

## КР–микроспектроскопия человеческого волоса: влияние ориентации образца

Н. Н. Брандт,\* Е. И. Травкина†

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,  
физический факультет, кафедра общей физики и волновых процессов  
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2  
(Поступила в редакцию 27.05.2022; подписана в печать 20.06.2022)*

Несмотря на большое число работ по КР–спектроскопии человеческого волоса, прослеживается недостаток информации о методике проведения экспериментов и достоверности получаемых данных. Существуют различные экспериментальные конфигурации, в которых образец располагается по-разному относительно возбуждающего излучения, а публикуемые спектральные данные отличаются друг от друга. Возникает вопрос о влиянии ориентации образца на измеряемые КР спектры. Мы проводим сравнение КР спектров человеческого волоса, измеренных при его горизонтальном (возбуждающее излучение перпендикулярно оси волоса) и вертикальном (возбуждающее излучение соосно с образцом) расположениях. Наряду с отличиями в спектрах, которые обоснованы молекулярными изменениями, были выявлены различия, связанные с поляризационной чувствительностью волоса. Для получения поперечных сечений волоса был разработан метод, основанный на заморозке образца в жидком азоте и не требующий использования микротомов и фиксирующих сред.

PACS:42.55.Ye, 33.20.Fb

УДК: 543.4

Ключевые слова: КР микроспектроскопия, волос человека, подготовка срезов волоса, поляризационная чувствительность.

### ВВЕДЕНИЕ

Человеческий волос является придатком кожи, состоящим из белков–кератинов, которые имеют иерархическую структуру. В волосе можно выделить 3 основные компоненты: кортекс (внутренняя часть), кутикула (оболочка) и медула (сердцевина). Кортекс состоит из веретенообразных макрофибрилл, которые имеют две основные составляющие: микрофибриллу и матрикс, которые различаются по своей структуре и аминокислотному составу. Микрофибрилла представляет собой кристаллический волокнистый белок, состоящий в основном из  $\alpha$ –кератинов, которые являются белками с  $\alpha$ –спиральной структурой. Кутикула в свою очередь преимущественно состоит из  $\beta$ –структур [1].

Одна из причин возрастающего интереса к изучению человеческого волоса связана с тем, что для него характерны структурные изменения, схожие с таковыми в кератинах кожи [2], несмотря на то, что волос в полной мере не является живой тканью. Поэтому исследования человеческого волоса могут быть полезны для изучения влияния различных внешних воздействий на кератины.

КР–спектроскопия широко используется в качестве неинвазивного метода изучения характеристик кератинов [3, 4]. Данная методика исследования практически не требует подготовки образца и предоставляет как молекулярную, так и структурную информацию. Метод КР–спектроскопии позволяет с помощью конфокальных микроскопов проводить исследования в трёхмерном пространстве с разрешением до 1 мкм, а так

как толщина кутикулы человеческого волоса составляет порядка нескольких микрометров, то её исследование с помощью данного метода вполне оправдано.

В работах на тему КР–спектроскопии человеческого волоса [4–8] применены различные методики подготовки экспериментальных образцов. В части работ [3, 4] волос располагается горизонтально и закрепляется на подложке, а молекулярная структура кутикулы и кортекса изучается с помощью конфокальной спектроскопии. Возбуждающее излучение при этом заводится перпендикулярно оси волоса. В других работах [1, 5] волос разрезается с помощью микротомов и располагается на подложке соосно с возбуждающим излучением. Учитывая вышесказанное, в работе был поставлен вопрос о спектральных отличиях в различных экспериментальных конфигурациях.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1.1. КР–спектроскопия

КР спектры измерялись с помощью КР микроскопа DXR Raman Microscope (ThermoScientific). Латеральное и аксиальное разрешения были равны 2 и 6 мкм, соответственно. Длина волны возбуждающего излучения составляла 780 нм, а источником возбуждения являлся непрерывный диодный одноимодовый лазер со стабилизацией частоты. Фокусировка излучения на образец осуществлялась с помощью объектива Olympus LMPlanFL N 50X/0.5 BD с рабочим расстоянием 10.6 мм и размером пятна фокусировки 1.6 мкм. Мощность возбуждения на образце составляла 24 мВт. Спектры измерялись в интервале 50–3500  $\text{см}^{-1}$  со спектральным разрешением 4  $\text{см}^{-1}$ . Накопление каж-

\* brandt@phycis.msu.ru

† travkina.ei19@physics.msu.ru

лого спектра проводилось в течение 15 мин. Изображение образца регистрировалось цветной цифровой видеокамерой с матрицей  $1024 \times 768$  пикселей.

Обработка полученных спектров проводилась следующим образом. Коррекция фонового сигнала осуществлялась с помощью компьютерной программы New Compare в Matlab. Методика подробно описана в работе [9] и основана на том, что произвольный спектр можно представить в виде суперпозиции полезного сигнала и широкополосного фона. Представленные таким образом спектры могут быть аппроксимированы друг другом методом наименьших квадратов, причём спектральные интервалы, в которых осуществляется аппроксимация, могут задаваться произвольным образом. После коррекции фонового сигнала для удобства анализа спектральных отличий строятся разностные спектры.

## 1.2. Подготовка образцов

В экспериментах использовался седой человеческий волос от здорового донора. Измерения проводились в двух конфигурациях.

В горизонтальной конфигурации эксперимента (рис. 1, а) волос помещался горизонтально на подложку с несколькими отверстиями, находящимися на расстоянии 10 мм, шириной 3 мм каждое. Образец приклеивался к подложке, которая помещалась на предметный столик КР микроскопа. Анализируемый участок волоса располагался, таким образом, над отверстием, что исключало присутствие в спектрах фонового сигнала от подложки.

Вертикальная конфигурация подразумевает исследование поперечных сечений волоса, когда возбуждающее излучение распространяется параллельно оси образца. В работе применялся оригинальный способ получения поперечного сечения волоса без использования микротомов и фиксирующих сред. Волос помещался в чашку Петри с жидким азотом на 1 мин и разламывался на несколько частей длиной 4-6 мм каждая. Полученные образцы поочередно приклеивались на скотч параллельно друг другу на расстоянии 1-2 мм, причём каждый образец выступал за край скотча на  $\sim 1$  мм (рис. 1, б). Затем скотч приклеивался на вертикальную сторону крепёжной пластины, которая фиксировалась на предметном столике КР микроскопа так, чтобы образцы были ориентированы соосно с направлением возбуждающего излучения.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведён КР спектр кутикулы человеческого волоса. Рассмотрим характерные линии на частотах 508, 550, 935, 1001, 1040, 1243, 1316, 1338, 1652-1688  $\text{см}^{-1}$ . Линии на 508 и 550  $\text{см}^{-1}$  содержат

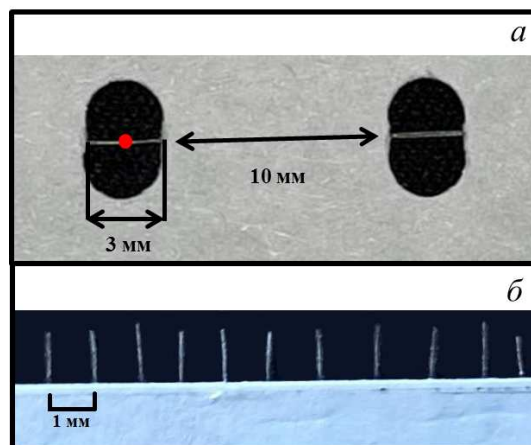


Рис. 1. Экспериментальные образцы в горизонтальной конфигурации (кружком схематично показана область, из которой собирается сигнал) (а) и в вертикальной конфигурации (б)

информацию о дисульфидных (S-S) валентных колебаниях в двух конформациях: gauche-gauche-gauche (ggg) и trans-gauche-trans (tgt) соответственно [10]. Частота 935  $\text{см}^{-1}$  характеризует скелетные колебания полипептидной цепи N-C $\alpha$ -C, а также маятниковые колебания групп CH $_3$  и валентные колебания групп C-N и N-C $\alpha$  [11]. Интенсивность вблизи частоты 1001  $\text{см}^{-1}$  пропорциональна содержанию аминокислотных остатков фенилаланина. Линию на 1040  $\text{см}^{-1}$  обычно относят к симметричным валентным колебаниям цистеиновой кислоты (S=O) [12]. Область частот с центром  $\sim 1243$   $\text{см}^{-1}$  (линия АмидIII) характеризует наличие неупорядоченных структур [3]. Частота 1316  $\text{см}^{-1}$  относится к колебаниям C $\alpha$ -H, а частота 1338  $\text{см}^{-1}$  — к колебаниям CH $_2$  и триптофана [13]. Диапазон частот 1652-1688  $\text{см}^{-1}$  соответствует области АмидI, в которой можно выделить основные компоненты на частотах 1652, 1670 и 1688  $\text{см}^{-1}$ , характеризующие содержание  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур [14]. Кроме того, частота 1688  $\text{см}^{-1}$  может быть отнесена к колебаниям боковых цепей аспарагина и глутамина [12].

### 2.1. Горизонтальное расположение волоса

Для того, чтобы иметь представление о степени отличия спектров в разных точках одного и того же волоса, было произведено сравнение двух спектров одного волоса при фокусировке возбуждающего излучения на его боковую поверхность. В связи с тем, что конфокальное разрешение микроскопа составляет 6 мкм, а латеральное 2 мкм, то сигнал должен собираться из области, имеющей форму сфероида с соответствующими параметрами. Но так как фокусировка излучения осуществляется на поверхность образца, то в этом случае рассеянное излучение собирается из объема внут-

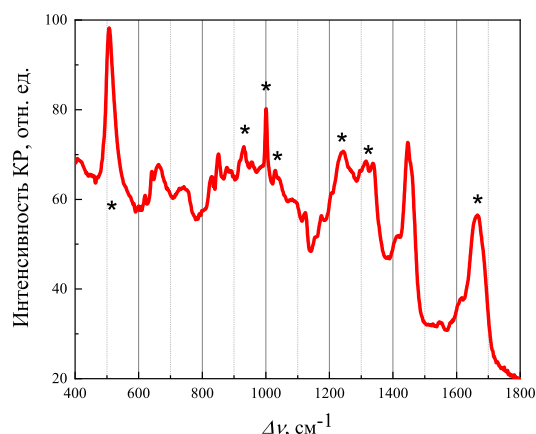


Рис. 2. КР спектр кутикулы человеческого волоса

ри полусфероида высотой 3 мкм и диаметром 2 мкм, плоская поверхность которого совпадает с поверхностью волоса (аналогичная ситуация будет и в случае фокусировки на торец волоса при его вертикальном расположении). На рис. 3 приведена разность спектров (график 1), полученных из областей, расстояние между которыми составляет несколько мм. Видно, что отклонение разностного спектра от нулевого значения находится в пределах 1%.

Влияние жидкого азота на структуру белка можно проанализировать, сравнив спектры, которые были получены до и после заморозки волоса при фокусировке излучения на поверхность и при углублении в образец на 10 мкм. Причем во втором случае сигнал собирается уже из области, имеющей форму сфероида высотой 6 мкм и диаметром 2 мкм. Рассчитав разность спектров необработанного волоса и волоса после погружения в жидкий азот на несколько минут для обоих случаев фокусировки (рис. 3, графики 2, 3), можно сделать вывод о том, что жидкий азот не оказывает практически никакого воздействия на белковые структуры волоса. Стоит отметить изменение интенсивности линии фенилаланина на частоте  $1003\text{ см}^{-1}$ . Эта линия обычно считается конформационно не чувствительной и используется для нормировки КР спектров.

Необходимо отметить некоторые недостатки экспериментальной конфигурации с горизонтальным расположением волоса. Во-первых, аксиальное разрешение в этом случае втрое хуже латерального, что не позволяет проводить исследования кутикулы в полной мере, поскольку её толщина составляет  $\sim 2\text{ мкм}$ . Во-вторых, горизонтально расположенный волос представляет собой цилиндрическую линзу, которая меняет геометрию фокусировки лазерного излучения. Следовательно, необходимо рассчитывать поправочные коэффициенты для корректного сравнения спектров, но задачу усложняет тот факт, что геометрические параметры и соотношение структурных компонент у каждого

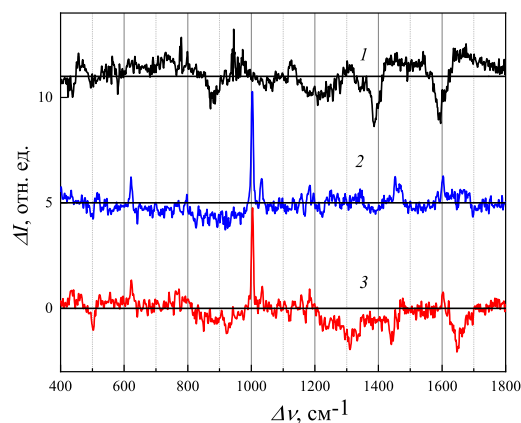


Рис. 3. Разность КР спектров, полученных в горизонтальной конфигурации эксперимента, соответствующих двум точкам поверхности, которые находятся на расстоянии несколько мм — 1; разность спектров, соответствующих области поверхности волоса до и после заморозки — 2; разность спектров, соответствующих области волоса на глубине 10 мкм до и после заморозки — 3. Для удобства сравнения спектры сдвинуты друг относительно друга по вертикали

волоса индивидуальные, и поправка к спектрам для каждого образца должна считаться отдельно. Кроме того, следует принять во внимание зависимость поправочных коэффициентов от коэффициента поглощения волоса на разных длинах волн [15].

## 2.2. Вертикальное расположение волоса

На рис. 4 представлена микрофотография торца волоса, на которой отмечены области, из которых собирался КР сигнал. Область 1 соответствует спектру кутикулы, а область 2 — спектру кортекса. Расстояние между этими областями составляет 10 мкм. Так как излучение фокусируется на поверхность поперечного сечения волоса, то объем, из которого собирается сигнал, имеет форму полусфероида (аналогично фокусировке на поверхность волоса в горизонтальной конфигурации). При этом латеральное разрешение (2 мкм) позволяет изучить отдельно области кутикулы и кортекса.

На рис. 5, а представлена разность между КР спектрами, полученными от областей 1 и 2 на рис. 4. Наиболее выраженные изменения интенсивностей показаны стрелками ( $508, 550, 935, 1040, 1243, 1340, 1649$  и  $1676\text{ см}^{-1}$ ). Уменьшение интенсивности на частоте  $508\text{ см}^{-1}$  и её увеличение на частоте  $550\text{ см}^{-1}$  (колебания S-S) показывает, что при переходе от кутикулы к кортексу часть дисульфидных связей разрушается, а часть переходит от ggg к tgt конформации. Из уменьшения интенсивности на частоте  $1040\text{ см}^{-1}$

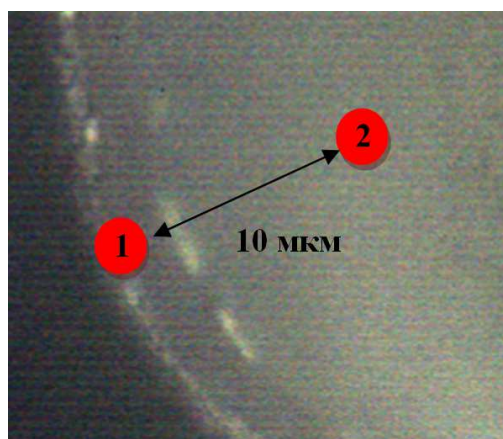


Рис. 4. Микрофотография торца волоса, сделанная с помощью длиннофокусного объектива Olympus LMPlanFL N 50X/0.5 BD; кружками отмечены области, из которых собирается сигнал

(колебания  $S=O$ ) следует увеличение содержания свободных тиолов [12].

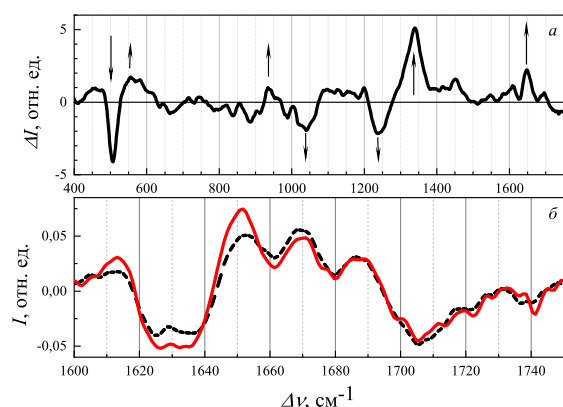


Рис. 5. Разность между КР спектрами, полученными из областей 1 и 2 на рис. 4, изменения интенсивности отображены стрелками (а); вторая производная от спектров, которые соответствуют областям 1 и 2 рис. 4, в диапазоне частот линии Амид I (б)

Особое внимание следует уделить линиям вблизи частот 935, 1340, 1649 и 1676  $\text{см}^{-1}$ . Область около частоты 935  $\text{см}^{-1}$  ( $N-C_{\alpha}-C$ ,  $C-N$ ,  $N-C_{\alpha}$  и  $CH_3$ ) характеризует содержание спиральных структур [11]. Отличия спектров в области 1340  $\text{см}^{-1}$  обусловлены изменениями интенсивностей на частотах 1316 ( $C_{\alpha}-H$ ) и 1338  $\text{см}^{-1}$  ( $CH_2$  и триптофан). Структура линии Амид I проявляется при рассмотрении спектров вторых производных КР спектров из областей 1 и 2 на рис. 4. На частоте 1652  $\text{см}^{-1}$  интенсивность пропорциональна содержанию  $\alpha$ -спиралей, частоты 1670  $\text{см}^{-1}$  и 1688  $\text{см}^{-1}$  соответствуют содержанию  $\beta$ -листов и  $\beta$ -шпилек, соответственно [14]. Важ-

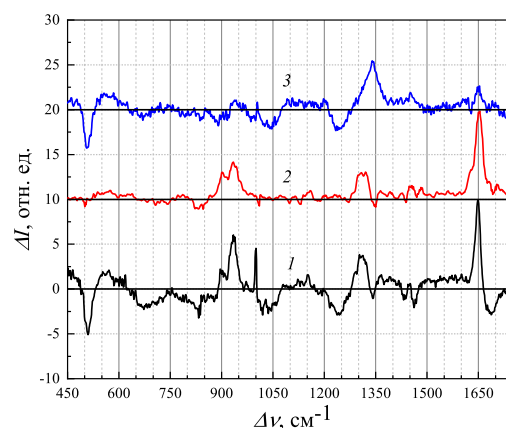


Рис. 6. Разность КР спектров, измеренных при фокусировке возбуждающего излучения на поверхность волоса в горизонтальной конфигурации и на кутикуле в вертикальной конфигурации — 1; разность спектров  $S_h$  и  $S_v$ , рассчитанная с использованием результатов работы [17] — 2; разность спектров, измеренных в областях 2 и 1 на рис. 4 — 3. Для удобства сравнения спектры сдвинуты друг относительно друга по вертикали

но отметить, что спектральные изменения на частотах 935, 1316 и 1652  $\text{см}^{-1}$ , которые характеризуют содержание  $\alpha$ -структур, хорошо коррелируют друг с другом. При переходе от кутикулы к кортексу изменение интенсивности на этих частотах говорит об увеличении содержания  $\alpha$ -спиральных элементов и уменьшении концентрации  $\beta$ -структур и неупорядоченных элементов (частота 1243  $\text{см}^{-1}$  рис. 2).

Все выявленные структурные изменения при переходе от кутикулы к кортексу полностью согласуются с литературными данными [16].

### 2.3. Сравнение горизонтальной и вертикальной конфигурации

В разности КР спектров вертикально и горизонтально расположенного волоса (кривая 1 на рис. 6) хорошо видны отличия на частотах 508, 897, 935, 1001, 1243, 1316, 1652 и 1688  $\text{см}^{-1}$ . Изменения интенсивностей линий на частотах 935, 1316 и 1652  $\text{см}^{-1}$  в данном случае говорят о поляризационной чувствительности  $\alpha$ -спиралей, расположенных преимущественно вдоль одной оси с волосом, несмотря на то, что при измерении КР спектров в работе используется деполаризованное излучение. При вертикальном расположении образца плоскость, в которой лежат вектора напряжённости, параллельна торцу волоса и перпендикулярна его оси (рис. 7, а). При горизонтальном расположении волоса половина возбуждающего излучения в среднем имеет поляризацию, параллельную оси волоса ( $E_{\parallel}$ ), а поло-

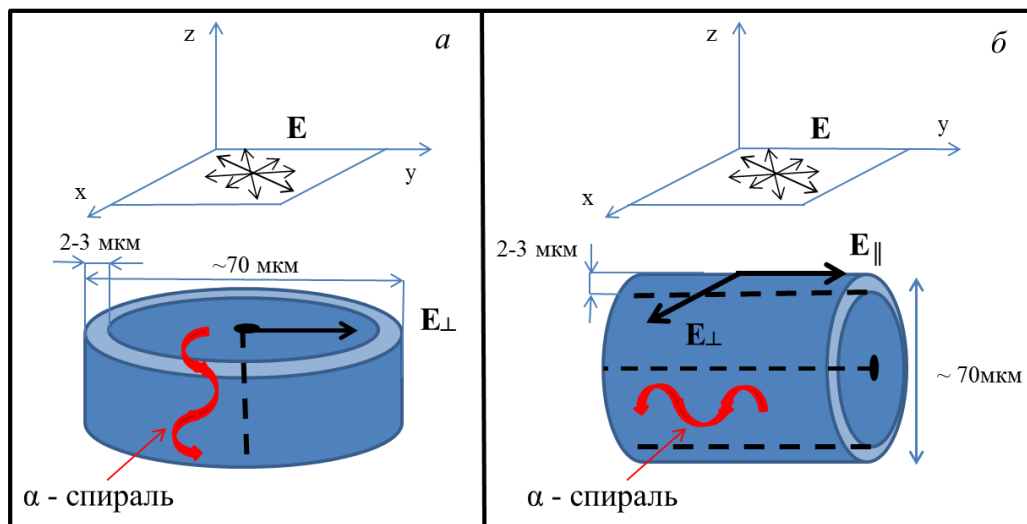


Рис. 7. Схематичное представление вертикального (а) и горизонтального (б) расположения образца и поляризации возбуждающего излучения для каждого случая

вина — перпендикулярную ей ( $E_{\perp}$ ) (рис. 7, б). В работе [17] были измерены спектры  $S_{xx}$ ,  $S_{xy}$ ,  $S_{yx}$ ,  $S_{yy}$  человеческого волоса при различной взаимной ориентации поляризатора (первый индекс) и анализатора. Используя эти результаты, мы рассчитали, какие должны получаться спектры горизонтально и вертикально расположенного волоса в случае, когда возбуждающее излучение деполаризовано, и в экспериментальной установке отсутствует анализатор. В вертикальной конфигурации спектр  $S_{\nu}$  можно представить как сумму только  $S_{xy}$  и  $S_{xx}$  компонент, т.к. в этом случае происходит возбуждение только в плоскости перпендикулярной оси волоса, а спектр горизонтальной конфигурации  $S_h$  можно оценить как  $0.5 \times (S_{xx} + S_{xy} + S_{yx} + S_{yy})$ . Разность спектров  $S_h$  и  $S_{\nu}$  показана на рис. 6 (кривая 2). Видно, что спектры отличаются в интервалах, характеризующих  $\alpha$ -структуры белка, и все отличия в тех же интервалах видны на кривой 1.

Кроме того, стоит обратить внимание на спектральные отличия на частотах 508, 1001, 1243 и 1688  $\text{см}^{-1}$ . Спектр, полученный при фокусировке на поверхность горизонтально расположенного волоса, содержит в себе информацию как о кутикуле, так и о кортексе из-за недостаточного конфокального разрешения. Спектр, полученный в вертикальной конфигурации из области 1 (рис. 4), соответствует только кутикуле. Поэтому изменения интенсивностей (кривая 1 на рис. 6) на перечисленных частотах следует связать с изменениями, которые были выявлены при переходе от кутикулы к кортексу (кривая 3 на рис. 6).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была предложена методика изготовления поперечного сечения волоса с помощью заморозки

и излома в жидком азоте. Метод не требует использование микротомы и фиксирующих веществ. Показано, что заморозка в жидком азоте в течение нескольких минут не влияет на КР спектры волоса. Приведены результаты исследования поперечного сечения волоса. Изменения молекулярной структуры волоса при переходе от периферии к центру хорошо согласуются с литературными данными. Использование различных экспериментальных конфигураций (горизонтальной и вертикальной) при КР микроспектроскопии человеческого волоса приводит к разным экспериментальным данным. Это связано с поляризационной чувствительностью КР спектров волос, которая проявляется даже при использовании деполаризованного возбуждающего излучения, а также с различием между аксиальным и латеральным разрешениями микроскопа. Отметим, что исследование волоса, расположенного горизонтально, может быть применено для изучения поляризационно-чувствительных структур, например,  $\alpha$ -спиралей, однако необходимо учитывать низкое конфокальное разрешение и наличие поправочных коэффициентов, связанных с особенностями геометрии волоса. Изучение поперечного сечения волоса при заведении излучения перпендикулярно его торцу не требует учёта дополнительных поправок, имеет значительное преимущество в разрешении, однако подразумевает получение свободной поверхности волоса в поперечном сечении.

### Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретённого за счёт средств Программы развития Московского университета. Часть работ выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-02-00932).

- [1] Kuzuhara A. // *Biopolymers*. 2005. **79**, N 4. P. 173.
- [2] Chavanas S., Bodemer C., Rochat A., Hamel-Teillac D., Mohsin Ali, Irvine Alan D., Bonafü J.-L., Wilkinson J., Taneb A., Barrandon Y., et al. // *Nature Genetics*. 2000. **25**, N 2. P. 141.
- [3] Schlycker S., Liang C., Strehle K.R., DiGiovanna J.J., Kraemer K.H., Levin I.W. // *Biopolymers*. 2006. **82**, N 6. P. 615.
- [4] Zhang G., Senak L., Moore D.J. // *J. of Biomed. Opt.* 2011. **16**, N 5.
- [5] Kuzuhara A. // *J. of Mol. Struct.* 2013. **1047**, P. 186.
- [6] Pudney P.D.A., Bonnist E.Y.M., Mutch K., Stanfield S. // *Appl. Spectrosc.* 2013. **67**, N 12. P. 1408.
- [7] Dos Santos J.D., Edwards H.G.M., Oliveira L.F.C. // *Heliyon*. 2019. **5**, N 5.
- [8] Lam S.E., Mat Nawi S.N., Abdul Sani, Khandaker M.U., Bradley D.A. // *Sci. Rep.* 2021. **11**, N 1.
- [9] Brandt N.N., Chikishev A. Yu., Chulichkov A.I., Ignatiev P.A., Lebedenko S.I., Voronina O.V. // *Laser Phys.* 2004. **14**, N 11. P. 1386.
- [10] Sugeta H., Go A., Miyazawa T. // *Bull. of the Chem. Soc. Japan*. 1973. **46**, N 11. P. 3407.
- [11] Tuma R. // *J. of Raman Spectrosc.* 2005. **36**, N 4. P. 307.
- [12] Church J. S., Corino G. L., Woodhead A. L. // *Biopolymers*. 1997. **42**, N 1. P. 7.
- [13] Carter E.A., Fredericks P.M., Church J.S., Denning R.J. // *Spectrochim. Acta*. 1994. **50**, N 11. P. 1927.
- [14] Lejevre T., Rousseau M.-E., Pezolet M. // *J. Biophys.* 2007. **92**, N 8. P. 2885.
- [15] Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В. // *Квантовая электроника*. 2006. **36**, N 12. P. 1111.
- [16] Fedorkova M.V., Brandt N.N., Chikishev A.Yu., Smolina N.V., Balabushevich N.G., Gusev S.A., Lipatova V.A., Botchey V.M., Dobretsov G.E., Mikhailchik E.V. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2016. **164**, P. 43.
- [17] Ackermann K.R., Koster J., Schlycker S. // *J. Biophotonics*. 2008. **1**, N 5. P. 419.

## Raman spectroscopy of human hair: the influence of sample orientation

N. N. Brandt<sup>a</sup>, E. I. Travkina<sup>b</sup>

*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia*  
E-mail: <sup>a</sup>brandt@phycis.msu.ru, <sup>b</sup>travkina.ei19@physics.msu.ru

Despite the large number of works on Raman spectroscopy of human hair, there is a lack of information about the methodology of experiments and the reliability of the data obtained. There are various experimental configurations in which the sample is positioned differently relative to the exciting radiation, and the published spectral data differ from each other. The question arises about the influence of the sample orientation on the measured Raman spectra. We compare the Raman spectra of a human hair measured in horizontal (exciting beam is perpendicular to the hair axis) and vertical (exciting beam and hair are coaxial) configurations. Along with the differences in the spectra, which result from molecular changes, the differences related to the polarization sensitivity of hairs were identified. To obtain cross-sections of the hair, we have developed the method based on freezing the sample in liquid nitrogen, which does not require microtomes and fixing agents.

PACS: 42.55.Ye, 33.20.Fb.

*Keywords:* Raman microspectroscopy, human hair, hair sample preparation, polarization sensitivity.

*Received 27 May 2022.*

### Сведения об авторах

1. Брандт Николай Николаевич — канд. физ.-мат. наук, доцент; e-mail: brandt@phycis.msu.ru.
2. Травкина Елена Игоревна — студент; e-mail: travkina.ei19@physics.msu.ru.