

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

УДК 636.32/38:677.31:577.1

**МИХАЛЮК ВАСИЛИНА ВОЛОДИМИРІВНА**

**БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЕРАТИНІВ ТА СТВОРЕНИХ НА ЇХ  
ОСНОВІ МОДЕЛЕЙ БІОМАТЕРІАЛІВ**

**03.00.04 – біохімія**

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Львів – 2021**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біології тварин НААН.

**Науковий керівник** – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Гавриляк Вікторія Василівна**,  
Національний університет «Львівська політехніка»,  
професор кафедри технології біологічно активних  
сполук, фармації та біотехнології Інституту хімії та  
хімічних технологій.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Савчук Олексій Миколайович**,  
КНУ імені Тараса Шевченка, завідувач кафедри біохімії  
ННЦ «Інститут біології та медицини»;

доктор біологічних наук, професор  
**Юкало Володимир Глібович**,  
Тернопільський національний технічний університет  
імені Івана Пулюя, професор кафедри харчової  
біотехнології та хімії.

Захист відбудеться «27» квітня 2021 р. о «11<sup>00</sup>» годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.368.01 в Інституті біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий «26» березня 2021 р.

**Вчений секретар**  
спеціалізованої вченої ради

**Д. І. Мудрак**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Волос у широкому біологічному значенні є складним волокном із неоднорідною морфологічною структурою. Поєднання різних компонентів у волокні зумовлює формування його унікальних фізико-механічних властивостей. Основним компонентом волоса, близько 90–95 % маси, є кератин, який належить до групи нерозчинних протеїнів зі значним вмістом Сульфуру (Posati T. et al., 2018).

Кератини є біополімерами з ієрархічною структурою субодиниць – від  $\alpha$ -ланцюгів через мікрофібрили до волокна. На молекулярному рівні кератини відрізняються від інших структурних протеїнів високим рівнем дисульфідних зв'язків, які забезпечують утворення компактної тривимірної структури, стійкої до біологічної і хімічної деградації (Saha S. et al., 2019).

Сьогодні біоматеріали та їх дизайн є одним із найважливіших інноваційних підходів у різних галузях, зокрема, для розроблення сенсорів, створення оптико-електронних матеріалів, робототехніки, медицини. З одного боку, такі біополімери, як фіброїн, еластин, хітозан, кератин широко використовують у біомедицині завдяки їх широкій доступності, низькій токсичності, біосумісності і біоактивності (Deb-Choudhury S., 2016), з іншого – існують можливості для використання натуральних параметрів біополімерів та їх адаптації до стимулів навколишнього середовища.

Відомо, що структура кератину подібна на позаклітинний матрикс біологічних тканин, завдяки чому біоматеріали на його основі широко використовують як матриці для адгезії клітин і як основу для безклітинної підтримки нативних тканин (Cheng, Z. et al., 2018).

Унікальною характеристикою екстрагованих кератинів є їх здатність до самозбирання та самоагрегації (Saha S. et al., 2019). У науковій літературі досить багато інформації про застосування кератину для розробки нановолокон (Cochis A., 2017), гідрогелів (Ajay Sharma, 2017; Du H., 2019), плівок (Isarankura N., 2015; McLellan J., 2019), 3D-скафолдів для тканинної інженерії (Saha S. et al., 2019), наноконтейнерів для контрольованої доставки лікарських засобів (Posati T., et al., 2018), загоєння ран (Kelly R., 2016), регенерації нервових волокон (Pace L., 2013).

Екстрагування кератинів з волоса людини чи тваринних волокон є першим кроком до створення функціональних біоматеріалів, тому дуже важливо правильно підібрати метод солюбілізації, врахувавши вплив багатьох чинників, зокрема, температури, значення рН, тривалості екстракції, вибору відновника.

Для екстрагування кератину існує безліч різних методів, проте всі вони переважно базуються на окисненні або відновленні дисульфідних зв'язків у його молекулі (Saha S. et al., 2019). Отримані на основі кератинів матеріали можуть істотно відрізнитися за складом, структурою і властивостями залежно від конкретного джерела та методів його обробки.

Із огляду на це існує необхідність проведення експериментальних досліджень із вибору оптимальних умов для екстракції кератинів із морфологічно відмінних вовняних волокон та волоса людини з урахуванням впливу різних чинників і створення на їх основі біоматеріалів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота була частиною наукової тематики лабораторії обміну речовин імені С. З. Гжицького Інституту біології тварин НААН за завданням 35.00.02.07 П «Вивчити структурні особливості вовни та розробити способи покращення її технологічних і фізико-хімічних властивостей» (№ДР 0116U001416), у якій дисертантка була співвиконавицею і вивчала характеристики солюбілізованих кератинів, отриманих із морфологічно відмінних природних волокон за різних умов та їх застосування як біоматеріалів функціонального призначення.

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – з'ясувати біохімічні характеристики солюбілізованих кератинів, отриманих різними способами з вовни та волоса людини і розробити на їх основі біоматеріали з цільовими властивостями.

Для досягнення поставленої мети в роботі визначено такі *завдання*:

- дослідити вплив різних чинників на екстракцію кератинів з різних волокон і порівняти її ефективність;
- охарактеризувати солюбілізовані кератини та дослідити вплив створеної на їх основі композиції на фізико-хімічні параметри вовняних волокон;
- з'ясувати можливість використання хімічно модифікованого кератину як біосорбенту для зв'язування іонів важких металів із водних розчинів їх солей;
- порівняти ефективність адсорбції функціоналізованим кератином іонів Плюмбуму та Кадмію за різного рН;
- отримати плівки на основі солюбілізованого кератину та дослідити їх основні характеристики.

*Об'єкт дослідження* – регеновані кератини, отримані з різних видів природних волокон, та біоматеріали, виготовлені на їх основі.

*Предмет дослідження* – біохімічні властивості кератинів за впливу температури, рН та відновників, адсорбція біосорбентом на основі кератину іонів важких металів, процес виготовлення плівок і їх стабілізація.

*Методи дослідження*: біохімічні (фракціонування протеїнів, електрофорез у поліакриламідному гелі, спектрофотометрія), мікроскопічні (світлова мікроскопія, сканувальна електронна мікроскопія, поєднана з рентгенівським мікроаналізом), фізико-хімічні (визначення міцності, тонини, розчинності волокон), методи математичної статистики.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Визначено оптимальні параметри для екстрагування кератинів із вовняних волокон і волоса людини, які забезпечують максимальне отримання регенованого протеїну.

Уперше досліджено ефективність солюбілізації кератину з морфологічно відмінних вовняних волокон за дії таких чинників, як температура, рН і тривалість екстракції. З'ясовано, що в разі заміни у складі екстракційної суміші 2-меркаптоетанолу (2-МЕ) на дигіотреїтол (ДТТ) суттєво підвищувалася ефективність екстракції кератинів із вовни, а натрію метабісульфіту – з волосся.

Уперше запропоновано стабілізувати отримані методом кастингу плівки на основі регенованого кератину водною парою. Виявлено зміни в їх структурі залежно від використання як пластифікатора гліцеролу та показано їх біосумісність у адсорбційному тесті.

На основі кератину вовни отримано біосорбент, який ефективно зв'язує іони Плюмбуму та Кадмію. Показано, що ефективність адсорбції важких металів біосорбентом залежить від рН водних розчинів. Виявлено, що хімічна обробка істотно підвищує адсорбційну ємність біосорбентів, яка в модельних системах за однакових умов вища для іонів Плюмбуму, ніж для іонів Кадмію.

Отримані дані відкривають нові перспективи у дослідженні структурно-функціональних характеристик солюбілізованих кератинів та їх потенційному використанні у біомедицині.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати дисертаційного дослідження є науковим підґрунтям для розробки підходів до створення біоматеріалів на основі природних біополімерів. Визначено оптимальний метод екстракції кератинів, який забезпечує отримання протеїнів мікрофібрилярної структури. Для покращення фізико-хімічних характеристик вовни запропоновано обробляти їх 3% розчином регенованого кератину після попередньої хімічної модифікації поверхні волокна гідроген пероксидом, що докладно викладено у методичних рекомендаціях «Методи модифікації вовняних волокон».

Запропоновані в дисертаційній роботі методологічні підходи до створення біосорбенту на основі кератинів можуть бути використані для елімінації важких металів із водних розчинів.

Розроблено схему одержання біоактивної та біосумісної плівкової моделі на основі регенованого кератину для використання у репаративній медицині.

Результати досліджень поглиблюють сучасні уявлення про кератини, їх потенційне застосування, що дає підстави використовувати їх у навчальних курсах із біохімії та біотехнології, а також у науковому процесі на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

**Особистий внесок здобувача.** Авторка дисертаційного дослідження самостійно провела аналіз та інтерпретацію наукової літератури, виконала експериментальну частину роботи (на базі Інституту біології тварин НААН) і статистичну обробку даних. Усі розділи дисертації написані авторкою самостійно. Планування досліджень, аналіз і обговорення отриманого матеріалу, підготовку рукописів статей проведено разом із науковим керівником. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, використано фактичний матеріал досліджень автора.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові положення дисертаційної роботи були представлені на таких наукових заходах: «Nauki przyrodnicze we współczesnym świecie» (Щецин, Польща, 2017), East West Chemistry conference (Львів, 2018), XIV Міжнародна конференція «Young scientists towards the challenges of modern technology» та IX Міжнародний молодіжний науковий форум «Litteris et Artibus» (Львів, 2019), The 5<sup>th</sup> International conference on biotechnology, environment and engineering sciences (Стокгольм, Швеція, 2019), XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135-й річниці від дня народження Я. Парнаса (Львів, 2019) і на щорічних звітних наукових конференціях Інституту біології тварин НААН «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2016–2020).

**Публікації.** Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях, з них 3 у фахових наукових виданнях України, що входять до міжнародних наукометричних баз даних, 1 – у зарубіжному виданні, яке включене до міжнародної бази даних Scopus, 2 – у наукових зарубіжних виданнях, 9 тезах доповідей наукових конференцій, методичних рекомендаціях.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, 2 додатків. Дисертацію викладено на 152 сторінках комп'ютерного тексту (основний зміст – 127 сторінок), проілюстровано 49 рисунками та 9 таблицями. Список використаних джерел містить 225 найменувань, з яких 210 – латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** Огляд літератури складається з 6 підрозділів, у яких висвітлено інформацію про будову волоса, структурні та функціональні характеристики кератинів. Значну увагу приділено огляду методів екстракції кератинів і можливостям їх застосування у біомедицині та біоінженерії.

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження за темою дисертаційної роботи проведені впродовж 2016–2019 років відповідно до планів науково-дослідних робіт лабораторії обміну речовин імені С. З. Гжицького Інституту біології тварин НААН. У роботі використовували морфологічно відмінні волокна вовни овець і волос людини. Усі дослідження відповідають вимогам норм біоетичної експертизи згідно з Наказом МОЗ України № 281 від 01. 11. 2000 р., Конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, від 18. 03. 1986 р., Директиви ЄЕС № 609 від 24. 11. 1986 р. та протоколу № 86 засідання комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН від 26. 06. 2020 р.

Відповідно до поставлених завдань дисертаційної роботи експериментальна частина складалася з трьох серій досліджень. Перша серія досліджень полягала у з'ясуванні оптимальних умов екстракції кератинів. Для цього порівнювали ефективність екстракції за використання окиснювально-відновних методів та сульфітолізу. Вивчали вплив на процес екстракції таких факторів, як вибір відновника, температура, значення рН, тип волокна та, власне, тривалість екстракції. Концентрацію протеїнів визначали методом Бредфорда (Bradford M., 1976). Отримані розчини кератину ліофілізували за температури  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  у вакуумі. Структуру кератину підтверджували за допомогою ІЧ-спектроскопії, а склад протеїнів – методом електрофорезу в буферній системі Леммлі (Laemmli U., 1970). Досліджували ефективність застосування відновленого кератину для обробки вовняних волокон з метою покращення їх хімічних і фізичних параметрів.

Метою другої серії роботи було з'ясувати можливості використання сорбенту на основі кератину для елімінації іонів важких металів із їх водних розчинів. Досліджували біосорбцію іонів важких металів за різного значення рН. Порівнювали вплив попередньої обробки вовняних волокон натрій метабісульфітом та гідроген пероксидом на адсорбційну активність кератинів.

Завдання третьої серії експериментів передбачало створення моделей кератинових плівок для застосування в біомедицині. З цією метою плівки виготовляли з відновленого кератину методом кастиingu. Їх біосумісність досліджували за допомогою адсорбційного тесту інкубуванням отриманих плівок у сироватці крові людини упродовж 5 і 15 хв. Протеїни, адсорбовані плівкою (контактна сироватка) та десорбовані із застосуванням додецилсульфату натрію з поверхні плівки, розділяли методом електрофорезу. За допомогою сканувальної електронної мікроскопії оцінювали морфологічні властивості плівок із використанням гліцеролу та без нього.

Для статистичного аналізу даних використовували програму OriginPro 8.5 та Excel відповідно до загальноприйнятих алгоритмів. У роботі наведено середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ), які представлено в таблицях і на рисунках. Вірогідність відхилення значень обчислювали з використанням критерію Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності за  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### Вибір оптимальних параметрів екстракції кератинів і їх характеристика.

**Вплив рН на ефективність екстракції кератинів.** Констатовано, що значення рН істотно впливало на ефективність екстракції кератинів (табл. 1). Обраний діапазон рН коливався в межах 6,5–8,5. Найбільший вміст розчинного протеїну практично для всіх типів волокон зафіксовано за рН середовища 8,5. Найбільший вміст протеїну екстраговано з тонких вовняних волокон, що, очевидно, може бути пов'язане з їх будовою.

Таблиця 1

### Вплив рН на вміст розчинного протеїну, отриманого з різних типів вовняних волокон за використання 250 мМ 2-МЕ впродовж 24 год ( $M \pm m$ , $n=5$ )

рН	Вміст розчинного протеїну, мг/мл		
	тонка вовна	кросбредна вовна	ость
6,5	2,21±0,11	2,34±0,35	1,92±0,30
7,5	3,02±0,27	3,13±0,31	2,71±0,24
8,5	3,74±0,15*	3,46±0,10*	2,93±0,17*

**Примітка.** Позначкою \* – різниці вірогідні до рН 6,5.

**Вплив температури на ефективність екстракції кератинів.** Вивчали ефективність екстракції кератинів у діапазоні температур від 40 до 60 °С. Результати засвідчили, що з підвищенням температури збільшується вміст протеїну, екстрагованого з усіх типів волокон, проте найбільший вміст спостерігали за температури 50 °С для тонких і кросбредних волокон (табл. 2). Незалежно від температури, за якої здійснювалася екстракція, найменшим був уміст солюбілізованого протеїну з ості. Цей факт пояснюється тим, що в остьових волокнах значний об'єм займає серцевина, а корковий шар може бути незначним. Проте протеїни саме коркового шару найкраще екстрагуються, що пов'язано з їх хімічними характеристиками.

**Вплив температури на вміст розчинного протеїну, отриманого з різних типів вовняних волокон за використання 250 мМ 2-МЕ впродовж 24 год ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

t, °C	Вміст розчинного протеїну, мг/мл		
	тонка вовна	кросбредна вовна	ость
40	2,35±0,12	2,38±0,25	1,84±0,15
50	3,62±0,34*	3,42±0,17*	2,93±0,30*
60	3,50±0,50#	3,05±0,21	2,97±0,27

**Примітка.** Позначками: \* – різниці вірогідні між температурним режимом 40 і 50 °C; # – різниці вірогідні між температурним режимом 40 і 60 °C.

**Вплив тривалості екстракції кератинів на її ефективність.** За використання 2-МЕ як відновного агента вміст розчинного протеїну в екстрактах вовняних волокон коливався в межах 3,13–3,85 мг/мл (рис. 1, а).

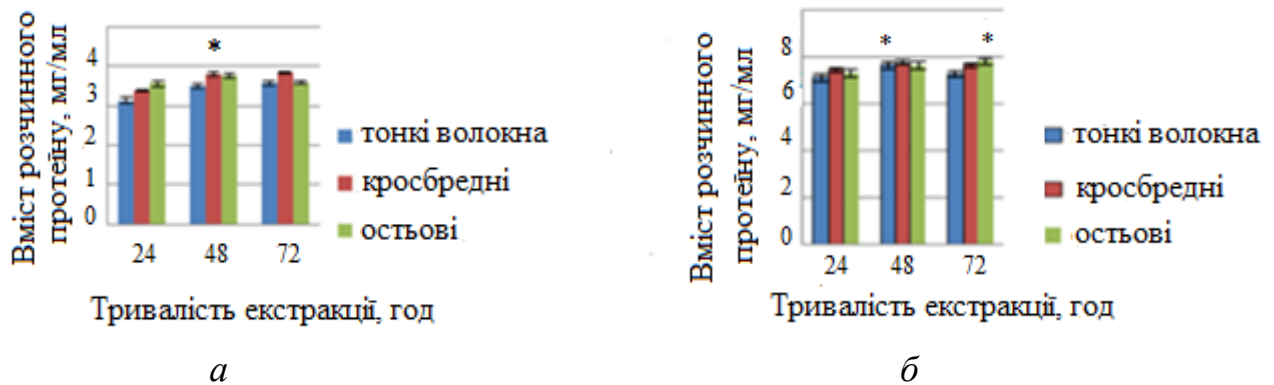


Рис. 1. Вміст розчинного протеїну в екстракті за використання: 250 мМ 2-МЕ, мг/мл (а); 250 мМ ДТТ (б); ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

**Примітка.** Позначкою \* – різниці вірогідні залежно від тривалості екстракції.

Ефективність екстракції за цих умов суттєво не залежала від її тривалості, а також від морфології вовни. Максимальний вміст розчинного протеїну зафіксовано для кросбредних вовняних волокон за умов їх екстрагування впродовж 48 год за температури 50 °C. За використання ДТТ (рис. 1, б) ефективність екстракції кератинів зросла більш ніж удвічі, а вміст розчинного протеїну залежно від типу вовняного волокна змінювався в межах 7,15–7,83 мг/мл. З'ясовано, що для тонких вовняних волокон оптимальна тривалість екстракції становила 48 год, а для значно грубших остьових волокон – 72 год. Для кросбредних волокон час екстракції суттєво не впливав на її ефективність.

**Вплив відновника на концентрацію протеїнів.** Порівняльний аналіз солюбілізації кератинів вовни та волоса людини різними методами свідчить, що концентрація протеїнів значною мірою залежить від вибору відновника в складі екстракційної суміші. Як бачимо з результатів, представлених у табл. 3, ефективність екстракції кератинів із вовни та волоса людини вірогідно залежить від відновного агента.



**Ефективність екстракції кератинів з вовни та волоса людини за використання різних відновників ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

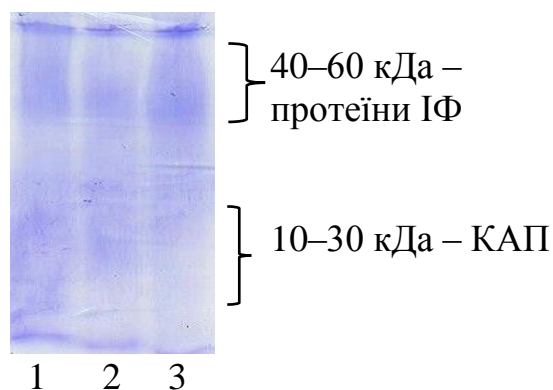
Відновний агент	Ефективність екстракції, %	
	вовна	волос людини
2-меркаптоетанол	31,90±1,07 <sup>a</sup>	34,16±0,17 <sup>a</sup>
Дитіотреїтол	50,65±1,46 <sup>b</sup>	40,80±2,3 <sup>b</sup>
Натрій метабісульфіт	33,96±1,25 <sup>a</sup>	47,90±0,98 <sup>c</sup>

**Примітка.** Значення, підписані різними літерами вірогідно відрізняються – ( $p < 0,05$ ).

Зазначимо, що ефективність екстракції кератинів із вовни була вища за використання в екстракційній суміші ДТТ. На противагу, вплив 2-МЕ та натрію метабісульфіту на ефективність екстракції був майже ідентичним. Ефективність екстракції кератинів із волоса людини була найвища за використання натрію метабісульфіту – 47,9 %, тоді як за присутності ДТТ і 2-МЕ становила 40,8 і 34,16 %, відповідно.

Отримані результати свідчать, що в разі заміни 2-МЕ на ДТТ у складі екстракційної суміші вірогідно підвищується ефективність екстракції кератинів як із вовни, так і з волоса людини, проте найбільш ефективним відновником для солюбілізації кератину з волоса людини є натрію метабісульфіт.

**Електрофоретичний профіль екстрагованих кератинів.** На рис. 2. зображено електрофореграму результатів розділення кератинів вовни, екстрагованих за допомогою ДТТ. В результаті екстракції отримано два поліпептидні ланцюги з молекулярною масою 40–60 кДа, які відповідають типу I і типу II протеїнів інтермедіальних філаментів (ІФ). У низькомолекулярній ділянці виявлено смуги протеїнів із молекулярною масою 10–30 кДа, що відповідають кератинасоційованим протеїнам (КАП).



**Рис. 2. Електрофоретичний профіль кератинів, отриманих із вовняних волокон різної будови, після 48 год екстракції за умов використання ДТТ і за температури 50 °С.**

**Примітка.** 1 – тонке волокно; 2 – кросбредне; 3 – остьове.

У результаті проведеного електрофоретичного аналізу екстракту протеїнів волоса людини, отриманого за використання натрію метабісульфіту, виявлено лише два поліпептидні ланцюги протеїнів ІФ із молекулярною масою 40–60 кДа (рис. 3).

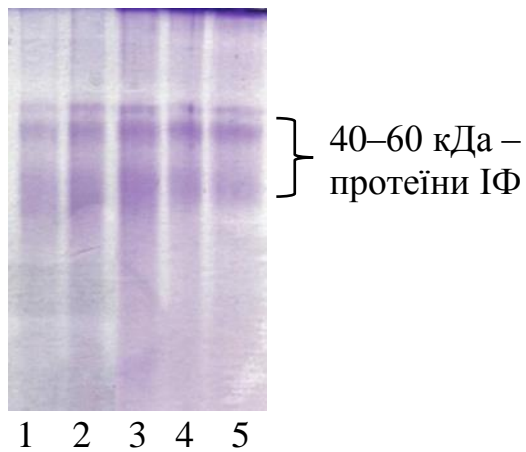


Рис. 3. Електрофореграма протеїнового екстракту волоса людини.

Примітка. 1–5 – екстракт кератину, отриманого з волоса людини, молекулярна маса 40–60 кДа.

За цих умов екстракції низькомолекулярних КАП не виявлено. Очевидно, такі результати можна пояснити тим, що ці протеїни погано екстрагуються методом сульфїтолізу або слід добирати інші умови їх електрофоретичного розділення.

**Вплив обробки вовняних волокон розчином відновленого кератину на їх фізико-хімічні параметри.** Відомо, що для покращення властивостей вовняних волокон можна з успіхом використовувати розчини на основі відновленого кератину. Виявлено, що обробка вовняних волокон розчинами кератину стимулює зміни у їх структурі, а саме, перерозподіл протеїнових фракцій – кератоз. У результаті проведених досліджень фіксували збільшення фракції альфа-кератози і зниження гамма-кератози залежно від концентрації протеїнового розчину, який використовували для обробки (табл. 4). Частка бета-фракції в оброблених розчином відновленого кератину волокнах порівняно з інтактними майже не змінювалася. Ймовірно, відновлений кератин, який містить активний цистин у S-сульфонатній формі, сприяє перебудові дисульфідних зв'язків у волокні, впливаючи на його властивості (Saha S., 2019).

Таблиця 4

**Співвідношення протеїнових фракцій у вовняних волокнах, оброблених розчином відновленого кератину, % ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Кератоза	Інтактне волокно	Волокно, оброблене 3% розчином відновленого кератину	Волокно, оброблене 5% розчином відновленого кератину
Альфа	57,30±2,15	64,95±2,48*	65,35±3,91
Бета	13,10±0,78	11,08±0,84	12,55±1,01
Гамма	29,60±1,93	23,97±1,67	23,10±1,70*

Примітка. Позначкою \* – вірогідні різниці між інтактним вовняним волокном і волокном, обробленим відновленим кератином.

Результати дослідження фізико-хімічних параметрів вовни показали, що міцність вовняних волокон у результаті їх обробки 3% водним розчином відновленого кератину вірогідно підвищувалася, порівняно з інтактними волокнами. Розчинність вовни за цих умов не змінювалася. Такий ефект зумовлений здатністю низькомолекулярних протеїнів проникати у кортекс волокна, а також заповнювати простір між лусками кутикули, коригуючи її дефекти.

Дослідження зв'язування важких металів біосорбентом на основі кератину. Характерною ознакою кератинів є наявність великої кількості активних функціональних груп. Це зумовлює їх здатність зв'язувати іони важких металів, катіонні барвники, нафтопродукти з водних розчинів. Ефективність абсорбції залежить від багатьох факторів: температури, рН, початкової концентрації іонів, площі поверхні (Shavandi A. et al, 2017). Згідно з результатами наших досліджень (рис. 4), найвища ефективність адсорбції іонів  $Pb^{2+}$  зафіксована для кератину вовни, обробленого натрію бісульфітом за рН 6,0.

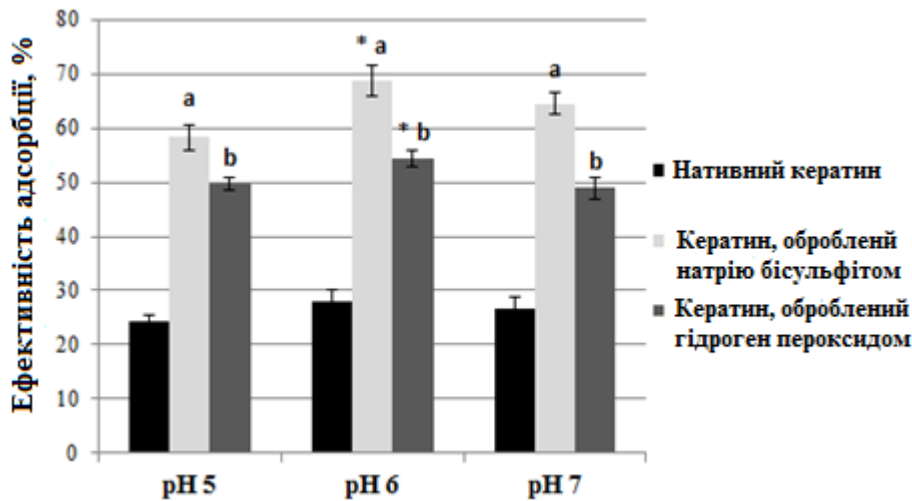


Рис. 4. Ефективність адсорбції  $Pb^{2+}$  кератином вовни.

**Примітка.** Позначками: \* – вірогідні відмінності між хімічно модифікованим кератином за сталого рН; а – відмінності між необробленим кератином і обробленим натрію бісульфітом; b – відмінності між необробленим кератином і обробленим гідроген пероксидом.

За цих умов кератин вовни, оброблений 10% розчином гідроген пероксиду, меншою мірою зв'язував з розчину іони  $Pb^{2+}$  (53,3 %), проте ці результати значно вищі, ніж у контролю (нативний кератин).

Подібна закономірність спостерігалася і в дослідженні адсорбції  $Pb^{2+}$  сорбентом на основі кератину за рН 5,0 і 7,0, проте адсорбційна ємність кератину за цих рН була значно менша, ніж за рН 6,0.

Ефективність адсорбції  $Cd^{2+}$  біосорбентом на основі нативного кератину в діапазоні рН 5,0–7,0 коливалася від 12,8 до 17,5 % (рис. 5). Зі зміною рН до 6,0 ефективність адсорбції зростала відповідно до 28,2 % для кератину вовни, обробленої гідроген пероксидом, і до 38,5 % – для кератину, хімічно модифікованого натрію бісульфітом. Подібна закономірність спостерігалася і в разі зміни рН до 7,0.

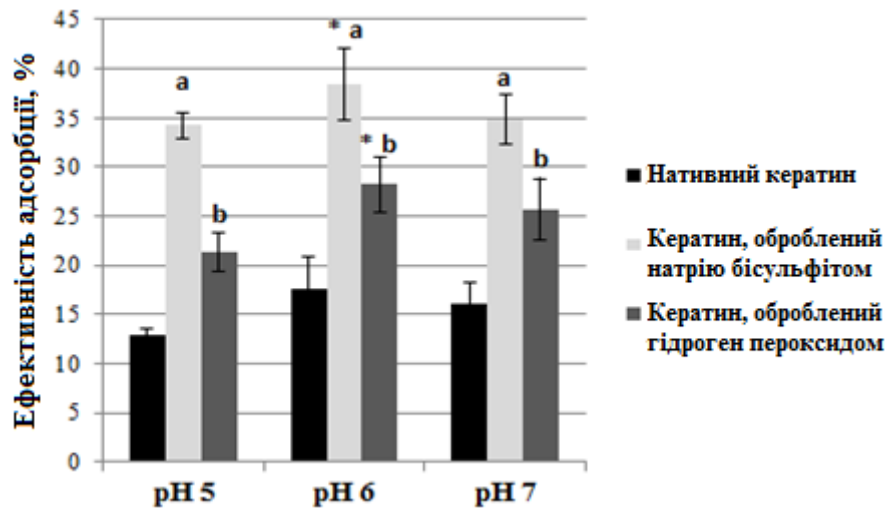


Рис. 5. Ефективність адсорбції  $\text{Cd}^{2+}$  кератином вовни.

**Примітка.** Позначками: \* – відмінності між хімічно модифікованим кератином за сталого pH; a – відмінності між необробленим кератином і обробленим натрію бісульфітом; b – відмінності між необробленим кератином і обробленим гідроген пероксидом.

Відмінності у сорбційних властивостях модифікованого кератину, вочевидь, можна пояснити конкуренцією між протонами та іонами металів за сайти зв'язування (Nomagai P., 2009). Загалом, спорідненість біосорбенту до іонів Плюмбуму була вища, ніж до іонів Кадмію, що зумовлено міцнішою взаємодією між функціональними групами кератину та іонами металу. Водночас, більшу адсорбцію  $\text{Pb}^{2+}$  можна пояснити його стабільністю і міцнішою електростатичною взаємодією з реактивними сайтами хімічно обробленого кератину. Іони Плюмбуму формують міцний зв'язок з групами, що містять атоми Сульфуру та Нітрогену, а саме,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{R-S-}$ ,  $\text{-SH-}$ ,  $\text{NH}_2^-$ , тоді як іони Кадмію можуть утворювати стабільні зв'язки переважно лише з  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{O}_2$ -лігандами (Wang J., 2009).

**Створення плівкових моделей на основі регенованого кератину та дослідження їх характеристик.** Кератини, екстраговані з вовни та волоса людини, у водних розчинах мають здатність до самозбирання у складні тривимірні структури, що можна успішно використовувати для створення біоматеріалів. Їх переваги – біодеградабельність, здатність забезпечувати адгезію клітин, низька цитотоксичність (Arshad M., 2016). Тому ми прагнули сформувані плівки на основі розчину регенованого кератину та дослідити їх характеристики. У результаті проведених досліджень показали, що плівка на основі кератину та гліцеролу (рис. 6, а) після стабілізації у водяній парі набувала гелеподібної консистенції, що пояснюється властивістю гліцеролу до акумуляції вологи. Плівка, виготовлена лише з водного розчину кератину (рис. 6, б) була представлена тонким і ламким полімерним шаром. Це підтверджує факт, що гліцерол покращує її механічні властивості.

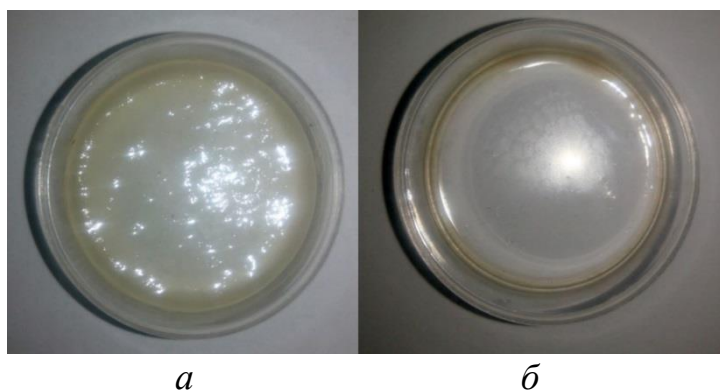


Рис. 6. Плівка на основі 4% розчину кератину та 1% розчину гліцеролу (а), плівка без додавання гліцеролу (б).

На рис. 7, а, із використанням сканувальної електронної мікроскопії зображено поверхню плівки, виготовленої за поєднання 4% водного розчину кератину та 1% розчину гліцеролу. Показано, що поверхня плівки переважно гомогенна, без порожнин і отворів, із невеликою кількістю вбудованих гранул різної форми. Наявність поодиноких тріщин може бути спричинена великою кількістю міжмолекулярних зв'язків.

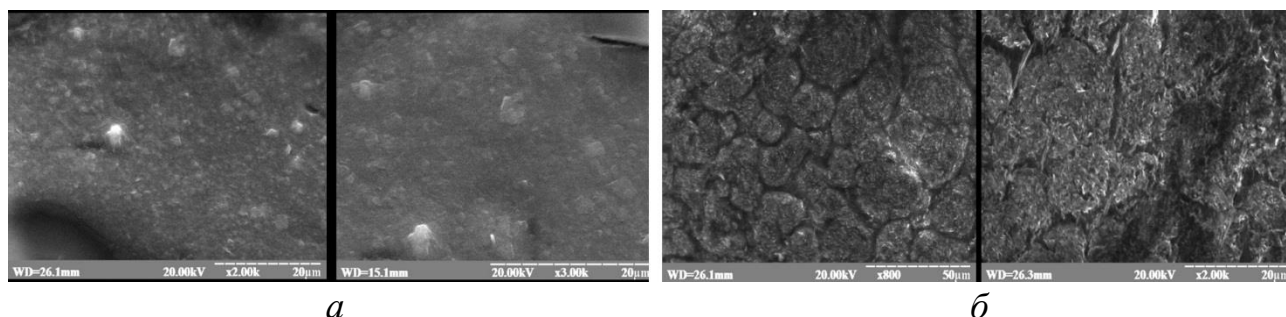


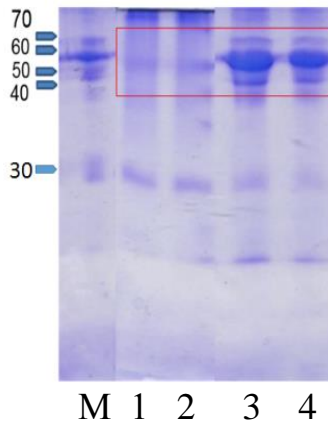
Рис. 7. Електронно-мікроскопічні зображення плівки, виготовленої з 4% розчину кератину та 1% розчину гліцеролу (а), і плівки, виготовленої лише на основі розчину кератину (б);  $\times 300$ .

Як бачимо з рис. 7, б, поверхня плівки, виготовленої без додавання гліцеролу негетогенна, з великою кількістю заглибин і виступів.

За допомогою рентгенівського мікроаналізу обох типів плівок виявлено елементи Na, S, K. Найбільша частка припадає на Сульфур, що зумовлено наявністю великої кількості дисульфідних зв'язків у молекулі кератину, головним чином за рахунок цистеїнових залишків. У складі кератин-гліцеролової плівки виявлено також Силіцій, вміст якого становить 0,21%. Саме Силіцій надає твердості кератинізованим тканинам і сприяє їх високій хімічній резистентності. У спектрі рентгенівського мікроаналізу плівки, виготовленої лише з розчину кератину, не виявлено Силіцію, або його вміст був менший від межі чутливості приладу. Імовірно, це пов'язано з неоднорідною структурою плівки.

Біосумісність кератин-гліцеролової плівки підтверджено у адсорбційному тесті з протеїнами сироватки крові людини. Як бачимо з електрофореграми (рис. 8.), плівка на основі кератину здатна поглинати досить велику кількість альбуміну з сироватки крові, про що свідчать інтенсивні смуги в діапазоні молекулярної маси 60 кДа, як після 5 хв, так і після 15 хв інкубації в сироватці крові людини. Наявні у

зразку смуги в діапазоні 60–70 кДа можуть відповідати молекулярній масі гемоглобіну.



**Рис. 8. Електрофореграма протеїнів контактної сироватки, адсорбованих плівкою, створеною на основі кератинів і десорбованих протеїнів з її поверхні.**

**Примітка.** М – маркер молекулярних мас; 1 – протеїни, десорбовані з плівки після 5 хв інкубації; 2 – протеїни десорбовані з плівки після 15 хв інкубації; 3 – адсорбовані плівкою протеїни після 5 хв інкубації; 4 – адсорбовані плівкою протеїни після 15 хв інкубації.

Результати проведених досліджень свідчать, що у зразках протеїнів, десорбованих із поверхні плівки, смуга, яка відповідає альбуміну, була дуже слабкою, а інтенсивність смуг низькомолекулярних протеїнів у діапазоні 30 кДа була практично такою ж, як і контактної сироватки. Ці результати підтверджують, що плівки на основі кератину найбільше адсорбували альбумін сироватки крові.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично узагальнено та експериментально визначено біохімічні характеристики солубілізованих кератинів, отриманих із вовняних волокон та волоса людини в оптимальних умовах, і з'ясовано їх структурні характеристики залежно від способу їх екстракції. Результати дослідження впливу обробки вовняних волокон розчином регенованого кератину на їх фізико-хімічні параметри, здатності хімічно модифікованого кератину до зв'язування іонів важких металів і біосумісності полімерних плівок на основі кератину сприяють розширенню сфери застосування кератинів у біомедицині.

1. З'ясовано вплив різних чинників на ефективність екстракції кератину з морфологічно відмінних вовняних волокон. Показано, що оптимальними умовами для солубілізації кератинів є температурний режим 50–60 °С, рН 8,5 і тривалість у межах 48–72 год. Заміна у складі екстракційної суміші 2-меркаптоетанолу на дитіотреїтол сприяє підвищенню ефективності екстракції кератину з вовняних волокон на 59 % ( $p < 0,05$ ). Електрофоретичний аналіз солубілізованого кератину підтвердив наявність протеїнів із молекулярною масою 40–60 кДа і 10–30 кДа, які відповідають протеїнам інтермедіальних філаментів і кератинасоційованим протеїнам.

2. Використання у складі екстракційних сумішей натрію метабісульфіту і дитіотреїтолу сприяло вірогідному підвищенню ефективності екстракції кератину з волоса людини відповідно на 13,7 і 6,6 % порівняно з традиційним методом із використанням 2-меркаптоетанолу. Структуру регенованого кератину підтверджено ІЧ-спектроскопією, виявлено його кращі термічні властивості порівняно з нативним кератином.

3. Оброблення вовняних волокон 3 і 5% розчином регенованого кератину супроводжувалося змінами у співвідношенні їх структурних протеїнів, зокрема, збільшенням альфа-кератози на 13 % ( $p < 0,05$ ) і зменшенням частки матриксних протеїнів при одночасному підвищенні міцності волокон на 17,6 ( $p < 0,05$ ) і 10,9 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, порівняно з контролем.

4. Виявлено у модельних системах здатність кератину вовни зв'язувати іони важких металів із їх розчинів. Хімічна модифікація кератину суттєво збільшує його адсорбційну ємність для іонів Плюмбуму та Кадмію порівняно з нативними волокнами і залежить від рН розчину. Найвища ефективність адсорбції для іонів Pb (II) та Cd (II) характерна для кератину, обробленого натрію бісульфітом за рН 6,0 – відповідно 68,7 і 38,5 % порівняно з контролем. За цих умов здатність адсорбувати іони Pb (II) і Cd (II) із розчину кератином, обробленим гідроген пероксидом становила відповідно 53,3 та 28,2 %.

5. З'ясовано, що незалежно від способу хімічної модифікації та рН розчину спорідненість біосорбенту на основі кератину до іонів Pb (II) була вища, ніж до іонів Cd (II).

6. Розроблено плівкові моделі на основі регенованого кератину. Встановлено, що додавання гліцеролу покращує структуру плівок і забезпечує формування гладкої гомогенної поверхні.

7. Показано ефективність стабілізації плівок на основі кератинів за допомогою водяної пари. У тесті на адсорбцію доведено здатність поглинати плівками переважно альбумін сироватки крові, що свідчить про їх біосумісність і можливість успішного застосування в біомедицині.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз даних

1. Гавриляк, В., **Михалюк, В.** (2016). Вплив деяких факторів на ефективність екстракції кератинів вовняних волокон різного типу. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (73), 47–50. (Дисертантка брала участь у проведенні дослідження ефективності екстракції кератинів, здійснила електрофоретичний аналіз отриманих протеїнів, брала участь у статистичній обробці даних і написанні статті).

2. **Михалюк, В. В.**, Гавриляк, В. В. (2019). Методи екстракції кератинів з вовни та волосся та перспективи їх застосування в біомедицині та біоінженерії. *Біологічні студії*, 13 (2), 117–130. (Дисертантка брала участь у написанні та оформленні статті).

3. Havryliak, V., **Mykhaliuk, V.** (2020). The comparative analysis of the methods for keratin extraction from wool and human hair. *The animal biology*, 22 (4), 9–12. (Дисертантка здійснила експериментальну частину, брала участь у написанні та оформленні статті).

**Стаття у науковому фаховому виданні,  
що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus**

4. Havryliak, V., **Mykhaliuk, V.**, Petrina, R., Fedorova, O., Lubenets V., Novikov, V. (2020). Adsorbents based on keratin for lead and cadmium removal. *Current applied science and technology*, 20 (1), 136–143. (Дисертантка брала участь в изготовленні біосорбенту на основі кератинів, проведенні статистичних обчислень і написанні статті).

**Стаття у зарубіжному виданні**

5. **Mykhaliuk, V.**, Havryliak, V., Sedilo, H., Vovk, S. (2017). The impact of pH and temperature on extraction of wool fiber proteins. *Nauki przyrodnicze we współczesnym świecie: zbiór artykułów naukowych*, 116–119. (Дисертантка брала участь у проведенні екстракції кератинів, статистичній обробці даних і написанні статті).

**Стаття у матеріалах міжнародної конференції**

6. Havryliak, V., **Mykhaliuk, V.** (2019). The efficiency of keratin extraction from human hair by sulfitolysis. *9<sup>th</sup> International youth science forum "Litteris et Artibus" & 14<sup>th</sup> International conference "Young scientists towards the challenges of modern technology": materials*, 229–231. <https://openreviewhub.org/lea/paper-2019/efficiency-keratin-extraction-human-hair-sulfitolysis> (Дисертантка провела екстракцію кератинів методом сульфитолізу, брала участь у статистичній обробці результатів і написанні статті).

**Методичні рекомендації**

7. Гавриляк, В. В., Стапай, П. В., Смолянінова, О. О., Скорохід, А. В., **Михалюк, В. В.** Методи модифікації вовняних волокон: метод. рекомендації. Львів; 2018. 16с. (Дисертантка брала участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні методичних рекомендацій).

**Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації  
Тези та матеріали конференцій**

8. **Михалюк, В. В.**, Кривда, Р. Г., Гавриляк, В. В. (2016). Перспективи дослідження кератинів. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали XV Всеукр. наук.-практ. конф.* (с.166). Інститут біології тварин НААН. (Дисертантка брала участь у написанні та оформленні тез).

9. **Михалюк, В. В.**, Гавриляк, В. В. (2016). Вплив деяких відновників на ступінь екстракції кератину вовняних волокон. *Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали міжнар. наук.-практ. конф.* (с. 123). Інститут біології тварин НААН. (Дисертантка провела



екстракцію кератинів за використання різних відновників, брала участь у статистичній обробці результатів і написанні тез).

10. **Mykhaliuk, V.**, Havryliak, V. (2017). Comparative characteristics of methods for keratin extraction from wool fibers. *Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine: abstracts of reports of the XVI all-Ukrainian scientific and practical conference of young scientists* (p. 132). Institute of animal biology NAAS. (Дисертантка провела експериментальну частину дослідження, брала участь у статистичній обробці результатів і написанні тез).

11. **Михалюк, В. В.**, Гавриляк, В. В. (2018). Отримання водорозчинних біополімерів на основі кератинів волосу людини. *Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали міжнар. наук.-практ. конф.* (с. 141). Інститут біології тварин НААН. (Дисертантка провела експериментальну частину дослідження, брала участь у статистичній обробці результатів і написанні тез).

12. **Mykhaliuk, V.**, Havryliak, V. (2018). Preparation of water-soluble polymers from hair keratins for biomedical application. *East West Chemistry conference* (p. 115). Lviv Polytechnic National University. (Дисертантка провела експериментальну частину дослідження, брала участь у статистичній обробці результатів і написанні тез).

13. Гавриляк, В. В., **Михалюк, В. В.** (2019). Методи отримання кератинів із волокон природного походження. *Молодь і поступ біології: XV Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, присвячена 135-й річниці від дня народження Я. Парнаса: збірник тез* (с. 220). Львівський національний університет імені Івана Франка. (Дисертантка провела експериментальну частину дослідження, брала участь у статистичній обробці результатів і написанні тез).

14. Havryliak, V., **Mykhaliuk, V.**, Petrina, R., Fedorova, O., Lubenets, V., Novikov, V. (2019). Adsorbents based on keratin for the heavy metals removal. *The 5<sup>th</sup> International conference on biotechnology, environment and engineering sciences: proceeding* (p. 36). (Дисертантка брала участь у експериментальній частині дослідження і в написанні тез).

15. Гавриляк, В. В., **Михалюк, В. В.** (2019). Кератини: методи екстракції та біомедичні аспекти застосування. *Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали XVIII Всеукр. наук.-практ. конф., присвяченої 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Скорохода Володимира Йосиповича* (с. 135). Інститут біології тварин НААН. (Дисертантка провела експериментальну частину дослідження, брала участь у статистичній обробці результатів і написанні тез).

16. Havryliak, V., **Mykhaliuk, V.** (2020). The comparative analysis of the methods for keratin extraction from sheep wool and human hair. *Young scientists in solution of actual problems of biology, animal husbandry and veterinary medicine: abstracts of reports of the XIX all-Ukrainian scientific and practical online conference of young scientists dedicated to the 90<sup>th</sup> anniversary of birth of Vadym Yanovich* (p. 44). Institute of animal biology NAAS. (Дисертантка брала участь у експериментальній частині дослідження і в написанні тез).

## АНОТАЦІЇ

**Михалюк В. В. Біохімічна характеристика кератинів та створених на їх основі моделей біоматеріалів. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2021.

У дисертаційній роботі представлено результати оптимізації екстракції кератинів вовняних волокон різного типу та волоса людини для подальшого застосування цих протеїнів у біомедицині та біоінженерії.

Досліджено, що оптимальними умовами екстракції кератинів вовняних волокон є температура в діапазоні 50–60 °С, рН 8,5, тривалість солюбілізації в межах 48–72 год. Найефективнішим відновником для екстракції кератинів вовни є дитіотреїтол, для кератинів волоса людини – натрію метабісульфіт.

Оброблення вовняних волокон 3 і 5% розчином відновленого кератину покращувало їх міцність і сприяло збільшенню альфа-кератози у структурі кератину.

Максимальна ефективність елімінації іонів  $Cd^{2+}$  і  $Pb^{2+}$  спостерігалася в разі використання біосорбенту на основі протеїнів вовни, обробленої натрію бісульфітом, за рН 6,0.

Поєднання протеїнового розчину з гліцеролом для виготовлення полімерних плівок покращує їх механічні властивості. Доведено ефективність стабілізації плівок водяною парою, а їх біосумісність – у адсорбційному тесті з протеїнами сироватки крові.

**Ключові слова:** волос, вовна, кератини, кератози, екстракція, біополімери, біoadсорбенти.

**Мыхалюк В. В. Биохимическая характеристика кератинов и созданных на их основе моделей биоматериалов. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2021.

В диссертационной работе представлены результаты оптимизации экстракции кератинов шерстяных волокон различного типа и волоса человека для дальнейшего применения этих протеинов в биомедицине и биоинженерии.

Доказано, что оптимальными условиями экстракции кератинов шерстяных волокон является температура в диапазоне 50–60 °С, рН 8,5, продолжительность солюбилизации в пределах 48–72 ч. Самым эффективным восстановителем для экстракции кератинов шерсти является дитиотреитол, для кератинов волоса человека – натрия метабисульфит.

Обработка шерстяных волокон 3 и 5% раствором восстановленного кератина улучшала их прочность и способствовала увеличению альфа-кератозы в структуре кератина.

Максимальная эффективность элиминации ионов  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  наблюдалась при использовании биосорбента на основе протеинов шерсти, обработанной бисульфитом натрия, при pH 6,0.

Сочетание протеинового раствора с глицеролом для изготовления полимерных пленок улучшает их механические свойства. Доказана эффективность стабилизации пленок водяным паром, а их биосовместимость – в адсорбционном тесте с белками плазмы крови.

**Ключевые слова:** волос, шерсть, кератины, кератозы, экстракция, биополимеры, биоадсорбенты.

**Mykhaliuk V.V. The biochemical characteristics of keratins and keratin-based models of biomaterial. – Manuscript.**

The dissertation on achieving the scientific degree of Candidate of Biological Sciences (Ph.D.), specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, 2021.

The aim of the study was to compare various methods for the extraction of keratins from wool and human hair, their analysis, and creation of biomaterials of functional purpose on the basis of extracted proteins.

We found that the optimal conditions for the extraction of keratins from wool fibers of different types are the following: the temperature in the range of 50–60 °C, pH 8.5, and the duration of solubilization of proteins in the range of 48–72 hours.

The use of 2-mercaptoethanol and dithiothreitol as reducing agents significantly increased the efficiency of keratin extraction from wool fibers, with the content of soluble protein in the extracts under conditions of using dithiothreitol was twice as high as when using 2-mercaptoethanol. As a result of the extraction of human hair proteins, it was found that the most effective reducing agent is sodium metabisulfite.

The results of the electrophoretic separation of keratins demonstrated that proteins of intermediate filaments (IF) of types I and II and low molecular weight keratin-associated proteins (CAP) can be extracted from wool fibers under the effect of different reducing agents.

Similar bands of keratin were found in extracts from human hair under the use of dithiothreitol. We obtained a slightly different electrophoregram of the protein extract using sodium metabisulfite. In this case, we found only IF proteins. Such results may indicate either that this type of a reducing agent is not suitable for the extraction of CAP of human hair or that it is needed to choose another type of electrophoretic separation. The structure of the extracted keratins was confirmed by IR spectroscopy.

We found that the use of 3% aqueous solution of reduced keratin for the treatment of wool fibers increases the strength of wool fibers. No changes in the fiber tone were discovered. The treatment with 3 and 5% protein solutions was accompanied by the redistribution of keratins in wool fibers towards an increase in the alpha fraction and a decrease in the proportion of matrix proteins. The use of 3 and 5% aqueous solution of reduced keratin for the treatment of wool fibers did not significantly affect the solubility of wool in 0.1 n NaOH solution and 4 n HCl, but the strength increased as compared to the control.

We found that the treatment of wool fibers, modified with hydrogen peroxide, contributed to the improvement of the specific electrical conductivity of the fibers.

The results of the study of the adsorption properties of keratins indicate that the maximum efficiency of heavy metals elimination by the biosorbent based on wool fibers was observed at pH 6.0 for both Cadmium ions and Lead ions. The best sorption properties for Cadmium and Lead ions were discovered for wool fibers treated with sodium bisulfite. It was found that under the same conditions of model experiments, the efficiency of adsorption of Lead ions by biosorbents based on wool fibers is significantly higher than for Cadmium ions.

When studying polymer films based on human hair keratin, we found that the combination of a protein solution with glycerol improves their mechanical properties and promotes surface homogeneity. Films made only from an aqueous solution of keratin were brittle, and the structure of their surface was characterized by a pronounced relief, which was confirmed by scanning electron microscopy. Serum protein adsorption test confirmed the biocompatibility of keratin films, so they can be successfully used in tissue engineering.

Thus, the studies made it possible to determine the optimal parameters for the extraction of keratins from wool fibers and human hair, which provide maximum production of regenerated protein.

We determined for the first time the efficiency of keratin extraction from wool fibers of various morphologies under the influence of such factors as temperature conditions, pH value, duration of solubilization, and the type of reducing agent. It was found that dithiothreitol in the composition of the extraction mixture significantly increases the yield of the reduced keratin in comparison with 2-mercaptoethanol.

Solubilized wool keratins produce a biosorbent that effectively binds Lead and Cadmium ions. The effect of pH of aqueous solutions on the adsorption efficiency of heavy metal ions was studied. It was found that chemical modification of wool fibers activates the functional groups of keratins, which significantly increases the adsorption capacity of biosorbents.

It was proposed for the first time to stabilize the films obtained by casting on the basis of regenerated keratin with water vapor. The influence of plasticizer on their structure was revealed and the biocompatibility of polymer films in the adsorption test was investigated.

The obtained results can serve as a foundation for further research in the direction of the use of biomaterials based on keratins in biomedicine and bioengineering.

**Key words:** human hair, wool, keratins, keratoses, extraction, biopolymers, bioadsorbents.