

ЛІТЕРАТУРА

1. Лисовская С.А. Изменение вирулентности и резистентности *Candida albicans* в микробных ассоциациях / С.А. Лисовская, Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – № 2. – С. 104-105.
2. Немченко О. О. Зміни мікроценотичних та імунологічних показників здоров'я населення за дії техногенного забруднення / О. О. Немченко // Актуальні проблеми медицини, фармації та біології. – 2006. – № 2. – С. 7-15.
3. Mertz D. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations / D. Mertz, R. Frei, N. Periat // Arch. Intern. Med. – 2009. – V. 169. – P.172-178.
4. Тюрин Ю.А. Действие протеаз клинических изолятов *Candida albicans* на поверхностные рецепторы лимфоцитов человека / Ю.А. Тюрин, Т.В. Григорьева // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – № 1. – С. 64-66.
5. Шабашова Н.В. Хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек и иммуногенетические механизмы врожденной чувствительности макроорганизма к *Candida spp.* / Н.В. Шабашова // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – № 4. – С. 64-66.

УДК 611.781:616.594.1.

ВПЛИВ ОКСИДАЦІЙНОГО СТРЕСУ НА СТРУКТУРНУ ОРГАНІЗАЦІЮ КЕРАТИНУ ВОЛОСА ЛЮДИНИ

Гавриляк В. В., к. с.-г. н., провідний наук. співробітник

Інститут біології тварин НААН

Досліджували зміни в структурі кератину за дії оксидативного стресу, викликаного хімічною обробкою волоса людини. Встановлено, що ступінь дегамінації кутикули залежить від тривалості обробки волоса, а між вмістом кутикули та її деградацією існує обернений зв'язок ($r = -0,98$). Оксидативний стрес, спричинений хімічною обробкою, супроводжується змінами в структурній організації кератину волоса. На основі експериментальних даних встановлено вірогідне зменшення матриксних протеїнів та кутикули волокна та підвищення кількості високомолекулярних протеїнів. Вміст мікрофібрилярних протеїнів не зазнає змін. Встановлено, що найхарактерніші зміни спостерігали після 90-хвилинної обробки волоса.

Ключові слова: волос, кератин, кутикула, матриксні протеїни, мікрофібрилярні протеїни, високомолекулярні протеїни, оксидативний стрес.

Гавриляк В. В. ВЛИЯНИЕ ОКСИДАЦИОННОГО СТРЕССА НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ КЕРАТИНА ВОЛОСА ЧЕЛОВЕКА/ Институт биологии животных НААН, Украина.

Исследовали изменения в структуре кератина под воздействием оксидационного стресса, вызванного химической обработкой волоса человека. Установлено, что дегаминация кутикулы зависит от продолжительности обработки волоса, а между содержанием кутикулы и ее деградацией существует обратная связь ($r = -0,98$). Оксидационный стресс, вызванный химической обработкой, сопровождается изменениями в структурной организации кератина волоса. На основе экспериментальных данных показано достоверное уменьшение матриксных протеинов и кутикулы волокна и повышение количества высокомолекулярных протеинов. Содержание микрофибрилярных протеинов не изменялось. Установлено, что наиболее характерные изменения наблюдали после 90-минутной обработки волоса.

Ключевые слова: волос, кератин, кутикула, матриксные протеины, микрофибрилярные протеины, высокомолекулярные протеины, оксидационный стресс.

Havrylyak V. V. THE EFFECT OF OXIDATION STRESS ON THE STRUCTURAL ORGANISATION OF HUMAN HAIR KERATIN /Institute of Animal Biology NAAS, Ukraine

The changes in the keratin structure after oxidation stress caused by chemical processing of human hair were investigated. It was found that the degree of cuticle delamination depends on the treatment duration of hair, and between the cuticle content and its degradation is inverse relationship ($r = -0,98$). Oxidation stress caused by chemical treatments is accompanied by changes in the structural organization of keratin hair. Based on the experimental data it was established the decrease of matrix protein and cuticle and the increase of amount of high molecular weight proteins. Microfibril proteins are unchanged. It was found that the most characteristic changes in hair structure were observed after 90-minute of treatment.

Key words: hair, keratin, cuticle, matrix proteins, microfibril proteins, high molecular weight proteins, oxidation stress

ВСТУП

Волос людини є складною мультикомпонентною системою. Відповідно до сучасних уявлень [1–3] кератинове волокно можна представити у вигляді системи, що має такі структурні рівні: – макроскопічний, структурними елементами якого є кутикула та кортекс із розмірами понад 10 мкм; клітинний, структурні елементи якого – клітини розміром понад 1 мкм; фібрилярний, елементами якого є фібрили розміром понад 10 нм; атомарний, структурні елементи якого – атоми та групи кератинових ланцюгів із розміром 0,1-1 нм.

Отже, морфологічно волос людини можна розділити на такі структурні компоненти, як кутикула, кортекс і серцевина. Серцевина, діаметр якої коливається в межах 5–10 мкм, утворена нещільно упакованими кератинізованими клітинами і не завжди присутня у волосі.

Кортекс, товщиною 45-90 мкм, становить до 90 % маси волокна. Він складається з макрофібрил, побудованих із мікрофібрил або інтермедіальних філаментів. Мікрофібрили становлять основну частину волоса і формують кристалічну фазу кератину. Вони занурені в аморфне середовище, так званий матрикс, утворений із трьох груп протеїнів: із високим та ультрависоким вмістом сульфуру та білків із високим вмістом тирозину і гліцину [2, 4].

Матриксні протеїни взаємодіють з інтермедіальними філаментами шляхом утворення міжмолекулярних дисульфідних зв'язків, які надають кератину волоса механічної стійкості та твердості. У клітинах кортексу знаходиться пігмент меланін, який не лише забезпечує фотохімічний захист протеїнів та ліпідів шляхом адсорбції УФ-променів, але й є своєрідним скавенджером для реакційно здатних форм кисню [5].

Зовнішній шар волоса – кутикула (менш ніж 5 мкм у товщину) у свою чергу складається із 4-х структурних компонентів, відмінних між собою за хімічним складом. Поверхня кутикулярних клітин вкрита тонким ліпідним шаром, утвореним 18-метилейкозеновою кислотою (18-МЕК). Ця антеїзорозгалужена жирна кислота відіграє істотну роль, забезпечуючи формування гідрофобного бар'єра на поверхні волоса. Відомо, що різноманітні хімічні обробки зумовлюють видалення 18-МЕК з епікутикули і є однією із причин пошкодження волоса [6].

Волос складається із кератину – групи нерозчинних білків, які залежно від вмісту води у волокні становлять від 65 до 95 % його маси. Відомо, що стреси, захворювання, хімічна обробка, атмосферні впливи можуть викликати зміни в кератині волоса і призводити до аномалій у його структурі [7–10].

На сьогодні в літературі описано чимало моделей, які характеризують пошкодження кератинових волокон [11–14], проте відсутня єдина думка щодо молекулярної природи таких ушкоджень.

Краще розуміння механізму взаємодії між кератиновим волокном і хімічним агентом може бути використано також для розробки нових косметичних продуктів.

Для хімічної обробки кератинових волокон часто використовують пероксид водню. Окиснювальна здатність оксиду водню не є дуже високою, проте він легко може перетворюватися з утворенням активних форм кисню, зокрема гідроксильних радикалів із високою окислювальною здатністю.

Мета роботи – вивчити структурні зміни, які відбуваються в кератині волоса у відповідь на дію оксидативного стресу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженнях використовували зразки натурального нефарбованого волосся жінок із середнім діаметром близько 70 мкм, довжиною 10 см. Маса кожного пучка становила приблизно 5 г. Спочатку зразки волосся промивали в 1 % розчині додецилсульфату натрію (ДСН), споліскували деіонізованою водою та висушували за кімнатної температури.

Хімічну обробку проводили шляхом занурення зразків у відбілювальний розчин (співвідношення рідини до волокна становить 50:1) при 37 °С протягом 30, 60, 90 хв. Відбілювальний розчин отримували шляхом змішування розчину А і розчину В у рівних пропорціях. Розчин А містив 10 г сечовини, 7 г NaCl, 12 мл аміаку (28 %), розчинені в 100 мл деіонізованої води. Розчин В (6 % H₂O₂) містив 17,1 мл H₂O₂ і 82,9 мл деіонізованої води. Оброблені зразки волосся промивали деіонізованою водою і сушили за кімнатної температури. Порівнювали інтактне волосся і волосся, оброблене відбілювальним розчином протягом 30, 60 і 90 хв.

Фракціонування волоса проводили відповідно до [9]. Для цього зразки знежиреного волосся поміщали у 25 мМ трис-НСl буфер (рН 8,3), що містив 1 % ДСН та 2 М 2-меркаптоетанол (2-МЕ). За цих умов протягом 3 діб за температури 50 °С екстрагувалися матриксні протеїни. Мікрофібрилярні протеїни екстрагували сумішшю, що містила 25 мМ трис-НСl буфер, (рН 8,3), 1 % ДСН та 0,4 М 2-МЕ. Тривалість екстракції становила 3 доби за температури 50 °С. Для екстрагування високомолекулярних протеїнів залишок волокна поміщали на 6 діб у 25 мМ трис-НСl буфер (рН 8,3), що містив 1 % ДСН та 0,2 М дитіотреїтолу. Після кожного екстрагування волокно промивали, висушували і зважували. Нерозчинний залишок ідентифікували як кутикулу волокна. Співвідношення об'єму екстрактивного середовища до маси волокна становило 100:1.

Для визначення вмісту деламінованої кутикули 200 мг волоса поміщали в пробірки типу фалькон та додавали 10 мл дистильованої води із 0,1 % Твін-20 і струшували при 37 °С протягом 20 год. на шейкері зі швидкістю 200 об/хв. [14]. Отриману суспензію фільтрували через нейлонове сито та вимірювали ОД суспензії кутикули на фотоелектроколориметрі КФК-2 при довжині хвилі 600 нм. Кількість деламінованої кутикули визначали за калібрувальною кривою, побудованою для суспензії кутикули.

Отримані цифрові дані опрацьовували статистично за допомогою програми Microsoft EXCEL та Origin Pro 8.5. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента (t). Розбіжності вважали статистично вірогідними при P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що поверхневий шар волосся, кутикула, складається із черепицеподібних, накладених одна на одну плоских зроговілих клітин, основна функція яких полягає в захисті кортексу від негативних впливів фізичних та хімічних чинників. Щоб оцінити пошкодження кутикули волоса за дії оксидативного стресу, ми визначали ступінь її деламінації.

Результати, представлені на рис. 1, свідчать, що деградація кутикулярного шару залежить від тривалості хімічної обробки.

У результаті проведених досліджень показано, що обробка волоса окислювальним розчином супроводжувалася збільшенням кількості відшарованих кутикулярних клітин, причому максимальний їх вміст спостерігався після 90-хвилинної обробки і був на 39 % більшим у порівнянні з інтактним волокном.

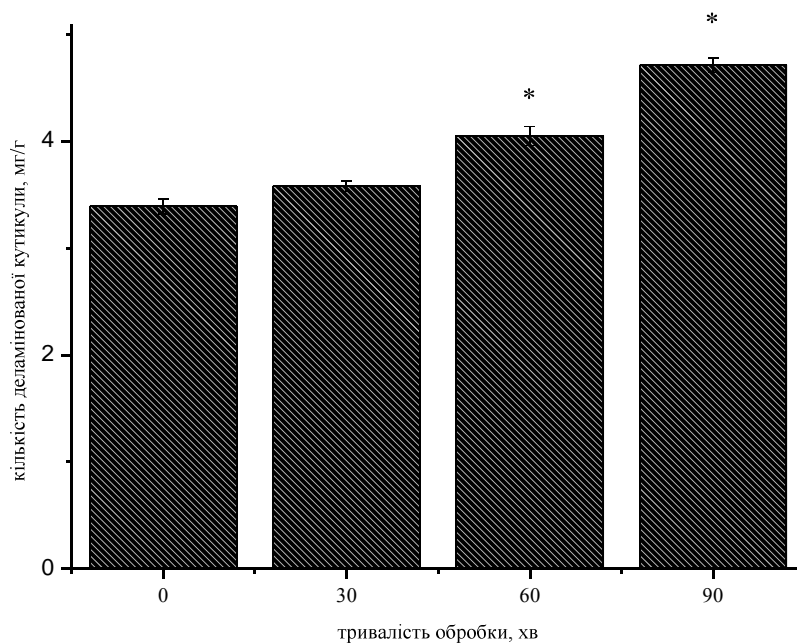


Рис. 1. Кількість деламінованої кутикули залежно від тривалості хімічної обробки волоса людини, мг/г, $M \pm m$, $n=5$. * – відмінності між обробленими і необробленими зразками статистично вірогідні ($P \leq 0,05-0,001$).

Відомо, що для протеїнів кутикули характерна велика кількість дисульфідних та ізопептидних зв'язків. Очевидно, що деструкція цих зв'язків за дії хімічних чинників спричиняє зменшення сили зчеплення між кутикулярними клітинами, яке супроводжується їх ексфоціацією та частковою втратою [13]. Отримані дані підтверджують результати досліджень інших авторів [14], які вказують, що при окислювальних обробках волоса кутикулярні клітини легше фрагментуються.

Відомо, що хімічний стрес призводить не лише до морфологічних змін, але й до відмінностей в амінокислотному та ліпідному складі волоса [2]. Закономірно припустити, що окисдаційний стрес, викликаний дією перексиду водню за підвищеного рН на кератин волоса, може спричинити зміни в його структурній організації.

У результаті фракціонування волоса людини нами було отримано чотири групи протеїнів (табл. 1), які відповідають певним структурним елементам волокна.

Дані, наведені у таблиці, свідчать, що вміст матриксних протеїнів при 30 та 60 хвилинній обробці волоса мав тенденцію до зниження, тоді як 90-хвилинна обробка супроводжувалася вірогідним зменшенням цієї фракції протеїнів. Характерно, що матриксні або кератин-асоційовані білки формують аморфну фазу волокна. До їх складу входять протеїни кортексу та протеїни кутикули з високим вмістом сірки [2].

Ймовірно, що перексид водню, який входить до складу окиснювального розчину, при високому рН генерує реакційний кисень, який спричиняє розрив дисульфідних зв'язків і, як наслідок, елюцію чи денатурацію аморфного матриксу волокна [2].

Таблиця 1 – Співвідношення структурних елементів волоса за дії хімічних факторів, г/100 г (M±m; n=5)

Структурний елемент волоса	Тривалість хімічної обробки, хв			
	0	30	60	90
Матриксні протеїни	30,75±0,94	29,03±1,01	28,79±0,92	27,05±0,74**
Мікрофібрилярні протеїни	45,21±1,29	44,80±1,69	45,88±0,53	46,93±1,28
Високомолекулярні протеїни	7,77±0,83	11,11±1,15*	11,00±0,64**	13,78±1,60**
Кутикула	16,27±1,30	15,06±1,06	14,32±0,52	12,22±0,62**

Примітка: вірогідні різниці показників при обробках порівняно до інтактного волокна: * – $P \leq 0,05$, ** – $P \leq 0,01$

У результаті проведених досліджень було встановлено вірогідне підвищення вмісту високомолекулярних протеїнів у кератині волоса у відповідь на дію хімічного чинника, тоді як зміни в кількості мікрофібрилярних білків були незначні. Зростання кількості високомолекулярних протеїнів, очевидно, може бути пов'язано з формуванням нових зв'язків у вигляді лантіоніну.

Слід відмітити, що в процесі хімічної обробки волоса спостерігалось вірогідне зменшення вмісту кутикули, що дозволило нам припустити наявність зв'язку між ступенем деламінації кутикули та її вмістом у волоссі.

Для підтвердження цього зв'язку нами було проведено кореляційний аналіз. Отримані результати засвідчили (рис. 2), що між вмістом кутикули у волоссі та ступенем її деламінації існує обернено пропорційна залежність, тобто за дії хімічного стресу, викликаного обробкою волоса окислювальним розчином, кількість відшарованої кутикули збільшується, а її вміст у волоссі зменшується ($r = -0,98$).

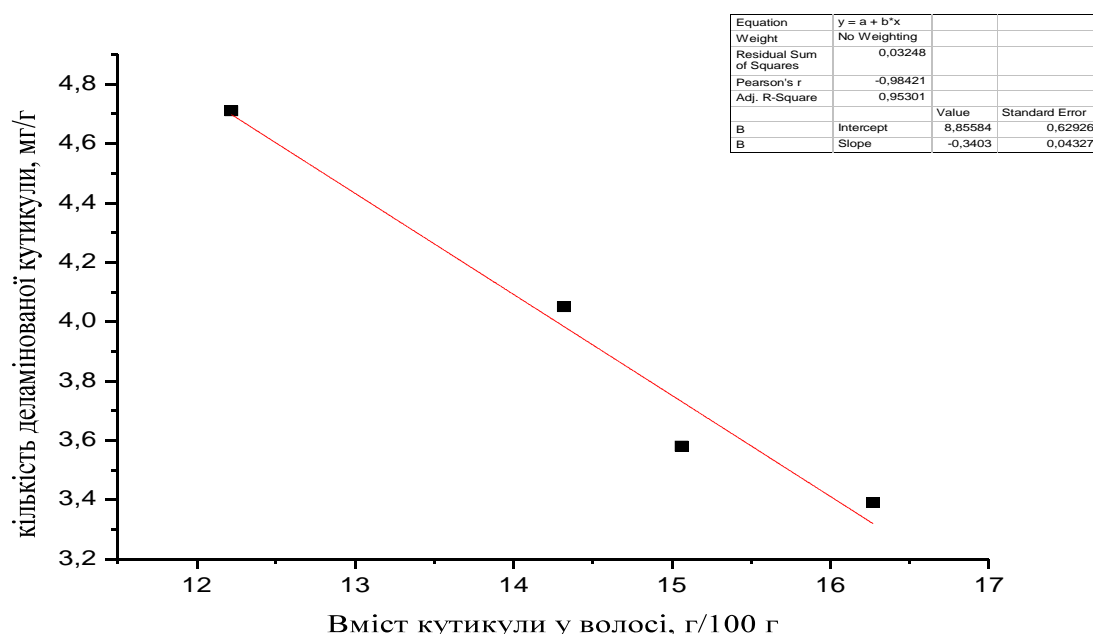


Рис. 2. Залежність між кількістю деламінованої кутикули та її вмістом у волоссі

Перспективою подальшого дослідження є вивчення структурних змін, які відбуваються у кератині волоса під впливом різних хімічних обробок, за допомогою інфрачервоної спектроскопії.

ВИСНОВКИ

1. Ступінь деламінації кутикули залежить від тривалості хімічної обробки волоса. Між вмістом кутикули у волосі та її деградацією існує обернений зв'язок ($r = -0,98$).
2. Оксидативний стрес, спричинений хімічною обробкою, супроводжується змінами в структурній організації кератину волоса людини. Встановлено вірогідне зменшення матриксних протеїнів та кутикули волокна, тоді як кількість високомолекулярних протеїнів при цьому підвищується. Вміст мікрофібрилярних протеїнів не зазнає змін.

ЛІТЕРАТУРА

1. Popescu C. Hair is the most sophisticated biological composite material / C. Popescu, H. Hocker // *Chem. Soc. Rev.* – 2007. – V. 36. – P. 1282–1291.
2. Robbins C. R. Chemical and physical behavior of human hair / C. R. Robbins. – New York, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag., 2012. – 724 p.
3. The location of the thioglycolic acid molecules in intrafibrillar unordered areas of the human hair keratin structure / Y. T. Zabashta, A. V. Kasprova, S. P. Senchurov, Grabovski Y.E. // *Int. J. of Cosm. Sci.* – 2012. – V. 34. – P. 223–225.
4. Biology of Human Hair : Know your Hair to control it / Araujo R., Fernandes M., Cavaco-Paulo A., Gomes A. – Berlin/Heidelberg, 2010. – P. 1–23.
5. Lee W. S. Photoaggravation of hair aging / W. S. Lee // *Int. J. of Trichology.* – 2009. – V. 1 (2). – P. 94–99.
6. Swift J. A. Human hair cuticle: Biologically conspired to the owner's advantage / J.A. Swift // *J. Cosm. Sci.* – 1999. – V. 50. – P. 23–47.
7. Effect of oxidation stress on the mechanical property of human hair / [Akiyama Y., Doi Y., Matsue Y et al.] // *Int. J. of Computation Biosciences.* – 2011. – V. 2. – P. 1–7.
8. Гавриляк В. В. Структурні зміни кератину волоса людини за норми та патології / В.В. Гавриляк, Л. Ю. Сенцев, О. М. Шехович // *Медична хімія.* – 2013. – № 1. – С. 16–19.
9. Kon R. Analysis of damaged components of permed hair using biochemical technique / R. Kon, A. Nakamura, N. Hirabayashi, K. Takeuchi // *J. of Cosmetic Sciences.* – 1998. – V. 49. – P. 13–22.
10. Osorio F. Hair weathering. Part 1. Hair structure and pathogenesis / F. Osorio, A. Tosti // *Cosmet. Dermatol.* – 2011. – V. 24. – P. 533–538.
11. Ahn H. J. An ultrastructural study of hair fiber damage and restoration following treatment with permanent hair dye / H. J. Ahn, W. S. Lee // *Int. J. Dermatol.* – 2002. – V. 41. – P. 88–92.
12. The proteomic profile of hair damage / [Sinclair R., Flagler M., Jones L. et al.] // *Br. J. Derm.* – 2012. – V. 166., Suppl. 2. – P. 27–32
13. Takada K. Influence of Oxidative and/or Reductive Treatment on Human hair (I): analysis of hair damage after Oxidative and/or Reductive Treatment / [Takada K., Nakamura A., Matsuo N. et al.] // *J. of Oleo Science.* – 2003. – V. 52. – № 10. – P. 541–548.
14. Dissimilar effect of perming and bleaching treatments on cuticles: Advanced hair damage model based on elution and oxidation of S100A3 protein / [Kizava K., Inoue T., Yamaguchi M. et al.] // *J. Cosmet. Sci.* – 2005. – V. 56. – P. 219–226.