShCs molekülünün IC <sub>50</sub> değerleri .....	41



## SİMGELER DİZİNİ

<b>pH</b>	Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
<b>M</b>	Molar konsantrasyon
<b>N</b>	Normal konsantrasyon
<b>ml</b>	Mililitre
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikrolitre
<b>g</b>	Gram
<b>mg</b>	Miligram
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogram
<b>d</b>	Özkütle (yoğunluk)
<b>n</b>	Mol
<b>°C</b>	Santigrad derece
<b>nm</b>	Nanometre
<b>Da</b>	Dalton
<b>Mw</b>	Moleküler ağırlık

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>CÜ</b>	Cumhuriyet Üniversitesi
<b>İÜ</b>	İnönü Üniversitesi
<b>CÜTAM</b>	Cumhuriyet Üniversitesi Teknoloji Araştırma Merkezi
<b>Cs</b>	Chitosan (Medium Moleküler Ağırlıklı)
<b>OlcShCs</b>	Oleik asit sülfatlanmış kitosan (sülfatit)
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i> CICC 21524
<b><i>B. subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193
<b><i>S. epidermidis</i></b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
<b>HCISO<sub>3</sub></b>	Klorosülfonik Asit
<b>EDC</b>	Etilen Diamin Korbomid
<b>NHS</b>	Hidroksi Süksünik Asit
<b>FA</b>	Yağ asiti
<b>RPM</b>	Dakikada dönme sayısı
<b>CFU</b>	Koloni oluşum birimi (Colony Forming Unit)
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>IR</b>	İnhibisyon Oranı
<b>MIC</b>	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>FTIR</b>	Floresans Transmitted İnfrared Rezonans
<b>NMR</b>	Nükleer Magnetik Rezonans
<b>DSC</b>	Differential scanning kalorimetri
<b>DTA</b>	Differential termal analiz
<b>TGA</b>	Termal gravimetrik analiz
<b>MTT</b>	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5 Diphenyl tetrasodium Bromide
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kitin ve Kitosan

### 1.1.1 Kitosan

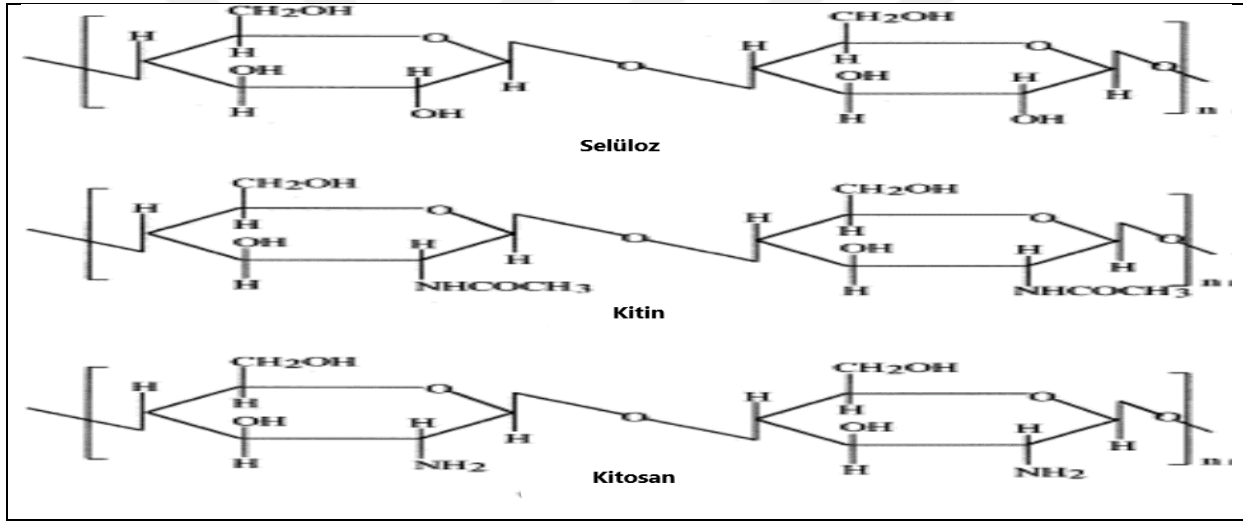
Kitosan (CS)  $[(C_6H_{11}NO_4)_n (C_8H_{13}NO_4)_m]$ , 1811 yılında ilk kez Bradconnot [1] tarafından tanımlanan kitinin  $\beta$ -(1→4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz ve  $\beta$ -(1→4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranoz birimlerinin rastgele dağılan katyonik linear polimerik yapıda olan polisakkarit dizisidir. Bu oran D-glukozamin için yaklaşık %80 iken N-asetil-D-glukozamin için yaklaşık %20'dir [1]. Kitosan doğal yollarla yıkılabilen, vücudumuza uyum gösteren, toksik olmayan, bilinen en iyi polimerlerden birisidir. Kitosanın kitin molekülünden farkı kitinin deasetile olmuş formudur. Kitosan yüksek nitrojen konsantrasyonundan dolayı ticari olarak ilgi odağıdır. Kitin ise doğal olarak bol miktarda bulunan bir mukopolisakkarittir. Yengeç ve böcekler gibi pek çok omurgasız canlıların iskelet yapısını oluşturmaktadır. 2-asetamido-2-deoksi-d-glukopiranoz kalıntılarının  $\beta$ -(1→4) bağıyla bağlı homopolimer yapıdan oluşmaktadır. Yapısında nitrojen molekülü olmasına rağmen ümmün sistemi alarma geçirmesi bakımından oldukça zayıftır. Kitosan oldukça suda çözünmez bir maddedir ve kapalı kimyasal yapısından dolayı kimyasal reaktivitesi ve çözünürlüğü açısından selülozu andırmaktadır. Günümüz polimerlerinin pek çoğu sentetik materyallerdir ve doğal polimerler (selüloz, kitin, kitosan ve türevleri) ile karşılaştırdığımızda biyouyumluluk ve biyoçözünürlük açısından dezavantajlara sahiptir. Fakat doğal polimerlerinde reaktivite ve işlenebilirliği bakımından bazı sınırlandırmaların olduğu bilinmektedir [2].

Selülozdan sonra doğada en çok bulunan doğal bir polisakkarit olan kitin yengeç, böcek, mantar ve bazı fungi ve yeşil alglerin hücre duvarlarının dış iskeletlerinin temel bileşenidir. Kuru ağırlığına oranla kitin miktarı en çok yengeç canlılarında bulunduğu için kimya endüstrisi için bu canlılar kitin kaynağı olarak göz önünde bulundurulurlar. Kitin pek çok organik çözücülerde, asit, baz, nötral sıvı çözeltilerinde ve suda çözünmeyen bir polisakkarittir [3].

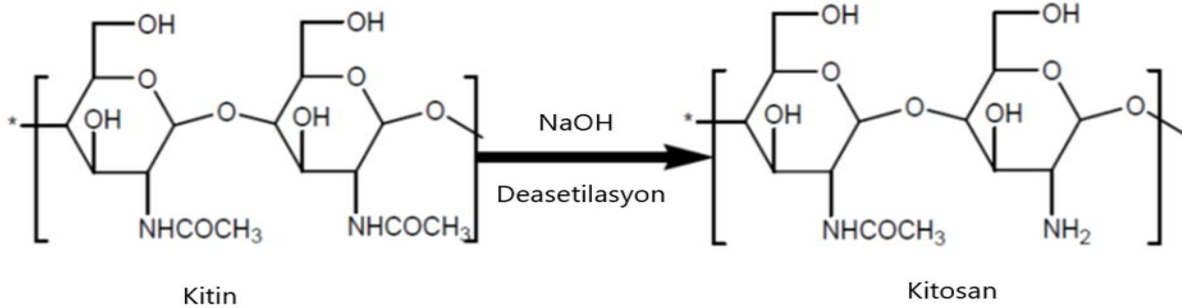
Kitosan [poli- $\beta$ -(1→4) N-asetil-D-glukozamin], kitin polisakkaridinin N-deasetile olmuş formudur. Kitosanın moleküler zincir yapısında düzenli dağılmış serbest amino grup yapılarından dolayı kitin ile kıyaslandığında kimyasal ve biyokimyasal reaktivitesi daha yüksektir [4].

### 1.1.2 Kitosanın kaynakları

Kitin karides kabuklarından, yengeçten ve mantar misellerinden elde edilebilir. Kitinden kitosan eldesi ise kitinin alkali uygulamaları ile N-deasetilasyonu sonucu elde edilmektedir. Alkali uygulamalar ise uygulanan sıcaklık, süre ve alkalinin konsantrasyonuna bağlı olarak farklı deasetilasyon derecesine sahip kitosan oluşmasına sebep olmaktadır. Örneğin 100°C’de 1 saat süre zarfında %50’lik NaOH çözeltisi ile kitin muamele edildiğinde deasetilasyon derecesi yaklaşık %70’dir. Ancak %80 deasetilasyon derecesine ulaşması için 5 saate daha ihtiyaç duyulduğu rapor edilmiştir [6].



Şekil 1.1: Selüloz kitin ve kitosanın yapıları [5]



Şekil 1.2: Kitin molekülünden kitosan molekülünün sentezlenme şeması [7]

### 1.1.3 Kitosanın kimyası

Temelde kitosanın asetilasyonu derecesi moleküler ağırlık ve çözünürlük bakımından kimyasal karakterizasyonu yapılır. Çünkü bu karakterler biyolojik aktivitelerinde, kimyasal modifikasyonlarında ve kitosanın türevlerinde önemli etkilere sahiptirler.

Kitosanın deasetilasyon derecesi (DD) 2-asetamido-2-deoksi- D-glukopiranoz birimlerinin 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz birimlerine oranı ile hesaplanır. Deasetilasyon derecesinin bazı bakteri türleri üzerinde önemli antimikrobiyal etkilere sahip olduğu saptanmıştır [8]. Örneğin yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* türlerine karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [8].

Kitosanın moleküler ağırlığı 50 kDa'dan küçük olanlar düşük (low) moleküler ağırlıklı, 50-150 kDa aralığında olanlar orta (medium), 150 kDa'dan daha büyük olanlar yüksek (high) moleküler ağırlıklı olarak bilinmektedir [9]. Kitosanın moleküler ağırlığıda antimikrobiyal, hemostasi, ilaç taşınımı, antioksidan özellik bakımından önemlidir [10]. Kitosan asidik ortamlarda amin gruplarının protonlanmasından dolayı çözünür olur. Örneğin suda, organik çözücülerde, nötral ve alkali pH'larda kitosan çözünmezken asetik asit, formik asit, laktik asit ve seyreltik organik asit solüsyonlarında çözünür [5].

Protonasyon derecesi %50 oranını geçtiğinde kitosan tamamen çözünür. Ve sitokiometrik oran ( $[AcOH]/[Chit-NH_2]$ ) 0.6 olmaktadır [11]. Kitosan molekülünün çözünme probleminden dolayı bazı araştırmacılar çeşitli modifikasyonlar ile suda çözünür kitosan elde etmeyi başarmışlardır [12].

### 1.1.4 Kitosanın kimyasal özellikleri

Kitosan nötral ve bazik pH çözeltilerinde çözünmez iken asetik asit, formik asit, hidroklorik asit, glutamik asit gibi organik asitlerde ve inorganik asitlerde çözünür. Kitosan fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri açısından çeşitli farklılık gösterdiği için, yenilebilir (edible) film endüstrisi, yiyeceklerin besinsel değerini artırmak için eklenti, besinlerden katı materyallerin geri kazanılması, atıkların işlenmesi, suyun saflaştırılması gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Kitosanı ticari olarak önemli kılan biyolojik olarak yıkılabilmesi, hem bitki hem hayvan dokuları için biyouyumlu olması, non-toksik olması, jellere, boncuk yataklarına, filimlere, tozlara,

kapsüllere dönüştürülebilme özelliklerinin olmasıdır [13]. Kitosanın diğer bir mükemmel özelliği onun sindirilemez olması ve tatsız bir tadının bulunması, düşük kalorili besinlerin hazırlanmasında besin katkı malzemesi olarak kullanılması için iyi bir sebeptir.

### 1.1.5 Kitosanın biyolojik özellikleri

Kitosan biyolojik açıdan toksik olmayan, biyouyumluluk özelliğe sahip ve biyolojik olarak yıkıma uğrayabilen bir amino polisakarittir. Bu nedenle klinik uygulamalardan besin endüstrisine kadar pek çok alanda uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin yara iyileştirilmesinde, ümmün sistemin güçlendirilmesinde, ilaç taşınımlarında, antimikrobiyal çalışmalarda çok sık kullanılmıştır. Ayrıca fungusitlere karşıda önemli bir antifungal etki gösterdiğinden besinlerin funguslara karşı korunması amacıyla besin endüstrisine yönelik pek çok çalışmaları bulunmaktadır [14].

### 1.1.6 Kitosan ve türevlerinin antimikrobiyal özellikleri

Kitosan, bakterilerin büyük bir çoğunluğunun büyümesini inhibe etmektedir. Yani yüksek antimikrobiyal aktiviteye, geniş spektrumlu bir aktiviteye, yüksek öldürme hızına, memeli hücrelerine karşı düşük toksisite özelliğine sahiptir [15].

**Çizelge 1.1:** Farklı bakteri türlerinin kitosanın farklı konsantrasyonlarına karşı inhibisyonu [3]

Bakteri Türü	Kitosan Konsantrasyonu	Sonuç
<i>Bacillus cereus</i>	$\geq 0.02\%$	İnhibisyon
<i>Escherichia coli</i>	$\geq 0.0075\%$	İnhibisyon
<i>Proteus vulgaris</i>	$\geq 0.0075\%$	İnhibisyon
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\geq 0.01\%$	İnhibisyon
<i>Pseudomonads</i>	$\geq 0.2\%$	İnhibisyon
<i>Salmonella typhimurium</i> ve <i>P. morganii</i>	$\geq 0.01\%$	İnhibisyon
<i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>P. pentosaceus</i>	$\geq 0.1\%$	İnhibisyon

### 1.1.7 Antimikrobiyal ajan olan kitosanın etki mekanizmaları

Kitosanın bakteri türlerine karşı olan etkisi ortamın pH değeri, sıcaklık, kitosanının etki süresi, kitosanın elde edildiği kaynak, moleküler ağırlığı ve kitosanın çözündüğü organik veya inorganik çözücüler gibi faktörlerinde bakteri türleri üzerinde büyümelerini azaltıcı etkileri vardır (Çizelge 1.1) [3]. Kitosan molekülünün bazı bakteri ve fungus türlerine antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır (Çizelge1.2) [7]. Kitosanın antimikrobiyal etkisinin aydınlatılması için çeşitli mekanizmalar öne sürülmektedir.

**Çizelge 1.2:** Bazı bakteri ve fungus türlerine karşı kitosan molekülünün antimikrobiyal etkisi [7]

Bakteri	MIC (ppm)	Mantar	MIC (ppm)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100	<i>Botrytis cinerea</i>	10
<i>Bacillus cereus</i>	1000	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Corynebacterium michiganese</i>	10	<i>Drecheslera sorokina</i>	10
<i>Erwinia sp.</i>	500	<i>Micronectriella nivalis</i>	10
<i>Erwina carotovora subsp.</i>	200	<i>Piricularia oryzae</i>	5000
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	20	<i>Rhizoctonia solani</i>	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700	<i>Trichophyton equinum</i>	2500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500		
<i>Staphylococcus aureus</i>	20		
<i>Xanthomonas compestris</i>	500		

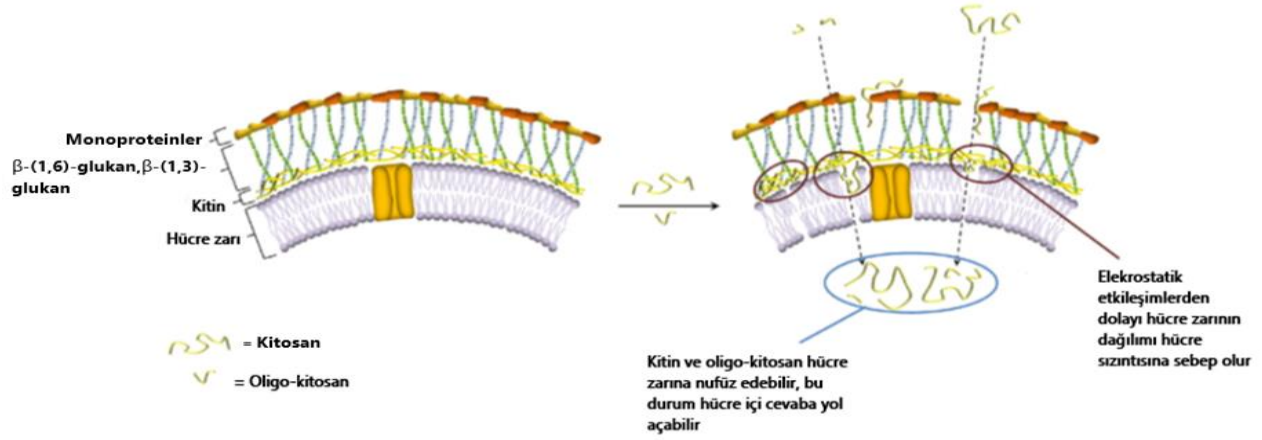
Polimerik bir makro molekül olan kitosan gram negatif bakterilerin dış membranından geçiş yapamaz. Ancak pH 6.3 değerinden daha düşük pH ortamlarında kitosanın C-2 pozisyonundaki amino gruplarından dolayı pozitif yüke sahip olacaktır ve gram negatif bakterilerin hücre yüzeyinde yer alan negatif yüklü lipopolisakarit yapı ile reaksiyon verecektir. Polikasyonik moleküllerin gram negatif bakterilerin dış yüzeyine bağlanması bu yapının bütünlüğünün bozulmasına sebep olacak ve bakterinin dış yapısının koruyucu özelliğinin kaybolmasına sebep olacaktır [16]. Polikasyonik moleküllerin bağlanması bakteri hücrelerinin dış mebranının bütünlüğünü bozduğundan bariyer fonksiyonunun kaybolmasına sebep olabilir ancak doğrudan bakterisit etkisi eksiktir. Gram negatif bakterilerin dış mebranına bağlanarak bu yapının bozulmasına sebep olan alifatik ve katyonik polimer bileşeni polyethyleneimine (PEI) de içinde bulunduğu aktif bileşenler organizmaların deterjan indüklü parçalanmasına ve hidrofobik antibiyotiklere veya problemlere karşı duyarlı hale getirmektedir [17].

Genel anlamda bir katyonik antimikrobiyal ajan olan kitosan bakteri hücre yüzeyinde makromoleküllerin negatif yüklü kalıntıları ile etkileşmesi yoluyla hücre geçirgenliğinde değişime sebep olur. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin mekanizması bakterinin yüzey bileşenlerine kitosanın amino gruplarının bağlanmasını içermektedir. Böylelikle onların çoğalmasını inhibe etmektedir. Düşük konsantrasyonlarda (0.1 mg/ml) kitosan, bakteri hücre membranını parçalamak için negatif yüklü bakteri hücre yüzeyine bağlanabilir ve hücre içi bileşenlerin sızmasından dolayı hücre ölümüne sebep olur. Yüksek konsantrasyonlarda ise (2 ve 5 mg/ml) kitosan bakteri yüzeyini ekstra kaplayıcı bir özelliğe sahip olduğundan hücre içi bileşenlerin sızmasını engeller ve aynı zamanda hücre bariyeri boyunca madde transferini alıkoyar [18].

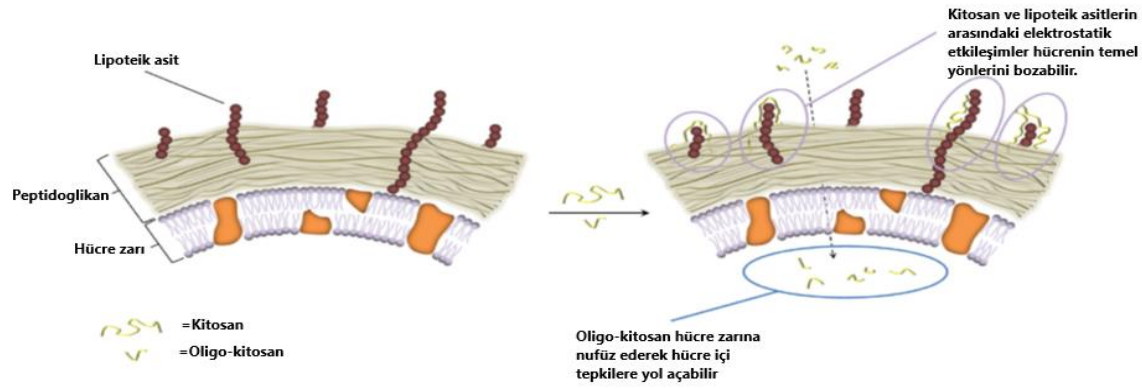
Kitosanın antimikrobiyal mekanizması farklı faktörler tarafından etkilendiği için, altında yatan mekanizmayı aydınlatmak oldukça güçtür. En önemli faktörler ise mikroorganizmaların çeşitleri, moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesidir [19]. Mikroorganizmalar kabaca 4 gruba ayrılabilir; gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler, kitosan duyarlı fungi ve kitosan dirençli fungi [20]. Fungi ve bakterilerin hücre yüzeylerinde çok reaktif olan kitosan geçirgenliğe sebep olmaktadır [21]. Bu etkileşim genellikle elektrostatik olarak değerlendirilir [20] ve bakterilerin hücre yüzeyinde negatif yüklü moleküller ile kitosanın protonize olan amino gruplarının pozitif yükleri arasında meydana gelmektedir. Genelde hücre yüzeyinin geçirgenliği hücre içeriği materyallerinin dışarıya sızması ile hücre ölümüne sebep olmaktadır.

Kitosanın nükleik asitlere bağlanarak DNA ekspresyonunu etkileyerek hücre ölümüne sebep olması da bir diğer etkidir [22]. Ancak kitosan DNA ekspresyon mekanizmasına etki etmeden önce plasm membranına bağlanmak zorundadır. Bu ise mikroorganizmanın çeşidine ve kitosanın moleküler ağırlığına bağlıdır. Elektrostatik etkileşimler çok önemli olmasına rağmen kitosan kovalent olmayan bağlanmalar ile kolestrole de bağlanabilmektedir [23]. Bu durum diğer kovalent olmayan etkileşimlerin de elektrostatik etkileşimlere ek olarak antimikrobiyal aktivitede rol aldığını göstermektedir. Kitosan fungi ve bakterilere karşı bir antimikrobiyal ajan gibi kullanılabilir, fakat kitosanın aktivitesi pek çok faktörler tarafından belirlenmektedir. Genellikle kitosan hücre yüzeyinde oldukça aktiftir. Mikroorganizmaların türüne bağlı olarak, moleküler ağırlık, diğer antimikrobiyal aktiviteler DNA/RNA sentezinin inhibisyonunu veya protein sentezinin yıkımını tetikleyebilir [24].





Şekil 1.3: Kitosan ve kito oligomerlerin antifungal etkisi [24]



Şekil 1.4: Kitosan ve kito oligomerlerin gram(+) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi [24]



Şekil 1.5: Kitosan ve kito oligomerlerin gram(-) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi [24]

### **1.1.8 Kitosan ve türevlerinin antioksidan özellikleri**

Antioksidan çalışmalarında “2-thiobarbituric acid” rakatif maddesi (TBARS) testi kullanılmaktadır. Shahidi ve arkadaşları [25] tarafından lipid oksidasyonunda kitosanın etkinliği çalıştılar. Onlar pişirilmiş morina balığının 12 gün +4°C’de depolandıktan sonra TBARS değerlerini gözlemlemişler. Pişirme öncesi kitosan uygulamasının bir sonucu olarak TBARS değerinin düştüğünü gözlemlemişler. Kitosanın üç farklı konsantrasyonu ve üç farklı viskozitesi bu çalışmada kullanılmış. Konsantrasyonlar 50, 100, 200 ppm ve viskoziteler 14, 57, 360 cp Morino balığı oksidasyon kontrolünde en etkili 200 ppm ve 14 cp değerine sahip kitosan örneğinin olduğunu rapor etmişleridir.

Kitosanının antioksidan aktivitesi bu nedenle onların metal şelatlayıcı kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir. Farklı moleküler ağırlıkları ile birlikte kitosanın Atlantik Morina ve Ringa balıklarının lipid oksidasyonu üzerine etkisi Jeon ve arkadaşları [26] tarafından çalışılmıştır. Çeşitli kitosan örnekleri ile kaplanmış Morina ve Ringa balığı örneklerinin her ikisinde TBARS içerikleri 12 gün +4°C’de kaplanmamış örneklere göre istatistiksel olarak ( $p \leq 0.05$ ) düşük olduğu saptanmıştır. 360 cp kullanılan balıkların çeşitliliğine bakılmaksızın TBARS değerlerini düşürmede en etkili değer olarak belirlenmiştir. Bu durumun altında yatan temel mekanizma iyonik fonksiyonel grupların çok sayıda varlığıdır. Bu fonksiyonel gruplar çok güçlü etkileşimler oluşturarak yüksek viskoziteli kitosanlarda zincir hareketliliğini kısıtlamışlardır. Bu durumda iyi bir oksijen bariyeri oluşturma özelliği ortaya koymaktadır.

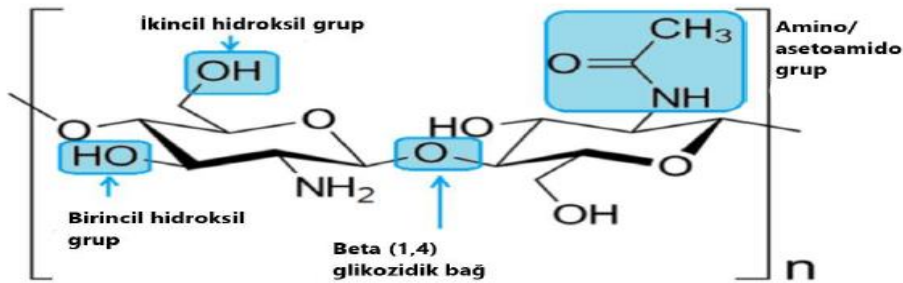
## **1.2. Kitosan Modifikasyonları Ve Uygulamaları**

### **1.2.1 Kitosanın parçalanması ve oligomerleri**

Kitosanın modifikasyonları içerisinde farklı moleküler ağırlığa sahip kitosan elde etmek için parçalama işlemi gerçekleştirilir. Güçlü asitler veya alkali uygulama ile gerçekleştirilen parçalama işlemi kimyasal hidroliz olarak ifade edilmektedir. Kimyasal hidroliz geride bırakmış olduğu kimyasal kalıntılar veya bu kalıntılardan kurtulmak için yapılan ekstra saflaştırma işlemi maliyet ve süreci artırmaktadır. Yine kimyasal hidroliz sert hidrolitik şartlar gerektirmektedir. Glikoz halkalarının kimyasal modifikasyonları açığa çıkabilmektedir. Ayrıca bazı toksik bileşenlerin açığa çıkması çevre kirliliği açısından risk taşımaktadır. Bütün bu

olumsuz durumlara karşı verim ise düşüktür. Enzimatik hidroliz ise ılıman reaksiyon şartlarına ihtiyaç duyar. Glikoz halkası modifikasyonları açığa çıkmaz. Verim ise oldukça yüksektir. Enzimatik hidroliz oluşabilecek olumsuz modifikasyonları minimize etmektedir [27]. Kitinaz ve kitosanaz kitosan oligomerlerinin üretimi için pahalı enzimler olsa bile gelişen enzim teknolojisi ile araştırmalar sonucunda alternatif ucuz enzimler bulunabilmektedir. Fakat bulunan alternatif enzimler non spesifik olduğu için kullanım miktarı fazladır. Bu nedenle kullanımını azaltacak araştırmalar da yapılmıştır [28]. Enzimatik olarak kitosan glukozamin-glukozamin, glukozamin-N-asetilglukozamin ve N-asetil-glukozamin-N-asetil-glukozamin bağlarını parçalayan enzimler ile hidroliz edilebilmektedir. Deasetilasyon derecesine bağlı olarak canlı mikroorganizmalar tarafından kitosanın parçalanma hızı değişmektedir ve hızla deasetilasyon derecesi zıt orantılıdır [29]. Kitosanın enzimatik hidrolizini araştıran çalışmalar literatürde çok fazla bulunmaktadır. Genellikle kullanılan enzimler kitinaz, kitosanaz, lizozim ve selülozazdır [30].

Kitosan oligosakkaritler (CSOS) *N*-asetilglukozamin ve *D*-glukozamin'nin homo veya heteroolimomerleridir [31]. Polimerizasyon derecesi 20'den daha küçük ve 3.9 kDa moleküler ağırlıktan daha küçük kitosan birimleri kitosan oligosakkarit veya oligomer olarak adlandırılır. Yine literatürde polimerizasyon derecesi 55'den daha küçük ve moleküler ağırlığı 10000 daltonda küçük olan birimler oligomer olarak adlandırılmaktadır [32]. CSOS kitin veya kitosanın enzimatik, kimyasal veya bu metotların kombinasyonu ile üretilebilmektedir. Kitosanın kimyasal hidrolizi deasetile formundan dolayı yüksek sıcaklık gerektirmektedir. Kitosan ve kitosan oligomerlerin antibakteriyel aktivitesi üzerine günümüzde yapılan çalışmaların sonuçları, kitosanın kitosan oligomerlerine göre bakteriler üzerinde daha iyi etki gösterdiğini ifade eden çalışmalar bulunmaktadır [33].



Şekil 1.6: Kitosanın fonksiyonel grupları [34]

Kitosan oligosakkaritler fizikokimyasal bakımdan kitosan ve kitini andırmaktadır. İlk olarak kitosan oligosakkaritler toksik olmayan, biyouyumlu ve biyobozunurdur. İkinci olarak kitin çoğu solventte güçlkle çözünmekte iken kitosan yüksek viskozite ile birlikte zayıf çözüdür ve düşük absorblanma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle çözürlük, viskozite, absarbsiyon olabilme insan faydalı CSOS için biyomedikal uygulamalar da ve pek çok alanda ayırt edici özelliklerdendir. Yani düşük moleküler ağırlıklı CSOS hem suda hemde fizyolojik şartlar altında tamamen çözüdür ve gasrointestinal sistem ve diğer mukozal mebranlar tarafından neredeyse tamamı absorbe edilebilmektedir. Üçüncü olarak N-asetil glukozamin (GlcNAc) birimleri uzun bir zincir oluşturmak için tekrar etmektedir. Kitin genelde çok sayıda GlcNAc birimleri içerirken, kitosan N-glukozamin (GlcN) birimlerini içermektedir. Bu durum CSOS içinde benzerdir. Benzer pH değerlerinde kitosanın yapısında yer alan (GlcN) birimleri kolay protonlaştığı için kitosanın çok daha fazla pozitif yüklenmesini sağlar ve bu durumda birtakım özellikleri beraberinde getirmektedir. Aynı durum CSOS içinde benzerdir. Sonuç olarak CSOS biyolojik ve kimyasal özellikleri için gerekli olan üç tane genel fonksiyonel reaktif grup içermektedir. Bu reaktif fonksiyonel gruplar; 1) Amino/asetamido (amino/asetamido grup); 2) C-2, -3, C-6 pozisyonlarında yer alana birincil ve ikincil hidroksil grupları; 3) N-glukosamin birimleri arasındaki ( $\beta(1-4)$ ) glikozidik bağıdır [34].

Kitosan oligomerlerinin çeşitlenmesinde polimerizasyon derecesi önemli bir yer tutmaktadır. Hemokitooligosakkaritler GlcN (D unit) veya GlcNAc (A unit) birimlerinin oligomerleridir. Heterooligosakkaritler ise hem D hem de A birimlerinden oluşmaktadır. Polimerizasyon derecesi 10'dan daha küçük olan heterokitooligosakkaritler suda çözüdür. Ancak 10'dan daha büyük ise sudaki çözürlüğü çözeltilin pH değerine ve N asetilasyon derecesine bağlıdır. Besin endüstrileri, ilaç endüstrileri ve bilim insanları tercihsel olarak heterokitooligosakkaritler tarafından kullanılmaktadırlar. Birkaç monomer biriminden oluşan CSOS oligomer olarak adlandırılır ve bir oligomerdeki monomerik birimlerin sayısı polimerizasyon derecesi (DP) olarak görülür [32].

### **1.2.2 Yağ asitleri ve sülfatitler**

Yağ asitleri genellikle ya bir gliserol molekülüne yada bir sifingozin molekülüne bağlıdır. Gliserol üzerindeki her bir alkol grubuna bağlı yağ asitleri enerji bakımından önemli olan trigliseridleri oluşturmaktadır. Lipaz enzimi tarafından parçalandığında digliserid, monogliserid,

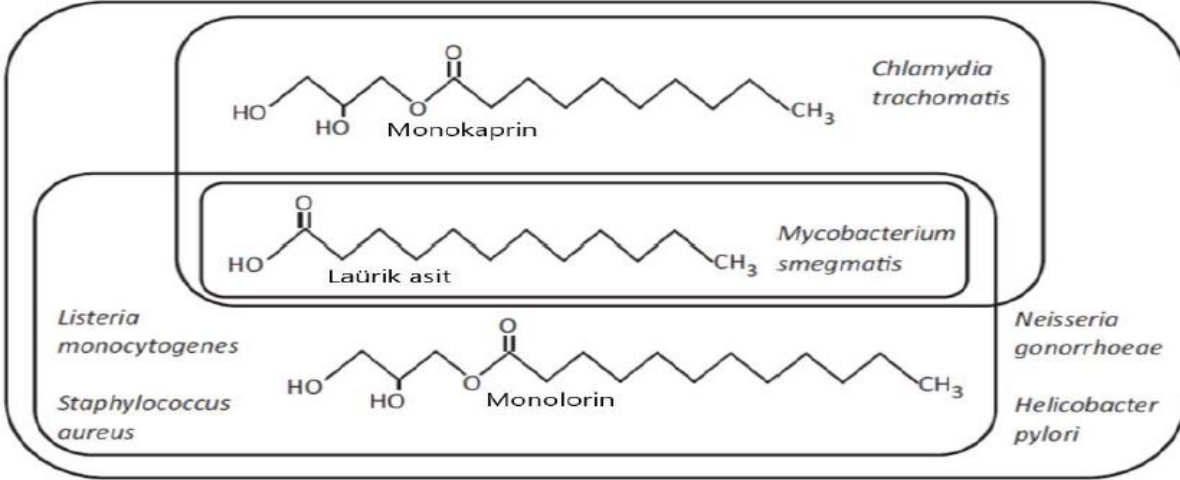
gliserol ve yağ asitleri açığa çıkmaktadır. Yağ asitlerinin sınıflandırılmasında 6 karbondan daha küçük olanlar kısa zincirli, 7-12 karbon arası olanlar ise orta zincirli, 13 ve daha fazla sayıda karbon zinciri içeren yağ asitleri ise uzun zincirli olarak tanımlanır [35]. Karbon zincir uzunluğunun yanı sıra karbon zincirinin doyunluk seviyesi de molekülün fiziksel özelliğini etkiler. Doymuş yağ asitleri karbon zincirinde çift bağ içermeyenlere denir. Eğer tek bir doymamış çift bağ varsa tekli doymamış yağ asitleri, daha fazla ise çoklu doymamış yağ asitleri denir. Çift bağın birden fazla olması geometrik ve konfüğural izomerlerin (*cis* veya *trans* izomerler) açığa çıkmasına sebep olur. İki molekülün arasındaki fiziksel özellikler oldukça farklıdır. *Trans* form molekülü daha düz yaparken *cis* form molekülü bükülmüş hale getirmektedir. Bu durum molekülün paketlenmesini engeller ve erime sıcaklığını düşürür.

Yağ asitleri karboksil grubuna bağlı doymuş veya doymamış karbon zincirlerinden oluşan amfifilik moleküllerdir. Karboksil grup hidrofilik, karbon zinciri kısım ise hidrofobiktir. Bu durum non polar ve polar sıvılar arasında bir arayüzde düşük yüzey gerilimleri gibi davranır. Yağ asitlerinin sudaki çözünürlüğü non polar karbon zincirinin uzunluğu ile belirlenir. Uzun zincirli olan yağ asitleri daha az çözünürdür. Doğal olarak var olan yağ asitleri karbon zinciri çift sayılıdır. Fakat yapay üretilen yağ asitleri karbon zinciri tek olabilmektedir.

Yağ asitlerinin antimikrobiyal mekanizmalarını aydınlatmak için yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Yağ asitlerinin gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal özellikleri incelendiğinde doymuş yağ asitleri içerisinde laurik asit en fazla antimikrobiyal potansiyele sahipken doymamış yağ asitleri içerisinde ise linoleik ve linolenik yağ asitlerin en fazla antimikrobiyal aktivite potansiyeli gösterdiği rapor edilmiştir. [36].

Yağ asitlerinin bakterilere karşı olan etkinliği kültür besiyeri bileşenleri, pH ve sıcaklık gibi faktörler tarafından etkilenmektedir. Yağ asitlerinin antimikrobiyal mekanizması 10 mM araşidonik asit ile muamele edilen *N. gonorrhoeae* ve *Haemophilus influenzae* türlerinde iç ve dış mebranların ayrımı, hücre şeklinin kaybı, hücre yıkımı ve organizasyon bozukluğu gibi sonuçlar açığa çıkmaktadır [37]. Bu durum yağ asitlerinin ve monogliseritlerin amfifilik doğasından kaynaklanmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda yağ asitleri bakteri bakterilerin mebranlarındaki lipidlerin çözünmesini kolaylaştıran bir deterjan gibi davranmaktadır. Bu durum hücrenin liziz olması anlamına gelmektedir. Bakteriyel lipit tabakası üzerinde florasan mikroskopi ile inceleme yapıldığında laurik asit, lauril sülfat ve kaprik asit tübül oluşturduğu, lauril sülfat ve monolaurin

tamamen fosfolipit tabakayı çözdüğü, monokaprin ise tübüllere veya tomurcuklanmaya sebep olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre hiçbir yağ asiti aynı karbon sayısına sahip olsa bile bakteriyel mebranları aynı mekanizma ile parçalamaz [38]. Ayrıca yağ asitleri evrensel olarak bulunabilirliğinden dolayı, doğal yollarla vücudumuzda yıkılabilmesi, ucuz olması gibi etkenlerden dolayı polimerik materyallerin sentezlenmesi için akademik ve endüstriyel uygulamaların ilgi odağıdır. Bitkisel kaynaklı yağ asiti polimerleri (VOBP) biyomateryal sentezlemede oldukça ilgi odağıdır. Bitkisel yağlar (ayçiçeği, pamuk, mısır) çeşitli kaynaklardan elde edilebildiğinden dolayı çeşitli polimerlerde sentezlenebilmektedir. Karbonhidrat ve protein gibi diğer temelli polimerler ile karşılaştırıldığında bitkisel temelli polimerler miçel oluşturabilme ve hidrofobik yapıları bol miktarda bulundurma özelliklerinden dolayı daha ilgi çekici olduğu bilinmektedir.



**Şekil 1.7:** Laurik asit ve mololaurin yağ asitinin çeşitli bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi [35]

Uzun hidrofobik zincirler ve büyük hidrofobik gruplar misel yapıların bozulmadan kalmasında yardımcı olurlar ve çevreye karşı ilaç bileşenlerini korurlar [39]. Hidrofobik merkez ve hidrofilik dış kabuk biyobozunur olduğu ve toksik olmadığı için hidrofobik polimer üzerine araştırmacıların çoğu doğal biyomateryallere odaklanmaktadır [40].

Sülfatitler ise özellikle hücrelerin birbirlerini tanımada, yapışmada rol alan glikozaminoglikan gruplarında (hyaluronik asitler, heparin/heparin sülfatlar, kontrotin/dermatan sülfatlar, keratan sülfatlar) yer alarak onlara çeşitli biyolojik özellikler kazandırdıkları için oldukça önemlidir. Bu

nedenle sülfatit temelli polimerlerin sentezlenmesi kanser hücrelerinin yapışmasını engellemekten hücreler arası boşluk doldurmaya kadar pek çok uygulaması mümkün olacaktır [41].

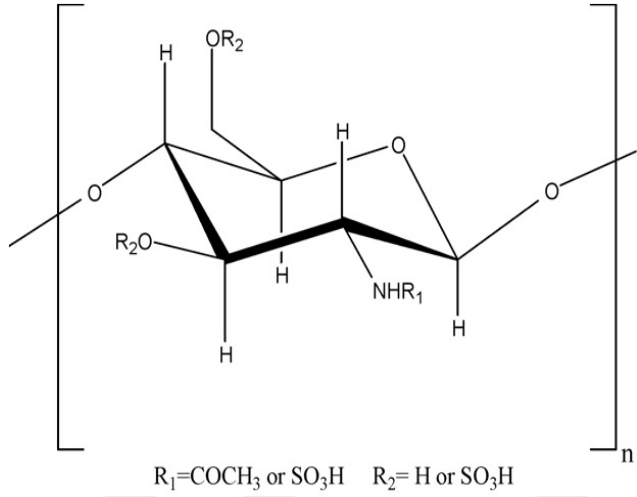
### **1.2.3 Kitosan sülfat polimerleri ve kanser tedavisi**

Kitosan doğal yollarla yıkılabilen, vücudumuza uyum gösteren, toksik özelliği olmayan bilinen en iyi polimerlerden birisidir [42]. Bu bakımdan kitosan pek çok polimer sentez çalışmalarının odağı hükmündedir. Yağ asitleri ve monogliseritlerin bakterilere karşı öldürücü etkilerini ifade etmektedir (Çizelge 1.3) [35]. Bilim insanları bu doğal polimerleri kullanarak onlarda küçük değişiklikler yapmak suretiyle pek çok yeni polimerik bileşikler sentezlemişlerdir. Bunlardan biriside sülfat kullanılarak yapılan modifikasyonlardır. Kitosanın kimyasal modifikasyonunda yeni biyolojik moleküller oluşturmak için sülfatın kullanılması ilgi odağıdır. Çünkü sülfat ile yapılan kimyasal modifikasyon kitosanın temel kimyasal ve iskeletsel yapısında değişiklik meydana getirmediğinden kullanılması oldukça avantajlıdır. Bu sayede kullanıma elverişli yeni biyolojik malzemeler sentezlenmektedir. Sülfat kullanılarak modifiye edilen kitosanın metal iyonlarının adsorplanmasından, ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine, kan ve doku uyumluluğuna ve antibakteriyel alanlar olmak üzere pek çok kullanımı bulunmaktadır [43, 44]. Kitosanın amino ve hidroksil gruplarının spesifik kimyasal modifikasyonları farmasotik uygulamalar için yeni ürünler oluşturabilir. Çünkü doğal kan çökmesini engelleyen heparinin en yakın yapısal analogu gibi davranan sülfatlanmış kitosanın yapısı anti-viral aktiviteler ve antisclerotic veya antikoagülant aktivitenin biomoleküler mekanizmasını gösterir. Çok fonksiyonlu polisakkaritlerin sülfantasyon reaksiyonları polimer zincirlerinde yapısal heteronije oluşturması kaçınılmazdır. Dolayısıyla bu durum bir belirsizliğe sebep olmaktadır. Fakat bu rast gelelik bazen de önemli bir karakter oluşmasına sebep olabileceği için de avantajlı olabilmektedir [45].

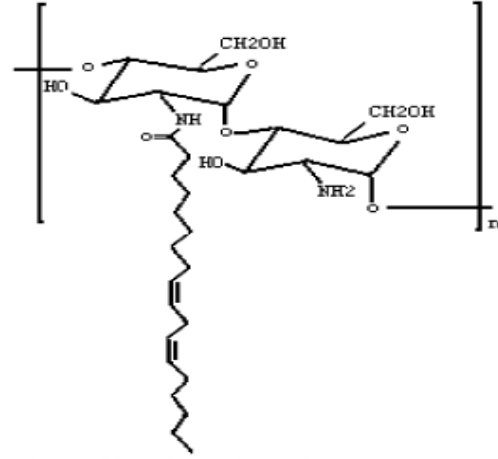
**Çizelge 1.3:** Yağ asitleri ve monogliseritlerin bakterilere karşı öldürücü etkileri [35]

Organizma	En etkili yağ asitleri ve monogliseridleri	Bakteri öldürme gösteren log azaltma test sonuçları
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Kaprik asit	5 dk için 20 mM
	Laürik asit	10 dk için 10 mM
	Monokaprin	5 dk için 5mM
<i>Helicobacter pylori</i>	Laürik asit	1 saat için 1 mM
	Monokaprin	1 saat için 1 mM
	Monolaürin	1 saat için 1 mM
	Monokaprilin	1 saat için 5 mM
	Laürik asit	40 dk için 1 mM
	Linolenik asit	40 dk için 0.5 mM
	Monolaürin	40 dk için 0.5 mM
	Monomiristin	40 dk için 0.9 mM
	Laürik asit	10 dk için 1.25 mM
	Palmitoleik asit	10 dk için 1.25 mM
	Monokaprin	1 dk için 1.25 mM
	Monolaürin	1 dk için 1.25 mM
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Laürik asit
Linolenik asit		24 saat için 10µg/ml
Monolaürin		24 saat için 10 µg/ml
		24 saat için 20µg/ml
		24 saat için 10µg/ml
		24 saat için 10µg/ml
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Laürik asit	24 dk için 0.2 mM
	Miristik asit	20 dk için 0.2 mM
	Palmitoleik asit	20 dk için 0.2 mM
	Oleik asit	20 dk için 0.1 mM
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Laürik asit	1 dk için 2.5 mM
	Palmitoleik asit	1 dk için 2.5 mM
	Monokaprin	1 dk için 2.5 mM
	Monolaürin	1 dk için 2.5 mM
	Miristoleik asit	2 dk için 0.5 mM
	Palmitoleik asit	2 dk için 0.5 mM
	Linolenik asit	2 dk için 0.5 mM
	Monokaprin	2 dk için 0.5 mM
<i>Staphylococcus aureus</i>	Laürik asit	24 saat için 0.25 mM
	Monolaürin	24 saat için 0.25 mM





**Şekil 1.8:** Kitosan sülfatın kimyasal yapısı [45]



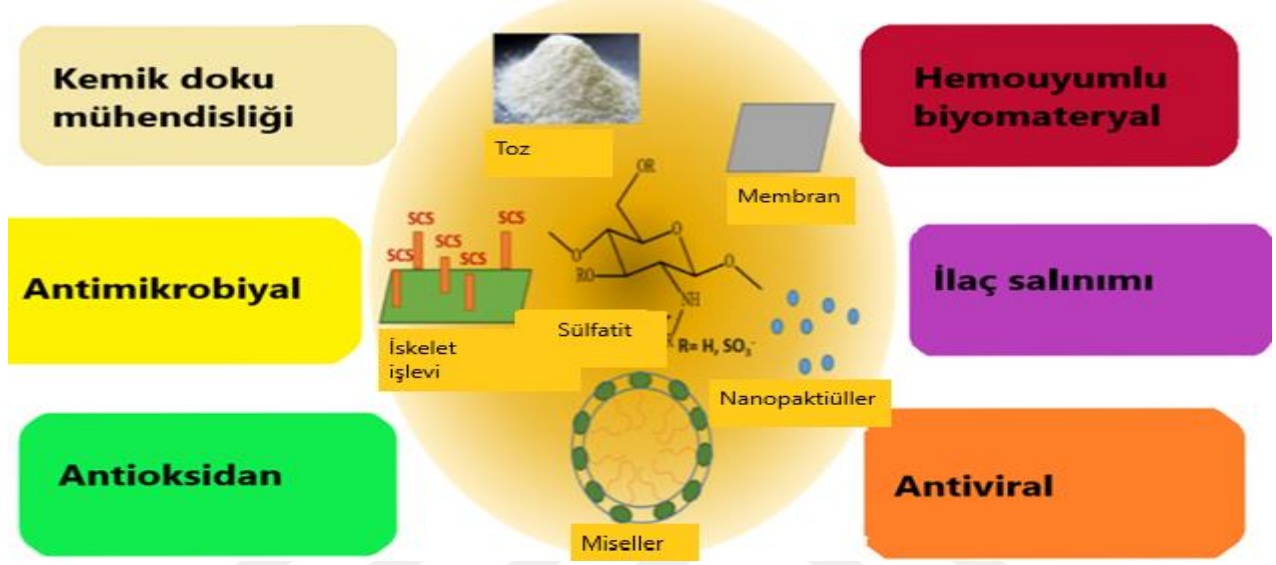
**Şekil 1.9:** Lineloik asit ile sentezlenmiş kitosanın yapısı [46]

Sulfonat grupları serbest amino grupları üzerine doğrudan eklenerek sulfamate ürünlerinin ( $-NH-SO_3^-$ ) açığa çıkmasını sağlarken, sulfonat grupları içeren ( $R-SO_3^-$ ) bileşikler aracılığı ile eklenmesi sulfonat ürünlerin ( $-NH-R-SO_3^-$ ) açığa çıkmasına sebep olur. Sülfonasyon reaksiyonu hidroksil grupları üzerinde olması sülfatit ürünlerin ( $-O-SO_3^-$ ) olduğunu gösterir [47].

3-O-Sulfogalactosylceramide (3-sulfatide) insan beyni ve diğer dokulardan ilk izole edilen sulfolipiddir. 3-Sulfatit sinir sistemi, bakteriyal enfeksiyon ve immün sistem gibi pek çok biyolojik fonksiyonlara sahiptir. 3-Sulfatit laminin, trombospondin, antistatin ve insan immün sistem yetersizliğine sebep olan HIV-1 gibi pek çok proteinle etkileşim göstermektedir. 3-Sulfatit kanser hücrelerinin yüzeyi üzerine kan dolaşımında bulunan selektin proteinleri için doğal bir ligand gibi hizmet etmektedir. Selektin proteinleri ise metastaz için kolaylaştırıcı fonksiyonu vardır. Yapılan bir araştırmada 3-Sulfatit ile muamele edilen karsinoma hücrelerini lamin ve vitronektin proteinlerine bağlanması incelendiğinde metastaz potansiyelini azalttığı görülmüştür. Kötü huylu tümör hücrelerinin başlangıç tümörden farklı bölgelere yayılması çoğalmayı, istila etmeyi, göçü, yapışmayı içeren karmaşık bir süreçtir [48].

Metastatik göğüs kanserlerinde endotel hücre bölünmesi ve yeni damar yollarının oluşumu heparin bağımlı büyüme faktörleri ile ilişkilidir. Düşük afiniteli reseptör olan heperan sülfat (HS) ile fibroblast büyüme faktörleri-2 (FGF-2)'nin etkileşimi FGF-2'nin daha yüksek afinite resöptörü tirozin kinaza (FGFR) bağlanması için konformasyonel değişim göstermesi bakımından önemlidir. Bu nedenle HS, FGF-2 ve hücre yüzeyinde vaskular endotel büyüme faktörü (VEGF)

gibi diğer HS bağlı büyüme faktörlerinin düzenli salınımı ve depolanması için önemlidir. Nihai olarak göğüs kanserlerinde kanserin oluşumu süresince HS değişimleri FGF-2 bağlanmasında ve fibroblast büyüme faktörü-resöptörü (FGFR) üçlü kompleks bağlanmasında değişime sebep olur.



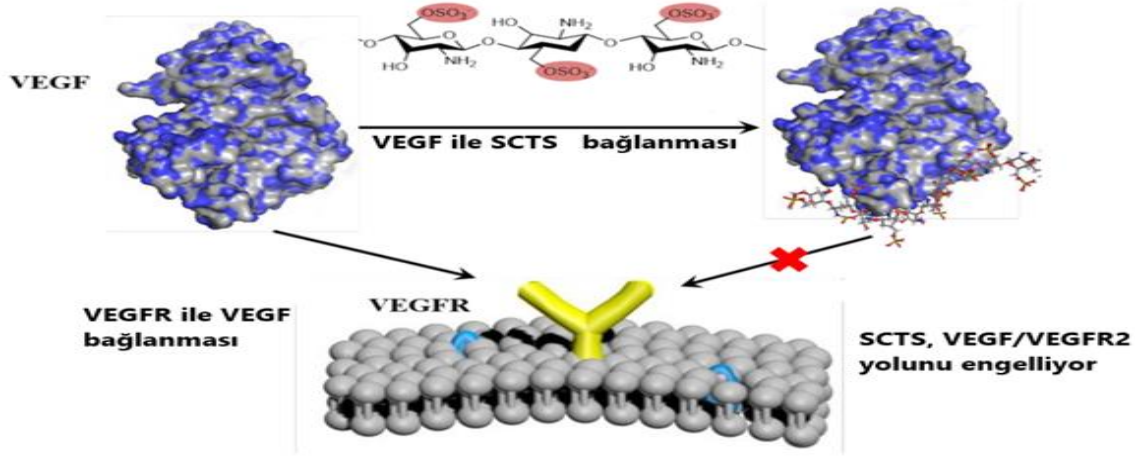
Şekil 1.10: Sülfatlanmış kitosanın kullanım alanlarını göstermektedir [50]

Mundhenke ve arkadaşları [49] sonuçlarına göre doğal sülfatlı polisakkaritler (pentosan polysulphate, tecogalan ve fucoidan) FGF-2 ile bağlanabilir ve FGF-2'nin HS ile etkileşimine engel olurlar ve hücre göçü (metastaz) ve çoğalmasını inhibe edebildiğini rapor etmişlerdir. Patolojik damarlaşma (anjiojenez) tümör büyümesi ve metastaz gibi kompleks hastalıkların gelişiminde rol almaktadır. Damar ağları ile ilişkili tümörleri inhibe etmekle, oksijen, besinler ve metabolizmanın artık ürünlerinin veilmesi engellenebilir. Tümör büyümesi sürecinde kontrolsüz damarlaşma büyüme faktörlerinin salınımı kontrolsüz yeni damar yollarının oluşumuna sebep olmaktadır. Tüm bilinen damarlaşma faktörleri arasında damar endotel büyüme faktörleri (VEGF) yeni damarlaşma oluşumu süresince damar gelişiminin kritik düzenleyicileridirler. Damar endotel büyüme faktör resöptör -2 (VEGFR2) bağlanması ile dimerleşir ve oto fosforile olarak alt kademedeki sinyal yolağını başlatır ve bu durum nihai olarak tümör damarlaşmasına, damar geçirgenliğinde artışa, hücre çoğalmasına ve göçe sebep olmaktadır. Bu nedenle VEGF/VEGFR2 sinyal yolağının inhibisyonu tümör için yeni damarlaşmanın inhibisyonunda önemli bir çalışma konusu olmaktadır. Klinik olarak ilgili yolağı inhibe eden “bevacizumab” ve

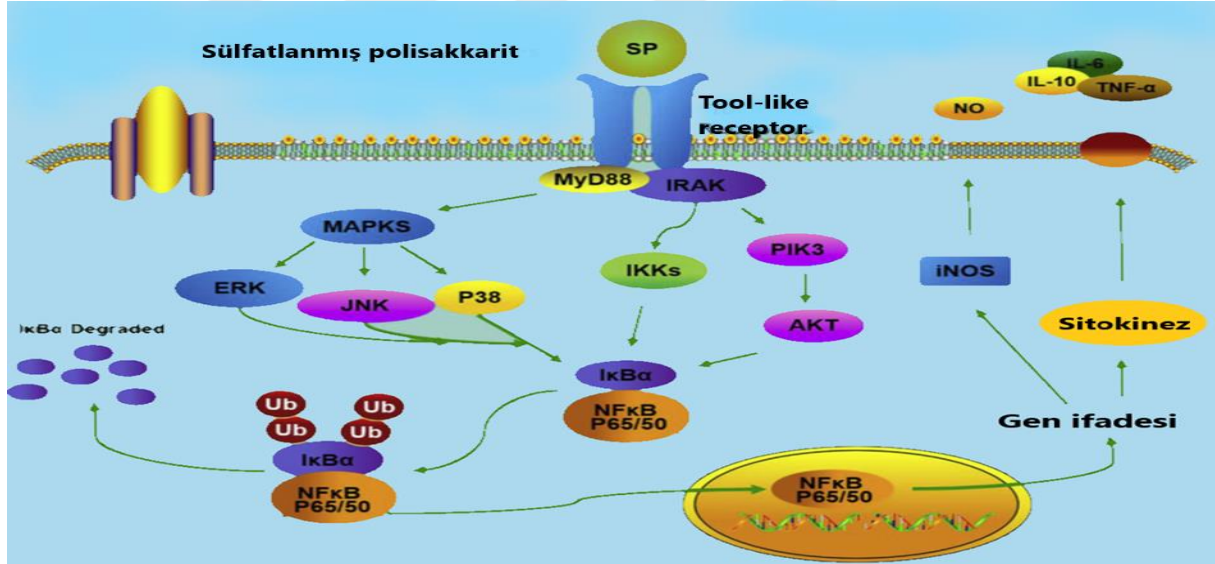
“sorfenib” gibi ilaçlar bulunmaktadır. Fakat pahalı olmaları nedeni ile diğer kullanım alanlarını sınırlandırmaktadır. Bilim insanları bu nedenle daha ucuz ve alternatifleri çok olan ilaçları araştırma eğilimindedirler [51]. Yapısında oldukça sülfat grupları bulunduran heparin uzun süredir antikoagülan ilaç olarak kullanılmaktadır. Antikoagülan özelliğine ek olarak VGFF/VEGFR2 sinyal yolağında inihibe edici bir ajan olduğu bazı deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir [52, 53].

Güçlü antikoagülan özelliğinden dolayı tümör tedavisinde heparinin klinik uygulamaları kısıtlıdır. Bu nedenle araştırmacılar heparinin güçlü antikoagülan özelliğini azaltacak ve VEGF ile daha çok fazla afinite göstermesi bakımından kimyasal modifikasyonlar yapmaktadırlar. Kitosan sülfat grupları eklendikten sonra heparinin aktif birimleri ile birlikte karşılatırıldığında 1,4-β-glukosamin'nin daha çok benzer yapısına sahiptir. Bu nedenle kitosan sülfat yeni damarlaşmayı inihibe etmek ve heparinin yan etkilerini azaltmak için aday olarak gösterilmektedir [51]. Geçen on yıl süresince glikomiks ve glikoproteomiks teknolojilerindeki gelişmelerin bir sonucu olarak anormal hücre yüzey glikolizasyonu hücrel onkogenез ve tümör ilerlemesinin önemli bir belirtisi olarak dikkate alınmaktadır. Kanserin bazı tiplerinde tümör mikroçevresi ve serum glikoproteinleriyle ilişkili olarak kanser hücre yüzey glikoproteinlerinin eş zamanlı olarak değişimleri glikobiyomarker olarak potansiyel göstermektedirler. Aynı zamanda glikolipidler ve glikoamioglikanlarda (GAGs) meydana gelen değişimlerden dolayı tümör ilişkili yüzey antijenleri (TASA) olarak adlandırılmaktadırlar.

C tip transmembran lektinler tümör hücrelerinin endotel hücreler, plateler ve lökositler ile spesifik yapışma etkileşimlerine aracılık etmektedir. Bu lektinler endotel hücrelerinde (E-Selektin) trombosit (platelet) hücrelerinde (P-Selektin) ve lökosit hücrelerinde (L-Selektin) olarak bulunmaktadırlar ve glikoepitoplari ile etkileşim göstermektedirler. Tümör mikroçevresinde (TME) selektinler lökosit gereksinimlerinde, tümör enflamasyonunda ve metastatik potansiyel kazanımıyla ilişkilidir.

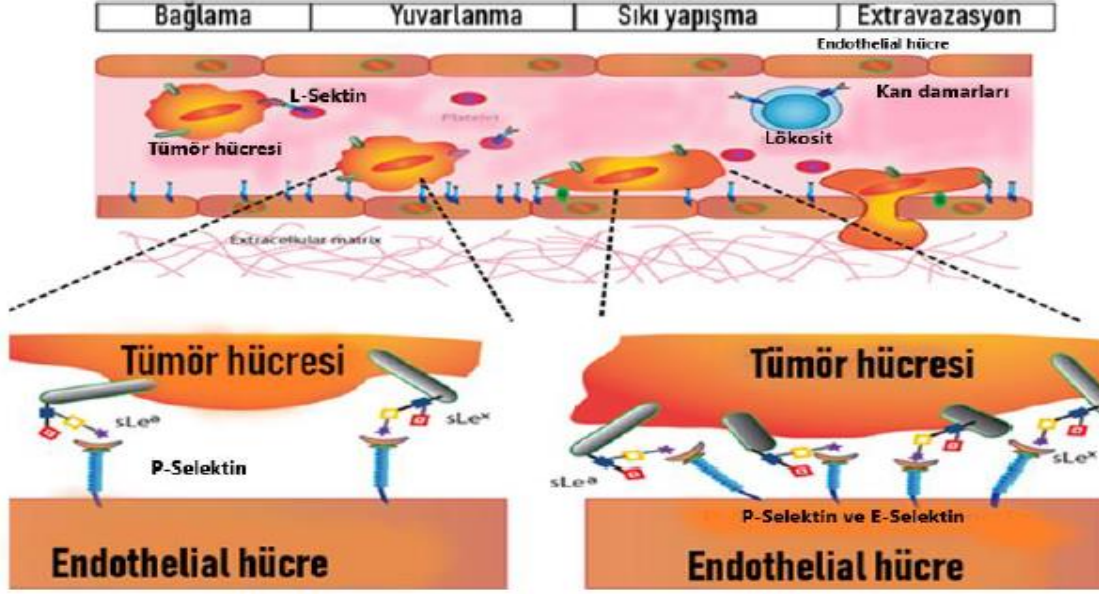


Şekil 1.11: Sülfatit kitosanın VEGF/VEGFR2 yolağı inhibisyon mekanizması [51]



Şekil 1.12: Sülfatit polisakkaritlerin ümmün sistem üzerine etkisi [54]

P-Selektinler (CD62P) tümör büyümesinde ve metastazında rol almaktadır. Çünkü CD62P kanser hücreleri ile plateletler arasındaki etkileşimleri kolaylaştırarak tümörün oluşumuna katkı sağlarlar. E-Selektin (CD62E) de kanser hücre yapışmasında rol almaktadır. L-Selektin (CD62L) ise, tümör lökosit etkileşimlerini düzenler ve hücre yapışmasını ilerletir. Selektinlerin kanserdeki kritik fonksiyonlarından dolayı pek çok araştırmacı selektin –glikan etkileşimlerini bozacak şekilde çalışmalarını sürdürmektedir [55, 56].



Şekil 1.13: Selektinlerin tümör adezyonundaki rolü [57]

Melanoma hücrelerinin kan damarlarına yapışması selektin ve ligandlarının bağlanmasıyla tetiklenmektedir. Bu sonuçlar dış yapılı sülfatitlerin metastazını baskılayabildiğini ileri sürmektedir.

#### 1.2.4 Antikoagülant ajanlar olarak kitosan

Heparin pahalı bir ürün olmasına rağmen kanda çökmeyi önleyici olarak en çok kullanılan bileşiktir. Bu nedenle teşebbüsler yeni sentetik antikoagülantların sentezi üzerine olmuştur. Fakat sentezlenen moleküllerin hiçbirisi heparin kadar az toksik değildir. Selüloz ve nişasta sülfürik asit esterleri toksik olmasına rağmen kitin disülfürik asit daha az toksiktir. Kitosanın sülfatlanmış türevleri heparin gibi yapıların elde edilmesinde en önemli uygulamalardan biridir. Kitosandaki sülfür içeriğinin artmasına bağlı olarak sülfatlanmış kitinin antikoagülant özelliği artmakta olduğunu ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; düşük moleküler ağırlıklı N-carboxymethyl chitosan 3,6-disulfonate heparine benzer antikoagülant özelliği sergilediği ve kana eklendiğinde hücresel yapılar üzerinde hiçbir yan etkinin gözlemlenmediğini rapor eden çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle bu sentezlenen polimer kanı depolamada kullanışlı olabilir [48, 58].

### 1.2.5 Metal iyonlarının absorblanması

Kitosan türevlerinin büyük bir bölümü kitosanın temel iskeleti üzerine yeni fonksiyonel grupların bağlanmasıyla metal iyonlarını absorblamada önemli rol oynamaktadır. Yeni fonksiyonel grupların kitosan ile birlikte bağlanmasından çeşitli amaçlar düşünülmektedir;

1. Bağlama bölgelerinin yoğunluğunu artırmak.
2. Metal bağlanması için pH aralığını değiştirmek
3. Hedef metaller için bağlanma seçiciliğini artırmaya yönelik bağlanma bölgelerini değiştirmek olarak sıralanabilir. Kitosan üzerine sülfür bileşenlerinin eklenmesi şelatlayıcı kitosan bağlı resinlerin tasarımları için pek çok çalışmaların konusudur. Bu şekilde sülfatlanmış türevler civanın geri kazanılması ve özel metallerin tutulması için başarılı şekilde test edilmiştir. Bu durum metal iyonları için sülfür bileşiklerinin şelatlayıcı afinitesine dayanmaktadır.

Asidik çözeltilerde metal iyonları için bağlanma kapasitesini arttırmak için kitosana sülfonik gruplar da ilave edilmektedir. Furan halkası üzerine bir sülfonik asit grubunun varlığı;

1. Çözünürlüğü arttırdığı
2. Çoklu amfolit davranış sergilediği
3. Şelatlama kapasitesini etkilediği
4. Biyolojik aktivitesi gibi parametrelerde etkili olduğu bilinmektedir.

*N*-sulfofurfuril kitosanın metal şelatlama gücü sırasıyla  $Cu(II) > Pb(II) > Ni(II) > Cr(III) > Co(II)$ 'dır. *N*-sulfofurfuril kitosan metal iyonlarının uzaklaştırılması için en etkili bileşendir [59]. Diğer doğal polimerler ile kitosan kıyaslandığında kitosanın şelatlama yeteneğinin daha etkili olduğu bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür [5, 60]. Doğal olarak bulunan polimerlerden selüloz, agar, agaroz, aljinik asit, dekstran, karagenan yine doğal bir polimer olan kitosan ile karşılaştırıldığında kitosan bazik bir polimer iken diğerleri asidik polimerlerdir. Bu nedenle kitosanın bazik olması diğer bahsi geçen asidik polimerlere göre bazı avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlardan biri metal iyonlarını şelatlayıcı özelliği kazandırmasıdır [5].

### 1.2.6 Antimikrobiyal ajanlar

Eşsiz polikasyonik doğasından dolayı kitosan ve onun türevleri antimikrobiyal ajanlar olarak da kullanılmaktadır. Kitosanın fungal büyümesini inhibe ettiğini rapor eden çalışmalar

bulunmaktadır. Bu durum kitosanı potansiyel olarak moleküler ağırlık bağımlı antifungal bir ajan yapar. Ek olarak günümüz çalışmalarının kitosan ve onun türevlerinin mikroorganizmalara karşı antagonistik etkisi besin endüstrisinde çeşitli endişelere sebep olmaktadır. Ayrıca bu materyallerin antimikrobiyal besin koruyucusu gibi potansiyel olarak kullanımı da bulunmaktadır. Kitosan ve onun türevleri ile bazı mikrobiyal türlerle (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton violaceum*) yapılan antimikrobiyal çalışmada eklenen grupların yoğunluk ve çeşidi önemli olmakla birlikte pH değişimleri de ayrıca önemlidir. *Staphylococcus aerus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine yapılan antimikrobiyal çalışmada sülfanasyon oranının önemli olduğuna dikkat çeken çalışmalar bulunmaktadır [61].

### **1.2.7 İlaç taşıma uygulamaları**

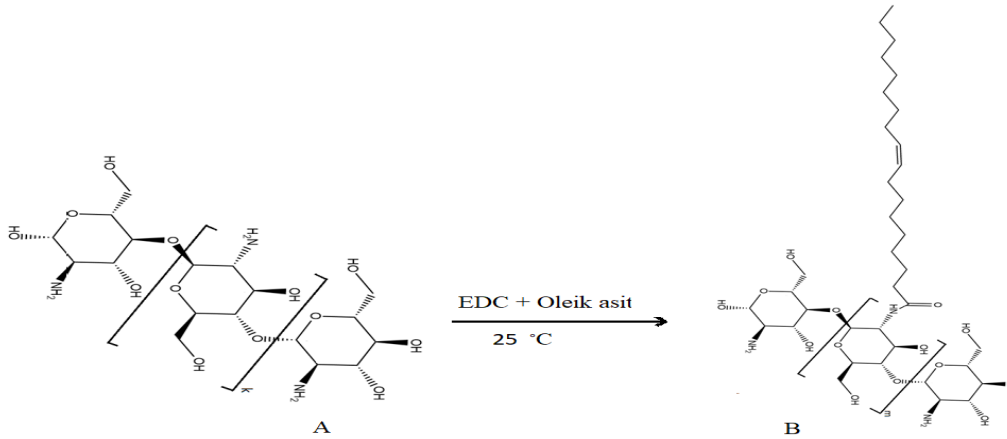
Kitosan çeşitli asitlerin sulu ortamlarında çözünmez ve su içerisinde miçel yapılar oluşturmazlar. N-Alkil-O-sulfatit kitosan uzun zincir alkil gruplarına sahip olmakla birlikte hidrofobik karakter sergilerken sülfat grupları ise hidrofilik karakter sergilemesine neden olur. Bu durum amfoterik olarak bilinmektedir ve su ortamlarında miçel yapıların oluşmasına neden olur ve oluşan miçel hacmi 100-400 nm büyüklüğündedir. Taksol suda çözünmeyen antikanser ajandır. Bu şekilde fiziksel olarak hapsedme ile polimerik miçeller içerisinde çözündürülebilmektedir. Sonuçta N-Alkil-O-sulfatit kitosan miçelleri içerisinde taksol konsantrasyonu su içerisindeki konsantrasyonundan daha fazla olduğu deneysel uygulamalar ile gösterilmiştir. Bu nedenle N-Alkil-O-sulfatit kitosan potansiyel olarak anti kanser ilaç veya sadece ilaç taşımada kullanılabilir [62].

## 2. MATERYAL ve METOT

**EKLER** kısmında kullanılan kimyasallar (**EK-1**), cihazlar (**EK-1**) ve mikroorganizmalar (**EK-2**) verilmiştir.

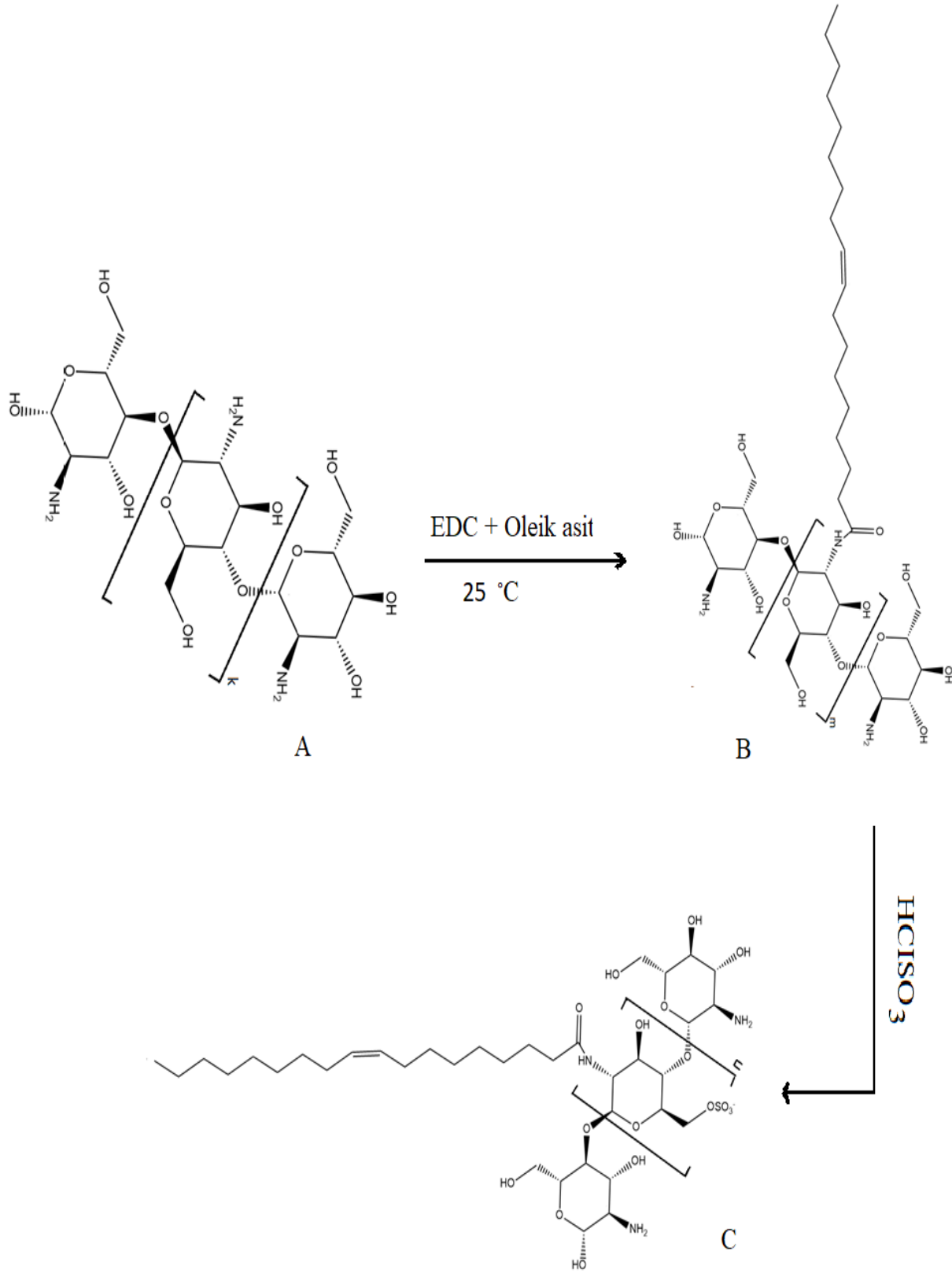
### 2.1 Orta Dereceli Moleküler Ağırlıklı Kitosanın (Cs) Modifikasyonu

1 gram kitosan (medium molecular weight (Sigma ürün kodu: 448877), deasetilasyon derecesi %75-85) %1'lik 100 ml asetik asitte çözüldü (Şekil 2.1 A). Oda sıcaklığında 15 saat süresince karıştırıldı. Üzerine 85 ml metanol eklendi. 0.172 g EDC ve 0.57 ml oleik asit 15 ml metanolde çözüldü ve 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Yağ asiti aktive edildikten sonra (Şekil 2.3) kitosan üzerine damlatma yöntemi ile eklendi. 24 saat oda sıcaklığında reaksiyon devam edildi (Şekil 2.1 B ve Şekil 2.4). Üzerine 40 ml methanol /amonyak (7:3 v/v) karışımı eklendi. Filtreden süzüldü. 10 dk. 5000 g'de +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Sırasıyla metanol dietileter, distile su ile yıkama işlemleri yapıldı (Şekil 2.5 A, B). 5 dk. 5000 g'de +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Üzerine metanol eklendi. Tekrar santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Üzerine dietil eter eklendi. Tekrar santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Pelet distile su ile yıkandı. Santrifüj edildi. 24 saat 30°C'de vakumlu etüvde kurutuldu. Kurutulan örnek daha önceden buz içerisinde soğutulmuş H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve HCISO<sub>3</sub> (1:2 V/V) 45 ml içerisine eklendi. 12 saat oda sıcaklığında karıştırıldı (Şekil 2.2 C). 4 katı soğuk dietileter eklendi ve örnekler çöktürüldü. Liyafilizatörde eksi (-) 60°C'de kurutuldu (Şekil 2.5 C, D) (OlcShCs ile gösterildi) [46, 63-66].

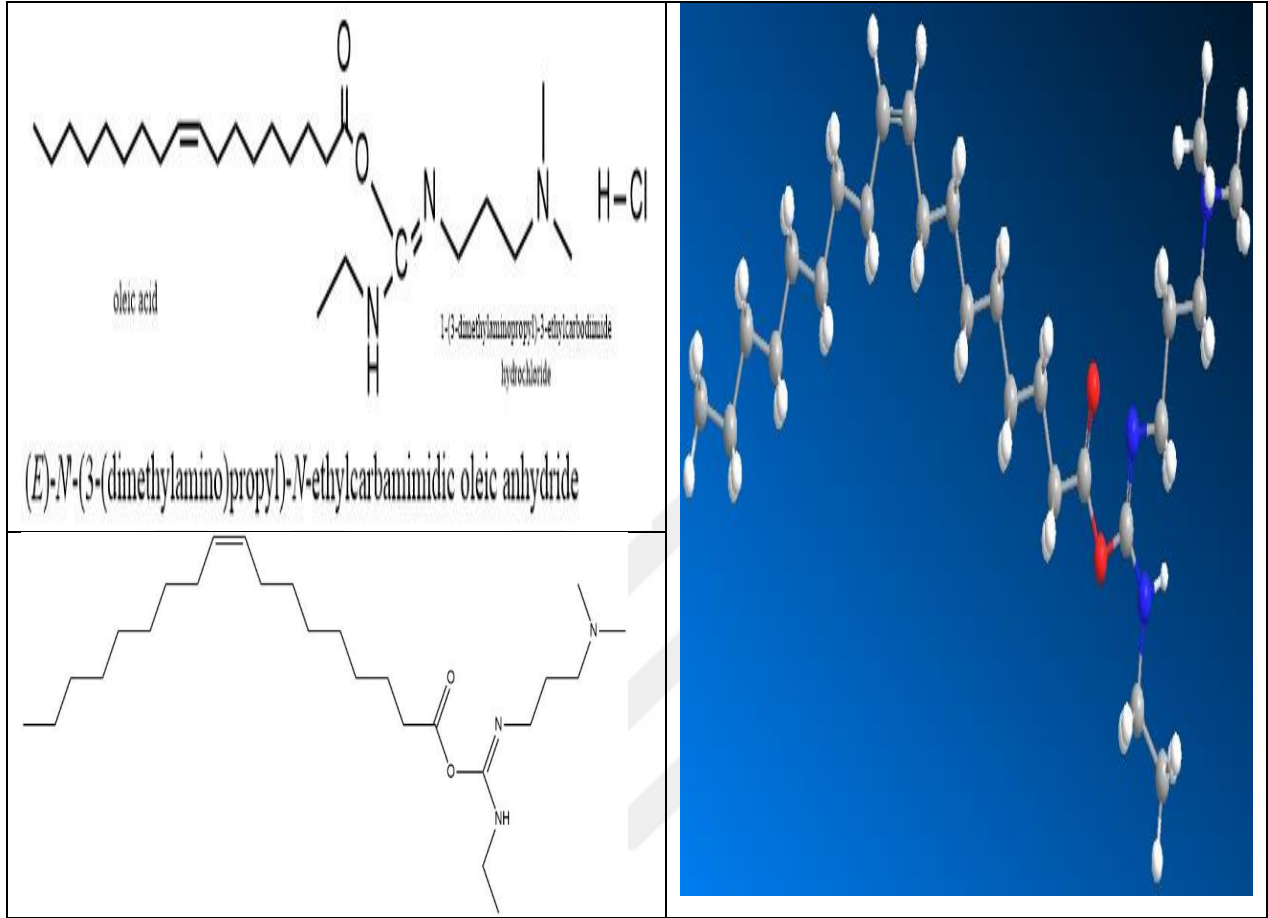


**Şekil 2.1:** Kitosan molekülünün oleik asit ile reaksiyonu

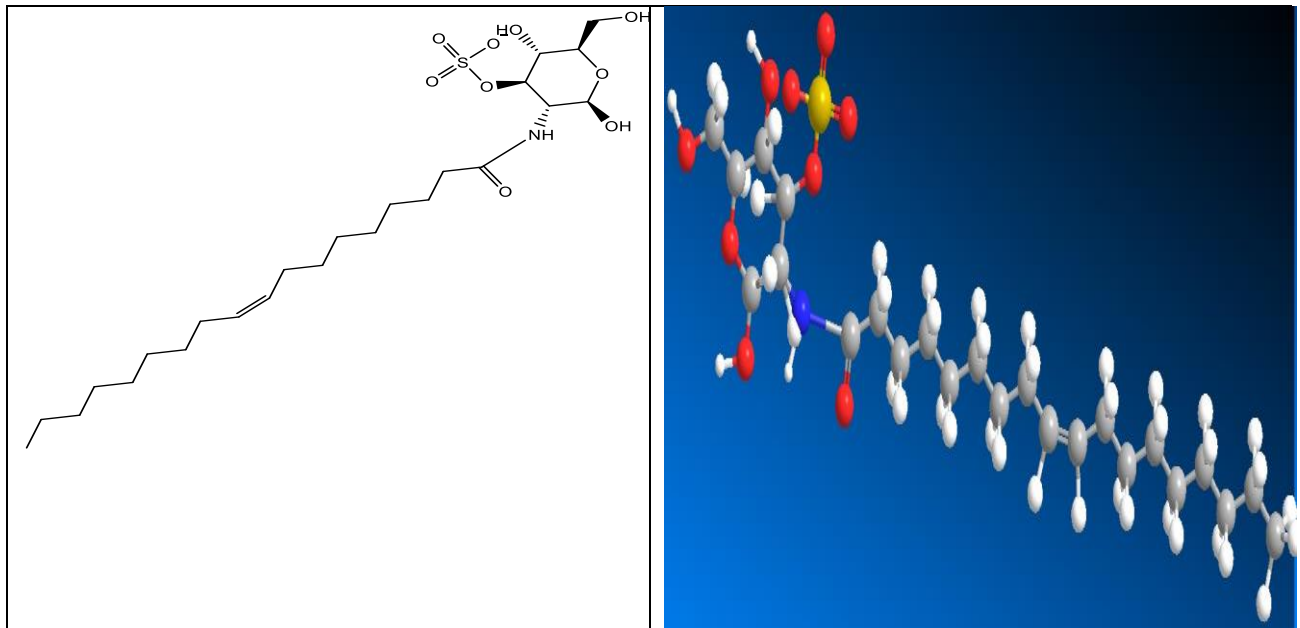




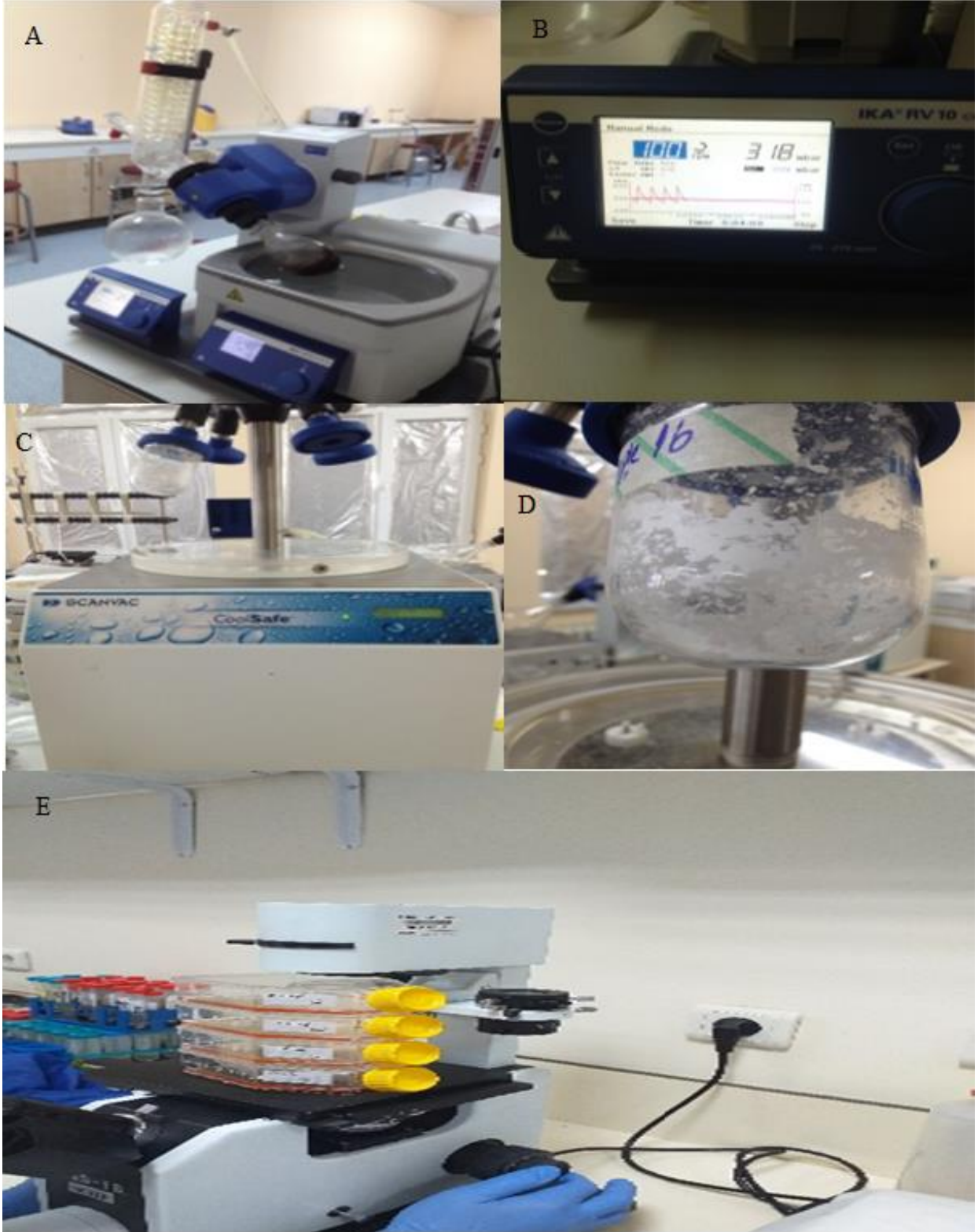
Şekil 2.2: Kitosan ile oleik asit ve sülfatın reaksiyonu



Şekil 2.3: Oleik asit ile EDC molekülünün etkileşimi. 3D yapısı (sağ) (Chemdraw 3D)



Şekil 2.4: Kitosan oleik asit ve sülfatit kompleksi. 3D yapısı (sağ) (Chemdraw 3D)



Şekil 2.5: Sentez aşamasında laboratuvarında kullanılan evaporatör (A, B), liyafilizatör (C, D), sitotoksisite deneylerinde kullanılan hücre kültür laboratuvarı (E)

## 2.2 Modifiye Kitosanın Kimyasal Karakterizasyonu

### 2.2.1 FT-IR analizi

Sentezlenen modifiye kitosan (OlcShCs) IR spektrumu Cumhuriyet Üniversitesi Teknolojik Araştırma Merkez (CÜTAM) Laboratuvarında hizmet alımı karşılığında BRUKER Tenson II marka spektrofotometresi ile FT-IR analizi gerçekleştirildi. 2 mg OlcShCs doğrudan cihaza konularak  $4000\text{ cm}^{-1}$  ile  $400\text{ cm}^{-1}$  aralığında spektrum taraması gerçekleştirildi. Kitosan molekülünün (Cs) FT-IR analizine de bakılarak karşılaştırma yapıldı. OlcShCs molekülünde yeni bağların oluştuğunu gösteren pikler belirlendi.

### 2.2.2 $^1\text{H}$ NMR analizi

$^1\text{H}$  (Hidrojen) NMR analizi için (JEOL (400 MHz) JNM-ECZ400S/L1) kullanıldı. Kitosan ve modifiye kitosan 5 mg miktarı 0.5 ml triflora asetik asit içerisinde çözüldü. İlgili cihazda ölçüm proton analizi gerçekleştirildi.

### 2.2.3 DSC, TGA ve DTA analizi

Kitosan molekülüne yağ açıl zinciri ve sülfat grubunun bağlanmasının termal etkisi SHIMADZU TA60 DSC termal analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. OlcShCs ve Cs örnekleri (3-5 mg) hava geçirmez kapalı alüminyum pan (tava) içerisine konuldu. Nitrojen atmosferi altında sabit  $10^\circ\text{C}/\text{dakika}$  artış oranı ile  $500^\circ\text{C}$ 'ye kadar ısıtıldı. Boş bir alüminyum pan ise referans olarak kullanıldı.

## 2.3 Modifiye Kitosanların Biyolojik Karakterizasyonu

### 2.3.1 Antibakteriyal aktivite

Antimikrobiyal analiz için petri sayma metodu uygulandı. Antimikrobiyal aktivite daha önceki çalışmalarda antimikrobiyal duyarlılık için kullanılmış olan *E. coli* CICC 21524 (gram-), *Bacillus*

*subtilis* ATCC 21332 (gram +), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (gram+) türlerine karşı petri sayma yöntemi kullanılarak test edildi [67]. Her bir bakteri türü için bir tek koloni yaklaşık 10 ml steril Lauril Broth (LB) besiyerinde taze olarak inoküle edildi ve gece boyu 115 rpm çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Elde edilen bakteriyal süspansiyon steril fizyolojik tuzlu su (%0.85 (w/v)) içerisinde seri sulandırma yöntemi ile ortamda  $10^2$ - $10^3$  CFU/ml koloni olacak şekilde (ortalama  $10^6$  kat seyreltme) sulandırmaları yapıldı [68]. Farklı konsantrasyonlarda (%0 (kontrol), %0.01, %0.05, %0,20, %0.50, %1.0 (w/v)) Cs %0.5 (v/v) asetik asit içerisinde hazırlandı. Solüsyonların pH'ı 1M NaOH kullanılarak 5.5'e ayarlandı. Benzer şekilde modifiye kitosan (OlcShCs pH 5.5) örnekleri de hazırlandıktan sonra tüm solüsyonlar 121°C'de 20 dakika otoklav edildi. 50 µl seyreltilmiş bakteriyal solüsyonlardan alınarak steril ependorf tüp içerisine ayrı ayrı konuldu. Üzerine 100 µl Cs ve OlcShCs solüyonlarından da konularak karıştırıldı. LB agar plate üzerine 150 µl inokulum ekim yapıldı. Steril deney tüpleri kullanılarak agar plate üzerine yayma yapıldı. Ters çevrilerek 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Kontrol olarak steril distile su kullanıldı. Büyüyen koloniler sayıldı. Aşağıdaki formül uygulanarak inhibisyon oranları (IR) yüzdelik olarak hesaplandı (Eş: 1).

$$IR (\%) = (N1 - N2) / N1 \times 100 \quad (1)$$

N1: Distile su kullanılarak elde edilen bakterilerin aritmetik ortalama koloni sayısı

N2: Cs ve OlcShCs örneklerinden elde edilen bakterilerin aritmetik ortalama koloni sayısı [69].

### 2.3.2 Antifungal aktivite

Antifungal analiz için petri sayma metodu uygulandı. Antifungal aktivite daha önceki çalışmalarda antifungal duyarlılık için kullanılmış olan *Candida albicans* ATCC 60193 türüne karşı petri sayma yöntemi kullanılarak test edildi [67]. *Candida albicans* türü için bir tek koloni yaklaşık 10 ml steril LB besiyerinde taze olarak gece boyu 37°C'de 115 rmp çalkalamalı su banyosunda çoğaltıldı. Elde edilen bakteriyal süspansiyon steril fizyolojik tuzlu su (%0.85 (w/v)) içerisinde seri sulandırma yöntemi ile ortamda  $10^2$ - $10^3$  CFU/ml koloni olacak şekilde (genel olarak  $10^{10}$  kat seyreltme) sulandırmaları yapıldı [68]. Farklı konsantrasyonlarda (%0 (kontrol), %0.01, %0.05, %0,20, %0.50, %1.0 (w/v)) Cs %0.5 (v/v) asetik asit içerisinde hazırlandı.

Solüsyonların pH'ı 1M NaOH kullanılarak 5.5'e ayarlandı. Benzer şekilde modifiye kitosan (OlcShCs pH 5.5) örnekleri de hazırlandıktan sonra tüm solüsyonlar 121°C'de 20 dakika otoklav edildi. 50 µl seyreltilmiş solüsyonlarından alındı. Steril ependorf tüp içerisine ayrı ayrı konuldu. Üzerine 100 µl Cs ve OlcShCs solüyonlarından da konularak karıştırıldı. LB agar plate üzerine 150 µl inokulum döküldü ve steril deney tüpleri kullanılarak agar plate üzerine yayılarak ekim yapıldı. Ters çevrilerek 37°C'de gece boyu inkübe edildi ve kontrol olarak steril distile su kullanıldı. Büyüyen koloniler sayıldı. Aşağıdaki formül uygulanarak inhibisyon oranları (IR) yüzdelik olarak hesaplandı (Eş: 2).

$$IR (\%) = (N1 - N2) / N1 \times 100 \quad (2)$$

N1: Distile su kullanılarak elde edilen *Candida albicans* türünün aritmetik ortalama koloni sayısı

N2: Cs ve OlcShCs örneklerinden elde edilen *Candida albicans* türünün aritmetik ortalama koloni sayısı [69].

### 2.3.3 Antikanser aktivite

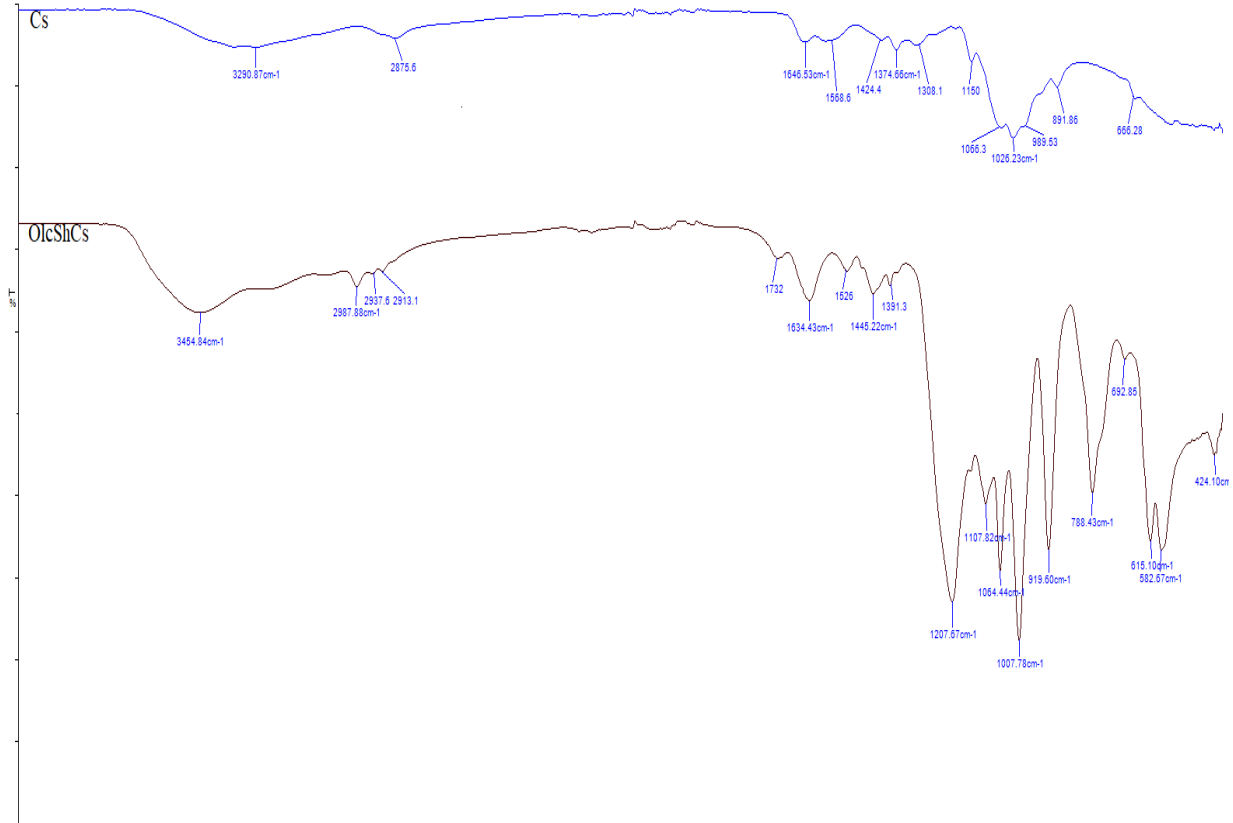
Canlı kanser hücrelerinin sayısı MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrasodium bromide) testi ile belirlendi [70]. İlgili kanser hücreleri MTT moleküllerini parçalar ve renkli farmozon kristalleri oluştururlar. HeLa (ATCC® CCL-2™) hücre hattı sırasıyla %10 (v / v) fetal bovine serum (FBS), 100 Unit/ml Penicillin ve 100 µg/ml Streptomycin içeren DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (ATCC® 30-2002™) içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe çoğaltıldı. HeLa hücreleri %70-80 büyüme oranlarına ulaşmaya kadar pasaj edildi (Şekil 2.5 E). Daha sonra 10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-well plate içerisine ekildi. 24 saat hücrelerin yüzeye tutunması için bekletildi. 10-1000 µg/ml OlcShCs örnekleri ile HeLa hücre hattı 24, 48, 72 saat süresince etkileştirildi. 5 mg/ml konsantrasyonuna sahip 10 µl MTT solüsyonu her bir well içerisine eklendi ve 2 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübasyona bırakıldı. Daha sonra MTT ve medium aspire edildi. 100 µl DMSO eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika karıştırılarak inkübe edildi ve 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Her bir örnek 3 kez okuma ile tekrar edildi ve en az 3 farklı pasaj için test edildi. Absorbans değerleri kullanılarak her bir örnek için GraphPad Prism7 aracılığı ile IC50 değerleri tespit edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Cs ve OlcShCs Örneklerinin Kimyasal Karakterizasyonu

##### 3.1.1 Cs ve OlcShCs örneklerinin FTIR analizi

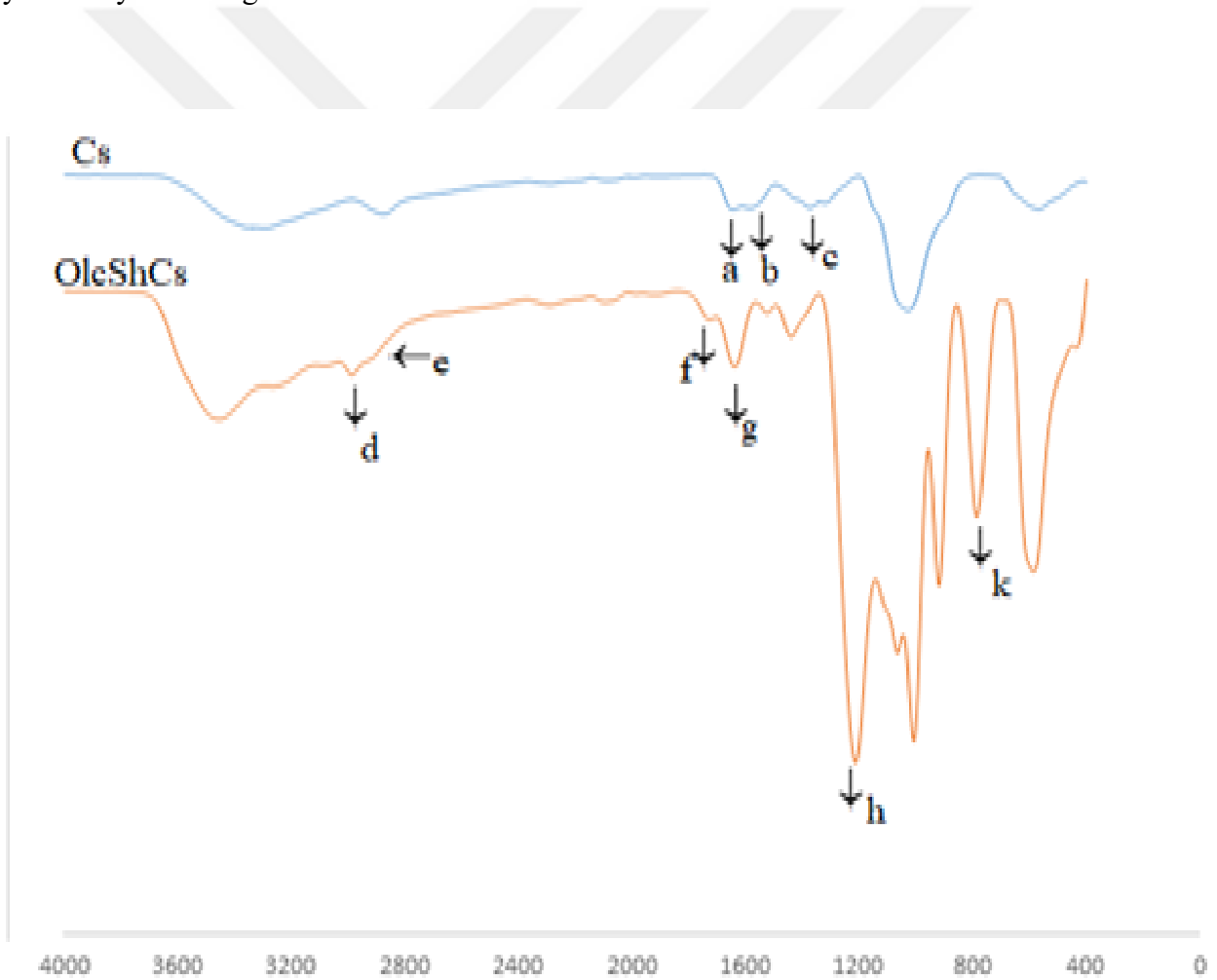
Kitosan ve modifiye kitosanın fonksiyonel gruplarını değerlendirmek için FT-IR analizi kullanıldı. Şekil 3.1 ve 3.2’de Cs ve OlcShCs’nin FT-IR spektrum sonuçlarına bakıldığında Cs’nin spektrumları;  $3280\text{ cm}^{-1}$ ,  $2876\text{ cm}^{-1}$ ,  $1646\text{ cm}^{-1}$ ,  $1568\text{ cm}^{-1}$  ve  $1374\text{ cm}^{-1}$ ,  $1150\text{ cm}^{-1}$ ,  $1026\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarında keskin pikler açığa çıktığı görülmektedir. Modifiye kitosan (OlcShCs) için bu değerler ise  $2987\text{ cm}^{-1}$ ,  $1732\text{ cm}^{-1}$ ,  $1634\text{ cm}^{-1}$ ,  $1526\text{ cm}^{-1}$ ,  $1445\text{ cm}^{-1}$ ,  $1207\text{ cm}^{-1}$ ,  $1026\text{ cm}^{-1}$ ,  $1107\text{ cm}^{-1}$ ,  $1007\text{ cm}^{-1}$ ,  $919\text{ cm}^{-1}$ ,  $788\text{ cm}^{-1}$  dalga boylarında keskin pikler açığa çıktığı görülmektedir.



Şekil 3.1: Cs ve OlcShCs örneklerinin FTIR analizi

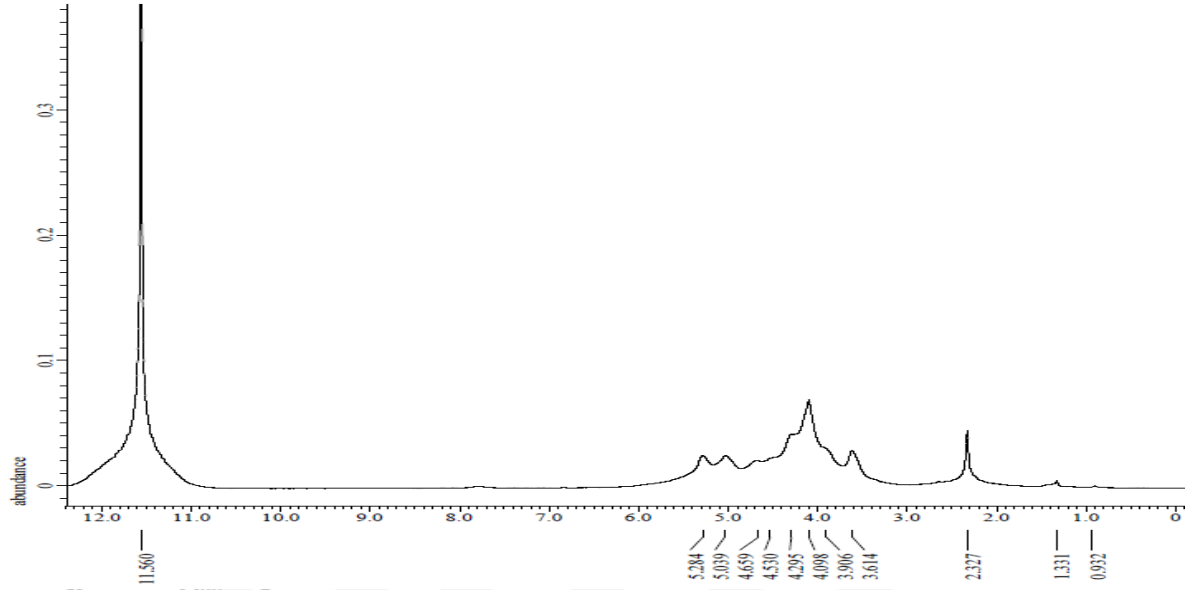
### 3.1.2 H NMR analizi

H1 NMR analiz sonucuna bakıldığında (Şekil 3.3) Cs için 11.5 ppm, 2.4 ppm, 3.6 ppm, 3.8-4.5 ppm, 5.0 ppm, 5.2 ppm bölgelerinde spektrum pikleri açığa çıktığı anlaşılmaktadır. OlcShCs için bakıldığında (Şekil 3.4) Cs için açığa çıkan spektrum piklerine ek olarak 1.4 ppm noktasında da pik yine görülmektedir. Kitosan ile modifiye kitosanın H<sup>1</sup> NMR sonuçları üst üste çakıştırıldığında (Şekil 3.5) açığa çıkan yeni pik 1.4 ppm noktasında görülmektedir. Ayrıca H<sup>1</sup> NMR (400 Mhz) analiz sonucuna bakıldığında OlcShCs için (Şekil 3.6) 1.4 ppm noktasında pik yine detaylı olarak görülmektedir.

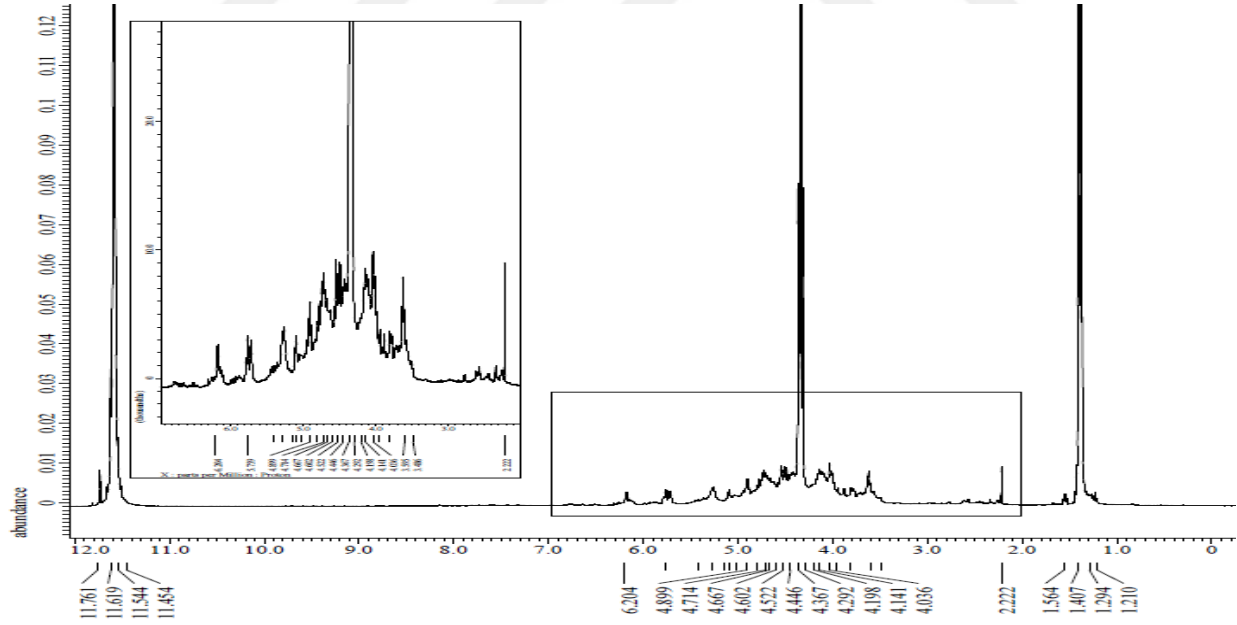


**Şekil 3.2:** Cs ve OlcShCs örneklerinin sadece ilgilenilen piklerin FTIR analizi. a) 1642 cm<sup>-1</sup>, b)1565 cm<sup>-1</sup>, c)1372 cm<sup>-1</sup>, d)2986 cm<sup>-1</sup>, e)2904 cm<sup>-1</sup>, f)1732 cm<sup>-1</sup>, g)1634 cm<sup>-1</sup>, h)1207 cm<sup>-1</sup>, k)782cm<sup>-1</sup>

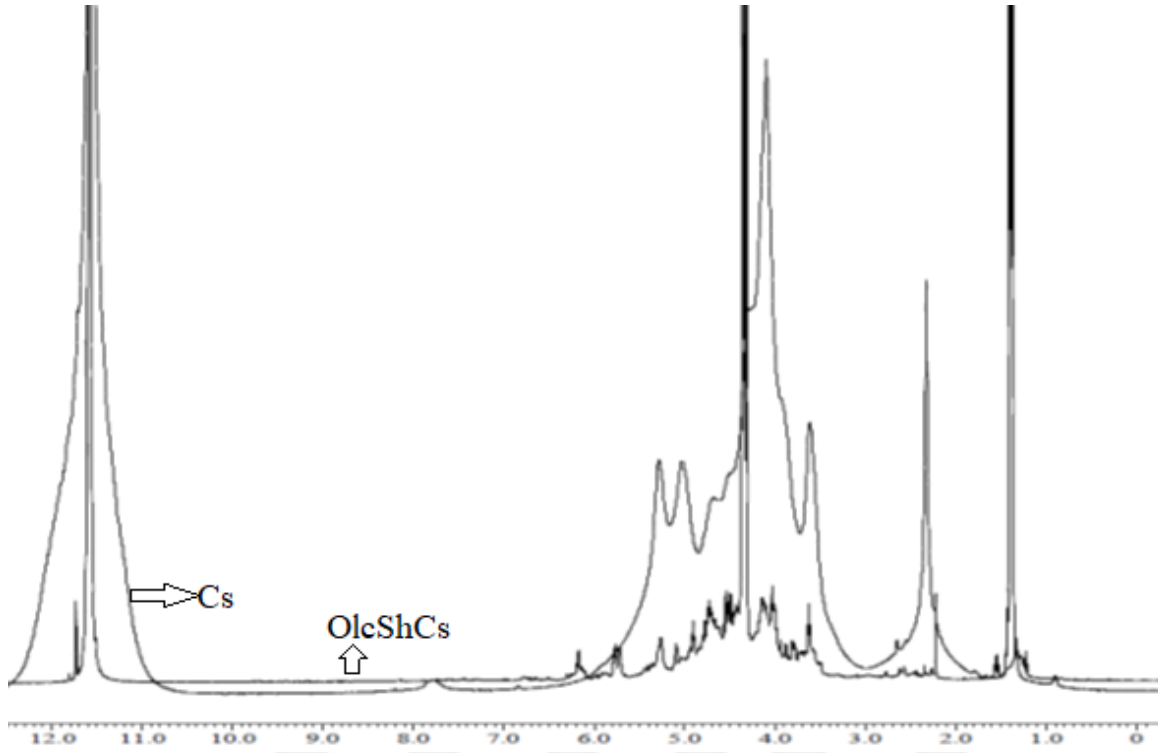




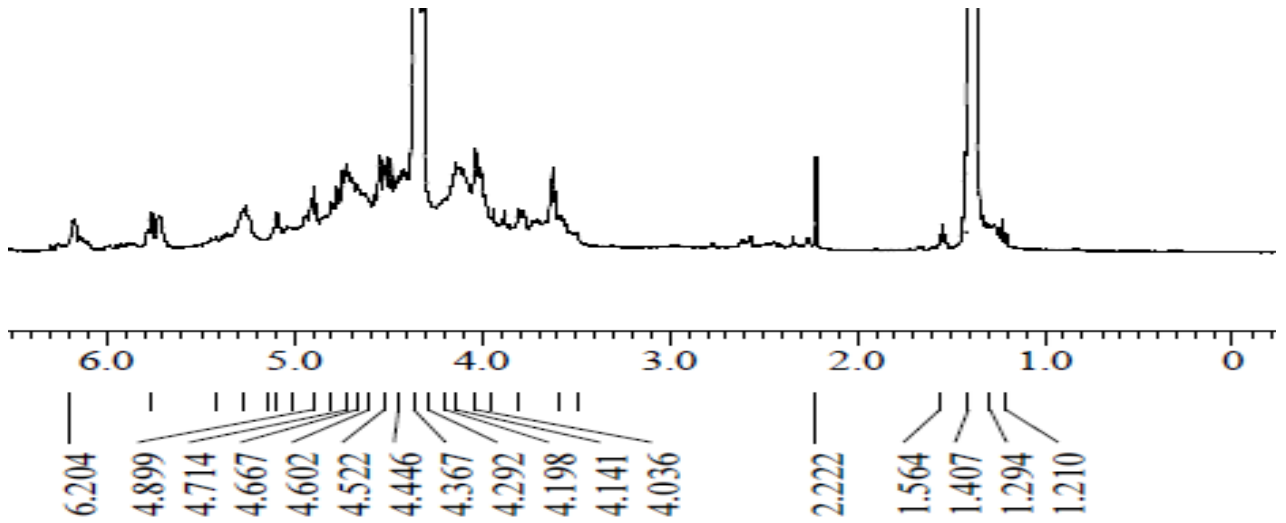
Şekil 3.3: Kitosanın (Cs)  $H^1$  NMR (400 MHz) analizi



Şekil 3.4: Modifiye kitosanın (OlcShCs)  $H^1$  NMR (400 MHz) analizi



Şekil 3.5: Cs ve OlcShCs'nin  $\text{H}^1$  NMR elle karşılaştırma analizi



Şekil 3.6: OlcShCs için elde edilen  $\text{H}^1$  NMR odaklanılan bölgenin büyütülmüş analizi

### 3.1.3 DSC, DTA ve TGA analizleri

Cs ve OlcShCs'nin Şekil 3.7'de gösterildiği üzere DSC termogram analizi sonuçlarına bakıldığında hem Cs hemde OlcShCs için bir çift endotermik ve ekzotermik pikler görülmektedir. Kitosanın DSC termogramında 90-100°C aralığında geniş bir endotermik pik görülmektedir. OlcShCs'nin DSC termogramında ise kitosanda olduğu gibi 90-100°C ve 240°C'de küçük ekzotermik pikler bulunmaktadır.

## 3.2 Biyolojik Karakterizasyon

### 3.2.1 Antibakteriyal aktivite

Kitosanın (Cs) *E. coli*'ye karşı antibakteriyal etkisi (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.8) konsantrasyon bağımlı olarak *E. coli*'ye karşı antibakteriyal etki göstermektedir. Çizelge 3.1'de verilen sonuçlara bakıldığında %1'lik kitosan 99.18 ±3.09, %0.5'lik kitosan 99.25 ±0.48, %0.2'lik kitosan 95.62 ±4.11, %0.05'lik kitosan 93.05 ±13.48, %0.01'lik kitosan 83.59 ±9.75 oranında *E. coli* bakterilerine karşı inhibisyon sonuçlarını göstermektedir. Modifiye kitosanın (OlcShCs) *E. coli*'ye karşı antibakteriyal etkisi değerlendirildiğinde (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.9) %1'lik modifiye kitosan 0 ±6.69, %0.5'lik modifiye kitosan 0 ±5.32, %0.2'lik modifiye kitosan 0 ±58.34, %0.05'lik modifiye kitosan 0 ±6.79 sonuçları elde edilirken %0.01'lik modifiye kitosan uygulamasından sonuç alınamadı.

Çizelge 3.2 ve Şekil 3.10'a bakıldığında %1'lik kitosan 87.50 ±0.48, %0.5'lik kitosan 88.75 ±0.5, %0.2'lik kitosan 82.50 ±2.06, %0.05'lik kitosan 80 ±1.25, %0.01'lik kitosan 75 ±1.25 oranında *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı inhibisyon sonuçları gösterirken Çizelge 3.2 ve Şekil 3.11'e bakıldığında negatif kontrol olarak kullanılan distile su ile kıyaslandığında %1'lik modifiye kitosan 6.66 ±1.25, %0.5'lik modifiye kitosan 0 ±2.63, %0.2'lik modifiye kitosan 0 ±4.79, %0.05'lik modifiye kitosan 0 ±2.63, %0.01'lik modifiye kitosan 0 ±0 yüzdelik oranlarında *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı antibakteriyal etki göstermektedir.

Çizelge 3.3 ve Şekil 3.12'de verilen sonuçlara göre %1'lik kitosan 100 ±0, %0.5'lik kitosan 99.31 ±0.48, %0.2'lik kitosan 97.21 ±0.95, %0.05'lik kitosan 69.24 ±2.06, %0.01'lik kitosan 54.55 ±1.25 oranında *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı inhibisyon oranları

gösterirken, yine Çizelge 3.3 ve Şekil 3.13’de ifade edilen sonuçlara göre; negatif kontrol olarak kullanılan distile su ile kıyaslandığında %1’lik modifiye kitosan 59.13  $\pm$ 4.97, %0.5’lik modifiye kitosan 54.50  $\pm$ 4.36, %0.2’lik modifiye kitosan 55.79  $\pm$ 8.96, %0.05’lik modifiye kitosan 20.83  $\pm$ 79.04, %0.01’lik modifiye kitosan 54.76  $\pm$ 5.25 oranlarında *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı antibakteriyal aktivite göstermektedir.

**Çizelge 3.1:** Kitosan ve modifiye kitosanın *E. coli* türüne karşı antibakteriyal etkisi

Örnek konsantrasyonu (%) (w/v)	%0	%0.01	%0.05	%0.20	%0.50	%1
Cs	0	83.59 $\pm$ 9.75	93.05 $\pm$ 13.48	95.62 $\pm$ 4.11	99.25 $\pm$ 0.48	99.18 $\pm$ 3.09
OlcShCs	0	ND	0 $\pm$ 21.18	0 $\pm$ 58.34	0 $\pm$ 5.32	0 $\pm$ 6.69

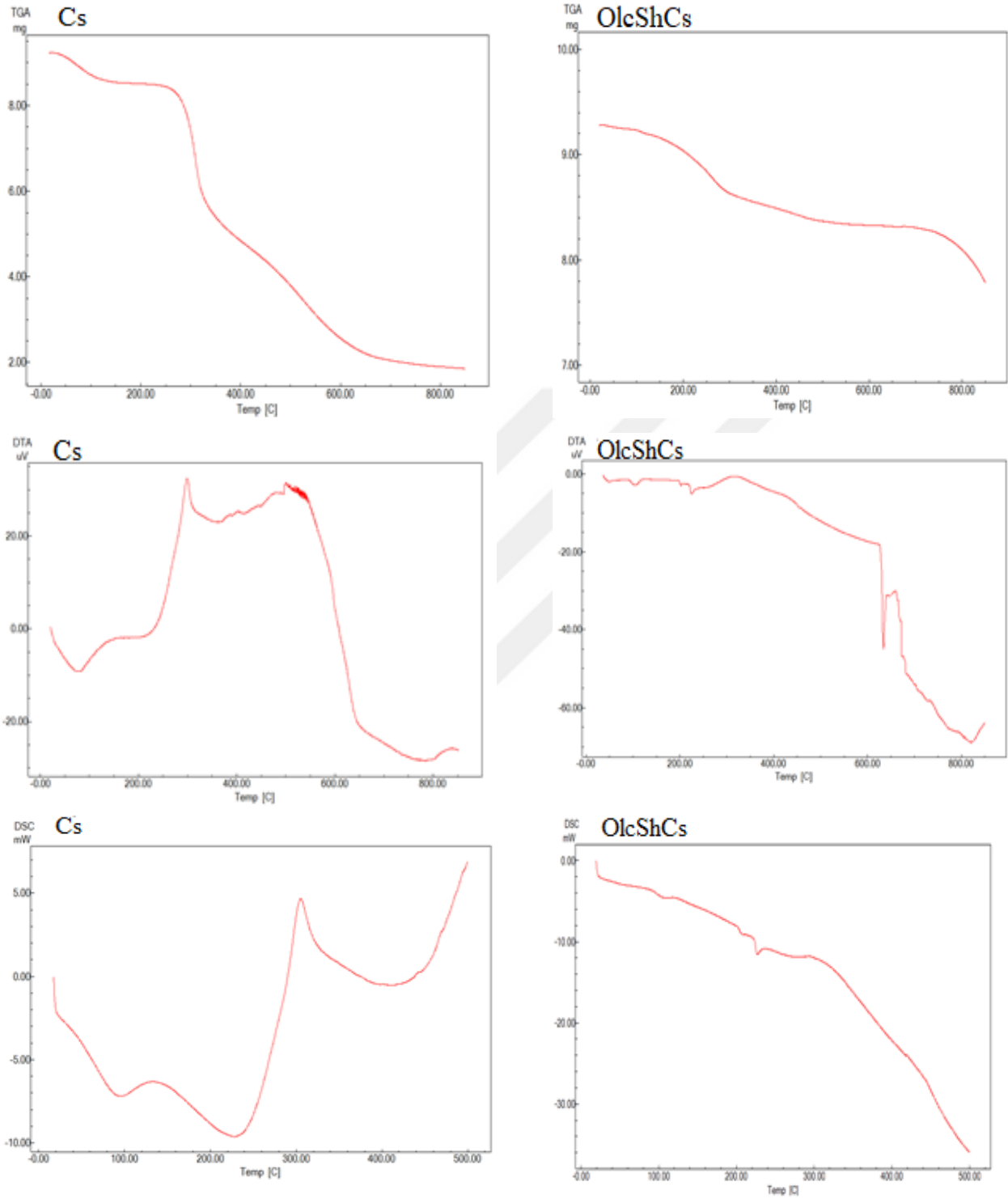
(ND: Belirlenemedi)

**Çizelge 3.2:** Kitosan ve modifiye kitosanın *Bacillus subtilis* türüne karşı antibakteriyal etkisi

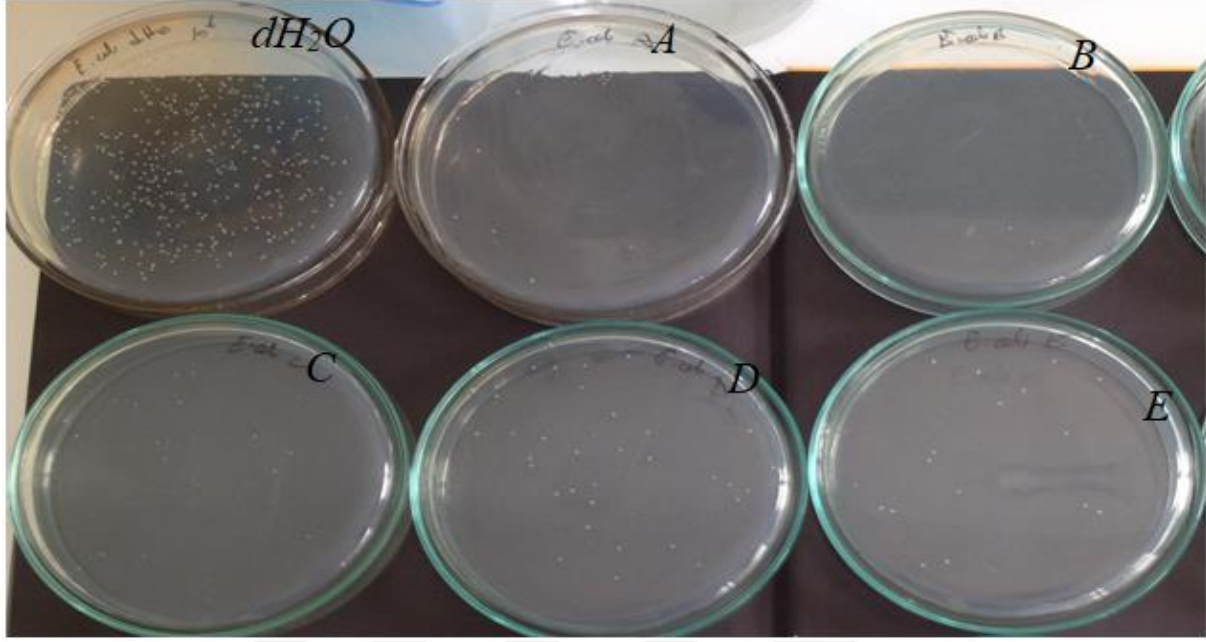
Örnek konsantrasyonu (%) (w/v)	%0	%0.01	%0.05	%0.20	%0.50	%1
Cs	0	75 $\pm$ 1.25	80 $\pm$ 1.25	82.50 $\pm$ 2.06	88.75 $\pm$ 0,5	87.50 $\pm$ 0.48
OlcShCs	0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 2.63	0 $\pm$ 4.79	0 $\pm$ 2.63	6.66 $\pm$ 1.25

**Çizelge 3.3:** Kitosan ve modifiye kitosanın *Staphylococcus epidermidis* türüne karşı antibakteriyal etkisi

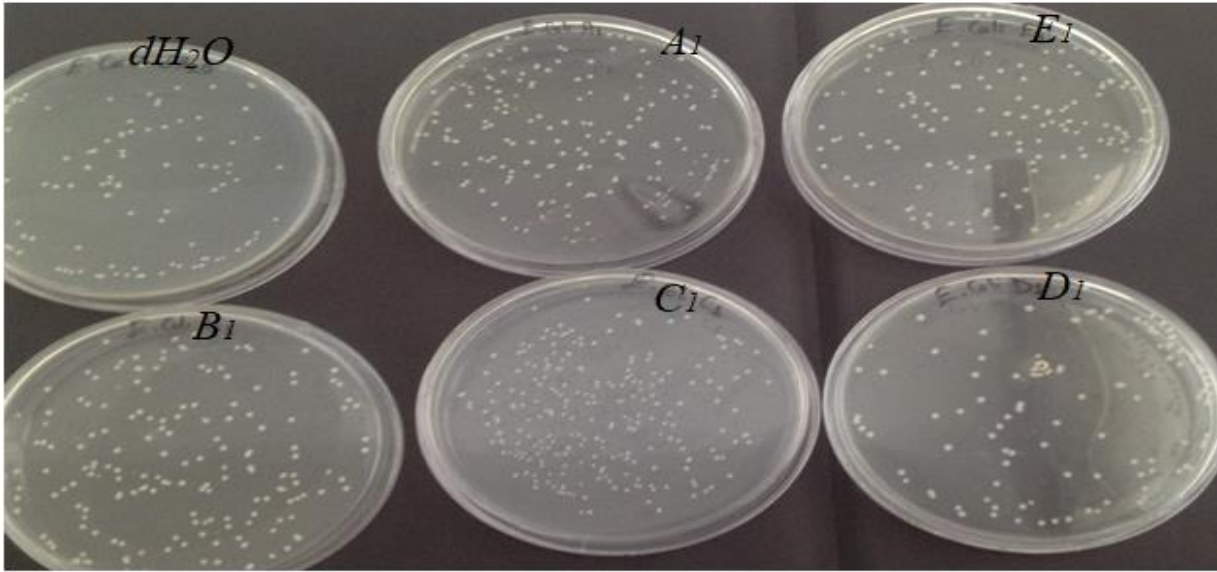
Örnek konsantrasyonu (%) (w/v)	%0	%0.01	%0.05	%0.20	%0.50	%1
Cs	0	54.55 $\pm$ 1.25	69.24 $\pm$ 2.06	97.21 $\pm$ 0.95	99.31 $\pm$ 0.48	100 $\pm$ 0
OlcShCs	0	54.76 $\pm$ 5.25	20.83 $\pm$ 79,04	55.79 $\pm$ 8.96	54.50 $\pm$ 4.36	59.13 $\pm$ 4.97



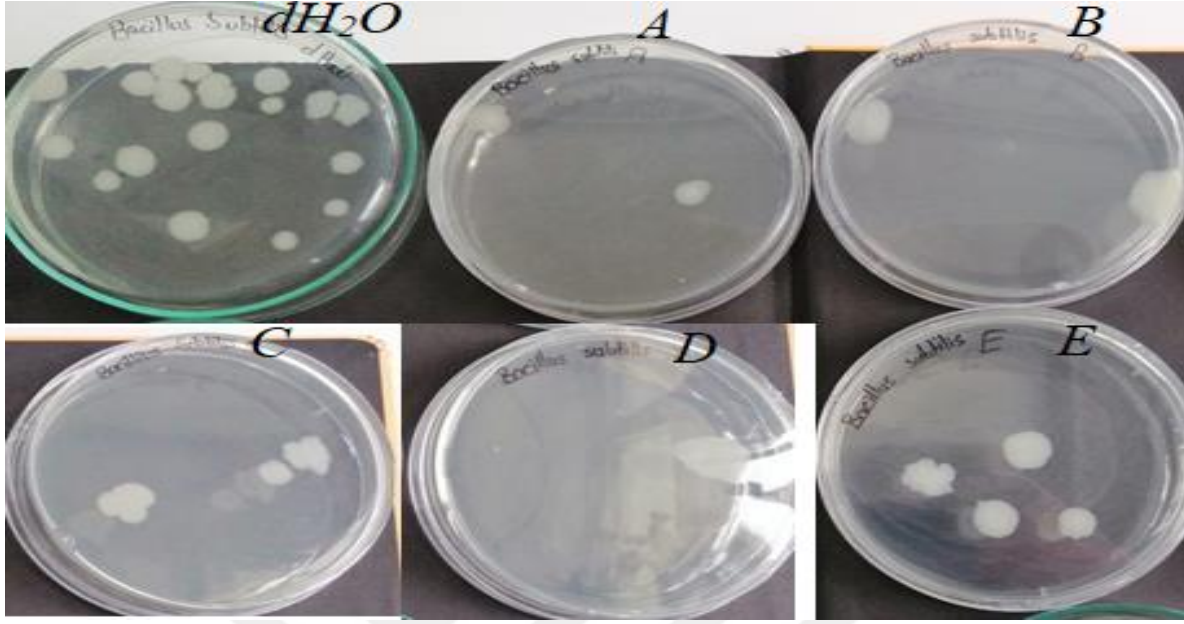
Şekil 3.7: Cs ve OlcShCs'nin termogravimetrik analizi



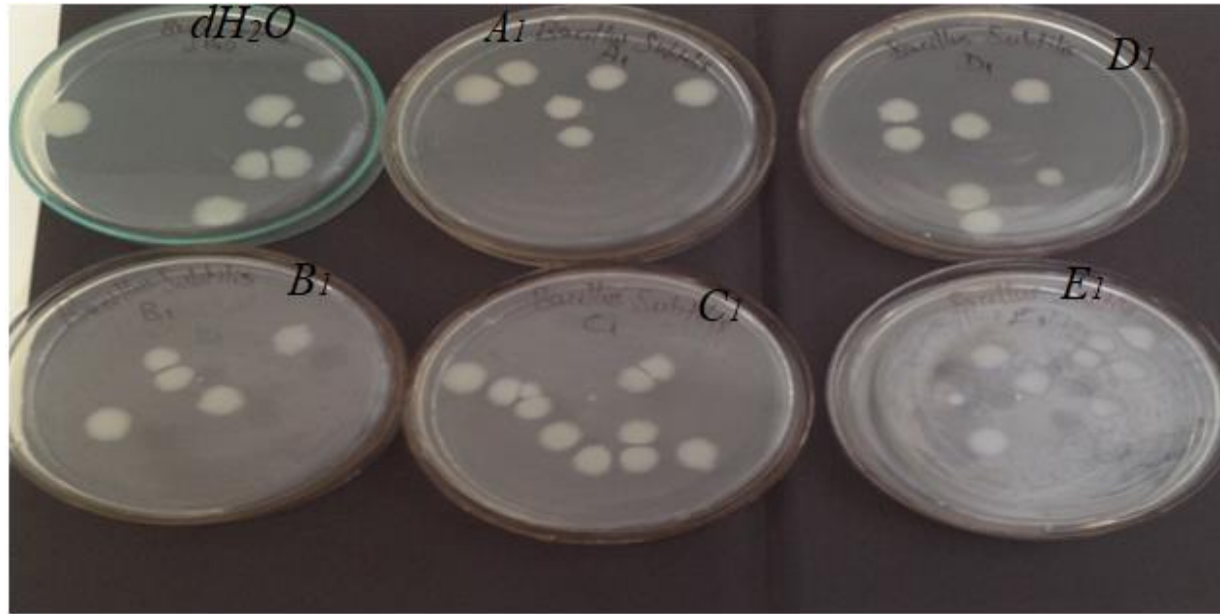
**Şekil 3.8:** Kitosan (Cs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A) %1, B) %0.5, C) %0.2, D) %0.05, E) % 0.01 kitosan konsantrasyonu



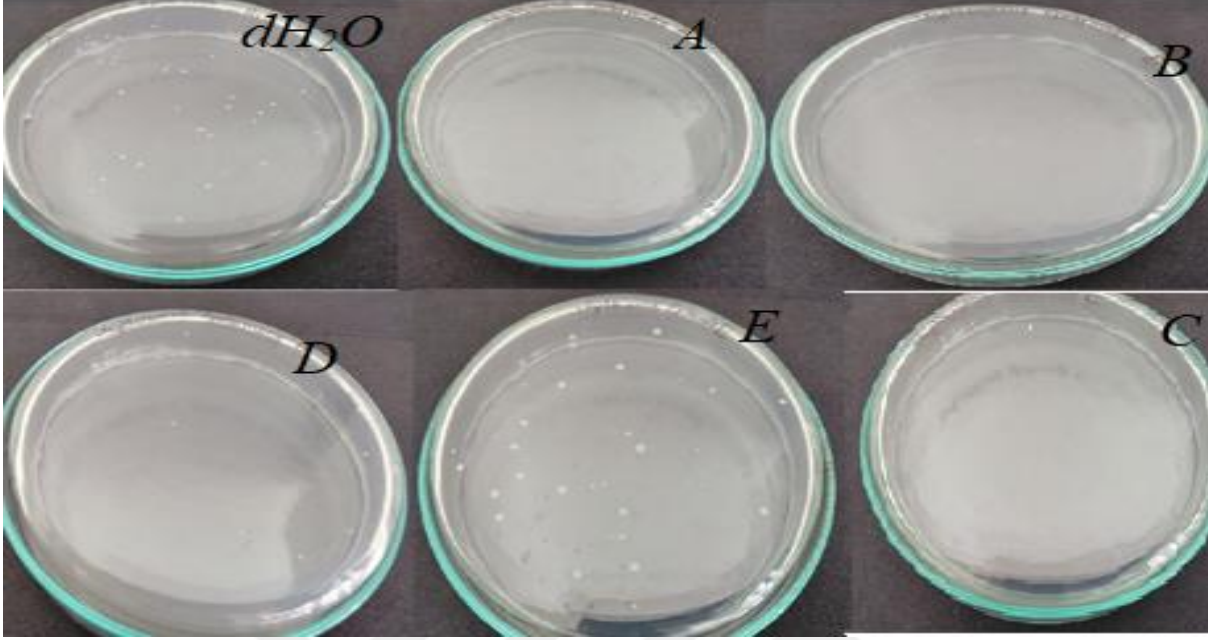
**Şekil 3.9:** Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A<sub>1</sub>) %1, B<sub>1</sub>) %0.5, C<sub>1</sub>) %0.2, D<sub>1</sub>) %0.05, E<sub>1</sub>) %0.01 modifiye kitosan konsantrasyonu



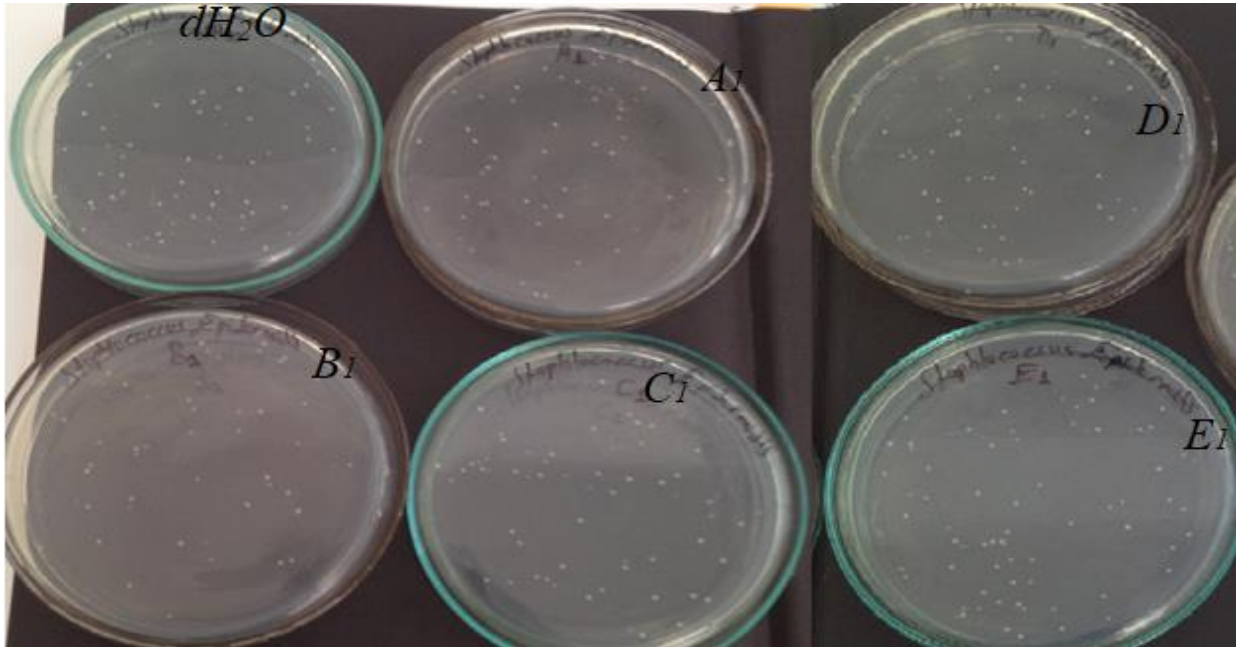
**Şekil 3.10:** Kitosan molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besisi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen *B. subtilis* bakterisine karşı antibakteriyal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A) %1, B) %0.5, C) %0.2, D) %0.05, E) % 0.01 kitosan konsantrasyonu



**Şekil 3.11:** Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besisi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen *B. subtilis* bakterisine karşı antibakteriyal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A<sub>1</sub>) %1, B<sub>1</sub>) %0.5, C<sub>1</sub>) %0.2, D<sub>1</sub>) %0.05, E<sub>1</sub>) % 0.01 modifiye kitosan konsantrasyonu



**Şekil 3.12:** Kitosan (Cs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besisi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen *S. epidermidis* bakterisine karşı antibakteriyal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A) %1, B) %0.5, C) %0.2, D) %0.05, E) % 0.01 kitosan konsantrasyonu



**Şekil 3.13:** Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besisi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen *S. epidermidis* bakterisine karşı antibakteriyal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A<sub>1</sub>) %1, B<sub>1</sub>) %0.5, C<sub>1</sub>) %0.2, D<sub>1</sub>) %0.05, E<sub>1</sub>) % 0.01 modifiye kitosan konsantrasyonu

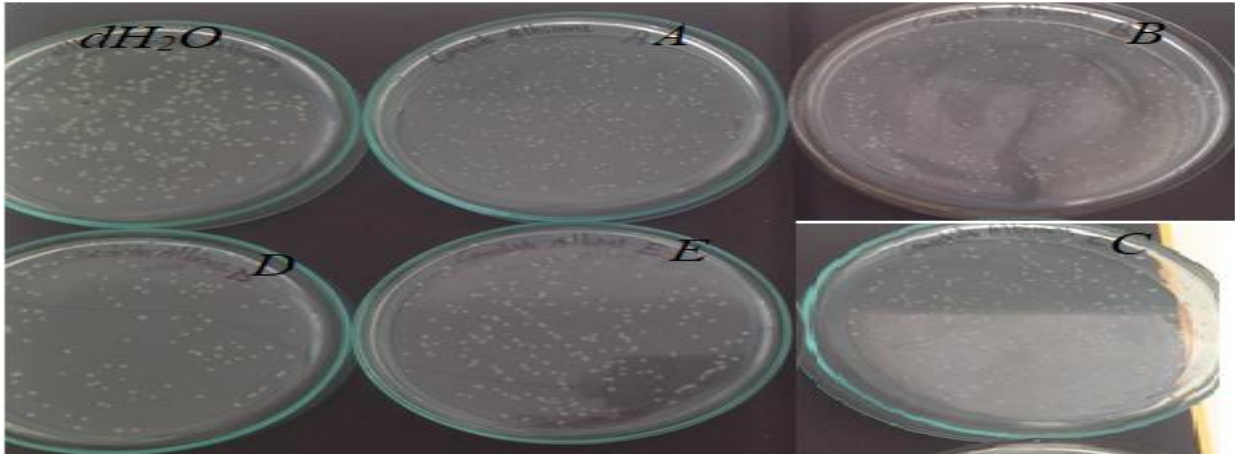


### 3.2.2 Antifungal aktivite

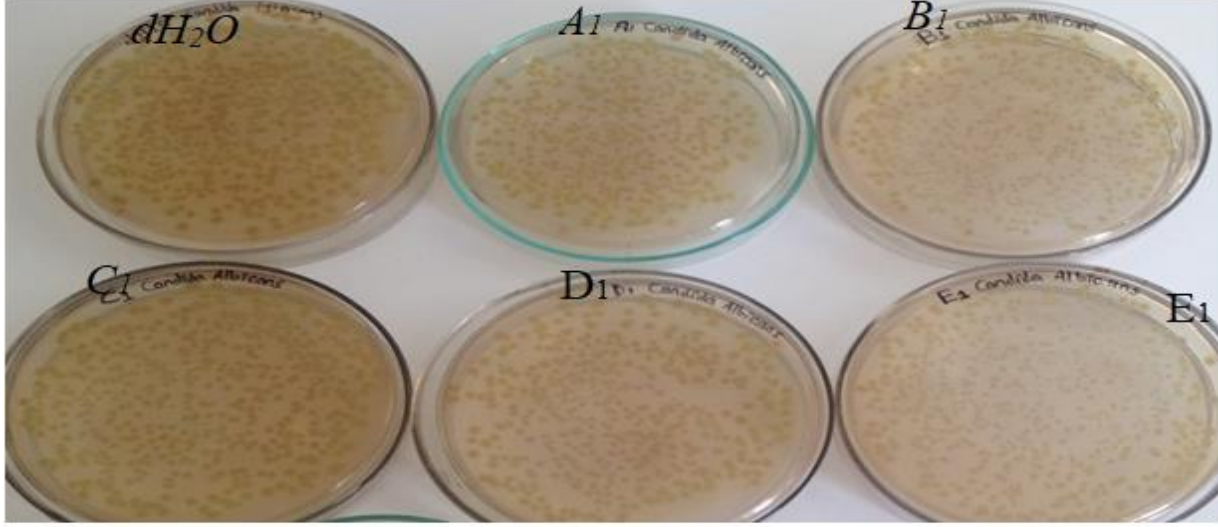
Kitosanın antifungal etkisi Çizelge 3.4 ve Şekil 3.14'te verilen sonuçlara bakıldığında %1'lik kitosan  $12.90 \pm 3.4$ , %0.5'lik kitosan  $6.40 \pm 11.96$ , %0.2'lik kitosan  $5.83 \pm 4.55$ , %0.05'lik kitosan  $10.62 \pm 63.15$ , %0.01'lik kitosan  $0 \pm 5.36$  oranında *Candida albicans*'a karşı inhibisyon oranları gösterirken, yine Çizelge 3.4'te ve Şekil 3.15'te gösterilen sonuçlara göre negatif kontrol olarak kullanılan distile su ile kıyaslandığında %1'lik modifiye kitosan  $21.26 \pm 2.17$ , %0.5'lik modifiye kitosan  $21.68 \pm 80.2$ , %0.2'lik modifiye kitosan  $19.92 \pm 13.1$ , %0.05'lik modifiye kitosan  $7.46 \pm 27.79$ , %0.01'lik modifiye kitosan  $7.10 \pm 40$  oranlarında *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivite elde edilmiştir.

**Çizelge 3.4:** Kitosan ve modifiye kitosanın *Candida albicans* türüne karşı antifungal etkisi

Örnek konsantrasyonu (%) (w/v)	%0	%0.01	%0.05	%0.20	%0.50	%1
Cs	0	$0 \pm 5.36$	$10.62 \pm 63.15$	$5.83 \pm 4.55$	$6.40 \pm 11.96$	$12.90 \pm 3.4$
OlcShCs	0	$7.10 \pm 40$	$7.46 \pm 27.79$	$19.92 \pm 13.1$	$21.68 \pm 80.2$	$21.26 \pm 2.17$



**Şekil 3.14:** Kitosan (Cs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C'de gece boyunca inkübe edilen *C. albicans*'a karşı antifungal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A) %1, B) %0.5, C) %0.2, D) %0.05, E) %0.01 kitosan konsantrasyonu



**Şekil 3.15:** Modifiye kitosan (OlcShCs) molekülünün Luria-Bertani (LB) agar besi ortamında 37°C’de gece boyunca inkübe edilen *C. albicans*’a karşı antifungal etkisi. dH<sub>2</sub>O kontrol, A<sub>1</sub>) %1, B<sub>1</sub>) %0.5, C<sub>1</sub>) %0.2, D<sub>1</sub>) %0.05, E<sub>1</sub>) % 0.01 modifiye kitosan konsantrasyonu

**Çizelge 3.5:** Cs molekülünün *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *C. albicans*’a karşı antimikrobiyal etkisi

Örnek konsantrasyonu (%) (w/v)	%0	%0.01	%0.05	%0.20	%0.50	%1
<i>E.coli</i>	0	83.59 ± 9.75	93.05 ± 13.48	95.62 ± 4.11	99.25 ± 0.48	99.18 ± 3.09
<i>B. subtilis</i>	0	75 ± 1.25	80 ± 1.25	82.50 ± 2.06	88.75 ± 0.5	87.50 ± 0.48
<i>S. epidermidis</i>	0	54.55 ± 1.25	69.24 ± 2.06	97.21 ± 0.95	99.31 ± 0.48	100 ± 0
<i>C. albicans</i>	0	0 ± 5.36	10.62 ± 63.15	5.83 ± 4.55	6.40 ± 11,96	12.90 ± 3.4

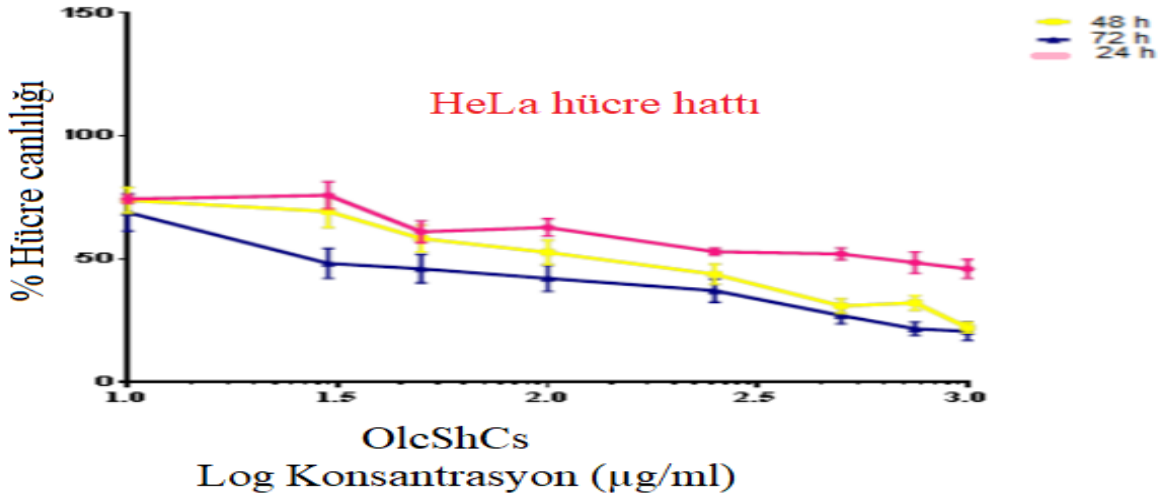
**Çizelge 3.6:** OlcShCs molekülünün *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *C. albicans*’a karşı antimikrobiyal etkisi

Örnek konsantrasyonu (%) (w/v)	%0	%0.01	%0.05	%0.20	%0.50	%1
<i>E.coli</i>	0	ND	0 ± 6.79	0 ± 58.34	0 ± 5.32	0 ± 6.69
<i>B. subtilis</i>	0	0 ± 0	0 ± 2.63	0 ± 4.79	0 ± 2,63	6.66 ± 1.25
<i>S. epidermidis</i>	0	54.76 ± 5.25	20.83 ± 79.04	55.79 ± 8.96	54.50 ± 4.36	59.13 ± 4.97
<i>C. albicans</i>	0	7.10 ± 40	7.46 ± 27.79	19.92 ± 13.1	21.68 ± 80.2	21.26 ± 2.17

(ND: Belirlenemedi)

### 3.2.3 Antikanser aktivite

Çizelge 3.7’de verilen bilgiler HeLa kanser hücresine karşı OlcShCs molekülünün IC50 değerlerini göstermektedir. Bu verilere göre 10 µg/ml- 1000 µg/ml konsantrasyonlarında modifiye kitosan ortama ilave edildiğinde HeLa hücreleri için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 24 saat sonra 81.57±5.30 iken, 48 saat sonra 74.43±4.61 ve 72 saat sonra 51.52±0.37 µg/ml olduğu görülmüştür.



Şekil 3.16: HeLa kanser hücresine karşı OlcShCs molekülünün sitotoksik etkisi

Çizelge 3.7: HeLa kanser hücresine karşı OlcShCs molekülünün IC50 değerleri

		OlcShCs
	Time	IC <sub>50</sub> ( µg/ml±SD*)
HeLa	24h	81.57±5.30
	48h	74.43±4.61
	72h	51.52±0.37

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kitosan ve modifiye kitosanın fonksiyonel gruplarını değerlendirmek için FT-IR analizi kullanıldı. Şekil 3.1 ve 3.2’de kitosan (Cs) ve modifiye kitosan (OlcShCs)’nın FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında Almeida ve arkadaşları [71] yapmış oldukları çalışma sonuçlarına göre Cs’nin karakteristik spektrumları; N–H ve O–H gerilme titreşimleri 3200–3500  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki geniş bant ile karakterize edilmektedir. Wang ve arkadaşları [72] yapmış oldukları çalışma sonuçlarına göre 1646  $\text{cm}^{-1}$  (C=O amide-I gerilmesi (stretching)), 1568  $\text{cm}^{-1}$  (N-H amide-II bağlanması) ve 1374  $\text{cm}^{-1}$  (C-N amide-III gerilmesi) olarak değerlendirilmektedir. 890-1100  $\text{cm}^{-1}$  titreşim aralığı ise kitosan sakkarin yapısının ether grupları ile ilişkilidir (C–O–C bağlanması) [73]. Yine Şekil 3.1 ve 3.2’de kitosan molekülünün modifikasyon sonrası açıl olmayan birincil amin grubuna karşılık gelen 1568  $\text{cm}^{-1}$  pik kaybolurken, 1634  $\text{cm}^{-1}$ ’de açığa çıkmaktadır. Bu durum modifiye kitosanda amid bağının varlığını göstermektedir [74]. Noor ve arkadaşları [75] çalışma sonuçları ile uyumlu olarak Şekil 3.1 ve 3.2’de görüldüğü gibi kitosan molekülüne yağ asitlerinin bağlanması sonucu 2900  $\text{cm}^{-1}$  ve 2987  $\text{cm}^{-1}$  pik yoğunluğundaki artış kitosanın yapısına oleik asit grubunun bağlanması ile  $-\text{CH}_2$  titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca 1732  $\text{cm}^{-1}$  ester bağının karbonil grubunun karakteristik pikidir. Bu bağ kitosanın hidroksil grubu ile oleik asitin karboksil grubu arasında açığa çıkmaktadır. Dolayısıyla yapıda N-açilasyonun açığa çıktığını göstermektedir [76]. Sülfonasyon kitosanın diğer önemli kimyasal modifikasyonlarından birisidir. Bu nedenle sülfat grubunun nereden bağlandığı önemlidir. Örneğin sulfonate grup kitosanın amino grubuna doğrudan bağlanarak sulfamate ürünlerin ( $-\text{NH}-\text{SO}_3-$ ) açığa çıkmasına sebep olabilir [53] veya sülfat grupları içeren bileşenler ( $\text{R}-\text{SO}_3-$ ) ile kitosan amin grubuna bağlandığında sülfonat bileşikler ( $-\text{NH}-\text{R}-\text{SO}_3-$ ) oluşabilir [77, 78]. Ayrıca sülfatlanma işlemi kitosan hidroksil grupları ile de reaksiyon gösterebilir. Bu reaksiyon sonucunda ise sülfatlanmış ürünler elde edilir [79]. Şekil 3.1 ve 3.2’de görüldüğü gibi modifiye kitosan molekülü için 788 ve 1207  $\text{cm}^{-1}$ ’de yeni açığa çıkan FTIR bantları ise sırasıyla sülfat gruplarının C–O–S and O–S–O bağ gerginliğine karşılık gelmektedir ve Vongchan ve arkadaşları [80] sonuçları da desteklenmektedir. 837 ve 820  $\text{cm}^{-1}$  bant yoğunlukları sırasıyla 2. ve 6. C atomundan sülfatlanma olduğunu Falshaw ve arkadaşları [81] ve Yang ve arkadaşları [82] yapmış oldukları çalışmalarda belirtmişlerdir. Tüm bu sonuçlar oleik asit ve sülfat gruplarının kitosan yapısına başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir [83-89].

Şekil 3.3'e bakıldığında  $H^1$  NMR analiz sonucuna göre 11.5 ppm'deki spektrum piki d.TFA çözücüsüne aittir ve Skorik ve arkadaşları [90] ve Queiroz ve arkadaşları [91] yapmış oldukları deneysel verilerin sonuçları ile paralellik göstermektedir. 2.4 ppm'deki pik N-asetil glukozamin grubunun N-asetil protonlarına karşılık gelmektedir. 3.6 ppm'deki pik ise deasetile glukozamin kalıntılarının H-2 protonuna denk gelmektedir. 3.8-4.5 ppm arasındaki dirençler ise halka protonları ile eşleşmektedir (H2, H3, H4, H5 ve H6). 5.0 ve 5.2 ppm'deki pikler ise sırasıyla N-asetil glukozamin ve deasetile glukozamin kalıntılarının H-1 olarak dikkate alınmaktadır. Modifiye kitosanın Şekil 3.4'te  $H^1$  NMR sonucuna bakıldığında ve Şekil 3.5'te kitosan ile modifiye kitosanın  $H^1$  NMR sonuçları üst üste karşılaştırılıp incelendiğinde ve Şekil 3.6'da modifiye kitosanın büyütülmüş  $H^1$  NMR sonucuna bakıldığında; kitosanın oleik asit ile kimyasal modifikasyonu [-CH<sub>2</sub>-CO] 1.4 ppm'deki açığa çıkan yeni pik ile doğrulanmaktadır [92].

Cs ve OlcShCs'nin DSC termogram analizi karşılaştırıldığında (Şekil 3.7) hem Cs hem de OlcShCs için bir çift endotermik ve ekzotermik pikler görülmektedir. Kitosanın DSC termogramında 90-100°C aralığında geniş bir endotermik pik görülmektedir. Bu durum bağlı su moleküllerinin kaybını belirler. Ayrıca 240 keskin bir endotermik pik örneğin termal yıkımını gösterir [93]. 300°C'deki ekzotermik pik ise kitosandaki glukozaminin (GlcN) bozulmasıyla ilişkilendirilebilir [94, 95]. OlcShCs'nin DSC termogramında ise kitosanda olduğu gibi 90-100°C ve 240°C'de küçük endotermik pikler bulunmaktadır. Kitosanın kimyasal modifikasyonu sonrası ekzotermik pikleri kaybolmaktadır [96].

Kitosan (Cs) %1'lik konsantrasyonunun antimikrobiyal etkisi dört farklı bakteri türüne karşı değerlendirildiğinde (Çizelge 3.5) *Staphylococcus epidermidis* ve *E. coli*'ye karşı neredeyse tamamen antimikrobiyal etki gösterirken *Bacillus subtilis* bakterisini tamamen inhibe etmemektedir. *Candida albicans* türüne karşı ise oldukça az etki etmektedir. Modifiye kitosanın (OlcShCs) %1'lik konsantrasyonunun inhibisyon oranı etkisi dört farklı bakteri türüne karşı değerlendirildiğinde (Çizelge 3.6) *E. coli*'ye karşı hiçbir inhibisyon göstermezken, *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis* için oldukça düşüktür ve *Candida albicans* için antifungal özelliği yine düşük olmasına rağmen Cs'ye göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Bu durum pH, moleküler ağırlık, kitosanın konsantrasyonu, kitosanın türü, mikroorganizmaların çeşitleri, belirli materyallerle oluşturulan kompleksler, besin bileşenleri, kitosanın deasetilasyon derecesi,

kitosanın elde edildiği kaynak, bakteri hücre duvarı yüzey morfolojisi, iyon yükü ve modifiye grupların çeşidi gibi farklı etkenden dolayı kaynaklanmaktadır [97-99].

pH'ın olası etkileri değerlendirildiğinde; Kitosan pH 6'dan (kitosanın pKa değeri yaklaşık 6.3) küçük olduğu ortamda polikasyonik doğasından dolayı C2 pozisyonunda bulunan NH<sub>2</sub> grubu protonize olacağından pozitif yüklü hale gelecektir (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Bu grup negatif yüklü bileşenler olan proteinler, anyonik polisakkaritler, yağ asitleri, safra asitleri ve posfolipitler gibi bileşenler ile reaksiyon verecektir. Dolayısıyla hücre bileşenlerinin sızmasına sebep olacak ve mikroorganizmaları öldürecektir.

Younes ve arkadaşları [100] yapmış olduğu bir çalışmada bakteri hücre duvarına kitosanın pH azaldıkça daha çok yapışdığını göstermiştir. Bu durum NH<sub>2</sub> grubunun protonlaşmasına bağlı olarak açıklanmıştır. Devlieghere ve arkadaşları [101] yapmış olduğu çalışmada doğal kitosanın *Candida lambica* türüne karşı pH 6 ile kıyaslandığında pH 4'de daha etkin antifungal etki gösterdiği ifade edilmiştir. Bu bilgilere göre Cs'nin *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* türlerine karşı göstermiş oldukları antifungal aktivite sonuçları Devlieghere ve arkadaşları [101] sonuçları ile göre uyumludur. Çünkü Cs pH 5.5 olan ortamda çalışıldığında ve Cs % 0.5'lik asetik asitte çözündüğünde asidik ortamda C2 pozisyonunda bulunan -NH<sub>2</sub> grubu daha fazla protonize olarak pozitif yüklü -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> reaktif grupların sayısı artacağı için gram negatif bakterilerin yüzeyinde yer alan negatif yükler ile daha sıkı etkileşim sergileyeceklerdir. Bu nedenle *E. coli* bakterileri %1'lik Cs konsantrasyonunda neredeyse tamamen inhibie edilmiştir (Çizelge 3.1). Gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit posfat yükleri nedeni ile genel anlamda negatif yüklü olduğu için %1'lik Cs konsantrasyonunda *S. epidermidis* tamamen inhibie edilmiştir (Çizelge 3.3). Ayrıca *S. epidermidis* gram pozitif bakteri olduğu için yüksek moleküler ağırlıklı kitosan peptidoglikan tabakayı kolaylıkla delmekte iken, gram negatif bakterilerin dış yüzünde yer alan lipopolisakkarit tabaka yine yüksek moleküler ağırlıklı kitosana karşı bariyer özelliği göstermektedir [102]. Bu nedenle bizim sonuçlarımıza bakıldığında %1'lik Cs konsantrasyonunda *S. epidermidis*'e karşı *E. coli*'den daha iyi antimikrobiyal özellik sergilemektedir (Çizelge 3.5). Fernandez-Saiz ve arkadaşları [103] tarafından yapılan antimikrobiyal çalışmada sentezledikleri kitosanyum asetat film türevlerinin düşük pH (6.2)'da *Staphylococcus aureus* türüne karşı daha az antimikrobiyal etki gösterdiğini, pH 7.4'te daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bu durum kitosanın antimikrobiyal etkisi

açısından zenginliğini göstermektedir. Çözücünün antimikrobiyal etkisinin bakteri türleri üzerinde etkili olduğunu ifade edebiliriz. Çünkü yapılan bir çalışmada 200 ppm konsantrasyonundaki asetik asit çözeltisinin *E. coli* bakterisine karşı antimikrobiyal etki göstermede sınır olduğu ifade edilmektedir. 200 ppm'den yüksek konsantrasyonlarda *E. coli* bakterileri ölmektedir [104]. Bizim çalışmalarımızda ise kullandığımız asetik asit konsantrasyonu 5250 ppm'dir.

Antimikrobiyal özelliği etkileyen önemli faktörlerden birisi de moleküler ağırlıktır. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosan (HMW) mikrobiyal mebranı geçemez ve bu nedenle hücre duvarına-yüzeyine yapışmaktadır. Bu durum mikrobiyal hücre mebranınından besin geçişlerini engellemektedir ve hücrenin parçalanmasına sebep olmaktadır. Diğer bir ifade ile çözünmüş kitosan oligomerleri mikroorganizmanın hücre içerisine girebilmektedir ve DNA ile bağlanarak mRNA sentezini inhibe etmektedir ve hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Kitosanın nükleik asitlere bağlanarak DNA ekspresyonunu etkilediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [22]. Çözünmüş HMW kitosan ise hücre mebran yapısıyla reaksiyon göstererek hücrenin geçirgenliğini değiştirmektedir. Li ve arkadaşları [105] tarafından yapılan çalışmada 3, 50 ve 1000 kDa moleküler ağırlığa sahip kitosanın *E. coli* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında 50 kDa moleküler ağırlığa sahip kitosanın en iyi aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. No ve arkadaşları [100] %0.1 kitosan (MW: 1671, 1106, 746, 470, 224 ve 28 kDa) genel olarak gram negatif bakterilerden ziyade gram pozitif bakterilere karşı daha etkili antimikrobiyal etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. *E. coli* ve *Pseudomonas fluorescens* türlerine karşı 746 kDa, *Salmonella typhimurium* ve *Vibrio parahaemolyticus* türlerine karşı 470 kDa moleküler ağırlıklara sahip kitosan test edildiğinde 746 kDa daha etkili olduğu rapor edilmiştir. 28 kDa ise *Salmonella typhimurium* için hiçbir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını da ifade etmektedirler. 0.73, 1.52, 2.09, 5.98, 8.39, 9.69, 15.06, 19.99, 70 and 600 kDa oligomer kitosanların *Candida albicans* türlerine karşı oldukça yüksek antifungal etki gösterdiğini rapor eden çalışmalar vardır [107]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada Cs *Candida albicans* türüne karşı oldukça düşük antifungal etki sergilemiştir (Çizelge 3.4). 3.3, 7.1, 29.2, 72.1, 156, 300 kDa kitosan örnekleri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* bakteri türlerine karşı antimikrobiyal özellikleri asidik ortamda moleküler ağırlık arttıkça antimikrobiyal özelliğinde arttığı rapor edilmektedir ve pH 7 ortamında moleküler ağırlık arttıkça antimikrobiyal özellik 29.2 kDa kitosana kadar artarken, daha yukarısında antimikrobiyal aktivitenin aşırı şekilde düştüğü ifade

edilmektedir [108]. Bu bilgilere göre Kitosan (Cs) %1'lik konsantrasyonunun inhibisyon oranı etkisi dört farklı bakteri türüne karşı değerlendirildiğinde (Çizelge 3.5) *Staphylococcus epidermidis* ve *E. coli*'yi neredeyse tamamen inhibe ederken *Bacillus subtilis* bakterisini kısmen inhibe etmektedir. Bu durum kitosanın (Cs) asidik bölgede çözünmesinden dolayı daha fazla anitimikrobiyal etkiye sahip olduğu ile uyumludur [109]. Oysa *Candida albicans* türüne karşı oldukça az etki etmektedir (Çizelge 3.5). Yüksek moleküler ağırlıklı kitosan molekülü ile kitosan oligomerlerinin çeşitli fungi türleri üzerine antifungal etkileri araştırıldığında *Pyricularia oryzae* türünün inhibe olmadığı rapor edilmiştir [109]

Yine aynı çalışmada 1 mg/ml konsantrasyonunda pH 5.6 ortamında çalışıldığında *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* türü için düşük moleküler ağırlıklı kitosan daha iyi antigungal etki gösterirken, yüksek moleküler ağırlıklı kitosan ise hiçbir antifungal etki göstermemektedir. Bu durum yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın aşırı viskos olması nedeni ile agar plate iyi difüze olamaması ile ilişkilendirilmiştir. *Rhizopus nigricans* türü içinse sadece kitosan oligosakakritleri kısmi antimikrobiyal aktivite gösterirken yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı kitosanların antifungal etki göstermediği rapor edilmiştir [109]. Bu sonuçlar Cs'nin antifungal etkisinin düşük olması ile uyumludur (Çizelge 3.4).

Kitosanın konsantrasyonu da anti mikrobiyal etkiyi değiştirmektedir. Genel anlamda bir katyonik antimikrobiyal ajan olan kitosan bakteri hücre yüzeyinde makromoleküllerin negatif yüklü kalıntıları ile etkileşmesi yoluyla hücre geçirgenliğinde değişime sebep olur. Sudarshan ve arkadaşları [18] göre kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin mekanizması bakterinin yüzey bileşenlerine kitosanın amino gruplarının bağlanmasını içermektedir. Böylelikle onların büyümesini inhibe etmektedir.

Elektron mikroskobu kullanarak *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium* bakterileri ile gerçekleştirilen deneylerle gram negatif bakteriler üzerine kitosanın antimikrobiyal özelliği 2001 yılında Helander ve arkadaşları [17] tarafından gerçekleştirildi. Yapılan deneyler ile elde edilen sonuçlar kitosanın gram negatif bakterilerin dış membranının bariyer özelliğini nasıl bozduğunu aydınlatmak için deliller sunmaktadır. Elektron çalışma mikrogörüntüleri kitosanın işlev yerinin bakterinin dış membranında olduğunu göstermiştir. Bakteri dış mebrandaki bozulmalar hidrofobik prob 1-Nphenylnaphthylamine (NPN)'nin geçirgenliğinin artırılması ile doğrulanmış ve anyonik deterjanlar boyalar ve safra asitleri gibi deneysel ajanların biyosidal ve inhibitör etkinliğine karşı



duyarlılığını artırmıştır. Gram negatif bakteriler için 2000-5000 ppm konsantrasyonundaki kitosan miktarının gram negatif bakteriler için öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [18].

Düşük konsantrasyonlarda kitosan hücre yüzeyine bağlanarak geçirgenliği bozar. Oysaki yüksek konsantrasyonda kitosan hücreyi elbise gibi kapatır ve hücre içi bileşenlerin sızmasını engeller. Yapılan bir çalışmada farklı moleküler ağırlıklara ( $5.5 \times 10^4$ – $15.5 \times 10^4$  Da ) sahip kitosanın farklı konsantrasyonları (20, 50, 100, 200, 500 ve 1000 ppm) hazırlanarak *E. coli* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde 200 ppm ve fazlası tüm kitosan çeşitleri için iyi antimikrobiyal sonuçlar verdiğini, 20 ppm konsantrasyonunda ise *E. coli* bakterisinin ürediğini rapor eden çalışmalar bulunmaktadır [104]. Bu durum yüksek konsantrasyondaki kitosan örneklerinin bakterileri yumak haline getirip öldürdüğü, düşük konsantrasyondaki kitosanın ise böyle bir etkisinin olmadığı ile ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır. Pamuk kumaşları üzerine yapılan farklı kitosan (1.5- 5 kDa) konsantrasyonları ile antimikrobiyal aktivite, %0.5-0.75 konsantrasyon aralığında maksimum iken, %1’lik konsantrasyonda ise antimikrobiyal aktivitenin kaybolmasına sebep olmuştur [110]. Yüksek moleküler ağırlıklı, düşük moleküler ağırlıklı ve oligomer kitosan molekülleri ile yapılan bir antifungal çalışmada konsantrasyon bağımlı inhibisyon oranının arttığı rapor edilmektedir [96]. Bu bilgilere göre kitosan (Cs ve OlcShCs) konsantrasyonlarının etkisi dört farklı bakteri türüne karşı genellikle konsantrasyon bağımlı inhibisyon oranı artmakta olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6). Sonuçlarımız önceden yapılan birçok çalışmanın bulguları ile uyumluluk göstermektedir [17, 18,104,109,110].

Antimikrobiyal etkiyi değiştiren önemli faktörlerden bir diğeri ise kitosanın türevleridir. Amino grupların yetersizliğinden dolayı antimikrobiyal aktivite pozitif yüklü grupların kitosana entegre edilmesiyle başarılabilir. Ayrıca kitosanın kullanılabirliği için suda çözünen kitosan türevleri elde etmekte bir o kadar önemlidir. Kitosan (pKa 6.3-6.5) protonlanmış amino gruplarından dolayı düşük pH’da en iyi antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bu nedenle quaternize edilmiş kitosan modifikasyonları kitosanın kendisine göre daha fazla antimikrobiyal etkiye sahiptir [111]. Karboksimetil kitosan, dört bileşenli karboksimetil kitosan, kitosan –N-arjinin, N-Alkil disakkarit kitosan ve suda çözünür kitosan oligosakkaritler başlıca örnekleridir. Kitosana hidrofobik grupların eklenmesi hem gram pozitif hemde gram negatif bakterilerde hücre geçirgenli üzerinde olumlu etkileri olmuştur [112]. Hidrofobik zincir uzunluğunun artışı ile antimikrobiyal etkinin arttığını ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır [113]. Molibdat di sülfid kitosanın *E. coli* ve *S.*

*aureus* üzerine yapılan antimikrobiyal çalışmada, doğal kitosana göre daha iyi bir antimikrobiyal ajan olan molibdat di sülfid *E. coli* türlerini oldukça inhibe etmektedir [114]. Yapılan bir çalışmada [115] kitosan, kitosan sülfat ve karboksimetil kitosanın hidrokсібenzensulfonail türevlerinin *S. aureus*, *Sarcina*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* türlerine karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu belirtilmiştir. Ancak hidrokсібenzensulfonail türevleri ise kitosan, kitosan sülfat ve karboksimetil kitosan moleküllerinin antimikrobiyal etkisinden istatistiksel olarak daha büyüktür. Ve kitosan türevlerinin moleküler ağırlığı azaldıkça antimikrobiyal etkinin arttığını Zhong ve arkadaşları [115] ifade etmişlerdir. Hidrokсібenzensulfonail türevleri *E. coli* ve *P. aeruginosa* türlerine karşı daha iyi antimikrobiyal etki sergilemesi gram negatif bakterilere karşı daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdikleri fikrini ortaya koymaktadır. Hidrokсібenzensulfonail türevlerinin antifungal etkisi ise orjinal kitosan (kitosan, kitosan sülfat ve karboksimetil kitosan) moleküllerine göre daha güçlü antifungal etki sergilediği yine Zhong ve arkadaşları [115] ifade edilmektedir. Konsantrasyon arttıkça antifungal etkinin arttığı, moleküler ağırlık arttıkça antifungal özelliğinin azaldığı ifade edilmektedir. 500 ppm konsantrasyonuna sahip hidrokсібenzensulfonail türevlerinin antifungal etkisi *P. asparagi* için %58.51, *A. solani* için %65.98, *F. oxysporum f. sp. Vasinfecum* için %50.50, *C. gloeosporioides (Penz.) Saec* için %42.78, ve *P. zingiberi* için %45.58 maksimum inhibitör oranı kaydedilmiştir [115]. Bu bulgulara göre bizim yapmış olduğumuz çalışmada sentezlenen kitosan sülfatit türevleri *Candida albicans* türüne karşı kitosana (Cs) göre daha iyi antifungal etki göstermiştir (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.6). Konsantrasyon arttıkça antifungal etki genel anlamda artmıştır. 500 ppm konsantrasyona sahip kitosan ve türevlerinin *Candida albicans* türüne karşı antifungal etkisi değerlendirildiğinde Cs için %10 (Çizelge 3.4), OlcShCs için %7.46'dır. 10000 ppm konsantrasyonunda Cs için %12 (Çizelge 3.4), OlcShCs için %21'dir. Bu sonuçlar elde edilen kitosan türevinin *Candida albicans* türüne karşı kitosana göre daha iyi antifungal özelliğe sahip olduğunu göstermektedir ve Palma-Guerrero ve arkadaşları [20] ve Zhong ve arkadaşları [115] yapmış olduğu deneysel bulgular ile uyumludur.

Test edilen mikroorganizmaların çeşitleri antimikrobiyal çeşitliliğe sebep olmaktadır. Gram pozitif bakterilerin kitosandan daha çok etkilendiğini ifade eden çalışmalar mevcuttur [105]. Gram pozitif bakterilerde yer alan teikoik asit posfat grupları tarafından negatif yüklü hale getirilmiştir. Bu nedenle pozitif yüklü kitosan amin grupları ile elektrostatik etkileşimler

sergilemektedirler. Devlieghere ve arkadaşları [101] ve Chung ve arkadaşları [116] bu bulguların aksine gram negatif bakterilerin kitosandan daha çok etkilendiklerini belirtmişlerdir.

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin aksine mayalara karşı antimikrobiyal aktivite, kitosan duyarlı ve kitosan dirençli mayalara arasındaki farklılıklar az duyulmaktadır. İlk olarak kitosan negatif yüklü posfolipitler ile elektrostatik etkileşimler aracılığı ile bağlanır [20]. Hücre membranı parçalandıktan sonra kitosan hücre içerisine girebilmektedir. Bu durum DNA/RNA sentezinin inhibisyonuna sebep olmaktadır ve protein sentezini bozar [117].

Kitosanın antimikrobiyal mekanizması farklı faktörler tarafından etkilendiği için, altında yatan mekanizmayı aydınlatmak oldukça güçtür. En önemli faktörler ise mikroorganizmaların çeşitleri, moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesidir [19]. Mikroorganizmaların çeşitleri kabaca 4 gruba ayrılabilir; gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler, kitosan duyarlı fungi ve kitosan dirençli fungi [20]. Fungi ve bakterilerin hücre yüzeylerinde çok reaktif olan kitosan geçirgenliğe sebep olmaktadır [21]. Bu etkileşim genellikle elektrostatik olarak değerlendirilir [20] ve bakterilerin hücre yüzeyinde negatif yüklü moleküller ile kitosanın protonize olan amino gruplarının pozitif yükleri arasında meydana gelmektedir. Genelde hücre yüzeyinin geçirgenliği hücre içeriği materyallerinin dışarıya sızması ile hücre ölümüne sebep olmaktadır. Ancak kitosan dirençli fungi türleri için hücre membranın geçirgenliğini arttıramamaktadır ve dış yüzeyde kalmaktadır [20]. Kitosan duyarlı funguslar için bu durum aksinedir. Kitosan hücre membran bütünlüğünü bağlanması sonucu bozmaktadır ve hücre içi materyallerin dışarı sızmasına sebep olmaktadır. Kitosanın hücre membran bütünlüğünü dirençli fungi türlerinde bozamamasının sebebi hücre membran içeriğindeki farklılıktan gelmektedir. Bu nedenle fungi türünün kendisinin hücre membran bileşeni kitosanın antifungal aktivitesini belirleyici bir etkidir. Açıkçası kitosan dirençli ve duyarlı olmak üzere farklı bir fungi ailesine ait mayalar bulunmaktadır. Yağ asiti içeriğine bağlı olarak taksonomik bir sınıflandırma funguslar için bir kriter olarak ileri sürülebilir [118]. Bu tarz bir taksonami kitosanın anti fungal etkisini açıklamada veya tahmin etmede kullanılabilir.

Gram pozitif bakteriler için kitosan peptidoglikan tabakasına birleşik teikoik asit ile kovalent olmayan bağlanmalar gösterir. Bu teikoik asitler hücre bölünmesi ve gram pozitif bakteri fizyolojisinin diğer durumları için önemlidir. Hücre membran boyunca membran geçirgenliği ve reaktivite özelliği kitosanın moleküler ağırlığı ile ilişkilidir. Çünkü bazı bilim insanları kitosanın hücre membranındaki porlardan daha büyük olduğu için membranı etkilediğini düşünmez. Fakat 5

kDa moleküler ağırlığından daha düşük kitosan DNA sentezini bloke ettiği Raafat ve arkadaşları [119] tarafından rapor edilmiştir. Teikoik asitin etkisi *Staphylococcus aureus* bakteri türlerinde test edilmiştir. Bu çalışmaya göre teikoik asitin sentezinden sorumlu bazı genlerde mutasyon oluşturarak elde edilen mutant aureus ile yabanıl tip *S. aureus* kitosana karşı dirençliliği karşılaştırıldığında mutant tip daha dirençli olduğu saptanmıştır. Bu durum polikationik teikoik asitlerin gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteyi artırdığını göstermektedir [119]. Teikoik asitlerin fonksiyonları kabaca 3 büyük gruba bölünebilir, çevresel strese karşı koruma, enzim aktivitesinin ve hücre zarındaki kationik konsantrasyonun kontrolü, resöptörlere ve yüzeylere hücrenin bağlanması. Büyük olasılıkla kitosan teikoik asitler ile birlikte elektrostatik etkileşimi teikoik asitlerin fonksiyonlarını bozar ve bu durum olasılıkla hücre fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Diğer kationik bakterisidler de anyonik teikoik asitlerden dolayı gram pozitif bakterilerde aktivite göstermektedirler. Tüm bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda antimikrobiyal etkinin temel mekanizması teikoik asitlere ile birlikte elektrostatik etkileşimler ilişkilidir ve hücre ölümüne sebep olacak farklı fonksiyonların kaybolması anlamına gelmektedir.

Gram negatif bakterilerde dış mebranda iki mekanizma aktif olduğuna Bassi ve arkadaşları [120] ve Mansilla ve arkadaşları [121] tarafından öne sürülmektedir. Mekanizmalardan birisi pH değeri pKa değerinden düşük olduğunda farklı kationlarla birlikte kitosanın şelatlama özelliği ile ilişkilidir [120]. Bu durum hücre duvar bütünlüğünün dağılmasına sebep olabilir ve  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  gibi önemli besinlerin alınımını bozabilmektedir [19]. İkinci mekanizma ise dış mebrandaki lipopolisakkaritlerin anyonik kısımları ile kitosanın etkileşimini içermektedir. Bu mekanizmalar belirsizliğini sürdürmektedir. Günümüz çalışmaları kitosanın iç mebranı parçaladığını göstermektedir ki hücre içi materyallerin sızmasına sebep olmaktadır [121]. Ayrıca kitosanın gram negatif bakterilerin hücre mebranı boyunca geçebileceği gösterilmiştir [22, 121]. Bu durum kitosanın DNA/RNA sentezi ile birlikte girişim göstereceği ve hücre içerisinde hücresel yanıtları tetikleyeceğini göstermektedir. Sonuç olarak anyonik hücre yüzeyi ve kitosan arasındaki elektrostatik etkileşimler fungi ve bakterilere karşı kitosanın antimikrobiyal aktivitesini belirlemede temel faktörlerdir.

Deasetilasyon derecesi önemli bir antimikrobiyal belirleyici faktördür. Kitosan kitinden asetil gruplarının uzaklaştırılması sonucu elde edilmektedir. Böylelikle serbest amin grupları açığa

çıkmaktadır. Bu durum antimikrobiyal aktivite ile ilişkilidir [122]. Byun ve arkadaşları [123] yapmış olduğu çalışmada %81.56 DD sahip kitosan ile % 62.71 DD sahip kitosanın antimikrobiyal etisi incelendiğinde yüksek DD kitosan daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. Fakat Park ve arkadaşları [124] yapmış olduğu çalışmada %75 DD kitosan % 90 DD ve %50 DD kitosana göre daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca atmosferik şartlar altında elde edilen düşük DD kitosanın *E. coli*, *S. aureus* ve *Candida albicans* türlerine karşı daha iyi antifungal aktivite göstermiştir. Yine düşük DD kitosanın *S. aureus* için iyi bir inhibitör olduğunu ifade eden çalışmalarda bulunmaktadır [125, 126]. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde Cs %75-85 DD'ye sahipken, deasetilasyon derecesi serbest amino grubu ile doğru orantılı olacağından antimikrobiyal aktiviteyi artırıcı etki yapacağı ifade edilebilir. Fakat kitosanın antimikrobiyal etkisi tek başına deasetilasyon derecesi ile belirlenmediğinden bahsedilen diğer parametreler de antimikrobiyal etkisini değiştirmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada düşük DD sahip kitosanın (Cs) oldukça yüksek antimikrobiyal aktivitesi görülmüştür ve önceki çalışmalar ile uyumludur [124-126]. Deasetilasyon derecesindeki azalışın çeşitli fungi türlerinin inhibisyonunu azalttığı Hirono ve arkadaşları [109] tarafından bildirilmiştir. Bu durum inhibitör ajanın N-asetilkitosan olmadığı, aksine kationik amin grubunun ve karboksil grubunun inhibisyonunda rol aldığı anlamına gelmektedir.

Yapılan çalışmada modifiye kitosanın antitumor aktivitesi değerlendirildiğinde; kitosan türevinin antikanser çalışmaları MTT assay yöntemi ile 10-1000 µg/ml aralığında farklı konsantrasyonlar kullanılarak 24, 48, 72 saat inkübasyon süreleri için belirlendi. Şekil 3.16 HeLa kanser hücreleri üzerinde stotoksik etkisini göstermektedir. Çizelge 3.7 ise Şekil 3.16'da elde edilen veriler kullanılarak IC50 değerleri hesaplandı. Artan inkübasyon süresine karşı azalan IC50 değerleri ve HeLa kanser hücreleri üzerinde modifiye kitosanın sistotoksitesitesi hücre büyümelerinin zaman bağımlı ve konsantrasyon bağımlı inhibisyon sergilediğini göstermektedir. Mevcut çalışmamızda Çizelge 3.7'de görüldüğü gibi 24 saat sonrasında kitosan türevinin IC50 değeri  $81.57 \pm 5.30$  µg/ml olarak belirlenmiştir [127].

Wang ve arkadaşları [51] tarafından yapılan deneysel çalışmada kitosan temelli olmadan sentezlenen 3 ve 6- sülfatidin B16F10 kanser hücrelerinin adezyonunu, göç etme durumunu ve istila durumunu azalttığını ancak 25 µM ve 75 µM konsantrasyonlarında hiçbir sitotoksik etki göstermediği, FAK, Akt, Erk aktivasyonunu azalttığı, a5 ve B1 protein ekspresyon seviyelerini

azalttığı, deneyleri sülfat içermeden gerçekleştirildiğinde ise kanser hücrelerinin göç etmesi, yayılması ve tutunma durumlarında herhangi bir azalma olmayışın sülfatlamanın önemli rolünü ortaya koyduğu ve sülfatit yapıların kanserin göç etmesinin engellenmesinde önemli bir ilaç adayı olabileceğini Wang ve arkadaşları vurgulamaktadırlar.

Abedian ve arkadaşları [128] yapmış oldukları çalışmada 600-800 kDa büyüklüğünde büyük moleküler ağırlıklı kitosan ve 100-300 kDa büyüklüğünde düşük moleküler ağırlıklı kitosan HeLa kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde konsantrasyon bağımlı hücre biyokütlesinde azalma gözlemlenmiştir. Kanser hücreleri normal hücreler ile kıyaslandığında görece olarak daha çok negatif yüklüdür ve kitosanının amino grupları ile kolay reaksiyon verebilmektedir [129]. Farklı kanser hücre hatları üzerinde kitosan türevlerinin etkisine literatür [130] içerisinde bakıldığında kitosan temelli sentezlenen nanopartiküllerin HepG2 kanser hücreleri üzerine 100, 50, 25, 12.5, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$  uygulandığında sadece 100  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$  konsantrasyonu 48 saat sonra HepG2 hücrelerinin %12'si kadarını öldürmüştür ve IC50 değeri 239  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$  olarak saptanmıştır.

İster negatif yüklü ister pozitif yüklü olsun, artırılmış net yükün sitotoksik etkiyi artırdığını ileri süren Huang ve arkadaşları [131] yapmış oldukları çalışmada, kitosan temelli sentezlenen dört farklı kitosan türevlerinin (COS (kitosan oligosakkarit), QCOS (Quaternize amino kitosan oligosakkarit), CCOS (karboksil kitosan oligosakkarit), SCOS (sülfatlanmış kitosan oligosakkarit)) HeLa, Hep3B, SW480 hücre hatlarına karşı sergilemiş oldukları sitotoksik etkide QCOS ve SCOS türevleri HeLa ve SW480 hücreleri üzerine artan konsantrasyonlara bağlı olarak benzer sitotoksik etki sergilediklerini rapor etmişlerdir. HeLa hücre hattı üzerine QCOS ve SCOS türevlerinin IC50 değerleri sırayla 450 ve 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olarak belirlenmiştir. Kendi yaptığımız çalışmada ise bu değer 81  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak bizim sentezlediğimiz sülfatit benzeri molekülün HeLa hücrelerine karşı daha çok toksik olduğu anlamı çıkarılmaktadır.

Lee ve arkadaşları [132] yapmış oldukları çalışmada kitosan türevlerinin HeLa kanser hücreleri üzerinde etkileri incelendiğinde IC50 değerleri sırasıyla qNH<sub>2</sub>-chitosan, DEAE-chitosan, qDEAE-chitosan 118  $\pm$ 15, 72  $\pm$ 12, 31  $\pm$ 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak belirlenmiştir. Bu durum net elektrik yükü ve hidrofobite sitotoksik aktivite ile ilişkili olduğunu söylemektedir. Lee ve arkadaşları [132] yapmış oldukları çalışmada artırılmış hidrofobitenin sitotoksik etkiyi artırmış olması, kendi deneyimizde sentezlemiş olduğumuz sülfatit benzeri molekülün de oleik asit içermesinden dolayı

hidrobobik bir karakteri vardır ve sitotoksik açıdan etkisinin olması Lee ve arkadaşları [132] tarafından rapor edilen sonuçlar ile uyumludur. Çünkü hidrofobik yapı kanser hücrelerinin yüzeyindeki fonksiyonel kalıntılarla reaksiyon vermesinden kaynaklanmaktadır. Bu tür hidrofobik etkileşimler polimer yüzeyindeki anyonların çökmesine sebep olabilir. Her ne kadar antitümör etkisinde pozitif yüklü polimer yüzeyi ile negatif yüklü kanser hücre yüzeyleri arasındaki elektrostatik iyonik etkileşimlerden kaynaklansa bile tümör hücre yüzeyi ve kitosan materyali arasındaki hidrofobik etkileşimleri gibi ikincil bağlanma güçleri de antitümör aktiviteyi etkilemektedirler.

Sonuç olarak başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve alanındaki öncül makalede yayınlanılarak literatürdeki [127] yerini alan kitosan türevi;

1-*Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı antibakteriyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

2- *Candida albicans* türüne karşı antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir.

3- HeLa kanser hücrelerine karşı da sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

4-Avantajları ve dezavantajları belirlenmiştir.

5- Kanser metazmasını önlemek amacıyla ilk kez sülfatit yapısını taklit eden kitosan temelli oleik asit sülfatitin sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] **Muzzarella, R. A. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., Demarchis, M., ve Paoletti, M. G.** (2012). Current Views on Fungal Chitin/Chitosan, Human Chitinases, Food Preservation, Glucans, Pectins and Inulin: A Tribute to Henri Braconnot, Precursor of the Carbohydrate Polymers Science, on the Chitin Bicentennial, *Carbohydrate Polymers*, 87, 995-1012.
- [2] **J. P. Jikakis (Ed.)** (1984), Chitin, Chitosan and Related Enzymes, *Academic, Orlando, FL*, pp. XVII–XVIV.
- [3] **Chhabra, P.** (1999). Antimicrobial And Antioxiđant Properties Of Chitosan B.S., S.I.E.S. College of Arts, Science and Commerce, Mumbai, India, 1999 *Post-Graduate Diploma, S.N.D.T. University, Mumbai, India, 2001.*
- [4] **Ogawa, K., Yui, Toshifumi, Y., ve Okuyama, K.** (2004). Three D Structures of chitosan. *Int. J of Biological Macromolecules* 34(1-2):1-8.
- [5] **Ravi Kumar, M. N. V.** (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers* 46: 1-27.
- [6] **Wu, A. C. M., Bough, W. A. A.** (1978). Study of Variables in the Chitosan Manufacturing Process in Relation to Molecular Weight Distribution, Chemical Characteristic and Waste Treatment Effectiveness. In A, M. R. A. and Pariser, E. R. (Eds.) *Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan. MIT Programme, Cambridge, M. A.*
- [7] **Fei, C.** (2009). Modification Of Chitosan For Simultaneous Antioxiđant And Antibacterial Functions (B. Eng Ecust) A Thesis Submitted For The Degree Of Master Of Engineering Department Of Chemical And Biomolecular Engineering National University Of Singapore 2009.
- [8] **Tsai, G. J., Tsai, M. T., Lee, J. M. ve Zhong, M. Z.** (2006). Effects of Chitosan and a Low-Molecular-Weight Chitosan on *Bacillus Cereus* and Application in the Preservation of Cooked Rice. *J. Food Protect.* 69, pp. 2168-2175.
- [9] **Goy, R. C., De Britto, D., ve Assis, O. B. G.,** (2009). A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19, 241-247,



- [10] **Guo, Z. Y., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z. M., Ji, X., Wang, L. ve Li, P. C.** (2008). The Influence of Molecular Weight of Quaternized Chitosan on Antifungal Activity. *Carbohydr. Polym.*, 71, pp. 694-697.
- [11] **Rinaudo, M., Pavlov, G. ve Desbrieres, J.** (1999). Influence of Acetic Acid Concentration on the Solubilization of Chitosan. *Polymer*, 40, pp. 7029-7032.
- [12] **Xie, W. M., Xu, P. X. ve Liu, Q.** (2001). Antioxidant Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, pp. 1699-1701.
- [13] **Hirano, S.** (1989). Production and application of chitin and chitosan in Japan. In *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical properties and Applications*. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., and Sandford, P. Elsevier Science Publishers Ltd., New York. p 51-69.
- [14] **Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z. ve De Yao, K.** (2001). Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79, pp. 1324-1335.
- [15] **Franklin, T. J., Snow, G. A.** (1981). *Biochemistry of antimicrobial action*. Chapman and Hall, London and New York.
- [16] **Nikaido, H.** (1996). Outer membrane. 2nd edn. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C. (Ed.), Vol 1. American Society for Microbiology, Washington, DC. p 29-47.
- [17] **Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., ve Roller, S.** (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International J Food Microbiology* 71:235-244.
- [18] **Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., ve Knorr, D.** (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology* 6(3): 257-272.
- [19] **M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, H. J.** (2010). Park Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review *International Journal of Food Microbiology*, 144, pp. 51-63.
- [20] **Palma-Guerrero, J. A., Lopez-Jimenez, A. J., Perez- Berna, I.C., Huang, H. B., ve Jansson, J. S.,** (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan *Molecular Microbiology*, 75, pp. 1021-1032

- [21] **Eaton, P., Fernandes, J. C., Pereira, E., Pintado, M. E. ve Xavier Malcata, F.** (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* *Ultramicroscopy*, 108, pp. 1128-1134
- [22] **Park, S. C., Nah, J. W. ve Park, Y.** (2011). pH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens *Macromolecular Research*, 19, pp. 853-860.
- [23] **Krajewska, B., Wydro, P., ve Janczyk, A.** (2011). Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. *Biomacromolecules*, 12, 4144–4152.
- [24] **Verlee, A., Mincke, S. ve Stevens, C. V.** (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives *Carbohydrate Polymers* 164 268–283
- [25] **Shahidi, F. ve Kamil, J. Jeon, Y. J. ve Kim, S. K.** (2002). Antioxidant role of chitosan in a cooked Cod (*Gadus Morhua*) Model System. *J. Food Lipids* 9: 57-64.
- [26] **Jeon, Y. J., Kamil, J. ve Shahidi F.** (2002). Chitosan as an edible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(18):5167-5178.
- [27] **Kima, S. K. ve Rajapakse, N.** (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review *Carbohydrate Polymers* 62 357–368.
- [28] **Rokhati, N., Susanto, H., Istirokhatun, T., Purwono ve Pramudono B.** (2018). Performance Comparison of Commercial Enzymes for the Synthesis of Glucosamine by Chitosan Hydrolysis in The Presence of Surfactant *MATEC Web of Conferences* 156, 01006
- [29] **Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., ve Chiellini, E.,** (2011). Chitosan-A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications, *Progress in Polymer Sci.*, 36, 981-1014.
- [30] **Wu, S.** (2011). Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis with commercial  $\alpha$ -amylase containing chitosanase activity *Food Chemistry* 128 769–772.

- [31] **Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M. ve Vincent Eijsink, G. H.** (2010). Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine *Mar. Drugs*, 8, 1482-1517 doi:10.3390/md8051482.
- [32] **Liaqata, F. ve Eltem, R.** (2018). Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review *Carbohydrate Polymers* 184 243–259.
- [33] **Hong Kyoon, N., Na Young, P., Shin Ho, L. ve Samuel, P. M.** (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights *International Journal of Food Microbiology* 74 65–72.
- [34] **Naveed, M., Phil, L., Sohail, M., Hasnat, M., Baig, M. M. F. A., Ihsan, A. U., Shumzaid, M., Kakar, M. U., Khan, T. M., Akabar, MD., Hussain, M. I. ve Zhou, Q. G.** (2019). Chitosan oligosaccharide (COS): An overview *International Journal of Biological Macromolecules* 129 827–843.
- [35] **Churchward, C. P., Alany, R. G. ve Snyder, L. A. S** (2018). Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides, *Critical Reviews in Microbiology*, 44:5, 561-570, DOI: 10.1080/1040841X.2018.1467875.
- [36] **Kanetsuna F.** (1985). Bactericidal effect of fatty acids on mycobacteria, with particular reference to the suggested mechanism of intracellular killing. *Microbiol Immunol.* 29:127–141.
- [37] **Knapp H. R. ve Melly M. A.** (1986). Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. *J Infect Dis.* 154:84–94.
- [38] **Yoon B.K., Jackman J.A., Kim M.C. ve Cho N.J.** (2015). Spectrum of membrane morphological responses to antibacterial fatty acids and related surfactants. *Langmuir.* 31:10223–10232.
- [39] **Yoshioka, H., Nonaka, K., Fukuda, K. ve Kazama, S.** (1995). Chitosanderived polymer-surfactants and their micellar properties. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 59, 1901-1904.
- [40] **Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. ve Rudzinski, W. E.** (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Controlled Release*, 70, 1-20.

- [41] **Lee, K. Y., Jo, W. H., Kwon, I. C., Kim, Y. H. ve Jeong, S. Y.** (1998). Structure determination and interior polarity of self-aggregates prepared from deoxycholic acid-modified chitosan in water. *Macromolecules*, 31, 378-383.
- [42] **Murata, J., Saiki, I., Nishimura, S. I., Nishi, N., Tokura, S. ve Azuma, I.** (1989). Inhibition of tumor cell arrest in lungs by antimetastatic chitin heparinoid. *Jpn.J. Cancer Res.* 80) 866–872.
- [43] **Tokura, S., Itoyama, K., Nishi, N., Nishimura, S. I., Saiki, I. ve Azuma, I.** (1994). Selective sulfation of chitin derivatives for biomedical functions *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* A31 1701–1718.
- [44] **Nishimura, K., Nishimura, S. I., Nishi, N., Tokura, S. ve Azuma, I.** (1990). Immunological activity of chitin and its derivatives. *Mol. Bioether.* 2 115–120.
- [45] **Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S. ve Tamura H.** (2007). Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials – Review, *International Journal of Biological Macromolecules* 40 175–181.
- [46] **Chen, X. G., Lee, C. M. ve Park, H. J.** (2003). O/W Emulsification for the Self-Aggregation and Nanoparticle Formation of Linoleic Acids Modified Chitosan in the Aqueous System *J. Agric. Food Chem.* 51, 3135–3139.
- [47] **Yang, J., Xie, Q., Zhu, J., Zou, C., Chen, L., Du, Y. ve Li, D.** (2015). Preparation and in vitro antioxidant activities of 6-amino-6-deoxychitosan and its sulfonated derivatives. *Biopolymers*, 103(10), 539–549.
- [48] **Hiroki, O., Yoshiko, S., Saori, K., Erika, S., Ryotaro, M., Takayuki, K., Fumiya, K., Noriyasu, H. ve Tadashi, K.** (2012). Sulfatides Inhibit Adhesion, Migration, and Invasion of Murine Melanoma B16F10 Cell Line in Vitro *Biol. Pharm. Bull.* 35(11) 2054–2058.
- [49] **Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S. ve Friedl, A.** (2002). Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor- 2 receptor binding in breast carcinomas, *The American Journal of Pathology*, vol. 160, no. 1, pp. 185–194.
- [50] **Dimassi, S., Tabary, N., Chai, F., Blanchemain, N. ve Martel, B.** (2018). Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: A review *Carbohydrate Polymers* Volume 202, 15 December 2018, Pages 382-396.

- [51] **Li, Y., Wang, W., Zhang, Y., Wang, X., Gao, X., Yuan, Z. ve Li, Y.** (2019). Chitosan Sulfate Inhibits Angiogenesis via Blocking VEGF/VEGFR2 Pathway and Suppress Tumor Growth in Vivo *Biomater. Sci.*, 2019, DOI: 0.1039/C8BM01337C.
- [52] **Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C. ve Taylor, S.** (1983). Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone *Science* 19 Aug 1983: Vol. 221, Issue 4612, pp. 719-725 DOI: 10.1126/science.6192498.
- [53] **Falanga, A. ve Marchetti, M.** (2007). Heparin in Tumor Progression and Metastatic Dissemination *Semin Thromb Hemost*; 33(7): 688-694 DOI: 10.1055/s-2007-991536.
- [54] **Wang, Z., Xie, J., Shen, M., Nie, S. ve Xie, M.** (2018). Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities *Review Trends in Food Science & Technology* 74 (2018) 147–157.
- [55] **Mitra, N., Banda, K., Altheide, TK., Schaffer, L., Johnson-Pais, TL. ve Beuten, J.** (2011). SIGLEC12, a human-specific segregating (Pseudo)gene, encodes a signaling molecule expressed in prostate carcinomas. *J Biol Chem* 286(26):23003–11. doi:10.1074/jbc.M111.244152.
- [56] **Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G. ve Etzler, M.** (2019). *Essentials of Glycobiology. 2nd edition, Chapter 31. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1943/>.*
- [57] **Cagnoni, A. J., Pérez Sáez, Y. M., Rabinovich, G. A. ve Mariño, K. V.** (2016). Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins: Chemical inhibition of Glycan-Dependent interactions in Cancer Review *Front. Oncol.*, 13 May 2016 <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00109>.
- [58] **Naggi, A. M., Torri, G., Compagnoni, T. ve Casu, B.** (1986). Synthesis and physicochemical properties of the polyampholyte chitosan-6-sulfate, in: R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, G.W. Gooday (Eds.), *Chiton in nature and technology*, Plenum Press, New York, pp. 371–377.
- [59] **Hadwiger, L. A. ve Beckman, J. M.** (1980). Chitosan as a Component of Pea-Fusarium solani Interactions. *Plant Physiol.* 66 205–211.

- [60] **Varma A. J., Deshpandea, S. V. ve Kennedy, J. F.** (2004). Metal Complexation by Chitosan and Its Derivatives: A Review”, *Carbohydr. Polym.*, 55, 77-93.
- [61] **Kauss, H., Jeblick, W. ve Domard, A.** (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*, *Planta* 178 385–392.
- [62] **Zhang, C., Ping, Q., Zhang, H. ve Shen, J.** (2003). Preparation of N-alkyl-O-sulfate chitosan derivatives and micellar solubilization of taxol. *Carbohydr. Polym.* 54 137–141.
- [63] **El Fray, M., Niemczyk, A. ve Pabin-Szafko, B.** (2012). Chemical modification of chitosan with fatty acids. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 17, 29-36.
- [64] **Chen, Z. P., Wang, W., Guo, L., Yu, Y.Y. ve Yuan, Z.** (2013). Preparation of enzymatically cross-linked sulfated chitosan hydrogel and its potential application in thick tissue engineering, *Science China Chemistry* 56(12) 1701–1709.
- [65] **Nam, J. P., Park, S. C., Kim, T. H Jang, J. Y., Choi, C., Jang, M. K. ve Nah, J. W.** (2013). Encapsulation of paclitaxel into lauric acid-O-carboxymethyl chitosan-transferrin micelles for hydrophobic drug delivery and site-specific targeted delivery *International Journal of Pharmaceutics* 457 124–135
- [66] **Zhao, L., Hu, Y., Xu, D. ve Cai, K.** (2014). Surface functionalization of titanium substrates with chitosan–lauricacid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 119 115–125.
- [67] **Wang, J. ve Wang, H.** (2011). Preparation of soluble p-aminobenzoyl chitosan ester by Schiff’s base and antibacterial activity of the derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules* 48 523–529.
- [68] **Cai, J., Dang, Q., Liu, C., Wang, T., Fan, B., Yan, J. ve Xua, Y.** (2015). Preparation, characterization and antibacterial activity of O-acetyl-chitosan-N-2 hydroxypropyltrimethylammoniumchloride, *International Journal of Biological Macromolecules* 80 8-15.

- [69] **Jou, C.** (2011). Anti bacterial activity and cytocompatibility of chitosan-N-hydroxy-2,3-propyl-N-methyl-N,N-diallylammonium methyl sulfate, *Colloids and Surfaces: Biointerfaces* 88 448–454.
- [70] **Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J. ve Vistica, D.** (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J Natl Cancer Inst.* 82(13) 1107-12.
- [71] **Almeida, A., Araújo, M., Novoa-Carballal, R., Andrade, F., Gonçalves, H., Reis, R. L. ve Sarmiento, B.** (2020). Novel amphiphilic chitosan micelles as carriers for hydrophobic anticancer drugs. *Materials Science and Engineering: C*, 110920.
- [72] **Wang, T., Zhou, Y., Xie, W., Chen, L., Zheng, H. ve Fan, L.** (2012). Preparation and anticoagulant activity of N-succinyl chitosan sulfates. *International journal of biological macromolecules*, 51(5), 808-814.
- [73] **Van de Velde, K. ve Kiekens, P.** (2004). Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state <sup>13</sup>C NMR. *Carbohydrate polymers*, 58(4), 409-416.
- [74] **Huang, L., Cheng, X., Liu, C., Xing, K., Zhang, J., Sun, G. ve Chen, X.** (2009). Preparation, characterization, and antibacterial activity of oleic acid-grafted chitosan oligosaccharide nanoparticles. *Frontiers of Biology in China*, 4(3), 321-327.
- [75] **Noor, N. M., Sheikh, K., Somavarapu, S. ve Taylor, K. M.** (2017). Preparation and characterization of dutasteride-loaded nanostructured lipid carriers coated with stearic acid-chitosan oligomer for topical delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 117, 372-384.
- [76] **Niemczyk, A., Kmiecik, A., El Fray, M. ve Piegat, A.** (2016). The Influence of C18-Fatty Acids on Chemical Structure of Chitosan Derivatives and Their Thermal Properties, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 21 165-175.
- [77] **Lima, P. H., Pereira, S. V., Rabello, R. B., Rodriguez-Castellón, E., Beppu, M. M., Chevallier, P. ve Vieira, R. S.** (2013). Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and  $\kappa$ -carrageenan films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 719-725.

- [78] **Ouerghemmi, S., Dimassi, S., Tabary, N., Leclercq, L., Degoutin, S., Chai, F. ve Blanchemain, N.** (2018). Synthesis and characterization of polyampholytic aryl-sulfonated chitosans and their in vitro anticoagulant activity. *Carbohydrate polymers*, 196, 8-17.
- [79] **Qu, G., Wu, X., Yin, L. ve Zhang, C.** (2012). N-octyl-O-sulfate chitosan-modified liposomes for delivery of docetaxel: preparation, characterization, and pharmacokinetics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 66(1), 46-51.
- [80] **Vongchan, P., Sajomsang, W., Subyen, D. ve Kongtawelert, P.** (2002). Anticoagulant activity of a sulfated chitosan. *Carbohydrate Research*, 337(13), 1239-1242.
- [81] **Falshaw, R. ve Furneaux, R. H.** (1998). Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae, *Gigartina lanceata* and *Gigartina chapmanii* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, 307(3-4), 325-331.
- [82] **Yang, J., Du, Y., Huang, R., Wan, Y. ve Li, T.** (2002). Chemical modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of Chinese lacquer polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 31(1-3), 55-62.
- [83] **Cardoso, J., Nava, D., García-Morán, P., Hernández-Sánchez, F., Gomez, B., Vazquez-Arenas, J. ve González, I.** (2015). Synthesis, characterization, and theoretical insights of green chitosan derivatives presenting enhanced Li<sup>+</sup> ionic conductivity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(9), 4655-4665.
- [84] **Wang, T., Zhou, Y., Xie, W., Chen, L., Zheng, H. ve Fan, L.** (2012). Preparation and anticoagulant activity of N-succinyl chitosan sulfates, *International Journal of Biological Macromolecules* 51 (5) 808-814.
- [85] **Nishimura, S. I., Kai, H., Shinada, K., Yoshida, T., Tokura, S. ve Kurita, K.** (1998). Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: Specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates, *Carbohydrate Research* 306 427–433.
- [86] **Vongchan, P., Sajomsang, W., Subyen, D. ve Kongtawelert, P.** (2002). Anticoagulant activity of a sulfated chitosan, *Carbohydrate Research* 337 1239–1242.35-



- [87] **Tien, C. L., Lacroix, M., Ispas-Szabo, P. ve Mateescu, M.** (2003). N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release, *J. Controlled Release* 93 1-13.
- [88] **Li, Y., Zhang, S., Meng, X., Chen, X. ve Ren, G.** (2011). The preparation and characterization of a novel amphiphilic oleoyl-carboxymethyl chitosan self-assembled nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 83 130–136.
- [89] **Katugampola, P. ve Winstead, C.** (2014). Rheological behavior and thermal stability of palmitoyl chitosan varying the degree of substitution, *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*. 3(11) 24-32.
- [90] **Skorik, Y. A., Kritchenkov, A. S., Moskalenko, Y. E., Golyshev, A. A., Raik, S. V., Whaley, A. K., Vasina, L. V. ve Sonin, D. L.** (2017). Synthesis of N-succinyl- and N-glutaryl-chitosan derivatives and their antioxidant, antiplatelet, and anticoagulant activity, *Carbohydrate Polymers*. 166 (15) 166-172.
- [91] **Queiroz, M. F., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sasaki, G. L. ve Rocha, H. A. O.** (2015). Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?, *Mar. Drugs* 13 141-158.
- [92] **Guo, H., Zhang, D., Li, C., Jia, L., Liu, G., Hao, L. ve Zhang, Q.** (2013). Self-assembled nanoparticles based on galactosylated O-carboxymethyl chitosan-graft-stearic acid conjugates for delivery of doxorubicin. *International journal of pharmaceutics*, 458(1), 31-38.
- [93] **Shelma, R. ve Sharma, CP.** (2011) . Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan, *Colloids Surf B Biointerfaces* 1;84(2) 561-70.
- [94] **Ferrero, F. ve Periolatto, M.** (2012). Antimicrobial Finish of Textiles by Chitosan UV-Curing, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 12(6) 4803-10.
- [95] **Orrego, C. E. ve Valencia, J. S.** (2009). Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(2), 197.

- [96] **Zariwala, M. G., Bendre, H., Markiv, A., Farnaud, S., Renshaw, D., Taylor, K. M. G. ve Somavarapu, S.** (2018) . Hydrophobically modified chitosan nanoliposomes for intestinal drug delivery, *Int J Nanomedicine*. 13 5837–5848.
- [97] **Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. ve Park, H. J.** (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
- [98] **Goy, R. C., Britto, D. D. ve Assis, O. B.** (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241-247.
- [99] **Hosseinnejad, M. ve Jafari, S. M.** (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 85, 467-475.
- [100] **Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K. ve Nasri, M.** (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International journal of food microbiology*, 185, 57-63.
- [101] **Devlieghere, F., Vermeulen, A. ve Debevere, J.** (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, 21(6), 703-714.
- [102] **Jing, Y., Hao, Y., Qu, H., Shan, Y., Li, D. ve Du, R.** (2007). Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. *Acta Biologica Hungarica*, 58(1), 75-86.
- [103] **Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M. ve Ocio, M. J.** (2009). Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 913-921.
- [104] **Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S., Meng, X. H. ve Yu, L. J.** (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate polymers*, 64(1), 60-65.

- [105] **Li, X. F., Feng, X. Q., Yang, S., Fu, G. Q., Wang, T. P. ve Su, Z. X.** (2010). Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 493-499.
- [106] **No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H. ve Meyers, S. P.** (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 65-72.
- [107] **Kulikov, S. N., Lisovskaya, S. A., Zelenikhin, P. V., Bezrodnykh, E. A., Shakirova, D. R., Blagodatskikh, I. V. ve Tikhonov, V. E.** (2014). Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight–activity relationship. *European journal of medicinal chemistry*, 74, 169-178.
- [108] **Chang, S. H., Lin, H. T. V., Wu, G. J. ve Tsai, G. J.** (2015). pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate polymers*, 134, 74-81.
- [109] **Hirano, S. ve Nagao, N.** (1989). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and biological chemistry*, 53(11), 3065-3066.
- [110] **El-Tahlawy, K. F., El-Bendary, M. A., Elhendawy, A. G. ve Hudson, S. M.** (2005). The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. *Carbohydrate polymers*, 60(4), 421-430.
- [111] **Badawy, M.E.I.** (2010). Structure and antimicrobial activity relationship of quaternary N-alkyl chitosan derivatives against some plant pathogens *Journal of Applied Polymer Science*, 117, pp. 960-969.
- [112] **Naberezhnykh, G. A., Bakholdina, S. I., Gorbach, V. I. ve Solov'eva, T. F.** (2009). New chitosan derivatives with potential antimicrobial activity. *Russian journal of marine biology*, 35(6), 498-503.
- [113] **Pei, L., Cai, Z., Shang, S. ve Song, Z.** (2014). Synthesis and antibacterial activity of alkylated chitosan under basic ionic liquid conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(7).

- [114] **Cao, W., Yue, L. ve Wang, Z.** (2019). High antibacterial activity of chitosan–molybdenum disulfide nanocomposite. *Carbohydrate polymers*, 215, 226-234.
- [115] **Zhong, Z., Li, P., Xing, R. ve Liu, S.** (2009). Antimicrobial activity of hydroxybenzenesulfonamides derivatives of chitosan, chitosan sulfates and carboxymethyl chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 45(2), 163-168.
- [116] **Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. G. ve Lin, J. G.** (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta pharmacologica sinica*, 25(7), 932-936.
- [117] **Galvan Marquez, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A. ve Smith, M.L.** (2013). Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan *International Journal of Food Microbiology*, 164 , pp. 108-112.
- [118] **Ruess, L., Häggblom, M. M., García Zapata, E. J. ve Dighton, J.** (2002). Fatty acids of fungi and nematodes—possible biomarkers in the soil food chain? *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 745–756.
- [119] **Raafat, D., Yon Barga, K., Haas, A. ve Sahl, H. G.** (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound *Applied and Environmental Microbiology*, 74, pp. 3764-3773.
- [120] **Bassi, R., Prasher, S.O. ve Simpson, B.K.** (1999). Effects of organic acids on the adsorption of heavy metal ions by chitosan flakes *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 34, pp. 289-294.
- [121] **Mansilla, A. Y., Albertengo, L., Rodriguez, M. S., Debbaudt, A., Zuniga, A. ve Casalongue, C. A.** (2013). Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, pp. 6957-6966.
- [122] **Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M. ve Alagui, A.** (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, 44(26), 7939-7952.

- [123] **Byun, S. M., No, H. K., Hong, J. H., Lee, S. I. ve Prinyawiwatkul, W.** (2013). Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(1), 136-142.
- [124] **Park, P. J., Je, J. Y., Byun, H. G., Moon, S. H. ve Kim, S. K.** (2004). Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal of microbiology and biotechnology*, 14(2), 317-323.
- [125] **Hongpattarakere, T. ve Riyaphan, O.** (2008). Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 1.
- [126] **Takahashi, T., Imai, M., Suzuki, I. ve Sawai, J.** (2008). Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 485-491.
- [127] **Kocabay, S. ve Akkaya, B.** (2019). Preparation of sulfatide mimicking oleic acid sulfated chitosan as a potential inhibitor for metastasis. *International journal of biological macromolecules*, Volume 147, 15 March 2020, Pages 792-798
- [128] **Abedian, Z., Moghadamnia, A. A., Zabihi, E., Pourbagher, R., Ghasemi, M., Nouri, H. R. 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.
- [129] **Zhang J., Xia W. ve Liu P.** (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Mar Drugs*; 8: 1962-87
- [130] **Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M. T. M. ve Abdellah, A. M.** (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035008.
- [131] **Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N. ve Kim, S. K.** (2006). Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life sciences*, 78(20), 2399-2408.

[132] **Lee, J. K., Lim, H. S. ve Kim, J. H.** (2002). Cytotoxic activity of aminoderivatized cationic chitosan derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 12(20), 2949-2951.



## EKLER

<b>EK-1</b>	
<b><u>KULLANILAN KİMYASALLAR</u></b>	<b><u>KULLANILAN CİHAZLAR</u></b>
Kitosan	Evaporatör
HCISO <sub>3</sub>	Liyafilizatör
EDC	Santrifüj
FA	Otoklav
Aseton	Etüv
Asetik Asit	Hassas Terazi
Dietileter	Kaba Terazi
Amonyak	Çalkalamalı Etüv
Metanol	Spektrofotometre
Etanol	Ph Metre
NHS	Magnetik Karıştırıcı
N,N- Dimetilformamid	Buzdolabı
Oleic Asit	Buz Makinası
Distile Su	Distile Su Cihazı
HCl	NMR
NaOH	FTIR
LB	DSC
Agar	SEM
Formamid	Çeker Ocak (Kabin)
DMEM	Mikroskop
RPMI	Hücre Kültür Kabini
Tripsin	Sıvı Azot Tankı
FBS	Karbondioksit Etüvü
Penicilin	
Gliserol	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
MTT	
NaCl	
DMSO	
CO <sub>2</sub>	

<b>EK-2</b>	
<b>DENEYSEL ÇALIŞMADA KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR</b>	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> CICC 21524
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 60193
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Kişisel bilgiler**

Adı Soyadı: Samet KOCABAY

Doğum Yeri ve Tarihi: 05.05.1989

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dil: İngilizce

İletişim Adresi: Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 58140 Sivas

E-posta Adresi: samet.kocabay@inonu.edu.tr

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

Lise	Gazi Osman Paşa Lisesi, TOKAT / 2007
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, SİVAS / 2012
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, SİVAS / 2015
Doktora	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, SİVAS / 2020

### **İş Tecrübesi**

İnönü Üniversitesi Araştırma Görevlisi, 2013 Devam ediyor...

### **Yayınlar**

#### **Yayın şekli**

Uluslararası

#### **Basılmış Yayınlar**

Yavuz, S., **Kocabay, S.**, Çetinkaya, S., Akkaya, B., Akkaya, R., Yenidunya, A. F., & Bakıcı, M. Z. (2017). Production, purification, and characterization of metalloprotease from *Candida kefyr* 41 PSB. *International journal of biological macromolecules*, 94, 106-113.



Uluslararası **Kocabay, S.,** Çetinkaya, S., Akkaya, B., & Yenidünya, A. F. (2016). Characterization of thermostable  $\beta$ -amylase isozymes from *Lactobacillus fermentum*. *International journal of biological macromolecules*, 93, 195-202.

**Tezden çıkan yayınlar**

Uluslararası **Kocabay, S.,** & Akkaya, B. (2020). Preparation of sulfatide mimicking oleic acid sulfated chitosan as a potential inhibitor for metastasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 792-798.

**Hakem Değerlendirme Sürecindeki Makale Adayları**

Uluslararası **Samet Kocabay,** Recep Akkaya, Mehmet Refik Bahar, Suat Tekin, Birnur Akkaya. (2020). “Chemical and biological characterization of new Heparin mimetic sulfated chitosan oligomer” **Hakem değerlendirme süreci devam ediyor**

Uluslararası **Samet Kocabay,** Irmak Icen Taskın. (2020). “Screening of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in Low pH” **Hakem değerlendirme süreci devam ediyor**

Ulusal Serap Çetinkaya, **Samet Kocabay,** Ali Fazıl Yenidünya. (2020). “An investigation of the probiotic properties of *Lactobacillus fermentum*” **Hakem değerlendirme süreci devam ediyor**