

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МИХАЛЮК ВАСИЛИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 636.32/38:677.31:577.1

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

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело _____ В. В. Михалюк

Науковий керівник:

Гавриляк Вікторія Василівна,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Львів – 2021

АНОТАЦІЯ

Михалюк В. В. Біохімічна характеристика кератинів та створених на їх основі моделей біоматеріалів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Мета дисертаційного дослідження полягала у з'ясуванні біохімічних характеристик солюбілізованих кератинів, отриманих різними способами з вовни та волоса людини і розробленні на їх основі біоматеріалів з цільовими властивостями.

Для виконання поставлених завдань було проведено три серії досліджень. Перша серія полягала у з'ясуванні оптимальних умов для екстракції кератинів. Для цього ми порівнювали ефективність екстракції протеїнів вовняних волокон різного типу за використання окисно-відновних методів та сульфітолізу. Вивчали вплив на процес екстракції таких факторів, як вибір відновника, температурний режим, значення рН, тип волокна, тривалість солюбілізації. Досліджували концентрацію екстрагованих протеїнів та їх структурні характеристики. Із солюбілізованих протеїнів готували розчини відновленого кератину. Досліджували ефективність застосування відновленого кератину для обробки вовняних волокон з метою покращення їх хімічних і фізичних параметрів.

Друга серія досліджень полягала у з'ясуванні можливостей використання сорбенту на основі кератину для елімінації іонів важких металів із їх водних розчинів. Для цього ми використовували попередньо хімічно модифікований кератиновий порошок для біосорбції іонів Pb^{2+} та Cd^{2+} з водних розчинів та досліджували вплив рН на цей процес. Також, порівнювали вплив обробки вовняних волокон натрію 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 кастингу. 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.

Встановлено, що оптимальними умовами екстракції кератинів з вовняних волокон різного типу є температура в діапазоні 50–60 °C, значення рН 8,5 та тривалість солюбілізації протеїнів в межах 48–72 год.

З'ясовано, що суттєвий вплив на ефективність екстракції кератинів здійснює відновник. Застосування 2-меркаптоетанолу та дитіотреїтолу суттєво підвищувало ефективність екстракції кератинів із вовняних волокон, при цьому вміст розчинного протеїну в екстрактах за умов використання дитіотреїтолу був вдвічі більший, ніж при використанні 2-меркаптоетанолу. У той же час, застосування в складі екстракційної суміші таких низькомолекулярних спиртів, як етанол та метанол виявилось малоефективним.

Аналізуючи ефективність екстракції протеїнів волоса людини встановлено, що найефективнішим відновником дисульфідних груп в молекулі кератину є натрію метабісульфіт.

Результати електрофоретичного розділення кератинів продемонстрували, що за дії різних відновників з вовняних волокон можна виділити протеїни інтермедіальних філаментів (ІФ) типу I і II та низькомолекулярні кератинасоційовані протеїни (КАП).

Аналогічні смуги кератинів виявлені в екстрактах з волоса людини за використання дитіотреїтолу. Дещо іншу електрофореграму протеїнового екстракту ми отримали за використання натрію метабісульфіту. У цьому випадку, нами виявлено лише протеїни ІФ. Такі результати можуть свідчити або про те, що

цей тип відновника не підходить для екстракції КАП волоса людини або про те, що потрібно підібрати інший тип електрофоретичного розділення. Структуру екстрагованих кератинів підтверджено за допомогою ІЧ-спектроскопії.

Встановлено, що обробка попередньо активованих гідроген пероксидом вовняних волокон 3 і 5% розчинами відновленого кератину призводила до певних змін у їх фізико-хімічних властивостях. Так, дія на вовну 3% розчину супроводжувалася перерозподілом кератоз у бік збільшення альфа-фракції на 13 % та зменшення частки матриксних протеїнів порівняно з інтактною вовною. Подібні зміни спостерігали і за використання 5% розчину.

Використання для обробки вовняних волокон 3 і 5% водного розчину відновленого кератину суттєво не впливало на розчинність вовни в 0,1 н розчині NaOH та 4 н HCl, проте істотно зростала її міцність порівняно до контролю.

Результати наших досліджень вказують на потенційну можливість використання кератину для зв'язування іонів важких металів з їх водних розчинів. Вивчення адсорбційних властивостей кератинів показали, що максимальна ефективність елімінації іонів важких металів біосорбентом на основі протеїнів вовняних волокон спостерігалася при рН 6,0 як для іонів Кадмію, так і для іонів Плюмбуму. Кращі сорбційні властивості щодо іонів Кадмію та Плюмбуму виявлені для кератину вовняних волокон, оброблених натрію бісульфітом. З'ясовано, що за однакових умов модельних дослідів ефективність адсорбції іонів Плюмбуму біосорбентами на основі кератину вовни є істотно вищою, ніж для іонів Кадмію.

При дослідженні полімерних плівок, виготовлених на основі кератину волоса людини, нами встановлено, що поєднання протеїнового розчину з гліцеролом покращує їх механічні властивості та сприяє гомогенності поверхні. Доведено ефективність стабілізації плівок за допомогою водяної пари. Плівки, виготовлені лише з водного розчину відновленого кератину були ламкими, а структура їх поверхні характеризувалася вираженою рельєфністю, що підтверджено за допомогою сканувальної електронної мікроскопії. Тест на

адсорбцію протеїнів сироватки крові підтвердив біосумісність кератинових плівок, тому їх можна з успіхом використовувати у тканинній інженерії.

Таким чином, проведені дослідження дали можливість визначити оптимальні параметри для екстрагування кератинів із вовняних волокон та волоса людини, які забезпечують максимальне отримання регенерованого протеїну.

Нами вперше 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-ME) на дитіотреїтол (ДТТ) суттєво підвищувалася ефективність екстракції кератинів із вовни, а натрію метабісульфіту – з волосся.

Уперше запропоновано стабілізувати отримані методом кастингу плівки на основі регенерованого кератину водяною 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.

Ключові слова: волос, вовна, кератини, кератози, екстракція, біополімери, біоадсорбенти.

Список опублікованих праць за темою дисертації:

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 в проведенні дослідження ефективності екстракції кератинів, здійснила

електрофоретичний аналіз отриманих протеїнів, брала участь в статистичній обробці даних і написанні статті).

2. 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 в проведенні екстракції кератинів, статистичній обробці даних і написанні статті).

3. Havryliak, V., Mykhaliuk, V. (2019). The efficiency of keratin extraction from human hair by sulfitolysis. *9th International youth science forum "Litteris et Artibus" & 14th 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 сульфітолізу, брала участь в статистичній обробці результатів і написанні статті).

4. 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 в написанні та оформленні статті).

5. 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 дослідження, брала участь у написанні та оформленні статті).

6. 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 у виготовленні біосорбенту на основі кератинів, проведенні статистичних обчислень і написанні статті).

7. 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 в написанні та оформленні тез).*

8. 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 в статистичній обробці результатів та написанні тез).*

9. 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 в статистичній обробці результатів та написанні тез).*

10. 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 в статистичній обробці результатів та написанні тез).*

11. 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 в статистичній обробці результатів та написанні тез).*

12. Гавриляк, В. В., Михалюк, В. В. (2019). Методи отримання кератинів із волокон природного походження. *Молодь і поступ біології: XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135-й річниці від дня народження Я. Парнаса: збірник тез* (с. 220). Львівський національний

університет імені І. Франка. *(Дисертантка провела експериментальну частину дослідження, брала участь в статистичній обробці результатів та написанні тез).*

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

14. 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 в статистичній обробці результатів та написанні тез).*

15. 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 90th anniversary of birth of Vadym Yanovich* (p. 44). Institute of Animal Biology NAAS. *(Дисертантка брала участь в експериментальній частині дослідження та в написанні тез).*

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

SUMMARY

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

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.

To accomplish the assigned tasks, we carried out three stages of research. The first step was to find out the optimal conditions for the extraction of keratins. To do this, we compared the efficiency of protein extraction of wool fibers of various types using redox methods and sulfitolysis. At the same time, we changed the extraction conditions: the type of reducing agent, temperature regime, pH value, the type of fiber, duration of solubilization. We investigated the concentration of extracted proteins and their structural characteristics. The chemical and physical parameters of wool were investigated after their treatment with solutions of reduced keratin.

The aim of the second stage of the study was to create biomaterials based on solubilized proteins. Possibilities for using keratins for the adsorption of heavy metal ions were investigated. To do this, we used keratin powder for biosorption of Pb^{2+} and Cd^{2+} ions from aqueous solutions and investigated the effect of pH on this process. Also, we compared the effect of treatment of wool fibers with sodium metabisulfite and hydrogen peroxide on the adsorption activity of keratins.

The aim of the third stage of the experiments was to make keratin films for biomedical applications. The effect of plasticizer on the mechanical properties of the film and its biocompatibility was studied.

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.

It was found that the reducing agent has a significant effect on the extraction efficiency. 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. Meanwhile, the use of low molecular weight alcohols such as ethanol and methanol in the extraction mixture proved to be ineffective.

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.

According to the results of the second series of the studies, 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Будова волоса	24
1.2. Структура та функції кератинів волоса	27
1.3. Методи екстракції кератинів	29
1.3.1. Окисні методи екстракції кератинів	30
1.3.2. Відновлювальні методи екстракції кератинів	31
1.4. Дослідження електрофоретичного профілю екстрагованих кератинів	32
1.5. Застосування екстрагованих кератинів в біоінженерії та біомедицині	32
1.5.1. Кератинові плівки	34
1.5.2. Нановолокна на основі кератину	35
1.5.3. Кератинові матриці та скаффолди	37
1.5.4. Кератинові губки	38
1.5.5. Гідрогелі на основі кератинів	39
1.5.6. Роль кератинів у процесі загоєння ран	40
1.5.7. Адсорбційні властивості кератинів	42
1.6. Ліпіди волоса	43
Висновки до розділу 1	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	46
2.1. Об'єкти та умови досліджень	46
2.2. Схема дослідження	46
2.3. Матеріали та обладнання	56
2.4. Методи дослідження	56
2.4.1. Світлова мікроскопія	56
2.4.2. Екстракція кератинів	59
2.4.2.1. Приготування волокон для дослідження	60

2.4.2.2. Окисно-відновні методи екстракції кератинів	60
2.4.2.3. Метод сульфїтолізу	60
2.4.3. Дїалїз протейїнів	61
2.4.4. Визначення концентрації загального протейну	61
2.4.5. Електрофоретичне роздїлення протейїнів в ПААГ	61
2.4.6. ІЧ-спектрофотометрія	62
2.4.7. Термічний аналіз нативного та регенерованого кератину	62
2.4.8. Визначення впливу відновленого кератину на хїмічні та фізичні параметри вовни	62
2.4.8.1. Обробка вовни розчином відновленого кератину	62
2.4.8.2. Визначення міцності волокон та їх діаметру	63
2.4.9. Роздїлення кератинових волокон на кератози	63
2.4.10. Дослідження адсорбційних властивостей іонів свинцю та кадмію	64
2.4.10.1. Приготування волокон для дослідження	64
2.4.10.2. Приготування розчинів іонів свинцю та кадмію	65
2.4.10.3. Визначення ефективності біосорбції	65
2.4.10.4. Визначення абсорбційної ємності	65
2.4.11. Виготовлення кератинових плївок для біомедичних цілей	66
2.4.11.1. Приготування протейнового розчину	66
2.4.11.2. Кастинг	66
2.4.11.3. Дослідження структури плївок	66
2.4.11.4. Дослідження біосумісності плївок, виготовлених на основі кератинів	67
2.4.12. Комп'ютерне і програмне забезпечення роботи та статистичний аналіз отриманих результатів	68
РОЗДІЛ 3. ВИБІР ОПТИМАЛЬНИХ ПАРАМЕТРІВ ЕКСТРАКЦІЇ КЕРАТИНІВ ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА	69
3.1. Визначення оптимальних умов для екстракції кератинів	69
3.1.1. Вплив рН на ефективність екстракції кератинів	70
3.1.2. Вплив температури на ефективність екстракції кератинів	71

3.1.3. Вплив тривалості екстракції кератинів на її ефективність	73
3.1.4. Вплив низькомолекулярних спиртів на ефективність екстракції кератинів	74
3.2. Дослідження структурних характеристик кератинів, отриманих із вовняних волокон різних типів та з волоса людини	79
3.2.1. Електрофоретичний профіль екстрагованих кератинів	80
3.2.2. ІЧ-спектроскопія екстрагованого кератину	84
3.2.3. Аналіз термічних властивостей кератину	86
3.3. Дослідження фізико-хімічних властивостей вовняних волокон за впливу обробок протеїновими гідролізатами на основі відновлених кератинів	90
3.3.1. Вплив обробки вовняних волокон 3% розчином відновленого кератину на їх міцність і тонину	91
3.3.2. Вплив обробки вовняних волокон розчином відновленого кератину на їх фізико-хімічні параметри	92
Висновки до розділу 3	96
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ БІОСОРБЕНТОМ НА ОСНОВІ КЕРАТИНУ	99
4.1. Адсорбційні властивості екстрагованого кератину	99
4.1.1. Елімінація іонів Pb (II) кератиновмісними адсорбентами	100
4.1.2. Елімінація іонів Cd (II) кератиновмісними адсорбентами	103
Висновки до розділу 4	107
РОЗДІЛ 5. СТВОРЕННЯ ПЛІВКОВИХ МОДЕЛЕЙ НА ОСНОВІ РЕГЕНЕРОВАНОГО КЕРАТИНУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ХАРАКТЕРИСТИК	108
5.1. Плівки на основі кератинів	108
5.2. Дослідження поверхні плівок	110
5.3. Рентгенівський мікроаналіз плівки, виготовленої на основі екстрагованих протеїнів	111
5.4. Дослідження біосумісності кератинових плівок	112

Висновки до розділу 5	114
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	115
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	129
ДОДАТКИ	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДСН	натрію додецилсульфат;
ДТТ	дитіотреїтол;
ІЛ	інтегральні ліпіди;
ІФ	протеїни інтермедіальних філаментів;
ІЧ	інфрачервоне випромінювання;
КАП	кератинасоційовані протеїни;
кВ	кіловольт;
кДа	кілодальтон;
КМК	клітинно-мембранний комплекс;
м-БС	метабісульфіт;
18-МЕК	18-метилейкозанова кислота;
нА	наноампер;
ПААГ	поліакриламідний гель;
ПЕГ	поліетиленгліколь;
УФ	ультрафіолетове випромінювання;
DTG	дериватограма;
OD	оптична густина;
SEM	сканувальна електронна мікроскопія;
TG	термограма.

ВСТУП

Волос у широкому біологічному значенні є складним волокном з неоднорідною морфологічною структурою. Поєднання різних компонентів у волокні зумовлює формування його унікальних фізико-механічних властивостей. Основним компонентом волоса, приблизно 90–95 % маси, є кератин, який належить до групи нерозчинних протеїнів зі значним вмістом Сульфуру [148].

Кератини є біополімерами із ієрархічною структурою субодиниць – від α -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 та хімічної деградації [163].

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 в біомедицині завдяки їх широкій доступності, низькій токсичності, біосумісності та біоактивності [157, 184, 198, 199, 225], з іншого – існують можливості для використання натуральних параметрів біополімерів та їх адаптації до стимулів навколишнього середовища.

Відомо, що структура кератину схожа 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 [49].

Унікальною характеристикою екстрагованих кератинів є їх здатність до самозбирання та самоагрегації [141, 163]. У науковій літературі досить багато інформації про застосування кератину для розробки нановолокон [28, 196, 206], гідрогелів [26, 30, 175], плівок [47, 148, 186, 213], 3D-скафолдів для тканинної

інженерії [41, 163, 213], наноконтейнерів для контрольованої доставки лікарських засобів [148], загоєння ран [71, 74, 120], регенерації нервових волокон [175].

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 [30, 163, 213]. Отримані на основі кератинів матеріали можуть істотно відрізнятися за складом, структурою та 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 врахуванням впливу різних чинників і створення на їх основі біоматеріалів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана у Інституті біології тварин НААН у відповідності до програми підготовки спеціалістів вищої кваліфікації через аспірантуру впродовж 2016–2019 років у лабораторії обміну речовин імені С. З. Гжицького та була частиною наукової тематики лабораторії 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 дослідження полягала у з'ясуванні біохімічних характеристик солюбілізованих кератинів, отриманих різними способами з вовни та волоса людини і розробленні на їх основі біоматеріалів з цільовими властивостями.

Для досягнення поставленої мети у роботі визначено такі основні завдання:

- дослідити вплив різних чинників на екстракцію кератинів з різних волокон та 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 – регенеровані 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 та їх стабілізація.

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

Наукова новизна отриманих результатів

Визначено оптимальні параметри для екстрагування кератинів із вовняних волокон та волоса людини, які забезпечують максимальне отримання регенерованого 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 дитіотреїтол (ДТТ) суттєво підвищувалася ефективність екстракції кератинів із вовни, а натрію метабісульфіту – з волосся.

Уперше запропоновано стабілізувати отримані методом кастингу плівки на основі регенованого кератину водяною 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 була 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 з біохімії та біотехнології, а також у науковому процесі на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота виконана під керівництвом доктора біологічних наук Гавриляк В. В. Авторка дисертаційного дослідження самостійно провела аналіз та інтерпретацію наукової літератури, виконала експериментальну частину роботи (на базі Інституту біології тварин НААН) і статистичну обробку даних. Планування досліджень, аналіз та обговорення отриманого матеріалу, підготовка рукописів статей проводилася разом з науковим керівником. Роботи, пов'язані з отриманням електронно-мікроскопічних зображень проведено спільно з Серкізом Р. Я. (Львівський національний університет імені І. Франка). Усі розділи дисертації написані авторкою самостійно. 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 5th 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 яких 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Будова волоса

Волосяний покрив – це утворення, що характерне лише ссавцям, яке виникло у жаркий і вологий клімат мезозою, як захист від перегрівання. Така зміна стала прикладом ароморфозу, що підняв всю організацію цього класу на якісно новий рівень. Окрім того, що волосся відповідає за деякі захисні та сенсорні функції ссавців, воно також відграє важливу роль у соціальній взаємодії людей [139].

Волос – це композитне протеїнове волокно природного походження, що характеризується значним поліморфізмом, проте можна визначити загальний план його будови (рис. 1.1), що включає кутикулу, кортекс та не завжди присутню серцевину [104, 218].

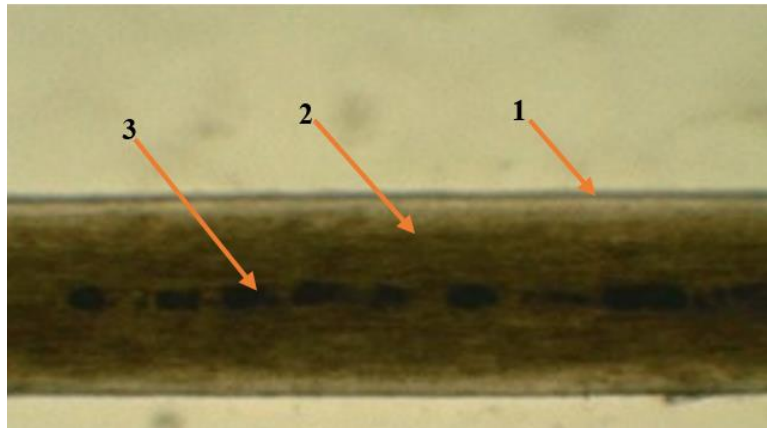


Рис. 1.1. Структура волоса, власна фотографія. Примітка. 1 – кутикула; 2 – кортекс; 3 – серцевина.

Кутикула представлена лускатим шаром, що складається з плоских зроговілих черепицеподібно розташованих клітин. Деякий прогрес у дослідженні

цієї структури зумовлений розвитком електронної, сканувальної та трансмісійної мікроскопії. Основною функцією кутикули, що побудована з жорстких протеїнів, є захист еластичного кортексу волосини від шкідливого впливу навколишнього середовища та косметичних процедур [160]. Середня товщина лускатого шару становить 0,5–1,0 мкм [143]. Кожна кутикулярна луска складається з декількох шарів (епі-, екзо- і ендокутікули), розділених ламелами, або так званим клітинним мембранним комплексом [180].

На рис. 1.2. зображено луски кутикули волоса людини.

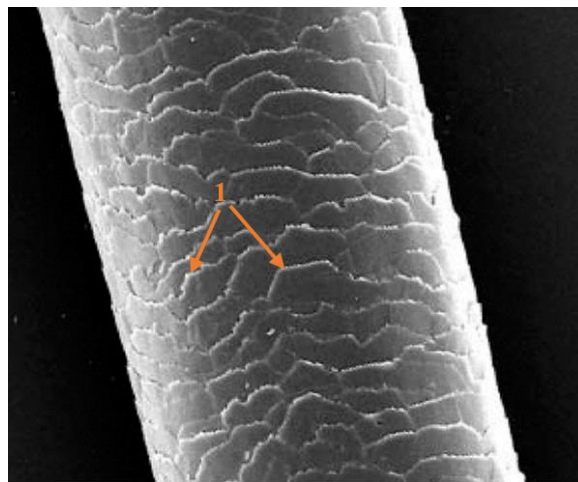


Рис. 1.2. Сканувальна електронна фотографія волоса людини [160].

Примітка. 1 – луски кутикули.

Епікутикула – це мембранна структура товщиною 5–7 нм, що контактує з навколишнім середовищем. Походження епікутикули достеменно невідоме, проте є дані, що її головним компонентом є протеїни та ковалентно зв'язані ліпіди, в основному, представлені 18-метил-ейкозановою кислотою (18-МЕК), що надає волосу гідрофобних властивостей. 18-МЕК відносно легко можна видалити з поверхні волокна хімічно або під впливом високих температур. Це призведе до втрати волокном зволоження, що збільшить його ламкість та коефіцієнт тертя. Спершу науковці вважали, що епікутикула вкриває лише поверхню волоса, проте

подальші дослідження показали, що вона повністю покриває кожну окрему луску [50, 160].

Під епікутикулою знаходиться А-шар, що так, як і екзокутикула складається з протеїнів, з'єднаних дисульфідними та ізопептидними зв'язками [180]. Товщина А-шару варіює в межах від 50 до 100 нм [214]. Завдяки великому вмісту цистеїну та міжмолекулярних зв'язків цей шар надає волокну міцності та стійкості до деформації [50].

Екзокутикула волоса стійка до дії хімічних речовин та протеолітичних ферментів та відповідає за міцність волокна за рахунок великої кількості дисульфідних зв'язків кератинасоційованих протеїнів, які в ній експресуються [150, 173, 178].

Ендокутикула, на відміну від екзокутикули, складається із м'яких та слабо з'єднаних між собою протеїнів, що набухають у воді [180].

Більшу частину волокна складає кортекс. Кортикальні клітини мають веретеноподібну форму та лежать паралельно вздовж осі волокна. Їх довжина становить 50–100 мкм, а товщина – 1–6 мкм. Вони багаті на Сульфур та мають філаментну будову, що спричинює розщеплення волосся вздовж своєї осі при механічному пошкодженні. Клітини кортексу, як вовняних волокон так і волоса людини, розділені на різні сегменти: ортокортес, паракортес на мезокортес. Така диференціація є важливим фактором для визначення кривизни волоса. Зокрема, пряме волосся має тенденцію до симетричного розподілу орто- та паракортесу, тоді як кучеряве волосся характеризується несиметричним розподілом цих кортикальних клітин [214].

Серцевина – найменш вивчена морфологічна структура волоса. Вона представляє собою вертикальний стовпець горизонтальних, нещільно упакованих клітин та містить бідні на Сульфур нетипові кератини з неорганізованою будовою. Ця структура локалізується в центрі волокна, може бути фрагментованою (рис. 1.3, а), суцільною (рис. 1.3, б) або ж відсутньою зовсім.

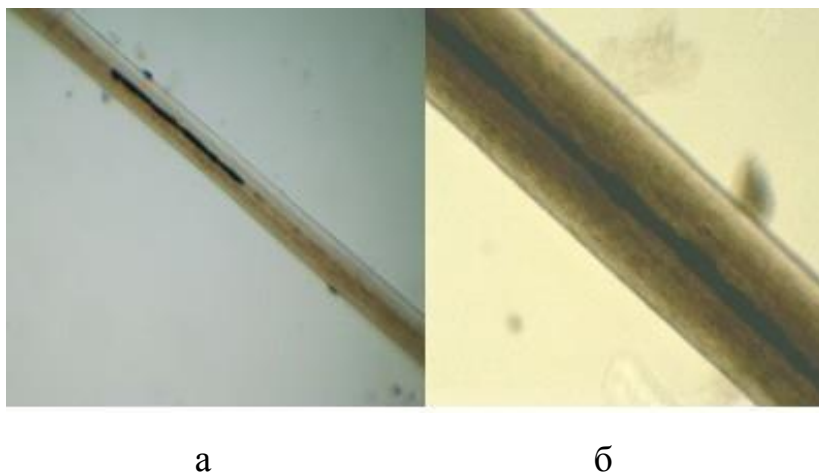


Рис. 1.3. Серцевина волоса, власні фотографії; $\times 10$ (а), $\times 40$ (б).

Також, вона містить значну кількість внутрішньоклітинних або міжклітинних повітряних порожнин, що утворюються протягом термінальної диференціації та надають їй ламкості. Наявність великої кількості повітряних порожнин у серцевині виконує теплоізоляційну функцію. Тому у тварин, що проживають в холодних широтах серцевина займає майже всю товщину волоса. На відміну від багатьох видів тварин, у людини серцевина в середньому займає не більше 5 % від товщини волосини [217].

Є дані, що до складу серцевини структури входять ліпіди, проте їх функція достеменно невідома. Дисульфідні зв'язки у серцевині замінені на пептидні, що є основною причиною нерозчинності її протеїнів [111, 139].

1.2. Структура та функції кератинів волоса

Волос – кератизоване волокно. Кератини – це поліпептиди, що побудовані з амінокислот, зв'язаних міжмолекулярними зв'язками з цистеїном та внутрішньо молекулярними зв'язками з полярними та неполярними групами [163]. Велика кількість цистеїнових залишків у молекулі (7–20 % від загальної кількості) якісно відрізняє кератини від інших структурних протеїнів. Залишки цистеїну містять тіольні групи, що утворюють міцні дисульфідні зв'язки, які призводять до зшивання матричної молекули. Дисульфідні зв'язки надають кератинам високої

стійкості до хімічних та 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 [163].

Поліпептидний ланцюг кератинів, у свою чергу, містить велику кількість бічних ланцюгів, що забезпечують послідовне складання кератинового волокна [163]. На молекулярному рівні кератини можуть мати три різні конфігурації: α -кератини, що відносяться до протеїнів інтермедіальних філаментів з низьким вмістом Сульфуру (1,5–2 %), мають структуру α -спіралі та молекулярну масу в діапазоні від 40 до 70 кДа; β – кератини, що також відносяться до протеїнів інтермедіальних філаментів, але мають структуру β -листка та меншу молекулярну масу – 10–30 кДа; та γ -кератини, що за своєю структурою є аморфними протеїнами з високим вмістом Сульфуру (4–8 %), локалізуються у матриксі, а їх молекулярна маса варіює в діапазоні від 11 до 28 кДа [148]. Взаємодія α -спіралі та β -листіків робить кератинове волокно еластичним, а дисульфідні зв'язки між молекулами цистеїну – стабільним та важко розчинним. Найбільш поширеними формами кератинів є α -кератини, що характерні для ссавців, та β -кератини, які характерні для рептилій та птахів. α -кератини входять до складу волосся, вовни, ріг, нігтів, кігтів ссавців, тоді як β -кератини присутні в нігтях, лусках, кігтях рептилій, ракушках, пір'ї та дзьобах птахів (рис. 1.4) [96, 163].

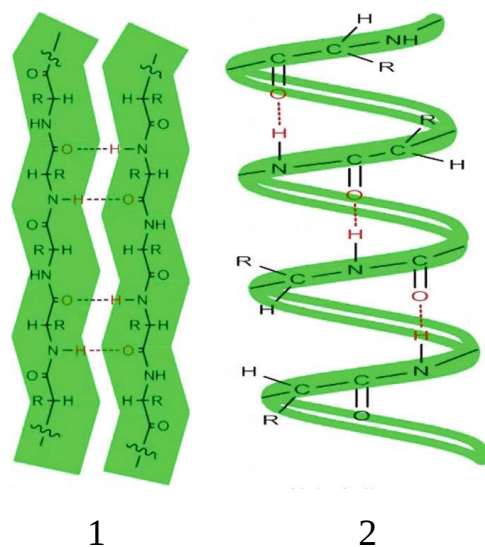


Рис. 1.4. Вторинна структура кератину [163]. Примітка. 1 – β -листок, 2 – α -спіраль.

Між катіонами аміногрупи та аніонами карбоксильної групи утворюються іонні зв'язки. Цей тип зв'язків залежить від рН. Ізоелектрична точка іонізованих груп спостерігається при рН 4–5 [163, 171].

Згідно з класифікацією поданою у науковій літературі [53], кератини поділяються на тверді – Іа, Іа та м'які або епідермальні – Ів і Ів. Ці дві групи кератинів відрізняються вмістом Сульфуру та ліпідів. Тверді кератини багаті на Сульфур, що представлений цистином, та бідні на ліпіди, вміст яких не перевищує 3 %. Вміст ліпідів у м'яких кератинах вищий і сягає 4 %, проте такі кератини характеризуються значно нижчим вмістом Сульфуру. Тверді кератини є монолітнішими, більш конденсованими та інертними до навколишнього середовища [55, 86], тоді як м'які є менш стійкими до дії ферментів і хімічних чинників [109, 110, 151].

1.3. Методи екстракції кератинів

Кератини, екстраговані з волоса, є предметом інтенсивних досліджень науковців зі всього світу через широкий спектр можливостей їх застосування в біотехнології та біомедицині, насамперед для створення імплантів, носіїв ліків, для тканинної інженерії з огляду на їх здатність до створення пористих матриць, самозбирання у тривимірні структури, біодеградації та низькій цитотоксичності [33].

Екстракція кератинів з волоса є важливим етапом на шляху до створення біоматеріалів функціонального призначення [174, 185, 194, 202]. Вона ускладнюється наявністю великої кількості внутрішньо-молекулярних та міжмолекулярних дисульфідних зв'язків [135]. Важливим завданням на цьому етапі є збереження нативних властивостей кератинів, на що впливає низка чинників, таких як: температура, значення рН, тривалість екстракції, вибір відновника та ін., тому необхідною є цілеспрямована екстракція шляхом розриву міжмолекулярних дисульфідних зв'язків зі збереженням ковалентних зв'язків

поліпептидного ланцюга. Схематично, етапи екстракції кератинів зображено на рис. 1.5.

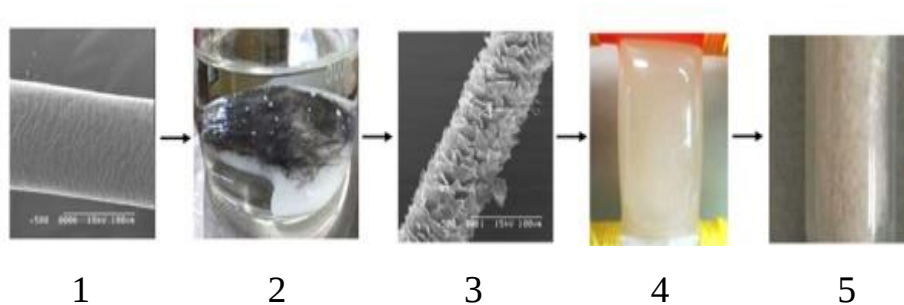


Рис. 1.5. Етапи екстракції кератинів [112]. Примітка. 1 – волос; 2 – знежирення; 3 – екстракція; 4 – діаліз; 5 – ліофілізація.

З розвитком окисно-відновних методів у хімії вчені досягли певного успіху в екстрагуванні кератинів спочатку з рог та копит, а потім з вовни та волоса людини. Саме за допомогою цих методів було виявлено, що кератини не є гомогенними протеїнами, а мають складну четвертинну структуру. Субодиноці кератинів відрізняються молекулярними масами, а отже, структурою та виконуваними функціями. У літературі описано чимало методів екстракції кератинів, більшість з яких базуються на реакціях окиснення, відновлення та сульфїтолізу. При використанні сильних окиснювачів цистеїнові залишки окиснюються до цистеїнової кислоти з утворенням кератоз. Цей процес незворотній. Натомість при використанні відновників отримують кератеїни. У результаті сульфїтолізу утворюється S-сульфонат-аніон. Цей процес є оборотним. Для створення біоматеріалів використовують як кератози, так і кератеїни [66, 96, 163, 171].

1.3.1. Окисні методи екстракції кератинів

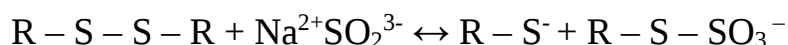
Дослідники Earland, Knight [65] та Buchanan [44] були першими, хто повідомили про можливість застосування окисного методу для екстракції кератинів. Вони використовували надоцтову та надмурашину кислоти для отримання гомогенного солюбілізованого розчину. Проте, згідно з їхніми даними,

вони також виявляли залишки нерозчинного кератину, так званого β -кератину желеподібної консистенції, в той час, як кристалічна форма α -кератинів розчинялася повністю. Протеїни, екстраговані таким методом, набувають нових фізико-хімічних властивостей [163].

Дослідник Sando зі співавторами для окиснення вовни використовували 2 % розчин надощтової кислоти [165], а вчені Shi зі співавторами [172], Marmer та Dudley [121] застосовували перкарбонат. Метод Hatakeyama та співавторів [81] полягає в почерговому відновленні зразків волосся тіогліколевою кислотою та окисненні гідроген пероксидом.

1.3.2. Відновлювальні методи екстракції кератинів

Метод відновлення-сульфидування, розроблений Fearheller зі співавторами [67], передбачає застосування сульфиду натрію та оксиду кальцію. Метод Nakamura [136] полягає в денатуруванні та відновленні в екстракційній суміші, що містить сечовину, тіосечовину та 2% меркаптоетанол в якості відновника. Проте, цей метод має такі недоліки, як висока вартість та неекологічність. Тому, як альтернативу часто використовують інший метод, в основі якого лежить принцип денатурування-відновлення, запропонований Isarankura [90], що передбачає застосування сечовини, додецилсульфату натрію та метабісульфіту натрію. Цей метод є економічно більш вигідним та менш шкідливим для навколишнього середовища. В результаті сульфїтолізу утворюються S-сульфонатні залишки ($R-S-SO_3^-$) та цистеїн тіол ($R-S^-$) [43, 171].



Обробка волосся лугами високої концентрації відділяє гідроген від сульфатних та карбоксильних груп та покращує солюбілізацію, не зважаючи на розриви поліпептидного ланцюга [221].

1.4. Дослідження електрофоретичного профілю екстрагованих кератинів

Згідно з дослідженнями Brown [43], всі перелічені вище методи є більш «м'якими» і дозволяють отримати протеїни з широким спектром молекулярних мас. Метод окиснення надोцтовою кислотою дає можливість отримати найбільші розчинні фрагменти з молекулярною масою більше 60 кДа. Електрофоретичний профіль кератинів, отриманих окисненням перкарбонатом, знаходиться у діапазоні 50–200 кДа. За використання тіогліколевої кислоти та гідроген пероксиду (метод відновлення-окиснення) можна отримати протеїни в діапазоні від 6 до 200 кДа, характерно, що більшість кератинів з молекулярною масою 40–70 кДа – це протеїни інтермедіальних філаментів [91, 94].

Електрофоретичний профіль кератинів, отриманих двома методами, в основі яких покладено спільний принцип денатурування-відновлення, суттєво відрізняється. Так за даними Isarankura, використання екстракційної суміші, що складається з сечовини, додецилсульфату натрію та метабісульфіту натрію можна отримати протеїни з молекулярною масою менше 30 кДа [90]. Внаслідок екстракції кератинів сумішшю, що містить сечовину, тіосечовину та 2 % меркаптоетанол найвиразніші смуги протеїнів спостерігаються в діапазоні 60–80 кДа та 6–14 кДа [136].

Внаслідок відновлення-сульфидування протеїни розділяються на фракції з молекулярними масами в межах 66 кДа, 40–50 кДа та менше 20 кДа [61].

1.5. Застосування екстрагованих кератинів в біоінженерії та біомедицині

Кількість досліджень таких протеїновмісних сполук, як желатин, колаген, альбумін, шовковий фіброїн та кератин з метою їх застосування в біомедицині та інженерії безперервно зростає [63]. Це пояснюється зокрема тим, що люди з усього світу все більше дбають про навколишнє середовище, тому збільшується

попит на природні і відновлювальні матеріали. Оскільки жоден біополімер не володіє одразу всіма необхідними властивостями, які можуть бути корисними для моделювання біоматеріалів, фокус уваги науковців спрямований на створення природних композитів [187]. Сьогодні такі біокомпозити створюють на основі альгінатів, екстрагованих з водоростей, гіалуронової кислоти, отриманої з тканин тварин, хітозану, що міститься в панцирі креветок, а також на основі еластину, фібриногену, фібронектину, фіброїну [184, 225].

Фундаментальні дослідження природи кератинів були проведені протягом 1940–1970 років. Поштовхом до цього став стрімкий розвиток виробництва таких синтетичних волокон, як нейлон та поліестер. Це становило загрозу для вовняної промисловості Австралії, яка на той час була лідером з виробництва та експорту вовни. В цей період були проведені масштабні дослідження, спрямовані на краще розуміння структури та біохімії кератинів та розширення меж їх застосування [158]. Напрацюваннями австралійських вчених активно цікавилися дослідники зі всього світу, проте найбільш активно в цьому напрямку працювали науковці з Японії. Саме вони запропонували використовувати кератинове покриття для судин, як спосіб попередження згортання крові [40].

Аналіз літературних джерел свідчить, що на сьогодні перспективи дослідження кератинів лежать у трьох напрямках. Перший стосується удосконалення методів екстракції кератинів з кератизованих структур [163]. Другий напрям стосується нанотехнологій, третій – полягає у можливості застосування кератинів для ідентифікації особи, що особливо важливо для судово-медичної експертизи, а також антропологічних досліджень. Існує думка, що саме протеом волосся замість ДНК може бути універсальним маркером [19, 20, 143]. Згідно з дослідженнями науковців зі США, протеїни волосся є набагато стійкішими і краще зберігаються в несприятливих умовах навколишнього середовища, ніж ДНК, яка руйнується значно швидше [143].

1.5.1. Кератинові плівки

Кератини, екстраговані з вовни чи волоса, активно застосовуються, як субстрат для виробництва плівок [47, 153, 170, 207]. Субстрати відіграють ключову роль в культивуванні клітин стимулюючи їх адгезію та проліферацію. Спершу, як субстрат для культивування клітин *in vitro* часто використовували полістерин. Дослідження останніх років показують, що попередня обробка субстрату покращує прикріплення, проліферацію та диференціацію клітин. З цією ціллю досліджено велику кількість, як синтетичних, так і природних матеріалів, серед яких: кератин, колаген, фібронектин, фібрин, желатин [157].

Yamauchi зі співавторами досліджували фізико-хімічні властивості та здатність до біодеградації матеріалів, отриманих з кератинів, екстрагованих з вовни, зокрема кератинових плівок [213]. Згідно з їхніми дослідженнями, поєднання екстрагованого кератину з гліцерином сприяє їх біодеградабельності, робить плівки прозорими, міцними та більш гнучкими [213], а використання хітозану надає їм ще й антибактеріальні властивості [184]. Показано, що кератинові плівки володіють хорошою адгезивністю та здатністю підтримувати клітинну проліферацію, що робить їх хорошим субстратом для культивування культури клітин. Зокрема, культивування L929 фібробластів мишей на плівках, що містили кератин або модифікований кератин підтвердили перспективність застосування цього біополімеру [157].

Дослідження Tonin та співавторів [190] продемонстрували перспективність поєднання кератинових плівок з таким синтетичним полімером, як поліетиленоксид. Плівки такого типу можна застосовувати як каркас для росту клітин, перев'язувальний матеріал або ж як мембрану для доставки лікарських засобів. З цією метою поєднували кератини з гідротальцитовими наночастинками, що містять диклофенак (рис. 1.6) [148].

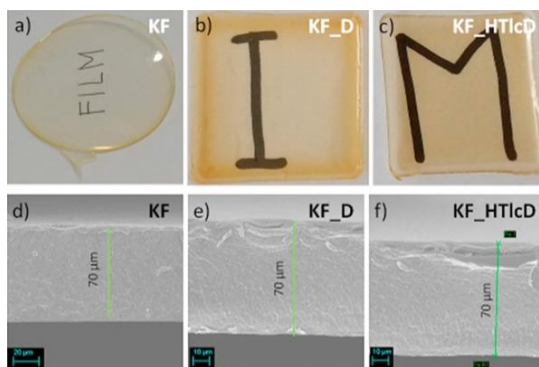


Рис. 1.6. Фотографії плівок [148]: Примітка. а) кератин; б) кератин-диклофенак; с) кератин-гідротальцит-диклофенак; d) f) g) – поперечний переріз плівок.

Такі гібридні плівки, у порівнянні з тими, що містили незв'язаний диклофенак, характеризувалися менш вираженою пористістю та набуханням, проте були більш термостійкими та краще вивільняли диклофенак за фізіологічних умов, ніж негібридні [148].

1.5.2. Нановолокна на основі кератину

Одним з найпоширеніших та відновлюваних джерел кератинів є пір'я курей, що більш, ніж на 90 % складається з кератинів. Проте, лише невелика кількість пір'я використовується, як компонент корму для тварин чи композитний матеріал, більшість – залишається біовідходами [33, 87, 89, 99, 163]. Деякі дослідники [206] поєднували кератини, екстраговані з пір'я курей, з біомодифікованою целюлозою для створення волокон, що характеризувалися кращими сорбційними властивостями, підвищеною гігроскопічністю та меншим кутом змочування, ніж волокна целюлози. Додавання кератину до целюлозних волокон дещо погіршувало їх механічні властивості, проте був досягнутий рівень оптимального співвідношення фракції кератин-целюлоза, який все ще дозволяв застосовувати їх для виготовлення композитних волокнистих матеріалів. Разом з тим, целюлозно-

кератинові волокна мали кращі біодеградабельні властивості, ніж целюлозні [64, 206].

Кератини, екстраговані фізичними або хімічними методами мають відносно низьку молекулярну масу та механічні властивості. В літературі описано мультиферментний каскадний шлях для отримання високомолекулярного кератину з молекулярною масою 120 кДа для його подальшого застосування у загоєнні ран. Для цього кератин екстрагували з вовни за допомогою кератинази та покращили молекулярну масу кератину за допомогою трансглютамінази. Нановолокна, приготовані з таким чином екстрагованого кератину, продемонстрували кращі механічні властивості. Встановлено, що синтезування наночастинок срібла на нановолокнах за допомогою біоредукції *in situ* за використання кератинази як відновника надає цим волокнам антибактеріальні властивості та покращує біосумісність (рис. 1.7).

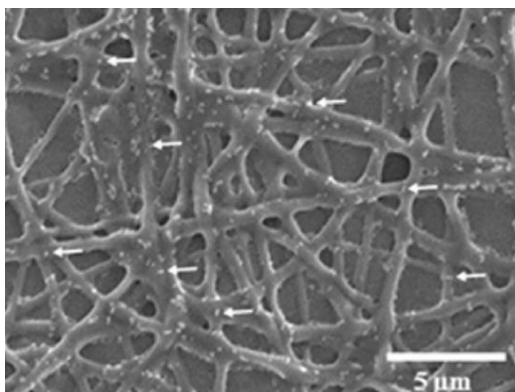


Рис. 1.7. Нановолокна, приготовані на основі кератину для загоєння ран та реконструкції шкіри. Білими стрілками позначено наночастинки срібла [216].

Ці результати демонструють значний потенціал застосування кератинових нановолокон у тканинній інженерії [70, 154, 216].

Окрім того, для виробництва нановолокон кератини поєднують з желатином та фіброїном. Змінюючи співвідношення компонентів суміші кератини-фіброїн, можна отримати нановолокна різного діаметру. Наприклад, при електроспіннінгу розчину, який містить по 50 % кератину та фіброїну розмір волокон становить

207 нм [225]. 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 та парів формальдегідів [225].

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 лікарських засобів [48, 76, 118, 128, 152]. Мембрани, виготовлені на основі кератинових нановолокон, мають велику площу поверхні, високу пористість (розмір пор у нанодіапазоні), володіють здатністю до хімічної та фізичної функціоналізації та унікальними хімічними, фізичними, оптичними та електричними властивостями [98].

1.5.3. Кератинові матриці та скаффолди

За допомогою ліофілізованого кератину можна створювати термостійкі матриці [144]. 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, що сприяють клітинному прикріпленню, проліферації та диференціації протягом тривалого періоду, а вільні залишки цистеїну здатні до іммобілізації біологічно активних речовин [201, 208].

Кератини, завдяки їх здатності до біодеградації, слугують відмінним матеріалом для скаффолдів [46, 114]. Вони відомі своєю здатністю покращувати ріст таких типів клітин ссавців, як фібробласти та кератиноцити. Для виробництва скаффолдів ключовими є кілька параметрів: біосумісність; відповідний розмір пор для обміну газів та клітинної інфільтрації; механічна міцність; адгезивна поверхня, що сприяє клітинній проліферації; антибактеріальна дія, що

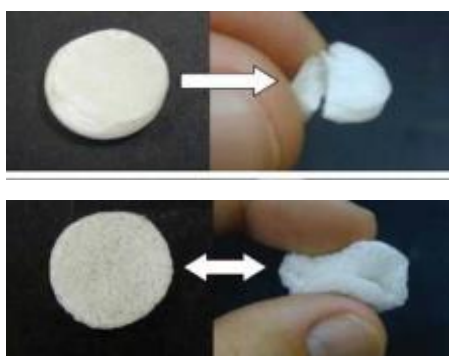
запобігатиме інфікуванню ран; здатність імітувати позаклітинний матрикс [115, 163].

Є дані, що використання хітозану та кератину покращує деякі з вищеперелічених характеристик [116, 163]. Наприклад, хітозан має напівкристалічну природу, що, власне, сприяє біосумісності та біодеградабельності біокомпозитів. За допомогою сканувальної електронної мікроскопії встановлено, що діаметр пор скаффолдів знаходився в межах від 6 до 17 нм, що важливо для проникнення клітин та дифузії речовин [163, 166].

1.5.4. Кератинові губки

Кератини, екстраговані з волоса людини, є хорошим матеріалом для створення губок. За допомогою електронної мікроскопії було показано, що такі губки здатні набухати, збільшуючи свою площу майже вдвічі протягом години, а середній діаметр пор становить 150 мкм [201].

Кератинові губки – це перспективна сировина для тканинної інженерії, оскільки кератини, екстраговані саме з волоса людини, є цитосумісними і біодеградабельними. Кератинові губки поєднують з фосфатами кальцію, що дає змогу культивувати на них остеобласти та змінювати схему їх диференціювання [181], або ж з альгінатами, якщо потрібно надати їм еластичності (рис. 1.8) [77].



Губка виготовлена з ліофілізованого кератину.

Губка виготовлена з кератину, поєданого з альгінатом.

Рис. 1.8. Поєднання кератину з альгінатом робить губки гнучкішими в порівнянні з губками, виготовленими лише з кератину [77].

1.5.5. Гідрогелі на основі кератинів

Більшість сучасних досліджень сфокусовані на виробництві гідрогелів з метою їх застосування у тканинній інженерії [162]. Цьому сприяють полімерні зв'язки, що нагадують природний позаклітинний матрикс. Гідрогелі володіють здатністю покращувати регенерацію нервових волокон [175]. Кератини, екстраговані з волоса людини посилюють активність клітин Шванна *in vitro*, індукуючи клітинну проліферацію і міграцію, а також посилюють експресію специфічних генів, необхідних для здійснення важливих функцій нейронів. Прискорення регенерації нервових волокон проявляється в збільшенні щільності аксонів та їх мієлінізації. Зокрема при використанні гідрогелю, створеного на основі альфа-кератозу, у дорослих мишей із дефектом великогомілкового нерва, було отримано значно кращі результати на 6 тижень порівняно із результатами регенерації нерва при використанні алотрансплантата. Подібні результати були отримані і в дослідженнях на маках [175].

Регенеративний ефект кератинів на тканини, в тому числі кісткові, на сьогодні добре задокументований [18, 26, 59, 175]. Наприклад, біоматеріали на основі кератоз та кератинів, як носії молекул BMP-2, були використані для регенерації дефектів щелепової кістки у модельному дослідженні, результати якого показали кращу біосумісність та мінімальний токсичний вплив, ніж біоматеріали, створені на основі колагену [182].

Нещодавні дослідження свідчать про можливість застосування гідрогелів, створених на основі кератинів, у стоматології, завдяки їх терапевтичній дії. Сучасні методи лікування пульпи полягають у заміні цієї тканини синтетичними матеріалом, який не має відповідних біологічних функцій, що призводить до втрати зубів. Як альтернативу синтетичним полімерам дослідниками запропоновано гідрогелі на основі кератинів, екстрагованих з вовни овець. Такі гідрогелі були імплантованими у верхні моляри щурів. На 28 день після імплантації за допомогою гістологічних та гістохімічних методів в пульпі спостерігали формування дентинового матричного протеїну [26].

Встановлено, що на ефективність дії гідрогелю впливає його концентрація. За допомогою реологічного аналізу було з'ясовано, що саме 20% гель показав найкращі результати за такими характеристиками, як міцність, еластичність, біосумісність, що позитивно впливає на нормальну корінцеву організацію та загоєння пульпи [26] (рис. 1.9).

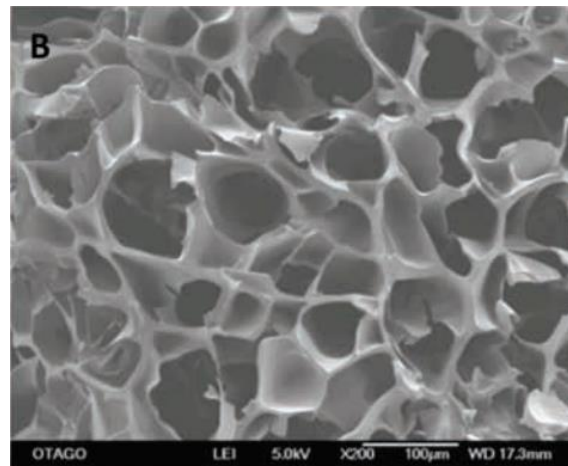


Рис. 1.9. Мікроструктура гідрогелю, приготованого на основі 20% кератину [26].

Не зважаючи на невелику кількість подібних досліджень, гідрогелі на основі кератинів – перспективна альтернатива загальноприйнятим методам у стоматологічній практиці.

Окрім цього, гідрогелі володіють хорошими гемостатичними властивостями, посилюючи формування фізичного ущільнення місця поранення [18].

1.5.6. Роль кератинів у процесі загоєння ран

Сучасна концепція загоєння ран полягає в створенні оптимальних умов навколо рани для кращого росту епітеліальних клітин та запобігання виникнення

мікробних інфекцій. Дослідники досягли певного успіху в створенні пористих матеріалів, що володіють антимікробними властивостями [137].

Кератини беруть участь у клітинній проліферації та загоєнні ран. Регуляція клітинного циклу та розмірів клітин зумовлює базові відмінності між тканинами ссавців та їх адаптацію до змін навколишнього середовища. На сьогодні, механізми, що координують клітинний розмір та проліферацію залишаються недостатньо вивченими, проте, відомо, що експресія кератинів впливає на процеси диференціації епітеліальних клітин. Нещодавні дослідження в сфері генетики мишей та захворювань людини підтвердили думку про те, що зміни в експресії певних кератинів впливають на розмір клітин, проліферацію та відповідь на стрес. Спостерігається швидка зміна експресії кератинів протягом диференціації, травмування тканин та утворення метастаз. Таким чином, протягом процесу загоєння ран на шкірі диференційовані епідермальні кератиноцити швидко пригнічують кератини родини 1 і 10, тим часом як проксимальні клітини рани індукують кератини родини 6, 16 та 17. Окрім цього, уповільнене закриття рани у K17 нульовому ембріоні супроводжується зменшенням розміру епітеліальних клітин, розташованих по краях рани [120, 124].

Кератини вовни часто використовують як колоїдний розчин для загоєння ран, проте деякі дослідження вказують на те, що кератини, екстраговані з волоса людини, сприяють цьому краще. Оскільки позаклітинний матрикс клітин, в основному, складається з кератинів, яким не вистачає здатності затримувати воду, то ці протеїни мають тенденцію до дегідратації за кімнатної температури. Для вирішення цієї проблеми у виробництві біокомпозитів застосовують такі полісахариди, як агар, альгінати, желатин [137]. Володіючи гідрофільною природою, вони добре затримують воду. Дослідження показали до 223 % абсорбційної ємності таких композитів [138].

1.5.7. Адсорбційні властивості кератинів

Гранульоване активоване вугілля, яке зараз найчастіше використовується, як адсорбент, має один суттєвий недолік: високу вартість виробництва [36], в той час як утилізація відходів сільського господарства та побічних продуктів промисловості потребує дешевих, легких у виробництві, безпечних для навколишнього середовища, біодеградабельних та, разом з тим, ефективних сорбентів поліютантів низької концентрації [127, 129].

На даний час спостерігається деяка тенденція до збільшення зацікавлення в кератинах, як матеріалу для очищення стічних вод від поліютантів різної природи [16, 149, 161, 169, 177, 189, 221].

Наприклад, кератини активно використовують, як адсорбенти іонів важких металів. Кератиновмісні матеріали містять велику кількість активних функціональних груп, таких як $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, що здатні зв'язувати іони металів. Більшість цих функціональних груп сховані іншими зв'язками у молекулі кератину, в основному – дисульфідними ($-\text{S}-\text{S}$). Хімічна модифікація кератинового матеріалу допомагає «звільнити» сховані функціональні групи та зробити їх більш реакційно здатними [163].

Згідно з літературними даними, хімічна модифікація кератинів, екстрагованих з пір'я курей покращила елімінацію Арсену (III) [101] та нафтонових кислот [34] з води.

Оброблення кератинів за допомогою натрій гідроксиду змінює структуру зовнішньої поверхні кератину, в той час як внутрішні зв'язки у молекулі залишаються без змін. Такі кератини використовували для елімінації іонів Cr (VI) [179, 193].

Дослідження показують, що розгортання третинної структури кератину шляхом хімічної модифікації призводить до більшої пористості біосорбенту, чим збільшує його площу поверхні, а, отже, і сорбційну здатність [163].

1.6. Ліпіди волоса

Як вже зазначалося, волос - це морфологічно складне утворення, що складається з різних типів хімічних речовин. В основному це кератини (65–95 % в залежності від типу волокна), решта – це, так звані, мінорні компоненти, такі як ліпіди, пігменти, мінеральні елементи, вода [7, 159].

Ліпіди волоса локалізовані не лише в кутикулі, а є частиною міжклітинного комплексу [52]. Вони складаються з холестеролу, жирних кислот, керамідів, фосфоліпідів, холестерол сульфатів та гліцерину і відносяться до групи ендогенних або інтегральних ліпідів, оскільки не є продуктом сальних залоз шкіри та розміщені всередині волокна, на противагу до ліпідів поверхні шкіри, що секретуються себумом і розглядаються, як група екзогенних ліпідів [17].

На сьогодні, найбільш детально вивченими ліпідним компонентом волоса є кераміди [17]. Вони входять до складу вільних та ковалентно-зв'язаних інтегральних ліпідів (ІЛ) та задіяні у сигнальних системах клітин, рості, диференціюванні та апоптозі [78, 79, 103, 105, 145, 183, 195, 200].

Жирні кислоти у кератизованих волокнах зв'язані тіоефірними зв'язками з протеїнами зовнішньої частини кутикули. Увага дослідників останніми десятиліттями спрямована на дослідження структурних ліпідів, особливо ковалентно зв'язаних з 18-МЕК [52]. Раніше вважалося, що ліпіди, які секретуються себумом, відіграють незначну роль для волосся. Проте, на сьогодні доведено, що нековалентно-зв'язані ліпіди визначають властивості поверхні волоса та його здатність до захисту від негативної дії зовнішніх чинників [52, 107, 126]. Такі ліпіди здатні змінювати структуру волокна, зменшуючи вміст і проникність вологи, та підвищуючи його міцність на розрив.

Вміст ІЛ у людському волосі та вовні варіює в межах від 0,7 до 1,3 %, окрім того, вони відрізняються від епідермальних ліпідів своїм хімічним складом [168].

Ліпіди у волосі перебувають у двох станах – вільному та зв'язаному з клітинно-мембранним комплексом (КМК). Склад ліпідів КМК відрізняються від біологічних мембран відсутністю фосфоліпідів [60, 159]. До складу ліпідів,

екстрагованих з кератинових волокон, входять насичені та ненасичені жирні кислоти з довжиною ланцюга від 5 до 26 вуглецевих атомів. Локалізація подвійних зв'язків у ненасичених жирних кислотах знаходиться в 6 і 7 позиціях з ізомерами, в основному, у позиціях 8 і 9 [159].

Волос людини зумовлює велику частину фенотипових варіацій між різними расами, тому його класифікують на три основні етнічні групи: кавказьку, азіатську та африканську [123]. Морфологічні відмінності волоса в залежності від приналежності до певної етнічної раси є маловивченими. Проте, як морфологічні так і біохімічні відмінності між волоссям людей, що відносяться до різних рас існують. Морфологічні дослідження зосереджені головним чином на кольорі, формі, діаметрі волокна, його механічних властивостях, в той час як біохімічні – в основному стосуються структури та функцій кератинів. Набагато менше опубліковано робіт, що стосувалися б ліпідного складу волоса, особливо волосся людей різних етнічних груп. Це пояснюється малою кількістю ліпідів у волосі та невеликою кількістю методів їх екстракції та подальшого дослідження [56, 92, 123].

Згідно з літературними даними, на загал ліпідний склад волоса людей різних етнічних груп подібний, проте деякі відмінності все ж існують. Наприклад, для волоса азіатів характерний вищий вміст інтегральних ліпідів, а саме вільних жирних кислот. Це пов'язано з меншим пошкодженням волосся УФ-променями [92, 123]. Вищий вміст внутрішніх ліпідів характерний для африканської етнічної групи. Відсутність осьової дифракції для волоса цього типу, що з'являється після видалення ліпідів, свідчить про вплив ліпідів на структуру кератину, а саме на ступінь дезорганізації структури кератину [56, 123]. Волос кавказької та азіатської етнічних груп характеризується подібною кількістю аполярних ліпідів та стеролів, проте в кавказькій групі значно більше вільних жирних кислот, в той час як у волосі азіатів - більша кількість полярних ліпідів [123].

Висновки до розділу 1

Аналіз даних літератури свідчить про надзвичайно різноманітні можливості застосування кератинів завдяки їх унікальній біохімії, біосумісності та здатності до самозбирання у складні тривимірні структури. Перш за все, попит на кератиновмісні матеріали обумовлений їх доступністю та переорієнтацією різних сфер промисловості на екологічне виробництво. На сьогодні дослідники зуміли досягти певного успіху у вивченні методів солюбілізації кератинів. Ці знання є важливими для переходу від лабораторних масштабів їх екстракції до промислових.

Оскільки виробництво будь-якого біоматеріалу на основі кератинів починається з екстракції цих протеїнів з кератизованих структур, що є доволі інтактними субстанціями, перш за все вважаємо за доцільне з'ясувати чинники, які впливають на оптимізацію цього процесу та збільшують його ефективність.

Враховуючи попередні дослідження, вивчення хімічної модифікації кератинів з метою надання їм нових функціональних властивостей є дуже важливим, оскільки значно розширює напрями їх застосування та здійснює революцію у світі біоматеріалів.

Сьогодні, коли планета знаходиться в надзвичайно складному екологічному становищі, зумовленому глобальною індустріалізацією, важко переоцінити важливість свідомого використання ресурсів. У зв'язку з цим вважаємо як ніколи актуальною заміну синтетичних полімерів біополімерами, отриманими з вовни, волоса, шерсті, що по своїй суті є біовідходами.

Отже, на основі проведеного аналізу літератури було обґрунтовано актуальність обраного напрямку досліджень та необхідність його подальшого вивчення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти та умови досліджень

Дослідження за темою дисертації виконані в 2016–2019 роках у лабораторії обміну речовин ім. С. З. Гжицького Інституту біології тварин НААН та на базі кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології, Інституту хімії та хімічних технологій, національного університету «Львівська політехніка».

Всі дослідження проведені на зразках вовни різних типів (тонка, кросбредна, остьова) та волоса людини різної геометрії (пряме, хвилясте, кучеряве). Зразки вовни були надані дослідним господарством Інституту тваринництва степових районів ім. М. Ф. Іванова «Асканія–Нова». Зразки волоса отримали від жінок і чоловіків віком від 20 до 25 років на волонтерських засадах. У дослідженнях використовували лише пігментоване волосся без ознак фізіологічного старіння.

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.

2.2. Схема дослідження

У процесі виконання дисертаційної роботи, відповідно до мети та завдань, проведено три серії досліджень. Загальна схема досліджень представлена на рисунку 2.1.



Рис. 2.1. Схема експериментальних досліджень

Нами були відібрані морфіологічно відмінні вовняні волокна. Детальна характеристика зразків вовни подана у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристика зразків вовни

№ п.п.	Опис зразка
1	Тонка вовна: товщина – 14,0 мкм. Рисунок кутикули простий, лінії кутикули не перетинаються, злегка хвилясті, розташовані паралельно одна до одної та поперечно вздовж волокна. Оптичний край дрібнозубцевий, нерівний. Коркова речовина складає основну товщину волокна, містить слабо виражену повздовжню посмугованість. Серцевина відсутня.
2	Тонка вовна: товщина – 18,0 мкм. Рисунок кутикули простий, лінії кутикули скошені, злегка хвилясті, розташовані паралельно одна до одної. Оптичний край дрібнозубцевий, нерівний. Коркова речовина складає основну товщину волокна, містить слабо виражену повздовжню посмугованість. Серцевина відсутня.
3	Тонка вовна: товщина – 21,0 мкм. Рисунок кутикули простий, лінії кутикули не перетинаються, злегка хвилясті, розташовані паралельно одна до одної. Оптичний край дрібнозубцевий, нерівний. Коркова речовина складає основну товщину волокна, містить слабо виражену повздовжню посмугованість. Серцевина представлена окремими острівцями.
4	Тонка вовна: товщина – 19,0 мкм. Рисунок кутикули простий, лінії кутикули не перетинаються, злегка хвилясті, розташовані паралельно одна до одної. Оптичний край дрібно зубцевий, нерівний. Коркова речовина складає основну товщину волокна, містить слабо виражену повздовжню посмугованість та поодинокі пігментофори. Серцевина відсутня.

№ п.п.	Опис зразка
5	Ость: товщина – 35,0 мкм. Рисунок кутикули простий. Клітини кутикули багатокутної форми, щільно прилягають одна до одної та розташовані вздовж волокна. Оптичний край кутикули дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура та нерівномірно віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить пігментофори та яскраво виражену повздовжню посмугованість. Серцевина займає основну товщину волокна, складається з клітин багатогранної форми, які щільно прилягають одна до одної. Товщина волокна нерівномірна по довжині.
6	Ость: товщина – 37,0 мкм. Рисунок кутикули простий. Клітини кутикули багатокутної форми, щільно прилягають одна до одної та розташовані вздовж волокна. Оптичний край кутикули дрібнозубцевий, зубці не щільно прилягають до стовбура в місцях стоншення волокна, нерівномірно віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить виражену повздовжню посмугованість. Серцевина займає основну товщину волокна, складається з клітин багатогранної форми, які щільно прилягають одна до одної. Товщина волокна нерівномірна по довжині.
7	Ость: товщина – 37,0 мкм. Рисунок кутикули простий. Клітини кутикули багатокутної форми, щільно прилягають одна до одної та розташовані вздовж волокна. Оптичний край кутикули дрібно зубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура та нерівномірно віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить пігментофори та яскраво виражену повздовжню посмугованість. Серцевина займає основну товщину волокна, клітини багатогранні, ближче до коркового шару набувають більш овальної форми, щільно прилягають одна до одної. Товщина волокна нерівномірна по довжині.

№ п.п.	Опис зразка
8	Ость: товщина – 39,0 мкм. Рисунок кутикули простий. Клітини кутикули багатокутної форми, нещільно прилягають одна до одної та розташовані вздовж волокна. Оптичний край кутикули дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура та нерівномірно віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить яскраво виражену повздовжню посмугованість. Серцевина займає основну товщину волокна, складається з клітин багатогранної форми, які щільно прилягають одна до одної. Товщина волокна нерівномірна по довжині.
9	Кросбредна вовна: товщина – 28,0 мкм. Рисунок кутикули простий. Лінії кутикули розташовані паралельно та достатньо віддалені одна від одної. Оптичний край нерівний, дрібнозубцевий, зубці нерівномірно віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить повздовжню посмугованість. Серцевина складається з багатогранних сплюснених клітин, займає основну товщину волоса.
10	Кросбредна вовна: товщина – 30,0 мкм. Рисунок кутикули простий. Лінії кутикули розташовані паралельно та достатньо віддалені одна від одної. Оптичний край нерівний, дрібнозубцевий, зубці нерівномірно та достатньо віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить повздовжню посмугованість. Серцевина складається з багатогранних видовжених клітин, займає основну товщину волоса.
11	Кросбредна вовна: товщина – 32,0 мкм. Рисунок кутикули простий. Лінії кутикули розташовані паралельно та достатньо віддалені одна від одної. Оптичний край нерівний, дрібнозубцевий, зубці нерівномірно віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить повздовжню посмугованість та поодинокі пігментофори. Серцевина складається з багатогранних сплюснених клітин, займає основну товщину волоса.

№ п.п.	Опис зразка
12	Кросбредна вовна: товщина – 29,0 мкм Рисунок кутикули простий. Лінії кутикули скошені та достатньо віддалені одна від одної. Оптичний край нерівний, дрібнозубцевий, зубці нерівномірно віддалені один від одного. Коркова речовина слабо розвинена, містить повздовжню посмугованість. Серцевина складається з багатограних сплюснених, а, подекуди, з видовжених клітин, займає основну товщину волоса.

У дослідженнях також використовували волос різної форми. Характеристика зразків волоса людини подана у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Характеристика зразків волоса людини

№ п.п.	Опис зразка
1	Волосся прямої форми, товщина – 70,0 мкм, коричневого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена перерваним тяжем, подекуди – окремими острівцями. Коркова речовина займає основну частину волосини, жовто-коричневого кольору. Пігмент жовто-коричневий, середньо-зернистий, нерівномірно розподілений, подекуди утворює мазки. Рисунок кутикули середньої складності. Оптичний край дрібнозубцевий, зубці нерівномірно віддалені один від одного.
2	Волосся прямої форми, товщина – 55,0 мкм, світло-коричневого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена перерваним тяжем. Коркова речовина займає основну частину волосини, коричневого кольору, подекуди трапляються пустоти, заповнені повітрям. Пігмент сіро-коричневий, середньозернистий, рівномірно розподілений, подекуди утворює тонкі мазки. Рисунок кутикули

№ п.п.	Опис зразка
	середньої складності, оптичний край дрібнозубцевий, зубці рівномірно відділені один від одного.
3	Волосся прямої форми, товщина – 35,0 мкм, темно-коричневого кольору. Серцевина: центрально розташована, нерівномірна по товщині, безструктурна, представлена безперервним тяжем. Коркова речовина займає основну частину волосини, коричневого кольору. Пігмент темно-коричневий, нерівномірно розподілений, середньозернистий, подекуди утворює тонкі мазки. Рисунок кутикули середньої складності, зубчастість оптичного краю не виражена.
4	Волосся прямої форми, товщина – 42,0 мкм, коричневого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена перерваним тяжем, подекуди – окремими острівцями. Коркова речовина займає основну частину волосини, жовто-коричневого кольору. Пігмент коричневого кольору, середньозернистий, рівномірно розподілений. Рисунок кутикули середньої складності, зубчастість оптичного краю слабо виражена, зубці нерівномірно віддалені один від одного.
5	Волосся кучерявої форми, товщина – 56,0 мкм, чорного кольору. Серцевина представлена окремими центрально-розташованими безструктурними острівцями. Коркова речовина займає основну частину волосини, коричневого кольору з чорним відтінком. Пігмент темно-коричневого кольору, крупно- та середньозернистий, сильно виражений, утворює скупчення у вигляді мазків, ланцюжків та глибок. Рисунок кутикули середньої складності, оптичний край дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура волосини, нерівномірно віддалені один від одного.

№ п.п.	Опис зразка
6	Волосся кучерявої форми, товщина – 75,0 мкм, темно-коричневого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена перерваним тяжем, подекуди окремими острівцями. Коркова речовина займає основну частину волосини, коричневого кольору, ближче до оптичних країв - темно-коричневого кольору. Пігмент темно-коричневого кольору, рівномірно розташований, утворює грубі мазки, а подекуди пігментофори. Рисунок кутикули складний, оптичний край з фіолетовим відтінком, дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура волосини та нерівномірно віддалені один від одного.
7	Волосся кучерявої форми, товщина – 80,0 мкм, коричневого кольору. Серцевина відсутня. Коркова речовина займає всю товщину волосини, коричневого кольору, ближче до оптичних країв – коричнево-сірого кольору. Пігмент темно-коричневого кольору, нерівномірно розташований, утворює мазки різної товщини. Рисунок кутикули середньої складності, дрібнозубцевий, зубці нещільно прилягають до стовбура волосини, нерівномірно віддалені один від одного.
8	Волосся кучерявої форми, товщина – 78,0 мкм, коричневого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, сильно фрагментована. Коркова речовина займає основну товщину волосини, коричневого кольору, ближче до оптичних країв - чорно-коричневого кольору. Пігмент темно-коричневого кольору, нерівномірно розташований, утворює мазки різної товщини. Рисунок кутикула середньої складності, дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура волосини, нерівномірно віддалені один від одного.

№ п.п.	Опис зразка
9	Волосся дугоподібної форми, товщина – 49,0 мкм, світло-русого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена перерваним тяжем. Коркова речовина займає основну товщину волосини, жовтого відтінку. Пігмент сіро-жовтого кольору, нерівномірно розташований, утворює тонкі мазки. Рисунок кутикули середньої складності, дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура волосини, нерівномірно віддалені один від одного.
10	Волосся дугоподібної форми, товщина – 52,0 мкм, темно-русого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена окремими острівцями. Кокова речовина займає основну товщину волосини, сірого кольору з жовтим відтінком. Пігмент сіро-жовтого кольору, нерівномірно розташований, утворює мазки різної товщини. Рисунок кутикули середньої складності, дрібнозубцевий, зубці не щільно прилягають до стовбура волосини, нерівномірно віддалені один від одного.
11	Волосся дугоподібної форми, товщина – 35,0 мкм, темно-коричневого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена суцільним тяжем. Коркова речовина займає основну товщину волосини, сірого та коричневого кольорів. Пігмент коричневого кольору, нерівномірно розташований, утворює мазки різної товщини. Рисунок кутикули середньої складності, дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура волосини, нерівномірно віддалені один від одного.
12	Волосся дугоподібної форми, товщина – 41,0 мкм, коричневого кольору. Серцевина центрально розташована, безструктурна, представлена переривчастим тяжем, подекуди окремими острівцями. Коркова речовина займає основну товщину волосини, коричневого кольору.

№ п.п.	Опис зразка
	Пігмент сіро-коричневого кольору, нерівномірно розташований, утворює грубі мазки. Рисунок кутикули середньої складності, дрібнозубцевий, зубці щільно прилягають до стовбура волосини, нерівномірно віддалені один від одного.

Перша серія досліджень полягала у з'ясуванні оптимальних умов для екстракції кератинів. Для цього ми порівнювали ефективність екстракції за використання окисно-відновних методів та сульфїтолізу. Вивчали вплив на процес екстракції таких факторів, як вибір відновника, температура, значення рН, тип волокна та, власне, тривалість екстракції. Концентрацію кератинів визначали методом Бредфорда [42]. Структуру кератину підтверджували за допомогою ІЧ-спектроскопії, а склад протеїнів – методом електрофорезу у буферній системі Леммлі [108]. 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 натрію метабісульфітом та гідроген пероксидом на адсорбційну активність кератинів.

Завдання третьої серії експериментів передбачало створення моделей кератинових плівок для застосування в біомедицині. Біосумісність виготовлених з відновленого кератину методом кастингу полімерних плівок досліджували за допомогою адсорбційного тесту.

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 із використанням гліцеролу та без нього.

2.3. Матеріали і обладнання

Матеріалом для дослідження були кератинові волокна – вовняні волокна та волос людини.

Для виконання дисертаційної роботи використано наступне обладнання: ваги електронні, світловий мікроскоп «MICROmed» (Китай), прилад для електрофорезу фірми “BIO RAD” (США), термостат, рН-метр, магнітна мішалка, апарат для ліофілізації протеїнів, спектрофотометр, чашки Петрі для культивування клітин, спектроскоп SPECORD 80 M, динамометр типу ДШ-3М, мікрометр (модель 02005), растровий електронний мікроскоп РЕММА-102 з рентгенівським мікроаналізатором; термічний аналіз відновленого кератину проводили на дериватографі Q-1500 системи “Паулік - Паулік–Ердей”.

У роботі з протеїнами використано: набір для визначення концентрації протеїнів методом Bradford (Simko Ltd), трис (ACROS), 2-меркаптоетанол (2-ME, ACROS), ДСН (натрію додецилсульфат, ApplChem), амонію персульфат (ACROS), ТЕМЕД (Reanal), сечовина (Reanal), гліцин, акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід (ACROS), набори маркерних протеїнів (Fermentas, Литва), діалізні касети для низькомолекулярних протеїнів (Thermo Scientific Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10K MWCO).

Усі решта використані реактиви були вітчизняного виробництва класифікації х. ч. та ч. д. а.

2.4. Методи дослідження

2.4.1. Світлова мікроскопія

Дослідження морфологічних особливостей вовни та волоса людини здійснювали за допомогою світлового мікроскопа «MICROmed XS 4130». Для просвітлення волокон використовували ксилол.

Деякі особливості досліджуваних нами вовняних волокон показано на рисунках нижче. Наприклад, на рис. 2.2 добре видно нерівномірність товщини вовняного волокна.



Рис. 2.2. Вовняне волокно; $\times 40$. Примітка. Стрілками позначено ділянки різної товщини.

При дослідженні вовняних волокон нами виявлено, що подекуди пігмент представлений пігментофорами – окремими гранулами більш інтенсивного забарвлення овальної форми, а корковий шар з добре вираженою посмугованістю (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Вовняне волокно; $\times 40$. Примітка. Стрілками позначено пігментофори.

На відміну від волоса людини, вовняні волокна характеризуються простим рисунком кутикули (рис. 2.4) та наявністю широкої серцевини, що займає майже всю товщину волокна (рис. 2.5).



Рис. 2.4. Кутикула вовняного волокна; $\times 40$.



Рис. 2.5. Серцевина вовняного волокна, $\times 40$.

Особливості структури волоса людини показані на рисунках нижче. На рис. 2.6 наведено типи серцевини деяких досліджуваних зразків волоса людини та зразок волоса без серцевини.



1

2

3

Рис. 2.6. Світлова мікроскопія волоса людини. Примітка. 1, $\times 40$ – серцевина відсутня; 2, $\times 40$ – серцевина суцільна; 3, $\times 10$ – серцевина фрагментована.

На рис. 2.7 стрілками позначено характер пігменту.



Рис. 2.7. Світлова мікроскопія волоса людини. Примітка. 1, $\times 40$ – пігментофори; 2, $\times 40$ – тонкі мазки пігменту; 3, $\times 40$ – грубі мазки пігменту.

На рис. 2.8 показано луски кутикули волоса людини, які нерівномірно віддалені один від одного та нещільно прилягають до стовбура волосини.

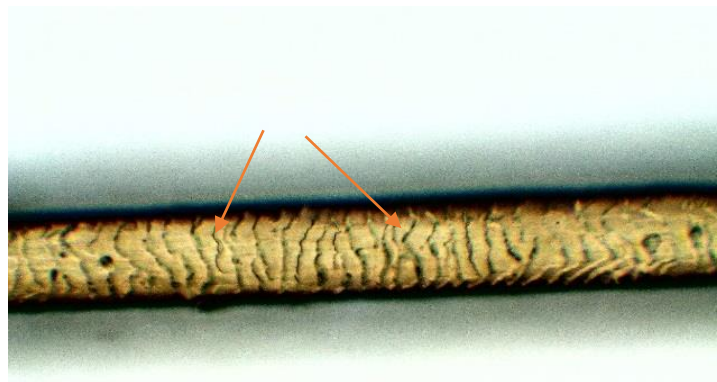


Рис. 2.8. Кутикула волоса людини, $\times 10$. Примітка. Стрілками позначено зубці лусок кутикули.

2.4.2. Екстракція кератинів

Екстракцію кератинів проводили двома методами: окисно-відновним [136] та за допомогою сульфітолізу [90]. В залежності від поставлених завдань, виділення кератинів проводили, змінюючи склад екстракційної суміші, тривалість екстракції (24, 48, 72 год), рН (6,5; 7,5; 8,5) та температурний режим (40° С, 50° С, 60° С).

2.4.2.1. Приготування волокон для дослідження

Зразки волоса людини подрібнювали ножицями, промивали у в 1% розчині натрію додецилсульфат (ДСН), тричі споліскували дистильованою водою та висушували на листках фільтрувального паперу при кімнатній температурі.

Вовняні волокна промивали у нейтральному мийному розчині за температури 40–50 °С, споліскували дистильованою водою. Залишковий жир екстрагували в апараті Сокслетта протягом 3–4 год за допомогою тетрахлорометану, після чого промивали 96 ° етанолом [2].

Для визначення вмісту вологи всі волокна висушували у термостаті за температури 105 °С до постійної маси.

2.4.2.2. Окисно–відновні методи екстракції кератинів

За основу для екстрагування кератинів з волокон використали метод, запропонований Nakamura зі співавторами [136]. Відповідно до цього методу, суміш для екстрагування складалася з: 25 мМ трис-НСІ, 5 М сечовини, 2,6 М тіосечовини та 2-меркаптоетанолу (2-МЕ).

Для порівняння впливу відновника на ефективність екстракції кератинів 2-МЕ у суміші частково замінювали на етанол, метанол, а також дитіотреїтол (ДТТ).

2.4.2.3. Метод сульфітолізу

Даний метод передбачає застосування в складі екстракційної суміші 8 М сечовини, 0,1 М ДСН та 0,5 М натрію метабісульфіту (м-БС) [90].

2.4.3. Діаліз протеїнів

Після завершення екстракції кератинів отримані розчини фільтрували за допомогою фільтрувального паперу, діалізували протягом 3-х діб проти деіонізованої води за допомогою діалізних касет для низькомолекулярних протеїнів та центрифугували при 12 000 g протягом 20 хв.

2.4.4. Визначення концентрації загального протеїну

Для визначення вмісту протеїну в супернатанті застосовували колориметричний метод з використанням реагенту Бредфорда [42]. Для цього ми змішували 1 мл реагенту Бредфорда та 1 мл отриманого протеїнового екстракту. Цю суміш інкубували протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Поглинання вимірювали за OD₅₉₅. Як контроль використовували розчинник. Для визначення концентрації кератинів будували калібрувальний графік за стандартними розчинами сироваткового альбуміну фірми «Sigma».

2.4.5. Електрофоретичне розділення протеїнів в ПААГ

Електрофорез протеїнів проводили в 12,5 % поліакриламідному гелі в денатурувальних умовах з ДСН у буферній системі Леммлі [108].

Проби для електрофорезу готували наступним чином: до 0,1 мл протеїнів додавали тріс-гліциновий електродний буфер, 2-ME, 0,4% бромфеноловий синій та кип'ятили протягом 5 хвилин на водяній бані. Процес електрофоретичного розділення проходив за напруги у 200 В. Для визначення молекулярної маси протеїнів у екстрактах використовували маркери протеїнів фірми “Fermentas”.

Після завершення електрофоретичного розділення гелі забарвлювали розчином 0,2% Coomassie R-250 протягом 1 год. Відмивали барвник розчином 7% оцтової кислоти у дистильованій воді.

2.4.6. ІЧ–спектрофотометрія

Для підтвердження структури кератину ми використали інфрачервону спектроскопію. Спершу, екстраговані протеїни піддавали ліофілізації. Отриманий порошок ліофілізованого кератину пресували у таблетки з KBr. ІЧ-спектри реєстрували за допомогою спектроскопа SPECORD 80 M, який автоматично реєструє ІЧ-спектри пропускання в діапазоні хвилі 4000...400 см⁻¹.

2.4.7. Термічний аналіз нативного та регеноерованого кератину

Комплексний термічний аналіз зразків проводили на дериватографі Q-1500 системи “Паулік–Паулік–Ердей”, з’єднаного з персональним комп’ютером. Дослідження проводили в інтервалі температур 20–400 °С в атмосфері повітря. Швидкість нагрівання зразків складала 3 °С за хвилину. Маса зразка 1 (нативний кератин) становила в середньому 70 мг, маса зразка 2 (регенерований кератин) була рівна 20 мг. Еталонною речовиною слугував алюміній оксид.

На наведених термограмах термогравіметричні криві TG відображають втрату маси зразків під час нагрівання. Диференційні термогравіметричні криві DTG відповідають швидкості втрати маси зразків і є результатом диференціювання кривих TG. Криві диференційного термічного аналізу DTA ілюструють теплові ефекти процесів.

2.4.8. Визначення впливу відновленого кератину на хімічні та фізичні параметри вовни

2.4.8.1. Обробка вовни розчином відновленого кератину

Для обробки вовняних волокон з ліофілізованого кератину готували кератиновмісні розчини з концентрацією 3 і 5% на фосфатному буфері (рН 7,4).

Відомо, що саме за такого рН відбувається спонтанне формування полімерного шару на поверхні волокна [22].

Обробку вовни проводили за температури 18–20 °С у ванні впродовж 45 хв. Ефективність обробки вовни оцінювали за її фізико-хімічними параметрами — міцністю та тониною.

2.4.8.2. Визначення міцності волокон та їх діаметру

Загальновідомо, що про міцність волокна та про зміни його функціональних груп опосередковано можна судити за розчинністю вовни у 0,1 н NaOH та у 4 н HCl. Тому у своїх дослідженнях ми використали саме ці маркери.

Зразки волокон піддавали обробці розчином 0,1 н NaOH та 4 н HCl і обчислювали різницю між сухою масою зразків до і після оброблення [3].

Міцність волокон на розрив визначали за допомогою динамометра ДШ-3М. Показник розривної довжини волокон встановлювали шляхом розриву пучка волокон певної довжини і маси. Для перерахунку міцності волокон з км у сН / текс враховували коефіцієнт 0,981.

Діаметр волокон визначали на мікрометрі моделі 02005.

2.4.9. Розділення кератинових волокон на кератоци

Розділення кератинових волокон на кератоци проводили методом, запропонованим R. Asquit та співавторами [35]. Згідно з цією методикою, надкислоти окиснюють дисульфідні зв'язки молекулі кератину, тому цистин виявляють у вигляді цистеїнової кислоти.

Вовняні волокна поміщали в свіжоприготовлену та охолоджену до 0 °С надмурашину кислоту у співвідношенні 40:1 (v/m) та залишали на 20 годин. Після цього, надмурашиний екстракт відфільтровували, волокна промивали мурашиною кислотою, а потім дистильованою водою. Мурашиний та надмурашиний екстракти об'єднували, охолоджували до 0 °С та нейтралізували 20% розчином

NaOH. Отриманий розчин діалізували протягом 12 годин проти деіонізованої води. Це призводило до випадання в осад протеїнів з високим вмістом тирозину і гліцину. Їх очищали і визначали гравіметрично [9].

Для виділення бета-кератози попередньо окиснені надмурашиною кислотою волокна розчиняли в 1,5 М аміачному розчині протягом 30 год при постійному струшуванні і фільтрували. Бета-кератозу, яка залишилася на фільтрі, промивали водою, ацетоном та висушували до постійної маси. Із фільтрату альфа-кератозу осаджували концентрованою оцтовою кислотою за рН 4,0 до кінцевої концентрації 5 % і витримували протягом 24 годин на холоді. Протеїни, що випали в осад відділяли фільтруванням, промивали водою і ацетоном і висушували. Вміст фракцій обчислювали гравіметрично і виражали у відсотках у перерахунку на масу окисненого волокна. Гамма-кератозу визначали за різницею між вмістом альфа- і бета-кератоз.

2.4.10. Дослідження адсорбційних властивостей іонів свинцю та кадмію

2.4.10.1. Приготування волокон для дослідження

Для перевірки здатності кератинів адсорбувати іони важких металів використовували низькоякісну вовну, що попередньо промивали в нейтральному мийному розчині, багаторазово споліскували дистильованою водою та висушували при кімнатній температурі. Поверхневі ліпіди екстрагували тетрахлорметаном у апараті Сокслетта протягом 6 годин.

Для покращення сорбційних властивостей, вовну обробляли 10% гідроген пероксидом та 0,2 М натрій бісульфітом та поміщали у розчин у співвідношенні 1:20 (w / V) на 3 год в термостат при температурі 37 °С. Після цього, волокна промивали кілька разів дистильованою водою та висушували при кімнатній температурі. Відтак, хімічно модифіковані волокна подрібнювали і отриманий порошок використовували, як біосорбент для видалення іонів важких металів з

водних розчинів. Як контроль використовували хімічно немодифікований кератин.

2.4.10.2. Приготування розчинів іонів свинцю та кадмію

Розчини свинцю та кадмію отримували шляхом розчинення ацетату свинцю та нітрату кадмію у дистильованій воді. Потім, робочий розчин металів у концентрації 100 мг/л отримували шляхом розведення у дистильованій воді. рН розчинів коригували 0,1 н HCl або 0,1 н NaOH та його значення варіювало між 5 і 7. Розчини фільтрували через фільтрувальний папір. Концентрацію свинцю та кадмію у фільтраті визначали за допомогою атомно-абсорбційної спектрофотометрії.

2.4.10.3. Визначення ефективності біосорбції

Ефективність біосорбції визначали за рівнянням:

$$\% = [(C_i - C_f) / C_i] \times 100,$$

де C_i і C_f – це початкові і кінцеві концентрації іонів Pb (II) та Cd (II) у водних розчинах [101].

2.4.10.4. Визначення абсорбційної ємності

Абсорбційна ємність кератину (мг/г) визначалася за формулою, використовуючи рівняння:

$$q = [(q_0 - q_1) \times V] / m,$$

де q_0 – кількість іонів металів у розчині перед адсорбцією; q_1 – кількість іонів металів у розчині після адсорбції; V – об'єм розчину, л; m – маса біосорбенту, г [101].

2.4.11. Виготовлення кератинових плівок для біомедичних цілей

2.4.11.1. Приготування протеїнового розчину

Для виробництва плівок використовували кератиновий екстракт, отриманий з волоса людини, солюбілізованого за допомогою ДТТ. Отриману екстракційну суміш фільтрували через фільтрувальний папір та діалізували протягом 3-х діб проти дистильованої води, використовуючи касети для діалізу низькомолекулярних протеїнів. Концентрацію протеїну у розчині визначали колориметричним методом з використанням реагенту Бредфорда [42]. З отриманих протеїнів готували 4% розчин кератину у дистильованій воді з додаванням 1% розчину гліцеролу та без нього.

2.4.11.2. Кастинг

Отримані протеїнові суміші тонким шаром товщиною не більше 3,0 мм наливали у чашки Петрі для культивування клітин. Відтак, чашки Петрі поміщали у термостат на 24 год при температурі 37 °С. Після цього, їх виймали з термостату та 24 год фіксували парами води у ексикаторі з притертою кришкою.

2.4.11.3. Дослідження структури плівок

Особливості поверхні плівок та елементний склад вивчали за допомогою растрового електронного мікроскопа REMMA-102 з рентгенівським мікроаналізатором.

Сканувальна електронна мікроскопія (SEM) дозволяє проводити неруйнівне дослідження масивних зразків та мікропроб в твердій фазі, як спеціально підготовлених так і в природньому вигляді. Сканування поверхні зразка здійснювалося з допомогою електронного пучка діаметром кілька нанометрів і з енергією електронів 0,2–40 кВ.

При бомбардуванні поверхні досліджуваного зразка частина електронів пружно відбивається, частина покидає зразок із втратою енергії (вторинні електрони), решта поглинаються зразком. Тому отримані зображення у електронному мікроскопі є зображеннями у пружновідбитих (зворотньо-розсіяних) та вторинних електронах.

При бомбардуванні об'єкту електронним пучком, окрім гальмівного неперервного рентгенівського спектру ми отримали спектр характеристичного випромінювання, лінії якого виявляють присутні хімічні елементи. Порівняння інтенсивностей відповідних ліній для зразку і для еталону, із відомим вмістом досліджуваного елементу, дозволило провести кількісний аналіз. Струми зонда при мікроаналізі складають 1–2 нА (прискорююча напруга – 20кВ).

2.4.11.4. Дослідження біосумісності плівок, виготовлених на основі кератинів

Вивчення адсорбційних властивостей плівок здійснювали за допомогою електрофорезу. Для цього вирізали фрагменти плівки розміром приблизно $0,6 \times 0,6$ см, поміщали у спеціальний планшет та інкубували сироваткою крові людини протягом 5 та 15 хв в термостаті при температурі 37 °С. По завершенню інкубації сироватку забирали у відповідно підписані пробірки типу Епендорф та використовували в подальшому для електрофорезу, як контактну сироватку. Як контроль використовували сироватку крові людини, інкубовану в порожній лунці.

Після забору сироватки всі фрагменти плівки промивали у дистильованій воді та поміщали у новий планшет. Ці фрагменти інкубували у ДСН протягом 1 години в термостаті за температури 37 °С. Як контроль, використовували ДСН інкубований в пустій лунці. Після інкубації, розчин ДСН відбирали у спеціально підписані пробірки та використовували для електрофорезу, як десорбований розчин протеїнів.

Установку для електрофорезу збирали відповідно до інструкції виробника. В передню камеру заливали тріс-гліциновий електродний буфер та ДСН, в задню

камеру – лише тріс-гліциновий буфер і під'єднували до блоку живлення. Електрофорез проходив при напрузі 200 В. Прилад від'єднували від блоку живлення через 50 хв, коли смуга зразків дійшла до кінця гелю.

Гелі виймали з камери, промивали дистильованою водою та на 1 год поміщали у розчин 0,2% Coomassie R-250 для фарбування. Після завершення вказаного часу гелі виймали із забарвлюючого розчину та поміщали в 7% розчин льодяної оцтової кислоти у дистильованій воді.

2.4.12. Комп'ютерне і програмне забезпечення роботи та статистичний аналіз отриманих результатів

Для роботи використовували комп'ютер на базі Intel Pentium 1,6 ГГц із операційною системою Windows ("Microsoft", США). Побудову графіків та статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програми 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 із використанням критерію Стюдента. Вірогідними вважали відмінності за $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ВИБІР ОПТИМАЛЬНИХ ПАРАМЕТРІВ ЕКСТРАКЦІЇ КЕРАТИНІВ ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА

3.1. Визначення оптимальних умов для екстракції кератинів

Екстракція кератинів з кератиновмісних матеріалів – дуже складний процес. Перш за все, це пояснюється тим, що такі багаті на кератини структури, як вовна, волосся, роги, копита, нігті, кігті є важко розчинними субстанціями. Окрім цього, молекули кератину стабілізуються великою кількістю внутрішньо-молекулярних та міжмолекулярних зв'язків, що значно ускладнює їх солюбілізацію [163].

У літературі описано чимало методів виділення кератинів. Їх поділяють на хімічні, мікробіологічні, ензиматичні, а також використовують мікрохвильове опромінення та надкритичний розрив водою та парою [93, 163, 171, 223].

На сьогодні виділяють два головних способи отримання розчинного кератину. Перший метод базується на розчиненні протеїнів шляхом розриву пептидних зв'язків з утворенням макромолекул та м'який метод, що призводить переважно до розриву дисульфідних зв'язків, а також внутрішньо молекулярних водневих зв'язків. Для збереження унікальних властивостей кератинів, зазвичай застосовують саме другий метод екстракції. Цього можна досягти шляхом окиснення або відновлення кератину [171].

Внаслідок окиснення надоцтовою кислотою, гідроген пероксидом та іншими окисниками, дисульфідні групи перетворюються на залишки цистеїнової кислоти. Отримані деривати називаються кератозами. Дисульфідні зв'язки кератоз неможливо відновити.

Кератеїни, що утворюються внаслідок відновлення кератину, набувають такої форми: Кератин – Cys – S та Кератин – Cys – SSO₃⁻ та містять залишки амінокислот здатних до повторного зв'язування [176].

Незалежно від обраного методу, на ефективність екстракції кератинів суттєво впливає низка факторів, таких як температура, значення рН, її тривалість [96]. Тому нашим завданням було дослідити, як ці чинники будуть впливати на солюбілізацію кератину вовняних волокон, які відрізняються своєю морфологією.

3.1.1. Вплив рН на ефективність екстракції кератинів

Для з'ясування впливу рН на ефективність екстракції кератинів солюбілізацію цих протеїнів ми проводили класичним методом, описаним Nakamura зі співавторами [136], використовуючи 2-меркаптоетанол як відновний агент.

Етапи екстракції схематично представлені на рис. 3.1.

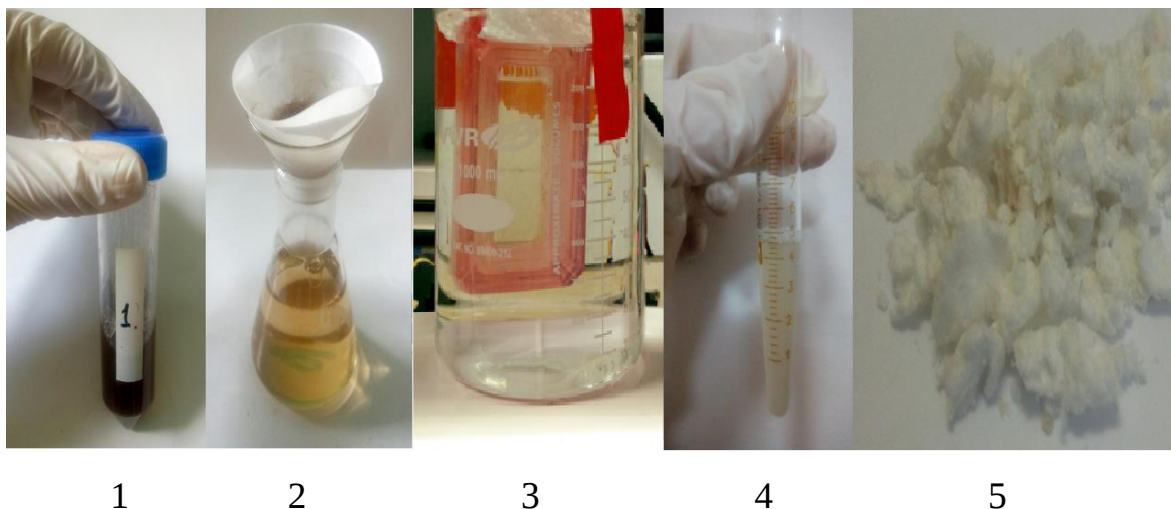


Рис. 3.1. Етапи отримання кератину: 1 – солюбілізація; 2 – фільтрація; 3 – діаліз; 4 – розчин кератину; 5 – ліофілізований кератин.

Дія 2-МЕ проявляється шляхом розриву дисульфідних зв'язків у молекулі кератину. Згідно з результатами, представленими у таблиці 3.1, нами встановлено, що значення рН істотно впливало на ефективність екстракції кератинів.

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.

Експериментально доведено, що оптимальне значення рН, прийняте для екстракції кератинів, знаходиться в межах 6,5–8,5, оскільки кератини не можуть розчинятися в кислому рН і, ймовірно, піддаються розкладу при лужному рН [95]. Тому у своїх дослідженнях ми використали саме цей діапазон рН.

Як видно з наведених даних, в залежності від рН екстракційної суміші вміст солюбілізованого протеїну коливався в межах 1,92–3,74 мг/мл, проте найбільше його значення практично для усіх типів волокон зафіксовано за рН середовища 8,5. Слід відзначити, що найбільший вміст протеїну екстраговано з тонких вовняних волокон, що, очевидно, може бути пов'язано з їх будовою.

3.1.2. Вплив температури на ефективність екстракції кератинів

При визначенні умов ефективної екстракції кератинів, варто враховувати температурний режим, який, згідно з літературними джерелами, відіграє в цьому процесі значущу роль [69].

Підвищення температури при солюбілізації кератинів покращує процес розчинення, оскільки збільшує мобільність іонів шляхом зменшення в'язкості екстракційної суміші [171]. Проте, відомо, що високі температури можуть порушувати структуру протеїну, тому ефективна екстракція – це завжди

компроміс між кількістю та якістю солюбілізованого кератину. На додаток, екстракція кератинів за високих температур може призводити до негативного впливу на амінокислотний склад. Цей факт потрібно брати до уваги, особливо у випадку, якщо метою екстракції є отримання продукту, багатого на певні амінокислоти [96, 171].

У своїх дослідженнях ми вивчали ефективність екстракції кератинів в діапазоні температур від 40 до 60 °C. Як видно з таблиці 3.2, наші результати засвідчили, що зі збільшенням температури збільшується вміст протеїну, екстрагованого з усіх типів волокон, проте, найвищий вміст спостерігали за температури 50 °C для тонких та кросбредних волокон.

Таблиця 3.2

**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.

Слід зазначити, що незалежно від температури, при якій відбувалася екстракція, вміст солюбілізованого протеїну з ості був найнижчим. Цей факт можна пояснити 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.

З літературних джерел відомо, що кератини можна екстрагувати і при значно нижчих температурах, наприклад 20 °C, проте, в залежності від типу кератизованих структур, оптимальне значення температури знаходиться в діапазоні від 50 до ± 75 °C. Зі збільшенням температури понад 77,5 °C

спостерігається поступове зменшення ефективності екстракції, що пояснюється денатураційними змінами в молекулі кератину [167].

3.1.3. Вплив тривалості екстракції кератинів на її ефективність

Літературні дані свідчать про те, що існує зв'язок між температурним режимом екстракції кератинів та її тривалістю і разом ці фактори впливають на ефективність солюбілізації [96].

Як показали результати наших досліджень, за умов використання 2-меркаптоетанолу як відновного агента, вміст розчинного протеїну в екстрактах вовняних волокон коливався в межах 3,13–3,85 мг/мл (рис. 3.2).

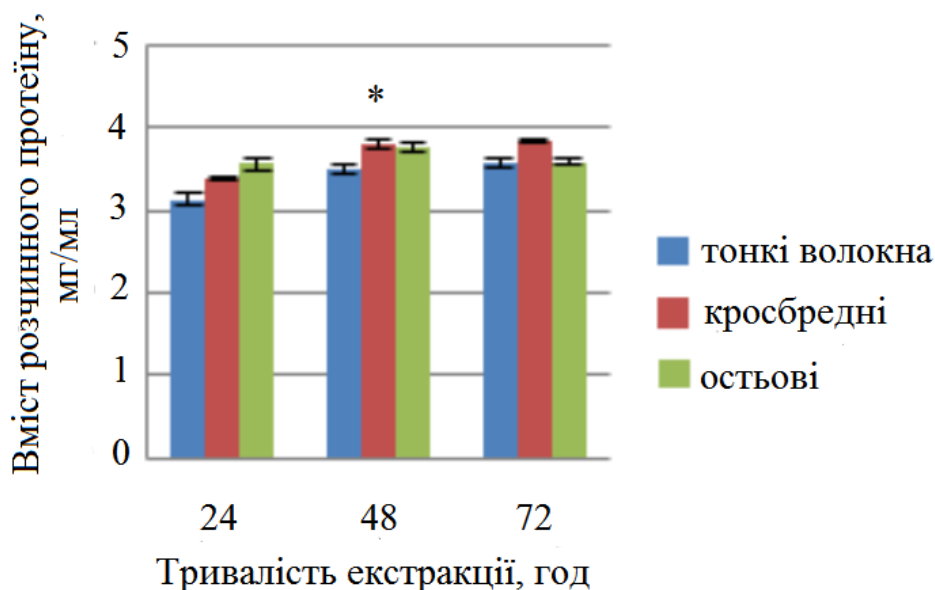


Рис. 3.2. Вміст розчинного протеїну в екстракті за використання 250 мМ 2-МЕ, мг/мл ($M \pm m$, $n=5$). Примітка. Позначкою * – різниці вірогідні залежно від тривалості екстракції.

Характерно, що 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 °С.

Літературні джерела вказують, що із збільшенням температури екстракції її тривалість можна зменшити, наприклад, при дослідженні оптимальних параметрів екстракції кератинів з пір'я курей встановлено, що збільшення температури від 67,5 до 77,5 °С та тривалості екстракції від 9,5 до 15,5 год збільшує кількість отриманого протеїну [167]. Проте, за цих умов слід враховувати специфіку будови пір'я.

3.1.4. Вплив низькомолекулярних спиртів на ефективність екстракції кератинів

Беручи до уваги той факт, що гідроксильна група 2-МЕ впливає на взаємодію ІФ та КАП у вовняному волокні, ми припустили, що у складі суміші для екстракції кератинів можна використати інші низькомолекулярні спирти, зокрема метанол і етанол. Таким чином, у екстракційній суміші 2-МЕ частково замінили 25% розчином відповідно етанолу та метанолу.

Оскільки у попередньому досліді було показано, що найефективнішою є екстракція за температури 50 °С і рН 8,5, то, власне, за цих умов відбувалася інкубація в часовому інтервалі між 24–72 год.

Отриманий розчин фільтрували, центрифугували і після діалізу використовували для визначення вмісту протеїну.

Як видно з рисунку 3.3, вміст розчинного протеїну в екстрактах вовняних волокон різних типів коливався в межах 0,137–0,165 мг/мл, що значно менше, ніж при використанні для екстрагування 2-меркаптоетанолу

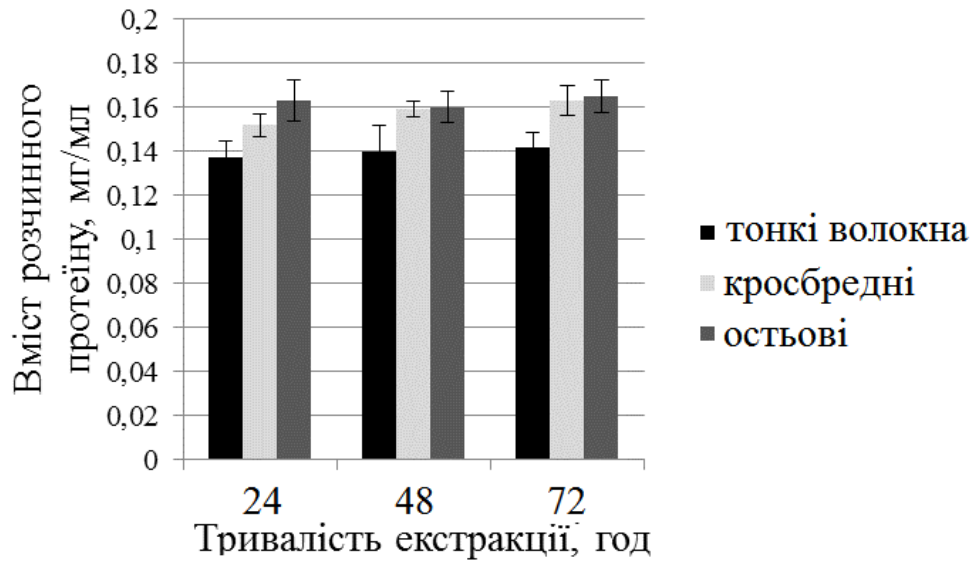


Рис. 3.3. Вміст розчинного протеїну в екстракті за використання 25% етанолу, мг/мл ($M \pm m$, $n=5$).

Слід зазначити, що вміст протеїну був вищий у екстрактах, отриманих із кросбредних та остьових вовняних волокон, проте не перевищував 0,165 мг/мл.

Практично аналогічні результати отримані і за використання в екстракційних сумішах метанолу (рис. 3.4).

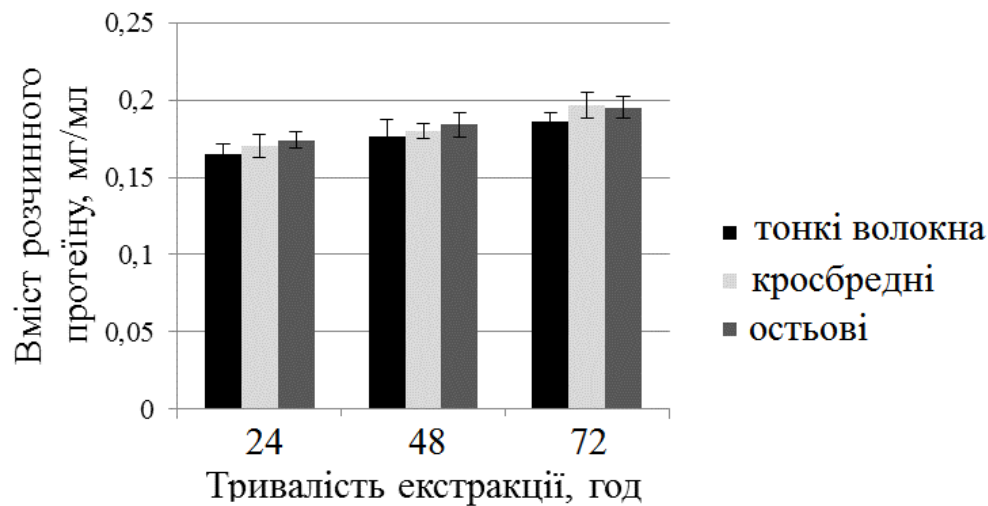


Рис. 3.4. Вміст розчинного протеїну в екстракті за використання 25% метанолу, мг/мл ($M \pm m$, $n=5$).

Характерно, що вміст розчинного протеїну за цих умов не перевищував 0,197 мг/мл і суттєво не залежав від тривалості екстракції.

Подібні результати були отримані при екстрагуванні волоса людини. При цьому електрофоретичний аналіз показав, що у отриманих екстрактах переважали КАП протеїни. Ці результати можуть свідчити про те, що за використання у складі екстракційної суміші таких низькомолекулярних спиртів, як метанол і етанол, в першу чергу виділяються матриксні протеїни, натомість для виділення структурних протеїнів необхідні сильніші відновники. Оскільки ефективність екстракції кератинів за використання етанолу і метанолу була низькою, до складу екстракційної суміші було введено замість 2-МЕ такий відновник, як ДТТ.

Як видно з рис. 3.5, за використання в екстракційній суміші ДТТ ефективність екстракції кератинів зросла більш, ніж удвічі ($p < 0,05-0,001$), а вміст розчинного протеїну залежно від типу вовняного волокна змінювався в межах 7,15–7,83 мг/мл.

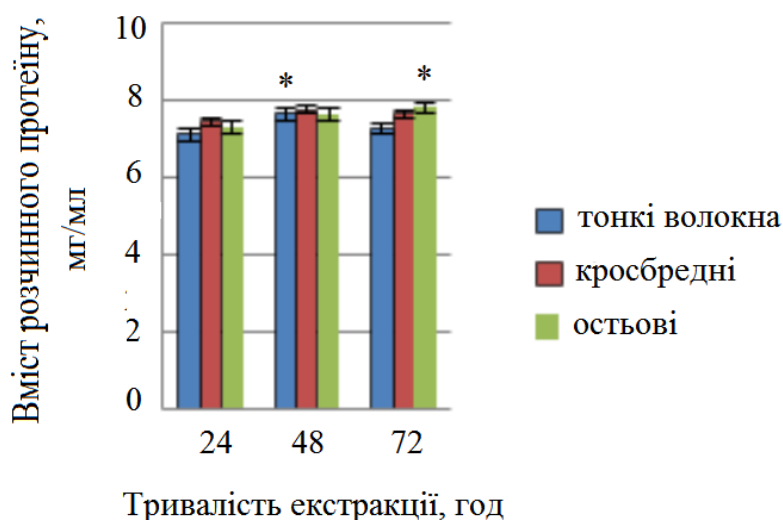


Рис. 3.5. Вміст розчинного протеїну в екстракті за використання 250 мМ ДТТ, мг/мл ($M \pm m$, $n=5$). Примітка. Позначкою * – різниці достовірні залежно від тривалості екстракції.

У результаті проведених досліджень також з'ясувалось, що для тонких вовняних волокон оптимальна тривалість екстракції становила 48 год, а для

значно грубших, остьових волокон – 72 год. Характерно, що для кросбредних волокон час екстракції суттєво не впливав на її ефективність.

У зв'язку із значною токсичністю 2-МЕ, що несе зі собою небезпеку, як для організму людини, так і для навколишнього середовища, та високою вартістю ДТТ, важливим є пошук більш безпечних та доступних методів екстракції кератинів. В такому випадку, як альтернативний метод екстракції кератинів дослідники пропонують сульфїтоліз.

Сульфїтоліз – це оборотний процес, в якому відновним агентом виступає натрію метабісульфїт (м-БС). У результаті сульфїтолізу утворюється S-сульфонатний залишок та цистеїн-тіол [163]. Тому, ми вирішили порівняти вплив 2-МЕ, ДТТ та м-БС на ефективність екстракції кератинів з волоса людини та з вовняних волокон.

У попередніх дослідженнях ми з'ясували, що оптимальними умовами для екстракції кератинів з вовняних волокон та волоса людини є температура в діапазоні 50–60 °C, pH 8,5 та її тривалість в межах 48–72 год. Саме за цих умов досягається максимальне отримання протеїну.

Як видно з результатів, представлених у табл. 3.3, ефективність екстракції кератинів з вовни та волоса людини вірогідно залежить від відновного агента.

Табл. 3.3.

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 ^a	34,16±0,17 ^a
Дитіотреїтол	50,65±1,46 ^b	40,80±2,3 ^b
Натрій метабісульфїт	33,96±1,25 ^a	47,90±0,98 ^c

Примітка. Значення підписані різними буквами вірогідно відрізняються ($p < 0,05$).

Варто зазначити, що ефективність екстракції кератинів з вовни була вищою за використання в екстракційній суміші ДТТ. На противагу, вплив 2-МЕ та натрію метабісульфіту на ефективність екстракції був практично ідентичним.

За присутності 2-МЕ ефективність екстракції кератинів з волоса людини становила 34,16 %, в той час як за використання ДТТ ефективність екстракції зросла до 40,8 %, а за метабісульфіту натрію – до 47,9 %.

Наші результати свідчать про те, що заміна 2-МЕ на ДТТ в складі екстракційної суміші вірогідно збільшує ефективність екстракції кератинів як з вовни, так і з волоса людини, проте, найбільш ефективним відновником для солюбілізації кератину з волоса людини є натрію метабісульфіт. Цей факт пояснюється тим, що сечовина у високій концентрації (8 М) в складі екстракційної суміші призводить до набухання структури кератину через ослаблення гідрофобних взаємодій у поліпептидному ланцюзі та полегшує вплив відновного агенту [211]. Функція ДСН проявляється в збільшенні ефективності екстракції та покращенні стабільності екстрагованого кератину у водних розчинах [213]. В свою чергу, метабісульфіт натрію руйнує цистеїнові зв'язки, в той час як довгий поліпептидний ланцюг кератину залишається інтактним [80].

В літературних джерелах описано методи покращення ефективності екстракції кератинів. Хоча дані отримані деякими авторами відрізняються. Згідно з дослідниками [96], ефективність екстракції кератинів з пір'я становила 18,3 %, якщо екстракційна суміш містила натрію метабісульфіт, в той час як за використання Na_2S – 86,5%. Також є дані, що меркаптоетанол є найкращим відновним агентом для екстракції кератинів пір'я [176].

В літературі повідомляється про новий двогодинний протокол екстракції кератинів з волоса людини з ефективністю екстракції $47,3 \pm 3,72$ % [205]. В цьому випадку, екстракційна суміш містила NaOH , ДСН, бета-меркаптоетанол та етилендіамінтетраоцтову кислоту. Хоча, деякі автори вважають, що оптимальним відновним агентом є саме натрію метабісульфіт, оскільки він дешевший та безпечніший, ніж 2-МЕ та ДТТ [176].

Вплив відновника на концентрацію протеїнів показаний на рис. 3.6.

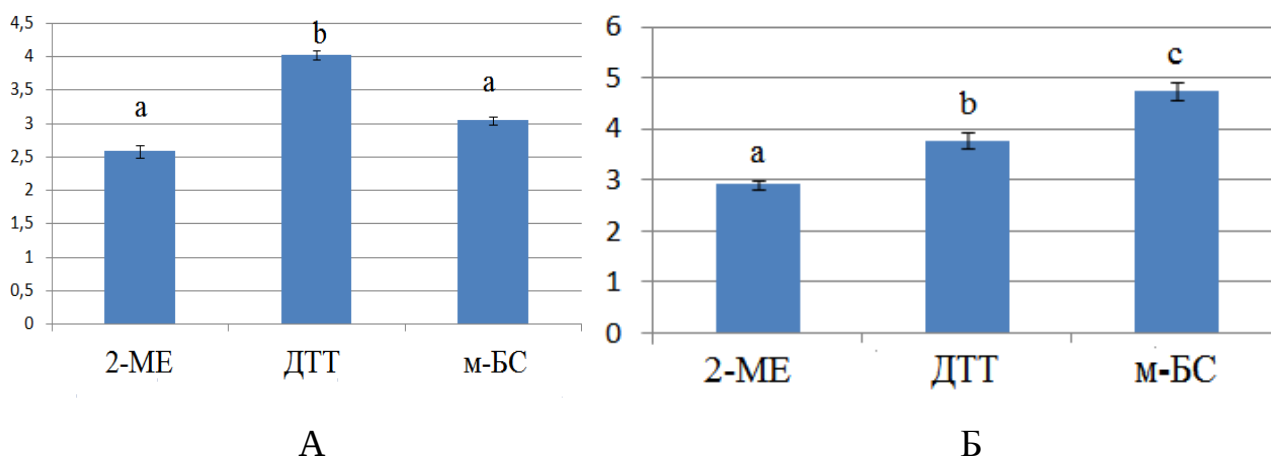


Рис. 3.6. Вплив відновника на концентрацію протеїнів (мг/мл): А – вовна; Б – волос людини. Примітки: Значення підписані різними літерами вірогідно відрізняються ($p < 0,05$); 2-ME – 2-меркаптоетанол, ДТТ – дитіотреїтол, м-БС – натрію метабісульфіт.

Концентрація протеїнів в екстракті з вовни коливалася в межах від 2,6 до 4,02 мг/мл (рис. 3.6, А). В екстракті волоса людини концентрація протеїнів знаходилася в межах 2,9–4,75 мг/мл (рис. 3.6, Б). Застосування в складі екстракційної суміші метабісульфіту та дитіотреїтолу супроводжується значним збільшенням вмісту протеїнів в екстракті з волоса людини ($p < 0,05$).

Отже, порівняльний аналіз солюбілізації кератинів вовни та волоса людини різними методами свідчить, що ефективність екстракції цих протеїнів значно залежить від вибору відновника в складі екстракційної суміші.

3.2 Дослідження структурних характеристик кератинів, отриманих із вовняних волокон різних типів та з волоса людини

Як вовна, так і волосся більш, ніж на 90 % складаються з кератинів – протеїнів з високим вмістом Сульфуру та великою кількістю цистеїнових залишків у молекулі (7–20 % від загальної кількості) [171]. Внутрішньо молекулярні та міжмолекулярні дисульфідні зв'язки забезпечують тривимірну структуру протеїну, надають йому стабільності та знижують розчинність, тому

кератини нерозчинні у воді, багатьох слабких кислотах та органічних розчинниках. На стабільність цих протеїнів також впливають гідрофобні, водневі та іонні зв'язки [171].

На молекулярному рівні кератини можуть мати три різні конфігурації: α -кератини, що входять до складу протеїнів інтермедіальних філаментів (ІФ), мають структуру α -спіралі; β -кератини, що теж входять до складу протеїнів ІФ, проте мають структуру β -листка; та γ -кератини – протеїни матриксу, що характеризуються аморфною структурою [148].

Електрофоретичний профіль кератинів вовни характеризується наявністю чотирьох фракцій різної молекулярної маси: протеїни з низьким вмістом Сульфуру з молекулярною масою 40–60 кДа; протеїни з високим вмістом Сульфуру, молекулярна маса яких становить 11–28 кДа; та протеїни з високим вмістом гліцину або тирозину з молекулярною масою 9–12 кДа [171]. Тому, при виборі методу солюбілізації кератину дослідники орієнтуються на те, які саме протеїнові фракції вони бажають отримати.

Нижче наведено електрофореграми кератинів, екстрагованих з вовни та волоса людини за допомогою різних екстракційних сумішей.

3.2.1. Електрофоретичний профіль екстрагованих кератинів

З'ясувавши вплив різних відновників на ефективність солюбілізації кератинів, наступним нашим завданням було дослідити та порівняти електрофоретичні профілі протеїнів, екстрагованих різними методами. Для розділення протеїнів був обраний варіант електрофорезу, запропонований Леммлі [108].

Як видно на рис. 3.7, електрофоретичний профіль кератинів вовни, екстрагованих за допомогою ДТТ, характеризується наявністю двох поліпептидних ланцюгів із молекулярною масою в діапазоні 40–60 кДа, які відповідають типу I і типу II протеїнів ІФ.

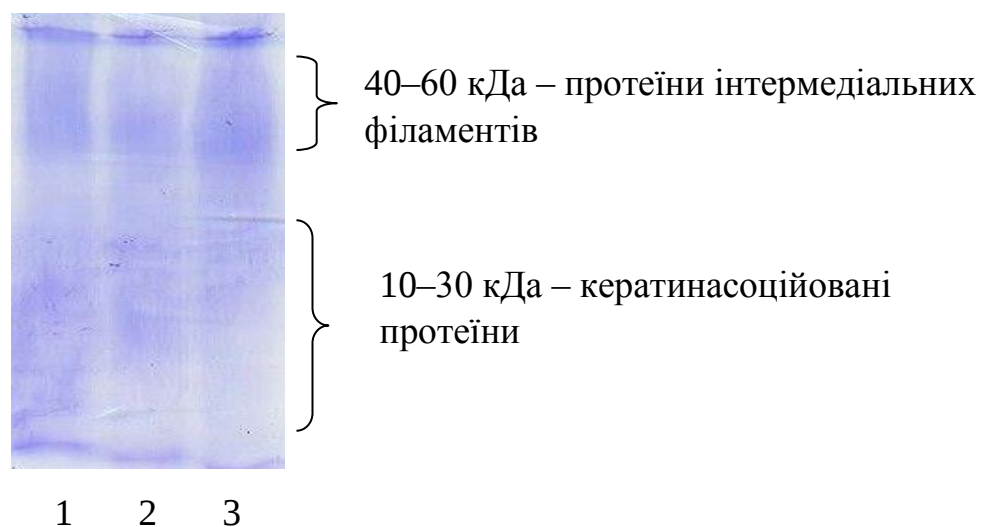


Рис. 3.7. Електрофоретичний профіль кератинів, виділених із вовняних волокон різної будови, після 48 год екстракції за умов використання ДТТ та температури 50 °С. Примітка. 1 – тонке волокно; 2 – кросбредне; 3 – остьове.

ІФ у кератиновому волокні упаковані у суперструктури, так звані макрофібрили, та характеризуються низьким вмістом Сульфуру.

У низькомолекулярній області виявлено смуги протеїнів із молекулярною масою 10–30 кДа – це багаті на Сульфур кератинасоційовані протеїни (КАП), що формують глобулярну протеїнову решітку, яка утримує кортикальні клітини. Така КАП-решітка впливає не лише на макрофібрили ІФ, а й на міцність та кривизну волокна [50].

Як видно з рис. 3.7, смуги КАП забарвилися з меншою інтенсивністю, ніж протеїни ІФ. Це пояснюється тим, що молекули кератину з високим вмістом Сульфуру гірше зв'язують барвник, ніж протеїни з низьким вмістом Сульфуру [73]. Відмінностей в електрофоретичному профілі протеїнів, екстрагованих з вовняних волокон різного типу (тонких, кросбредних, остьових) нами не виявлено.

На рис. 3.8 зображено порівняльну електрофореграму протеїнів вовни, екстрагованих різними методами.

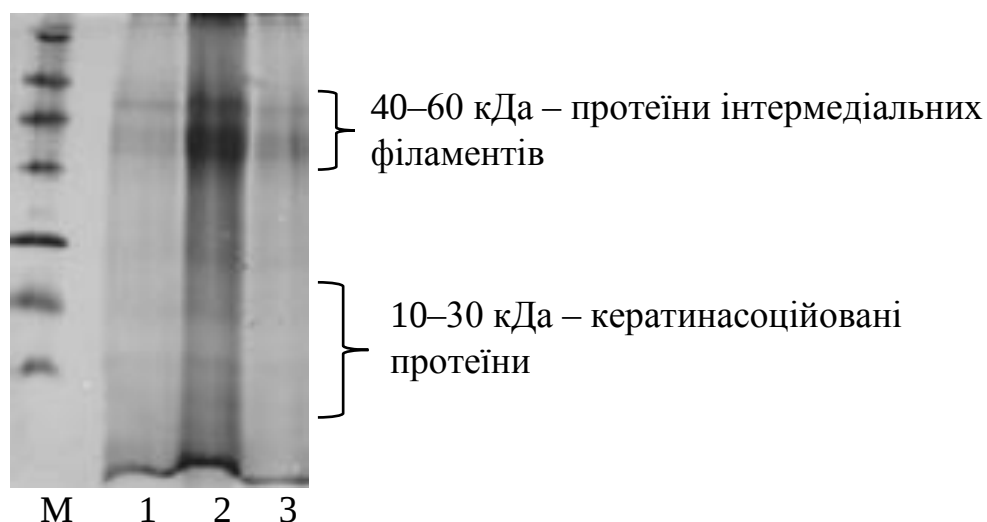


Рис. 3.8. Електрофореграма протеїнового екстракту вовни у ПААГ. Примітка. М – маркер молекулярних мас, 1 – екстракт кератинів вовни (2-МЕ), 2 – екстракт кератинів вовни (ДТТ), 3 – екстракт кератинів вовни (м-БС).

Згідно з нашими результатами, екстраговані кератини, отримані як відновним методом, так і сульфїтолізом характеризуються однаковими діапазонами молекулярних мас.

У результаті проведеного електрофоретичного аналізу екстракту, отриманого після обробки волоса людини м-БС та ДСН, нами також виявлено два поліпептидні ланцюги протеїнів ІФ з молекулярною масою у межах 40–60 кДа (рис. 3.9).

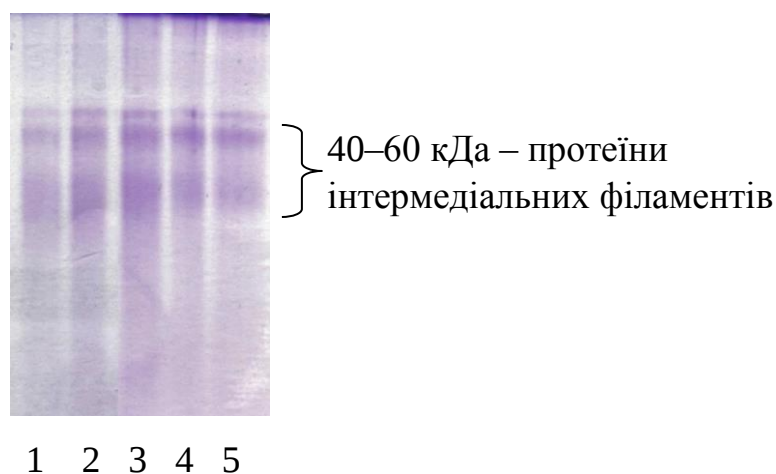


Рис. 3.9. Електрофореграма протеїнового екстракту у ПААГ. Примітка. 1–5 – екстракт кератину, отриманого з волоса людини.

У цьому випадку нами не виявлено низькомолекулярних КАП. Такі результати можна пояснити наступним чином: або цей тип протеїнів погано екстрагується методом сульфїтолізу, або слід підбирати інші умови їх електрофоретичного розділення.

Проте, для нас особливий інтерес становили саме фібрилярні протеїни, оскільки переважно їх використовують у різних напрямках біомедицини.

На рис. 3.10. представлено варіант електрофоретичного розділення протеїнів волоса людини за використання в екстракційній суміші ДТТ.

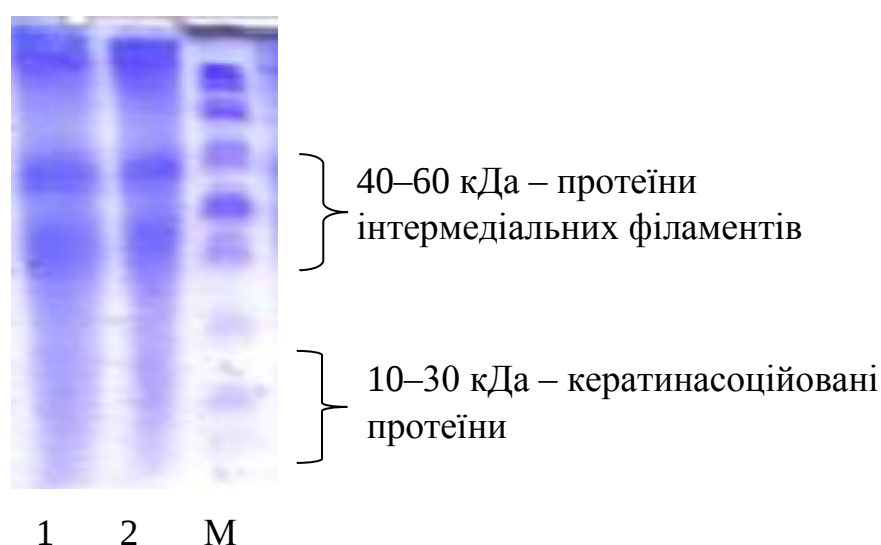


Рис. 3.10. Електрофореграма протеїнового екстракту у ПААГ. Примітка. 1–2 – екстракт кератину, отриманого з волоса людини, М – маркер молекулярних мас.

Отже, за присутності ДТТ в складі екстракційної суміші, можна отримати як протеїни ІФ, так і низькомолекулярні КАП.

Слід відзначити, що, як свідчать наші результати, незалежно від обраного методу екстрагування, отримані протеїни характеризуються молекулярною масою, яка властива фібрилярним протеїнам, які можуть бути матрицею для створення нових кератиновмісних біокомпозитів.

Як видно з рис. 3.7–3.10 електрофоретичні патерни всіх кератинових екстрактів, отриманих за використання різних екстракційних сумішей вірогідно не відрізняються.

3.2.2. ІЧ–спектроскопія екстрагованого кератину

Для розуміння структури та фізико-хімічних властивостей кератину волоса ми використали інфрачервону спектроскопію. ІЧ-спектр дає точну характеристику речовини і може слугувати критерієм ідентичності, оскільки кожна сполука має лише їй притаманний набір смуг поглинання, особливо в області $1300\text{--}700\text{ см}^{-1}$, оскільки характер спектру в цьому інтервалі часто істотно змінюється навіть при несуттєвих змінах у структурі сполуки.

З цією метою ІЧ-спектри реєстрували за допомогою спектроскопа SPECORD 80 M, який автоматично реєструє ІЧ-спектри пропускання в діапазоні хвилі $4000\text{...}400\text{ см}^{-1}$. Взірці готували шляхом пресування подрібнених проб у таблетки з KBr. Математичну обробку спектрів здійснювали за допомогою програми GetData.

Експериментальні дані показали, що значна кількість основних смуг у спектрах різних молекул знаходиться приблизно в одних і тих же спектральних інтервалах і їх можна пов'язати із коливанням основних груп атомів, на які впливають сусідні атоми і зв'язки молекул.

У літературних джерелах є дані про застосування ІЧ-спектроскопії для аналізу волосся людини [37, 130]. У своїх дослідженнях ми використали інфрачервону спектроскопію для підтвердження структури ліофілізованого кератину (рис. 3.11).



Рис. 3.11. Порошок ліофілізованого кератину, екстрагованого з волоса людини.

На рисунку 3.12 зображено ІЧ-спектр ліофілізованого екстракту кератину, на яких видно смуги амід I ($1640\text{--}1660\text{ см}^{-1}$) і амід II ($1520\text{--}1550\text{ см}^{-1}$).

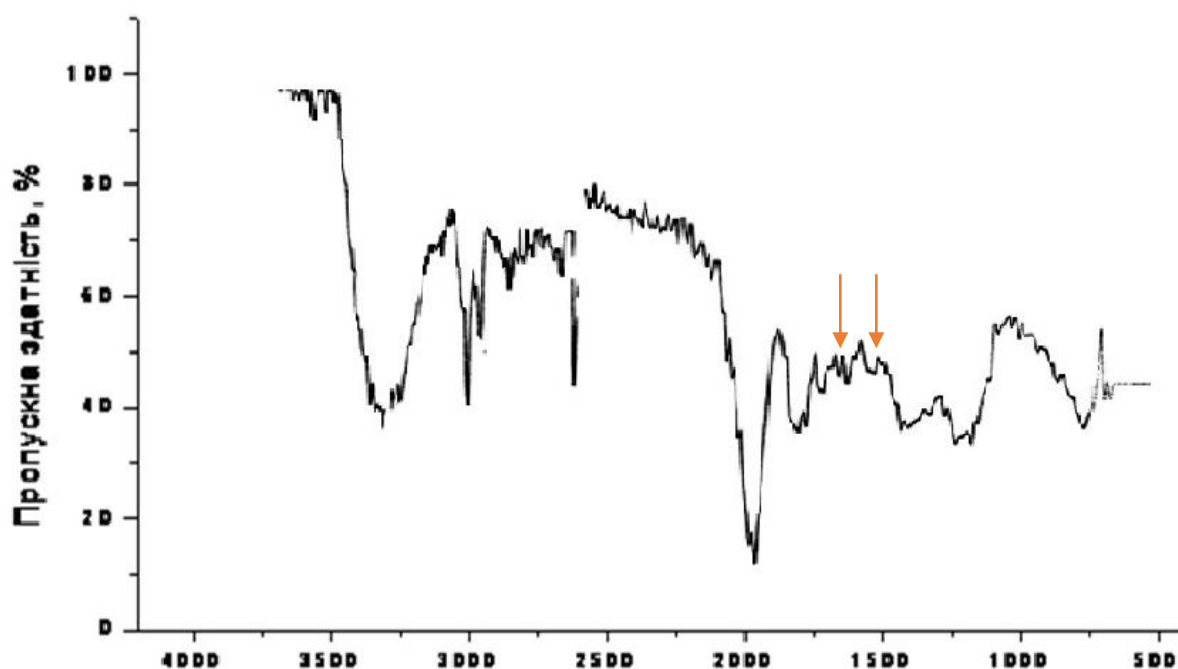


Рис. 3.12. ІЧ-спектри ліофілізованого кератину.

Для аналізу структури протеїну найцікавішими є три смуги в інфрачервоному діапазоні, які відповідають коливальним переходам в пептидному ланцюгу. Це смуги, пов'язані з валентними коливаннями зв'язку N–H (в області близько 3300 см^{-1}), розтягуванням зв'язку C=O ($1640\text{--}1660\text{ см}^{-1}$,

смуга амід І) і деформаційними коливаннями (деформацією) зв'язку N–H ($1520\text{--}1550\text{ см}^{-1}$, смуга амід ІІ) [37].

При формуванні вторинної структури протеїну енергії цих трьох коливань змінюються, в результаті чого фіксують зсуви смуг в ІЧ-спектрі. Перші дві смуги, що відповідають валентним коливанням, зміщуються в область нижчих енергій, оскільки наявність водневого зв'язку полегшує зміщення атома азоту амідної групи і атома кисню карбонільної групи в напрямі акцептора або донора протона відповідно. Смуга амід ІІ зміщується в бік вищих енергій, оскільки водневий зв'язок перешкоджає згинанню зв'язку N–H.

Отже, це свідчить, що застосовані методи м'якої екстракції дозволили отримати відновлений кератин, який за своїми характеристиками відповідає кератину вовняних волокон.

3.2.3. Аналіз термічних властивостей кератину

Стабільність нативного та регеноерованого кератину в тепловому середовищі була проаналізована за допомогою термогравіметричного аналізу, результати якого представлені у вигляді рис. 3.13 – 3.16.

Як видно з рис. 3.13, втрата маси зразка нативного кератину (1) становить 10,96 % і супроводжується появою чіткого ендотермічного ефекту на кривій DTA, який відповідає виділенню гігроскопічної (вільної) та, можливо, молекулярно зв'язаної води. У цьому температурному інтервалі можливе руйнування водневих зв'язків між витками альфа-спіралі. Незначну втрату маси (0,66 %) в інтервалі температур $180\text{--}206\text{ }^{\circ}\text{C}$, яка супроводжується неглибоким ендотермічним ефектом на кривій DTA, можна пояснити протіканням початкових деструкційних процесів у молекулі кератину. Інтенсивна втрата маси в інтервалі температур $206\text{--}276\text{ }^{\circ}\text{C}$ (19,48 %), яка супроводжується чітким ендоефектом на кривій DTA, відповідає денатурації спіралі макромолекули.

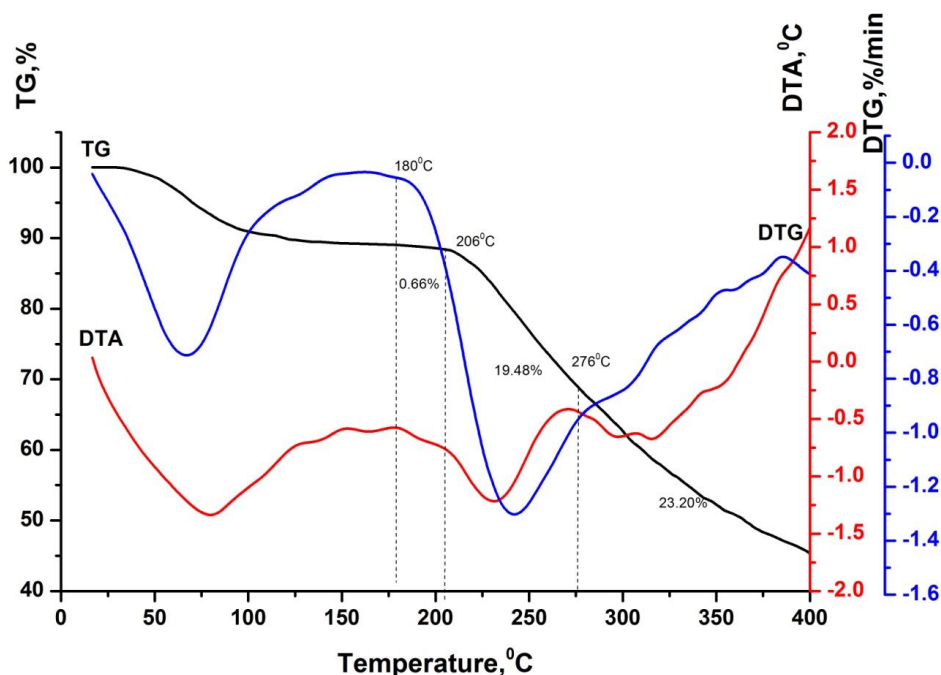


Рис. 3.13. Термограма нативного кератину.

Характерно, що пептидні зв'язки не руйнуються в процесі денатурації, а відбувається порушення зв'язків, які стабілізують вторинну та третинну структуру протеїну. За цих умов α -спіраль розмотується і втрачає свої характерні особливості [31].

В області температур 276–400 °C протікають значно глибші деструкційні процеси в макромолекулі кератину, які завершуються термоокисленням продуктів деструкції. На кривій DTA в цьому температурному інтервалі з'являються неглибокі ендотермічні ефекти, які за вищих температур переходять в екзотермічний ефект.

На рис. 3.14 представлена термограма регенованого кератину. Як видно з графіка, поява неглибоких ендотермічних ефектів на кривій DTA в області температур від 20 до 170 °C не супроводжується втратою маси, що можна пояснити процесами випаровування води. Початкові деструкційні процеси у макромолекулі протеїну починаються в інтервалі температур 170–215 °C, їм відповідає незначна втрата маси (2,23 %) і поява неглибокого ендоефекту на кривій DTA.

Слід зазначити, що початок деструкційних процесів у регенованому кератині у порівнянні з нативним зміщений в область нижчих температур. Очевидно, це пов'язане із структурою саме нативного кератину, який містить окрім протеїнів ІФ також КАП, які характеризуються значно вищим вмістом дисульфідних зв'язків.

Глибокі деструкційні процеси зразка 2, яким відповідає значна втрата маси (14,13 %) та поява глибшого ендотермічного ефекту на кривій ДТА спостерігається в температурному інтервалі 215–282 °С. У порівнянні з нативним кератином, регенований кератин відзначається вищою термічною стійкістю. Цей ефект, очевидно, можна пояснити утворенням нових зв'язків у молекулі кератину, насамперед, представлених Сульфуром, що в кінцевому результаті призводить до формування нової кристалічної фази. Саме збільшення кристалічної фази зумовлює підвищення термічної стійкості регенованого кератину [58].

Варто відзначити, що початок інтенсивної втрати маси регенованого кератину (за температури 215 °С) у порівнянні з нативним (за 206 °С) зміщений в область вищих температур, при цьому він менш інтенсивно втрачає масу (14,13 % проти 19,48 % для нативного кератину). Температура найбільш інтенсивної втрати маси зразка на 3-ій стадії термолізу відповідає 242 °С – екстремум кривої DTG (рис. 3.16).

Максимальна швидкість втрати маси регенованого кератину відповідає температурі 274 °С. Вищу термостабільність регенованого кератину можна пояснити більшою однорідністю структури та вищою часткою кристалічної фази, зумовленої особливостями екстракції.

В інтервалі 282–400 °С протікають значно глибші термоокисні процеси у макромолекулі, що супроводжуються інтенсивною втратою маси (41,49 %) та появою ендотермічного ефекту на кривій ДТА, який за вищої температури перетворюється у екзоефект.

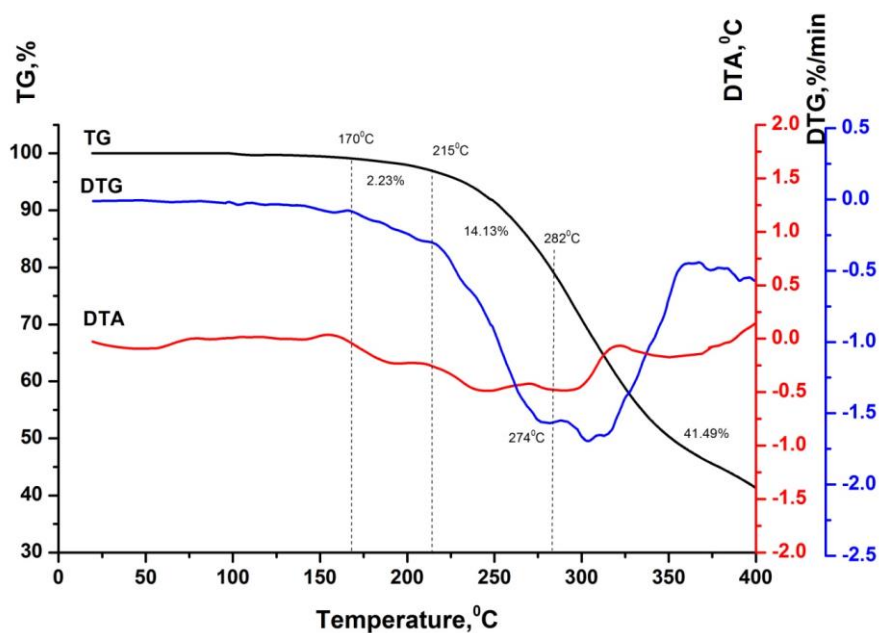


Рис. 3.14. Термограма регенованого кератину.

Слід зауважити, що у цьому температурному інтервалі на 4 стадії термолізу регенований кератин є менш термостабільним, що супроводжується інтенсивною втратою маси і більш стрімким на кривій екстремумом DTG (рис. 3.15. –3.16).

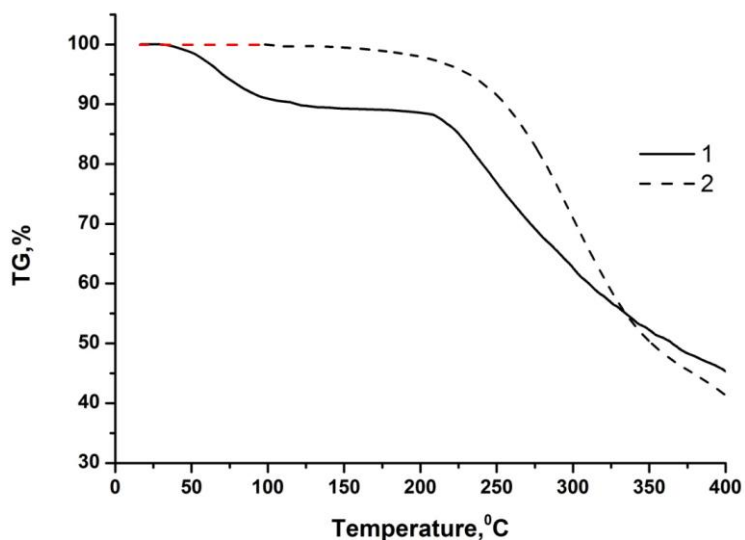


Рис. 3.15. Криві TG. Примітка. 1 – нативний кератин; 2 – регенований кератин.

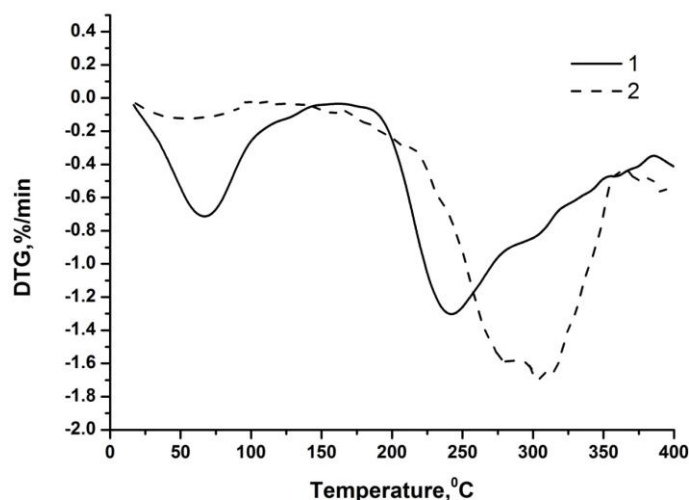


Рис. 3.16. Криві DTG. Примітка. 1 – нативний кератин; 2 – регенерований кератин.

3.3 Дослідження фізико-хімічних властивостей вовняних волокон за впливу обробки протеїновими гідролізатами на основі відновлених кератинів

На сьогодні загально визнано, що за допомогою інноваційних технологій можна надати конкурентних переваг текстильним матеріалам, насамперед за рахунок модифікації вовняної сировини шляхом нанотехнологій, мікрокапсулювання, плазмових та полімерних оброблень. Це особливо актуально у зв'язку із збільшенням попиту на складні функціональні і захисні матеріали для військового одягу, транспорту тощо. Нанотехнології дозволяють фіксувати мікро-і наночастинки на поверхні вовняних волокон, забезпечуючи антимікробний ефект. Розроблені методи, за рахунок яких можна покращити якісні показники вовняної сировини в процесі первинного оброблення з використанням ензимних препаратів, застосуванням аероїонної обробки, ІЧ-випромінювання. Ці методи модифікації вовняної сировини є значно екологічніші та менш затратні у порівнянні з традиційними [1, 4].

Відомо, що серед усіх текстильних волокон вовна є найчутливішою до змін, які виникають внаслідок різноманітних обробок. Саме механічна міцність волокна відіграє важливу роль при формуванні готового текстильного матеріалу. Вовна,

що втратила міцність, погіршує якість готової продукції. Тому актуальним є пошук засобів, обробка якими мала б захисний ефект на структуру вовни. Власне такими засобами, які зберігають міцність волокна і зменшують його обриви в результаті прядіння, є протеїнові гідролізати. Додавання протеїнових гідролізатів при фарбуванні волокон забезпечує рівномірне поглинання барвників [1, 4, 26].

3.3.1 Вплив обробки вовняних волокон 3% розчином відновленого кератину на їх міцність і тонину

Для з'ясування впливу фібрилярної дисперсії у вигляді 3% розчину відновленого кератину на вовняне волокно визначали його міцність на розрив, критерієм якого є розривне навантаження, а також тонину вовни.

Як видно з рис. 3.17, міцність вовняних волокон в результаті їх обробки 3% водним розчином відновленого кератину, мала тенденцію до збільшення порівняно з необробленими волокнами в середньому на 5%.

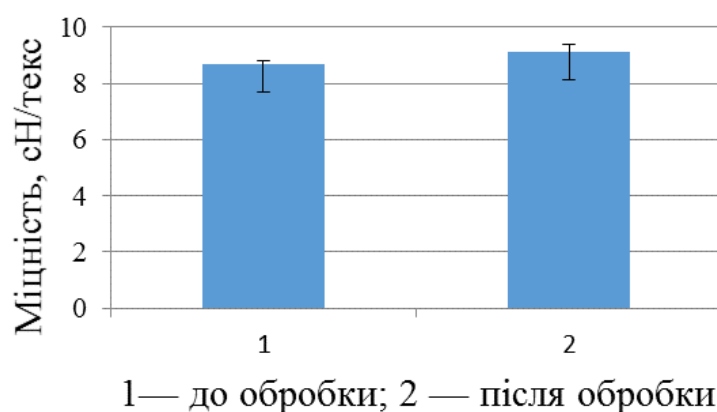


Рис. 3.17. Міцність вовняних волокон до і після обробки 3% розчином відновленого кератину, Сн/текс ($M \pm m$, $n=5$).

Очевидно, що пептиди, які містяться у фібрилярній дисперсії, можуть впливати позитивно на вовняне волокно двома шляхами: за рахунок низькомолекулярних пептидів, які здатні проникати у кортекс волокна, а також

змінювати структуру поверхневого шару вовни, заповнюючи простір між кутикулярними лусочками, або ж створювати покриття дефектів кутикули.

Результати визначення тонини вовняних волокон до і після обробки їх 3% водним розчином відновленого кератину представлені на рис. 3.18.

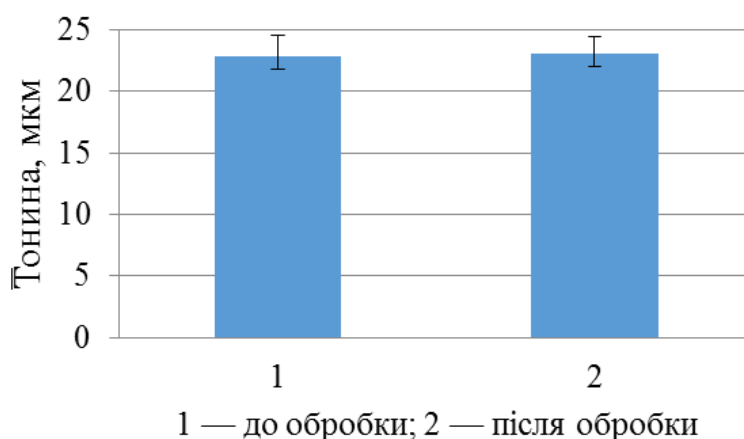


Рис. 3.18. Тонина вовняних волокон до і після обробки 3% розчином відновленого кератину, мкм ($M \pm m$, $n=5$).

Отже, отримані нами результати свідчать, що застосування 3% фібрилярної дисперсії на основі відновленого кератину, для обробки вовни суттєво не впливало на її товщину (22,8 і 23,03 мкм відповідно до і після обробки).

3.3.2 Вплив обробки вовняних волокон розчином відновленого кератину на їх фізико-хімічні параметри

Літературні дані свідчать, що для обробки вовняних волокон можна з успіхом використовувати розчини на основі відновленого кератину [26]. Враховуючи отримані нами результати щодо використання 3% розчину кератину, для функціоналізації поверхні вовну попередньо обробляли за допомогою 6% гідроген пероксиду за температури 37 °C впродовж 1 год. Після цього зразки вовни обробляли розчинами відновленого кератину з концентрацією 3 і 5%. Розчини з ліофілізованого кератину готували на фосфатному буфері (pH 7,4),

оскільки відомо, що саме за такого рН відбувається спонтанне формування полімерного шару на поверхні волокна [22].

У табл. 3.4 представлено результати дослідження структури вовняних волокон після їх попередньої обробки гідроген пероксидом та кератиновмісним розчином.

Таблиця 3.4

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 $\pm$ 2,15	64,95 $\pm$ 2,48*	65,35 $\pm$ 3,91
Бета	13,10 $\pm$ 0,78	11,08 $\pm$ 0,84	12,55 $\pm$ 1,01
Гамма	29,60 $\pm$ 1,93	23,97 $\pm$ 1,67	23,10 $\pm$ 1,70*

Примітка. Позначкою * – статистично вірогідна різниця між інтактним вовняним волокном та волокном, обробленим відновленим кератином.

У результаті проведених досліджень з'ясувалось, що обробка вовняних волокон впродовж 1 год відповідно 3 і 5% розчином кератину призводила до зміни співвідношення протеїнових фракцій – кератоз шляхом збільшення, в основному, альфа-фракції на 11,8 % ($p < 0,05$) та 12,3 %. Характерно, що вміст бета-фракції у модифікованих волокнах порівняно з інтактними практично не змінювався. Що стосується гамма-фракції, то ми спостерігали динаміку до зменшення її кількості, хоча ці результати не були статистично вірогідні. Цілком імовірно, що відновлений кератин, який містить активний цистин у S-сульфонатній формі, сприяє перебудові дисульфідних зв'язків у волокні, і тим самим впливає на його властивості.

Відомо, що про міцність волокна та про зміни його функціональних груп опосередковано можна судити за розчинністю вовни у 0,1 н NaOH та у HCl [3]. Тому в своїх дослідженнях ми використали саме ці маркери стану волокон. Так,

розчинність вовняного волокна у лугах характеризує ступінь гідролізу основних поліпептидних ланцюгів кератину.

У залежності від виду вовни, її якості розчинність коливається в межах 10–15 %. Як з'ясувалось, хімічна обробка поверхні волокон гідроген пероксидом та кератиновими розчинами істотно не впливала на розчинність, що може вказувати на збереженість пептидних зв'язків у вовні (рис. 3.19).

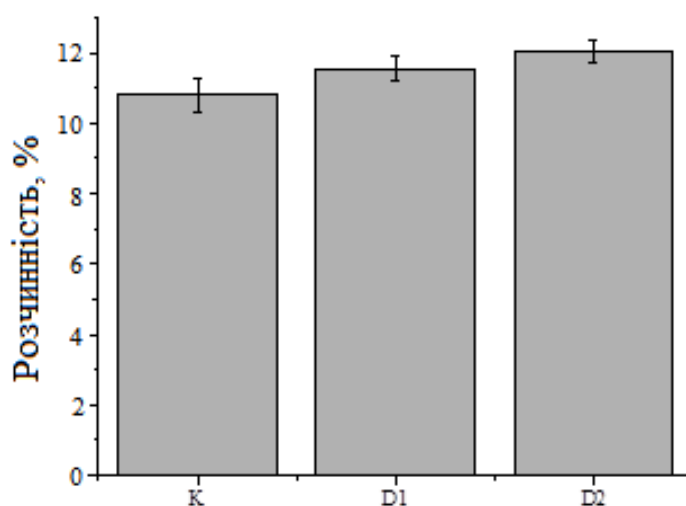


Рис. 3.19. Розчинність вовняних волокон в 0.1 н NaOH після хімічної обробки, ($M \pm m$, $n=5$). Примітка. К – інтактне волокно, D1 – волокно, оброблене 3% розчином кератину, D2 – волокно, оброблене 5% розчином кератину.

Відношення вовняних волокон до дії кислоти вказує на кількість водневих зв'язків у кератині. Як і в попередньому випадку, розчинність вовни у кислоті в залежності від її виду, сорту та якості коливається в межах 15 %.

У результаті проведених досліджень з'ясувалось, що розчинність модифікованої вовни в 4 н HCl є вищою, ніж у лугах і коливається в межах 14 %, проте, не виявлено різниці між досліджуваними волокнами та інтактними щодо цього параметру (рис. 3.20).

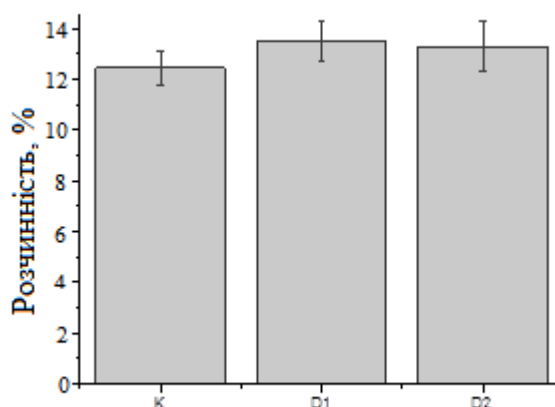


Рис. 3.20. Розчинність вовняних волокон в 4 н НСІ після хімічної обробки, $M \pm m$, $n=5$. Примітка. К – інтактне волокно, D1 – волокно, оброблене 3 % розчином кератину, D2 – волокно, оброблене 5 % розчином кератину.

Отримані результати можуть свідчити про те, що за дії лужної обробки відбувається розрив дисульфідних зв'язків та формування лантїонїнових, при цьому деструкції пептидних зв'язків не спостерігається.

Як видно з результатів, представлених у табл. 3.5, тонина модифікованих вовняних волокон в результаті обробок не змінювалася, а їх міцність збільшувалася відповідно на 17,6 і 10,9 % порівняно до контролю.

Таблиця 3.5.

Фізичні параметри хімічно модифікованих вовняних волокон, %
($M \pm m$, $n=5$)

Параметр	Інтактне волокно	Волокно, оброблене 3% розчином відновленого кератину	Волокно, оброблене 5% розчином відновленого кератину
Тонина, мкм	28,30±3,12	29,25±2,89	29,48±3,05
Міцність, сН/текс	7,92±0,22	9,31±0,44*	8,78±0,14*

Примітка. Позначкою * – статистично вірогідна різниця між інтактним вовняним волокном та волокном, обробленим відновленим кератином ($p < 0,05-0,001$).

Висновки до розділу 3

1. Температурний режим в діапазоні 50–60 °С, значення рН 8,5 та тривалість в межах 48–72 год забезпечують оптимальні умови для екстракції кератинів із вовняних волокон різних типів.

2. За використання для екстрагування кератинів у складі екстракційної суміші етанолу чи метанолу вміст розчиненого протеїну був дуже низьким і не перевищував 0,2 мг/мл екстракту волокна.

3. Застосування відновників 2-меркаптоетанолу та дитіотреїтолу суттєво підвищувало ефективність екстракції кератинів із вовняних волокон, при цьому вміст розчинного протеїну в екстрактах за умов використання дитіотреїтолу був вдвічі більший, ніж при використанні 2-меркаптоетанолу (7,15–7,83 мг/мл проти 3,13–3,85 мг/мл).

4. З'ясовано, що регенований кератин володіє вищою термічною стійкістю, на відміну від нативного кератину, що може бути зумовлено утворенням нових зв'язків у молекулі протеїну, насамперед, представлених Сульфуром, які призводять до формування нової кристалічної фази.

5. Внаслідок обробки вовняних волокон 3% водним розчином відновленого кератину міцність вовняних волокон збільшувалася на 5 % при незмінній тонині.

6. Використання екстракційної суміші, що містила натрію метабісульфіт, додецилсульфат натрію та сечовину забезпечувало в 1,6 разу вищу екстракцію кератинів із волокон порівняно до традиційного методу. Екстракт кератинів містив протеїни, молекулярна маса яких коливалася в межах 40-60 кДа.

7. Обробка 3 і 5% протеїновими розчинами супроводжувалася перерозподілом кератоз у вовняних волокнах у бік збільшення альфа-фракції та зменшення частки матриксних протеїнів.

8. За використання для обробки вовняних волокон 3 і 5 % водного розчину відновленого кератину розчинність вовни в 0,1 н розчині NaOH та 4 н HCl суттєво не змінювалася, а міцність зростала, відповідно, на 17,6 і 10,9 % порівняно до контролю.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

4. Гавриляк, В. В., Стапай, П. В., Смолянінова, О. О., Скорохід, А. В., Михалюк, В. В. Методи модифікації вовняних волокон: метод. рекомендації. Львів; 2018. 16с.

5. 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.

6. Гавриляк, В. В., Михалюк, В. В. (2019). Методи отримання кератинів із волокон природного походження. *Молодь і поступ біології: XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса: збірник тез* (с. 220). Львівський національний університет імені І. Франка.

8. Гавриляк, В., Михалюк, В. (2016). Вплив деяких факторів на ефективність екстракції кератинів вовняних волокон різного типу. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (73), 47-50.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

82. 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.

83. Havryliak, V., Mykhaliuk, V. (2019). The efficiency of keratin extraction from human hair by sulfitolysis. *9th International youth science forum "Litteris et Artibus" & 14th 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>

131. 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.

132. 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.

133. 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.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ БІОСОРБЕНТОМ НА ОСНОВІ КЕРАТИНУ

4.1. Адсорбційні властивості екстрагованого кератину

Сорбенти – це субстанції, що мають здатність до елімінації поллютантів за допомогою абсорбції, адсорбції або їх поєднанням [97]. Існує багато методів для очищення води: зворотній осмос, озонування, екстракція, преципітація, аеробне та фотокаталітичне деградування, адсорбція [24, 29, 102, 106, 146]. Адсорбційний метод, на відміну від інших методів, є економічно вигідним, екологічним та ефективним для елімінації поллютантів у низькій концентрації [45, 202, 212].

Адсорбція – це процес, що включає в себе переміщення іонів між двома фазами: з рідкої фази (водні розчини ацетату свинцю та нітрату кадмію) до поверхні твердої фази (кератинового порошка). Між адсорбатом, субстанцією, що підлягає адсорбції, та твердою фазою, тобто адсорбентом, існує фізичний (фізична адсорбція) або хімічний зв'язок (хімічна адсорбція). Цей зв'язок залежить від їх складу та природи. За відповідних умов, що залежать від температури та значення рН, хімічна та фізична адсорбція можуть відбуватися одночасно [163].

Відомо, що кератини здатні до елімінації поллютантів за допомогою як фізичної, так і хімічної адсорбції. Фізична адсорбція полягає у зв'язуванні іонів металів поверхнею кератину або порами, в той час як хімічна адсорбція полягає у здатності функціональних груп утворювати міцні зв'язки з іонами металів [163]. Для нас особливе зацікавлення становила саме хімічна адсорбція за різного значення рН.

4.1.1. Елімінація іонів Pb (II) кератиновмісними адсорбентами

Плюмбум є одним з чотирьох основних металів, які створюють певні ризики для здоров'я людини. Цей важкий метал генерується в навколишнє середовище головним чином, в результаті промислової діяльності людини [32]. Тому актуальним завданням є пошук сорбентів, які мали б здатність зв'язувати іони важких металів із водних розчинів та застосування яких було б економічно вигідним.

Літературні дані свідчать, що багато речовин природного походження мають властивості сорбентів [24, 36, 45]. Такі властивості, зумовлені особливостями будови, притаманні також і вовні. Окрім того, модифікація вовняних волокон за рахунок хімічної обробки може суттєво збільшити її сорбційну ємність [4].

Тому, біоматеріали на основі кератину були використані нами, як сорбент для видалення свинцю з водних розчинів. Адсорбційна ємність Pb (II) кератиновмісними біосорбентами визначалася при рН в діапазоні від 5 до 7.

У результаті проведеної роботи з'ясувалось, що хімічно модифікований кератин характеризується суттєво вищою адсорбційною здатністю щодо іонів Плюмбуму порівняно з нативним кератином (рис. 4.1).

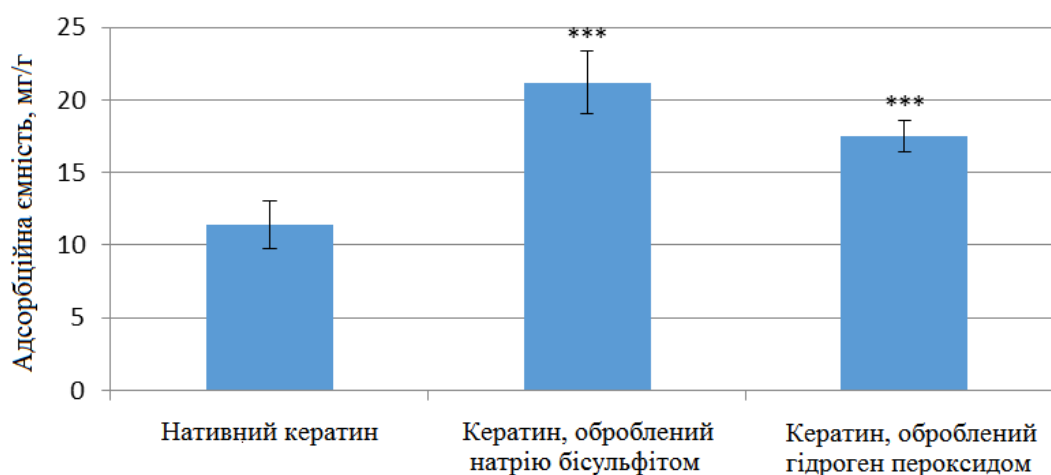


Рис. 4.1. Адсорбційна ємність кератину щодо іонів Плюмбуму (рН 5,0), мг/г, $M \pm m$, $n=5$. Примітка. Позначкою *** – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

Кератин, оброблений натрію бісульфітом, вдвічі краще сорбував іони Pb^{2+} із водного розчину порівняно з нативним кератином. При обробці кератину гідроген пероксидом його адсорбційна ємність щодо іонів Pb^{2+} збільшувалася порівняно з нативним на 68 %, проте була меншою, ніж за використання кератину, обробленого натрію бісульфітом.

При підвищенні рН водного розчину солі Плюмбуму до 6,0 адсорбційна ємність кератину зростала і коливалася в діапазоні від 14,4 до 26,5 мг/г (рис. 4. 2). Характерно, що за цих умов адсорбційна ємність функціоналізованого кератину була вищою відповідно на 63 і 52 %.

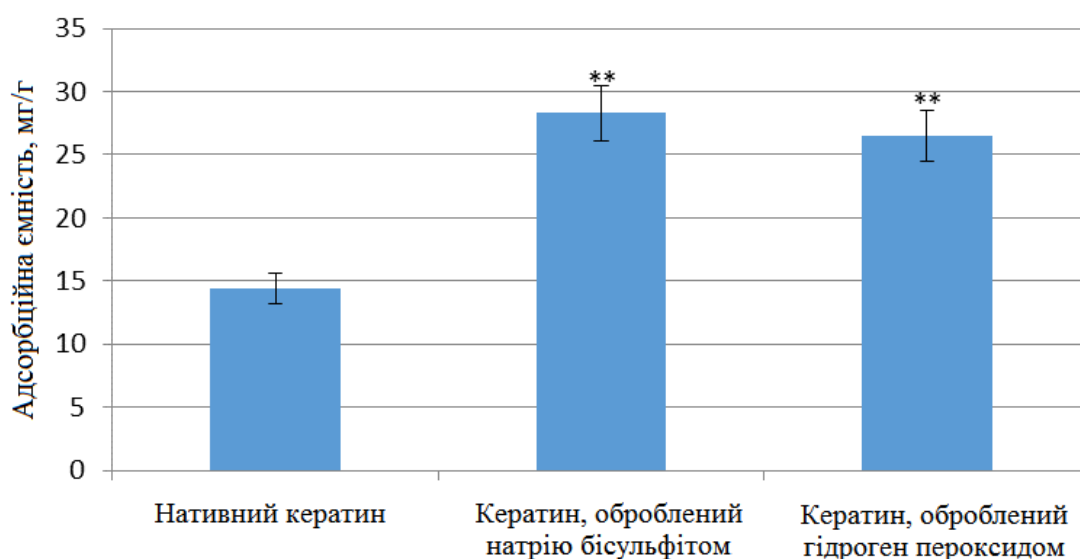


Рис. 4.2. Адсорбційна ємність кератину щодо іонів Плюмбуму (рН 6,0), мг/г, $M \pm m$, $n=5$. Примітка. Позначкою ** – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

Варто зазначити, що кількісно адсорбційна ємність кератину за цих умов була нижчою, ніж при рН 6,0, проте перевищувала значення при рН 5,0. Такі зміни можуть бути пов'язані із тим, що афінність обох видів хімічно обробленого кератину є більшою для вільних іонів металу у розчині, що можна пояснити сильнішою взаємодією функціональних груп протейну з цими іонами. У результаті проведених досліджень з'ясувалось, що ефективність адсорбції нативного кератину для іонів Плюмбуму була низькою і практично не перевищувала 30 %. Хімічна модифікація кератину супроводжувалася суттєвим збільшенням

ефективності адсорбції цих важких металів із їх розчинів. Слід відзначити, що на процеси адсорбції істотний вплив має також рН. Подібна закономірність спостерігалася і при рН 7,0 (рис. 4.3).

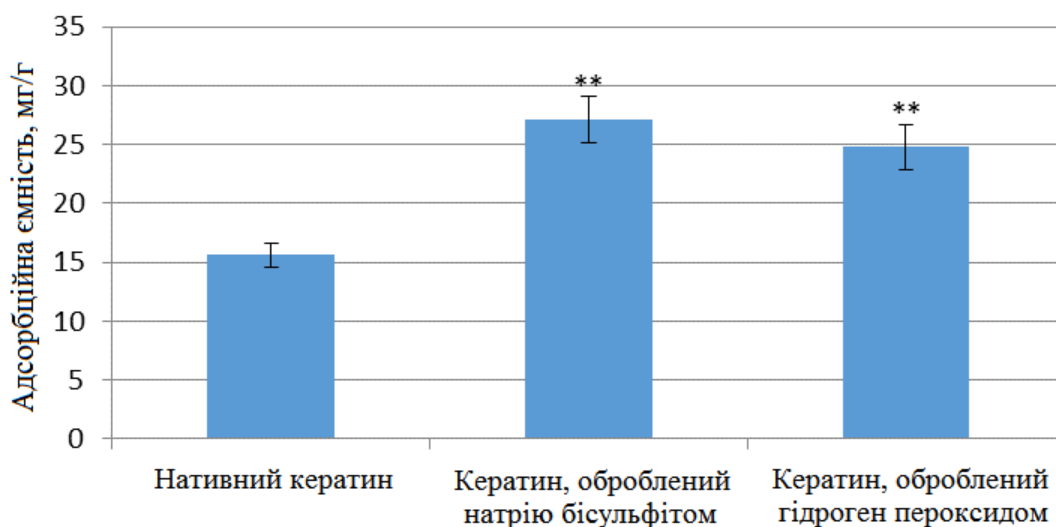


Рис. 4.3. Адсорбційна ємність кератину щодо іонів Плюмбуму (рН 7,0), мг/г, $M \pm m$, $n=5$. Примітка. Позначкою ** – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

Як свідчать експериментальні дані (табл. 4.1), найвища ефективність адсорбції для іонів Pb^{2+} зафіксована для кератину, обробленого натрію бісульфітом при рН 6,0 (68,7 %).

Таблиця 4.1

Ефективність адсорбції іонів Pb^{2+} хімічно модифікованим кератином, %
($M \pm m$, $n=5$)

рН водного розчину	Кератин		
	нативний	оброблений натрію бісульфітом	оброблений гідроген пероксидом
5,0	24,3±1,34	58,2±3,41***	50,4±3,57***
6,0	28,1±2,03	68,7±3,89***	53,3±4,61**
7,0	26,7±1,98	63,4±5,23***	48,9±3,45***

Примітка. Позначками *, **, *** ($p < 0,05 - 0,001$) – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

За цих умов, кератин, оброблений 10% розчином гідроген пероксиду, меншою мірою зв'язував із розчину іони Pb^{2+} (53,3 %), проте ці результати значно вищі порівняно до контролю (нативний кератин). Подібна закономірність спостерігалася і при дослідженні адсорбції Плюмбуму біосорбентом на основі кератину при рН 5,0 та 7,0. При рН 5,0 ефективність адсорбції цього металу хімічно модифікованим кератином була в 3,6 та 3,1 рази вищою, ніж у нативного кератину, тоді як при рН 7,0 ці зміни були на рівні 3,1 та 2,7 відповідно для обробленого бісульфітом та гідроген пероксидом кератину.

Кращі сорбційні властивості бісульфіт-модифікованого кератину можна пояснити утворенням тіолових та сульфонатних груп [176]. Деякі дослідники вважають, що серед різних функціональних груп атоми Сульфуру найкраще зв'язують іони важких металів [57]. Водночас, нижча сорбційна здатність кератину, обробленого гідроген пероксидом є очевидною через продукти окиснення цистину у вигляді цистеїнової кислоти, оксиду цистину, діоксиду цистину, що утворюють менш реакційноздатні групи [220]. Відомо, що існує конкуренція у адсорбції іонів H^+ з іонами металів, тому адсорбційна здатність при низькому рН порівняно мала [88].

4.1.2. Елімінація іонів Cd (II) кератиновмісними адсорбентами

Кадмій відноситься до токсичних ультрамікроелементів і є одним із політантив навколишнього середовища. Його негативна дія на живі організми проявляється у дуже низьких концентраціях. Тому очищення води від цього хімічного елемента має важливе практичне значення. Як показали результати, адсорбційна здатність іонів Cd (II) хімічно необробленим кератином досить низька. Після хімічної обробки натрію бісульфітом та гідроген пероксидом адсорбційна здатність біосорбенту збільшується та значно залежить від рН розчину. Як відомо, оптимальне значення рН для адсорбції іонів Cu (I) та Cd (II) знаходиться в межах 6,0–7,0 [134].

Як видно з рис. 4.4, при рН водного розчину 5,0 адсорбційна ємність хімічно модифікованого кератину порівняно з нативним кератином збільшувалася у 1,8 та 1,4 разу відповідно ($p < 0,001$).

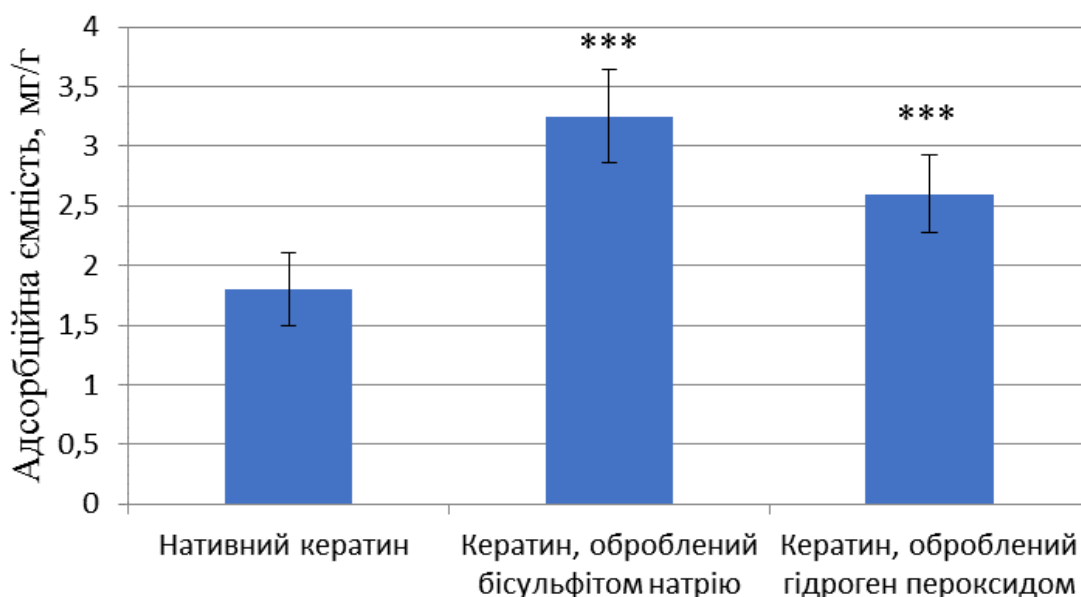


Рис. 4.4. Адсорбційна ємність кератину щодо іонів Кадмію (рН 5,0), мг/г, $M \pm m$, $n=5$. Примітка. Позначкою *** – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

Як засвідчили отримані результати, при збільшенні рН до 6,0 ємність хімічно модифікованих біосорбентів підвищувалася у 2 і 1,9 разу ($p < 0,001$). Характерно, що і як у випадку із іонами Плюмбуму, модифікований гідроген перексидом кератин гірше зв'язував іони Кадмію, ніж оброблений бісульфітом (рис. 4.5).

Цілком імовірно, що із збільшенням рН до 6,0 основні форми хімічних функціональних груп на поверхні кератину домінують, збільшуючи поверхневий негативний заряд. Саме тому збільшується біосорбція металу.

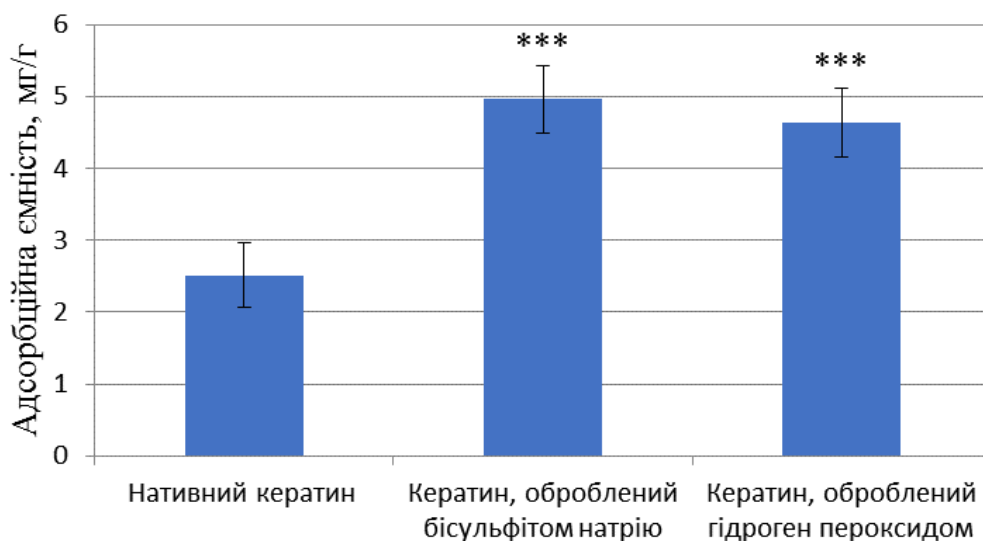


Рис. 4.5. Адсорбційна ємність кератину щодо іонів Кадмію (рН 6,0), мг/г, $M \pm m$, $n=5$. Примітка. Позначкою *** – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

Як свідчать результати досліджень, представлені на рис. 4.6, адсорбційна ємність біосорбентів при зміні рН водного розчину солі Кадмію до 7,0, не перевищувала результатів, отриманих за рН 6,0, проте біосорбція була істотно ефективнішою, ніж при рН 5,0.

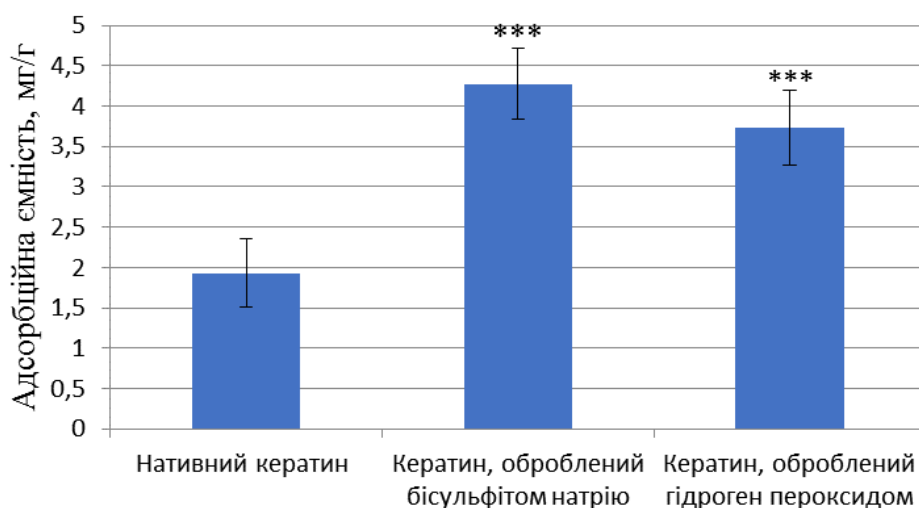


Рис. 4.6. Адсорбційна ємність кератину щодо іонів Кадмію (рН 7,0), мг/г, $M \pm m$, $n=5$. Примітка. Позначкою *** – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

Як і у всіх попередніх варіантах, нативний кератин характеризувався значно гіршими сорбційними властивостями порівняно із модифікованим.

Ефективність адсорбції Cd^{2+} біосорбентом на основі нативного кератину у діапазоні рН 5,0 – 7,0 коливалася від 12,8 до 17,5 % (табл. 4.2). Із зміною рН до 6,0 ефективність адсорбції збільшувалася відповідно до 28,2 % для кератину, обробленого гідроген пероксидом, і 38,5 % – для хімічно модифікованого кератину бісульфітом натрію. Подібна закономірність спостерігалася і при зміні рН до 7,0.

Таблиця 4.2

Ефективність адсорбції іонів Cd^{2+} хімічно модифікованим кератином, %
($M \pm m$, n=5)

рН водного розчину	Кератин		
	нативний	оброблений бісульфітом натрію	оброблений гідроген пероксидом
5,0	12,8 $\pm$ 0,68	34,2 $\pm$ 3,45***	21,3 $\pm$ 2,17**
6,0	17,5 $\pm$ 1,25	38,5 $\pm$ 3,67***	28,2 $\pm$ 2,56**
7,0	16,0 $\pm$ 2,00	34,9 $\pm$ 2,89***	25,6 $\pm$ 3,08*

Примітка. Позначкою *, **, *** ($p < 0,05$ – $0,001$) – статистично вірогідні різниці між нативним та хімічно модифікованим кератином.

Отже, максимальна ефективність адсорбції і для іонів Кадмію, і для іонів Плюмбуму спостерігалася при використанні біосорбенту на основі кератину, обробленого бісульфітом натрію. Відмінності у сорбційних властивостях модифікованого кератину, очевидно, можна пояснити конкуренцією між протонами та іонами металів за сайти зв'язування у молекулі протеїну [88]. На загал, спорідненість кератину до іонів Плюмбуму була вищою, ніж до іонів Кадмію, що зумовлене міцнішими взаємодіями між функціональними групами та іонами металу. З іншого боку, більшу адсорбцію Рb (II) можна пояснити його стабільністю та міцнішими електростатичними взаємодіями між Рb (II) та реактивними сайтами хімічно обробленого кератину. Іони Плюмбуму формують

міцний зв'язок з групами, що містять атоми Сульфуру та Нітрогену, а саме: CN -, R-S-, -SH-, NH₂ -, тоді як іони Кадмію можуть утворювати стабільні зв'язки в основному лише SO₃²⁻, O²⁻- лігандами [204].

Висновки до розділу 4

1. Адсорбційна ємність хімічно модифікованого кератину для іонів Плюмбуму та Кадмію є суттєво вищою, порівняно з нативним кератином.

2. На ефективність адсорбції важких металів біосорбентом на основі кератину суттєво впливає рН водних розчинів. Максимальна ефективність адсорбції спостерігалася при рН 6,0 як для іонів Кадмію, так і для іонів Плюмбуму.

3. Кращі сорбційні властивості щодо іонів Кадмію та Плюмбуму виявлені для кератину, обробленого натрію бісульфітом.

4. За однакових умов модельних дослідів ефективність адсорбції іонів Плюмбуму біосорбентами на основі кератину є істотно вищою, ніж для іонів Кадмію.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

84. Havryliak, V., **Mykhaliuk, V.**, Petrina, R., Fedorova, O., Lubenets, V., Novikov, V. (2019). Adsorbents based on keratin for the heavy metals removal. *The 5th International conference on biotechnology, environment and engineering sciences: proceeding* (p. 36.).

85. 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.

РОЗДІЛ 5

СТВОРЕННЯ ПЛІВКОВИХ МОДЕЛЕЙ НА ОСНОВІ РЕГЕНЕРОВАНОГО КЕРАТИНУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ХАРАКТЕРИСТИК

5.1. Плівки на основі кератинів

Кератини, екстраговані з вовни та волоса людини, у водних розчинах мають здатність до самозбирання, утворюючи плівки [16, 51, 68, 125, 186], що багато років використовуються для дослідження структури та функцій самоорганізованих кератинів. Такий тип біоматеріалів на основі кератинів успішно застосовують в тканинній інженерії, оскільки вони мають здатність підтримувати та покращувати ріст клітин, їх адгезію, міграцію та проліферацію, а також для контрольованої доставки лікарських засобів [68, 171].

Плівки, виготовлені лише з кератину, є дуже крихкими та ламкими. Для вирішення цієї проблеми у літературі описано чимало способів [188, 191, 205, 215, 216]. У своїх експериментах, для надання плівкам еластичності ми використовували гліцерол. Окрім того, гліцерол піддається вимиванню з плівки за допомогою водних розчинів у випадку такої потреби [122, 171]. Дія гліцеролу проявляється у зменшенні внутрішньо молекулярних та міжмолекулярних сил, що покращує гнучкість полімеру. Згідно з дослідженнями впливу різної концентрації гліцеролу на фізичні властивості кератинових плівок, встановлено, що застосування цього пластифікатора у кількості 0,09 г/г збільшує міцність плівки на розрив приблизно в 15 разів, а також здійснює найбільший вплив на збереження вологи [122, 171]. Проте, у зв'язку із гідрофільністю гліцеролу, плівки такого типу здатні до розчинення у водних розчинах. Тому, у випадках, коли застосування плівок передбачає їх контакт з рідинами організму, гліцерол є не найкращим кандидатом. Також, слід мати на увазі, що вміст гліцеролу у плівці

більше, ніж 5 % від її маси надає їй липкої консистенції, що перешкоджатиме формуванню гомогенної структури [122, 171].

Тому, у своїх дослідженнях для отримання плівок ми використовували 4% кератиновий екстракт, отриманий з волоса людини та 1% розчин гліцеролу. Солюбілізацію протеїнів проводили у суміші, що містила ДТТ. Екстракцію протеїнів проводили за температура 60 °C при рН 8,5 протягом 72 год, оскільки нами встановлено, що такі умови є оптимальними для солюбілізації кератинів.

На рис. 5.1 зображено кератинові плівки після їх інкубації в термостаті при температурі 37 °C та фіксації у водяній парі.

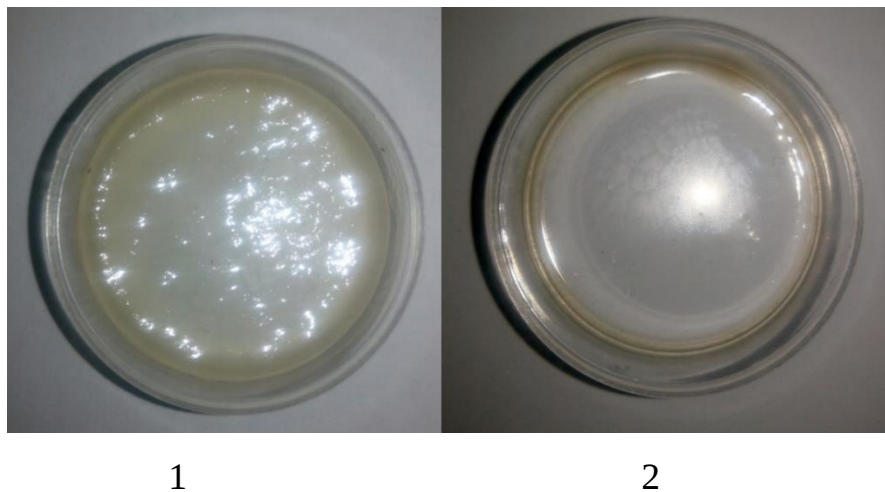


Рис. 5.1. Плівка на основі 4% розчину кератину та 1% розчину гліцеролу (1), плівка без додавання гліцеролу (2).

Як видно з рис. 5.1, плівка на основі кератину та гліцеролу (1) після стабілізації у водяній парі набувала гелеподібної консистенції, що пояснюється властивістю гліцеролу до акумуляції вологи, про що було згадано вище. У той час, плівка, виготовлена лише з водного розчину кератину (2) була представлена тонким полімерним шаром, що легко розривався при намаганні відділити її від чашки Петрі, що не було властивим для кератин-гліцеролової плівки. Це підтверджує факт, що гліцерол покращує її механічні властивості.

5.2. Дослідження поверхні плівок

На рис. 5.2 за допомогою сканувальної електронної мікроскопії зображено поверхню плівки, виготовленої за поєднання 4% водного розчину кератину 1% розчину гліцеролу. Як ми бачимо, поверхня плівки в основному гомогенна, без порожнин та отворів, з невеликою кількістю вбудованих гранул різної форми. Наявність поодиноких тріщини, як видно з рис. 5.2 (2-3), може бути зумовлена великою кількістю міжмолекулярних зв'язків [157].

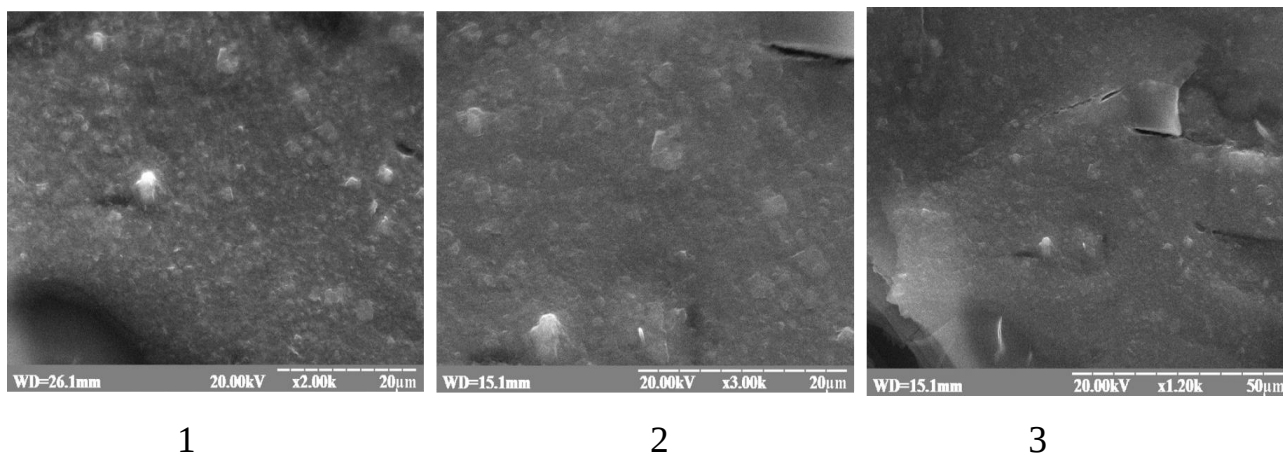


Рис. 5.2. Електронно-мікроскопічні зображення плівки, виготовленої з 4% розчину кератину та 1% розчину гліцеролу; $\times 300$. Примітка. 1–3 – ділянки плівки.

Дещо інше зображення ми отримали при дослідженні поверхні плівки, виготовленої лише з водного розчину кератину. Як видно на рис. 5.3, поверхня такої плівки не така гомогенна, з великою кількістю заглибин та виступів.

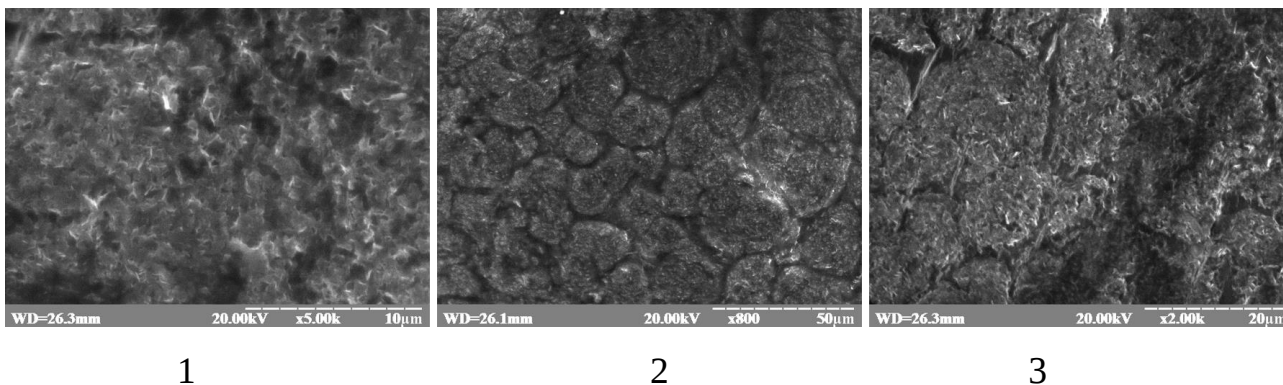


Рис. 5.3. Електронно-мікроскопічні зображення плівки, виготовленої з 4% розчину кератину; $\times 300$. Примітка. 1–3 ділянки плівки.

5.3. Рентгенівський мікроаналіз плівки, виготовленої на основі екстрагованих протеїнів

Якісний аналіз плівки виявив такі елементи, як Натрій, Силіцій, Сульфур, Калій. Як видно з рис. 5.4. – 5.5., серед досліджуваних елементів найбільша частка припадає на Сульфур, вміст якого перевищує 10 %, значно менша — на решту елементів.

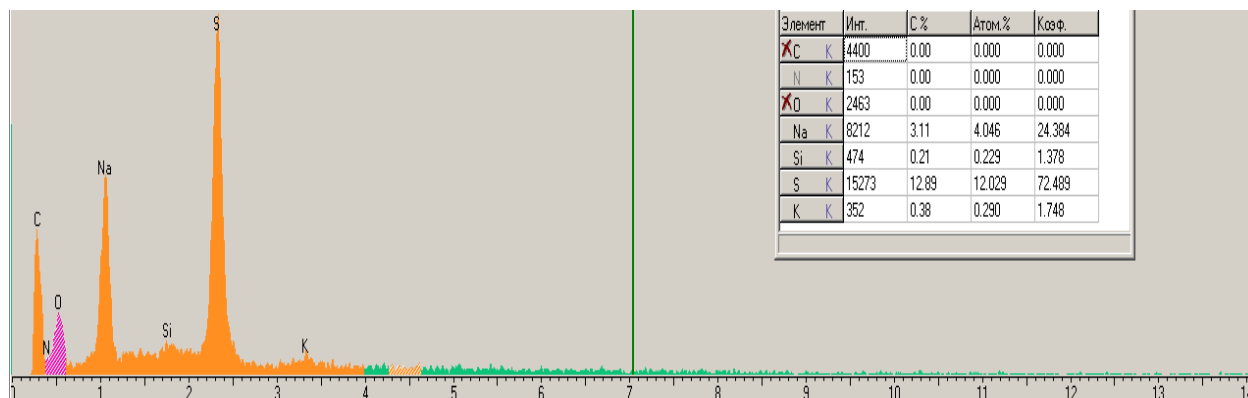


Рис. 5.4. Спектри рентгенівського мікроаналізу плівки, виготовленої з 4 % розчину кератину та 1 % розчину гліцеролу.

Високий вміст Сульфуру зумовлений наявністю великої кількості дисульфідних зв'язків у молекулі кератину, в основному за рахунок цистеїнових залишків.

Окрім Сульфуру, іншим важливим елементом є Силіцій, вміст якого становить 0,21 %. Саме Силіцій надає твердості кератинізованим тканинам та сприяє їх високій хімічній резистентності.

У спектрі рентгенівського мікроаналізу плівки, виготовленої лише з розчину кератину (рис. 5.5), не виявлено Силіцію, або його вміст був менший, від межі чутливості приладу. Ймовірно, це пов'язано з неоднорідною структурою плівки.

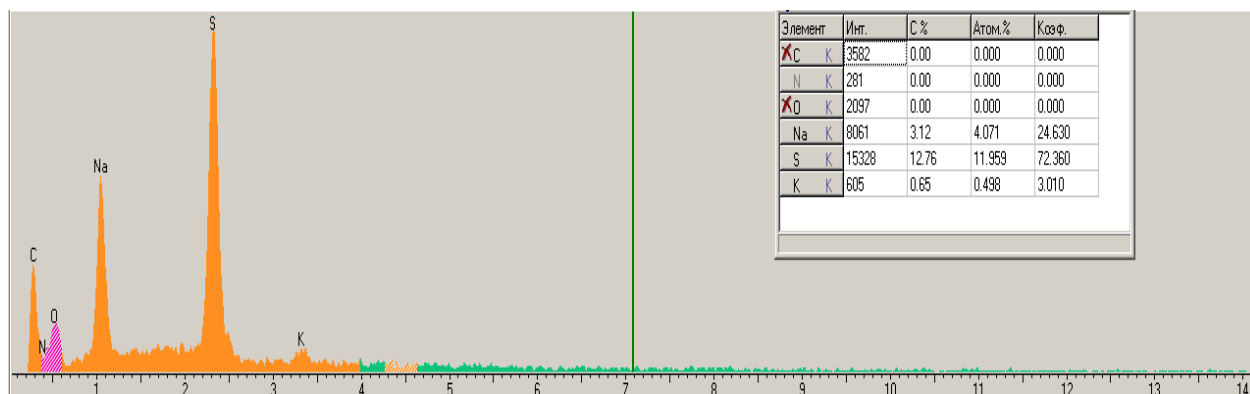


Рис. 5.5. Спектри рентгенівського мікроаналізу плівки, виготовленої з 4 % розчину кератину.

Порівнюючи рентгенівські спектри обох типів кератинових плівок інших суттєвих відмінностей у елементному складі не виявлено.

5.4. Дослідження біосумісності кератинових плівок

Аналіз адсорбції протеїнів є невід'ємною частиною дослідження біосумісності матеріалу. Оскільки, імплантований матеріал в організмі в першу чергу контактує з кров'ю, нашим завданням було перевірити здатність плівок на основі екстрагованих кератинів до утворення зв'язків з протеїнами сироватки крові.

Загальновідомо, що сироватковий альбумін кількісно переважає вміст усіх інших протеїнів крові людини. Встановлено, що адсорбція альбуміну на поверхні гальмує утворення тромбу, а фібриноген, навпаки, бере участь у згортанні крові, сприяє адгезії та агрегації тромбоцитів і відіграє важливу роль у процесах гемостазу та тромбозу. Тому посилення адгезії альбуміну проти фібриногену є надзвичайно бажаним для успішної функціоналізації біосумісних покриттів.

З іншого боку, відомо, що коефіцієнти адсорбції альбуміну та фібриногену суттєво пов'язані з характером покриття, оскільки фібриноген, будучи найбільш гідрофобним, переважно адсорбується на гідрофобних поверхнях, а альбумін, який за своєю природою є гідрофільним, на гідрофільних поверхнях під час конкурентного зв'язування [147].

На рис. 5.6 продемонстровано результати електрофоретичного розділення протеїнів, адсорбованих кератиноюю плівкою та десорбованих з її поверхні за допомогою додецилсульфату натрію.

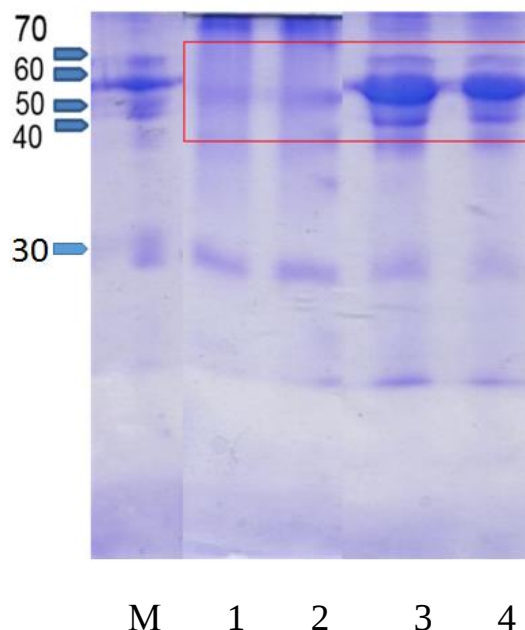


Рис. 5.6. Електрофореграма протеїнів контактної сироватки, адсорбованих плівкою, створеною на основі кератинів і десорбованих протеїнів з її поверхні. Примітка. М – маркер молекулярних мас, 1 – протеїни, десорбовані з плівки після 5 хв інкубації; 2 – протеїни, десорбовані з плівки після 15 хв інкубації; 3 – адсорбовані плівкою протеїни після 5 хв інкубації; 4 – адсорбовані плівкою протеїни після 15 хв інкубації.

Як видно з електрофореграми, плівка на основі кератину здатна поглинати досить велику кількість альбуміну, про що свідчать інтенсивні смуги в діапазоні молекулярної маси 60 кДа, як після 5, так і після 15 хв інкубації у сироватці крові людини. Наявні у зразку смуги в діапазоні 60–70 кДа можуть відповідати молекулярній масі гемоглобіну.

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 у контактної сироватки. Ці результати

підтверджують, що плівки на основі кератину найбільше адсорбували альбумін сироватки крові.

Висновки до розділу 5

1. Плівки, виготовлені на основі 4% розчину кератину та 1% розчину гліцеролу були еластичнішими, ніж плівки без додавання гліцеролу. Гліцерол у складі кератинової плівки забезпечує її більш гладку, гомогенну структуру, в той час як поверхня плівки, виготовленої лише з водного розчину кератину, була більш рельєфною, містила численні заглибини та виступи.

2. Спектри рентгенівського мікроаналізу обох типів плівок показали наявність великої кількості Сульфуру, що характерно для кератинів. Вміст інших хімічних елементів суттєво не відрізнявся.

3. Результати електрофоретичного аналізу свідчать, що плівки на основі кератинів як після 5, так і після 15 хв інкубації у сироватці крові людини активно адсорбували протеїни сироватки в діапазоні молекулярної маси, що відповідає альбуміну.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Аналіз літературних даних свідчить про значну зацікавленість науковців природою кератинів та біоматеріалами, створеними на їх основі [26, 30, 54, 68]. Здебільшого, це пов'язано з унікальною біохімією цих полімерів та широким спектром можливостей їх застосування. Кератини відрізняються від інших синтетичних полімерів складною ієрархічною будовою, м'якими умовами синтезу, здатністю до гідратації, мультифункціональністю, здатністю до самозбирання у складні тривимірні структури, наявністю простих елементів, що робить матеріали на основі кератинів біосумісними та біодеградабельними [163].

Загалом, головною перевагою кератизованих волокон є наявність у структурі кератину багатьох функціональних груп – карбоксильних, гідроксильних, амідних, тіолових/дисульфідних, тоді як синтетичні волокна, як правило, монофункціональні, що значно обмежує можливості для їх модифікації [102, 142]. Окрім цього, кератини – це постійне поновлювальне джерело полімерів, що можуть стати заміною продуктам переробки нафти і сприяти сталому розвитку, а разом, вирішенню багатьох екологічних та економічних проблем. Оскільки, природні ресурси все швидше вичерпуються, існує нагальна необхідність у переорієнтації промисловості на більш екологічне та раціональне природокористування [163].

Серед інших природних біополімерів, протеїни є одними з найкращих кандидатів для створення біоматеріалів функціонального призначення [68]. У першу чергу це пояснюється наявністю багатьох типів зв'язків у молекулі за рахунок присутності різних амінокислот. Тому, на сьогодні досліджено багато протеїнів і показано можливості їх застосування в різних сферах біомедицини та біоінженерії, наприклад: кератин, колаген, альбумін, желатин, фіброїн [102, 142]. Проте, серед перерахованого ряду біополімерів, кератини є найбільш

поширеними в природі. Вони входять до складу рогів, копит, кігтів, нігтів, пір'я, волосся, шерсті [171].

Аналіз літературних джерел свідчить, що на сьогодні перспективи дослідження кератинів стосуються кількох основних напрямів. Перший пов'язаний із дослідженнями методів їх солюбілізації [21, 66, 171].

Другий напрям стосується біо- та нанотехнологій з можливістю застосування у фармацевтиці та біомедицині [68, 100], для елімінації іонів важких металів [27, 72, 101], виробництва плівок, нановолокон [38, 51, 125, 186, 210] та гідрогелів [140, 155, 219] для біоінженерії, а також для виробництва «інтелектуального» текстилю [156, 203]. Третій полягає у можливості ідентифікації особи за протеїновим складом волосся, що особливо важливо для судово-медичної експертизи та антропологічних досліджень [143].

Першим етапом на шляху до створення біоматеріалів на основі кератинів є їх екстракція. Вона ускладнюється наявністю великої кількості внутрішньо молекулярних та міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Важливим завданням на цьому етапі є збереження нативних властивостей кератинів, на що впливає низка чинників (температура, значення рН, тривалість екстракції, вибір відновника та ін.), тому необхідною є цілеспрямована солюбілізація шляхом розриву міжмолекулярних дисульфідних зв'язків зі збереженням ковалентних зв'язків поліпептидного ланцюга.

Одним з найпоширеніших методів екстракції кератинів є відновлення, окиснення, сульфітоліз та лужна екстракція [21, 171, 192, 223, 222]. Лужна екстракція потребує значних концентрацій лугів для гідролізу та кислот для нейтралізації. Цистеїн є дуже чутливим до присутності лугів, тому він швидко розкладається з утворенням щавлевої та піровиноградної кислот [171]. Як відомо, в результаті лужного гідролізу вовни вторинна структура кератину залишається інтактною, а в супернатанті спостерігається мала кількість цистеїнових залишків [192]. Варто зазначити, що використання лугів в процесі екстракції має значний негативний вплив на вміст амінокислот у гідролізатах, тому в результаті такої солюбілізації утворюється мала кількість відновленого протеїну [171].

Відновний метод екстракції кератину передбачає застосування відновників, в якості яких використовують різні тіольні сполуки, наприклад меркаптоетанол, що руйнують цистинові дисульфідні зв'язки з утворенням цистеїну [171].

У процесі сульфїтолізу для екстракції кератинів використовують натрій сульфід. У результаті такого типу солюбілізації окрім цистеїну утворюються цистеїн-сульфонати [171].

Як відновний метод, так і сульфїтоліз передбачають застосування в складі екстракційної суміші сечовини у високій концентрації для денатурації протеїнів, що можуть змінювати фізико-хімічні властивості кератину.

Для окиснення кератину найчастіше використовують надкислоти: надоцтову та надмурашину кислоти, що призводить до утворення сульфонових кислот [44, 65]. Кератози, які утворюються в результаті такого методу солюбілізації, менш придатні для виробництва біоматеріалів, у зв'язку з певними структурними змінами в молекулі. Тому, для нанотехнологій найчастіше використовують кератеїни, які можна отримати відновлювальними методами. Перевагою кератеїнів у порівнянні з кератозами є те, що їх структура більш подібна до структури нативного кератину [171].

З огляду на велику кількість запропонованих у літературних джерелах методів солюбілізації кератину, першочерговим завданням дисертаційного дослідження була оптимізація процесу екстракції кератинів з вовняних волокон різного типу та волоса людини. Для екстракції кератинів з вовни та волоса ми використовували сульфїтоліз та окисно-відновні методи, при цьому змінювали умови екстракції протеїнів: значення рН, температуру, тривалість солюбілізації та тип відновника.

Як відомо, оптимальне значення рН для екстракції кератинів знаходиться в межах 6,5–8,5, оскільки кератини не розчиняються у кислому середовищі та розкладаються в лужному. Екстрагуючи кератини вовни, ми мали на меті з'ясувати, чи змінюватиметься вміст солюбілізованого протеїну в залежності від типу вовняного волокна.

Нами встановлено, що рН має істотний вплив на ефективність екстракції. При цьому, найбільший вміст розчиненого протеїну ми отримали за рН середовища 8,5 для всіх типів волокон, проте, найефективнішою виявилася екстракція кератину з тонких вовняних волокон. За цих умов найменша концентрація розчинного кератину виявлена нами у супернатанті з ості.

Іншим важливим чинником, що впливає на ефективність солюбілізації кератинів є температура. Як відомо, протеїни є чутливими до дії високих температур, що може призвести до їх необоротної денатурації. Нами встановлено, що підвищення температури здатне покращувати ефективність екстракції кератинів. Найвищий вміст екстрагованого протеїну ми отримали за температури 50 °С як для тонкої, так і кросбредної вовни. Для ості дещо ефективнішою виявилася екстракція за температури 60 °С.

Аналізуючи ефективність екстракції протеїнів, як за різного значення рН, так і за різної температури, нами встановлено, що найнижчий вміст солюбілізованих кератинів отримано з ості. Це пов'язано з особливостями будови цього типу волокон. Відомо, що для ості характерною є наявність серцевини, що займає значний об'єм, відповідно, коркового шару значно менше, ніж у волокнах інших типів, а обрані методи солюбілізації кератинів є ефективнішими саме для екстракції протеїнів кортексу.

На наступному етапі досліджень ми вивчали ефективність екстракції кератинів у різному часовому інтервалі. Деякі автори вважають, що між тривалістю екстракції кератинів та температурним режимом існує зв'язок, тому при підвищенні температури час солюбілізації можна скоротити [96]. Максимальний вміст розчинного протеїну зафіксовано для кросбредних вовняних волокон за умов їх екстрагування впродовж 48 год за температури 50 °С. У результаті проведених досліджень також з'ясувалось, що для тонких вовняних волокон оптимальна тривалість екстракції становила 48 год, а для значно грубших, остьових волокон – 72 год. Характерно, що для кросбредних волокон час екстракції суттєво не впливав на її ефективність.

Враховуючи той факт, що 2-МЕ є доволі токсичним реагентом, як для організму людини, так і для навколишнього середовища, ми спробували його замінити іншими низькомолекулярними спиртами та дослідили вплив 25% розчину етанолу та метанолу на ефективність екстракції кератину. Згідно з отриманими результатами, використання згаданих низькомолекулярних спиртів не було успішним. Хоча, слід зазначити, що вміст протеїну був вищий у екстрактах, отриманих із кросбредних та остьових вовняних волокон.

Нами встановлено, що за дії етанолу та метанолу в основному екстрагуються КАП, а не протеїни ІФ. Це пов'язано з тим, що КАП відносяться до низькомолекулярних протеїнів з невідповідною структурою, на відміну від високо впорядкованих протеїнів ІФ з більшою молекулярною масою. Проте, метою нашого дослідження було екстрагування протеїнів кератину, які відносяться саме до протеїнів інтермедіальних філаментів, оскільки їх властивості забезпечують формування біоматеріалів.

Іншим, більш безпечним методом екстракції кератинів є сульфітоліз [90]. Згідно з цим методом, в якості відновника виступає натрію метабісульфіт. Тому ми порівнювали ефективність екстракції кератинів з волоса людини та вовняних волокон за використання 2-МЕ, ДТТ та м-БС.

Нами встановлено, що ефективність екстракції кератинів з вовни та волоса людини вірогідно залежить від відновного агента. Що стосується вовни, то варто зазначити, що ефективність екстракції була вищою за використання в екстракційній суміші дитіотреїтолу. На противагу, суттєвої відмінності у дії меркаптоетанолу та натрій метабісульфіту на ефективність екстракції протеїнів вовни не спостерігали.

Результати екстракції кератинів волоса людини, свідчать про те, що найефективнішим відновником є натрію метабісульфіт. За його присутності у складі екстракційної суміші ефективність солюбілізації вірогідно зростала. Дещо нижча ефективність спостерігалася за дії дитіотреїтолу. Найменш ефективним відновником для екстракції кератинів волоса людини виявився меркаптоетанол.

Такі особливості, очевидно, можна пояснити відмінностями у будові вовни та волоса людини [150].

Наступні дослідження стосувалися з'ясування структурних властивостей екстрагованих кератинів. Залежно від обраного методу екстракції кератинів можна отримати протеїни певних молекулярних мас. Наприклад, метод окиснення надощтовою кислотою дає можливість отримати найбільші розчинні фрагменти з молекулярною масою більше 60 кДа. Електрофоретичний профіль кератинів, отриманих окисненням гідропероксосолювату карбонату натрію, показує, що більшість протеїнів знаходяться у діапазоні 50–200 кДа. За використання тіоглікової кислоти та гідроген пероксиду можна отримати протеїни з молекулярною масою в діапазоні від 6 до 200 кДа [94].

Згідно з літературними джерелами [90], в результаті сульфїтолізу можна отримати протеїни з молекулярною масою менше 30 кДа. Класичний метод солюбілізації протеїнів за дії меркаптоетанолу дозволяє отримати смуги кератинів у діапазоні 60–80 кДа та 6–14 кДа [136]. Унаслідок відновлення–сульфїдування протеїни розділяються на фракції з молекулярними масами в межах 66 кДа, 40–50 кДа та менше 20 кДа [61].

Оскільки ми в своїх дослідженнях використовували 12,5 % ПААГ, а не градієнтний гель, спектр молекулярних мас отриманих нами протеїнів дещо відрізнявся від описаних вище.

Як за дії ДТТ, так і за дії 2-МЕ та м-БС у складі екстракційної суміші протеїни вовни, незалежно від типу волокна, переважно розділилися на дві смуги, що відповідають поліпептидним ланцюгам з молекулярною масою 40–60 кДа, які характерні для протеїнів інтермедіальних філаментів типу I і II. У низькомолекулярній ділянці нами виявлено кератинасоційовані протеїни з молекулярною масою в межах 10–30 кДа. Характерно, що КАП зафарбувалися менш інтенсивно, ніж протеїни ІФ. Це пов'язано з тим, що протеїни з високим вмістом Сульфуру гірше зв'язують барвник [73].

Електрофоретичний профіль волоса людини, дещо відрізнявся від профілю вовни. Як за дії ДТТ, так і за дії м-БС ми виявили смуги протеїнів з молекулярною

масою 40–60 кДа, що, як вже зазначалося, відносяться до протеїнів ІФ. Смуг КАП за використання м-БС нами не виявлено. Це пояснюється тим, що в процесі сульфїтолізу цей тип протеїнів погано екстрагується або слід застосувати градієнтний тип електрофорезу. Проте, більший інтерес для нас становили саме протеїни ІФ з огляду на можливість їхнього застосування, насамперед, як матриці для створення біоматеріалів.

Окрім електрофорезу, для підтвердження структури кератину ми використовували ІЧ-спектроскопію. Порівнюючи ІЧ-спектр нативної вовни та спектр ліюфілізованого кератину ми спостерігали наявність смуги амід І, що пов'язані з розтягуванням зв'язку $C=O$, та амід ІІ, що пов'язані з деформаційними коливаннями зв'язку $N-H$. Відомо, що ці смуги є характерними для речовин протеїнової природи [130]. Отже, використані нами методи екстракції кератинів дозволяють зберегти їх структурні та функціональні властивості, що було важливим для виконання наших наступних завдань, пов'язаних з виробництвом та застосуванням біокомпозитів на основі кератинів.

Екстраговані кератини були використані для приготування протеїнових гідролізатів для обробки вовни, щоб перевірити як це впливатиме на фізико-хімічні параметри кератинових волокон. Відомо, що застосування дисперсій фібрилярних протеїнів у легкій промисловості викликає особливий інтерес. Такі препарати застосовують у складі композицій для шліхтування тканин, а фарбування виробів, попередньо оброблених кератином у кислому середовищі, значно підвищує абсорбцію барвника (до 91 %) [1, 4].

Хімічна модифікація вовняних волокон передбачає обробку вовни різноманітними сполуками, в результаті чого найперше змінюються поверхневі властивості волокон, його сорбційні характеристики [4]. Для такої модифікації використовують гіпохлорит натрію, хлорвмісні органічні сполуки, гідрогену пероксид, перманганат калію, спиртові розчини лугів та ін.

Основна мета хімічної модифікації волокна – деструкція дисульфідних зв'язків поверхні вовни, проте дуже важливо вибрати оптимальні умови, за яких волокна не зазнавали б незворотних пошкоджень. Такі умови підбирають,

враховуючи ряд параметрів, а саме значення рН розчину, концентрацію хімічного агента, тривалість його дії, температуру, за якої відбувається процес. Відомо, що під час обробки вовни відновниками з її поверхні можуть видалятися міцно сорбовані на кутикулі поверхневі ліпіди, які надають волокну гідрофобності. У результаті такої обробки на поверхні волокна можуть виникати нові гідрофільні групи, які будуть утворювати нові зв'язки при використанні полімерних розчинів [4].

Використання для обробок поверхні волокон полімерних розчинів може сприяти зменшенню статичної електрики та зменшенню тертя серед волокон. Різноманітні дефекти кутикули, зокрема тріщини, зменшуються при застосуванні певних компонентів, які вирівнюють кутикулу вздовж осі волокна. Гладкі кутикулярні луски відбивають більше світла, що покращує блиск, колір та м'якість вовни. Полімерні розчини можуть сорбуватися на поверхні волокна, або проникати в кортекс, залежно в основному від молекулярної маси їх компонентів.

Власне хімічно оброблені волокна будуть мати більшу спорідненість до полімерів у розчині через вищу пористість у порівнянні з нативною вовною [29].

Встановлено, що обробка вовняних волокон розчинами кератину призводить до змін у їх структурі, а саме до перерозподілу її кератоз. У результаті проведених досліджень було встановлено збільшення фракції альфа-кератози залежно від концентрації протейнового розчину, який використовували для обробки. Вміст бета-фракції у оброблених розчином відновленого кератину волокнах порівняно з інтактними практично не змінювався. Проте, ми спостерігали деяке зменшення гамма-фракції, але ці результати не були статистично вірогідні. Цілком імовірно, що відновлений кератин, який містить активний цистин у S-сульфонатній формі, сприяє перебудові дисульфідних зв'язків у волокні, і тим самим впливає на його властивості [163].

При вивченні впливу фібрилярних дисперсій кератинів на фізико-хімічні параметри вовни, встановлено, що міцність вовняних волокон в результаті їх обробки 3 % водним розчином відновленого кератину зростала, порівняно з інтактними волокнами. Цей ефект зумовлений здатністю низькомолекулярних

протеїнів проникати у кортекс волокна, а також заповнювати простір між лусками кутикули, коригуючи її дефекти. Результати дослідження впливу 3 % розчину відновленого кератину на товщину вовняних волокон не продемонстрували суттєвих позитивних змін.

Як ми вже зазначали, характерною ознакою кератинів є наявність великої кількості активних функціональних груп [112]. Цю особливість з успіхом використовують для виробництва біосорбентів та інших матеріалів для елімінації поллютантів з водного середовища [10, 15].

Забруднення поверхневих вод є глобальною проблемою, на вирішення якої в світі витрачаються значні кошти. Серед основних забруднювачів природних водойм України є важкі метали. Вони можуть накопичуватися в живих організмах і передаватися по усьому харчовому ланцюгу. Тому дослідження елімінації важких металів з цього ланцюга мають важливе значення як для охорони навколишнього середовища, так і громадського здоров'я зокрема [75].

Сьогодні існують численні методи для видалення іонів важких металів із водних розчинів, зокрема шляхом хімічного осадження, іонного обміну, зворотнього осмосу, транспорту через напіввідкриті мембрани. Проте, використання цих методів часто обмежується через їх високу вартість, енергозатратність, вимоги до реагентів та неповне видалення іонів металів [163].

Альтернативою вище описаним методам може слугувати біосорбція. З цієї точки зору біоматеріали розглядають як альтернативні нові біосорбенти, враховуючи співвідношення ціна/ефективність, а також високий ступінь адсорбційної здатності [10, 15, 16, 23, 62, 117, 149, 161, 177, 189, 221].

Матеріали на основі кератинів також можна розглядати як перспективний біосорбент для видалення промислових забруднювачів [164]. Цьому сприяє наявність у структурі кератину багатьох функціональних груп, таких як: $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ [102, 163], а також велику кількість іонізованих груп, ізоелектрична точка яких становить 4–5 [171]. Це зумовлює їх здатність зв'язувати іони важких металів, катіонні барвники та нафтопродукти з водних

розчинів. Ефективність абсорбції залежить від багатьох факторів: температури, значення рН, початкової концентрації іонів, площі поверхні [171].

Наші дослідження були спрямовані на порівняння сорбційних властивостей нативного та функціоналізованого кератину за різного значення рН. Для функціоналізації кератину ми обрали методи окиснення та відновлення, оскільки це є найпростіші способи реорганізації структури протеїну. Обробка кератину гідроген пероксидом призводить до окиснення дисульфідних зв'язків до утворення залишків цистеїнової кислоти. Перевагами цього методу є низька токсичність і вартість та висока ефективність. Вплив бісульфіту проявляється через відновлення дисульфідних зв'язків з утворенням тіольних та сульфонатних залишків.

У результаті проведених досліджень з'ясувалось, що ефективність адсорбції нативного кератину для іонів Плюмбуму була низькою і практично не перевищувала 30 %. Хімічна модифікація кератину вовни супроводжувалася суттєвим збільшенням ефективності адсорбції цього важкого металу із його розчинів. Слід відзначити, що на процеси адсорбції істотний вплив має також рН. Як свідчать експериментальні дані, найвища ефективність адсорбції для іонів Pb^{2+} зафіксована для біосорбенту на основі кератину, обробленого бісульфітом натрію, при рН 6,0 (68,7 %). За цих умов, біосорбент на основі кератину, обробленого 10 % розчином гідроген пероксиду, меншою мірою зв'язував із розчину іони Pb^{2+} (54,3 %), проте ці результати значно вищі ніж у контролю (нативний кератин). Подібна закономірність спостерігалася і при дослідженні адсорбції Плюмбуму біосорбентом на основі кератину вовни при рН 5,0 та 7,0. При рН 5,0 ефективність адсорбції цього металу хімічно модифікованим кератином була в 3,6 та 3,1 разів вищою, ніж для нативного кератину, тоді як при рН 7,0 ці зміни були на рівні 3,1 та 2,7 відповідно для біосорбентів на основі кератину, обробленого бісульфітом та гідроген пероксидом.

Ефективність адсорбції Cd^{2+} біосорбентом на основі нативного кератину у діапазоні рН 5,0 – 7,0 коливалася від 12,8 до 17,5 %. Із зміною рН до 6,0 ефективність адсорбції збільшувалася відповідно до 28,2 % для кератину,

обробленого гідроген пероксидом, і 38,5 % – для сорбенту на основі хімічно модифікованого кератину натрію бісульфітом. Подібна закономірність спостерігалася і при зміні рН до 7,0.

Отже, максимальна ефективність адсорбції і для іонів Кадмію, і для іонів Плюмбуму спостерігалася при використанні біосорбенту на основі кератину, обробленого натрію бісульфітом. Відмінності у сорбційних властивостях модифікованого кератину, очевидно, можна пояснити конкуренцією між протонами та іонами металів за сайти зв'язування на поверхні модифікованих волокон [220].

Як ми вже зазначали вище, кератинові препарати у різних формах (плівки, гелі, нановолкна, матриці) можна використовувати в біомедицині [125, 140, 144]. Тому, наступним нашим завданням було сформувати плівкові біоматеріали на основі розчину регенерованого кератину, дослідити їх структуру та перевірити їх здатність до утворення зв'язків з протеїнами сироватки крові людини для з'ясування її біосумісності.

Сканувальна електронна мікроскопія поверхні виготовлених нами плівок підтвердила інформацію, отриману з літературних джерел про важливість застосування пластифікаторів для покращення механічних властивостей плівок. У літературі є дані про вплив декількох пластифікаторів на мікроструктуру та паропроникність плівок [122, 125]. З цією метою дослідники застосовували сорбіт, гліцерол та поліетиленгліколь. Вони з'ясували, що сорбіт найкраще забезпечує однорідність плівки. За використання поліетиленгліколю (ПЕГ) механічні властивості плівки не покращувалися, вона залишалася крихкою. Ймовірно, це зумовлено довгим ланцюгом ПЕГ. Стосовно гліцеролу, то його застосування мало значний вплив на збереження вологи у плівці та покращувало її гнучкість [122, 125].

Також, кератинові плівки можна поєднувати з хітозаном. Плівки такого типу володіють здатністю до набрякання та характеризуються антибактеріальним ефектом, що важливо для культивування клітин [184]. Згідно з деякими дослідженнями, застосування желатину в поєднанні з хітозаном покращує

гідрофільність та оксигенацію плівок, причому ці властивості збільшуються зі збільшенням концентрації желатину. Окрім цього, додавання желатину покращує міцність плівки на розрив [25, 39].

Деякі автори повідомляють про поєднання кератину та фіброїну шовку [113, 119, 197]. Це збільшує кількість водневих зв'язків у структурі біоматеріалу. Плівки такого типу є біосумісними, а їх біодеградацію можна контролювати, що важливо коли мова йде про цільову доставку лікарських засобів [25, 197].

Наші дослідження показали, що кератин-гліцеролові плівки справді володіли кращими механічними властивостями, були гнучкішими та без пошкоджень відділялися від чашок Петрі. Поверхня таких плівок, в основному, була гомогенною, наявність поодиноких невеликих тріщин, ймовірно, було зумовлено великою кількістю дисульфідних зв'язків у молекулі кератину [157]. При цьому, поверхня плівок, виготовлених без додавання гліцеролу, мала чітко виражену рельєфність.

Окрім механічних властивостей важливо, щоб плівки були біосумісними. Для перевірки виготовлених нами плівок на біосумісність, ми адсорбували на її поверхні протеїни сироватки крові людини. Як показали результати електрофорезу, на поверхні плівки активно адсорбувалися протеїни з молекулярною масою в діапазоні 40–70 кДа. Це свідчить про те, що застосовані нами м'які методи екстракції кератинів забезпечують збереження їх нативних властивостей та здатність до утворення зв'язків з протеїнами живих організмів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично узагальнено та експериментально визначено біохімічні характеристики солюбілізованих 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 солюбілізації кератинів є температурний режим 50–60 °С, рН 8,5 та тривалість в 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 солюбілізованого кератину підтвердив наявність протеїнів з 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-кератоци 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 з 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 та 38,5 % порівняно з контролем. За цих умов здатність адсорбувати іони Pb (II) і Cd (II) із розчину кератином, обробленим пероксидом водню 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 регенерованого 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 та можливість успішного використання в біомедицині.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аршакуни, А. А. Губин, С. П. (2010). Наноматериалы на основе природных белковых волокон. *Неорганические материалы*. 46 (7), 818-826.
2. Влізло, В. В., Федорук, Р. С., Ратич, І. Б. та ін. (2012). *Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник* (В.В. Влізло, Ред.). СПОЛОМ.
3. Вовна. Визначення розчинності в лугах (ISO 3072:1975, IDT): ДСТУ ISO 3072:2008. – [Чинний від 2011-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2010. – 7 с.
4. Гавриляк В. В., Стапай П. В., Смолянінова О. О., Скорохід А. В., Михалюк В. В. Методи модифікації вовняних волокон (методичні рекомендації): - Львів, 2018. – 16 с.
5. 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.
6. Гавриляк, В. В., Михалюк, В. В. (2019). Методи отримання кератинів із волокон природного походження. *Молодь і поступ біології: XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса:збірник тез* (с. 220). Львівський національний університет імені І. Франка.
7. Гавриляк, В. В., Ткачук, В. М. (2012). Жирно-кислотний склад структурних ліпідів нормальних і патологічно змінених вовняних волокон. *Укр. біохім. журнал*, 84 (5), 106–111.

8. Гавриляк, В., Михалюк, В. (2016). Вплив деяких факторів на ефективність екстракції кератинів вовняних волокон різного типу. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (73), 47-50.
9. Гуменюк, В. В., Макар, И. А. (1979). *Способ разделения белков шерсти* (СССР патент №702029).
10. Дымова, Т. А., & Кузьмина, М. В. (2016). Очистка водных сред от ионов меди (II) модифицированным шерстяным волокном. *Современные научные исследования и инновации*, (9), 28-33.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Шайхлисламова, Д.Д. (2007). Использование отходов переработки шерсти для очистки сточных вод от поллютантов. *Тезисы доклада Международной конференции по химической технологии XT'07* (с. 286–288).
16. Abbasi, F., Yaraki, M. T., Farrokhnia, A., & Bamdad, M. (2020). Keratin nanoparticles obtained from human hair for removal of crystal violet from aqueous solution: Optimized by Taguchi method. *International journal of biological macromolecules*, 143, 492-500.

17. Abe, M., Oshima, E., Sakai, S., Hirabayashi, Y., Tsuchida, T., & Hamanaka, S. (2012). Sphingolipids of the murine hair. *J. Soci. Jap. Women Scientists*, 12, 32-43.
18. Aboushwareb, T., Eberli, D., Ward, C., Broda, C., Holcomb, J., Atala, A., & Van Dyke, M. (2009). A keratin biomaterial gel hemostat derived from human hair: evaluation in a rabbit model of lethal liver injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90(1), 45-54.
19. Adav, S. S., Subbaiah, R. S., Kerk, S. K., Lee, A. Y., Lai, H. Y., Ng, K. W., & Schmidtchen, A. (2018). Studies on the proteome of human hair-Identification of histones and deamidated keratins. *Scientific reports*, 8(1), 1-11
20. Adeola, H. A., Van Wyk, J. C., Arowolo, A., Ngwanya, R. M., Mkentane, K., & Khumalo, N. P. (2018). Emerging diagnostic and therapeutic potentials of human hair proteomics. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 12(2), 1700048.
21. Agarwal, V., Panicker, A. G., Indrakumar, S., & Chatterjee, K. (2019). Comparative study of keratin extraction from human hair. *International journal of biological macromolecules*, 133, 382-390.
22. Ahmad, T., Rafatullah, M., Ghazali, A., Sulaiman, O., Hashim, R., & Ahmad, A. (2010). Removal of pesticides from water and wastewater by different adsorbents: a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 28(4), 231-271.
23. Ahmaruzzaman, M., & Gupta, V. K. (2011). Rice husk and its ash as low-cost adsorbents in water and wastewater treatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(24), 13589-13613.
24. Ahmed, S. M., & Mohammad, S. G. (2014). Egyptian apricot stone (*Prunus armeniaca*) as a low cost and eco-friendly biosorbent for oxamyl removal from aqueous solutions. *Journal of Experimental Agriculture International*, 302-321.
25. Aigner, T. B., DeSimone, E., & Scheibel, T. (2018). Biomedical applications of recombinant silk-based materials. *Advanced Materials*, 30(19), 1704636.
26. Ajay Sharma, L., Love, R. M., Ali, M. A., Sharma, A., Macari, S., Avadhani, A., & Dias, G. J. (2017). Healing response of rat pulp treated with an

injectable keratin hydrogel. *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 15(3), 244-250.

27. Aluigi, A., Vineis, C., Tonin, C., Tonetti, C., Varesano, A., & Mazzuchetti, G. (2009). Wool keratin-based nanofibres for active filtration of air and water. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(3), 311-319.

28. Aluigi, A., Vineis, C., Varesano, A., Mazzuchetti, G., Ferrero, F., & Tonin, C. (2008). Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibres. *European Polymer Journal*, 44(8), 2465-2475.

29. Al-Zaben, M. I., & Mekhamer, W. K. (2017). Removal of 4-chloro-2-methyl phenoxy acetic acid pesticide using coffee wastes from aqueous solution. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1523-S1529.

30. Apel, P. J., Garrett, J. P., Sierpinski, P., Ma, J., Atala, A., Smith, T. L., & Van Dyke, M. E. (2008). Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: long-term functional and histological outcomes in a mouse model. *The Journal of hand surgery*, 33(9), 1541-1547.

31. Apostolidou, C. (2020). Regenerated Hoof Keratin from 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Acetate and Insights into Disulfide-Ionic Liquid Interactions from MD Simulation. *ChemistryOpen*, 9(6), 695.

32. Ara, A., & Usmani, J. A. (2015). Lead toxicity: a review. *Interdisciplinary toxicology*, 8(2), 55-64.

33. Arshad, M., Kaur, M., & Ullah, A. (2016). Green biocomposites from nanoengineered hybrid natural fiber and biopolymer. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1785-1793.

34. Arshad, M., Khosa, M. A., Siddique, T., & Ullah, A. (2016). Modified biopolymers as sorbents for the removal of naphthenic acids from oil sands process affected water (OSPW). *Chemosphere*, 163, 334-341.

35. Asquith, R. S., & Parkinson, D. C. (1966). The morphological origin and reactions of some keratin fractions. *Textile research Journal*, 36(12), 1064-1071.

36. Ata, A., Nalcaci, O. O., & Ovez, B. (2012). Macro algae *Gracilaria verrucosa* as a biosorbent: A study of sorption mechanisms. *Algal Research*, 1(2), 194-204.
37. Aziz, M. E., Jaleeli, K. A., & Ahmad, A. (2017). FTIR spectroscopic analysis of keratinized tissue-the Hair. *Int. J. Sci. Eng. Technol*, 6, 105-107.
38. Barone, J. R., & Schmidt, W. F. (2005). Polyethylene reinforced with keratin fibers obtained from chicken feathers. *Composites Science and Technology*, 65(2), 173-181.
39. Bazargan-Lari, R., Bahrololoom, M. E., & Nemati, A. (2009). Preparation and mechanical evaluations of a novel keratin-chitosan-gelatin composite film. *World Appl Sci J*, 7(6), 763-68.
40. Beyer, C. (1907). The keratin or horny substance of the hair. *Ger pat*, 22643.
41. Bhardwaj, N., Sow, W. T., Devi, D., Ng, K. W., Mandal, B. B., & Cho, N. J. (2015). Silk fibroin–keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering. *Integrative Biology*, 7(1), 53-63.
42. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
43. Brown, E. M., Pandya, K., Taylor, M. M., & Liu, C. K. (2016). Comparison of methods for extraction of keratin from waste wool. *Agricultural Sciences*, 7(10), 670-679.
44. Buchanan, J. H. (1977). A cystine-rich protein fraction from oxidized alpha-keratin. *Biochemical Journal*, 167(2), 489-491.
45. Chen, B., Yuan, M., & Liu, H. (2011). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution using plant residue materials as a biosorbent. *Journal of hazardous materials*, 188(1-3), 436-442.
46. Chen, I. C., & Yu, J. (2020). Human Hair: Scaffold Materials for Regenerative Medicine. *Bioinspired Biomaterials*, 223-229.

47. Chen, X., Wu, S., Yi, M., Ge, J., Yin, G., & Li, X. (2018). Preparation and physicochemical properties of blend films of feather keratin and poly (vinyl alcohol) compatibilized by tris (hydroxymethyl) aminomethane. *Polymers*, 10(10), 1054.
48. Cheng, Z., Chen, X., Zhai, D., Gao, F., Guo, T., Li, W., & Wang, B. (2018). Development of keratin nanoparticles for controlled gastric mucoadhesion and drug release. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 1-13.
49. Cheng, Z., Otto, G. M., Powers, E. N., Keskin, A., Mertins, P., Carr, S. A., & Brar, G. A. (2018). Pervasive, coordinated protein-level changes driven by transcript isoform switching during meiosis. *Cell*, 172(5), 910-923.
50. Cloete, E., Khumalo, N. P., Van Wyk, J. C., & Ngoepe, M. N. (2019). Systems approach to human hair fibers: interdependence between physical, mechanical, biochemical and geometric properties of natural healthy hair. *Frontiers in physiology*, 10, 112.
51. Cochis, A., Ferraris, S., Sorrentino, R., Azzimonti, B., Novara, C., Geobaldo, F., & Rimondini, L. (2017). Silver-doped keratin nanofibers preserve a titanium surface from biofilm contamination and favor soft-tissue healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(42), 8366-8377.
52. Coderch, L., Oliver, M. A., Martínez, V., Manich, A. M., Rubio, L., & Martí, M. (2017). Exogenous and endogenous lipids of human hair. *Skin Research and Technology*, 23(4), 479-485.
53. Conway, J. F., & Parry, D. A. (1990). Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded α -fibrous proteins. *International journal of biological macromolecules*, 12(5), 328-334.
54. Costa, F., Silva, R., & Boccaccini, A. R. (2018). Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair. *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair*, 175-204.
55. Coulombe, P. A., & Omary, M. B. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current opinion in cell biology*, 14(1), 110-122.

56. Cruz, C. F., Fernandes, M. M., Gomes, A. C., Coderch, L., Martí, M., Méndez, S., & Cavaco-Paulo, A. (2013). Keratins and lipids in ethnic hair. *International journal of cosmetic science*, 35(3), 244-249.
57. Dąbrowski, A., Hubicki, Z., Podkościelny, P., & Robens, E. (2004). Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. *Chemosphere*, 56(2), 91-106.
58. de Castro Lima, C. R. R., Machado, L. D. B., Velasco, M. V. R., & do Rosário Matos, J. (2018). DSC measurements applied to hair studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 132(3), 1429-1437.
59. de Guzman, R. C., Saul, J. M., Ellenburg, M. D., Merrill, M. R., Coan, H. B., Smith, T. L., & Van Dyke, M. E. (2013). Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds. *Biomaterials*, 34(6), 1644-1656.
60. De Jager, M. W., Gooris, G. S., Dolbnya, I. P., Bras, W., Ponec, M., Bouwstra, J. A. (2004). Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *Journal of Lipid Research*, 45(5), 923–932.
61. Deb-Choudhury, S., Plowman, J. E., & Harland, D. P. (2016). Isolation and analysis of keratins and keratin-associated proteins from hair and wool. *Methods in enzymology*, 568, 279-301.
62. Demirbas, A. (2008). Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *Journal of hazardous materials*, 157(2-3), 220-229.
63. Donato, R. K., & Mija, A. (2020). Keratin associations with synthetic, biosynthetic and natural polymers: An extensive review. *Polymers*, 12(1), 32.
64. Du, H., Liu, W., Zhang, M., Si, C., Zhang, X., & Li, B. (2019). Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 209, 130-144.
65. Earland, C., & Knight, C. S. (1955). Studies on the structure of keratin: I. The analysis of fractions isolated from wool oxidized with peracetic acid. *Biochimica et biophysica acta*, 17, 457-461.

66. Fagbemi, O. D., Sithole, B., & Tesfaye, T. (2020). Optimization of keratin protein extraction from waste chicken feathers using hybrid pre-treatment techniques. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, 100267.
67. Fearheller, S. H., Taylor, M. M., Windus, W., Filachione, E. M., & Naghski, J. (1972). Recovery and analyses of hair proteins from tannery unhairing wastes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 20(3), 668-670.
68. Feroz, S., Muhammad, N., Ranayake, J., & Dias, G. (2020). Keratin-Based materials for biomedical applications. *Bioactive materials*, 5(3), 496-509.
69. Floris, T. A, Slangen, K. (2005). *Method for producing a low reducing agent-containing keratin and products thereof*. U.S. Patent Application No. 11/791,739.
70. Fortunato, G. M., Da Ros, F., Bisconti, S., De Acutis, A., Biagini, F., Lapomarda, A., Vozzi, G. (2019). Electrospun structures made of a hydrolyzed keratin-based biomaterial for development of in vitro tissue models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 174.
71. Gao, F., Li, W., Deng, J., Kan, J., Guo, T., Wang, B., & Hao, S. (2019). Recombinant human hair keratin nanoparticles accelerate dermal wound healing. *ACS applied materials & interfaces*, 11(20), 18681-18690.
72. García-Sabido, D., López-Mesas, M., & Carrillo-Navarrete, F. (2016). Chicken feather fibres waste as a low-cost biosorbent of acid Blue 80 dye. *Desalination and Water Treatment*, 57(8), 3732-3740.
73. Gillespie, J. M. (1991). The structural proteins of hair: isolation, characterization and regulation of biosynthesis. *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 625-659.
74. Guo, T., Li, W., Wang, J., Luo, T., Lou, D., Wang, B., & Hao, S. (2018). Recombinant human hair keratin proteins for halting bleeding. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup2), 456-461.
75. Guo, T., Yang, X., Deng, J., Zhu, L., Wang, B., & Hao, S. (2019). Keratin nanoparticles-coating electrospun PVA nanofibers for potential neural tissue applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(1), 9.

76. Gupta, P., & Nayak, K. K. (2016). Optimization of keratin/alginate scaffold using RSM and its characterization for tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 85, 141-149.
77. Hamasaki, S., Tachibana, A., Tada, D., Yamauchi, K., & Tanabe, T. (2008). Fabrication of highly porous keratin sponges by freeze-drying in the presence of calcium alginate beads. *Materials Science and Engineering: C*, 28(8), 1250-1254.
78. Hannun, Y. A., & Luberto, C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in cell biology*, 10(2), 73-80.
79. Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 139-150.
80. Happey, F., & Wormell, R. L. (1949). 53-Regenerated keratin fibres from wool. *Journal of the Textile Institute Transactions*, 40(12), 855-869.
81. Hatakeyama, R., Tomita, Y., & Takigami, S. (2009). Preparation of Water Soluble Wool Keratin and Its Application for Human Hair. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 34(3), 399-402.
82. 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.
83. Havryliak, V., Mykhaliuk, V. (2019). The efficiency of keratin extraction from human hair by sulfitolysis. *9th International youth science forum "Litteris et Artibus" & 14th International conference "Young scientists towards the challenges of modern technology": materials*, 229–231.
84. Havryliak, V., Mykhaliuk, V., Petrina, R., Fedorova, O., Lubenets, V., Novikov, V. (2019). Adsorbents based on keratin for the heavy metals removal. *The 5th International conference on biotechnology, environment and engineering sciences: proceeding* (p. 36.)
85. 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.

86. Heid, H. W., Moll, I., & Franke, W. W. (1988). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation*, 37(2), 137-157.
87. Holkar, C. R., Jain, S. S., Jadhav, A. J., & Pinjari, D. V. (2018). Valorization of keratin based waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 115, 85-98.
88. Homagai, P. L., & Paudyal, H. (2009). Adsorption kinetics of Pb (II), Cd (II), Zn (II) and Fe (III) onto saponified apple waste. *Journal of Nepal Chemical Society*, 23, 102-105.
89. Huda, S., & Yang, Y. (2009). Feather fiber reinforced light-weight composites with good acoustic properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 17(2), 131-142.
90. Isarankura N. Ayutthaya, S. I. N., Tanpichai, S., & Wootthikanokkhan, J. (2015). Keratin extracted from chicken feather waste: extraction, preparation, and structural characterization of the keratin and keratin/biopolymer films and electrospuns. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 506-516.
91. Jacob, J. T., Coulombe, P. A., Kwan, R., & Omary, M. B. (2018). Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(4), a018275.
92. Ji, J. H., Park, T. S., Lee, H. J., Kim, Y. D., Pi, L. Q., Jin, X. H., & Lee, W. S. (2013). The ethnic differences of the damage of hair and integral hair lipid after ultra violet radiation. *Annals of dermatology*, 25(1), 54-60.
93. Jiang-Tao, X. U., Ping, Z. H. U., Lin, Z. H. A. N. G., Shu-ying, S. U. I., Zhao-hong, D. O. N. G., & Yi, Z. U. O. (2015). Study of keratin extraction from human hair. *Wool Textile Journal*, 43(5).
94. Jones, L. N., Simon, M., Watts, N. R., Booy, F. P., Steven, A. C., & Parry, D. A. D. (1997). Intermediate filament structure: hard α -keratin. *Biophysical chemistry*, 68(1-3), 83-93.

95. Kakkar, P., Madhan, B., & Shanmugam, G. (2014). Extraction and characterization of keratin from bovine hoof: A potential material for biomedical applications. *SpringerPlus*, 3(1), 1-9.
96. Kamarudin, N. B., Sharma, S., Gupta, A., Kee, C. G., Chik, T., & Gupta, R. (2017). Statistical investigation of extraction parameters of keratin from chicken feather using Design-Expert. *3 Biotech*, 7(2), 1-9.
97. Karan, C. P., Rengasamy, R. S., & Das, D. (2011). Oil spill cleanup by structured fibre assembly. *Indian J.*
98. Katoh, K., Shibayama, M., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2004). Preparation and properties of keratin–poly (vinyl alcohol) blend fiber. *Journal of applied polymer science*, 91(2), 756-762.
99. Kaur, M., Arshad, M., & Ullah, A. (2018). In-situ nanoreinforced green bionanomaterials from natural keratin and montmorillonite (MMT)/cellulose nanocrystals (CNC). *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(2), 1977-1987.
100. Kelly, R. (2016). Keratins in wound healing. *In Wound Healing Biomaterials*, 353-365.
101. Khosa, M. A., & Ullah, A. (2014). In-situ modification, regeneration, and application of keratin biopolymer for arsenic removal. *Journal of hazardous materials*, 278, 360-371.
102. Khosa, M. A., Wu, J., & Ullah, A. (2013). Chemical modification, characterization, and application of chicken feathers as novel biosorbents. *Rsc Advances*, 3(43), 20800-20810.
103. Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., & Hannun, Y. A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular signalling*, 20(6), 1010-1018.
104. Koch, S. L., Tridico, S. R., Bernard, B. A., Shriver, M. D., & Jablonski, N. G. (2020). The biology of human hair: A multidisciplinary review. *American Journal of Human Biology*, 32(2), e23316.
105. Kolesnick, R. N., & Krönke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annual review of physiology*, 60(1), 643-665.

106. Kong, H., He, J., Wu, H., Wu, H., & Gao, Y. (2012). Phenanthrene Removal from Aqueous Solution on Sesame Stalk-based Carbon. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 40(7), 752-759.
107. Körner, A., Höcker, H., & Rivett, D. E. (1992). The fatty acid composition of lipids from the wool cell membrane complex. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 344(10), 501-509.
108. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
109. Langbein, L., Rogers, M. A., Winter, H., Praetzel, S., Beckhaus, U., Rackwitz, H. R., & Schweizer, J. (1999). The catalog of human hair keratins: I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19874-19884.
110. Langbein, L., Rogers, M.A., Winter, H., Praetzel, S., Schweizer, J. (2001). 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.*, 276(37). 35123–35132.
111. Langbein, L., Yoshida, H., Praetzel-Wunder, S., Parry, D. A., & Schweizer, J. (2010). The keratins of the human beard hair medulla: the riddle in the middle. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(1), 55-73.
112. Lee, H., Noh, K., Lee, S. C., Kwon, I. K., Han, D. W., Lee, I. S., & Hwang, Y. S. (2014). Human hair keratin and its-based biomaterials for biomedical applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(4), 255-265.
113. Lee, K. Y., Kong, S. J., Park, W. H., Ha, W. S., & Kwon, I. C. (1998). Effect of surface properties on the antithrombogenicity of silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9(9), 905-914.
114. Lin, C. W., Chen, Y. K., Tang, K. C., Yang, K. C., Cheng, N. C., & Yu, J. (2019). Keratin scaffolds with human adipose stem cells: Physical and biological effects toward wound healing. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13(6), 1044-1058.

115. Lin, C. W., Yang, K. C., Cheng, N. C., Tsai, W. B., Lou, K. L., & Yu, J. (2018). Evaluation of adhesion, proliferation, and differentiation of human adipose-derived stem cells on keratin. *Journal of Polymer Research*, 25(2), 1-14.
116. Lin, Y. H., Huang, K. W., Chen, S. Y., Cheng, N. C., & Yu, J. (2017). Keratin/chitosan UV-crosslinked composites promote the osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(24), 4614-4622.
117. Liu, B., Wang, D., Yu, G., & Meng, X. (2013). Adsorption of heavy metal ions, dyes and proteins by chitosan composites and derivatives—A review. *Journal of Ocean University of China*, 12(3), 500-508.
118. Liu, R., Li, L., Liu, S., Li, S., Zhu, X., Yi, M., & Liao, X. (2018). Structure and properties of wool keratin/poly (vinyl alcohol) blended fiber. *Advances in Polymer Technology*, 37(8), 2756-2762.
119. Lv, X., Li, Z., Chen, S., Xie, M., Huang, J., Peng, X., & Feng, C. (2016). Structural and functional evaluation of oxygenating keratin/silk fibroin scaffold and initial assessment of their potential for urethral tissue engineering. *Biomaterials*, 84, 99-110.
120. Magin, T. M., Vijayaraj, P., & Leube, R. E. (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental cell research*, 313(10), 2021-2032.
121. Marmer, W. N., & Dudley, R. L. (2006). The oxidative degradation of keratin (wool and bovine hair). *Journal of the American Leather Chemists Association*, 101(11), 408-415.
122. Martelli, S. M., Moore, G., Paes, S. S., Gandolfo, C., & Laurindo, J. B. (2006). Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), 292-301.
123. Martí, M., Barba, C., Manich, A. M., Rubio, L., Alonso, C., & Coderch, L. (2016). The influence of hair lipids in ethnic hair properties. *International journal of cosmetic science*, 38(1), 77-84.
124. Mazzalupo, S., Wong, P., Martin, P., & Coulombe, P. A. (2003). Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin. *Developmental*

dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 226(2), 356-365.

125. McLellan, J., Thornhill, S. G., Shelton, S., & Kumar, M. (2019). Keratin-based biofilms, hydrogels, and biofibers. *In Keratin as a Protein Biopolymer*, Springer, Cham., 187-200.

126. McMullen, R.L, Laura, D., Chen, S., Koelmel, D., Zhang, G., Gillece, T. (2013). Determination of physicochemical properties of delipidized hair. *J Cosmet. Sci.*;64. 355-370.

127. Mi, X., Li, W., Xu, H., Mu, B., Chang, Y., & Yang, Y. (2020). Transferring feather wastes to ductile keratin filaments towards a sustainable poultry industry. *Waste Management*, 115, 65-73.

128. Moch, M., Schwarz, N., Windoffer, R., & Leube, R. E. (2020). The keratin–desmosome scaffold: pivotal role of desmosomes for keratin network morphogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(3), 543-558.

129. Mohammad, S. G. (2013). Biosorption of pesticide onto a low cost carbon produced from apricot stone (*Prunus armeniaca*): equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of applied sciences research*, 9(13), 6459-6469.

130. Mohd Abdul Mujeeb, Zafar M., K., M. (2017). FTIR Spectroscopic Analysis on Human Hair. *International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology*, 6 (5), 9327-9332.

131. 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.

132. 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.

133. 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.
134. Naik, R., Wen, G., Ms, D., Hureau, S., Uedono, A., Wang, X., & Smith, S. V. (2010). Metal ion binding properties of novel wool powders. *Journal of applied polymer science*, 115(3), 1642-1650.
135. Naito, S., & Arai, K. (1996). Type and location of SS linkages in human hair and their relation to fiber properties in water. *Journal of applied polymer science*, 61(12), 2113-2118.
136. Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K., & Fujii, T. (2002). A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 569-572.
137. Nayak, K. K., & Gupta, P. (2015). In vitro biocompatibility study of keratin/agar scaffold for tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 81, 1-10.
138. Nayak, K. K., & Gupta, P. (2017). Study of the keratin-based therapeutic dermal patches for the delivery of bioactive molecules for wound treatment. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1088-1097.
139. Oliver, M. A., Marti, M., Coderch, L., Carrer, V., Kreuzer, M., & Barba, C. (2019). Lipid loses and barrier function modifications of the brown-to-white hair transition. *Skin Research and Technology*, 25(4), 517-525.
140. Pace, L. A., Plate, J. F., Smith, T. L., & Van Dyke, M. E. (2013). The effect of human hair keratin hydrogel on early cellular response to sciatic nerve injury in a rat model. *Biomaterials*, 34(24), 5907-5914.
141. Pakkaner, E., Yalçın, D., Uysal, B., & Top, A. (2019). Self-assembly behavior of the keratose proteins extracted from oxidized Ovis aries wool fibers. *International journal of biological macromolecules*, 125, 1008-1015.
142. Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, 3(3), 1863-1887.

143. Parker, G. J., Leppert, T., Anex, D. S., Hilmer, J. K., Matsunami, N., Baird, L., & Leppert, M. (2016). Demonstration of protein-based human identification using the hair shaft proteome. *PloS one*, 11(9), e0160653.
144. Patrucco, A., Visai, L., Fassina, L., Magenes, G., & Tonin, C. (2019). Keratin-based matrices from wool fibers and human hair. *Materials for Biomedical Engineering. Elsevier*, 375-403.
145. Peña, L. A., Fuks, Z., & Koksnick, R. (1997). Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochemical pharmacology*, 53(5), 615-621.
146. Pham, TL, Inoue, K. (2012). Minimal generalization for conjunctive queries. In: *Lecture notes in computer science (including subseries lecture notes in artificial intelligence and lecture notes in bioinformatics)*. LNAI, 7694.
147. Popov, C., Vasilchina, H., Kulisch, W., Danneil F., Stüber M., Ulrich, S., Welle, A., Reithmaier, J.P. (2009). Wettability and protein adsorption on ultrananocrystalline diamond/amorphous carbon composite films. *Diamond & Related Materials*, 18. 895–898.
148. Posati, T., Giuri, D., Nocchetti, M., Sagnella, A., Gariboldi, M., Ferroni, C., & Aluigi, A. (2018). Keratin-hydrotalcites hybrid films for drug delivery applications. *European Polymer Journal*, 105, 177-185.
149. Posati, T., Listwan, A., Sotgiu, G., Torreggiani, A., Zamboni, R., & Aluigi, A. (2020). Keratin/Hydrotalcites hybrid sponges as promising adsorbents for cationic and anionic dyes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 68.
150. Powell, G. Rogers; ed. P. Jones, H. Zahn, H. Hocker. (1997) Formation and Structure of Human Hair. *Birhaner Verlag Basel, Switzerland*, 59–148.
151. Rafik, M. E., Doucet, J., & Briki, F. (2004). The intermediate filament architecture as determined by X-ray diffraction modeling of hard α -keratin. *Biophysical Journal*, 86(6), 3893-3904.
152. Rahmani Del Bakhshayesh, A., Annabi, N., Khalilov, R., Akbarzadeh, A., Samiei, M., Alizadeh, E., & Montaseri, A. (2018). Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(4), 691-705.

153. Ramakrishnan, N., Sharma, S., Gupta, A., & Alashwal, B. Y. (2018). Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization. *International journal of biological macromolecules*, 111, 352-358.
154. Ramya, K. R., Thangam, R., & Madhan, B. (2020). Comparative analysis of the chemical treatments used in keratin extraction from red sheep's hair and the cell viability evaluations of this keratin for tissue engineering applications. *Process Biochemistry*, 90, 223-232.
155. Raza, F., Zafar, H., Zhu, Y., Ren, Y., Ullah, A., Khan, A. U., & Ge, L. (2018). A review on recent advances in stabilizing peptides/proteins upon fabrication in hydrogels from biodegradable polymers. *Pharmaceutics*, 10(1), 16.
156. Reddy, N., Chen, L., Zhang, Y., & Yang, Y. (2014). Reducing environmental pollution of the textile industry using keratin as alternative sizing agent to poly (vinyl alcohol). *Journal of Cleaner Production*, 65, 561-567.
157. Reichl, S. (2009). Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials*, 30(36), 6854-6866.
158. Rivett, D.E., Ward, S.W., Belkin, L.M., Ramshaw, J.A.M., Wilshire J.F.K. (1996) The Lennox Legacy. *CSIRO Publishing; Collingwood, VIC, Australia: Keratin and Wool Research*.
159. Robbins, C. R. (2012) Chemical and physical behavior of human hair. *New York, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag*, 5, 724.
160. Rogers, G. E. (2019). Known and Unknown Features of Hair Cuticle Structure: A Brief Review. *Cosmetics*, 6(2), 32.
161. Sadeghi, S., Dadashian, F., & Eslahi, N. (2019). Recycling chicken feathers to produce adsorbent porous keratin-based sponge. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(2), 1119-1128.
162. Sadeghi, S., Nourmohammadi, J., Ghaee, A., & Soleimani, N. (2020). Carboxymethyl cellulose-human hair keratin hydrogel with controlled clindamycin release as antibacterial wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, 147, 1239-1247.

163. Saha, S., Arshad, M., Zubair, M., & Ullah, A. (2019). Keratin as a Biopolymer. In *Keratin as a Protein Biopolymer Springer, Cham.*, 163-185.
164. Saha, S., Zubair, M., Khosa, M. A., Song, S., & Ullah, A. (2019). Keratin and chitosan biosorbents for wastewater treatment: a review. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(7), 1389-1403.
165. Sando, L., Kim, M., Colgrave, M. L., Ramshaw, J. A., Werkmeister, J. A., & Elvin, C. M. (2010). Photochemical crosslinking of soluble wool keratins produces a mechanically stable biomaterial that supports cell adhesion and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(3), 901-911.
166. Saravanan, S., Sameera, D. K., Moorthi, A., & Selvamurugan, N. (2013). Chitosan scaffolds containing chicken feather keratin nanoparticles for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 62, 481-486.
167. Saucedo-Rivalcoba, V., Martínez-Hernández, A. L., Martínez-Barrera, G., Velasco-Santos, C., & Castaño, V. M. (2011). (Chicken feathers keratin)/polyurethane membranes. *Applied Physics A*, 104(1), 219-228.
168. Schwan, A., Herrling, J., & Zahn, H. (1986). Characterization of internal lipids from wool. *Colloid and polymer science*, 264(2), 171-175.
169. Sharma, S., & Gupta, A. (2016). Sustainable management of keratin waste biomass: applications and future perspectives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.
170. Sharma, S., Gupta, A., Kumar, A., Kee, C. G., Kamyab, H., & Saufi, S. M. (2018). An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(10), 2157-2167.
171. Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A., & Bekhit, A. E. D. A. (2017). Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials science*, 5(9), 1699-1735.
172. Shi, B., Lu, X., Sun, D., Cao, M. (2003). The Mechanism of Oxidative Unhairing Using Hydrogen Peroxide. *Journal of the American Leather Chemists Association*; 98, 185–192.

173. Shimomura, Y., & Ito, M. (2005, December). Human hair keratin-associated proteins. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings Elsevier*, 10(3), 230-233.
174. Shui-qing, J., Lin, Z., Haixia, W., & Gang, C. (2017). Study on effective extraction of keratin from human hair wastes. *Integrated Ferroelectrics*, 180(1), 102-107.
175. Sierpinski, P., Garrett, J., Ma, J., Apel, P., Klorig, D., Smith, T., & Van Dyke, M. (2008). The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*, 29(1), 118-128.
176. Sinkiewicz, I., Śliwińska, A., Staroszczyk, H., & Kołodziejska, I. (2017). Alternative methods of preparation of soluble keratin from chicken feathers. *Waste and biomass valorization*, 8(4), 1043-1048.
177. Song, K., Qian, X., Zhu, X., Li, X., & Hong, X. (2020). Fabrication of mechanical robust keratin film by mesoscopic molecular network reconstruction and its performance for dye removal. *Journal of colloid and interface science*, 579, 28-36.
178. Strelkov, S. V., Herrmann, H., Geisler, N., Wedig, T., Zimbelmann, R., Aebi, U., & Burkhard, P. (2002). Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *The EMBO journal*, 21(6), 1255-1266.
179. Sun, P., Liu, Z. T., & Liu, Z. W. (2009). Chemically modified chicken feather as sorbent for removing toxic chromium (VI) ions. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(14), 6882-6889.
180. Swift, J. A., Smith, J. R. (2006). Atomic force microscopy of human hair. *Scanning*, 22(5), 310–318.
181. Tachibana, A., Kaneko, S., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2005). Rapid fabrication of keratin–hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation. *Biomaterials*, 26(3), 297-302.
182. Tachibana, A., Nishikawa, Y., Nishino, M., Kaneko, S., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2006). Modified keratin sponge: binding of bone morphogenetic protein-

2 and osteoblast differentiation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(5), 425-429.

183. Taha, T. A., Mullen, T. D., & Obeid, L. M. (2006). A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(12), 2027-2036.

184. Tanabe, T., Okitsu, N., Tachibana, A., & Yamauchi, K. (2002). Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. *Biomaterials*, 23(3), 817-825.

185. Tasaki, K. (2020). A novel thermal hydrolysis process for extraction of keratin from hog hair for commercial applications. *Waste Management*, 104, 33-41.

186. Tesfaye, T., Sithole, B. B., & Ramjugernath, D. (2018). Preparation, characterization and application of keratin based green biofilms from waste chicken feathers. *Int. J. Chem. Sci*, 16(3).

187. Thonpho, A., & Srihanam, P. (2016). Preparation and characterization of keratin blended films using biopolymers for drug controlled release application. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(4), 1739.

188. Thonpho, A., Songeon, W., & Srihanam, P. (2016). Effect of cross-linked agents on keratin films property. *International Journal*, 11(28), 2866-2869.

189. Tissera, N. D., Wijesena, R. N., Yasasri, H., de Silva, K. N., & de Silva, R. M. (2020). Fibrous keratin protein bio micro structure for efficient removal of hazardous dye waste from water: surface charge mediated interfaces for multiple adsorption desorption cycles. *Materials Chemistry and Physics*, 246, 122790.

190. Tonin, C., Aluigi, A., Vineis, C., Varesano, A., Montarsolo, A., & Ferrero, F. (2007). Thermal and structural characterization of poly (ethylene-oxide)/keratin blend films. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 89(2), 601-608.

191. Tran, C. D., & Mututuvvari, T. M. (2015). Cellulose, chitosan, and keratin composite materials. Controlled drug release. *Langmuir*, 31(4), 1516-1526.

192. Tsuda, Y., & Nomura, Y. (2014). Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. *Animal science journal*, 85(2), 180-185.

193. Turan, N. G. (2011). Metal uptake from aqueous leachate of poultry litter by natural zeolite. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 30(2), 152-159.

194. Unnikrishnan, G., & Ramasamy, V. (2020). Extraction of Keratin from Human Hair with Production of Biofertilizer from Waste Liquid of Hair Extraction and its Efficient Application on Growth Yield of *Abelmoschus esculentus* L. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 9(2), 119.
195. Vaena de Avalos, S. Ceramides, S. Vaena de Avalos, J. A. Jones, Y. A. Hannun; ed. A. Nicolaou and G. G. Kokotos (2004). Bioactive Lipids. *The Oily Press, Bridgwater*. 135–167.
196. Varesano, A., Aluigi, A., Vineis, C., & Tonin, C. (2008). Study on the shear viscosity behavior of keratin/PEO blends for nanofibre electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 46(12), 1193-1201.
197. Vasconcelos, A., Freddi, G., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules*, 9(4), 1299-1305.
198. Vaz, J. M., Pezzoli, D., Chevallier, P., Campelo, C. S., Candiani, G., & Mantovani, D. (2018). Antibacterial coatings based on chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. *Current pharmaceutical design*, 24(8), 866-885.
199. Veerasubramanian, P. K., Thangavel, P., Kannan, R., Chakraborty, S., Ramachandran, B., Suguna, L., & Muthuvijayan, V. (2018). An investigation of konjac glucomannan-keratin hydrogel scaffold loaded with *Avena sativa* extracts for diabetic wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 165, 92-102.
200. Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A., & Obeid, L. M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30701-30708.
201. Verma, V., Verma, P., Ray, P., & Ray, A. R. (2008). Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications. *Biomedical materials*, 3(2), 025007.
202. Vineis, C., Varesano, A., Varchi, G., & Aluigi, A. (2019). Extraction and characterization of keratin from different biomasses. In *Keratin as a Protein Biopolymer* (pp. 35-76). Springer, Cham.

203. Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., & Meyers, M. A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229-318.
204. Wang, J., Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27 (2), 195-226.
205. Wong, S. Y., Lee, C. C., Ashrafzadeh, A., Junit, S. M., Abraham, N., & Hashim, O. H. (2016). A high-yield two-hour protocol for extraction of human hair shaft proteins. *PloS one*, 11(10), 0164993.
206. Wrześniewska-Tosik, K., Wawro, D., Ratajska, M., Stęplewski, W. (2007). Novel composites with feather keratin. *Fibres Text. East. Eur.* 15, 157–162.
207. Wu, S., Chen, X., Yi, M., Ge, J., Yin, G., & Li, X. (2018). Improving the water resistance and mechanical properties of feather keratin/polyvinyl alcohol/tris (hydroxymethyl) aminomethane blend films by cross-linking with transglutaminase, cacl₂, and genipin. *Materials*, 11(11), 2203.
208. Wu, Y. L., Lin, C. W., Cheng, N. C., Yang, K. C., & Yu, J. (2017). Modulation of keratin in adhesion, proliferation, adipogenic, and osteogenic differentiation of porcine adipose-derived stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(1), 180-192.
209. Xi, Z., & Chen, B. (2014). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution by raw and modified plant residue materials as biosorbents. *Journal of environmental sciences*, 26(4), 737-748.
210. Xie, H., Li, S., & Zhang, S. (2005). Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers. *Green Chemistry*, 7(8), 606-608.
211. Xu, H., Ma, Z., & Yang, Y. (2014). Dissolution and regeneration of wool via controlled disintegration and disentanglement of highly crosslinked keratin. *Journal of Materials Science*, 49(21), 7513-7521.
212. Yakout, S. M., & Daifullah, A. A. M. (2013). Removal of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution onto various adsorbent materials. *Desalination and Water Treatment*, 51(34-36), 6711-6718.

213. Yamauchi, K., Yamauchi, A., Kusunoki, T., Kohda, A., & Konishi, Y. (1996). Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 31 (4), 439-444.
214. Yang, F. C., Zhang, Y., & Rheinstädter, M. C. (2014). The structure of people's hair. *PeerJ*, 2, 619.
215. Yang, Y., Chen, J., Migliaresi, C., & Motta, A. (2020). Natural Fibrous Protein for Advanced Tissue Engineering Applications: Focusing on Silk Fibroin and Keratin. In *Bioinspired Biomaterials*, 39-49.
216. Ye, J. P., Gong, J. S., Su, C., Liu, Y. G., Jiang, M., Pan, H., & Shi, J. S. (2020). Fabrication and characterization of high molecular keratin based nanofibrous membranes for wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 194, 111158.
217. Ymazaki, J., & Maeda, K. (2018). Analysis of lipids in the medulla of Japanese hair and their function. *Cosmetics*, 5(2), 27.
218. Yu, Y., Yang, W., Wang, B., & Meyers, M. A. (2017). Structure and mechanical behavior of human hair. *Materials Science and Engineering: C*, 73, 152-163.
219. Yue, K., Liu, Y., Byambaa, B., Singh, V., Liu, W., Li, X., & Khademhosseini, A. (2018). Visible light crosslinkable human hair keratin hydrogels. *Bioengineering & translational medicine*, 3 (1), 37-48.
220. Zhang, H., Carrillo, F., López-Mesas, M., & Palet, C. (2019). Valorization of keratin biofibers for removing heavy metals from aqueous solutions. *Textile research journal*, 89 (7), 1153-1165.
221. Zhang, Y., Zhao, W., & Yang, R. (2015). Steam flash explosion assisted dissolution of keratin from feathers. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(9), 2036-2042.
222. Zhu, W., Qian, X., Yu, H., Li, X., & Song, K. (2020). Fabrication of mechanical robust keratin adsorbent by induced molecular network transition and its

dye adsorption performance. *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (33), 41577-41584.

223. Zoccola, M., Tonin, C., Aluigi, A., Varesano, A., Montarsolo, A., Vineis, C., & Zimbardi, F. (2006). Study on the conversion of wool keratin by steam explosion. *Biomacromolecules*, 7 (12), 3499-3504.

224. Zoccola, M., Aluigi, A., Patrucco, A., Vineis, C., Forlini, F., Locatelli, P., & Tonin, C. (2012). Microwave-assisted chemical-free hydrolysis of wool keratin. *Textile Research Journal*, 82 (19), 2006-2018.

225. Zoccola, M., Aluigi, A., Vineis, C., Tonin, C., Ferrero, F., & Piacentino, M. G. (2008). Study on cast membranes and electrospun nanofibers made from keratin/fibroin blends. *Biomacromolecules*, 9 (10), 2819-2825.

Додаток А



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з науково-педагогічної роботи
Національного університету
«Львівська політехніка»
Давидчак О. Р.
2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Методичні рекомендації щодо отримання регенованого кератину з вовни та волоса людини та створення на його основі біоматеріалів функціонального призначення.

2. Ким запропоновано: лабораторією обміну речовин ім. С. З. Гжицького Інституту біології тварин НААН (м. Львів, вул. В. Стуса, 38)

Автори: Михалюк В. В.

3. Джерело інформації:

3.1. Михалюк В., Гавриляк В. Методи екстракції кератинів з вовни та волосся та перспективи їх застосування в біомедицині та біоінженерії // Біологічні студії, 2019: 13 (2); 117–130.

3.2. Havryliak, V., Mykhaliuk, V., Petrina, R., Fedorova, O., Lubenets, V., Novikov, V. Adsorbents Based on Keratin for Lead and Cadmium Removal // Current Applied Science and Technology (CAST), 2020, 20 (1), 136-143.

3.3. Havryliak V., Mykhaliuk V. The comparative analysis of the methods for keratin extraction from wool and human hair. // Біологія тварин. – 2020. – №. 22, № 4. – С. 9-12.

4. Рекомендовано впровадити: у навчальний процес кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Інституту хімії та хімічних технологій Національного університету «Львівська політехніка» у лекційні курси «Біохімія», «Біотехнологія білків», «Біополімери в промисловості та медицині», «Сировинна база біотехнологій та біоутилізація відходів» при вивченні відповідних тем.

5. Термін впровадження: «5»лютого 2021 року.

6. Ефективність впровадження відповідно до критеріїв, що викладені в п.3

Показники	За даними	
	розробників	установи, що затверджує
Оптимізовані методи отримання регенованого кератину дозволять використати його при створенні біосорбентів для елімінації важких металів та біосумісних плівок для регенеративної медицини, а також розв'язати екологічну проблему утилізації відходів у вигляді низькоякісної вовни та інших кератинізованих структур.		

7. Зауваження, пропозиції: не має.

Відповідальний за впровадження:

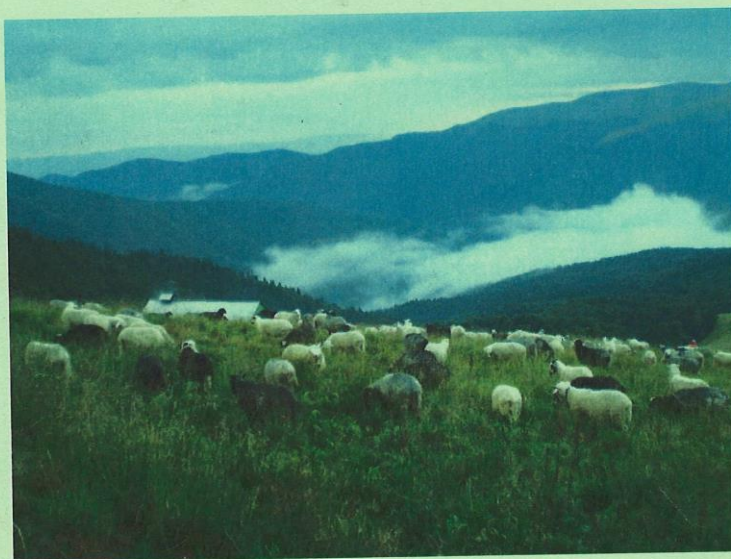
В.о. завідувача кафедри
технології біологічно активних
сполук, фармації та біотехнології
Національного університету «Львівська політехніка»
д.х.н., проф.

 В.І. Лубенець

Додаток Б

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ



Методи модифікації вовняних волокон

ЛЬВІВ-2018