

11. Rope M., Isensee R. W., Joseph L. Derivatives of 2-phenylbenzimidazole. *Journal American Chemical Society*, 1952, vol. 74, no. 4, pp. 1095–1096.

12. Nakaz MOZ Ukrainy № 167 vid 05.04.2007 «Pro zatverdzhennia metodichnykh vkazivok shchodo vyznachennia chutlyvosti mikroorganizmiv do antybakterialnykh preparativ»

[Order of MOH of Ukraine № 167 of 05.04.2007 «On the approval of guidelines to determine the sensitivity of microorganisms to antibiotics»]. Kyiv, Ministry of Health of Ukraine, 2007. 63 p. (in Ukrainian).

УДК 611.781: 616.594.1

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ КЕРАТИНУ НОРМАЛЬНИХ І ПАТОЛОГІЧНО СТОНШЕНИХ ВОВНЯНИХ ВОЛОКОН

В. В. Гавриляк¹, Г. М. Седіло²
havvita@ukr.net

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

²Інститут землеробства і тваринництва західного регіону НААН, Україна, Львівська обл., 81115, с. Оброшино, вул. Грушевського

У статті описано метод фракціонування вовняних волокон, який дозволяє отримати та кількісно охарактеризувати чотири фракції протеїнів.

Для досліджень використовували нормальні та патологічно стоншені ділянки вовняних волокон асканійських кросбредних вівцематок.

За дії відновника різних концентрацій у поєднанні із аніонним детергентом із вовняного волокна виділено фракції протеїнів матриксу, мікрофібрил, високомолекулярних білків та кутикули.

За допомогою електрофоретичного аналізу було показано, що у зоні білків із молекулярною масою 50–40 кДа, які відповідають протеїнам мікрофібрил, виявлено 2 поліпептидні ланцюги, які відповідають I типу і II типу інтермедіальних філаментів. У низькомолекулярній ділянці виявлено смуги матриксних або кератин-асоційованих протеїнів із молекулярною масою 30–10 кДа. Вище від зони мікрофібрилярних протеїнів розміщена смуга, яка відповідає мінорному білковому компоненту із молекулярною масою 100 кДа. Ці дані свідчать, що

електрофоретичний профіль кератину вовняного волокна відповідає його структурним компонентам, отриманим за допомогою фракціонування.

За допомогою описаного методу проведено аналіз співвідношення різних протеїнових компонентів у вовняних волокнах за норми та патологічного стоншення. Показано, що така вада вовняного волокна, як патологічне стоншення, характеризується вірогідним зменшенням вмісту матриксних або кератин-асоційованих протеїнів, що вказує на перерозподіл кристалічної та аморфної фаз у волокні.

Цей метод може бути застосований для аналізу структурних змін у кератинових волокнах за дії різноманітних аліментарних, фізичних чи хімічних чинників.

Ключові слова: ВОВНЯНЕ ВОЛОКНО, КЕРАТИН, ФРАКЦІОНУВАННЯ, МАТРИКСНІ ПРОТЕЇНИ, ПРОТЕЇНИ МІКРОФІБРИЛ, ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНІ ПРОТЕЇНИ, КУТИКУЛА

KERATIN STRUCTURAL ORGANISATION OF NORMAL AND PATHOLOGICAL THINNED WOOL FIBERS

V. V. Havrylyak¹, H. M. Sedilo²
havvita@ukr.net

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

²Institute of Agriculture of Carpathian region NAAS, Hrushevskoho str., Obroshyno village, Lviv region, 81115, Ukraine

The method of wool fiber extraction that allows quantifies four protein fractions has been described in the paper.

For analysis normal and pathologically thinned wool fibers of Askanian crossbred ewes were used.

Using a combination of reducing agent with different concentration and anionic detergent matrix protein, microfibrils protein, high molecular mass protein and cuticle residue were isolated from wool fibers.

Obtained proteins were analyzed by SDS-electrophoresis. The protein fraction was composed of microfibril keratins with molecular mass of 40–50 kDa, matrix or keratin-associated protein with a molecular mass of 10–30 kDa and high molecular mass minor protein component (100 kDa). These data indicate that the electrophoretic profile of wool fiber keratin

consistent with its structural components, obtained by extraction.

The correlation of different protein components in the normal and pathological thinned wool fibers was investigated. It was shown that such defect wool fiber as a thinning characterized by decrease of matrix or keratin-associated proteins, indicating a redistribution of the crystalline and amorphous phases in the fiber.

This method can be applied to analyze the structural changes of keratin fibers component damaged due different nutritional, physical or chemical factors.

Key words: WOOL FIBRE, KERATIN, FRACTIONING, MATRIX PROTEINS, MICROFIBRIL PROTEINS, HIGH MOLECULAR WEIGHT PROTEINS, CUTICLE

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КЕРАТИНА НОРМАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИ УТОНЕННЫХ ШЕРСТНЫХ ВОЛОКОН

В. В. Гавриляк¹, Г. М. Седило²
havvita@ukr.net

¹Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38, г. Львов, 79034 Украина

²Институт земледелия и животноводства Карпатского региона НААН Украины, ул. Грушевского, с. Оброшино, Львовская обл., 81115 Украина

В статье описан метод фракционирования шерстных волокон, который позволяет получить и количественно охарактеризовать четыре фракции протеинов.

В эксперименте использовали нормальные и патологически утоненные участки шерстных волокон асканийских кроссбредных овцематок.

Под воздействием восстановителя в различных концентрациях и в сочетании с анионным детергентом с шерстного волокна

выделено фракцию матричных, микрофибрилярных и высокомолекулярных протеинов, а также кутикулы.

Электрофоретический анализ показал, что в зоне протеинов с молекулярной массой 50–40 кДа, которые соответствуют микрофибрилярным белкам, выявлено 2 полипептидные цепи, отвечающие интермедиальным филаментам I типа и II типа. В низкомолекулярной зоне обнаружены полосы матричных или кератин-ассоциированных протеинов с молекулярной

массой 30–10 кДа. Выше полосы микрофибриллярных протеинов обнаружена зона минорного белкового компонента с молекулярным весом 100 кДа. Эти данные свидетельствуют, что электрофоретический профиль кератина шерстного волокна соответствует его структурным компонентам, полученным с помощью фракционирования.

С помощью описанного метода проведен анализ соотношения различных протеиновых компонентов в шерстных волокнах в норме и патологически утоненных. Показано, что такой дефект шерстного волокна, как утонение, отличается достоверным уменьшением содержания матриксных или кератин-ассоциированных протеинов, что указывает на перераспределение кристаллической и аморфной фаз в волокне.

Данный метод может быть применен для анализа структурных изменений в кератиновых волокнах под воздействием различных алиментарных, физических или химических факторов.

Ключевые слова: ШЕРСТНОЕ ВОЛОКНО, КЕРАТИН, ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ, МАТРИКСНЫЕ ПРОТЕИНЫ, ПРОТЕИНЫ МИКРОФИБРИЛЛ, ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БЕЛКИ, КУТИКУЛА

Загальновідомо, що вовна на 95 % складається із кератину. Завдяки внутрішньомолекулярним дисульфідним зв'язкам та між- і внутрішньомолекулярним зв'язкам, утвореним полярними і неполярними амінокислотами, тверді кератини надзвичайно міцні і нерозчинні у воді та різних органічних розчинниках, що утруднює їх виділення [1].

Основну частину вовняного волокна становить кортекс, який складається із веретеноподібних клітин, побудованих із протеїнів інтермедіальних філаментів з переважаючою α -спіральною структурою і занурених у аморфний матрикс кератин-асоційованих протеїнів.

Протеїни, виділені із вовни, складаються із двох основних фракцій. Одна із них характеризується високою молекулярною масою та низьким вмістом сульфуру порівняно з інтактною вовною і має мікрофібрилярне походження. Інша фракція протеїнів має меншу молекулярну масу і містить більше сульфуру, ніж волокно. Це група матриксних або кератин-асоційованих протеїнів, які у свою чергу поділяються на протеїни з високим вмістом сульфуру та протеїни з високим вмістом тирозину та гліцину. Дослідження структури кератинів можливе лише після їх переведення у розчин шляхом попереднього розщеплення –S-S-зв'язків за допомогою відновлення, окислення чи сульфїтолізу [2]. Подальше розділення цих протеїнів здійснювали методами, описаними у роботах [3, 4].

Мета нашої роботи полягала у адаптації методу фракціонування кератину, запропонованого Kon et al. [5], який дає змогу розділити і кількісно оцінити чотири фракції протеїнів вовняного волокна та проаналізувати співвідношення його структурних компонентів волокна у нормі та при патологічному стоншенні.

Матеріали і методи

Для досліджень була використана вовна асканійських кросбредних вівцематок Інституту тваринництва степових районів ім. М. Ф. Іванова «Асканія-Нова». Із штапелів руна для аналізу відбирали ділянки із нормальною тониною та ознаками патологічного стоншенням.

Вовну промивали у нейтральному розчині, споліскували водою та висушували. Поверхневі ліпіди екстрагували в апараті Сокслетта тетрахлорметаном впродовж 5 годин, а потім сумішшю етилового спирту і діетилового ефіру (1:1, v/v).

Фракціонування вовняних волокон проводили відповідно до методу Kon et al. [5]. Для цього зразки знежиреної вовни поміщали у 25 мМ трис-НСІ буфер (pH 8,3),

що містив 1 % додецилсульфату натрію (SDS) та 2 М 2-меркаптоетанолу (2-ME). Екстракцію матричних протеїнів проводили протягом 3 діб за температури 50 °С. Мікрофібрилярні протеїни екстрагували сумішшю, що вміщувала 25 мМ трис-НСІ буфер, (рН 8,3), 1 % SDS та 0,4 М 2-ME. Тривалість екстракції становила 3 доби за температури 50 °С. Для екстрагування високомолекулярних протеїнів залишок волокна поміщали у 25 мМ трис-НСІ буфер (рН 8,3), що містив 1 % SDS та 0,2 М дитіотреїтолу (DTT). Після кожного екстрагування волокно промивали, висушували і зважували. Нерозчинний залишок ідентифікували як кутикулу волокна.

Для електрофоретичних досліджень екстракцію кератину проводили за методом, описаним [6]. Волокна поміщали у 25 мМ трис-НСІ буфер (рН 8,5), який містив 2.6 М тіосечовину, 5 М сечовину, 5 % 2-ME за температури 50 °С протягом 3 діб. Після фільтрування розчин діалізували протягом 3 діб та центрифугували при 15 000 g протягом 20 хв. Електрофоретичне розділення білків проводили у 12,5 % ПААГ у присутності 0,1 % SDS відповідно до загальноприйнятої методики [7].

Вміст розчинних білків у загальному екстракті, а також у фракціях матричних, мікрофібрилярних та високомолекулярних протеїнів визначали за допомогою методу Бредфорда [8].

Співвідношення об'єму екстрактивного середовища до маси волокна становить 100:1.

Результати досліджень опрацьовували статистично з використанням середнього арифметичного та стандартної похибки ($M \pm m$) та достовірного інтервалу для оцінки ступеня вірогідності (P) за допомогою критерію Стьюдента (t). Розбіжності вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

Результати й обговорення

Як було зазначено вище, застосований нами метод дає змогу виділити і кількісно оцінити вміст чотирьох фракцій кератину, не потребує спеціального обладнання і придатний для серійних досліджень. Оскільки даний метод не є широко вживаним, тому для зручності ми вважаємо за доцільне представити його схематично (рис. 1).



Рис. 1. Схема фракціонування вовняного волокна

Особливість цього методу полягає у дії на волокно відновника у різних концентраціях у поєднанні із аніонним детергентом. У результаті впливу на волокно 2-МЕ у високих концентраціях екстрагуються матриксні протеїни, тоді як білки мікрофібрил можна виділити за допомогою 0,4 М 2-МЕ. При використанні ДТТ, сильнішого відновника, ніж 2-МЕ, була отримана фракція з молекулярною масою в межах 100 кДа, яка відповідає високомолекулярним протеїнам. Такі особливості екстракції, очевидно, пов'язані із залежністю денатурувальної здатності аніонних сурфактантів від концентрації відновника.

Літературні дані свідчать, що цей метод придатний для аналізу структурних змін у волоссі при пошкодженнях, викликаних дією фізичних та хімічних чинників [5]. У зв'язку з цим нам було цікаво проаналізувати співвідношення різних структурних елементів вовняного волокна, отриманих шляхом фракціонування, за норми та патологічного стоншення.

У своїх попередніх роботах ми показали, що така патологія вовняного волокна, як «голодна тонина», пов'язана із порушенням балансу сульфуровмісних сполук, а також змінами у амінокислотному та ліпідному складі [9–11]. Результати фракціонування вовняних волокон (таблиця), свідчать, що на кортикальні

протеїни вовни припадає понад 60 % від їх маси, тоді як вміст протеїнів матриксу становить до 30 %. Вміст розчинних білків у екстрактах матриксних білків коливається від 0,43 мг/мл до 0,55 мг/мл і в середньому становить 0,50 мг/мл, для мікрофібрилярних білків — 0,83— 0,90 мг/мл (середнє 0,86 мг/мл) і для високомолекулярних протеїнів — 0,63–0,69 мг/мл (середнє 0,66 мг/мл).

Після постадійної екстракції цих груп протеїнів залишається кутикулярний залишок, вміст якого коливається у межах 13 %. Такі дані узгоджуються із результатами, отриманими при розділенні вовняного волокна на кератоци — протеїнові фракції, виділені після попереднього окислення вовни [9].

У результаті проведених досліджень показано, що вовна з ознаками «голодної тонини» характеризується меншою кількістю (на 12 %) матриксних або, згідно із сучасною класифікацією, кератин-асоційованих протеїнів, які характеризуються високим вмістом сульфуру. Одночасно спостерігається тенденція до збільшення частки мікрофібрилярних протеїнів, так званих інтермедіальних філаментів, для яких характерний низький вміст сульфуру. Вміст високомолекулярних протеїнів та кутикули як у нормальних, так і патологічно стоншених волокнах є однаковим.

Таблиця

Структурні особливості нормальних і патологічно стоншених вовняних волокон, % (M±m, n=5)

Структурний елемент	Вовняне волокно	
	Нормальне	Патологічно стоншене
Матриксні протеїни	29,84±0,57	26,19±0,77*
Мікрофібрилярні протеїни	50,37±1,02	52,60±1,12
Високомолекулярні протеїни	8,02±0,85	8,56±0,61
Кутикула	11,77±0,70	12,65±0,89

Примітка: * — статистично вірогідні різниці ($P \leq 0,05-0,001$) між нормальним та патологічно стоншеним волокном

Отримані дані свідчать про те, що у вовняних волокнах із ознаками патологічного стоншення змінюється співвідношення між різними фазами

волокна, на що вказує співвідношення між його кристалічною та аморфною фазами (відповідно 2,01 та 1,69).

Оскільки досліджувані групи протеїнів відрізняються між собою за молекулярною масою, нами було проведено їх розділення за допомогою електрофорезу. Якісна характеристика цих білків представлена на рисунку 2.

За допомогою електрофоретичного аналізу було показано наявність 2 поліпептидних ланцюгів у зоні протеїнів із молекулярною масою 50–40 кДа, які відповідають типу I і типу II інтермедіальних філаментів або протеїнам

мікрофібрил. У низькомолекулярній ділянці виявлено смуги протеїнів із молекулярною масою 30–10 кДа. Це матриксні або кератин-асоційовані протеїни, які у волокні виконують роль своєрідного внутрішньоклітинного цементу, забезпечуючи його міцність. Крім того на електрофореграмі вище від смуги мікрофібрилярних протеїнів розміщена зона, яка відповідає мінорному білковому компоненту із молекулярною масою 100 кДа.

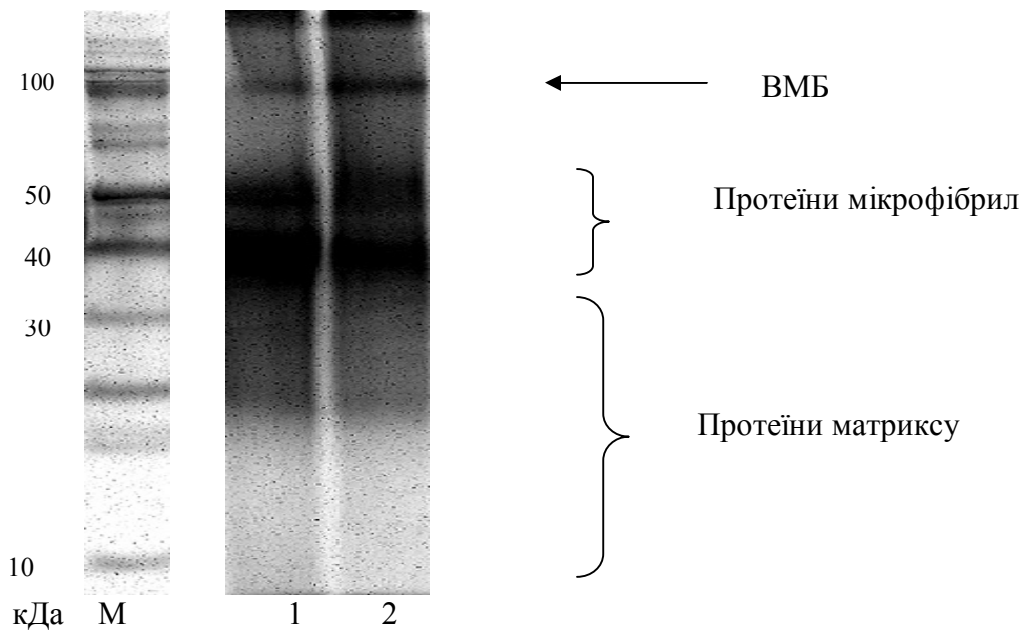


Рис. 2. Електрофоретичний профіль білків вовняних волокон
 М — маркер молекулярних мас (10-200 кДа), ВМБ — високомолекулярні протеїни
 1 — патологічно стоншене волокно; 2 — нормальне волокно

Отримані дані свідчать, що електрофоретичний профіль кератину вовняного волокна відповідає його структурним компонентам, отриманим за допомогою фракціонування.

Отже, цей метод може бути застосований для аналізу структурних змін у кератинових волокнах за дії різноманітних аліментарних, фізичних чи хімічних чинників.

Висновки

1. Описаний метод фракціонування кератину вовняного волокна дозволяє кількісно оцінити його структурні

компоненти. Показано, що використання 2-МЕ у різних концентраціях у поєднанні із аніонним детергентом забезпечує ефективне розділення протеїнів на чотири фракції.

2. Встановлено вірогідне зменшення кількості матриксних протеїнів у патологічно стоншених волокнах, що свідчить про відмінності у співвідношенні між аморфною та кристалічною фазами нормальної та дефектної вовни. Статистично достовірних змін стосовно інших фракцій не виявлено.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно продовжити дослідження з використанням описаного методу для оцінювання структурних змін кератину у різних модельних системах пошкодження волоса.

1. Zahn H., Wortman F. J., Wortman G. *Wool* —Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2005. 31 p.

2. Cardamone J. Investigation the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR). *J. of Molecular Structure*. 2012, 969, pp. 97–105.

3. Gillespie J. M. *The Structural Proteins of Hair: Isolation, characterization, and regulation of biosynthesis*. In Physiology, biochemistry and molecular biology of skin: Oxford, 1991. P. 625–658.

4. Plowman J. E., Flanagan L. M., Paton L. N., Fitzgerald A.C., Joyce N.I., Bryson W.G. The effect of oxidation or alkylation on the separation of wool keratin proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 2003, 3 (6), pp. 942–950.

5. Kon R., Nakamura A., Hirabayashi N., Takeuchi K. Analysis of damaged components of permed hair using biochemical technique. *J. of Cosmetic Sciences*. 1998, 49, pp. 13–22.

6. Nakamura A., Arimoto M., Takeuchi K., Fujii T. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, p. 569.

7. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T₄. *Nature*. 1970, 227, (1), pp. 680–685.

8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, pp. 248–254.

9. Havrylyak V. V. Morfostrukturni ta khimichni zminy vovnyanoho volokna v normi ta patolohiyi [Morphostructural and chemical changes of wool fiber in norm and pathology]. *Visnyk Luhans'koho natsional'noho universytetu imeni Tarasa Shevchenka — Bulletin of Luhansk National University named by Taras Shevchenko*, 2012, V.17, 252, pp. 31–37 (in Ukrainian).

10. Havrylyak V. V., Sedilo H. M. Zminy aminokyslotnoho ta mineral'noho skladu keratynu vovnyanykh volokon za normy ta patolohichnoho stonshennya [Changes of amino acids and mineral composition of wool fiber for norm and pathological thinning]. *Naukovi dopovidi Nats. Universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannya — Scientific posters of National University of life and environmental sciences*. 2011, 5 (27) http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_5/11gvv.pdf (in Ukrainian).

11. Havrylyak V. V., Tkachuk V. M. Zhyrnokyslotnyy sklad strukturnykh lipidiv normal'nykh i patolohichno zminenykh vovnyanykh volokon [Fatty acid composition of structural lipid of normal and abnormal wool fibres] *Ukr. biokhim. zhurnal — Ukrainian Biochemical Journal*, 2012, V. 84, №5, pp. 106–111 (in Ukrainian).