

УДК 611.781:616.594.1

В. В. Гавриляк, к. с.-г. н., провідний науковий співробітникІнститут біології тварин НААН, лабораторія живлення та біосинтезу продукції жуйних,
вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна, e-mail: havvita@ukr.net**ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРИ КЕРАТИНОВИХ ВОЛОКОН РІЗНИХ ТИПІВ**

Наведено результати порівняльного аналізу структурних характеристик кератинових волокон різної морфологічної будови. Встановлено відмінності в їх амінокислотному складі та співвідношенні протеїнових фракцій, які відповідають певним морфологічним компонентам волокна. Співвідношення між кристалічною та аморфною фазами волокон збільшується у ряді: волос людини → волос щура → вовна овець і становить відповідно 1,9; 2,1; 2,3.

Ключові слова: кератини, матриксні, мікрофібрилярні протеїни, кутикула, високомолекулярні протеїни, кератози, амінокислотний склад

Волос – це композитне протеїнове волокно природного походження, яке характеризується гетерогенною морфологічною структурою. Волокно складається із трьох концентричних шарів: кутикули, кортексу і серцевини. Зовнішня частина волосу – кутикула, складається з плоских зроговілих клітин-лусок, що черепицеподібно накладаються одна на одну і побудовані з чотирьох шарів із різним вмістом дисульфідних зв'язків: епікутикули – гідрофобної мембрани товщиною до 5 нм; механічно найбільш стійкого α -шару; екзо- і ендоктикули. Товщина кутикулярного шару коливається в досить широких межах і залежить, насамперед, від типу волокна [3].

Основну частину більшості волокон займає кортекс, який складається із веретеноподібних клітин, що містять філаментні структури, орієнтовані паралельно осі волокна [12]. Деякі волокна у центральній частині містять серцевину у вигляді суцільного або переривчастого тяжа. Наприклад, у волоссі щура цей шар займає до 90 % його площі. Подібну будову має волос кроля, зайця, оленя, білки [3].

Волос складається в основному із двох груп протеїнів – α -кератинів з низьким вмістом сульфуру, молекулярна маса яких коливається в межах 40–60 кДа та матриксних протеїнів із молекулярною масою від 10 до 25 кДа. Так, α -кератини утворюють мікрофібрилярну структуру, відому як інтермедіальні філаменти, що надають волосу еластичності та міцності, а матриксні або кератин-асоційовані протеїни виконують функцію специфічного клею, що з'єднує ці філаменти [10, 12]. У складі матриксних протеїнів виділяють групу білків з високим вмістом тирозину і гліцину.

На сьогодні у літературі існують численні повідомлення про можливість використання кератинових волокон, як природних біокомпозитів, для створення біосумісних наноматеріалів, що надзвичайно важливо для розвитку нанотехнологій.

Так, на основі кератинів створюють плівки [7], гідрогелі та скаффолди для тканинної інженерії і регенеративної медицини [11, 13–16].

Мета роботи – з'ясувати структурні характеристики кератинових волокон, відмінних за своєю морфологічною будовою, для вибору оптимальних підходів до створення нових біокомпозитних матеріалів.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом досліджень були зразки волосся людини, вовни овець та волоса щура. Усі волокна промивали у нейтральному мийному розчині, ретельно споліскували та висушували. Поверхневі ліпіди екстрагували в апараті Сокслета тетрахлорметаном впродовж 5 годин, а потім сумішшю етиловий спирт-діетиловий ефір (1:1, v/v).

Амінокислотний склад кератину визначали на автоматичному аналізаторі амінокислот Т 339 фірми «Mikrotechna» (Чехія) після гідролізу 6 н розчином хлоридної кислоти протягом 24 годин за температури 110 °С [2].

Постадійне фракціонування волокон проводили відповідно до методу, описаного Kop et al. [9]. Для цього волокна поміщали у 25 мМ трис-НСІ буфер (рН 8,3), що містив різні концентрації 2-меркаптоетанола (2-ME), 1 % додецилсульфат натрію та дитіотреїтол. У залежності від концентрації 2-ME та тривалості екстракції кератини розділялися на фракції матриксних, мікрофібрилярних та високомолекулярних протеїнів, а також нерозчинного залишку, ідентифікованого як кутикула волокна. Співвідношення об'єму екстрактивного середовища до маси волокна становило 100:1.

Для визначення протеїнів з високим вмістом тирозину використовували метод, який ґрунтувався на екстракції цих білків за допомогою надмурашиної кислоти з наступним осадженням та очищенням [1]. Окиснені надмурашиною кислотою волокна фракціонували на кератози за методом, описаним Asquit et al. [5]. Для виділення β -кератози волокна розчиняли в 1,5 М аміачному розчині протягом 30 год при постійному струшуванні і фільтрували. На фільтрі залишалася β -кератоза, яку промивали водою, ацетоном і висушували до постійної маси. Із фільтрату α -кератозу осаджували концентрованою оцтовою кислотою при рН 4,0. Вміст фракцій обчислювали гравіметрично і виражали у відсотках у перерахунку на масу окисненої вовни. γ -кератозу визначали за різницею між вмістом α - і β -кератоз.

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними групами при $P < 0,05$. Дані представлено як середнє арифметичне (M) та його стандартну похибку (m): $M \pm m$.

Результати та їх обговорення

Показано, що досліджувані кератинові волокна мають подібний амінокислотний склад (табл. 1). Відмінності стосуються в основному лізину, лейцину, тирозину, гістидину, аргініну, аспарагінової кислоти та гліцину. Так, волос людини

характеризується більшим вмістом лізину, аргініну і меншим – лейцину та аспарагінової кислоти порівняно з вовною овець, тоді як для волоса щура характерний нижчий рівень лізину та гістидину і вищий – тирозину та гліцину у порівнянні з досліджуваними волокнами. Очевидно, що ці різниці в амінокислотному складі кератинів можуть бути пов'язані із формуванням різних за морфологічним характером типів волоса, на що вказують деякі автори [8, 17].

Таблиця 1

Амінокислотний склад кератинів волокон (г/100 г, $M \pm m$, $n=3$)

Амінокислота	Тип волокна		
	волос людини	волос щура	вовна
Лізін	2,17±0,03	2,01±0,25	1,05±0,11**+
Лейцин	6,59±0,39	5,02±0,11*	9,55±0,35**+
Валін	5,40±0,32	4,25±0,040	5,44±0,056
Треонін+серин	13,87±0,62	13,19±0,93	14,96±0,65
Ізолейцин	2,29±0,09	1,93±0,29	2,56±0,42
Фенілаланін	2,68±0,16	2,37±0,47	4,03±0,43
Тирозин	3,12±0,12	3,99±0,07*	3,24±0,27
Гістидин	5,52±0,52	3,11±0,43*	6,84±0,69+
Метіонін	0,64±0,06	0,88±0,08	0,81±0,08
Цистин	13,72±0,43	11,29±0,55*	12,56±0,48
Триптофан	-	-	-
Аргінін	5,68±0,37	4,33±0,34	3,03±0,19**+
Аспарагінова кислота	4,69±0,28	5,13±0,18	7,23±0,45**+
Пролін	-	-	-
Глютамінова кислота	14,61±0,54	16,25±0,88	15,16±0,83
Гліцин	2,67±0,43	7,61±0,46*	3,55±0,34+
Аланін	3,52±0,29	3,35±0,27	3,81±0,34

Примітка: * – відмінності вірогідні між волосом людини і волосом щура, ** – між волосом людини і вовняним волокном, + – між волосом щура і вовняним волокном.

Істотні зміни стосуються і цистину, однієї з найважливіших амінокислот, загальний вміст якої у різних кератинах може коливатися від 5 % до 19 % [8]. Залишки цистину утворюють між- та внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки, за допомогою яких формується компактна тривимірна структура, яка забезпечує високу хімічну стійкість та нерозчинність кератинів. Отримані результати свідчать, що вміст цистину знижується у ряді: волос людини → вовна овець → волос щура. Відповідно і загальний вміст сульфуровмісних амінокислот у вовняному волокні та волосі щура на 7 % і 15 % менший, ніж у людському волосі.

У літературі описано різні підходи до розділення кератинів, проте всі вони ґрунтуються на розщепленні дисульфідних зв'язків шляхом окиснення чи відновлення. Обидва методи дозволяють отримати протеїнові фракції – кератоци у випадку окиснення волокна і кератеїни – у випадку відновлення кератину. Хоча слід зазначити, що білкові фракції, виділені після відновлення дисульфідних зв'язків, за своїми характеристиками більш подібні до нативних протеїнів та володіють кращою біосумісністю [6].

Аналіз співвідношення структурних елементів досліджуваних кератинових волокон показав, що вміст матриксних протеїнів знаходиться в межах 30 %, тоді як на частку протеїнів макро- і мікрофібрил припадає 57–62 %. За вмістом матриксних та мікрофібрилярних протеїнів волос людини практично не відрізнявся від волосу щура та вовни вівці. Відповідно, вірогідно вищий вміст високомолекулярних протеїнів був у вовняному волокні та волосі щура (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика структури кератинових волокон (%), $M \pm m$, $n=5$

Структурний елемент волоса	Тип волокна		
	волос людини	волос щура	вовна
Матриксні протеїни	30,61±1,27	29,14±0,82	27,82±1,09
Мікрофібрилярні протеїни	48,66±1,17	50,08±1,03	50,50±1,17
Високомолекулярні протеїни	8,33±0,43	11,09±0,97*	12,39±1,08**
Кутикула	12,41±1,10	9,63±1,05	9,30±0,77*

Примітка: * – відмінності вірогідні між волосом людини і волосом щура, ** – між волосом людини і вовняним волокном, + – між волосом щура і вовняним волокном.

У той же час вміст кутикули у цих волокнах зменшується, що, очевидно, пов'язано із особливостями будови їх кутикулярного шару. У підсумку, співвідношення між кристалічною та аморфною фазами збільшується у ряді: волос людини → волос щура → вовняне волокно і становить відповідно 1,9; 2,1; 2,3.

У результаті розділення кератинів після попереднього окиснення дисульфідних зв'язків за допомогою надмурашиної кислоти отримано три протеїнові фракції – кератоци, які відповідають певним морфологічним компонентам волокон. Нерозчинна частка – β -кератоци, містить кутикулу та залишки клітинних мембран, α -кератоци характеризує кристалічну чи фібрилярну частину волокна, а γ -кератоци – протеїни з аморфних ділянок кортексу.

Морфологічно різні кератинові волокна відрізняються за співвідношенням цих білкових фракцій, зокрема, людський волос характеризується більшим вмістом β - і γ -кератоци у порівнянні з вовняним волокном і волосом щура, при цьому вірогідної різниці стосовно кератоци у цих волокнах не спостерігається (Рис. 1).

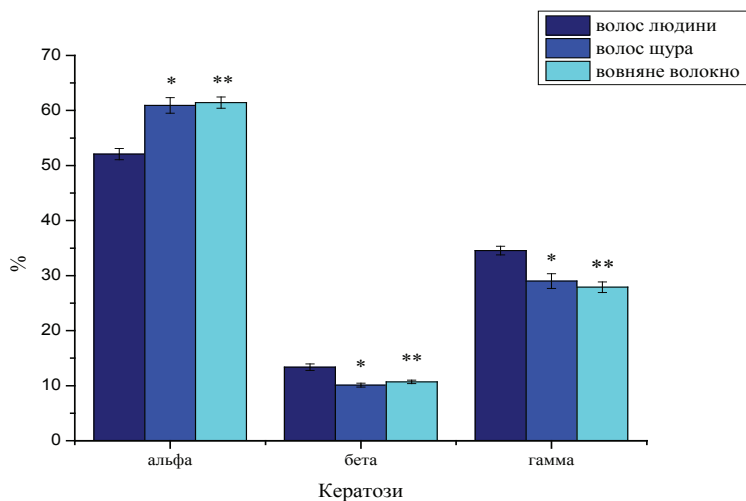


Рис. 1. Співвідношення протеїнових фракцій — кератоз у різних типах волокон (%; $M \pm m$, $n=5$); * – відмінності вірогідні між волосом людини і волосом щура, ** – між волосом людини і вовняним волокном.

Відомо, що γ -кератоза містить протеїни з високим вмістом сульфуру, що цілком узгоджується із високим вмістом цистину у волосі людини.

У складі матричних протеїнів виділяють групу білків, яка містить велику кількість тирозину і гліцину і характеризується молекулярною масою нижче 10 кДа [4, 8]. Слід зазначити, що у волосі людини цієї групи протеїнів виявлено не було, про що свідчать і дані літератури [8], тоді як волос щура, який характеризується добре розвинутою серцевиною, за кількістю цих білків перевищує вовняне волокно практично вдвічі (рис. 2).

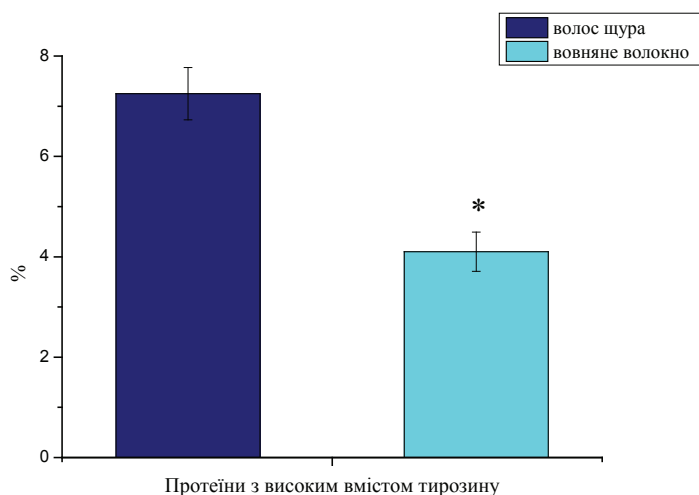


Рис. 2. Вміст протеїнів з високим вмістом тирозину у кератинових волокнах (%; $M \pm m$, $n=5$); * – відмінності вірогідні між волосом щура і вовняним волокном.

Ці результати узгоджуються із амінокислотним аналізом представлених кератинів волокон, який показав, що сумарний вміст тирозину і гліцину у волоссі щура більший на 50 % і 41 % порівняно з волосом людини і вовною.

Отже, незважаючи на видову специфічність та морфологічну будову досліджуваних волокон, запропоновані способи їх солюбілізації дають можливість отримати фракції мікрофібрилярних протеїнів та α -кератоци. Незалежно від способу фракціонування їх вміст коливається у межах 50–60 % від маси розчиненого волокна. Саме ці протеїнові розчини можна використовувати як матрицю для створення нових кератиновмісних біокомпозитів.

Висновки

1. Показано, що кератинові волокна різної морфологічної будови відрізняються за амінокислотним складом, а саме за вмістом лізину, лейцину, гістидину, тирозину, цистину, аргініну, аспарагінової кислоти та гліцину.

2. Встановлено, що співвідношення між кристалічною та аморфною фазами волокна збільшується у ряді: волос людини→волос щура→вовна овець і становить відповідно 1,9; 2,1; 2,3.

3. Вміст протеїнів з високим вмістом тирозину і гліцину у волоссі щура вдвічі більший, ніж у вовняному волокні. У волоссі людини ці білки не виявлені.

Список використаної літератури

1. Авторское свидетельство СССР № 702029. Способ разделения белков шерсти / В. В. Гуменюк, И. А. Макара. – Заявл. 10.05.1977; опубл. 05.12.1979; Бюлл. № 45. — 4 с.
2. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. — Львів: СПО-ЛОМ, 2012. — 764 с.
3. Морфологічні особливості шкіри та волоса різних видів тварин і людини в аспекті судово-ветеринарної експертизи / Коцюмбас Г. І., Коцюмбас І. Я., Щербентовська О. М. та ін. — Л.: ТзОВ ВФ «Афіша», 2010. — 136 с.
4. Aoki N. Isolation and characterization of mouse high-glycine/tyrosine proteins / N. Aoki, K. Ito, M. Ito // J. of Biological Chemistry. — 1997. — Vol. 272, № 48. — P. 30512–30518.
5. Asquith R. S. The morphological origin and reactions of some keratin fractures /R. S. Asquith, D. C. Parkinson // Textile Research Journal. — 1966. — Vol. 36. — P. 1064–1071.
6. de Guzman R. C. Mechanical and biological properties of keratose biomaterials /R. C. de Guzman, M. R. Merrill, J. R. Richter et al. //Biomaterials. — 2011. — Vol. 32 (32). — P. 8205–8217.
7. Fujii T. Convenient procedures for human hair protein films and properties of alkaline phosphatase incorporated in the film /T. Fujii, D. Ogiwara, M. Arimoto // Biol. Pharm. Bull. — 2004. — Vol. 27. — P. 89–93.
8. Gillespie J. M. The structural Proteins of Hair: Isolation, characterization, and regulation of biosynthesis / J. M. Gillespie // Physiology, biochemistry and molecular biology of skin: Oxford, 1991. — 658 p.
9. Kon R. Analysis of damaged components of permed hair using biochemical technique / R. Kon, A. Nakamura, N. Hirabayashi, K. Takeuchi // J. of Cosmetic Sciences. — 1998. — Vol. 49. — P. 13–22.
10. Rogers M. A. Human hair keratin-associated proteins (KAPs). / M. A. Rogers, L. Langbein, S. Praetzel-Wunder et al. // Intern. Rev. Cytol. — 2006. — Vol. 251. — P. 209–263.
11. Rouse J. A review of keratin-based biomaterials for biomedical application / J. G. Rouse, M. E. Van Dyke // Materials. — 2010. —Vol. 3. — P. 999–1014.

12. *Schweizer J.* New consensus nomenclature for mammalian keratins / J. Schweizer, P. E. Bowden, P. A. Coulombe et al. // *J. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 174. – P. 169–174.
13. *Sierpinski P.* The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves / P. Sierpinski, J. Garrett, P. Apel, D. Klorig, T. Smith, L. A. Koman, A. Atala, M. Van Dyke // *Biomaterials.* – 2008. – Vol. 29. – P. 118–128.
14. *Tachibana A.* Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation / A. Tachibana, Y. Futura, H. Takeshima, T. Tanabe, K. Yamauchi // *J. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 93. – P. 165–170.
15. *Verma V.* Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissues-engineering application / V. Verma, P. Verma, P. Ray, A. R. Ray // *Biomed. Materials.* – 2008. – Vol. 3. – P. 25007.
16. *Sando L.* Photochemical crosslinking of soluble wool keratins produces a mechanically stable biomaterial that supports cell adhesion and proliferation / L. Sando, M. Kim, M. L. Colgrave et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2010. – Vol. 95(3). – P. 901–911.
17. *Silk, mohair, cashmere and other luxury fibres* / Ed. R. R. Franck – Woodhead publishing Ltd, 2001. – 255 p.

В. В. Гавриляк

Институт биологии животных НААН,
лаборатория питания и биосинтеза продукции жвачных, e-mail: havvita@ukr.net
ул. В. Стуса, 38, Львов, 79034, Украина

**ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ КЕРАТИНОВЫХ ВОЛОКОН
РАЗНЫХ ТИПОВ****Резюме**

Приведены результаты сравнительного анализа структурных характеристик кератиновых волокон, отличающихся своим морфологическим строением. Установлены различия в их аминокислотном составе и соотношении протеиновых фракций, которые соответствуют определенным морфологическим компонентам волокна. Соотношение между кристаллической и аморфной фазами волокна увеличивается в ряде волос человека → волос крысы → шерсть овец и составляет соответственно 1,9; 2,1; 2,3.

Ключевые слова: кератины, матричные, микрофибриллярные протеины, кутикула, высокомолекулярные протеины, кератозы, аминокислотный состав

V. V. Havrylyak

Institute of Animal Biology NAAS,
Laboratory of Nutrition and Biosynthesis of Ruminant products e-mail: havvita@ukr.net
38, V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

**STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF DIFFERENT TYPES
OF KERATIN FIBRES****Summary**

The results of the comparative analysis of the structural characteristics of keratin fibers of different morphological structure were presented. It was found the differences in their amino acid composition and the ratio of protein fractions that characterized certain morphological fiber components. The ratio between crystalline and amorphous phase of fibers is respectively 1,9; 2,1; 2,3 for human hair, rat hair and wool fibre.

Key words: keratins, matrix and microfibrillar proteins, cuticle, high molecular weight proteins, keratoses, amino acid composition

Стаття надійшла до редакції 13.11.2013