

УДК 681.784.88, 535.36

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ КОЖИ
ЧЕЛОВЕКА, С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОВ ДИАПАЗОНА 0,05–1,2 ТГц****А.А. Езерская, М.В. Цуркан, О.А. Смолянская, А.В. Капралова, Н.С. Балбекин, И.В. Романов,
И.В. Прожеев, Е.А. Стрепитов, И.Ю. Просанов**

Методом терагерцовой (ТГц) спектроскопии с разрешением во времени получены спектры кожи человека и таблетированных препаратов аминокислот в диапазоне 0,05–1,2 ТГц. Сделано сопоставление спектральных линий аминокислот для идентификации их в коже. Показано, что наиболее хорошо различимы в спектре кожи следующие аминокислоты: триптофан, цистеин, аланин, глицин, фенилаланин и гистидин. ТГц спектральные линии указанных аминокислот связаны с колебательными модами молекул, которые обусловлены химическими реакциями, процессами гидратации и конформных изменений молекул в коже человека. Определение спектральных линий аминокислот и других характерных молекул, участвующих в метаболических процессах кожи, необходимо для разработки ТГц диагностического прибора с максимальной чувствительностью и селективностью.

Ключевые слова: терагерцовая спектроскопия, диагностика, кожа человека, аминокислоты.

Введение

Исследования в области применения ТГц излучения в медицине направлены, в основном, на диагностику различных заболеваний человека и животных [1, 2]. Наиболее актуальными объектами диагностических исследований являются патологические новообразования кожи человека, а также динамика восстановления кожи после полученной травмы. В этом направлении получены положительные результаты, показывающие однозначную идентификацию пораженных областей кожи с помощью ТГц спектроскопии [3]. В том числе, большое количество экспериментальных работ по данной тематике было проведено в научно-образовательном центре фемтосекундной оптики и фемтотехнологий НИУ ИТМО. Однако до сих пор неизученным оставался вопрос идентификации различных биологических молекул, входящих в состав кожи человека, в ТГц спектрах. На данный момент имеются предположения о том, что отдельные пики ТГц спектров характеризуют поглощение воды, входящей в состав кожи [1, 4]. Также в литературе встречаются работы, в которых приводятся ТГц спектры отдельных биологических молекул [5, 6]. Однако общая картина изменения спектров ТГц излучения в результате взаимодействия с кожными покровами на данный момент отсутствует. Очевидно, что для разработки медицинских приложений необходимо заполнить эту нишу.

В ТГц диапазоне частот лежат линии поглощения, соответствующие вращательным движениям молекул, молекулярных групп сложных молекул. Также излучение оказывает влияние на молекулярные комплексы, структурированные за счет межмолекулярных взаимодействий – ван-дер-ваальсовых сил и водородных связей. Развитие ТГц спектроскопии позволяет получить новые сведения как о конформации молекул, так и о характеристиках межмолекулярных взаимодействий при различных условиях.

Особый интерес представляет оценка возможных конформационных изменений сложных биологических молекул при их взаимодействии или изменении условий и среды функционирования молекул. К настоящему времени хорошо известно, что функциональное состояние биологической молекулы зависит от ее конформационных особенностей [7–9]. В белке акцепторами ТГц излучения являются аминокислоты, поэтому представляет несомненный интерес изучение влияния излучения ТГц диапазона на состояние колебательно-вращательных мод индивидуальных аминокислот, в первую очередь таких, как характеристические белковые хромофоры – триптофан, тирозин и пр. Практически при любых физико-химических воздействиях на белок, включая и электромагнитное излучение, именно эти аминокислоты обнаруживают различия в поглощении излучения при стандартной УФ спектроскопии [7, 8].

В связи с этим представляется актуальным исследование влияния ТГц излучения на колебательно-вращательные частоты этих хромофоров в коже человека в ТГц диапазоне.

Материалы и методы

Терагерцовый рефлектометрический томограф. Исследование спектров отражения образцов в диапазоне 0,05–1,2 ТГц проводилось с помощью терагерцового рефлектометрического томографа. Его схема представлена на рис. 1. В основе работы устройства лежит принцип записи распределения электрической компоненты поля до и после отражения от образцов. Восстановление спектра ТГц излучения реализуется с помощью вычисления интеграла Фурье по записанным данным.

Луч с выхода FL-1 поступает на светоделитель пучка 1, где разделяется на два луча. Пробный луч распространяется по оптической схеме (система зеркал М, электрооптический кристалл 9, ахроматическая четвертьволновая пластина 10, призма Волластона 11) и поступает на вход балансного детектора 12. Луч накачки последовательно проходит оптико-механический модулятор 5, оптическую линию задержки 2 и поступает на вход полупроводникового кристалла InAs 3. Излучение с выхода 3 через систему двух параболических зеркал и делитель ТГц излучения 7 падает на исследуемый образец 6. Отраженное образцом излучение через параболическое зеркало 4 и делитель 7 падает на электрооптический кристалл CdTe 9, фо-

кусируясь линзой 8. Под действием электрической компоненты ТГц излучения изменяется плоскость поляризации электрооптического кристалла. Таким образом, электрическая компонента ТГц излучения с помощью фазосдвигающей пластинки 10 и призмы Волластона 11 детектируется балансным детектором 12 с синхронным усилением. Изменение времени задержки луча накачки приводит к сдвигу времени открытия электрооптического кристалла, что позволяет сканировать распределение электрической компоненты поля по времени. Данные измерений с синхронного усилителя заносятся в персональный компьютер с помощью встроенного аналого-цифрового преобразователя.

В таблице представлены основные характеристики ТГц рефлектометрического томографа.

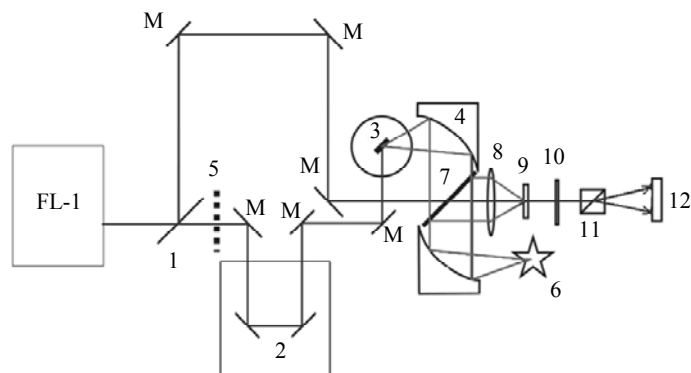


Рис. 1. Схема ТГц рефлектометрического томографа: FL-1 – лазер фемтосекундных импульсов на Yb:KYW; М – зеркала с $R \approx 100\%$ при падении светового пучка под 45° ; 1 – светоделитель; 2 – оптическая линия задержки; 3 – полупроводниковый кристалл InAs; 4 – 45° параболические зеркала; 5 – оптико-механический модулятор; 6 – объект исследования; 7 – светоделитель ТГц излучения на основе пластины из высокоомного кремния; 8 – линза из TPX (поли-4-метилпентен-1) с $f = 5$ см; 9 – электрооптический кристалл CdTe; 10 – ахроматическая четвертьволновая пластинка; 11 – призма Волластона; 12 – балансный детектор

Характеристика	Значение
Средняя мощность ТГц излучения, мкВт	30 ± 3
Мощность импульса, мВт	120 ± 10
Длительность импульса, пс	3
Энергия импульса, фДж	360 ± 30
Спектральный диапазон, ТГц	0,05–2,0
Отношение сигнал/шум в спектре	100
Частота повторения, МГц	75
Частота модуляции, Гц	433

Таблица. Характеристики ТГц рефлектометрического томографа

Методика измерений спектра пропускания кожи человека и отдельных аминокислот состоит из следующих этапов:

1. запускается ТГц рефлектометрический томограф, согласно порядку включения;
2. на персональном компьютере запускается программа управления томографом;
3. производится измерение амплитуды электрической компоненты поля в отсутствие измеряемого образца;
4. предварительно подготовленные образцы помещаются согласно схеме (рис. 1) в измерительную установку;
5. производится измерение амплитуды электрической компоненты поля, отразившегося от образца;
6. полученные данные заносятся в программу, реализующую алгоритм преобразования Фурье;
7. по полученным спектральным выборкам определяется частота отражения ТГц излучения в образцах.

Подготовка кожи для экспериментального исследования. Для получения спектра нормальной кожи облучался участок кожи руки человека с внешней стороны, представленный на рис. 2.

Подготовка аминокислот для экспериментального исследования. В качестве объектов были использованы таблетированные формы порошковых лиофилизированных препаратов следующих аминокислот: аланин, глицин, гистидин, триптофан, фениланин, цистеин (фирма Sigma, США). Образцы для эксперимента готовились путем прессования порошков аминокислот в таблетки диаметром 3 мм и толщиной около 1,5 мм. Прессование производилось в вакууме в стальных оправках. Эксперименты проводились при комнатной температуре. Исследуемые образцы кожи и аминокислот устанавливались в перетяжку ТГц луча, диаметр которого составлял 1 мм. Время экспозиции образца под излучением составляло 5 минут. Спектр каждого образца записывался три раза. Результаты измерений по каждому образцу усреднялись.

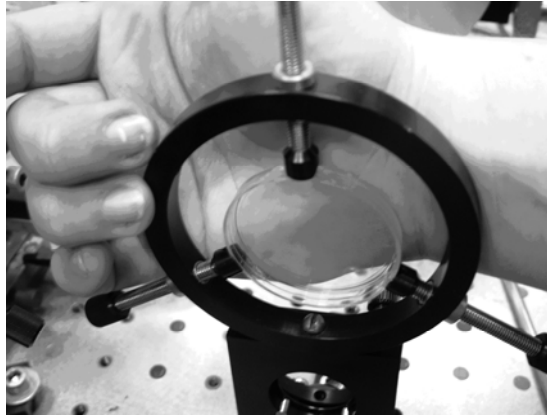


Рис. 2. Фотография руки женщины 21 года с участком облучаемой кожи

Результаты и их обсуждение

На рис. 3 представлен спектр отражения нормальной кожи человека.

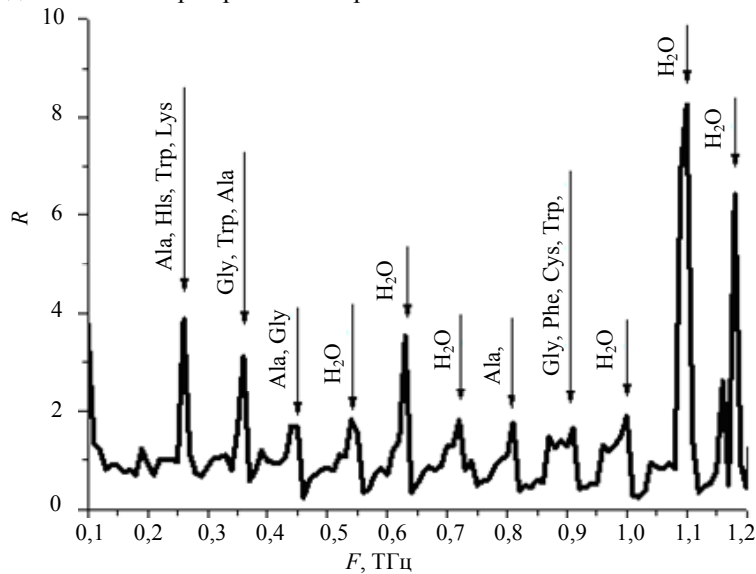


Рис. 3. ТГц спектр отражения участка нормальной кожи человека: R – ТГц отраженный сигнал, в условных единицах; F – частота. Ala – аланин; Cys – цистеин; His – гистидин; Gly – глицин; Trp – триптофан; Phe – фениланин; H_2O – вода

На спектре удалось выделить спектральные линии исследованных аминокислот. Так, рядом с линией отражения кожи на частоте 0,26 ТГц линия отражения имеется у аланина, гистидина, триптофана и лизина. Аминокислоты расположены в порядке уменьшения интенсивности пика отражения. Линия отражения кожи на частоте 0,36 ТГц совпала с линиями следующих аминокислот: глицин, триптофан и аланин. Отражение на частоте 0,82 ТГц совместились с отражением аланина. Линии отражения кожи имеются в области частот 0,87; 0,89; 0,91 ТГц. Этим линиям сопоставлены следующие аминокислоты: глицин, фениланин, цистеин, аланин и триптофан. Указанные аминокислоты содержатся в больших количествах в коже и соединительной ткани, поэтому полезны для ее восстановления при повреждении [10]. Глицин замедляет дегенерацию мышечной ткани. Он является источником креатина – вещества, содержащегося в мышечной ткани и используемого при синтезе ДНК и РНК. Цистеин играет важную роль в процессах формирования тканей кожи. Он входит в состав альфа-кератина – основного белка ногтей, кожи и волос, способствует формированию коллагена и улучшает эластичность и текстуру кожи.

Линии отражения на частотах 0,55; 0,63; 0,73; 1 ТГц, а также 1,1 и 1,17 ТГц были отнесены к пикам, связанным с поглощением жидкой воды [11, 12] и водяного пара [13] в терагерцовой области частот. Субмиллиметровое, т.е. ТГц излучение поглощается парами воды и молекулярным кислородом [14]. С большой вероятностью можно считать, что в коже человека возможными фоторецепторами субмиллиметрового диапазона могут быть свободная вода и гидратные оболочки ионов и молекул, находящихся во внеклеточной жидкости, а также растворенный в ней молекулярный кислород. Изменение состояния воды и кислорода может вызвать изменение конформации примембранных белков.

Заключение

Получены ТГц спектры отражения нормальной кожи человека и некоторых аминокислот. Показано, что некоторые линии отражения кожи совпадают со следующими аминокислотами: триптофан, цистеин, аланин, глицин, фенилаланин, гистидин. Указанные аминокислоты содержатся в больших количествах в коже и соединительной ткани. ТГц спектральные линии указанных аминокислот связаны с колебательными модами молекул, которые обусловлены химическими реакциями, процессами гидратации и конформных изменений молекул в коже человека. Определение спектральных линий аминокислот и других характерных молекул, участвующих в метаболических процессах кожи, необходимо для разработки ТГц диагностического прибора с максимальной чувствительностью и селективностью.

Некоторые линии в ТГц спектрах кожи человека соотнесены с поглощением воды, находящейся во внеклеточной жидкости, а также с растворенным в ней молекулярным кислородом. Таким образом, изменение состояния воды и кислорода под влиянием ТГц излучения может вызвать изменение конформации примембранных белков в структуре кожи.

Полученные результаты актуальны для диагностики и терапии кожи человека, нормальной и с патологическими изменениями.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (ГК № 14.В37.21.0248).

Литература

1. Езерская А.А., Романов И.В., Смолянская О.А., Грачев Я.В. Ранняя диагностика кариеса твердых тканей зубов с помощью лазерного излучения терагерцового диапазона // Научно-технический вестник СПбГУ ИТМО. – 2011. – № 6 (76). – С. 92–97.
2. Езерская А.А., Смолянская О.А., Парахуда С.Е., Грачев Я.В., Гончаренко А.О. Терагерцовые спектры пропускания и отражения катарактально измененных хрусталиков глаза человека // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2012. – № 2 (78). – С. 33–36.
3. Joseph C.S., Yaroslavsky A.N., Al-Arashi M. Terahertz spectroscopy of intrinsic biomarkers for non-melanoma skin cancer // Proceedings of SPIE (SPIE, Bellingham, WA 2009). – V. 7215. – P. 72150I.
4. Laman N., Harsha S.S., Grischkowsky D., Melinger J.S. High-resolution waveguide thz spectroscopy of biological molecules // Biophysical Journal. – 2008. – V. 94. – P. 1010–1020.
5. Xu J., Plaxco K.W., Allen S.J. Probing the collective vibrational dynamics of a protein in liquid water by terahertz absorption spectroscopy // Protein Science. – 2006. – V. 15. – P. 1175–1181.
6. Казаринов К.Д. Биологические эффекты электромагнитного поля терагерцового диапазона // Электронная техника. Сер. 1: СВЧ-техника. – 2009. – Т. 503. – № 4. – С. 48–58.
7. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. – Кн. 2 / Под ред. Ю.А. Грызунова, Г.Е. Добрецова. – М.: ГЭОТАР, 1998. – 440 с.
8. Добрецов Г.Е., Миллер Ю.И. Биохимия и физико-химия сывороточного альбумина. Центры связывания органических молекул // Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. – Кн. 1 / Под ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова. – М.: ИРИУС, 1994. – С. 13–28.
9. Капралова А.В., Погодин А.С. Влияние терагерцового излучения различных диапазонов на конформацию молекул бычьего сывороточного альбумина // Вестник НГУ. Серия: Физика. – 2010. – Т. 5. – Вып. 4. – С. 182–185.
10. Аминокислоты [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.strong-atlet.net/main/dobavki/133-aminokisloty.html>, свободный. Яз. рус. (дата обращения 17.10.2012).
11. Globus T., Anwar Mehdi, DeMaria Anthony J., Shur Michael S. Low-Terahertz spectroscopy of liquid water // Terahertz Physics, Devices and Systems II // Proc. of SPIE. – 2007. – V. 6772. – P. 67720S-1–67720S-11.
12. Анцыгин В.Д., Мамрашев А.А., Николаев Н.А., Потатуркин О.И. Малогабаритный терагерцовый спектрометр с использованием второй гармоники фемтосекундного волоконного лазера // Автометрия. – 2010. – Т. 46. – № 3. – С. 110–117.
13. Martin van Exter, Fattinger Ch., Grischkowsky D. Terahertz time-domain spectroscopy of water vapor // Optics Letters. – 1989. – V. 14. – № 20. – P. 1128–1130.
14. Айвазян Г.М. Распространение миллиметровых и субмиллиметровых волн в облаках. – Л.: Гидрометеоиздат, 1991. – 480 с.

Езерская Анна Александровна

– Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, студент, a.a.ezerskaya@gmail.com

Цуркан Мария Валерьевна

– Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, аспирант, tsurkan.maria@yandex.ru

- Смолянская Ольга Алексеевна* – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат физ.-мат. наук, доцент, o_smolyanskaya@mail.ru
- Капралова Ангелина Владимировна* – Институт лазерной физики СО РАН, аспирант, kapralova@ngs.ru
- Балбекин Николай Сергеевич* – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, студент, godnikolay@yandex.ru
- Романов Илья Владимирович* – Томский государственный университет, аспирант, roil@elefot.tsu.ru
- Прожеев Игорь Александрович* – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, студент, prozheev.iv@gmail.com
- Стрепитов Евгений Александрович* – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, студент, e-strep@yandex.ru
- Просанов Игорь Юрьевич* – Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, доктор технических наук, ст. научный сотрудник, prosanov@mail.ru