

# ***In vivo* неинвазивное определение концентрации и связывающих свойств воды в роговом слое кожи человека с помощью конфокальной микроспектроскопии комбинационного рассеяния (мини-обзор)\***

М.Е.Дарвин, Ч.З.Чо, И.Шлойзенер, Ю.Ладеманн

*Вода играет важную роль в нормальном функционировании кожи. Роговой слой (РС) – самый внешний слой эпидермиса, который поддерживает барьерную функцию кожи и регулирует водный баланс в организме. Вода в РС распределена неравномерно, и ее правильное определение важно в дерматологии и косметологии. Конфокальная микроспектроскопия комбинационного рассеяния (КМКР) является наиболее подходящим неинвазивным методом для определения профилей концентрации воды, воды с разной подвижностью и силой водородных связей молекул воды в коже человека *in vivo*, т. е. для изучения гидратации и увлажнения РС. В данной статье рассматривается применение КМКР для исследования *in vivo* нормальной кожи человека с целью изучения профиля концентрации воды и свойств связывания воды в РС. Исследования, проведенные среди добровольцев двух возрастных групп, показали, что РС «возрастной» кожи связывает воду эффективнее, чем РС более молодой кожи.*

**Ключевые слова:** барьерная функция кожи, гидратация кожи, увлажнение кожи, подвижность воды, межклеточные липиды, эпидермис, старение.

## **1. Введение**

Роговой слой (РС), самый верхний слой эпидермиса, состоит из корнеоцитов, содержащих межклеточные липиды, которые поддерживают барьерную функцию кожи, т. е. обеспечивают защиту от внешних физических и химических воздействий, препятствуют проникновению патогенов в организм и играют важную роль в регуляции водного баланса в организме. Основными компонентами РС являются кератин, липиды, молекулы естественного фактора увлажнения (ЕФУ) и вода. Кроме того, РС содержит каротиноиды и меланин. Все компоненты РС неоднородно распределены по глубине слоя [1, 2]. Концентрация воды минимальна у поверхности РС и максимальна в самой глубокой его области [3]; общая концентрация воды в РС колеблется в пределах 0.20–0.78 г/см<sup>3</sup> [4]. Вода необходима для РС, т. к. она служит средой для многих ферментов и других веществ, которые делают РС метаболически активным. Основными центрами связывания воды в РС являются молекулы ЕФУ [5] и кератин [6] внутри корнеоцитов, а также, в меньшей степени, ламеллярная структура внеклеточных липидов [7] между корнеоцитами. Эффективность связывания воды неоднородна и зависит от глубины РС [8, 9].

\* Перевод с англ. В.Л.Дербова.

**M.E.Darvin, J.Schleusener, J.Lademann.** Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin Institute of Health, Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; e-mail: maxim.darvin@charite.de  
**C.S.Cho.** Kim Il Sung University, Ryongnam-Dong, Taesong District, Pyongyang, DPR Korea

Поступила в редакцию 3 ноября 2020 г.

Концентрация воды в коже является важным физиологическим параметром для контроля степени гидратации сухой и обезвоженной кожи, а также для диагностики ряда кожных заболеваний и контроля лечения. Для ее определения необходимо использование неинвазивных методов *in vivo*. Для неинвазивного измерения содержания воды в коже человека *in vivo* используются электрические (корнеометрия) [10, 11], оптические (ИК спектроскопия [12, 13], спектроскопия отражения в ближнем ИК диапазоне [14–16], конфокальная микроспектроскопия комбинационного рассеяния (КМКР) [3, 17, 18]) и другие методы [19–24].

Электрические методы включают измерения электрической проводимости и емкости кожи. Значения проводимости хорошо коррелируют с содержанием воды на глубине до 15 мкм, т. е. в РС, а значения емкости – с содержанием воды на глубине до 45 мкм, т. е. в сосочковой дерме [25, 26]. Таким образом, эти методы можно использовать для определения сухости РС и обезвоживания кожи соответственно. Преимущества электрических методов – низкая стоимость приборов и простота процедуры измерения. К недостаткам можно отнести низкую стабильность измерений, которая может дополнительно зависеть от внешних факторов, таких как температура и влажность, а также от смачивания поверхности кожи, на которую влияет потоотделение, трансэпидермальная потеря воды (ТЭПВ), наличие косметики и качество контакта датчика с поверхностью кожи при измерениях. Кроме того, измерения электрической проводимости и емкости выполняются интегрально и не дают информации о градиенте распределения воды.

В красной и ближней ИК областях спектра ( $\lambda < 1$  мкм) кожа характеризуется низкими коэффициентами поглощения и рассеяния (так называемое окно спектральной прозрачности кожи) [27] и низкой интенсивностью флуоресценции [28], что определяет частый выбор этих длин волн для измерений на коже. Поглощение излучения во-

дой сильно увеличивается в ИК диапазоне, начиная с длин волн  $\sim 1$  мкм [29, 30]. По этой причине спектроскопия отражения для воды в основном проводится в этом спектральном диапазоне [14, 16]. Оптические лазерные микроскопические методы, работающие в красном и ближнем ИК диапазонах, весьма перспективны для неинвазивных измерений воды и, благодаря использованию лазеров со стабильным уровнем интенсивности, характеризуются высокой точностью измерений и возможностью определения профиля распределения воды с микронным разрешением. Преимуществом КМКР является возможность выполнять неинвазивные *in vivo* измерения концентрации воды [13, 31, 32] и силы водородных связей молекул воды [18, 33], профилей ее распределения вплоть до слоя сосочковой дермы. При исследовании РС предполагалось, что кератин – основной белок РС – может быть использован для нормированного ослабления сигнала, зависящего от глубины [34].

В настоящей работе представлены профили концентрации воды по глубине в зависимости от ее состояния подвижности и свойств связывания воды в РС, полученные *in vivo* среди здоровых добровольцев двух возрастных групп с использованием КМКР. Специфицирован метод КМКР и обсуждены полученные результаты.

## 2. Материалы и методы

Неинвазивные измерения проводились *in vivo* на коже ладонной части предплечья среди 11 здоровых добровольцев в возрасте от 23 до 62 лет с использованием конфокального рамановского микроскопа (модель 3510, RiverD International B.V., Роттердам, Нидерланды). Спектральную область «отпечатка пальца» (fingerprint, FP),  $400 - 2000$  см $^{-1}$ , возбуждали излучением лазера на длине волны 785 нм (время экспозиции 5 с, мощность 20 мВт), область с высокими волновыми числами (high wave number, HWN),  $2000 - 4000$  см $^{-1}$ , – лазерным излучением на 671 нм (время экспозиции 1 с, мощность 17 мВт). Пространственное разрешение составило менее 5 мкм, а спектральное разрешение – менее 2 см $^{-1}$ . Спектры комбинационного рассеяния (КР) в областях FP и HWN записывались в одном и том же месте на коже с шагом 2 мкм между поло-

жениями мест записи на расстояниях примерно 10 мкм над поверхностью и 30 мкм ниже поверхности. Точное положение поверхности кожи определялось на уровне половины максимума профиля кератина, измеренного на частоте около  $1650$  см $^{-1}$  [3], а толщина РС определялась в том месте, где градиент концентрации воды достигал 0.5, что соответствует границе между РС и зернистым слоем [35]. Перед обработкой спектров КР в области HWN фон флуоресценции был удален с помощью описанного в [18] алгоритма кусочно-взвешенной аппроксимации методом наименьших квадратов.

Декомпозиция полосы КР в области HWN выполнялась методом множественной нелинейной регрессии с использованием 10 функций Гаусса. Начальные положения центров для функций Гаусса указывались при частотах  $2850$  см $^{-1}$  (симметричные валентные колебания СН-групп липидов),  $2880$  см $^{-1}$  (асимметричные валентные колебания СН-групп липидов),  $2930$  см $^{-1}$  (симметричные валентные колебания СН $_3$ -групп кератина),  $2980$  см $^{-1}$  (асимметричные валентные колебания СН $_3$ -групп кератина),  $3005$  см $^{-1}$  (жестко связанная вода, DAA),  $3060$  см $^{-1}$  (валентное колебание групп СН олефинов кератина),  $2280$  см $^{-1}$  (сильно связанная вода, DDAA),  $3460$  см $^{-1}$  (слабосвязанная вода, DA),  $3604$  см $^{-1}$  («свободная» вода) и  $3330$  см $^{-1}$  (NH-колебание кератина). Полученные данные анализировались в среде Matlab R2015a (The Mathworks Inc., Натик, США).

Все процедуры соответствовали Хельсинкской декларации и были одобрены Комитетом по этике Медицинского университета «Шарите», Берлин.

## 3. Результаты и их обсуждение

Вода характеризуется интенсивным спектром КР в широком диапазоне волновых чисел, примерно  $3000 - 3700$  см $^{-1}$  (валентные колебания группы ОН). Обычно концентрация воды в РС рассчитывается на основе соотношения между полосой КР, относящейся к воде ( $3350 - 3550$  см $^{-1}$ ), и полосой КР, связанной с белком ( $2910 - 2965$  см $^{-1}$ ) [3, 34]. Эти области схематически показаны на рис.1,а. В случае кожи, обработанной косметическими составами, обычно рекомендуется нормировка по полосе

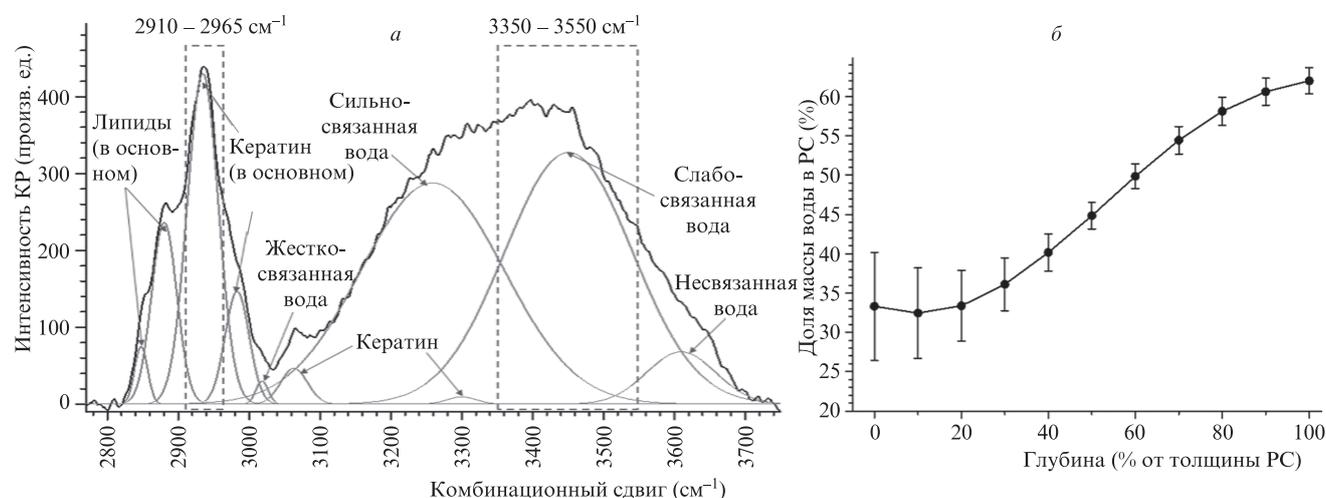


Рис.1. Спектр комбинационного рассеяния РС ладонной части предплечья человека *in vivo* на глубине 20 мкм (толщина РС составляет 20 мкм) в области  $2780 - 3750$  см $^{-1}$ , разложенный с использованием функций Гаусса (а), и профиль распределения концентрации воды по глубине, полученный из отношения интенсивностей  $I_{3350-3550}/I_{2910-2965}$  с учетом неоднородности распределения кератина в РС (б). Рисунки заимствованы из работ [1, 18].

КР амида I на частоте  $1650\text{ см}^{-1}$  из-за отсутствия или контролируемого перекрытия области  $2910\text{--}2965\text{ см}^{-1}$  [36, 37]. Нормировка по полосе КР, связанной с кератином, необходима для учета зависящего от глубины ослабления сигналов лазерного возбуждения и комбинационного рассеяния, вызванного поглощением и диффузным рассеянием кожи. Как недавно было показано, концентрация кератина уменьшается вглубь из-за увеличения концентрации воды, что может быть учтено при моделировании ослабления сигнала в РС [38]. Результаты показывают, что учет неоднородности концентрации кератина в РС приводит к незначительному занижению значений концентрации воды на глубине, составляющей 50% – 100% от толщины РС (параметр отклонения  $p < 0.05$ ) [1]. Профиль концентрации воды в РС, рассчитанный с учетом неоднородности распределения в нем кератина, представлен на рис.1,б. Концентрация воды в РС неоднородна: минимальная концентрация (около 33%) достигается вблизи поверхности (0–20% толщины РС). Далее концентрация воды равномерно увеличивается и достигает максимума (~62%) на границе между РС и зернистым слоем (100% толщины РС).

Спектр КР воды в области  $3000\text{--}3750\text{ см}^{-1}$  содержит следующую информацию о подвижности воды: более низкие или более высокие частоты соответствуют большей или меньшей силе водородных связей воды с окружающими молекулами, т.е. меньшей или большей подвижности воды [39, 40]. Представление спектра комбинационного рассеяния РС кожи человека в виде суперпозиций функций Гаусса иллюстрирует рис.1,а, где показано наложение связанных с кератином полос КР вблизи  $3063$  и  $3330\text{ см}^{-1}$  на спектр воды. Разложенный спектр КР описывает молекулы воды с разной подвижностью, т.е. с разными состояниями водородных связей: примерно на  $3005\text{ см}^{-1}$  – жестко связанная вода, на  $3277\text{ см}^{-1}$  – сильно связанная вода, на  $3458\text{ см}^{-1}$  – слабо связанная вода и на  $3604\text{ см}^{-1}$  – несвязанная вода [18].

Отслеживание интенсивности КР по соответствующим гауссовым кривым дает информацию о распределении различных типов воды в зависимости от силы водородных связей в РС (рис.2,а). Как видно из рисунка, доля сильно связанной и слабо связанной воды составляет свыше 90% от всей воды в РС. Оставшаяся часть (менее 10%)

приходится на жестко связанные и несвязанные типы воды. Отношение концентраций слабо связанной и сильно связанной воды дает представление о силе водородных связей молекул воды в РС (рис.2,б). Это важный физиологический параметр, который показывает эффективность связывания молекул воды на разной глубине в РС. Более низкое значение параметра отвечает лучшей эффективности связывания воды с окружающими молекулами РС, что наблюдается на глубине порядка 20%–40% толщины РС.

Кожа человека с возрастом претерпевает изменения [41, 42], что влияет на связывание воды в РС [43]. Для участия в пилотном исследовании с использованием КМКР были набраны добровольцы, составившие младшую группу (23–34 года, средний возраст 29 лет) и старшую группу (45–62 года, средний возраст 50 лет). Толщина РС на ладонной части предплечья в старшей группе, равная  $21 \pm 2\text{ мкм}$ , была немного больше, чем в младшей группе, где она составляла  $19 \pm 1\text{ мкм}$  (умеренное различие,  $p < 0.1$ ) [44]. На рис.3 приведены результаты для распределений концентрации воды в РС в зависимости от состояния ее подвижности и силы водородных связей для обеих групп.

Распределения слабо связанной и сильно связанной воды в РС демонстрируют значительные различия ( $p < 0.05$ ) между младшей и старшей группами на глубинах, составляющих 10%–30% от толщины РС. Роговой слой у младшей группы содержит больше слабо связанной и меньше сильно связанной воды по сравнению со старшей группой (рис.3,а и б). Не было обнаружено различий для групп в распределениях жестко связанной и несвязанной воды (рис.3,в и г). Сила водородных связей воды на глубине 10%–30% от толщины РС значительно больше у старшей группы (рис.3,д), что означает более эффективное связывание воды на этих глубинах по сравнению с младшей группой. Таким образом, увеличение возраста приводит к увеличению связывания воды на определенной глубине РС, что может быть связано с увеличением концентрации ЕФУ и орторомбической организации межклеточных липидов на глубине 10%–30% РС [44]. Эти результаты согласуются с данными о несколько более низком показателе ТЭПВ в стареющей коже, что указывает на усиление барьерной функции [45, 46]. Однако

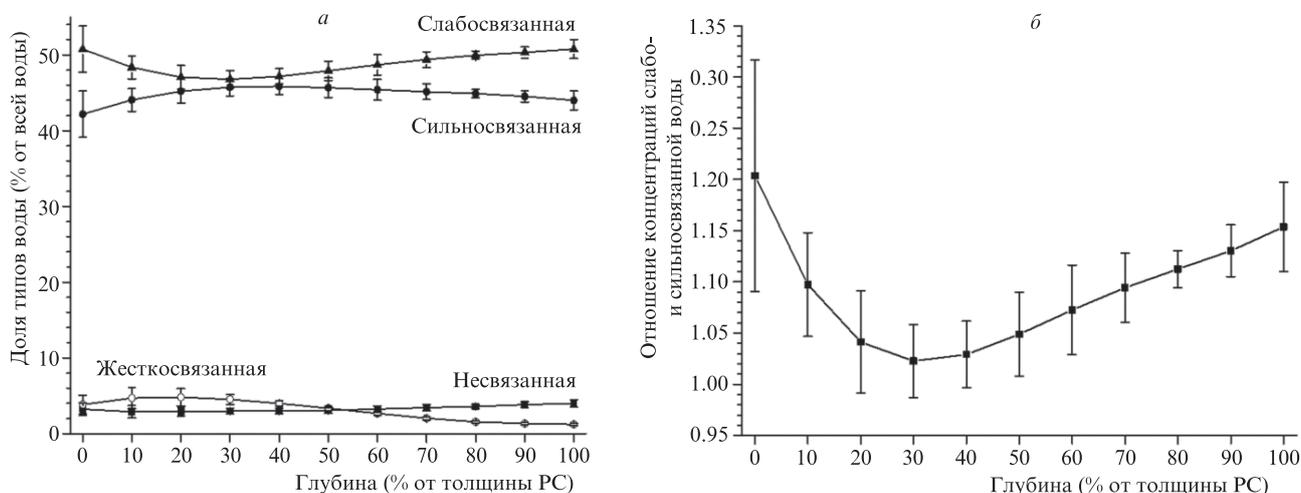


Рис.2. Профили распределения по глубине РС кожи человека для концентрации молекул воды с различной подвижностью, зависящей от силы водородных связей (а), и отношение концентраций слабо- и сильно связанной воды (б), измеренные *in vivo* с использованием КМКР. Рисунки заимствованы из работы [18].

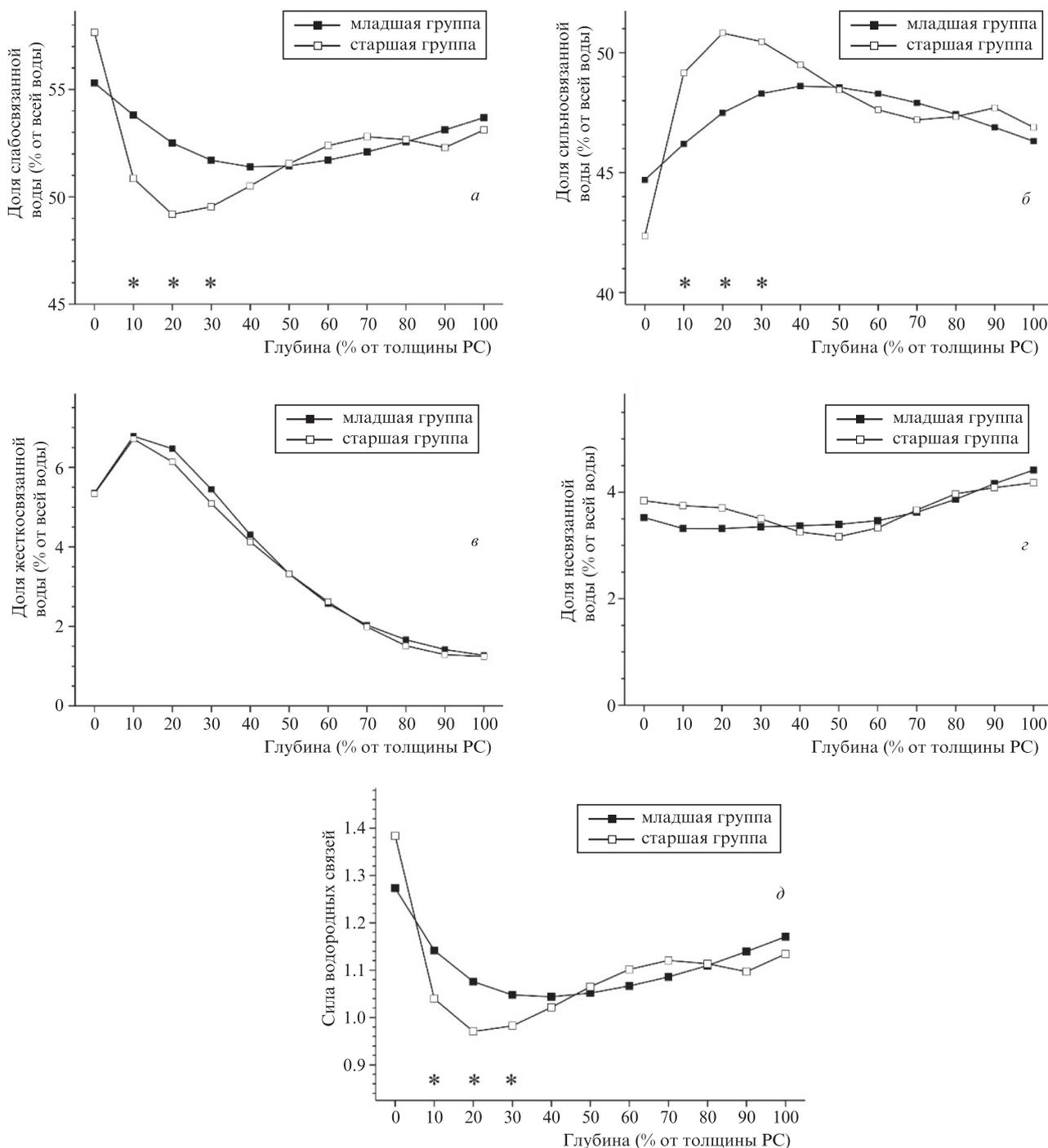


Рис.3. Профили распределения по глубине для слабосвязанных (а), сильносвязанных (б), жесткосвязанных (в) и несвязанных (г) молекул воды, а также сила водородных связей молекул воды в РС (д). В обеих возрастных группах измерения проводились *in vivo* с использованием КМКР; знаком «\*» отмечена область, где различия значительные ( $p < 0.05$ ). Рисунки заимствованы из работы [44].

ТЭПВ не содержит информации о гидратации кожи. Следует учитывать, что связывание воды в РС может отличаться от представленного на рис.3 для добровольцев в возрасте свыше 70 лет, т. к. в этом возрасте собственное старение более выражено и проявляется клинически [47].

В заключение можно резюмировать, что профили распределения по глубине концентрации воды, воды с разной подвижностью, а также сила водородных связей молекул воды могут быть успешно определены *in vivo* в РС кожи человека в полностью неинвазивном режиме.

Работа М.Е.Д., И.Ш. и Ю.Л. выполнена при поддержке Фонда физиологии кожи Ассоциации доноров немецкой науки и гуманитарных наук. Ч.З.Ч. получил поддержку от Немецкой службы академических обменов (DAAD) за исследования в отделении дерматологии Медицинского университета «Шарите» (Берлин).

1. Darvin M.E., Choe C.S., Schleusener J., Lademann J. *Biomed. Opt. Express*, **10** (6), 3092 (2019).
2. Yakimov B.P., Shirshin E.A., Schleusener J., Allenova A.S., Fadeev V.V., Darvin M.E. *Sci. Rep.*, **20**, 14374 (2020).

3. Caspers P.J., Lucassen G.W., Bruining H.A., Puppels G.J. *J. Raman Spectrosc.*, **31** (8–9), 813 (2000).
4. Li X., Johnson R., Kasting G.B. *J. Pharm. Sci.*, **105** (3), 1141 (2016).
5. Rawlings A.V., Harding C.R. *Dermatol. Ther.*, **17** (1), 43 (2004).
6. Scheuplein R.J., Morgan L.J. *Nature*, **214** (5087), 456 (1967).
7. Imokawa G., Kuno H., Kawai M. *J. Investig. Dermatol.*, **96** (6), 845 (1991).
8. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darwin M.E. *Sci. Rep.*, **7** (1), 15900 (2017).
9. Caussin J., Groenink H.W., de Graaff A.M., Gooris G.S., Wiechers J.W., van Aelst A.C., Bouwstra J.A. *Exp. Dermatol.*, **16** (11), 891 (2007).
10. Tagami H.Br. *J. Dermatol.*, **171** (3), 29 (2014).
11. Утц С.Р., Каракаева А.В., Галкина Е.М. *Саратовский научно-медицинский журнал*, **10** (3), 512 (2014).
12. Potts R.O., Guzek D.B., Harris R.R., Mckie J.E. *Arch. Dermatol. Res.*, **277** (6), 489 (1985).
13. Lucassen G.W., van Veen G.N., Jansen J.A. *J. Biomed. Opt.*, **3** (3), 267 (1998).
14. Якимов Б.П., Давыдов Д.А., Фадеев В.В., Будылин Г.С., Ширшин Е.А. *Квантовая электроника*, **50** (1), 41 (2020) [*Quantum Electron.*, **50** (1), 41 (2020)].
15. Behm P., Hashemi M., Hoppe S., Wessel S., Hagens R., Jaspers S., Wenck H., Rubhausen M. *AIP Advances*, **7** (11), 115004 (2017).
16. Attas M., Posthumus T., Schattka B., Sowa M., Mantsch H., Zhang S.L. *Vibr. Spectrosc.*, **28** (1), 37 (2002).
17. van Logtestijn M.D., Dominguez-Huttinger E., Stamatias G.N., Tanaka R.J. *PLOS One*, **10** (2), e0117292 (2015).
18. Choe C., Lademann J., Darwin M.E. *Analyst*, **141** (22), 6329 (2016).
19. Verdier-Sevrain S., Bonte F. *J. Cosmet. Dermatol.*, **6** (2), 75 (2007).
20. Asogwa C.O., Lai D.T.H. *Electronics*, **6** (4), 82 (2017).
21. Xiao P., Wong W., Cottenden A.M., Imhof R.E. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **34** (4), 328 (2012).
22. Wang J., Stantchev R.I., Sun Q., Chiu T.W., Ahuja A.T., MacPherson E.P. *Biomed. Opt. Express*, **9** (12), 6467 (2018).
23. Yang X., Zhao X., Yang K., Liu Y.P., Liu Y., Fu W.L., Luo Y. *Trends Biotechnol.*, **34** (10), 810 (2016).
24. Кекконен Э.А., Коновко А.А., Ли Ю.С., Ли И.-М., Ожередов И.А., Парк К.Х., Сафонова Т.Н., Сикач Е.И., Шкуринов А.П. *Квантовая электроника*, **50** (1), 61 (2020) [*Quantum Electron.*, **50** (1), 61 (2020)].
25. Alanen E., Nuutinen J., Nicklen K., Lahtinen T., Monkkonen J. *Skin Res. Technol.*, **10** (1), 32 (2004).
26. Clarys P., Clijns R., Taeymans J., Barel A.O. *Skin Res. Technol.*, **18** (3), 316 (2012).
27. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38** (15), 2543 (2005).
28. Schleusener J., Lademann J., Darwin M.E. *J. Biomed. Opt.*, **22** (9), 91503 (2017).
29. Bertie J.E., Lan Z.D. *Appl. Spectrosc.*, **50** (8), 1047 (1996).
30. Бернацкий А.В., Лагунов В.В., Очкин В.Н. *Квантовая электроника*, **49** (2), 157 (2019) [*Quantum Electron.*, **49** (2), 157 (2019)].
31. Nakagawa N., Matsumoto M., Sakai S. *Skin Res. Technol.*, **16** (2), 137 (2010).
32. Sdobnov A.Y., Tuchin V.V., Lademann J., Darwin M.E. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **50**, 285401 (2017).
33. Sdobnov A.Y., Darwin M.E., Schleusener J., Lademann J., Tuchin V.V. *J. Biophoton.*, **12** (5), e201800283 (2019).
34. Caspers P.J., Lucassen G.W., Carter E.A., Bruining H.A., Puppels G.J. *J. Investig. Dermatol.*, **116** (3), 434 (2001).
35. Crowther J.M., Sieg A., Blenkiron P., Marcott C., Matts P.J., Kaczvinsky J.R., Rawlings A.V. *Br. J. Dermatol.*, **159** (3), 567 (2008).
36. Choe C., Schleusener J., Choe S., Lademann J., Darwin M.E. *J. Biophoton.*, **13** (1), e201960106 (2020).
37. Choe C., Schleusener J., Choe S., Ri J., Lademann J., Darwin M.E. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **42**, 482 (2020).
38. Choe C., Choe S., Schleusener J., Lademann J., Darwin M.E. *J. Raman Spectrosc.*, **50** (7), 945 (2019).
39. Sun Q. *Vibr. Spectrosc.*, **51** (2), 213 (2009).
40. Sun Q. *Chem. Phys. Lett.*, **568**, 90 (2013).
41. Gniadecka M., Nielsen O.F., Christensen D.H., Wulf H.C. *J. Investig. Dermatol.*, **110** (4), 393 (1998).
42. Kammeyer A., Luiten R.M. *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
43. Gniadecka M., Nielsen O.F., Wessel S., Heidenheim M., Christensen D.H., Wulf H.C. *J. Investig. Dermatol.*, **111** (6), 1129 (1998).
44. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darwin M.E. *Mech. Ageing Dev.*, **172**, 6 (2018).
45. Boireau-Adamezyk E., Baillet-Guffroy A., Stamatias G.N. *Skin Res. Technol.*, **20** (4), 409 (2014).
46. Kottner J., Lichterfeld A., Blume-Peytavi U. *Arch. Dermatol. Res.*, **305** (4), 315 (2013).
47. Blume-Peytavi U., Kottner J., Sterry W., Hodin M.W., Griffiths T.W., Watson R.E., Hay R.J., Griffiths C.E. *Gerontologist*, **56** (2), S230 (2016).