

НИЗКОЧАСТОТНАЯ КР-СПЕКТРОСКОПИЯ КЕРАТИНОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ВОЛОСА

© 2025 г. Е. И. Травкина*, А. Ю. Чикишев, Н. Н. Брандт

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Физический факультет,
Кафедра общей физики и волновых процессов, Москва, Россия*

**E-mail: travkina.ei19@physics.msu.ru*

Поступила в редакцию 14.11.2024 г.

После доработки 03.12.2024 г.

Принята к публикации 30.12.2024 г.

Выполнена идентификация низкочастотных линий комбинационного рассеяния, характеризующих колебания элементов вторичной структуры фибриллярных белков — кератинов. Предложена методика, основанная на измерении спектров комбинационного рассеяния непигментированных человеческих волос в двух экспериментальных конфигурациях: при фокусировке возбуждающего излучения соосно с волосом и перпендикулярно ему. На основании поляризационной чувствительности полосы на частотах 150 и 221 см⁻¹ отнесены к колебаниям α -спиральных структур кератинов. Спектральный интервал 270–340 см⁻¹ отнесен к колебаниям β -структур.

Ключевые слова: низкочастотная КР микроспектроскопия, кератины, вторичная структура белка, поляризационная чувствительность, волос человека

DOI: 10.31857/S03676765250401811, EDN: GUEXKQ

ВВЕДЕНИЕ

Человеческий волос состоит в основном из фибриллярных белков — кератинов [1]. В волосе можно выделить три структурных компонента: кутикулу, кортекс и медулу. Кортекс формируется из левосторонних суперспиралей α -кератинов, которые организуются в микрофибриллы. Микрофибриллы образуют макрофибриллы, которые ориентированы преимущественно вдоль оси волоса и погружены в низкомолекулярный матрикс [2]. Стабильность такой структуры поддерживается в основном за счет дисульфидных мостиков, концентрация которых составляет около 1.5 ммоль/г [3]. Кортекс окружен защитной оболочкой — кутикулой, которая имеет толщину 2–3 мкм и образована кератинами, вторичная структура которых состоит преимущественно из β -листов, β -шпилек и неупорядоченных элементов [2]. Внутренние слои кутикулы также содержат суперспирали α -кератинов [4]. Характерной особенностью кутикулы является более высокое содержание дисульфидных связей (2.1 ммоль/г) по сравнению с кортексом [3]. Таким образом, волос является удобной молекулярной системой для изучения и сравнения колебательных полос вторичной структуры кератинов, в том числе в низкочастотном (НЧ) (50–480 см⁻¹) спектральном интервале.

Микроспектроскопия комбинационного рассеяния (КР) успешно используется для исследования молекулярной структуры человеческого волоса с начала XXI века [5]. Микронное пространственное разрешение метода позволяет различать спектры кутикулы и кортекса. В интервале «отпечатков пальцев» (ОП интервал) вторичная структура белков в основном характеризуется линиями амид I (1650–1680 см⁻¹) и амид III (1230–1300 см⁻¹) [5].

Особый интерес вызывают широкие НЧ линии, которые часто относятся к коллективным колебаниям скелета молекулы или межмолекулярным колебаниям [6–7], однако однозначная интерпретация КР линий в этом интервале до сих пор отсутствует. В настоящее время проводится множество исследований, посвященных определению причин возникновения НЧ колебаний белковых молекул. Выявлено, что такие колебания чувствительны к конформационным изменениям молекулы белка. Например, сравнительный анализ КР спектров нативного и денатурированного коллагена показал, что отличие интенсивностей КР линий в полосе 200–300 см⁻¹ может быть обусловлено изменениями в третичной структуре белка [8]. Обсуждается влияние разрыва дисульфидных связей на третичную структуру химотрипсина и альбумина посредством сравнения КР спектров в ОП и НЧ ин-

тервалах [9]. Существуют разногласия в интерпретации полосы частот $100\text{--}190\text{ см}^{-1}$. В одних работах авторы утверждают, что КР линии в этом интервале характеризуют колебания α -спиралей [10–12], а в других – их относят к колебаниям β -структур [13–15]. Вышесказанное актуализирует проблему идентификации НЧ полос в КР спектрах белков.

Цель работы состоит в идентификации низкочастотных КР линий, характеризующих колебания элементов вторичной структуры кератинов человеческого волоса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовались седые человеческие волосы. Образцы были промыты в дистиллированной воде и высушены при комнатной температуре. Донор не использовал косметические средства для волос в течение недели до момента забора образцов. Отсутствие пигмента в волосах обеспечивало пренебрежимо малое тепловое воздействие на волос при измерениях КР спектров и минимизировало интенсивность широкополосного флуоресцентного фона.

Измерения проводились в двух экспериментальных конфигурациях: горизонтальной и вертикальной. Горизонтальная конфигурация подразумевает фокусировку возбуждающего излучения на боковую поверхность волоса. В вертикальной конфигурации возбуждающее излучение фокусируется нормально на торец волоса. Свободное поперечное сечение волоса получалось в результате его заморозки и последующего излома в жидком азоте [16].

КР спектры измерялись на микроспектрометре DXR Raman Microscope (Thermo Scientific) с длиной волны возбуждения 780 нм и мощностью 24 мВт . Фокусировка на образец деполяри-

зованного излучения (степень поляризации ≈ 0.1) осуществлялась объективом Olympus MPlan N 100X/0.90 BD (рабочее расстояние 0.21 мм) в пятно диаметром 0.9 мкм . Спектры измерялись в интервале $50\text{--}3500\text{ см}^{-1}$ со спектральным разрешением 4 см^{-1} . Латеральное и аксиальное разрешения микроспектрометра составляли 1 и 2 мкм , соответственно. Время накопления одного спектра было равно 30 минут.

Коррекция фонового сигнала при сравнении КР спектров проводилась с помощью программы NewCompare, осуществляющей минимизацию среднеквадратичного отклонения между спектрами с помощью умножения одного из спектров на константу и добавления к нему полинома заданной степени [17]. После коррекции спектры сглаживались по 20 точкам с помощью алгоритма Савицкого–Голея [18], после чего применялось $R(\nu)$ -преобразование [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены КР спектры кутикулы человеческого волоса, измеренные в горизонтальной и вертикальной конфигурациях. Спектры на рис. 1б сдвинуты по вертикали для удобства сравнения. Отличия связаны с поляризационной чувствительностью КР линий α -спиралей. В вертикальной конфигурации напряженность поля возбуждающего излучения преимущественно перпендикулярна осям α -спиралей, а в горизонтальной – направлена равновероятно вдоль осей α -спиралей и перпендикулярно им [20].

В ОП интервале значимые отличия видны на частотах 560 , 935 , 1316 и 1652 см^{-1} (рис. 1). Линия на частоте $\approx 560\text{ см}^{-1}$ может характеризовать как внеплоскостные изгибные колебания группы $\text{C}=\text{O}$ (амид VI) [21], так и колебания дисульфидных мостиков в транс-гош-транс конформа-

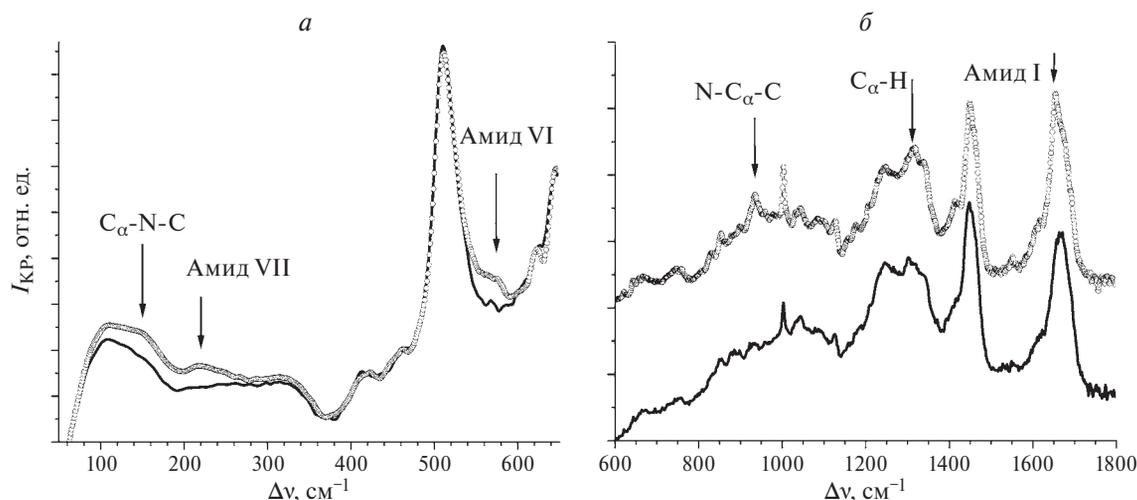


Рис. 1. КР спектры кутикулы человеческого волоса, измеренные при фокусировке возбуждающего излучения на торец волоса (сплошная кривая) и при заведении излучения перпендикулярно оси волоса (кривая с кружками).

ции [22]. На частоте 935 см^{-1} происходят скелетные колебания полипептидной цепи $\text{N-C}_\alpha\text{-C}$, валентные колебания групп C-N , N-C_α и маятниковые колебания групп CH_3 [22]. Частота 1316 см^{-1} соответствует колебаниям $\text{C}_\alpha\text{-H}$ [5]. Полоса с максимумом на частоте 1652 см^{-1} (амид I) отвечает колебаниям пептидной связи [1, 22]. Указанные спектральные отличия проявляются на частотах, характеризующих колебания α -спиральных структур.

В НЧ интервале ярко выражены отличия в полосах на частотах $110\text{--}165$ и $200\text{--}240\text{ см}^{-1}$ (рис. 1а). В КР спектрах, измеренных в горизонтальной конфигурации, то есть при наличии компоненты поля, параллельной осям спиралей, интенсивность $I_{\text{КР}}$ широких линий на частотах около 150 и 221 см^{-1} значительно больше. Поскольку отличия в ОП и НЧ интервалах должны коррелировать, линии на частотах 150 и 221 см^{-1} можно отнести к колебаниям α -спиральных структур кератинов.

Полученные результаты согласуются с опубликованными данными, полученными для различных α -спиральных белков. Линии вблизи частоты 150 см^{-1} наблюдаются в КР спектрах бычьего альбумина [23], альбумина человека [24] и коллагена [10]. В КР спектрах α -спирального поли-L-аланина линия на частоте 120 см^{-1} отнесена к крутильным колебаниям $\text{C}_\alpha\text{-C}$ и N-C_α [12], а линия на частоте 159 см^{-1} характеризует внеплоскостные изгибные колебания N-H группы и также деформационные колебания C-N-C_α и $\text{N-C}_\alpha\text{-C}$ [11]. Сравнительный анализ КР спектров α -спирального белка лизоцима и β -белка химотрипсина показал, что интенсивность линии на частоте 150 см^{-1} возрастает при увеличении концентрации α -спиралей в белке [10].

Данные о полосе частот $200\text{--}240\text{ см}^{-1}$ также подтверждают ее принадлежность к колебаниям

α -структур. КР линии вблизи частоты $\sim 200\text{ см}^{-1}$ относятся к колебаниям амид VII [25]. В КР спектрах α -спирального поли-L-аланина и полиглицина линии на частотах 209 см^{-1} и 217 см^{-1} были отнесены к колебаниям C-N-C_α и C=O [11]. Колебания на частоте 240 см^{-1} в КР спектрах α -спиральных лизоцима и миоглобина [26] характеризуют симметричные валентные или крутильные колебания полипептидной цепи.

На рис. 2 показаны КР спектры кутикулы и кортекса, измеренные в вертикальной конфигурации эксперимента, то есть при фокусировке возбуждающего излучения на торец волоса. Спектры на рис. 2б сдвинуты по вертикали для удобства сравнения. Изменение интенсивностей $I_{\text{КР}}$ в ОП интервале (рис. 2) при переходе от кутикулы к кортексу обусловлено уменьшением концентрации S-S (510 см^{-1}), C-S (665 см^{-1}) и S=O (1040 см^{-1}) связей [5]. Важно отметить спектральные отличия, связанные с различной концентрацией элементов вторичной структуры кератинов в кутикуле и кортексе. Возрастание интенсивности $I_{\text{КР}}$ линий в КР спектре кортекса наблюдается на частотах $560, 935, 1316, 1652\text{ см}^{-1}$, что обусловлено более высоким содержанием α -спиралей. При этом в КР спектре кутикулы линии на частотах 1247 и 1671 см^{-1} являются более интенсивными за счет повышенной концентрации β -структур и неупорядоченных элементов [22]. Увеличение интенсивностей $I_{\text{КР}}$ линий на частотах $750, 1340$ и 1615 см^{-1} при переходе от кутикулы к кортексу соответствует увеличению концентрации аминокислотных остатков триптофана [5, 21].

В НЧ интервале также наблюдается перераспределение интенсивностей $I_{\text{КР}}$ линий при переходе от кутикулы к кортексу: увеличение интенсивности $I_{\text{КР}}$ линий на частотах 150 и 221 см^{-1} сопровождается уменьшением интенсивности $I_{\text{КР}}$

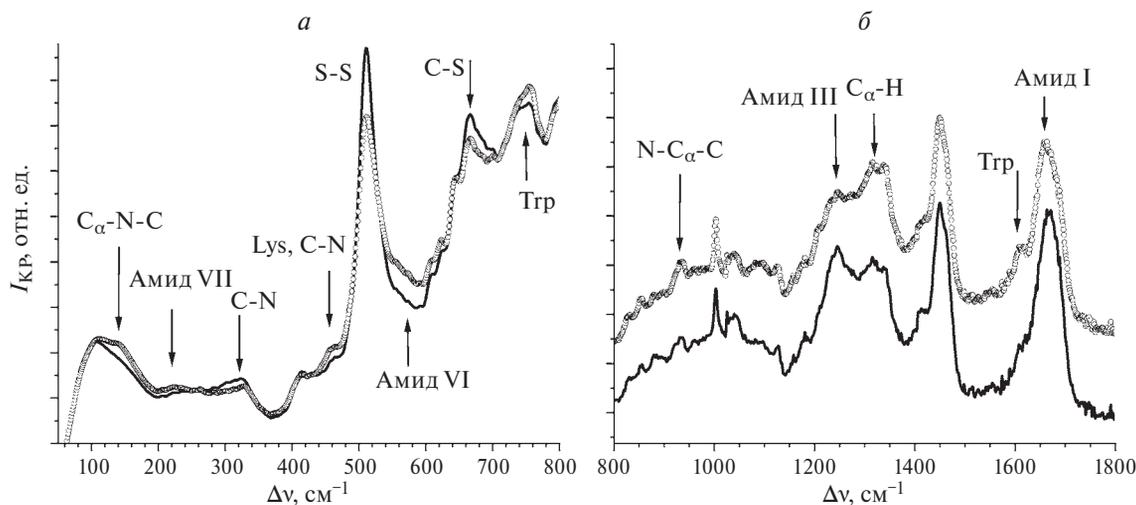


Рис. 2. КР спектры кутикулы (сплошная кривая) и кортекса (кривая с кружками) человеческого волоса, измеренные в вертикальной экспериментальной конфигурации.

в интервале 270–340 см^{-1} (рис. 2а). Изменения вблизи частот 150 и 221 см^{-1} согласуются с показанными на рис. 1а и, следовательно, характеризуют увеличение содержания α -спиралей. КР линию в интервале 270–340 см^{-1} можно отнести к колебаниям β -структур. Действительно, характерные линии на частотах 300 и 330 см^{-1} наблюдались, например, в КР спектрах поли-L-аланина, поли-L-аланилглицина и полиглицина в β -конформации, которые были отнесены к деформационным колебаниям C-N-C $_{\alpha}$, N-C $_{\alpha}$ -C, плоскостным колебаниям C=O [27] или валентным колебаниям N-C [28].

Отличия между КР спектрами кутикулы и кортекса в НЧ интервале наблюдаются также на частоте 465 см^{-1} (рис. 2а), что может быть связано с более высокой концентрацией в кортексе лизина [3, 29]. Вблизи частоты 465 см^{-1} могут также наблюдаться колебания C-N групп, например, в случае лизоцима [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Непигментированный человеческий волос является удобной системой для изучения КР линий, характеризующих колебания вторичной структуры кератинов в НЧ интервале (50–480 см^{-1}).

Проведена идентификация НЧ КР линий, характеризующих колебания элементов вторичной структуры кератинов, основанная на их поляризационной чувствительности. Спектральные отличия проявляются при фокусировке деполяризованного излучения на боковую поверхность волоса и на его торец. Широкие линии на частотах 150 и 221 см^{-1} отнесены к колебаниям α -спиралей кератинов. В результате сравнения КР спектров кутикулы и кортекса (областей волоса с различным содержанием элементов вторичной структуры) получено, что в интервале 270–340 см^{-1} проявляются колебания β -структур.

Результаты работы могут быть положены в основу исследований конформационных переходов, происходящих в кератинах, например, при воздействии различных внешних факторов, таких как нагрев, УФ облучение или химические воздействия.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств программы развития Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «Базис».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuzuhara A. // Biopolymers. 2005. V. 79. No. 4. P. 173.
2. Yang F.C., Zhang Y., Rheinstädter M.C. // PeerJ. 2014. V. 2. Art. No. e619.
3. Robbins C.R. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. P. 105.
4. Rogers G.E. // Cosmetics. 2019. V. 6. No. 2. P. 32.
5. Kuzuhara A. // J. Mol. Struct. 2013. V. 1047. P. 186.
6. Chou K.C. // Biophys. Chem. 1986. V. 25. No. 2. P. 105.
7. Berzins K., Fraser-Miller S.J., Gordon K.C. // Int. J. Pharm. 2020. V. 592. Art. No. 120034.
8. Balakhnina I.A., Brandt N.N., Mankova A.A., Chikishev A.Y. // Vibrat. Spectrosc. 2021. V. 114. Art. No. 103250.
9. Mankova A.A., Nagaeva A.I., Brandt N.N., Chikishev A.Yu. // Vibrat. Spectrosc. 2023. V. 128. Art. No. 103564.
10. Balakhnina I.A., Brandt N.N., Chikishev A.Y. et al. // J. Biomed. Opt. 2017. V. 22. No. 9. Art. No. 091509.
11. Krimm S., Bandekar J. // Adv. Protein Chem. 1986. V. 38. P. 181.
12. Lee S.H., Krimm S. // Biopolymers. 1998. V. 46. No. 5. P. 283.
13. Shigeto S., Chang C.F., Hiramatsu H. // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. No. 3. P. 490.
14. Spiro T.G., Gaber B.P. // Annu. Rev. Biochem. 1977. V. 46. No. 1. P. 553.
15. Kalanoor B.S., Ronen M., Oren Z. et al. // ACS Omega. 2017. V. 2. No. 3. P. 1232.
16. Брандт Н.Н., Травкина Е.И. // Учен. зап. физ. фак-та Моск. ун-та. 2022. № 4. С. 2241103.
17. Brandt N.N., Chikishev A.Yu., Chulichkov A.I. et al. // Laser Phys. 2004. V. 14. No. 11. P. 1386.
18. Savitzky A., Golay M.J.E. // Analyt. Chem. 1964. V. 36. No. 8. P. 1627.
19. Nielsen O.F. // Annu. Rep. Prog. Chem. C. Phys. Chem. 1993. V. 90. P. 3.
20. Брандт Н.Н., Травкина Е.И., Михальчик Е.В., Чукишев А.Ю. // Квант. электрон. 2022. Т. 52. № 1. С. 36; Brandt N.N., Travkina E.I., Mikhal'chik E.V., Chikishev A.Yu. // Quantum Electron. 2022. V. 52. No. 1. P. 36.
21. Di Foggia C., Boga, Micheletti G. et al. // Data Brief. 2021. V. 38. P. 107439.
22. Paquin R., Colomban P. // J. Raman Spectrosc. 2007. V. 38. No. 5. P. 504.
23. Brandt N.N., Chikishev A.Y., Mankova A.A., Sakodynskaya I.K. // J. Biomed. Opt. 2014. V. 20. No. 5. Art. No. 051015.
24. Zhabankov R.G., Firsov S.P., Kolosova T.E. et al. // J. Mol. Struct. 2003. V. 656. No. 1-3. P. 275.
25. Kuhar N., Sil S., Umapathy S. // Spectrochim Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. 2021. V. 258. Art. No. 119712.
26. Eaves J.D., Fecko C.J., Stevens A.L. et al. // Chem. Phys. Lett. 2003. V. 376. No. 1-2. P. 20.
27. Moore W.H., Krimm S. // Biopolymers. 1976. V. 15. No. 12. P. 2465.
28. Fanconi B. // Biopolymers. 1973. V. 12. No. 12. P. 2759.
29. Aliaga A.E., Aguayo T., Garrido C. et al. // Biopolymers. 2010. V. 95. No. 2. P. 135.
30. Lord R.C., Yu N.T. // J. Mol. Biology. 1970. V. 51. No. 2. P. 203.

Low-frequency Raman spectroscopy of human hair keratins

E. I. Travkina*, A. Yu. Chikishev, N. N. Brandt

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: travkina.ei19@physics.msu.ru*

Low-frequency Raman lines characterizing vibrations of elements of the secondary structure of fibrillar proteins (keratins) are identified. Experiments with unpigmented human hair are performed in two configurations: with excitation radiation focused coaxially with the hair and perpendicularly to it. Based on polarization sensitivity, the bands at frequencies of 150 and 221 cm^{-1} are assigned to vibrations of the α -helical structures of keratins. Spectral interval of 270–340 cm^{-1} is assigned to vibrations of β -structures.

Keywords: low-frequency Raman microspectroscopy, keratins, protein secondary structure, polarization sensitivity, human hair