

# Рамановская спектроскопия и поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия для анализа компонентов кожи человека

Л.А. Братченко<sup>1</sup>, Е.А. Абросимова<sup>1</sup>, С.С. Стафеев<sup>1,2</sup>, Е.Н. Тупикова<sup>1</sup>, Е. Борисова<sup>3</sup>,  
И.А. Братченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34А, Самара, Россия, 443086

<sup>2</sup>Институт систем обработки изображений РАН - филиал ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Молодогвардейская 151, Самара, Россия, 443001

<sup>3</sup>Институт электроники Болгарской академии наук, Цариградское шоссе 72, София, Болгария, 1784

**Аннотация.** В работе исследованы спектральные характеристики таких аминокислот, как аргинин, лизин, глицин, тирозин, цистин. Представлены результаты сравнительного анализа характеристик аргинина, лизина, глицина, тирозина, полученных с помощью рамановского рассеяния в видимой области (центральная длина волны 532 нм) и рамановского рассеяния в ближней инфракрасной области (центральная длина волны 785 нм). Кроме того, проанализирована возможность применения поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии в ближней инфракрасной области (центральная длина волны 785 нм) на примере цистина. Выявленные спектральные особенности исследованных аминокислот могут быть использованы в качестве моделей для изучения топологии белков и пептидов в коже человека при развитии патологических процессов в организме.

## 1. Введение

Различные физиологические и патологические процессы, протекающие в организме человека, связаны с состоянием кожи и влияют на ее компонентный состав [1]. Поэтому анализ изменений компонентного состава различных слоев кожи человека является одним из направлений терапевтической дисциплины. Кроме того, кожа доступна, и, следовательно, является привлекательным объектом *in vivo* диагностики.

Для изучения состава компонентов кожи применимы различные биохимические и иммунохимические методы лабораторного анализа. Альтернативой применяемым сегодня методам лабораторного анализа являются различные физические методы [2]. Одним из таких методов, успешно применяемых на сегодняшний день в различных областях клинической медицины, является рамановская спектроскопия. Рамановская спектроскопия позволяет оценивать химический состав исследуемых биологических объектов на молекулярном уровне.

Ранее наша исследовательская группа проанализировала возможность дифференциальной оптической диагностики меланоцитарных образований кожи на основе рамановской спектроскопии и флуоресценции для получения спектральной информации, которая может

быть полезна и информативна для дифференциации пигментных новообразований кожи [3, 4]. Повышение информативности проводимого анализа и улучшение понимания патологоассоциированных процессов, происходящих в коже, и анализ выявленных информативных спектральных различий сигнала рамановского рассеяния, возможны при проведении модельных исследования спектральных характеристик отдельных компонентов кожи.

Одними из основных органических соединений в коже являются аминокислоты, играющие важную физиологическую роль в широком спектре химических реакций, образовании белков, пептидов и различных тканей организма [5]. Поэтому в данной работе исследованы спектральные характеристики таких аминокислот, как аргинин, лизин, глицин, тирозин, с помощью рамановского рассеяния в видимой области (центральная длина волны 532 нм) и рамановского рассеяния в ближней инфракрасной области (центральная длина волны 785 нм). Также проанализирована возможность применения поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии в ближней инфракрасной области (центральная длина волны 785 нм) для анализа микродоз аминокислот с используемым экспериментальным оборудованием на примере цистина.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Коллоидный раствор золота для поверхностно-усиленного рамановского рассеяния

В связи с тем, что регистрация спектров осуществляется на длине волны 785 нм в ближнем ИК диапазоне, для создания плазмонного резонанса и достижения эффекта поверхностного усиления наиболее целесообразно использовать наночастицы из золота [6]. Ранее в работе [7] нами установлено, что для используемого экспериментального стенда оптимальное усиление сигнала достигается с помощью золотых микроструктур. Коллоидный раствор золота был приготовлен восстановлением золотохлористоводородной кислоты  $\text{HAuCl}_4$  цитратом натрия  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  по методике [8]. В спектре поглощения полученного раствора наблюдается максимум при 525 нм, что, согласно литературным данным [9], соответствует размеру частиц около 40 нм. Полученный коллоидный раствор золотых наночастиц сферической формы подвергнут формированию вторичных частиц за счет агрегации. Для этого соляная кислота (концентрация 0,1М) добавлена к коллоидному раствору золота в соотношении 7/40, соответственно.

### 2.2. Подготовка образцов

В работе исследованы следующие аминокислоты: аргинин, лизин, глицин, тирозин, цистин. Для исследования кристаллических форм образцов аминокислот с помощью рамановской спектроскопии в видимом и ближнем ИК диапазоне, исследуемые образцы помещались на алюминиевую фольгу.

Подготовка растворов для исследования методом поверхностно-усиленного рамановского рассеяния выполнена по следующему алгоритму: водный раствор аминокислоты концентрацией  $10^{-2}$  мг/мл смешивается с агрегированным коллоидом золота в соотношении 1/1; раствор в объеме 6 мкл наносят на алюминиевую фольгу и сушат в течение 30 минут при комнатной температуре.

### 2.3. Экспериментальная установка

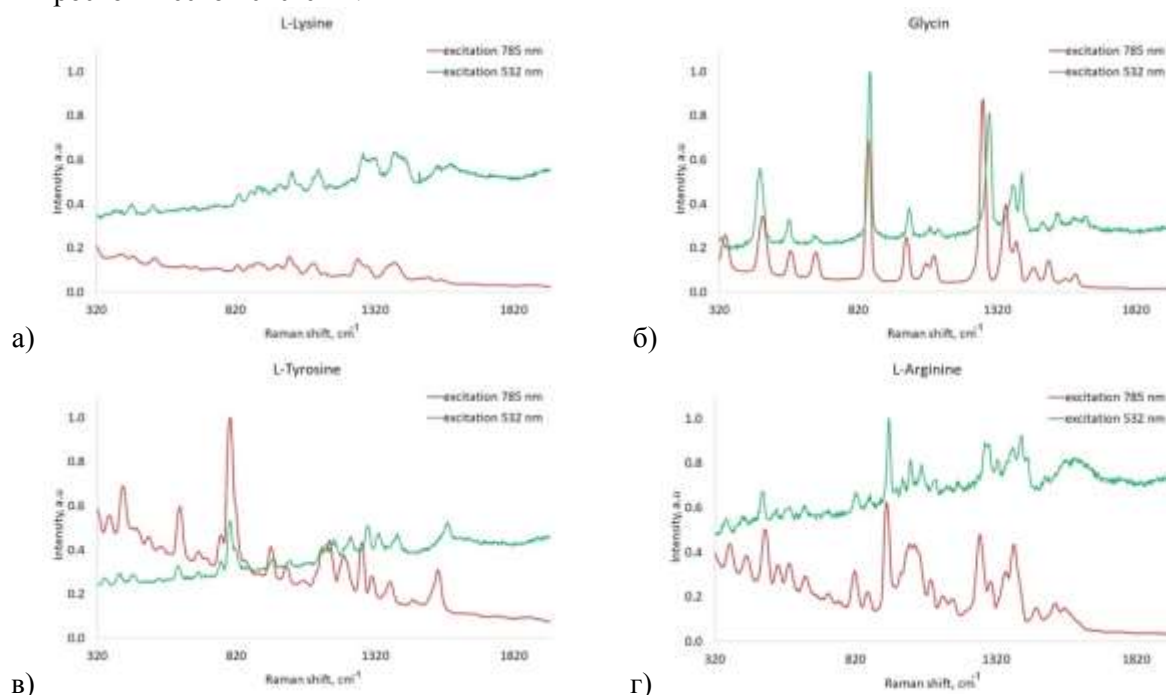
Для исследования спектральных характеристик аминокислот с помощью рамановской спектроскопии и поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии в ближнем ИК диапазоне, возбуждение регистрируемых спектров производилось излучением лазерного модуля LuxxMaster Raman Voxh фирмы PD-LD (центральная длина волны 785 нм). Фокусировка зондирующего излучения, захват и фильтрация сигнала осуществлялись с использованием рамановского пробника RPB785 фирмы InPhotonics. Регистрация спектров выполнена с помощью высокоразрешающего спектрометра Shamrock SR-500i-D1-R со встроенной цифровой камерой ANDOR DU416A-LDC-DD, охлаждаемой до  $-65^\circ\text{C}$ . Была

выполнена последовательная запись трех спектров для каждого исследуемого образца. Результирующий спектр получен путем усреднения трех регистрируемых спектров. Общее время записи спектра составило 3 минуты.

Анализ спектральных характеристик исследуемых аминокислот в видимой области осуществлен с помощью многофункциональной автоматизированной системы Ntegra Spectra. Для возбуждения спектров использован лазер LCM-S-111 (мощность 100 мВт, центральная длина волны 532 нм). Регистрация спектров осуществлялась с помощью спектрометра Nanofinder 30 (Solar III) со встроенной камерой ANDOR DV401-BV.

### 3. Результаты и обсуждение

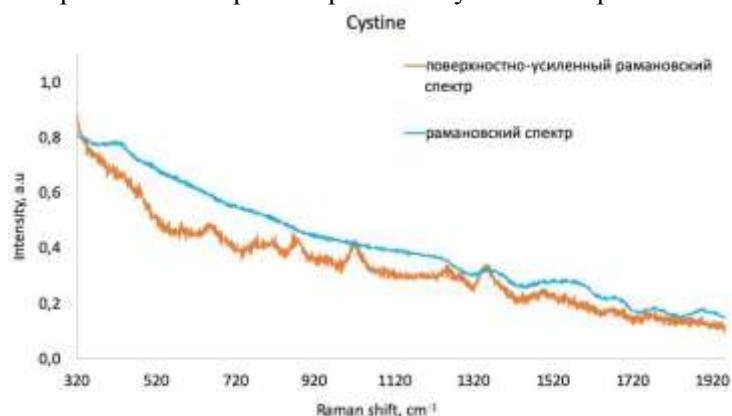
В настоящее время в подавляющем большинстве работ, посвященных изучению спектральных характеристик аминокислот с применением рамановской спектроскопии, использовалось оборудование с конфокальной микроскопической системой. Например, в работе [10] для исследования кристаллических форм аминокислот и их водных растворов использована фокусировка лазерного излучения на поверхности исследуемого образца с помощью объектива микроскопа с 20-кратным увеличением. В нашей работе первым этапом исследования стало сравнение экспериментальных данных, полученных с применением экспериментального стенда без микроскопической системы и экспериментального стенда с микроскопической системой. На рисунке 1 представлены рамановские характеристики четырех протеиногенных аминокислот: лизина, глицина, тирозина и аргинина, при возбуждении в видимой области с применением микроскопической системы и в ближней инфракрасной области без микроскопической системы.



**Рисунок 1.** Рамановские спектры при длинах волн возбуждения 532 нм (с микроскопической системой) и 785 нм (без микроскопической системы): а) – лизина; б) – глицина; в) – тирозина; г) – аргинина.

Анализ рисунка 1 демонстрирует, что, при исследовании кристаллических форм аминокислот, спектральные характеристики, полученные с применением экспериментального стенда без микроскопической системы, спектральные характеристики, полученные с применением экспериментального стенда с микроскопической системой, имеют схожий характер. Различия наблюдаются в уровне и характере флуоресцентного фона, что обусловлено использованием разных длин волн возбуждения в обоих случаях.

На рисунке 2 представлены рамановские спектральные характеристики цистина при обычном рамановском рассеянии и при поверхностно-усиленном рамановском рассеянии.



**Рисунок 2.** Рамановские спектральные характеристики цистина при обычном рамановском рассеянии и при поверхностно-усиленном рамановском рассеянии.

Спектральные характеристики исследуемого образца цистина, представленные на рисунке 2, позволяют сделать вывод, что, применение технологии поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии с используемым экспериментальным стендом без микроскопической системы позволяет усилить и обнаружить характерные рамановские полосы цистина:  $678\text{ см}^{-1}$ ,  $785\text{ см}^{-1}$ ,  $873\text{ см}^{-1}$ ,  $1041\text{ см}^{-1}$ ,  $1341\text{ см}^{-1}$  [10]. Полученные результаты демонстрируют потенциальную возможность применения поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии в ближней инфракрасной области с используемым экспериментальным стендом без микроскопической системы при анализе микродоз аминокислот в модельных экспериментах с целью дальнейшего изучения топологии белков и пептидов в коже человека.

#### 4. Заключение

Проанализированные спектральные особенности кристаллических форм исследованных протеиногенных аминокислот таких, как лизин, глицин, тирозин и аргинин, полученные с применением экспериментального стенда без микроскопической системы в ближней инфракрасной области, и спектральные характеристики, полученные с применением экспериментального стенда с микроскопической системой в видимой области, имеют схожий характер. В работе проанализирована и продемонстрирована возможность применения поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии в ближней инфракрасной области (центральная длина волны  $785\text{ нм}$ ) для анализа микродоз аминокислот с используемым экспериментальным оборудованием на примере цистина. Выявленные спектральные особенности исследованных аминокислот могут быть использованы в качестве моделей для изучения топологии белков и пептидов в коже человека при развитии патологических процессов в организме.

#### 5. Благодарности

Проведенное исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-52-18001 Болг\_а и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (проект МК-1888.2019.2).

#### 6. Литература

- [1] Franks, A.G. Skin Manifestations of Internal Disease // Medical Clinics of North America. – 2009. – Vol. 93(6). – P. 1265-1282.
- [2] Cal, K. Advanced tools for in vivo skin analysis / K. Cal, D. Zakowiecki, J. Stefanowska // International Journal of Dermatology. – 2010. – Vol. 49(5). – P. 492-499.

- [3] Khristoforova, Y. In vivo Raman and autofluorescence study of the pigmented skin neoplasms / Y. Khristoforova, I. Bratchenko, L. Bratchenko, S. Konovalov, A. Andreeva, A. Moryatov, D. Kassirov, A. Orlov, S. Kozlov, V. Zakharov // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2019. – Vol. 1368. – P. 022059.
- [4] Khristoforova, Y.A. Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by Raman and autofluorescence analysis / Y.A. Khristoforova, I.A. Bratchenko, O.O. Myakinin, D.N. Artemyev, A.A. Moryatov, A.E. Orlov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // *Journal of Biophotonics*. – 2019. – Vol. 12(4). – P. e201800400.
- [5] Zhu, G. Kinetics of amino acid production from bean dregs by hydrolysis in sub-critical water / G. Zhu, X. Zhu, Q. Fan, X. Wan // *Amino Acids*. – 2010. – Vol. 40(4). – P. 1107-1113.
- [6] Sharma, B. SERS: Materials, applications, and the future / B. Sharma, R.R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, R. P. Van Duyne // *J. Materials Today*. – 2012. – Vol. 15(1-2). – P. 16-25.
- [7] Shamina, L.A. Comparative study of human blood Raman spectra and biochemical analysis of patients with cancer / L.A. Shamina, I.A. Bratchenko, D.N. Artemyev, O.O. Myakinin, A.A. Moryatov, A.E. Orlov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // *Proc. SPIE Saratov Fall Meeting: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX, 2018*. – Vol. 107160D.
- [8] Yue, J. Determination of malachite green in environmental water using cloud point extraction coupled with surface-enhanced Raman scattering / J. Yue, M. Pinyi, L. Fanghui, G. Dejiang, W. Xinghua // *Anal. Methods* – 2013. – Vol. 5. – P. 5609-5614.
- [9] Шлюкер, С. Поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия (SERS): аналитические, биофизические и биомедицинские приложения – Москва: Техносфера, 2017. – С. 49.
- [10] Zhu, G. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions / G. Zhu, X. Zhu, Q. Fan, X. Wan // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2011. – Vol. 78(3). – P.1187-1195.

## Conventional Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy for human skin components analysis

L.A. Bratchenko<sup>1</sup>, E.A. Abrosimova<sup>1</sup>, S.S. Stafeev<sup>1,2</sup>, E.N. Tupikova<sup>1</sup>, E. Borisova<sup>3</sup>,  
I.A. Bratchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara National Research University, Moskovskoe Shosse 34A, Samara, Russia, 443086

<sup>2</sup>Image Processing Systems Institute of RAS - Branch of the FSRC "Crystallography and Photonics" RAS, Molodogvardejskaya street 151, Samara, Russia, 443001

<sup>3</sup>Institute of electronics, Bulgarian Academy of Sciences, Tsarigradsko chaussee 72, Sofia, Bulgaria, 1784

**Abstract.** In the current study the spectral characteristics of amino acids such as arginine, lysine, glycine, tyrosine, cystine are investigated. The comparative analysis results of the characteristics of arginine, lysine, glycine, tyrosine obtained using Raman scattering in the visible region (central wavelength of 532 nm) and Raman scattering in the near infrared region (central wavelength of 785 nm) are presented. In addition, the possibility of using surface-enhanced Raman spectroscopy in the near infrared region (central wavelength of 785 nm) was analyzed using cystine as an example. The revealed spectral features of the studied amino acids can be used as models for studying the topology of proteins and peptides in human skin during the presence of pathological processes in the body.