

УДК 57.621.383

Л.Н. Бутвина¹, А.Л. Бутвина¹, В.Д. Бицоев²

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук,
Научный центр волоконной оптики им. Е.М. Дианова, Москва, Россия

²Мосгорздрав, Москва, Россия

ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОЖИ IN VIVO ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИМ СЕНСОРОМ ПРИ ФИЗИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУРАХ

В работе исследованы возможности эванесцентной контактной инфракрасной Фурье-спектроскопии кожи живых людей в ИК-области основных колебаний биомолекул ($600\text{--}4000\text{ см}^{-1}$) с использованием новых экструзионных наноструктурированных световодов из галогенидов серебра для получения количественного молекулярного анализа. Малые оптические потери этих световодов и высокое оптическое качество контактных поверхностей позволили получить высокую спектральную чувствительность к клеточным составляющим верхних слоёв кожи и исследовать различия их изменений под воздействием облучения жёлтым светом при физиотерапевтических процедурах разными аппаратами.

Ключевые слова: ИК-экструзионные поликристаллические световоды, эванесцентная инфракрасная спектроскопия, кожа *in vivo*, гидратация кожи, волоконно-оптический сенсор, молекулярный состав биоткани.

L.N. Butvina¹, A.L. Butvina¹, V.D. Bitsoev²

¹General Physics Institute, A.M. Prokhorov Russian Academy of Sciences,
Scientific Center for Fiber Optics named
after E.M. Dianov, Moscow, Russian Federation

²Mosgorzdrav, Moscow, Russian Federation

IN VIVO SKIN INFRARED SPECTROSCOPY FIBER OPTIC SENSOR IN PHYSIOTHERAPY PROCEDURES

The paper investigates the possibilities of evanescent contact infrared Fourier spectroscopy of the skin of living people in the infrared region of the main vibrations of biomolecules ($600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) using new extrusion nanostructured light guides from silver halides to obtain quantitative molecular analysis. The low optical losses of these fibers and the high optical quality of the contact surfaces made it possible to obtain high spectral sensitivity to the cellular components of the upper layers of the skin and to study the differences in their changes under the influence of yellow light irradiation during physiotherapeutic procedures with different devices.

Keywords: IR-extrusion polycrystalline fibers, evanescent infrared spectroscopy, *in vivo* skin, skin hydration, fiber-optic sensor, molecular composition of biological tissue.

Введение

Экструзионные поликристаллические световоды из галогенидов серебра, получаемые ранее в безоболочечном виде¹, использовались для изучения эванесцентной инфракрасной (ИК) спектроскопии кожи людей *in vivo* с различными целями²⁻⁴. В этих работах было получено высокое отношение сигнала к шуму в области основных фундаментальных колебательных переходов составляющих компонентов приповерхностных слоев живой биоткани в широком спектральном диапазоне 4000–500 см⁻¹. Однако постепенное осаждение молекул воды на поверхность безоболочечных световодов и связанные с этим изменения в суммарном спектре, из-за огромного сечения поглощения воды в этом спектральном диапазоне, не позволяли вести долговременные количественные спектральные измерения. Развитие экструзионных поликристаллических инфракрасных (ИК) оболочечных световодов из негигроскопического и нетоксического материала кристаллов твердых растворов галогенидов серебра AgCl–AgBr–AgI с широкой областью (длины волн 20–2,5 мкм или волновые числа 500–4000 см⁻¹) малых оптических потерь (0,1 дБ/м–1дБ/м) со стабильными характеристиками позволяет проводить количественные долговременные спектральные исследования. Стабильность спектра пропускания этих световодов достигается глубокой очисткой исходных монокристаллов для изготовления сердцевины и оболочки и их совместной экструзией в оболочечный наноструктурированный световод. Эванесцентная инфракрасная спектроскопия, основанная на нарушенном полном внутреннем отражении, распространяющемся излучении в сердцевине, является одним из возможных применений инфракрасных световодов на основе галогенидов серебра. Хорошее пропускание и высокое отношение сигнала к шуму в полученных новых световодах позволили достоверно определить изменения спектра поглощения кожи даже при слабых физиотерапевтических воздействиях.

Эксперимент

Эванесцентная компонента излучения в изогнутом петлей с радиусом 4 мм волокне со снятой резанием оболочкой экспоненциально затухает в прижатой коже *in vivo* на глубину порядка длины волны излучения (3–10 микрометра).

Эксперимент проводился с целью выяснения влияния засветки кожи желтым светом одинаковой интенсивности из двух разных физиотерапевтических аппаратов – БИК-1 (Россия) и аналогичного аппарата фирмы Zepher. Аппараты различались только наличием жгута кварцевых световодов длиной 30 см для вывода излучения у БИК-1. Из клинической физиотерапевтической практики известно, что подобная засветка позволяет улучшить иммунный статус организма и переносимость организмом некоторых физиотерапевтических процедур.

В эксперименте в качестве датчика-сенсора использовалось многомодовое наноструктурированное кристаллическое оболочечное волокно со следующим составом: сердцевина 50AgCl–50AgBr диаметром 900 мкм, оболочка 35AgBr–65AgCl диаметром 1000 мкм. В качестве Фурье-спектрометра использовался спектрометр фирмы «Bruker» (модель Vector 22) со штатным пироприемником DTGS, работающим при комнатной температуре. Устройство ввода и вывода излучения, состоящее из двух поворотных зеркал и двух короткофокусных 15 мм ZnSe просветлённых линз с разъёмами для SMA-коннекторов, закреплялось в месте для образцов спектрометра. Спектральное разрешение спектрометра составляло 4 см^{-1} . Погрешность измерения сигнала за 32 сканирования интерферометра спектрометра, связанная с шумом приемника, составляет: $\sigma_{\text{spectre}} = P_{\text{noise}}/P_{\text{signal}} \cdot 1/\sqrt{N} \approx 20/300 \cdot 1/\sqrt{32} \approx 1\%$.

Волокно длиной 2 м в середине было пластически изогнуто в форму петли диаметром 8 мм под 180 градусов, выступающая часть кристаллической оболочки и сердцевина до 1/3 диаметра была срезана и отполирована. Оба конца световода заделывались в SMA-коннекторы. Исходный спектр пропускания ИК-сигнала полученного сенсора представлен на рис.1. Все измерения проводились при красном освещении для предохранения засветки незащищённых открытых световодов галогенидов серебра.

Для получения эванесцентного спектра пропускания кожи выполнялась следующая процедура. Сначала сенсор прижимался перпендикулярно к коже с усилием 100 г на внутренней части запястья. Кожа в месте соприкосновения предварительно протиралась этиловым спиртом и сушилась 5 мин. Изменение пропускания от поглощения кожей (эванесцентный спектр пропускания верхнего слоя кожи *stratum corneum in vivo*), полученное делением сигнала с кожей на исходный сигнал (см. рис. 1), показано на рис. 2. Кожа не поглощает в диапазоне волновых чисел (wavenumber) $2000\text{--}2500 \text{ см}^{-1}$. Поглощение кожей приводит к уменьше-

нию сигнала во всём остальном диапазоне волновых чисел. Спектр поглощения кожей, следовательно, необходимо получать делением сигнала на сигнал в этой области. Характерные спектральные подписи молекулярных составляющих верхнего слоя кожи приведены в таблице.

Значение полос в FT-IR спектрах биологических тканей⁵⁻⁷

Волновое число (см ⁻¹)	Тип колебаний и вещества
3611	Валентные симметричные O–H и N–H
3500–3600	Полосы OH
3401	Валентные симметричные O–H и N–H
3396	O–H валентные ассиметричные
3330	N–H валентные ассиметричные
3300	Амид A-колебание от N–H моды в протеинах и ДНК-кислотах
3008	Олефины–CH валентные: ненасыщенные липиды, эфиры холестерина
1630–1670	Амид I, пептид, протеин, OH
1515–1570	Амид II, пептид, протеин
1468	Деформационные ножничные колебания CH ₂ : липиды
1453	Присадка CH ₂ : в основном липиды и небольшой вклад протеинов
1400	COO– валентные симметричные: жирные кислоты
1343	Крутильные колебания CH ₂ : фосфолипидная жирная кислота, триглицерид, аминокислотные боковые цепи
1238	PO ₂ валентные ассиметричные: в основном нуклеиновые кислоты с небольшим вкладом фосфолипидов
1080	Глюкоза, сахара
968	N–C связь: нуклеиновые кислоты, рибоза-фосфатные колебания основной цепи
933	ДНК Z-типа
915	Колебания рибозного кольца: РНК–ДНК
868	Левая спираль ДНК (Z-форма)
500–800	OH поляризационные

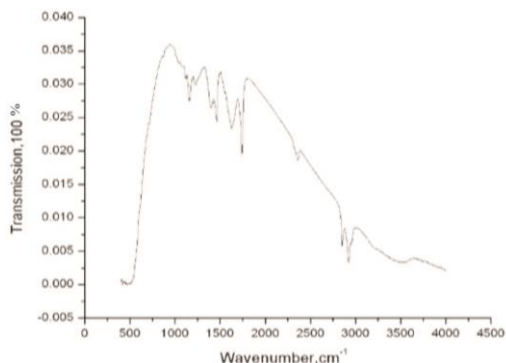


Рис. 1. Исходный сигнал сенсора

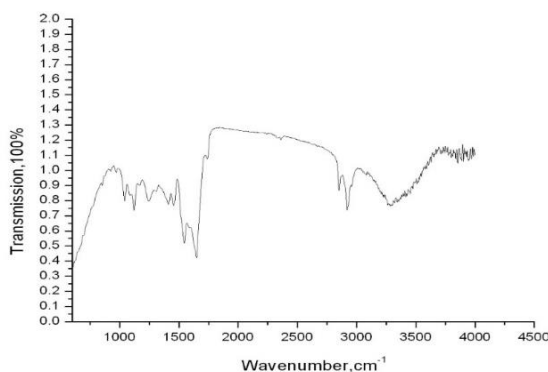


Рис. 2. Спектр кожи (начальный)

Результаты

Для установления результатов влияния жёлтого цветового облучения на кожу запястья аппаратами БИК-1 и Zepher проведены измерения эванесцентных ИК-спектров кожи при терапевтически релевантных дозах облучения.

Ороговевший слой *stratum corneum* частично уменьшался путём отрыва слоя клеток липкой лентой, прижимавшейся последовательно несколько раз.

Далее кожа запястья в том же месте освещалась 4 мин желтым светом через кварцевые световоды аппарата БИК-1. Спектр кожи после засветки приведен на рис. 3.

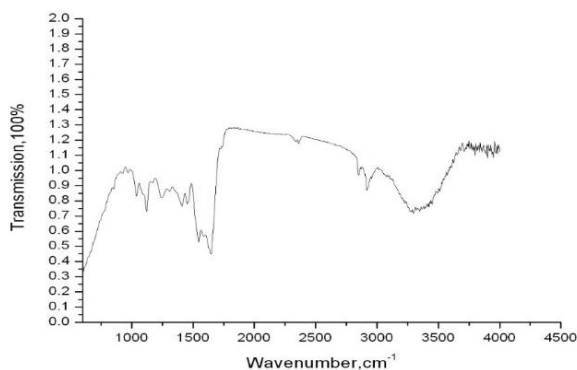


Рис. 3. Спектр кожи после засветки БИК-1 (4 мин)

Далее снималось 2 раза по 5 слоев верхнего кератинированного слоя кожи с помощью липкой ленты DEL. Спектры кожи приведены на рис. 4 и 5 (снято 10 слоев).

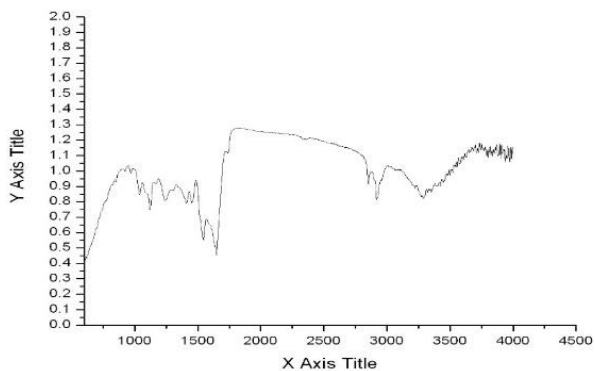


Рис. 4. Спектр кожи (снято 5 слоев)

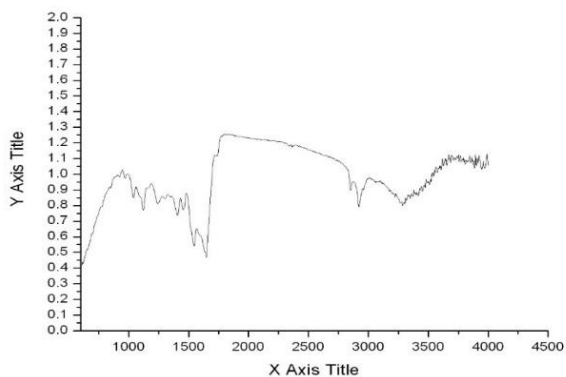


Рис. 5. Спектр кожи (снято 10 слоев)

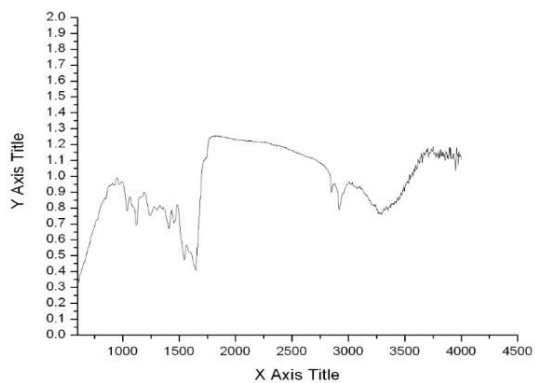


Рис. 6. Спектр кожи после засветки БИК-1 (10 мин)

После этого рука засвечивалась аппаратом БИК-1 в течение 10 мин. Спектр кожи после засветки приведен на рис. 6.

Далее последовательно снималось по 5 слоев кожи. Соответствующие спектры кожи приведены на рис. 7 и 8.

После этого был выбран новый участок кожи запястья. Спектр нового участка кожи приведен на рис. 9. Этот участок кожи облучался по аналогичной процедуре, но другим аппаратом. Сначала кожа подвергалась облучению аппаратом фирмы Zepher в течение 4 мин. Спектр кожи после 4-минутного облучения см. на рис. 10.

Далее последовательно снималось по 5 слоев кожи (спектры на рис. 11 и 12).

Наконец, последняя засветка аппаратом фирмы Zepher длилась 10 мин (см. спектр кожи после засветки на рис. 13). После этого были последовательно сняты 5 слоев кожи (рис. 14 и 15 (10 раз)).

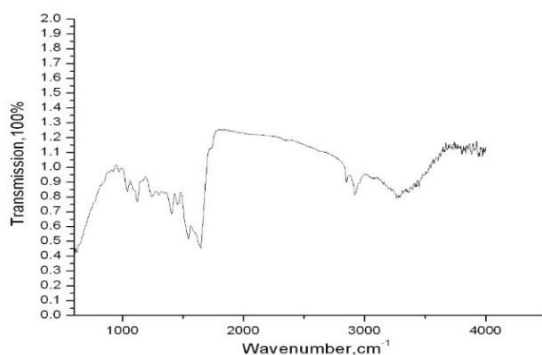


Рис. 7. Спектр кожи (снято 5 слоев после засветки в течение 10 мин)

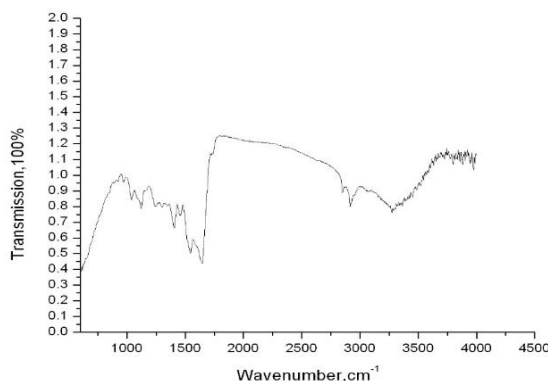


Рис. 8. Спектр кожи (снято 10 слоев после засветки в течение 10 мин)

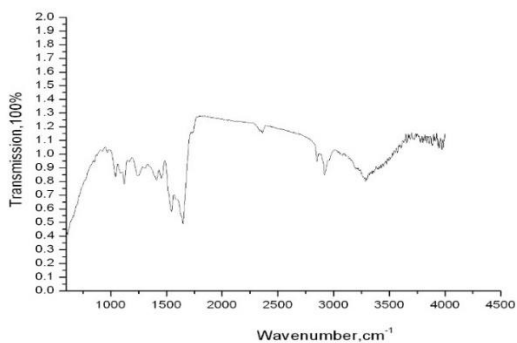


Рис. 9. Исходный спектр кожи (2-й участок)

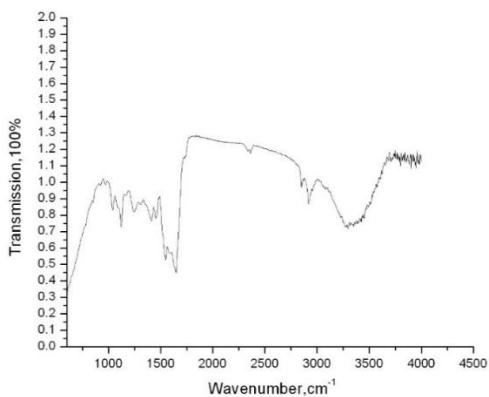


Рис. 10. Спектр кожи после 4 мин засветки (аппарат Zepter)

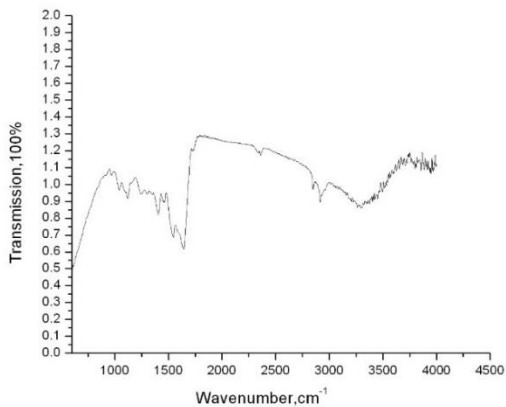


Рис. 11. Спектр кожи после снятия 5 слоев (после аппарата Zepter, 4 мин)

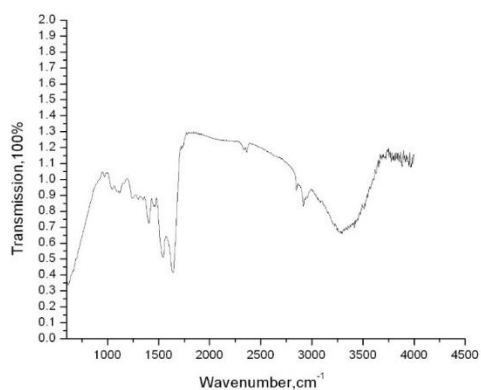


Рис. 12. Спектр кожи после снятия 10 слоев (после аппарата Zepiter, 4 мин)

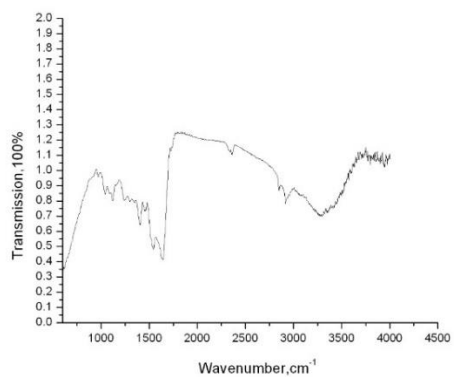


Рис. 13. Спектр кожи после 10 мин засветки (аппарата Zepiter)

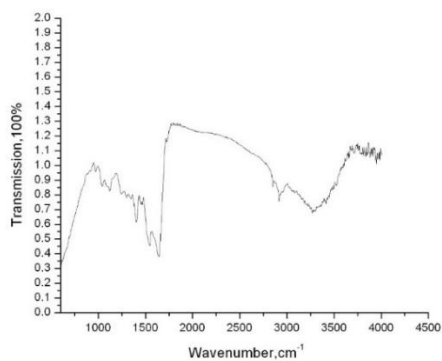


Рис. 14. Спектр кожи после снятия 5 слоев (после аппарата Zepiter, 10 мин)

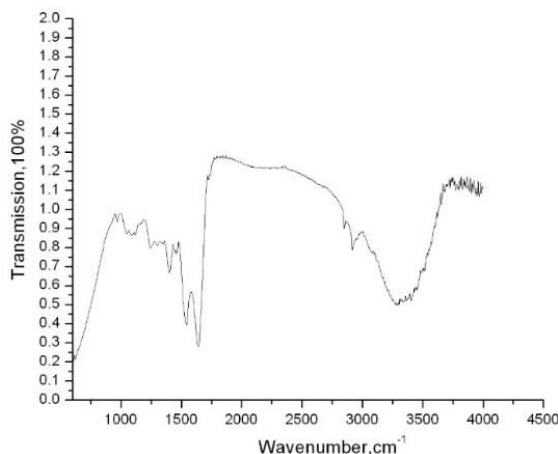


Рис. 15. Спектр кожи после снятия 10 слоев (после аппарата Zepter, 10 мин)

Анализ спектров

На рис. 16 приведены спектры после 4 и 10 мин засветки на аппарате БИК-1, а на рис. 17 – их соотношение. Изменение спектра от 10 мин засветки на аппарате БИК-1 показано на рис. 18, а от аналогичной засветки на аппарате Zepter – на рис. 19.

В отличие от аппарата Zepter, который сушит кожу (пропускание на склоне от 600 до 900 см^{-1} и в водяной полосе 3200–3500 см^{-1} увеличилось, см. рис. 19), спектры кожи после облучения аппаратом БИК-1 показывают увеличение гидратации *stratum corneum* или её сохранение. Это видно из уменьшения сигнала после 10 мин облучения БИК-1 во всех трёх спектральных подпоясах воды 600–900, 1670, 3200–3500 см^{-1} (см. таблицу и рис. 18).

Заметного изменения спектра кожи от снятия липкой лентой ороговевших клеток кожи после облучения аппаратом БИК-1 не произошло с точки зрения изменения степени гидратации (рис. 20). В случае облучения аппаратом Zepter верхний слой *stratum corneum* оказался высушенным, а наиболее глубокий слой (после 10 снятий слоев клеток), наоборот, – более гидратированным (рис. 21, спектр номер 15).

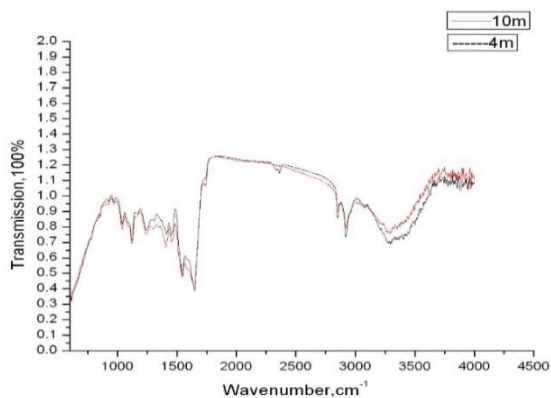


Рис. 16. Спектры после 4 и 10 мин засветки на аппарате БИК-1

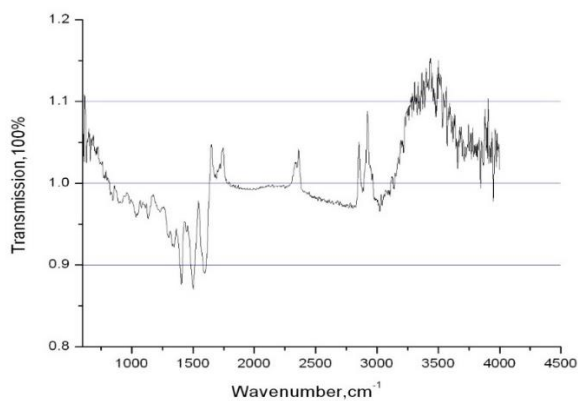


Рис. 17. Соотношение спектров после 4 и 10 мин засветки на аппарате БИК-1

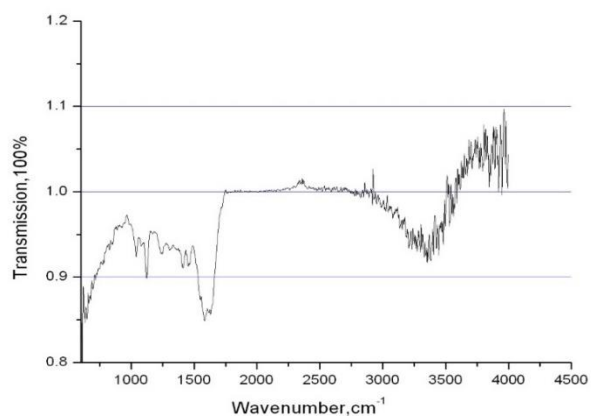


Рис. 18. Изменение (отношение) спектра от 10 мин засветки на аппарате БИК-1

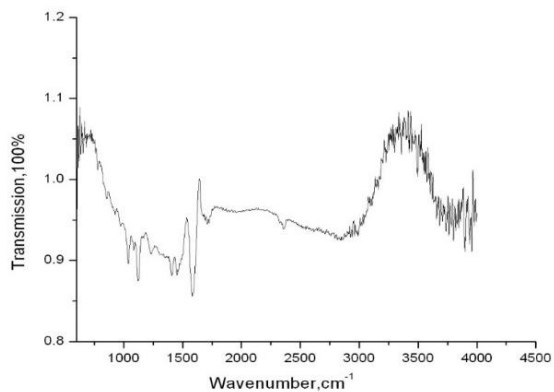


Рис. 19. Изменение (отношение) спектра от 10 мин засветки на аппарате Zephter

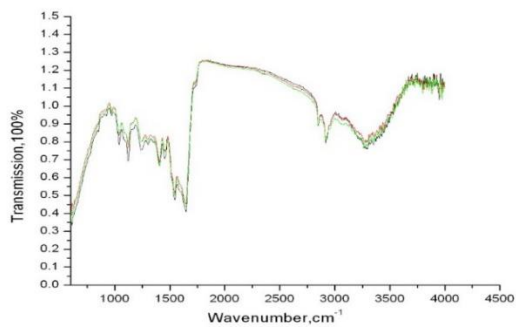


Рис. 20. Спектр поглощения до и после снятия кожи (номера спектров: 6 – черный, 7 – красный, 8 – зеленый)

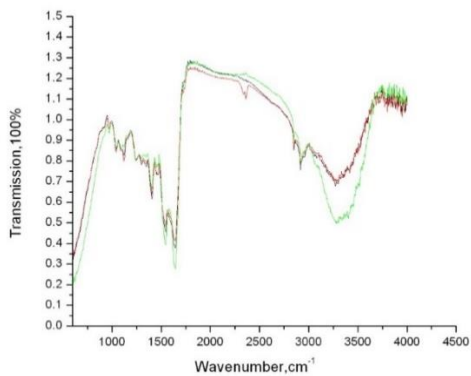


Рис. 21. Спектры после снятия кожи липкой лентой (спектры номер 13 – черный, 14 – красный, 15 – зелёный)

Выводы

Показано, что при полностью волоконном наноструктурированном оболочечном, цельном без прерываний, эванесцентном ИК-спектральном сенсоре можно вести на живых людях исследования молекулярного состава биотканей, в частности кожи, с высоким отношением сигнала к шуму в широком диапазоне ИК 600–4000 см⁻¹, используя работающие штатно при комнатной температуре Фурье-спектрометры. В этой области лежат фундаментальные колебания составляющих ткань биомолекул (их спектральные подписи). Высокое оптическое качество оголённого изогнутого участка наноструктурированного световода позволило получать спектры с большой глубиной модуляции: свыше 50 % поглощение в полосах поглощения, составляющих белки Amide I и Amide II. Это обеспечивает высокую спектральную селективность сенсора и применимость его к количественному анализу молекулярного состава подповерхностных слоёв биоткани *in vivo*. При исследовании засветки кожи одного и того же человека в процессе физиотерапевтических процедур со слабыми дозами удалось выявить различия изменения уровня гидратации подповерхностных слоёв кожи простым сравнением полученных эванесцентных спектров. Этот сенсор может давать релевантную информацию о молекулярных изменениях в ядрах клеток и межклеточной жидкости, в частности об уровне глюкозы.

Список литературы

1. Butvina L. Polycrystalline Fibers // Infrared Fiber Optics / ed. by J.S. Sanghera, I.D. Aggarwal. – CRC Press, Boca Raton, 1998. – P. 209–249.
2. Heise H.M., Kupper L., Butvina L.N. Bio-Analytical Applications of Mid-Infrared Spectroscopy Using Silver Halide Fiber-Optic Probes // Spectrochim. Acta B. – 2002. – №57(10). – P. 1649–1663.
3. Investigations of normal skin tissue using fiber optical FTIR spectroscopy / Angelique L. Brooks, Reinhard F. Bruch, Natalia I. Afanasyeva, Sergei F. Kolyakov, Leonid N. Butvina, Lixing Ma // Proc. SPIE 3195, Laser-Tissue Interaction, Tissue Optics and Laser Welding III. – 14 January 1998.
4. Investigation of normal human skin tissue and acupuncture points of human skin tissue using fiberoptical FTIR spectroscopy / Angelique L.

Brooks, Reinhard F. Bruch, Natalia I. Afanasyeva, Sergei F. Kolyakov, Leonid N. Butvina, Lixing Ma // *Proc. SPIE 3262, Surgical-Assist Systems*. – 5 June 1998. – URL: <https://doi.org/10.1117/12.309469>

5. Epidermal In Vivo and In Vitro Studies by Attenuated Total Reflection Mid-Infrared Spectroscopy Using Flexible Silver Halide Fibre-Probes / H.M. Heise, L. Kupper, W. Pittermann, M. Stucker. // *J. Molec. Struct.* – 2003. – P. 651–653. – P. 127–132.

6. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues // *Appl. Spectrosc. Rev.* – 2008. – №43(2). – P. 134–179.

7. Characterization of Microrna-125b Expression in MCF7 Breast Cancer Cells by ATR-FTIR Spectroscopy / N.S. Ozek, S. Tuna, A.E. Erson-Bensan [et al.] // *Analyst.* – 2010. – №135(12). – P. 3094–3102.

8. Bellisola G., Sorio C. Infrared Spectroscopy and Microscopy in Cancer Research and Diagnosis // *Am. J. Cancer Res.* – 2011. – №2(1). – P. 1–21.

References

1. Butvina L. Polycrystalline Fibers. *Infrared Fiber Optics*. Ed. by J.S. Sanghera, I.D. Aggarwal. CRC Press, Boca Raton, 1998, pp. 209-249.

2. Heise H.M., Kupper L., Butvina L.N. Bio-Analytical Applications of Mid-Infrared Spectroscopy Using Silver Halide Fiber-Optic Probes. *Spectrochim. Acta B*, 2002, no. 57(10), pp. 1649-1663.

3. Angélique L. Brooks, Reinhard F. Bruch, Natalia I. Afanasyeva, Sergei F. Kolyakov, Leonid N. Butvina, Lixing Ma. Investigations of normal skin tissue using fiber optical FTIR spectroscopy. *Proc. SPIE 3195, Laser-Tissue Interaction, Tissue Optics, and Laser Welding III*, 14 January 1998.

4. Angélique L. Brooks, Reinhard F. Bruch, Natalia I. Afanasyeva, Sergei F. Kolyakov, Leonid N. Butvina, Lixing Ma. Investigation of normal human skin tissue and acupuncture points of human skin tissue using fiberoptical FTIR spectroscopy. *Proc. SPIE 3262, Surgical-Assist Systems*. 5 June 1998, available at: <https://doi.org/10.1117/12.309469>

5. Heise H.M., Kupper L., Pittermann W., Stucker M. Epidermal In Vivo and In Vitro Studies by Attenuated Total Reflection Mid-Infrared Spectroscopy Using Flexible Silver Halide Fibre-Probes. *J. Molec. Struct.*, 2003, pp. 651-653, pp. 127-132.

6. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2008, no. 43(2), pp. 134-179.

7. N.S. Ozek, S. Tuna, Erson-Bensan A.E. et al. Characterization of Microna-125b Expression in MCF7 Breast Cancer Cells by ATR-FTIR Spectroscopy. *Analyst*, 2010, no. 135(12), pp. 3094-3102.

8. Bellisola G., Sorio C. Infrared Spectroscopy and Microscopy in Cancer Research and Diagnosis. *Am. J. Cancer Res.*, 2011, no. 2(1), pp. 1-21.

Получено 1 июня 2020