

Evaluation of Waste Snake Molt as a Delivery System and in Vitro Release of D-Panthenol

Betül Aktaş[✉], Lalehan Akyüz[✉], Murat Kaya^{*✉}

Aksaray University, Faculty of Science and Letters, Department of Molecular Biology and Genetics, Aksaray, Turkey

Keywords

Snake Skin, Snake Shedding,
Snake Molting, Drug Loading,
Wound Healing

Article information

Received: May 17, 2023
Accepted: July 2, 2023
Online: Dec 15, 2023

doi: [10.29002/asujse.1298383](https://doi.org/10.29002/asujse.1298383)

Abstract

Biomolecules such as collagen, silk and keratin are frequently preferred in medical fields as wound healing and drug delivery systems, thanks to their many unique properties. Keratin-based materials, which are a strong structural proteins such as feathers, hooves, hair and wool, are preferred for drug release because they are nanotoxic and biocompatible. However, no studies have been conducted on the drug release of the snake skin containing keratin as a structural protein. Controlled drug release is very important in terms of maximum benefit, minimum harm and patient comfort from therapeutic agents. In the present study, the waste shedding of *Dolichophis caspius* (Hazer snake, bozyoruk) which has high keratin content and widely distributed was evaluated as a drug carrier biomaterial for the first time. D-Panthenol, which is commonly used in wound healing, was loaded on three different parts of the untreated waste snake skin, dorsal scale, ventral scale and hinge, and its release properties were investigated. Average drug loading capacities for the dorsal scale, ventral scale and hinge portions, were recorded as $2.07 \pm 0.13\%$, $1.28 \pm 0.04\%$ and $1.77 \pm 0.95\%$. The release was measured by taking sample for every hour at least for 24 hours. In the first hour, 46.67% of the drug was released in the dorsal scale, 80.09% in the ventral scale and 69.85% in the hinge portion. Based on these results, especially the dorsal scale part was developed in future studies and it was revealed that it is a potential biomaterial for controlled drug release.

Atık Yılan Gömleğinin Taşıyıcı Sistem Olarak Değerlendirilmesi ve D-Panthenol'ün in Vitro Salımı

Anahtar Kelimeler

Yılan Derisi, Yılan Dökülmesi,
Yılan Deri Değişimi, İlaç
Yükleme, Yara İyileştirme

Özet

Kolajen, ipek ve keratin gibi biyomoleküller sahip oldukları birçok eşsiz özellikleri sayesinde yara iyileştirme ve ilaç taşıma sistemleri olarak medikal alanda sıkça tercih edilmektedir. Özellikle tüy, toynak, saç ve yünde bulunan, güçlü bir yapısal protein olan keratin bazlı materyaller, nantoksik ve biyoyumlu olmalarından dolayı ilaç salımı amaçlı tercih edilmektedir. Fakat yapısal protein olarak keratin içeren yılan gömleği için ilaç salımı üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Kontrollü ilaç salımı, terapötik ajanlardan maksimum fayda sağlanması, minimum zarar görülmesi ve hasta konforu açısından oldukça önemlidir. Mevcut çalışmada, yüksek keratin içeriğine sahip ve oldukça geniş bir yayılım gösteren *Dolichophis caspius*' un (Hazer yılanı, bozyörük) atık gömleği ilk kez ilaç taşıyıcı biyomalzeme olarak değerlendirilmiştir. Hiçbir işlem görmemiş atık yılan derisinin dorsal ölçek, ventral ölçek ve menteşe olmak üzere üç farklı kısmına, yara iyileşmesinde yaygın olarak kullanılan D-Panthenol yüklenmiş ve salım özellikleri araştırılmıştır. Sırasıyla dorsal ölçek, ventral ölçek ve menteşe kısımları için ortalama ilaç yükleme kapasiteleri: 2.07 ± 0.13 , 1.28 ± 0.04 , 1.77 ± 0.95 olarak kaydedilmiştir. Salım 24 saat boyunca her saat başı örnek alınıp ölçüm yapılarak izlenmiştir. İlk 1 saatte dorsal ölçekte ilacın %46.67'si, ventral ölçekte %80.09'u ve menteşe kısmında %69.85'i salınmıştır. Bu sonuçlara dayanarak özellikle dorsal ölçek kısmının ileriki çalışmalarda geliştirilerek kontrollü ilaç salımı için potansiyel bir biyomalzeme olduğu ortaya konulmuştur.

*Corresponding Author: мурatkaya3806@yahoo.com, [ID 0000-0001-6954-2703](https://orcid.org/0000-0001-6954-2703)



1. GİRİŞ

Kontrollü ilaç salım sistemleri, ilacın salım süresini ve dozunu ayarlayabilmenin yanı sıra hedefe yönelik çalışma imkanı da sunmaktadır [1]. Hastalıkların tedavisinde ilacın etki edeceği bölgede kalma süresini artırmak, daha az ilaç kullanılarak tedavi imkanı sağlamak, toksik birikimi ve ilaç tekrarı sıklığını azaltmak açısından oldukça önemlidir [2]. Oral yolla, intramüsküler enjeksiyon yoluyla veya damar yoluyla uygulamada ilacın plazma düzeyi hızla artarak etkili doz düzeyinde bir süre kalmakta ardından da hızla etkili doz düzeyinin altına düşmektedir [2]. Geleneksel ilaç kullanımından kaynaklanan bu gibi dezavantajlar nedeniyle bilim insanları, terapötik ajanların maksimum fayda sağlayan, hasta konforunu artıran kullanım şekillerini geliştirmeye yönelirken beraberinde minimum zarar vermelerini hedeflemektedir. Bu amaç için de özellikle biyouyumlu ve nontoksik biyolojik temelli materyaller kontrollü ilaç salımı alanında yoğun ilgi görmektedir. Bu biyolojik materyallerden biri olan keratin; ara filament grubunun üst ailesinde bulunan ve hayvanlarda önemli olan iki biyopolimerden biridir [3]. Epitel hücrelerinin ana yapısal proteini olan keratin [4], omurgalıların keratinositler adı verilen ve sadece keratin üretmek için özelleşmiş hücreleri tarafından sentezlenen [5], çözünmeyen ve filament oluşturan bir proteindir [6].

Keratinler, non-toksik ve biyouyumlu olmalarının yanı sıra nispeten kimyasal olarak reaktif olmamaları, çözünmemeleri, ekstrakte edilmiş keratin proteinlerinin kendi kendine bir araya gelme, gözenekli ve lifli yapı iskeleleri halinde polimerize olma özelliğine sahip olmaları gibi özellikleri sayesinde medikal alanda çokça kullanılmaktadırlar [7, 8]. Bu özelliklere ek olarak hücreye yapışma sekanslarının doğal varlığı [9, 10], hücresel proliferasyonu ve migrasyonu iyileştirmesi [11, 12], farklı biyomoleküllerle etkileşime girmesini sağlayan karboksil, amino ve sülfhidril grupları gibi geniş fonksiyonel gruplara sahip olmaları da keratinlerin medikalde kullanım alanlarını artırmaktadır [13]. Keratin; tırnak, toynak, saç, yün, yılan gömleği ve tüy gibi yapılarda doğal olarak oluşabilmesi, yaygın olarak bulunması ve yenilenebilir kaynaklara sahip olması gibi avantajları sayesinde biyoteknolojik uygulamalar için iyi bir adaydır.

Bu biyoteknolojik uygulama alanlarından biri olan ilaç dağıtım sistemleri ile ilgili farklı kaynaklardan elde edilen keratinler ile bu güne kadar birçok kontrollü salım çalışması yapılmış ve bu çalışmalarda genel itibariyle tüy keratini, saç keratini ve yün keratini üzerinde yoğunlaşmıştır. Literatüre bakıldığında tüyden elde edilen keratin ile yapılan çalışmalardan bazıları şöyledir, 2014 yılında yapılan bir çalışmada pH'a duyarlı hidrojel hazırlanmış ve küçük moleküler bir ilaç olan rodamin B için kümülatif salım oranı, pH 8.4'te 24 saatte %97 olarak rapor edilirken, makromoleküler sıvır serum albümini için pH 7.4'te %89 olarak rapor edilmiştir [14]. Rodamin B'nin kontrollü salımının yapıldığı bir başka çalışmada, keratin bazlı filmlerin salım oranları farklı pH'larda ölçülmüş ve salım oranının pH'dan etkilendiği ortaya konulmuştur [15]. İndometasinin'in (IDM) ciddi gastrointestinal yan etkilerini hafifletmek amacıyla Gong ve arkadaşları, ıslak eğirme yoluyla deri çekirdekli yapıya sahip sodyum aljinat (SA)/tüy keratin kompozit lifi hazırlayıp, ince bağırsak, kolon ve sindirim simüle sıvısında IDM salımını, keratin ve SA oranının salım üzerindeki etkisini rapor etmişlerdir [16]. Yara iyileştirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, keratin/aljinat, keratin/agar ve keratin/gellan kullanılarak üretilen gözenekli dermal yamalardan temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) salımı sonuçlarının üç gün ölçüldüğü ve bu ölçümler sonucunda ilk iki gün üç dermal yamanın hepsinde benzer sonuçlar olduğu fakat üçüncü gün keratin/gella'nın en yüksek salım oranını (88.89) verdiği rapor edilmiştir [17]. Başka bir çalışmada ise, farklı formülasyonlarda disülfid karıştırma stratejisi ile keratinden üretilen hidrojellerin, normal ortamın (PBS ortamı) ve indirgeyici ortamın (GSH ortamı) simüle edildiği iki farklı ortamda hidrojellerin bozunması ve ilaç salımı siprofloksasin ve doksorubisin kullanılarak gözlemlenmiş ve farklı parametrelerden nasıl etkilendiklerini rapor edilmiştir [18]. Bir diğer keratin kaynağı olan saç ile yapılan çalışmalardan bazıları ise şöyledir, kanser tedavisini hedefleyen bir çalışmada, %52.9'luk (w/w) çok yüksek bir ilaç yükleme oranına sahip, biyolojik glutatyon faktörü (GSH) ve tripsin'e çift uyarıcı tepkili keratin-aljinat kompozit nanojeller hazırlanmıştır. Bu nanojellerden salınan doksorubisinin serbet ilaca göre hem

anti tümör aktivitesinin daha iyi olduğu hem de yan etkisinin daha az olduğu bildirilmiştir [19]. Doksorubisin (DOX) salımının konu edildiği yakın tarihli bir çalışmada ise keratin-doksorubisin nanoparçacıklarından doksorubisinin kümülatif salımı farklı pH'larda 270 saat boyunca gözlenmiş ve sürecin sonunda pH 7.4'te DOX'un sadece ~%5'i salınmasına karşın pH 5.0'da ilk beş saatte %10'dan fazlasının salındığı ve bunu hızlı bir salımın takip ettiği rapor edilmiş [20]. Başka bir çalışmada, eksojen büyüme faktörlerinin ve kas progenitör hücrelerinin eş zamanlı iletimi için keratin ve keratoz hidrojel taşıyıcı sistemler oluşturulmuş ve bunların bozunmaları, büyüme faktörlerinin salımı, bozunma salım arasındaki ilişki ayrıntılı bir şekilde rapor edilmiştir [21]. Geçmiş yıllarda yanık yarası tedavisi için keratin hidrojelardan siprofloksasin salımının konu edildiği bir çalışmada, salımın basit difüzyon şeklinde gerçekleşmediği jel bozunmasının bir fonksiyonu olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Antibiyotik yüklü jellerin hücre rejenerasyonunu engellemeden hem Gram negatif (*P. aeruginosa*) hem de Gram pozitif (*S. aureus*) bakteri seviyelerini önemli ölçüde azaltması nedeniyle yanık yarısında birinci basamak tedavi olarak kullanılabilir iyi bir aday olduğunu düşündüklerini rapor etmişlerdir [22]. Sadeği ve arkadaşlarının yara tedavisini amaçladıkları çalışmada ise, karboksimetil selüloza (CMC) keratin eklenmesinin karboksimetil selülozun (CMC) ilaç salım ve diğer özelliklerini nasıl etkilediği üzerine yoğunlaşmışlar ve farklı konsantrasyonlardan oluşmuş kompozitlerde bu özellikleri gözlemlemişlerdir. *In vitro* salım verileri, kompozit örtüden klindamisin salım profilinin bir Fickian difüzyon mekanizması yoluyla kontrol edildiğini ve daha fazla keratin içeren örneklerde salımın daha yavaş olduğunu bildirmişlerdir [23]. Bir başka çalışmada keratinin, keratozun ve farklı keratin-keratoz oranlarında hazırlanan keratin nanoparçacıkların mukoadezif özellikleri ve ilaç salımını araştırmak için keratin nanoparçacıklar üretilmiştir. Araştırma sonucundan keratin ve keratozun güçlü mukoadezif özellikler sergilediklerini ve model ilaç olarak amoksisilinin kullanıldığı keratin nanoparçacıklardan ilaç salımında ise salım hızının keratinin keratoza oranı değiştirilerek ayarlanabileceği ve keratin nanopartiküllerdeki keratoz oranının artırılarak salım oranının artırılabilirliğini bildirmişlerdir [24]. Bir keratin kaynağı olarak yün de kontrollü salım çalışmaları için bilim insanlarının oldukça ilgisini çekmektedir. Keratin ve pluronic'e dayalı ikili tetiklenebilir salım özelliklerine sahip hidrojel nanopartiküllerden kurkumin salımı 192 saat gözlenmiş ve 192 saat sonunda ilaç salımı kontrol numunesinde yaklaşık %5 iken, glutatyon (GSH) ve tripsin varlığında salımın kontrol numunesine göre 9 kat daha fazla olduğu, sadece GSH içeren numunelerde 8 kat, sadece tripsin içeren numunelerde ise 2 kat fazla salım oranı olduğu bildirilmiştir [25]. Tran ve Mututuvvari, selüloz, keratin ve kitosanın tek tek kullanılmasıyla veya ikili üçlü kompozitler halinde kullanılmasıyla oluşturulan filmlerden siprofloksasin'in kontrollü salımını araştırmışlardır. Keratin, selüloz ve kitosanın siproflaksasini kapsülleyebildiği ve tek tek veya ikili üçlü bileşikler olarak salılabildiğini bulmuşlardır. Selüloz ve kitosanın tek veya bileşik olarak kullanıldığı durumlarda, orandan bağımsız olarak, ilaç salım hızı nispeten yüksekken bunlardan birinin yanına keratin eklendiğinde veya üçlü bir bileşik oluşturulduğunda salım hızının önemli ölçüde azalttığı ve salım hızındaki azalmanın keratin konsantrasyonuyla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır [26]. Osteosarkom'un farmakolojik tedavisini hedefleyen bir çalışmada, yüksek moleküler ağırlıklı ve suda çözünür keratinlerden hazırlanan nanopartiküller Chlorin-e6 (Ce6) ile ışığa duyarlı hale getirilip kemoterapötik ilaç Paklitaksel (PTX) ile yüklenmiştir. Nanopartiküllerin üretimi için ilaca bağlı toplama yöntemi (PTX-Ce6@ker ag) ve desolvasyon yöntemi (PTX-Ce6 @ ker ds) olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. (PTX-Ce6 @ ker ds) de ilk 5 saatte PTX'in yaklaşık %25'i, (PTX-Ce6@ker ag) de ise ilk 5 saate PTX'in yaklaşık %50'si salındığı rapor edilmiştir [27]. Paklitaksel'in (PTX) aracı ilaç olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, keratin nanopartiküllerden PTX'in kontrollü salımı ile meme kanseri tedavisi hedeflenmiştir. Keratin nanopartiküllerden PTX salımı sırasında ilk 3 saatte bir ilk patlama olduğunu ve ardından gelen 24 saat içerisinde daha uzun süreli bir salım gözlediklerini ve ilk 24 saat boyunca kümülatif salımın ~%32 olmasının fizyolojik koşullar altında uzun süreli etkinliğinin garanti edilebileceğini düşündürtüğünü rapor etmişlerdir [28]. Aluigi ve arkadaşları, birçok kanser türü için yaygın olarak kullanılan doksorubisinin serbest haldeki yan etkilerini en aza indirmek amacıyla iyonik jelleşme ve agregasyon yöntemleriyle pH'ya duyarlı hazırladıkları keratin nanopartiküllere

doktorubisin yükleyip kontrollü salımını yapma gibi bir strateji izlemişlerdir. İyonik jelleşmenin daha yüksek ilaç yüklemesine (ağırlıkça %30) izin verdiği ve MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ortadan kaldırılmasında daha verimli olduğunu bulmuşlardır. İlk 24 saatte fizyolojik koşullarda (pH 7.4) ilacın sadece %38'nin salındığını, tümör asidik mikroçevresinde pH 5.0'da salım oranının %60'a ulaştığını ve pH'ya duyarlı nanopartiküllerin rolünü raporlamışlardır [29]. Posati ve arkadaşları, keratin filmler ve keratin-hidrotalsit hibrit filmlerden diklofenak salımını in vitro ortamda gözlemişler ve 6 saat sonra keratin filmlerde (KF-D) salım oranının %28, keratin-hidrotalsit-diklofenak (KF_HTLcD) hibrit filmlerinde ise %54 olduğu, 150 saat sonra hibrit filmlerde salım oranının %85 olduğunu hibrit olmayan filmlerde ise %66 olduğunu rapor etmişlerdir [30]. Güncel bir çalışmada, keratin-polilaktik asit (PLA)-grafen oksit (GO) komposit nanoliflerden rhodamine blue salımı araştırılmış ve keratin ve PLA 50/50 kullanılırken sistemlere uyarıcı kontrollü ilaç verme yeteneği ekleme fırsatı veren GO'nun farklı oranlarda kullanıldığı ve GO içeriğine göre ilaç salımının elektriksel tetikleme kapasitesinin ayarlanabileceği daha önceki kontrollü salım çalışmalarına da atıfta bulunularak raporlanmıştır [31]. Keratin ve asetamidlenmiş keratin (AAK), karboksimetillenmiş keratin (CMK) ve aminoetilatlanmış keratin (AEK) olarak modifiye edilmesiyle hazırlanan hidrojelardan ilaç salımında, keratin ve AAK hidrojellerinin 3 günden fazla ilaç salımı yaparken, CMK ve AEK hidrojellerinin salımının bir gün içerisinde tamamlandığı rapor edilmiştir [32]. Guidotti ve arkadaşları, keratin/poli(bütülen süksinat) (PBS) 70/30 ve 50/50 harman elektro eğirme matlarından rodamin B (RhB) salımını çalışmış ve keratin/PBS 70/30 numunesinden ilk bir saatte %90 salım olurken keratin/PBS 50/50 numunesinden %56'lık bir salım olduğunu, takip eden 50 saatte ise 70/30 numunesi %100'e varan yavaş bir salım gerçekleştirirken, 50/50 numunesinde bu oranın %75 olduğu rapor edilmiştir [33]. Başka bir bilimsel çalışmanın konusu ise ticari keratin kullanılarak kitosan-keratin-poli(ϵ -kaprolakton)-polietilen glikol kullanılarak oluşturulan sütürlardan diklofenak potasyum salımıdır. Çalışmada, in vitro ortamda sütürların gösterdiği olumlu özellikler elde edilen sütürların klinik ortamda ileriye dönük uygulamaya sahip olabileceğinin düşünülmesine neden olduğu rapor edilmiştir [34].

Pantotenik asidin (B5 vitamini) stabil bir analogu olan D-Panthenol dokular tarafından absorbe edildikten sonra hızla ve tamamen pantotenik aside metabolize olmaktadır. Pantotenik asidin cilt veya mukoza zarları üzerine uygulanan formları kararsızdır. Bu nedenle kararlı olan D-Panthenol formu; kozmetik formülasyonlarda, lezyonların tedavisinde, cildin yumuşamasında, cilt iritasyonlarında ve elastikiyetin artması gibi amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır [35].

Literatürde yılan gömleğinin yara iyileştirmedeki etkisi bilinmektedir [36]. Bu etkiyi artırmak amacıyla mevcut çalışmada yılan gömleğinin üç farklı kısmına (dorsal ölçek, ventral ölçek ve menteşe) D-panthenol yüklenerek salım özellikleri araştırılmıştır.

2. MALZEME VE YÖNTEMLER

Dolichophis caspius 'a (Hazer yılanı, bozyörük) ait yılan gömleği aktardan temin edilmiştir. Yılan gömleği distile su ile yıkanıp, UV ile steril edildikten sonra doğal hali korunarak kullanılmıştır.

2.1. Kimyasallar

Hidroklorik asit (HCl) Sigma - Aldrich'ten (St. Louis, Missouri, ABD), D-Panthenol (D-Panthenol, Panthoenly alcohol, Provit B5) Majistral Pharma'dan satın alınmıştır. Tüm deney adımlarında saf su kullanılmıştır.

2.2. Pasif yükleme tekniği ile D-Panthenol'ün yılan gömleğine (dorsal ölçek, ventral ölçek, menteşe) yüklenmesi

Pasif yüklemede kullanılan D-panthenol'ün 1 ml'sinde 0.774 g/ml pantenol vardır. 1 ml'sinde 25 mg D-pantenol olacak şekilde ayarlanmış ve 1.62 ml kullanılmıştır. 1.62 ml D-panthenol 50 ml'lik balon içerisine konulup üzeri distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu D-panthenol karışımından 1 ml alınıp distile su konularak 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu 25 mg örnek eklenerek çalkalayıcıda 100 rpm'de ve 25°C sıcaklıkta 48 saat bekletilmiştir. 48 saat sonunda

örnekler filtre kağıdından süzülerek 28°C’de 36 saat etüvde bekletilmiştir. Tüm işlemler dorsal ölçek, ventral ölçek ve menteşe kısımları için ayrı ayrı yapılmıştır.

2.3. Kapsülleme verimliliği

Yılan gömleği örneklerinden 5’er mg tartılıp 3 ml distile su eklenmiştir. 10 dakika boyunca vorteks ile karıştırılarak 5 dakika boyunca sonikatörde bekletilmiştir. Daha sonra kurutma kağıdından süzülen örnekler etüvde kurutulmuştur. *Dolichophis caspius* (Hazer yılanı, bozyörük)’ün gömleğine yüklenen D-Panthenol’un kalibrasyon eğrisini elde etmek için farklı konsantrasyonlarda 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml ve 25 µg/ml’de çözülmüş ve çözeltilerin absorbansı, bir UV VIS spektrofotometre kullanılarak 210 nm’de ölçülmüştür. Dorsal ölçek, ventral ölçek ve menteşe olmak üzere her bir kısmın ilaç yükleme etkinliğini değerlendirmek için her bir örnekten 5’er mg tartılıp 3 ml distile su eklenmiştir. 10 dakika boyunca vorteks ile karıştırılarak 5 dakika boyunca sonikatörde bekletilmiştir. Daha sonra örnekler kurutma kağıdından berrak çözelti toplanmıştır. Çözeltinin absorbansı UV-spektrofotometre kullanılarak 210 nm’de ölçülmüştür. Yükleme verimliliği kalibrasyon doğrusu kullanılarak aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{İlaç miktarı(mg)}=(\text{absorbans}\times\text{seyreltme faktörü})/(\text{eğim}\times 1000)$$

$$\text{İlaç yükleme(\%)}=(\text{ilaç miktarı/yılan gömleği kısımlarına yüklenen ilacın miktarı})\times 100$$

$$\text{İlaç yükleme verimliliği(\%)}=(\text{hesaplanan ilaç yüklemesi/teorik ilaç yüklemesi})\times 100$$

2.4. D-Panthenol yüklü yılan gömleği kısımlarının in vitro salım çalışmaları

İn vitro, basit yükleme tekniği kullanılarak elde edilen D-Panthenol yüklü yılan gömleği kısımlarından ilaç salım çalışmaları pH 5.5 tampon kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, 15 mg D-Panthenol yüklü yılan gömleği kısımları (dorsal ölçek, ventral ölçek, menteşe) 5 ml tampon çözeltisine ayrı ayrı ilave edilmiştir. Her çözelti daha sonra diyaliz torbaları içerisine aktarılmış ve 50 ml tampon çözelti içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra numuneler 37°C’de 100 rpm de 24 saat boyunca bir su banyosunda çalkalanmıştır. Diyaliz torbasında bulunan yılan gömleği kısımlarından tampon (pH 5.5) solüsyonuna salınan D-Panthenol miktarını hesaplamak için 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 24. saat zaman aralıklarında örnek alınmıştır. Hacmi korumak için ortama tekrar aynı miktarda taze tampon solüsyonu (pH 5.5) ilave edilmiştir. UV-VIS spektrofotometre kullanılarak alınan örneklerin 210 nm de ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca serbest ilaç salımını kontrol etmek için tampon solüsyonuna 42 ml panthenol çözeltisi eklenmiştir ve yukarıdaki prosedür izlenerek salım çalışması yapılmıştır.

D-Panthenol’un kümülatif yüzde salımını hesaplamak için aşağıdaki denklemler kullanılmıştır:

$$\text{İlaç konsantrasyonu (mg/mL)} = (\text{Absorbans} \times \text{Eğim}) \pm \text{Kesme noktası}$$

$$\text{İlaç miktarı (mg)} = \text{Konsantrasyon} \times \text{Çözünme banyo hacmi}$$

$$\text{Kümülatif yüzde salım (\%)} = (\text{Ortamdan alınan örneğin hacmi (mL)} / \text{Çözünme banyo hacmi (ml)}) \times P(t-1) + P_t$$

P_t, t zamanındaki yüzde salımı, P(t-1), t’den önceki yüzde salımdır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

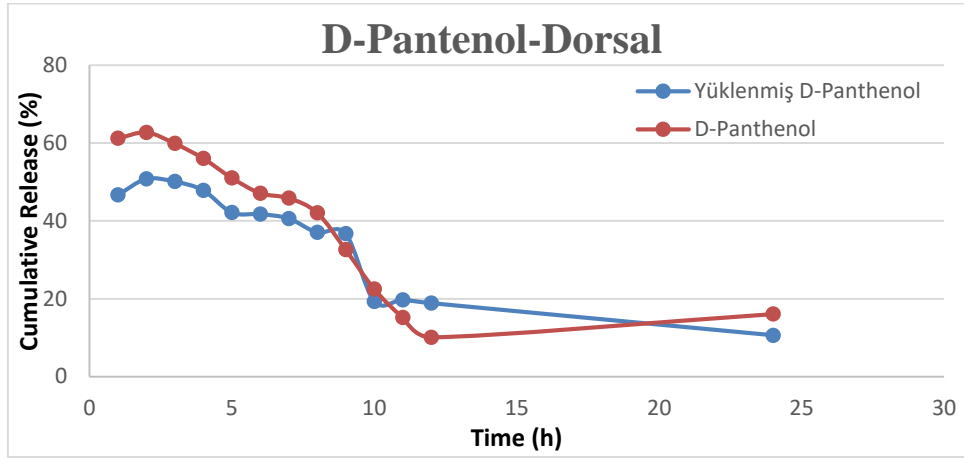
3.1. Kapsülleme verimliliği

Mevcut çalışmada, D-Panthenol’un yılan gömleği kısımlarına yüklenmesinde pasif yükleme tekniği uygulanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği (%) sırasıyla dorsal ölçek, ventral ölçek ve menteşe %2.07±0.13, %1.28±0.04 ve %1.77±0.95 olarak kaydedilmiştir. Kapsülleme yüzdelerindeki farklılığın yılan gömleği kısımlarının yüzey farklılıklarından ve ilaç yükleme tekniğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

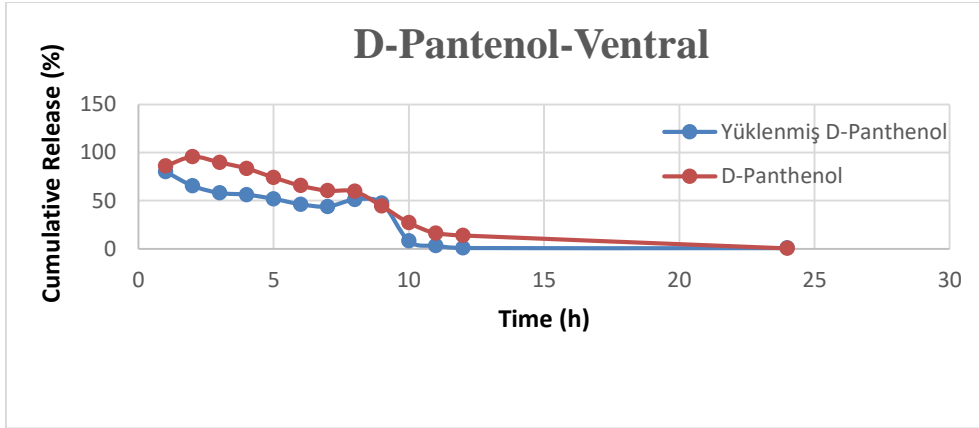
3.2. Kümülatif salım

Tampon içerisinde (pH 5.5) D-Panthenol ve D-Panthenol yüklü yılan gömleği kısımlarının (dorsal ölçek, ventral ölçek, menteşe) in vitro salım çalışmaları yapılarak sonuçlar Şekil 1, 2 ve 3’te verilmiştir. D-Panthenol salım profili, dorsal ölçek

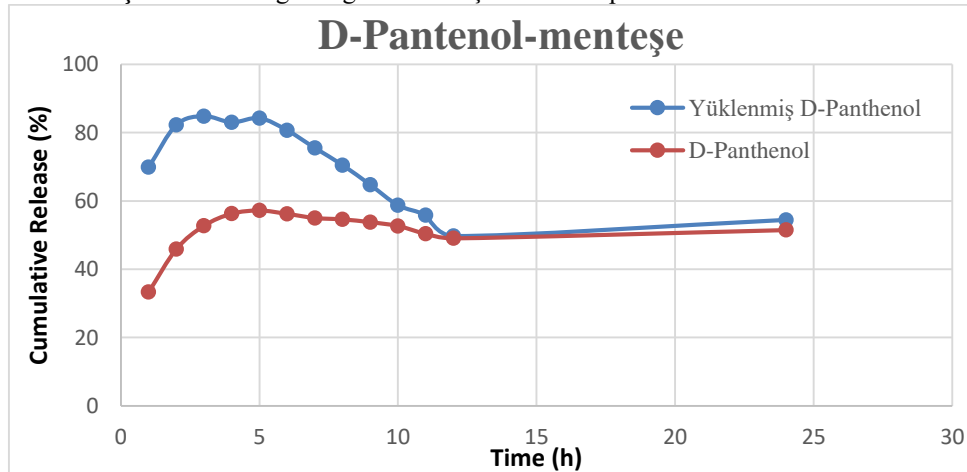
ve ventral ölçek de ilk 2 saat boyunca başlangıçta hızlı bir salım profili ortaya koymuş ancak ardından azalmaya başlamıştır. Mentеше kısmında ise ilk 4 saatte başlangıçta hızlı bir salım profili ortaya koyarken ardından azalmaya başladığı görülmüştür. D-Panthenol yüklü dorsal ve ventral ölçek saf ilaca göre daha yavaş bir salım oranı gösterirken, menteşe kısmında saf ilaca göre daha hızlı bir salım oranı görülmüştür. Menteşe kısmındaki bu hızlı salımın nedeni, bu kısımda çıplak gözle de fark edilen yüzey yapısındaki çukurluklardan kaynaklanabilir. Bu çalışmada görülen ilk patlama salımının D-Panthenol'un yılan gömleği kısımları üzerine zayıf tutunması kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Daha önceki çalışmalarda Guidotti ve arkadaşlarının da belirttiği gibi, yaralanmanın ilk saatlerinde vücudun kendini onarma hızı daha yüksek olacağı için ilk saatlerdeki yüksek ilaç salım oranı da bu iyileşme hızını destekleyebilir [33]. Elde edilen sonuçlardan özellikle dorsal kısmın gelecek vadede başarılı sonuçları göz önüne alındığında atık olan bu malzemenin ileriye dönük ilaç salım biyomalzemesi olarak kullanılabilmesi öngörülmüştür.



Şekil 1. Yılan gömleği dorsal ölçek kısmı D-panthenol salım oranı



Şekil 2. Yılan gömleği ventral ölçek kısmı D-panthenol salım oranları



Şekil 3. Yılan gömleği menteşe kısmı D-panthenol salım oranları

Genel bir değerlendirme yapıldığında yılan gömleğinin D-panthenolün taşınımı ve salımı amaçlı kullanılabilirliği ortaya konmuştur. Fakat bu materyalin farklı etken maddeler ile etkileşimi ve kontrollü salım amaçlı kullanılabilirliği ileriki çalışmalarda denenebilir. Bunun yanında atık olan yılan gömleğinin doku mühendisliği ve biyomedikal gibi alanlarda kullanılma potansiyeli mevcuttur.

Teşekkürler

Yazarlar, Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından sağlanan teknik desteğe teşekkür eder. Araştırma görevlisi Bahar Akyüz Yılmaz'a yardımından dolayı teşekkür eder.

Kaynaklar

- [1] Davoodi P, Lee LY, Xu Q, Sunil V, Sun Y, Soh S, (2018). Drug delivery systems for programmed and on-demand release *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 104-138.
- [2] Park, K. (2014). *The controlled drug delivery systems: Past forward and future back*, *Journal of control release*, 190, 3-8.
- [3] McKittrick, J., Phen, P. Y., Bodde, S. G., Yang, W., Novitskaya, E. E. ve Meyers M. A. (2012). *The structure, functions, and mechanical properties of keratin*, *JOM*, 64, 4, 449-468.
- [4] Coulombe, P. A. ve Omary, M, B. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments, *Current Opinion in Cell Biology*, 14, 1, 110-122.
- [5] Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., ve Meyer, M. A. (2016). *Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration*, *Progress in Materials Science*, 76, 229-318.
- [6] Herrmann, H.ve Aebi U. (2004). *Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism and functionally integration into different intracellular scaffolds*, *Annual Revi of Biochemistry*, 73, 749-789.
- [7] Konop, M., Rybak, M. ve Drapala, A. (2021). *Keratin Biomaterials in Skin Wound Healing, an Old Player in Modern Medicine: A Mini Review*, *Biomaterials in Skin Wound Healing and Tissue Regeneration*, 13, 12, 2029.
- [8] Thomas, H., Conrads, A., Phan, P. H., van de Locht, M. ve Zahn, H. (1986). *In vitro reconstitution of wool intermediate filaments*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 8, 5, 258-264.
- [9] Loschke, F., Seltmann, K., Bouameur, J. E. ve Magin, T. M. (2015). *Regulation of keratin network organization*, *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 56-64.
- [10] Tachibana, A., Furuta, Y., Takeshima, H., Tanabe, T. ve Yamauchi, K. (2002). *Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation*, *Journal of Biotechnology*, 93, 2, 165-170.
- [11] Rouse, J. G. ve Van Dyke M. E. (2010). *A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications*, *Materials*, 3, 2, 999-1014.
- [12] Vasconcelos, A. ve Cavaco-Paulo, A. (2013). *The use of keratin in biomedical applications*, *Current Cancer Drug Targets*, 14, 5, 612-619.
- [13] Chilakamarry, C. R., Mahmood, S., Saffe, S. N. B. M., Arifin, M. A. B., Gupta, A., Sikkandar, M. Y., Begum, S. S. ve Narasaiah, B. (2021). *Extraction and application of keratin from natural resources: a review*, *3 Biotech*, 11, 5, 220.
- [14] Guo, H., Pan, S.J., Yin, X.C., He, Y.F., Li, T. ve Wang, R.M. (2015). *pH-sensitive keratin-based polymer hydrogel and its controllable drug-release behaviour*, *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 41572.
- [15] Yin, X.-C., Li, F.-Y., He, Y.-F. ve Wang, R.-M. (2013). *Study on effective extraction of chicken feather keratins and their films for controlling drug release*, *Biomaterials Science*, 1, 5, 528-536.
- [16] Gong, X., Dang, G., Guo, J., Liu, Y. ve Gong, Y. (2020). *A sodium alginate/feather keratin composite fiber with skin-core structure as the carrier for sustained drug release*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 386-392.
- [17] Nayak, K.K. ve Gupta, P. (2017). *Study of the keratin-based therapeutic dermal patches for the delivery of bioactive molecules for wound treatment*, *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1088-1097.

- [18] Cao, Y., Yao, Y., Li, Y., Yang, X., Cao, Z. ve Yang, G. (2019). *Tunable keratin hydrogel based on disulfide shuffling strategy for drug delivery and tissue engineering*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 544, 121-129.
- [19] Sun, Z., Yi, Z., Zhang, H., Ma, X., Su, W., Sun, X. ve Li, X. (2017). *Bio-responsive alginate-keratin composite nanogels with enhanced drug loading efficiency for cancer therapy*, *Carbohydrate Polymers*, 175, 159-169.
- [20] Liu, P., Wu, Q., Li, Y., Li, P., Yuan, J., Meng, X. ve Xiao, Y. (2019). *DOX-Conjugated Keratin Nanoparticles for pH-Sensitive Drug Delivery*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 1012-1018.
- [21] Tomblyn, S., Pettit Kneller, E. L., Walker, S. J., Ellenburg, M. D., Kowalczewski, C. J., Van Dyke, M., Burnett, L. ve Saul, J. M. (2015). *Keratin hydrogel carrier system for simultaneous delivery of exogenous growth factors and muscle progenitor cells*, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(5), 864-879.
- [22] Roy, D. C., Tomblyn, S., Isaac, K., M., Kowalczewski, C. J., Burmeister, D. M., Burnett, L. R. ve Christy, R. J. (2016). *Ciprofloxacin-loaded keratin hydrogels reduce infection and support healing in a porcine partial-thickness thermal burn*, *Wound Repair and Regeneration*, 24, 4, 657-668.
- [23] Sadeghi, S., Nourmohammadi, J., Ghaee, A. ve Soleimani, N. (2019). *Carboxymethyl cellulose-human hair keratin hydrogel with controlled clindamycin release as antibacterial wound dressing*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 1239-1247.
- [24] Cheng, Z., Chen, X., Zhai, D., Gao, F., Guo, T., Li, W., Hao, S., Ji, J. ve Wang, B. (2018). *Development of keratin nanoparticles for controlled gastric mucoadhesion and drug release*, *Journal Nanobiotechnology*, 16, 1-13.
- [25] Ghaffari, R., Eslahi, N., Tamjid, E. ve Simchi, A. (2018). *Dual-Sensitive Hydrogel Nanoparticles Based on Conjugated Thermoresponsive Copolymers and Protein Filaments for Triggerable Drug Delivery*, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10, 23, 19336-19346.
- [26] Tran, C. D. ve Mututuvvari, T. M. (2015). *Cellulose, Chitosan, and Keratin Composite Materials*, *Controlled Drug Release*. *Langmuir*, 31, 4, 1516-1526.
- [27] Martella, E., Ferroni, C., Guerrini, A., Ballestri, M., Columbaro, M., Santi, S., Sotgiu, G., Serra, M., Donati, D., Lucarelli, E., Varchi, G. ve Duchi, S. (2018). *Functionalized Keratin as Nanotechnology-Based Drug Delivery System for the Pharmacological Treatment of Osteosarcoma*, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 11, 3670-.
- [28] Foglietta, F., Spagnoli, G. C., Muraro, Manuele G., Ballestri, M., Guerrini, A., Ferroni, C., Aluigi, A., Sotgiu, G. ve Varchi, G. (2018). *Anticancer activity of paclitaxel-loaded keratin nanoparticles in two-dimensional and perfused three-dimensional breast cancer models*, *International Journal of Nanomedicine*, 13, 4847-4867.
- [29] Aluigi, A., Ballestri, M., Guerrini, A., Sotgiu, G., Ferroni, C., Corticelli, F., Gariboldi, M. B., Monti, E. ve Varchi, G. (2018). *Organic solvent-free preparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers for antitumour activity*, *Materials Science and Engineering: C*, 90, 476-484.
- [30] Posati, T., Giuri, D., Nocchetti, M., Sagnella, A., Gariboldi, M., Ferroni, C., Sotgiu, G., Varchi, G., Zamboni, R. ve Aluigi, A. (2018). *Keratin-hydrotalcites hybrid films for drug delivery applications*, *European Polymer Journal*, 105, 177-185.
- [31] Schifino, G., Gasparini, C., Drudi, S., Giannelli, M., Sotgiu, G., Posati, T., Zamboni, E. Treossi, E. Maccaferri, L. Giorgini, R. Mazzarro, V. Morandi, V. Palermo, R., Bertoldo, M. ve Aluigi, A. (2022). *Keratin/Poly(lactic acid)/graphene oxide composite nanofibers for drug delivery*, *International Journal of Pharmaceutics*, 623, 121888.
- [32] Nakata, R., Osumi, Y., Miyagawa, S., Tachibana, A. ve Tanabe, T. (2015). *Preparation of keratin and chemically modified keratin hydrogels and their evaluation as cell substrate with drug releasing ability*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120, 1, 111-116.
- [33] Guidotti, G., Soccio, M., Bondi, E., Posati, T., Sotgiu, G., Zamboni, R., Torreggiani, A., Corticelli, F., Lotti, N. ve Aluigi, A. (2021). *Effects of the blending ratio on the design of keratin/poly(butylene succinate) nanofibers for drug delivery applications*, *Biomolecules*, 11, 8, 1194.
- [34] Deng, X., Gould, M. ve Ali, M. A. (2021). *Fabrication and characterisation of melt-extruded chitosan/keratin/PCL/PEG drug-eluting sutures designed for wound healing*, *Materials Science and Engineering: C*, 120, 111696.
- [35] Webb, M. E., Smith, A., G. ve Abell, C. (2004). *Biosynthesis of pantothenate*, *Natural Product Reports*, 21, 6, 695.
- [36] Vakilian, S., Jamshidi-adevani, F., Al-Shidhani, S., Anwar, M. U., Al-Harrasi, R., Al-Wahaibi, N., Qureshi, A., Alyaqoobi, S., Al-Amri, I., Al-Harrasi, A. ve Al-Hashmi, S. (2019). *A Keratin-based biomaterial as a promising dresser for skin wound healing*, *Wound Medicine*, 25, 1, 100155.