



УДК 636.32/38:677.31:577.1

МЕТОДИ ЕКСТРАКЦІЇ КЕРАТИНІВ ІЗ ВОВНИ ТА ВОЛОССЯ І ПЕРСПЕКТИВИ ЇХНЬОГО ЗАСТОСУВАННЯ В БІОМЕДИЦИНІ Й БІОІНЖЕНЕРІЇ

В. В. Михалюк^{1*}, В. В. Гаєриляк²

¹ *Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна*

² *Національний університет "Львівська політехніка",
Інститут хімії та хімічних технологій, пл. Св. Юра, 3/4, Львів 79013, Україна*

** Кореспондуючий автор: e-mail: vasylyna.v.m@gmail.com*

*Mykhaliuk V.V., Havryliak V.V. Methods of keratin extraction from wool and hair and prospects of their application in biomedicine and bioengineering. **Studia Biologica**, 2019: 13(2); 117–130 • DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1302.600>*

Наведено наукову інформацію про будову волоса, структурні та функціональні особливості кератинів і методи їхнього екстрагування з волокон природного походження. Обґрунтовано важливість проведення екстракції кератинів через розрив дисульфідних зв'язків і переведення кератину в розчинну форму зі збереженням ковалентних зв'язків. З'ясовано, що така екстракція сприяє збереженню нативних властивостей цих білків, а це забезпечує їхнє подальше застосування як біоматеріал функціонального призначення. Зокрема, йдеться про такі властивості як стійкість кератинів до дії хімічних і біологічних чинників завдяки дисульфідним зв'язкам, висока частота яких забезпечує велику кількість хімічних модифікацій цих білків, котрі впливають на їхні фізико-хімічні властивості, а також про подібність кератинів до позаклітинного матриксу біологічних тканин, що забезпечує високу біосумісність і низьку цитотоксичність препаратів на основі кератинів. Отримані таким чином і ліофілізовані препарати кератину під час підбору певного розчинника можуть збиратись у фібрилярні структури. Проаналізовано деякі методи екстракції кератинів, їхню ефективність і електрофоретичні профілі отриманих екстрактів. Аналіз наукових джерел свідчить, що цілеспрямовану екстракцію кератинів здійснюють методами, які базуються на реакціях окиснення, відновлення та сульфїтолізу. Реакції окиснення кератинів є необоротними та полягають в окисненні цистеїнових залишків до цистеїнової кислоти з утворенням кератоз. Натомість у разі використання відновників отримують кератеїни. У результаті сульфїтолізу, що є оборотним процесом, утворюється S-сульфонат-аніон. Розглянуто перспективні напрями застосування

екстрагованих кератинів. Перший напрям стосується біомедичних технологій, від яких залежатиме ефективність лікування патологій волоса. Другий напрям полягає у створенні біоматеріалів на основі кератинів із широким спектром застосування, а саме: тканинна інженерія, репаративна медицина, текстильна й аграрна промисловість, косметологія, виробництво очисного обладнання. Третій напрям пов'язаний із можливістю застосування кератинів для ідентифікації особи. Такі пошуки матимуть позитивний вплив на розвиток антропологічних досліджень і судово-медичної експертизи. Цьому сприяє висока стійкість білків волосся до несприятливих умов навколишнього середовища.

Ключові слова: волос, кератини, екстракція

ВСТУП

Волосяний покрив – це утворення, що властиве лише ссавцям і виникло в умовах жаркого і вологого клімату мезозою як захист від перегрівання. Така зміна стала прикладом ароморфозу, що підняв усю організацію цього класу на якісно новий рівень.

На сьогодні описані структура та властивості конститутивних білків волоса, клонують гени, що їх кодують. Хоча в Україні дослідження такого характеру практично не проводяться, перспективним є розроблення методів, за допомогою яких можна істотно покращити якісні показники кератинових волокон. А глобальні тенденції свідчать про попит на цільову модифікацію природних кератинових волокон і створених на їхній основі біоматеріалів із новими функціональними властивостями.

Будова волоса. Волос – це композитне протеїнове волокно природного походження, що характеризується значним поліморфізмом, проте загальний план його будови включає кутикулу, кортекс і не завжди наявну серцевину (рис. 1).

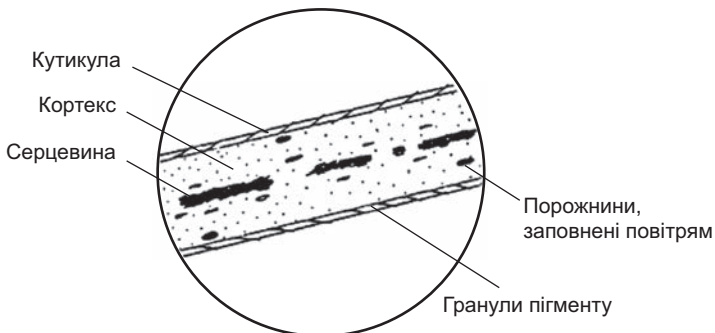


Рис. 1. Діаграма волоса [10]

Fig. 1. Hair diagram [10]

Кутикула представлена лускатим шаром, що складається із плоских зроговілих черепицеподібно розташованих клітин (рис. 2). Середня товщина лускатого шару становить 0,5–1,0 мкм [35]. Кожна кутикулярна луска складається з кількох шарів (епі-, екзо- й ендокутікули), розділених мембранними комплексами. Кожен шар лусок відрізняється за вмістом Сульфуру.

Епікутикула завтовшки 5–7 нм безпосередньо контактує з навколишнім середовищем. Вона вкрита ліпідним шаром, утвореним переважно 18-метил-ейкозаною кислотою, що ковалентно зв'язана за допомогою тіоетерного зв'язку з протеїновим

шаром, розміщеним нижче [23, 41]. Під епікутикулою міститься А-шар, що складається з білків із високим вмістом цистину, який забезпечує утворення дисульфідних зв'язків між А-шаром і екзокутикулою [4].

Екзокутикула гідрофобна та стійка до дії хімічних речовин і протеолітичних ферментів. В екзокутикулі експресуються кератин-асоційовані білки, що належать до родин 5 і 10 – це порівняно малі гідрофобні білки, які характеризуються ультрависоким вмістом Сульфуру та характерними повторюваними структурами.

Ендокутикула складається зі слабо з'єднаних між собою білків із низьким вмістом Сульфуру, що утворюють пористу структуру [45].

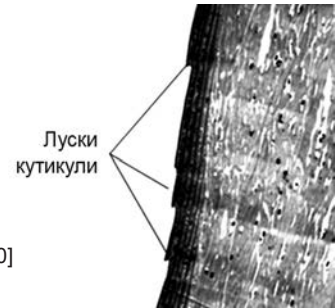


Рис. 2. Сканувальна електронна фотографія волоса людини [10]

Fig. 2. Scanning electron microscopy of human hair [10]

Безпосередньо під кутикулярним шаром міститься кортекс, товщина якого коливається від 10 до 90 % від товщини волоса залежно від його типу [2, 10]. Кортикальні клітини мають веретеноподібну форму, довжина яких коливається в діапазоні від 80 до 150 мкм [14], вони багаті на Сульфур і мають філаментну будову, що спричинює розщеплення волосся уздовж його осі у разі механічного пошкодження. Ці клітини заповнені фібрилами, які орієнтовані паралельно до осі волокна і з'єднані між собою міжклітинною речовиною [14]. Макрофібрили утворюються внаслідок агрегації інтермедіальних філаментів і занурені у матрикс, сформований кератин-асоційованими протеїнами (КАП) [4]. Це структури розміром приблизно 0,1–0,4 мкм у діаметрі та до кількох мікрон завдовжки [16]. Вони характеризуються циліндричною формою та з'єднані між собою протеїновим матеріалом, який іноді називають міжмакрофібрилярним матриксом. Про склад матриксу інформації небагато, ймовірно, він складається із залишків цитоплазми клітин до кератинізації, а також містить такі небілкові компоненти, як залишки ядер і меланінові гранули [4]. Макрофібрили складаються з мікрофібрил, які, у свою чергу, побудовані з тонких α -волоконць і протофібрил [11, 31, 36, 37]. Позбавлений пігменту корковий шар прозорий, а пігментований – має специфічну для певного таксона топографію і форму агломератів пігментних гранул. У деяких видів тварин корковий шар неоднорідний і розділяється на орто- й паракортекс, що відрізняються орієнтацією та характером “упакування” мікрофібрил, розташуванням на стержні (ортокортекс покриває випуклі ділянки стержня, а паракортекс – увігнуті), наявністю і відсутністю залишків ядер, будовою та біохімічним складом (паракортекс містить більше цистину, проліну і, відповідно, менше гліцину) [36, 37].

Серцевина – найменш вивчена морфологічна структура волоса. Вона локалізована в центрі волокна (рис. 3) і може бути суцільною, фрагментованою чи відсутньою зовсім [10, 13, 51].

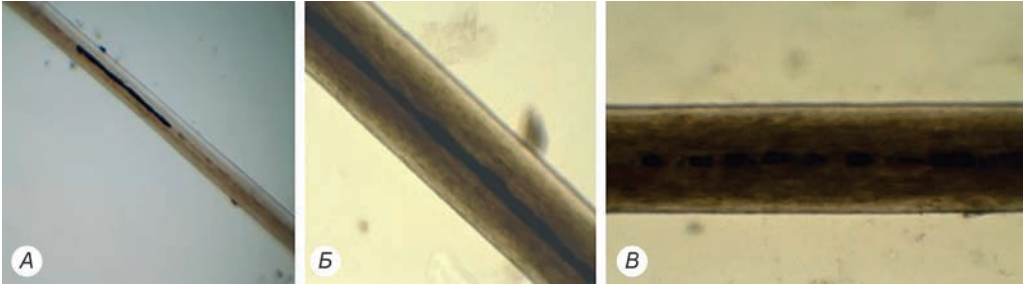


Рис. 3. Фотографії серцевини волоса людини: $\times 10$ (А); $\times 40$ (Б, В)

Fig. 3. Own photos of human hair core: $\times 10$ (A); $\times 40$ (B, B)

Серцевина містить бідні на Сульфур нетипові кератини з неорганізованою структурою та значну кількість повітряних порожнин [28]. Дисульфідні зв'язки у серцевині замінені на пептидні, що є основною причиною нерозчинності її протеїнів. У волоссі людини ідентифіковано два типи серцевини – тонку і товсту [51].

Тонка серцевина характеризується меншим розміром, більшою контрастністю і чітко визначеною межею між нею і кортексом. Товстій серцевині властива глобулярна структура та більші порожнини, кількість яких зменшується у напрямку від центру до кортикальної частини [51, 55].

Структура та функції кератинів волоса. Волос – це кератизоване волокно. Кератини – високоспеціалізовані фібрилярні протеїни, які синтезуються у певних епітеліальних клітинах вищих хребетних і утворюють основну масу рогового шару епідермісу та його придатків. Термін “кератин” (із грец. “керас” – ріг) виник приблизно на початку ХІХ ст. і використовувався для означення нерозчинних матеріалів, таких як роги та копита [38]. Із розвитком окисно-відновних методів у хімії вчені досягли певного успіху в екстрагуванні кератинів спочатку з рогів і копит, а потім із вовни та волосся людини. Саме за допомогою цих методів було виявлено, що кератини не є гомогенними білками, а мають складну четвертинну структуру. Субодиноці кератинів відрізняються молекулярними масами, а отже, структурою та виконуваними функціями.

Кератини відрізняються від інших структурних білків кількістю цистеїнових залишків у молекулі (7–20 % від загальної кількості). Дисульфідні зв'язки надають кератинам високої стійкості до хімічних і ензиматичних впливів. Наявність високої частоти дисульфідних зв'язків (0,8 мМоль/г) є основною для багатьох хімічних модифікацій кератину, які впливають на його фізико-хімічні властивості [52].

Ізоелектрична точка так званого “відновленого” кератину, тобто кератину, отриманого після відповідної екстракції, дорівнює 4,5, що забезпечує його здатність зв'язувати важкі метали, катіонні барвники, нафтопродукти із води, а також легкі речовини. Механізми, які забезпечують видалення полютантів із води та повітря, ґрунтуються на фізичній і хімічній адсорбції. Проте поглинання та фіксація забруднюючих речовин кератинами залежить від низки чинників, зокрема, від складу сорбенту, площі його поверхні, рН розчину, вихідної концентрації забруднюючих речовин, температури та ін. Важливою характеристикою сорбентів на основі кератинів є їхня здатність до регенерації [5].

Згідно з класифікацією J. Conway і D. Parry [7], кератини поділяються на тверді – Ia, IIa та м'які, або епідермальні – Ib і IIb. Такий поділ зроблено на основі амінокислотного аналізу кератинів. Тверді кератини є монолітнішими, більш конденсованими [8, 19, 20, 21] та інертними до навколишнього середовища, тоді як м'які є менш стійкими до дії ферментів і хімічних чинників [26, 27, 39].

Методи екстракції кератинів. Кератини, екстраговані з волоса, є предметом інтенсивних досліджень науковців усього світу через широкий спектр можливостей їх застосування в біотехнології та біомедицині, насамперед для створення імплантів, носіїв ліків, для тканинної інженерії, з огляду на їхню здатність до створення пористих матриць, самозбирання у тривимірні структури, біодеградації та низької цитотоксичності [18].

Екстракція кератинів із волоса є важливим етапом на шляху до створення біоматеріалів функціонального призначення. Вона ускладнюється наявністю великої кількості внутрішньомолекулярних і міжмолекулярних дисульфідних зв'язків [18, 32]. Важливим завданням на цьому етапі (рис. 4) є збереження нативних властивостей кератинів, на що впливає низка чинників (температура, значення pH, тривалість екстракції, вибір відновника та ін.), тому необхідно є цілеспрямована екстракція шляхом розриву міжмолекулярних дисульфідних зв'язків зі збереженням ковалентних зв'язків поліпептидного ланцюга.

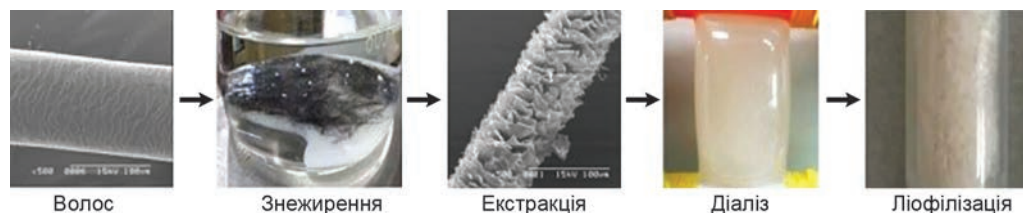


Рис. 4. Етапи екстракції кератинів [29]

Fig. 4. Keratin extraction stages [29]

У літературі описано чимало методів екстракції кератинів, більшість із яких базується на реакціях окиснення, відновлення та сульфїтолізу. Під час використання сильних окиснювачів цистеїнові залишки окиснюються до цистеїнової кислоти з утворенням кератоз – окисненої форми кератинів, екстрагованих із волосся людини (під час окиснення цистину в молекулі кератину дисульфідні зв'язки розриваються з утворенням залишків цистеїнової кислоти за схемою $\text{Ker}^1\text{-S-S-Ker}^2 \rightarrow \text{Ker}^1\text{-SO}_3\text{H} + \text{Ker}^2\text{-SO}_3\text{H}$). Цей процес необоротний. Натомість у разі використання відновників отримують кератеїни. Унаслідок сульфїтолізу, тобто розщеплення дисульфідних зв'язків у молекулі кератину за допомогою сульфїтів і бісульфїтів, утворюється S-сульфонат-аніон. Цей процес є оборотним. Для створення біоматеріалів використовують як кератози, так і кератеїни.

Наприклад, метод, запропонований L. Sando et al., – це метод окиснення вовни 2% надацетатною кислотою [42]. Дослідники B. Shi et al. [43], W.N. Marmar і R.L. Dudley [30] розробили метод окиснення вовни гідропероксосольватом карбонату натрію. Метод R. Hatakeyama et al. [17] полягає в почерговому відновленні зразків волосся тіогліколевою кислотою й окисненні гідроген пероксидом. Метод відновлення-сульфїдування, розроблений S.H. Fearheller et al. [12], передбачає

застосування сульфїду натрію та оксиду кальцію. A. Nakamura et al. [33] запропонували метод денатурування–відновлення в екстракційній суміші, що складалася зі сечовини, тіосечовини та 2 % меркаптоетанолу як відновника. Інший метод, в основі якого лежить принцип денатурування–відновлення, запропонували S. Isarankura Na Ayutthaya et al. [22], що передбачає застосування сечовини, додецилсульфату натрію та метабісульфїту натрію.

Детально проаналізувавши літературні джерела, у власних дослідженнях ми використали методи A. Nakamura (2002) та S. Isarankura Na Ayutthaya et al. (2015) для екстрагування кератинів вовни різних типів (кресбредної, напівгрубої, тонкої) та волоса людини.

Виділення кератинів методом A. Nakamura (2002) проводили з використанням меркаптоетанолу та дитіотреїтолу, що дало змогу порівняти вплив цих відновників на ефективність екстракції. Згідно з нашими результатами, використання дитіотреїтолу підвищує ефективність екстракції білків більш ніж удвічі [18].

Екстракція кератинів методом S. Isarankura Na Ayutthaya et al. (2015) засвідчила, що ефективність екстракції кератинів була в 1,6 разу вищою після використання екстракційної суміші, що складалася зі сечовини, додецилсульфату натрію та метабісульфїту натрію, ніж за використання сечовини, тіосечовини та меркаптоетанолу [18].

Згідно з дослідженнями Eleanor M. Brown et al. [6], усі перелічені вище методи є більш “м’якими” і дають змогу отримати протеїни з широким спектром молекулярних мас. Метод окиснення надацетатною кислотою дає можливість отримати найбільші розчинні фрагменти з молекулярною масою більше 60 кДа. Електрофоретичний профіль кератинів, отриманих окисненням гідропероксосольвату карбонату натрію, перебуває у діапазоні 50–200 кДа. У разі використання тіогліколевої кислоти й гідроген пероксиду (метод відновлення–окиснення) можна отримати білки в діапазоні від 6 до 200 кДа. Характерно, що більшість кератинів з молекулярною масою 40–70 кДа – це білки інтермедіальних філаментів [24].

Електрофоретичний профіль кератинів, отриманих двома методами, в основі яких покладено спільний принцип денатурування–відновлення, суттєво відрізняється. Так, за даними I. Isarankura Na Ayutthaya et al. (2015), використання екстракційної суміші, що складається зі сечовини, додецилсульфату натрію та метабісульфїту натрію можна отримати білки з молекулярною масою менше 30 кДа [22]. Наші результати свідчать про наявність двох смуг білків у діапазоні 40–60 кДа, які, згідно з літературними даними, можуть належати до білків інтермедіальних філаментів із низьким вмістом Сульфур, що локалізуються в кутикулі волосся. Унаслідок екстракції кератинів сумішшю, що містить сечовину, тіосечовину та 2% меркаптоетанол найвиразніші смуги білків перебувають у діапазоні 60–80 кДа та 6–14 кДа [33], тоді як ми виявили два поліпептидних ланцюги з молекулярними масами в діапазоні 40–50 кДа, що відповідають типу I і типу II білків інтермедіальних філаментів. У низькомолекулярній ділянці нами було виявлено смуги білків із молекулярною масою 10–30 кДа, які можна вважати кератин-асоційованими білками, що формують матрикс волокна [18]. Електрофореграми екстрагованих нами кератинів трохи відрізняються від описаних у вказаних вище статтях, оскільки ми використовували 12,5% поліакриламідний гель, тоді як у дослідженнях A. Nakamura (2002) та S. Isarankura Na Ayutthaya et al. (2015)

застосовували градієнтний гель, який дає можливість розділити білки з молекулярними масами ширшого діапазону.

Унаслідок відновлення—сульфидування білки розділяються на фракції з молекулярними масами в межах 66 кДа, 40–50 кДа та менше 20 кДа [9].

Застосування екстрагованих кератинів у біоінженерії та біомедицині. Дослідники зі всього світу багато десятиліть тому звернули увагу на природні макромолекули, зокрема, на білки як на матрицю для створення біоматеріалів через їхню здатність виконувати специфічні структурні та біохімічні функції. Сьогодні біоматеріали створюють на основі альгінатів, екстрагованих із водоростей, гіалуринової кислоти, отриманої з тканин тварин, хітозану, що міститься в панцирі креветок, а також на основі еластину, фібриногену, фібронектину, фіброїну, колагену і кератину [48, 56].

Фундаментальні дослідження природи кератинів були проведені протягом 1940–1970 років. Поштовхом до цього став стрімкий розвиток виробництва таких синтетичних волокон як нейлон і поліестер. Це становило загрозу для вовняної промисловості Австралії, яка на той час була лідером із виробництва й експорту вовни. У цей період були проведені масштабні дослідження, спрямовані на краще розуміння структури та біохімії кератинів і розширення меж їхнього застосування [40]. Напрацюваннями австралійських вчених активно цікавилися дослідники з усього світу, зокрема, Японії. Саме вони першими запропонували використовувати кератинове покриття для судин як спосіб запобігання згортанню крові [3].

Аналіз літературних джерел свідчить, що на сьогодні перспективи дослідження кератинів лежать у трьох напрямках. Перший стосується біомедичних технологій, від реалізації яких залежить ефективність лікування патологій волоса, а також створення інноваційних косметичних продуктів для догляду за ним. Другий напрям стосується нанотехнологій, третій – полягає у можливості застосування кератинів для ідентифікації особи, що особливо важливо для судово-медичної експертизи, а також для антропологічних досліджень [35]. Згідно з дослідженнями науковців зі США, білки волосся є набагато стійкішими і краще зберігаються в несприятливих умовах навколишнього середовища, ніж ДНК, яка руйнується значно швидше [35].

Кератини відрізняються від інших структурних білків високим вмістом цистеїну та дисульфідними зв'язками, що сприяє формуванню тривимірних каркасів і волокнистих матриць, резистентних до біологічної та хімічної деградації. Структура цих білків подібна до позаклітинного матриксу біологічних тканин. Від синтетичних полімерів кератини відрізняються складною ієрархічною будовою, багатофункціональністю компонентів системи та м'якими умовами синтезу.

Найпершими матеріалами, створеними на основі кератинів, були кератинові порошки для косметичних засобів і спеціальні покриття для лікарських препаратів [3].

К. Yamauchi et al. досліджували фізико-хімічні властивості та здатність до біодеградації матеріалів, отриманих із кератинів, екстрагованих з вовни, зокрема, кератинових плівок [54]. Згідно з їхніми дослідженнями, поєднання екстрагованого кератину з гліцерином сприяє їхній біодеградабельності, робить плівки прозорими, міцними та більш гнучкими [54], а використання хітозану надає їм ще й антибактеріальних властивостей [48].

Дослідники К. Wrzesniewska-Toski et al. [53] поєднували кератини, екстраговані з пір'я курей, з біомодифікованою целюлозою для створення волокон, що характеризувалися кращими сорбційними властивостями, підвищеною гігроскопічністю і меншим кутом змочування, ніж волокна целюлози. Додавання кератину до целюлозних волокон трохи погіршувало їхні механічні властивості, проте було досягнуто оптимального співвідношення фракції кератин-целюлоза, що дало змогу застосовувати їх для виготовлення композитних волокнистих матеріалів. Крім того, целюлозно-кератинові волокна мали кращі біодеградабельні властивості, ніж целюлозні.

З'ясовано, що кератинові плівки мають хорошу адгезивність і здатність підтримувати клітинну проліферацію, що робить їх хорошим субстратом для культивування культури клітин, зокрема, фібробластів мишей. Дослідження С. Tonin et al. [49] продемонстрували перспективність поєднання кератинових плівок із таким синтетичним полімером як поліетиленоксид. Плівки такого типу можна застосовувати як каркас для росту клітин, перев'язувальний матеріал або ж як мембрану для доставки ліків.

Окрім того, кератини з желатином і фіброїном поєднують з метою виробництва нановолокон. Змінюючи співвідношення компонентів суміші кератини-фіброїн, можна отримати нановолокна різного діаметра. Наприклад, у процесі електроспінінгу розчину, який містить по 50 % кератину та фіброїну, розмір волокон становить 207 нм [56].

Оптимальний вміст кератину для формування волокна становить 30 %, це забезпечує механічну міцність, водонепроникність, адсорбцію хімічних речовин. Наприклад, поєднання полівінілового спирту з кератином є дуже перспективним для створення абсорбентів для іонів важких металів і парів формальдегідів. Застосовують нановолокна у косметології, для виробництва сенсорів, фільтрів для очищення води і повітря, технічного та медичного текстилю, захисного одягу, скаффолдів для тканинної інженерії та цільової доставки ліків. Мембрани, виготовлені на основі кератинових нановолокон, мають велику площу поверхні, високу пористість (розмір пор у нанодіапазоні), мають унікальні хімічні, фізичні, оптичні й електричні властивості. Окрім цього, такі мембрани мають здатність до хімічної та фізичної функціоналізації, тобто набуття нових властивостей через зміну поверхні молекули кератину під дією фізичних (обробка УФ-променями) та хімічних (обробка гідроген пероксидом і т. д.) чинників [25].

За допомогою ліофілізованого кератину можна створювати термостійкі матриці. Важливо відзначити, що кератини, виділені з вовни і людського волоса, містять такі мотиви, як аргінін-гліцин-аспарагінова кислота і лейцин-аспарагінова кислота-валін, що імітують ділянки для клітинної адгезії, характерні для позаклітинного матриксу. Ці мотиви сприяють клітинному прикріпленню, проліферації та диференціації протягом тривалого періоду. Вільні залишки цистеїну в молекулі кератину здатні до іммобілізації біологічно активних речовин [50].

Кератини, екстраговані з волосся людини, є хорошим матеріалом для створення губок (рис. 5). За допомогою електронної мікроскопії було показано, що такі губки здатні набухати, збільшуючи свою площу майже удвічі протягом години, а середній діаметр пор становить 150 мкм [50]. Кератинові губки – це перспективна сировина для тканинної інженерії, оскільки кератини, екстраговані саме з волосся

людини, є цитосумісними і біодеградабельними. А. Tachibana et al. у своїх дослідках поєднали кератинові губки з фосфатами кальцію та застосовували їх для культивування остеобластів [46].

Ще однією перспективою використання кератинів є створення на їхній основі гідрогелів, які покращують регенерацію нервів [44]. Кератини, екстраговані з волосся людини, посилюють активність шваннівських клітин *in vitro*, індукуючи клітинну проліферацію і міграцію, а також посилюють експресію генів фактора росту нервів (NGF), S100 кальцій-зв'язувального протеїну В (S100B), гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) і рецептора нейротрофінів р75, необхідних для здійснення важливих функцій нейронів. Прискорення регенерації нервів проявляється у збільшенні щільності аксонів і їхньої мієлінізації. Зокрема, під час використання гідрогелю, створеного на основі α -кератози, у дорослих мишей із дефектом великогомілкового нерва отримано значно кращі результати на 6-й тиждень порівняно з результатами регенерації нерва у разі використання алотрансплантата. Подібні результати були отримані й у дослідженнях на макаках [44].

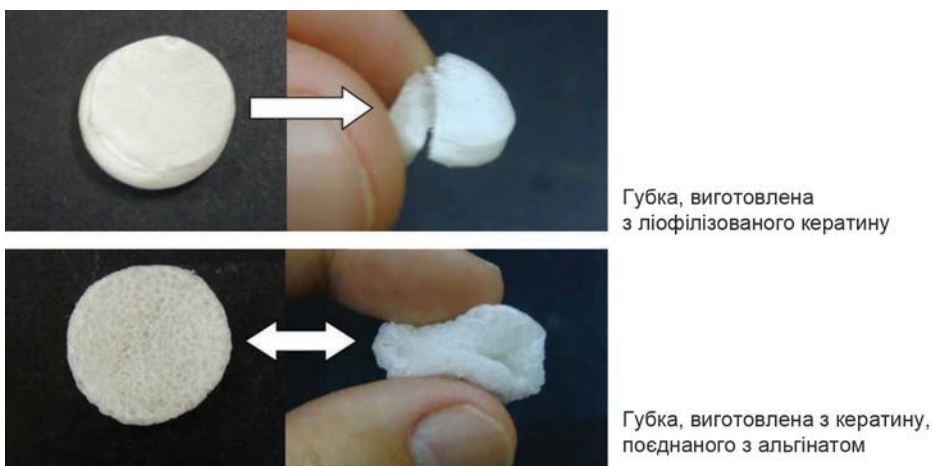


Рис. 5. Поєднання кератину з альгінатом робить губки гнучкішими порівняно з губками, виготовленими лише з кератину [15]

Fig. 5. The combination of keratin with alginate makes sponges more flexible compared to sponges made only of keratin [15]

Також гідрогелі мають хороші гемостатичні властивості, посилюючи формування фізичного ущільнення місця поранення [1].

Біоматеріали на основі кератоз і кератеїнів як носії молекул кісткового морфогенетичного протеїну-2 (BMP-2) були використані для регенерації дефектів щелепової кістки в модельному дослідженні, результати якого довели кращу біосумісність і мінімальний токсичний вплив, ніж біоматеріали, створені на основі колагену [47].

ВИСНОВКИ

Отже, в науковій літературі є достатньо даних щодо використання матеріалів на основі кератинів як матриці для розробки біоматеріалів медичного призначен-

ня. Перспективність цих протеїнів забезпечується унікальними біохімічними особливостями, а саме: високим вмістом Сульфуру, здатністю до гідратації та самозбирання, м'якими умовами синтезу, ієрархічною будовою та мультифункціональністю. Водорозчинні протеїни, отримані вищевказаними методами, у численних дослідженнях продемонстрували успішність їхнього застосування як матеріал для біомедичних і біотехнологічних цілей (регенерація тканин, цільова доставка ліків, виготовлення біофільтрів для очищення води та повітря, виробництва медичного та технічного текстилю), що, у свою чергу, вирішує значну екологічну проблему, пов'язану зі щорічними викидами мільйонів тонн низькоякісної вовни, не придатної для прядіння, пір'я, шерсті із забійних цехів, волосся із перукарських салонів, а також побічних продуктів текстильної промисловості.

1. *Aboushwareb T., Eberli D., Ward C., Broda C., Holcomb J., Atala A., Van Dyke M.* A keratin biomaterial gel hemostat derived from human hair: Evaluation in a rabbit model of lethal liver injury. **J. Biomed. Mater. Res. B.**, 2009; 90: 45–54.
[DOI: <http://doi.org/10.1002/jbm.b.31251>]
2. *Bertrand L., Doucet J., Simionovici A., Tsoucaris G., Walter P.* Lead-revealed lipid organisation in human hair. **Biochim Biophys Acta**, 2003; 1620: 218–224.
[DOI: [http://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00538-x](http://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00538-x)]
3. *Beyer C.* The keratin or horny substance of the hair. DE22643. **German Pat.**, 1907.
4. *Bouillon C., Wilkinson J.D.* **The Science of Hair Care**. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group., 2005; 752.
5. *Bragulla H.H., Homberger D.G.* Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **J Anat.** 2009; 214(4): 516–59.
[DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>; PMID: PMC2736122]
6. *Brown E.-M., Pandya K., Taylor M.-M., Liu C.-K.* Comparison of methods for extraction of keratin from waste wool. **Agric. Sci.**, 2016; 7: 670–679.
[DOI: <https://doi.org/10.4236/as.2016.710063>]
7. *Conway J.F., Parry D.A.D.* Structural features in the heptad substructures and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins. **Int J Biol Macromol**, 1990; 12: 328–334.
[[https://doi.org/10.1016/0141-8130\(90\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0141-8130(90)90023-4)]
8. *Coulombe P.A., Omary M.B.* “Hard” and “soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr Opin Cell Biol**, 2002; 14(1): 110–22.
[[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(01\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(01)00301-5)]
9. *Deb-Choudhury S., Plowman J.E., Harland D.P.* Isolation and Analysis of Keratins and Keratin-Associated Proteins from Hair and Wool. **Methods in Enzymology**, 2016; 568: 279–301.
[DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2015.07.018>]
10. *Deedrick D.W.* Microscopy of hair part 1: a practical guide and manual for human hair. **Forensic Sci. Commun.**, 2004; 1: 1–7.
11. *Fan J., Liu J.-F., He J.-H.* Hierarchy of Wool Fibers and Fractal Dimensions. **International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation**, 2008; 9(3): 293–296.
[DOI: <https://doi.org/10.1515/IJNSNS.2008.9.3.293>]
12. *Fairheller S.H., Taylor M.M., Windus W., Filachione E.M., Naghski J.* Recovery and Analyses of Hair Proteins from Tannery Unhairing Wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1972; 20: 668–670.
[DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf60181a033>]
13. *Feughelman M., Johnson D. H.* Morphology and properties of hair. **Hair and hair care**, 1997; 1–32.
14. *Fraser R., David A.* Macrofibril assembly in trichocyte (hard α -) keratins. **Journal of Structural Biology**, 2003; 142: 319–325.
[[https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00027-3)]

15. *Hamasaki S., Tachibana A., Tada D., Yamauchi K., Tanabe T.* Fabrication of highly porous keratin sponges by freeze-drying in the presence of calcium alginate beads. **Mater Sci Eng**, 2008; 28: 1250–1254.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.11.008>; Google Scholar]
16. *Harland D.P., Caldwell J.P., Woods J.L., Walls R.J., Bryson W.G.* Arrangement of trichokeratin intermediate filaments and matrix in the cortex of Merino wool. **J Struct Biol**, 2011; 173(1): 29–37.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.08.009>]
17. *Hatakeyama R., Tomita Y., Takigami S.* Preparation of Water Soluble Wool Keratin and Its Application for Human Hair. **Transactons of the Materials Research Society of Japan**, 2009; 34: 399–402.
[DOI: <http://dx.doi.org/10.14723/tmrsj.34.399>]
18. *Havryliak V.V., Mykhaliuk V.V.* The factors impacting the efficiency of the extraction of keratin wool fibers. **Visnyk of Lviv University. Biological Series**, 2016; 73: 47–50. (In Ukrainian)
19. *Heid H.W., Moll I., Franke W.W.* Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum). **Differentiation**, 1988; 37(2): 137–157.
[DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1988.tb00724.x>]
20. *Heid H.W., Moll I., Franke W.W.* Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. **Differentiation**, 1988; 37(2): 137–157.
[DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1988.tb00805.x>]
21. *Heid H.W., Werner E., Franke W.W.* The complement of native alpha-keratin polypeptides of hair-forming cells: a subset of eight polypeptides that differ from epithelial cytokeratins. **Differentiation**, 1986; 32(2): 101–119.
[DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1986.tb00562.x>]
22. *Isarankura Na Ayutthaya S., Tanpichai S., Wootthikanokkhan J.* Keratin Extracted from Chicken Feather Waste: Extraction, Preparation, and Structural Characterization of the Keratin and Keratin/Biopolymer Films and Electrospuns. **Journal of Polymers**, 2015; 23(4).
[DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0725-8>]
23. *Jones L.N., Rogers G.E., Rufaut N., Sinclair R.D.* Location of keratin-associated proteins in developing fiber cuticle cells using immunoelectron microscopy. **Int J Trichology**, 2010; 2: 89–95.
[DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-7753.77512>; PMID: 21712910]
24. *Jones L.N., Simon M., Watts N.R., Booy F.P., Steven A.C., Parry D.A.D.* Intermediate Filament Structure: Hard α -Keratin. **Biophysical Chemistry**, 1997; 68: 83–93.
[DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622\(97\)00013-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622(97)00013-6)]
25. *Katoh K., Shibayama M., Tanabe T., Yamauchi K.* Preparation and properties of keratin-poly(vinyl alcohol) blend fiber. **J Appl Polym Sci**, 2004; 91: 756–762.
[DOI: <https://doi.org/10.1002/app.13236>; Google Scholar]
26. *Langbein L., Rogers M. A., Winter H., Praetzel S., Beckhaus U., Rackwitz H.R., Schweizer J.* The catalog of human hair keratins: I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. **J Biol Chem**, 1999; 274:19874–19893.
[DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19874>]
27. *Langbein L., Rogers M.A., Winter H., Praetzel S., Schweizer J.* The catalog of human hair keratins: II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and type II keratins. **J Biol Chem**, 2001; 276(37): 35123–35132.
[DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M103305200>]
28. *Langbein L., Yoshida H., Praetzel-Wunder S., Parry D.A., Schweizer J.* The keratins of the human beard hair medulla: the riddle in the middle. **J Invest Dermatol**, 2010; 130: 55–73.
[DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2009.192>]

29. Lee, H., Noh, K., Lee, S.C., Kwon, I.K., Han, D.W., Lee, I.S., Hwang, Y.S. Human Hair Keratin and Its-Based Biomaterials for Biomedical Applications. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2014; 11: 255–265.
[DOI: <https://doi.org/10.1007/s13770-014-0029-4>]
30. Marmer W.N., Dudley R.L. The Oxidative Degradation of Keratin (Wool and Bovine Hair). **Journal of the American Leather Chemists Association**, 2006; 101: 408–415.
31. McKinnon A.J., Harland D.P. The role of liquid-crystalline structures in the morphogenesis of animal fibers. **Int J Trichology**, 2010; 2: 101–103.
[DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-7753.77516>; PMCID: PMC3107951]
32. Naito S., Arai K. Type and location of SS linkages in human hair and their relation to fiber properties in water. **J Appl Polym Sci**, 1996; 61: 1918–2113.
[DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960919\)61:12<2113::AID-APP9>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960919)61:12<2113::AID-APP9>3.0.CO;2-D)]
33. Nakamura A., Arimoto M., Takeuchi K., Fujii T. A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2002; 25: 569–572.
[DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.25.569>.]
34. Orfanos C.E., Montagna W., Stuttgart G. **Hair Research**. Springer, 1981; 712 p.
35. Parker G.J., Leppert T., Anex D.S., Hilmer J.K., Matsunami N., Baird L., et al. Demonstration of Protein-Based Human Identification Using the Hair Shaft Proteome. **PLoS One**, 2016; 11(9): e0160653.
[DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160653>]
36. Plowman J.E., Deb-Choudhury S., Bryson W.G., Clerens S., Dyer J.M. Protein expression in orthocortical and paracortical cells of merino wool fibers. **J. Agric. Food Chem.**, 2009; 57(6): 2174–2180.
[DOI: <https://doi.org/10.1021/jf803290h>]
37. Plowman J.E., Paton L.N., Bryson W.G. The differential expression of proteins in the cortical cells of wool and hair fibres. **Exp Dermatol**, 2007; 16(9): 707–714.
[DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00576.x>]
38. Powell B.C., Rogers G.E. **Hair keratin: composition, structure and biogenesis**. J. Bereiter-Hahn. Springer, 1986; 695–721.
39. Rafik M.E., Doucet J., Briki F. The intermediate filament architecture as determined by X-ray diffraction modelling of hard α -keratins. **Biophys J**, 2004; 86: 3893–39.
[DOI: <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.034694>; PMCID: PMC1304291]
40. Rivett D.E., Ward S.W., Belkin L.M., Ramshaw J.A.M., Wilshire J.F.K. **The Lennox Legacy**. CSIRO Publishing; Collingwood, VIC, Australia: 1996. Keratin and Wool Research.
[Google Scholar]
41. Rogers G. Laser capture microscopy in a study of expression of structural proteins in the cuticle cells of human hair. **Exp Dermatol**, 2009; 18: 541–547.
[DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00825.x>]
42. Sando L., Kim M., Colgrave M.L., Ramshaw J.A.M., Werkmeister J.A., Elvin C.M. Photochemical crosslinking of soluble wool keratins produces a mechanically stable biomaterial that supports cell adhesion and proliferation. **J Biomed Mater Res A**, 2010; 95(3): 901–911.
[DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32913>]
43. Shi B., Lu X., Sun D., Cao M. The Mechanism of Oxidative Unhairing Using Hydrogen Peroxide. **Journal of the American Leather Chemists Association**, 2003; 98: 185–192.
44. Sierpinski P., Garrett J., Ma J., Apel P., Klorig D., Smith T., Koman L.A., Atala A., Van Dyke M. The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. **Biomaterials**, 2008; 29: 118–128.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.023>; Google Scholar]
45. Swift J.A., Smith J.R. Atomic force microscopy of human hair. **Scanning**, 2000; 22(5): 310–318.
[DOI: <https://doi.org/10.1002/sca.4950220506>]

46. Tachibana A., Kaneko S., Tanabe T., Yamauchi K. Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation. **Biomaterials**, 2005; 26: 297–302.
[DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.032>; Google Scholar]
47. Tachibana A., Nishikawa Y., Nishino M., Kaneko S., Tanabe T., Yamauchi K. Modified keratin sponge: Binding of bone morphogenetic protein-2 and osteoblast differentiation. **J Biosci Bioeng**, 2006; 102: 425–429.
[DOI: <https://doi.org/10.1263/jbb.102.425>; Google Scholar]
48. Tanabe T., Okitsu N., Tachibana A., Yamauchi K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. **Biomaterials**, 2002; 23: 817–825.
[DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00187-9); Google Scholar]
49. Tonin C., Aluigi A., Vineis C., Varesano A., Montarolo A., Ferrero F. Thermal and structural characterization of poly(ethylene-oxide)/keratin blend films. **J Therm Anal Calorim**, 2007; 89: 601–608.
[DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-006-7557-7>; Google Scholar]
50. Verma V., Verma P., Ray P., Ray A.R. Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications. **Biomed Mater**, 2008; 3: 25007.
[DOI: <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/2/025007>; Google Scholar]
51. Wagner R., Kiyohara P. K., Silveira M., Joeke I. Electron microscopic observations of human hair medulla. **J Microsc**, 2007; 226: 54–63.
[DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01747.x>]
52. Wolfram L.J. Human hair: A unique physicochemical composite. **J Am Acad Dermatol**, 2003; 48: 106–114.
[DOI: <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.276>]
53. Wrzesniewska-Tosik K., Wawro D., Ratajska M., Stęplewski W. Novel composites with feather keratin. **Fibres Text. East. Eur.**, 2007; 15: 157–162.
[Google Scholar]
54. Yamauchi K., Yamauchi A., Kusunoki T., Kohda A., Konishi Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. **J. Biomed. Mater. Res.**, 1996; 31: 439–444.
[DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199608\)31:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199608)31:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-M)]
55. Zahn H., Jolles P., Hocker H. **Formation and Structure of human hair**. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1997. P. 59–148.
[DOI: <https://doi.org/10.1177/004051759706701110>]
56. Zoccola M., Aluigi A., Vineis C., Tonin C., Ferrero F., Piacentino M.G. Study on cast membranes and electrospun nanofibers made from keratin/fibroin blends. **Biomacromolecules**, 2008; 9: 2819–2825.
[DOI: <https://doi.org/10.1021/bm800579a>; Google Scholar]

METHODS OF KERATIN EXTRACTION FROM WOOL AND HAIR AND PROSPECTS OF THEIR APPLICATION IN BIOMEDICINE AND BIOENGINEERING

V. V. Mykhaliuk^{1*}, V. V. Havryliak²

¹ Institute of Animal Biology, NAAS, 38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine

² Lviv Polytechnic National University, Institute of Chemistry and Chemical Technology
3/4, St. Yura Sq., Lviv 79013, Ukraine

* Corresponding author: e-mail: vasylyna.v.m@gmail.com

The present article gives the overview of scientific information on the hair structure, the structural and functional properties of keratins, and methods of their extracting from the natural fibers. The article substantiates an importance of keratin extraction by breaking

the disulfide bonds and converting the keratin into a soluble form while maintaining covalent bonds. Such extraction preserves the native properties of these proteins, that ensures their further use as functional biomaterials. The examples of such properties are: resistance of keratin to the effects of chemical and biological factors (due to high frequency of disulfide bonds that make a large number of chemical modifications of proteins possible) and high biocompatibility and low cytotoxicity of keratin-based preparations (due to a similarity of keratin to the extracellular matrix of biological tissues). The keratin-based materials, obtained by this way and then lyophilized, can form fibrillar structures when a particular solvent is selected. The methods of keratins extraction, as well as the efficiency and electrophoretic profiles of obtained extracts, were also analyzed. The purposeful extraction is carried out by the methods based on oxidation, reduction, and sulfitolysis reactions. The oxidation reactions of keratin are irreversible and cause the oxidation of cysteine residues to cysteic acid with the formation of keratosis. At the same time, keratin is obtained due to a reduction reactions. As a result of the reversible process of sulfitolysis, the S-sulfonate anion is formed. The paper also considers promising applications of extracted keratin in biomedicine and bioengineering. The biomedical technologies are related to the effective treatment of hair pathologies. The second area is the creation of keratin-based biomaterials with a wide range of applications, such as tissue engineering, reparative medicine, textile industry, agriculture, cosmetology, and production of cleaning equipment. The third area of keratins application is the identification of a person. Such application makes an important contribution to the anthropological research and forensic science. High resistance of hair proteins to adverse environmental conditions makes this area very promising.

Keywords: hair, keratins, extraction

Одержано: 30.09.2019