Влияние конфигурации измерений на результаты КР-микроспектроскопии человеческого волоса

Н.Н.Брандт, Е.И.Травкина, Е.В.Михальчик, А.Ю.Чикишев

Возрастающий интерес к спектроскопическим исследованиям человеческого волоса актуализирует вопрос о корректности измерения его спектров и оптимизации экспериментальных установок. Предложен оригинальный способ получения поперечного среза волоса без использования микротомов и химического воздействия. Проводится сравнение результатов конфокальной КР-микроспектроскопии человеческого волоса, полученных при его различной ориентации относительно оптической оси установки. Показано, что наряду с ожидаемыми изменениями спектров, происходящими при перемещении от периферии к оси волоса, наблюдаются также существенные различия спектров при возбуждении волоса перпендикулярно и параллельно его оси.

Ключевые слова: *КР-микроспектроскопия, КР-картирование, волос человека, подготовка срезов волоса.*

1. Введение

Волос является придатком кожи, на 80%–90% состоящим из белков – кератинов. Основная масса кератинов волоса образует корковое вещество (кортекс), которое определяет механические свойства волоса с помощью структурной организации нерастворимых в воде высокомолекулярных кератинов в фибриллы. Фибриллы погружены в матрикс, содержащий низкомолекулярные кератины. Снаружи волос покрыт кутикулой, состоящей из нескольких слоев. Кутикула выполняет ряд функций, в частности осуществляет механическую защиту и контролирует содержание воды в стержне волоса (см., напр., [1]). Низкомолекулярные растворимые кератины волоса составляют малую часть по сравнению с фибриллярными кератинами. Они находятся преимущественно в кортексе волосяного стержня и образуют матрикс, поддерживающий структуру волоса за счёт связей между белками [2–4]. Низкомолекулярные кератины насчитывают более 20 семейств белков, различающихся молекулярной массой (5–60 кДа), содержанием глицина, тирозина и цистеина [5].

Несмотря на то что человеческий волос является доступным объектом исследования и изучается различными современными методами [6, 7], многие вопросы, касающиеся структуры волоса, остаются актуальными. В частности, недавно между кортексом и кутикулой был обнаружен высокорезистивный слой (прикреплённое к кутикуле резистивное основание), препятствующий проникновению в кортекс молекул из внешней среды [8].

Н.Н.Брандт, Е.И.Травкина, А.Ю.Чикишев. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2;
e-mail: brandt@physics.msu.ru
Е.В.Михальчик. Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

Поступила в редакцию 2 октября 2021 г.

Интерес к исследованиям человеческого волоса связан также с тем, что волос, не являясь в полной мере живой тканью, отвечает на воздействия внешней среды [9, 10] структурными изменениями, аналогичными изменениям кератинов кожи [11]. Следовательно, волос можно рассматривать в качестве объекта для поиска маркеров повреждения кератинов, например под действием УФ излучения [12].

Одним из важнейших современных методов научного исследования волос является спектроскопия комбинационного рассеяния (КР). В последние годы в научных исследованиях стали широко использоваться промышленные конфокальные КР-микроспектрометры, позволяющие проводить КР-картирование образцов с трёхмерным пространственным разрешением вплоть до 1 мкм. Поскольку толщина кутикулы человеческого волоса составляет порядка нескольких микрометров, применение КР-микроспектроскопии для исследования такого объекта вполне оправданно. Для исследования структуры волоса метод стал использоваться в начале века (см., напр., [13]). В последующих работах проводилось уточнение полученных результатов, выявлялись новые структурные особенности волос различных типов [14–16]. В настоящее время КР-спектроскопия, по-прежнему, широко применяется для анализа структуры волоса человека [17, 18]. Однако при измерении КР-спектров волоса остаются открытыми некоторые методические вопросы В части работ волос разрезается микротомом после фиксации, например в эпоксидной смоле [13, 15], а спектры измеряются на срезе волоса с латеральным (поперечным) разрешением. В других работах волос располагается горизонтально и закрепляется на подложке (см., напр., [19]). Лазерное излучение заводится вертикально, перпендикулярно оси волоса, а конфокальная геометрия светосбора позволяет добиться аксиального (продольного) разрешения. В работе [14] горизонтально расположенный волос сначала накрывается покровным стеклом, а затем сверху к нему подводится масляно-иммерсионный объектив. К сожалению, в упомянутых работах не указывается, чем обусловлена та или иная геометрия эксперимента, что

иногда затрудняет сравнительный анализ экспериментальных результатов.

В связи с вышесказанным в настоящей работе проводится сравнение получаемых с помощью конфокальной КР-микроспектроскопии спектральных данных при использовании различных экспериментальных конфигураций.

2. Материалы и методы

2.1. Методика КР-микроспектроскопии

КР-спектры измерялись с использованием конфокального КР-микроскопа DXR Raman Microscope (Thermo Scientific). Источником возбуждения служил непрерывный диодный одномодовый лазер со стабилизацией частоты, генерирующий излучение на длине волны 780 нм. Мощность излучения на образце была равна 24 мВт. Излучение фокусировалось на образец объективом Olympus LMPlanFL N 50X/0.5 BD с рабочим расстоянием 10.6 мм. Размер пятна фокусировки составлял 1.6 мкм. Время накопления одного спектра равнялось 15 мин. Измерения проводились в спектральном диапазоне 50–3500 см$^{-1}$ со спектральным разрешением 4 см$^{-1}$. Латеральное и аксиальное разрешения микроскопа составляли 2 и 6 мкм соответственно. Изображение образца регистрировалось с помощью цветной цифровой видеокамеры с матрицей 1024 × 768 пикселей.

В КР-спектрах всегда присутствует фоновый сигнал, изменяющийся даже при последовательном измерении двух спектров в одной точке образца. Поэтому для детального сравнения спектров мы применяли процедуру коррекции фона по методике, описанной в работе [20]. Процедура включает в себя минимизацию среднеквадратичного отклонения одного из сравниваемых спектров от другого в спектральных интервалах, свободных от конформационно-чувствительных линий белка (250–450, 570–620, 750–820, 960–1020, 1060–1200, 1350–1580 и 1750–2000 см$^{-1}$), и обеспечивает практическое равенство фоновых сигналов в сравниваемых спектрах.

2.2. Подготовка образцов

В экспериментах использовался седой человеческий волос здорового 60-летнего донора. Измерения проводились в двух конфигурациях.

Вертикальное расположение волоса. Получение поперечного среза волоса представляет собой самостоятельную задачу. Обычно для этой цели используется микротом. Однако в этом случае волос (пучок волос) приходится помещать в фиксирующую среду, например в эпоксидную смолу, которая находилась бы в момент среза в твёрдом состоянии. Мы применяли оригинальную методику получения поперечного среза волоса без использования микротома и инородных сред, которые могли бы проникнуть в структуру волоса и повлиять на его состав.

Концевая часть волоса длиной ~1 см помещалась на несколько секунд в чашку Петри с жидким азотом. В области замерзания волос разламывался и его скол в некоторых случаях был близок к плоскому. Были отобраны образцы цилиндрической формы длиной ~5 мм с практически плоскими торцами, перпендикулярными оси волоса. Эти образцы накладывались боковыми поверхностями на скотч параллельно друг другу с интервалом в несколько миллиметров так, чтобы каждый образец выступал плоским торцом за край клейкой ленты на ~1 мм. Затем скотч наклеивался на вертикальную поверхность толстой стеклянной плоскопараллельной пластинки, которая закреплялась на предметном столике КР-микроскопа, и торцы образцов оказывались перпендикулярными оптической оси объектива. При латеральном перемещении образца его поверхность оставалась в фокальной плоскости объектива.

Горизонтальное расположение волоса. Участок волоса длиной ~1 см располагается горизонтально на подложке над отверстием диаметром 2 мм. Концы образца приклеиваются к подложке и система закрепляется на предметном столике КР-микроскопа. Такая конфигурация обеспечивает жёсткую фиксацию образца и отсутствие фонового сигнала от подложки в спектре.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.1,*а* приведены два характерных спектра волоса, расположенного горизонтально, при фокусировке возбуждающего излучения на его поверхность. Помимо коррекции фонового сигнала, описанной в предыдущем разделе, спектры сдвинуты относительно друг друга по вертикали для удобства сравнения. Использованные параметры объектива и конфокальной диафрагмы микроскопа обеспечивают аксиальное разрешение 6 мкм. Таким образом, рассеянное излучение собирается из примыкающей к поверхности волоса области глубиной около 3 мкм и диаметром 2 мкм, имеющей форму полусфероида. Никакой предварительной обработки волоса не проводилось, а расстояние вдоль его поверхности между точками 1 и 2, в которых измерялись спектры, составляло несколько миллиметров. На рис.1,*б* показана разность спектров 1 и 2 (без учёта вертикального смещения). Хорошо видно, что спектры практически совпадают. Отклонение разности спектров от нулевого значения даёт представление о степени различия (~1%) спектров, измеренных в разных точках поверхности одного и того же волоса.

Вид рис.1,*в, г* и *д*, *е* аналогичен виду рис.1,*а*, *б*. Спектры обработаны по той же методике. На рис.1,*в* приведены спектры волоса также в горизонтальной конфигурации при фокусировке возбуждающего излучения на поверхность волоса. Спектр 1 соответствует необработанному волосу (спектр 2 на рис.1,*а*), а спектр 2 получен после выдерживания волоса в жидком азоте в течение 30 с и возврата к комнатной температуре. Сравнение разностей спектров на рис.1,*б* и *г* позволяет говорить о минимальном влиянии жидкого азота на белковые структуры волоса. Обращает на себя внимание лишь незначительное изменение интенсивности линии фенилаланина на частоте 1003 см$^{-1}$. Обычно эта линия считается конформационно-нечувствительной и используется в качестве репера при нормировке КР-спектров. Аналогичные минимальные различия спектров наблюдаются для тех же образцов при измерениях в областях, расположенных в глубине волоса на расстоянии 10 мкм от его поверхности (рис.1,*д*). В этом случае КР-сигнал собирается из области внутри сфероида высотой 6 мкм и диаметром 2 мкм, центр которого находится на указанной глубине.

Приведённые данные об объёме, из которого собирается КР-сигнал, позволяют заключить, что даже при измерении спектра в случае фокусировки возбуждающего излучения на поверхность волоса значительная часть сиг-

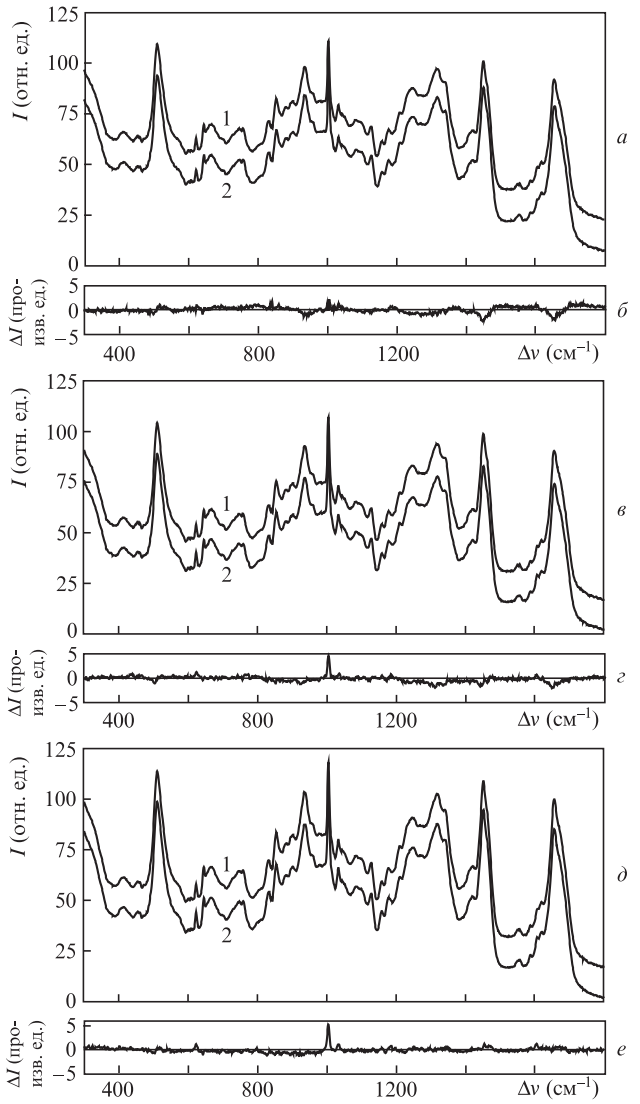

Рис.1. КР-спектры 1, 2, измеренные в двух разных точках горизонтально расположенного волоса при фокусировке возбуждающего излучения на его поверхность (*а*),и разность этих спектров (*б*); КР-спектры, измеренные в той же геометрии после (1) и до (2) обработки жидким азотом (*в*), и разность этих спектров (*г*); КР-спектры, измеренные при фокусировке возбуждающего излучения на глубине 10 мкм от поверхности горизонтально расположенного волоса после (1) и до (2) обработки жидким азотом (*д*), и разность этих спектров (*е*).

нала выходит не из кутикулы, а из кортекса, поскольку характерная толщина кутикулы составляет ~1 мкм [7]. Этим обусловлено то обстоятельство, что спектры, измеренные на поверхности волоса (спектр 1 на рис.1,*в*) и на глубине 10 мкм (спектр 1 на рис.1,*д*) практически совпадают.

Необходимо отметить, что в большинстве конфигураций светосбора при конфокальной КР-микроспектроскопии аксиальное разрешение хуже латерального. При измерении спектров, показанных на рис.1, латеральное разрешение (2 мкм) втрое лучше аксиального (6 мкм). Выбор объектива с большим увеличением (100×) и уменьшение диаметра конфокальной диафрагмы позволяют улучшить аксиальное разрешение до 2 мкм, однако рабочее расстояние объектива и отношение сигнал/шум в этом случае существенно меньше, что не даёт возможности получать спектры высокого качества.

Дополнительный недостаток горизонтального расположения волоса состоит в невозможности точно определить поправочные коэффициенты для корректного сравнения спектров, измеренных в конфокальном режиме на различной глубине от поверхности волоса. Горизонтально расположенный волос представляет собой цилиндрическую линзу, существенно изменяющую геометрию фокусировки лазерного излучения. Поскольку диаметры и показатели преломления образцов волос различны, то для каждого образца поправки к спектрам должны рассчитываться индивидуально. Кроме того, спектральные поправки будут существенно зависеть от коэффициента поглощения волоса на разных длинах волн, измерение которого представляет собой отдельную задачу (см., напр., [21]).

На рис.2,*а* показана серия спектров, измеренных при фокусировке возбуждающего излучения на торец волоса, полученный при его разломе в жидком азоте. Спектры обработаны так же, как и спектры на рис.1, и сдвинуты относительно друг друга по вертикали для удобства сравнения. Спектр 1 получен при фокусировке излучения вдоль оси на торец волоса так, что КР- сигнал собирается из объёма полусфероида, расположенного внутри волоса и граничащего с его боковой поверхностью. Плоская поверхность полусфероида диаметром 2 мкм совпадает с торцевой поверхностью волоса. Высота полусфероида равна ~3 мкм. Отметим, что в такой геометрии перетяжка лазерного пучка совпадает с торцевой поверхностью волоса независимо от его латерального расположения.

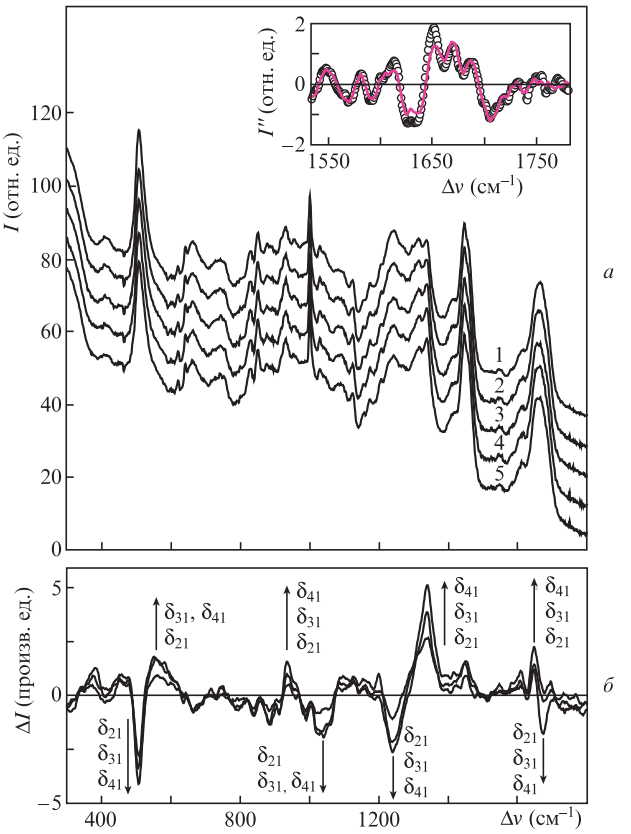

Рис.2. КР-спектры вертикально расположенного волоса при фокусировке излучения на его торец в точках 1, 2, 3, 4 и 5 (см. ниже рис.3), находящихся на расстоянии 2 мкм друг от друга (*а*), и разности спектров 2 и 1 (δ_{21}), 3 и 1 (δ_{31}), 4 и 1 (δ_{41}) (*б*). На вставке к рис.2,*а* показаны вторые производные *I″* спектров 1 (сплошная кривая) и 5 (кружки).

А в приближении того, что коэффициент поглощения волоса на длине волны возбуждения слабо зависит от радиальной координаты, измеряемые в разных точках КР-спектры можно сравнивать между собой без дополнительных корректировок. Более того, применение длиннофокусных объективов в рассматриваемой геометрии нецелесообразно. Однако для корректного сравнения представленных в настоящей работе спектров во всех экспериментах мы использовали тот же длиннофокусный объектив, что и при КР-микроспектроскопии волоса, находящегося в горизонтальном положении (рис.1). Пространственное разрешение при вертикальном расположении волоса определяется не аксиальным, а латеральным разрешением и может достигать долей микрометра. Для конфигурации, в которой измерены спектры на рис.2,*а*, пространственное разрешение составляло 2 мкм, что немногим превышает толщину кутикулы волоса. Спектры 2–5 измерены при смещении точки фокусировки излучения по отношению к спектру 1 от периферии к центру волоса на 2, 4, 6 и 8 мкм соответственно.

На рис.3 приведена микрофотография рассматриваемого сечения волоса, сделанная длиннофокусным объективом, с помощью которого проводится лазерное возбуждение КР-спектров. Кружками 1–5 показаны проекции полусфероидов, из объёма которых собирается КР- сигнал, на плоскость изображения. Нумерация кружков соответствует нумерации спектров. Видно, что спектр 1 должен соответствовать спектру кутикулы, спектр 2 – линейной комбинации спектров кутикулы и кортекса, а спектры 3–5 – спектру кортекса.

Для удобства анализа различий спектров на рис.2,*б* приведены разности спектров 2, 3, 4 и спектра 1, обозначенные δ_{21}, δ_{31}, δ_{41} соответственно. Все разности спектров сглажены с помощью фильтра Савицкого–Голея. Разность между пятым и первым спектрами практически совпадает с разностью δ_{41} и поэтому не показана на рис.2,*б*. Выраженные различия спектров наблюдаются на частотах 508, 550, 935, 1040, 1243, 1338, 1649 и 1676 см$^{-1}$ (последовательные изменения отмечены стрелками на рис.2,*б*). Линии на частотах 508 и 550 см$^{-1}$ отвечают валентным колебаниям дисульфидных мостиков в гош-гош-гош (gauche-gauche-gauche (ggg)) и транс-гош-транс (trans-gauche-trans (tgt)) конформациях соответственно

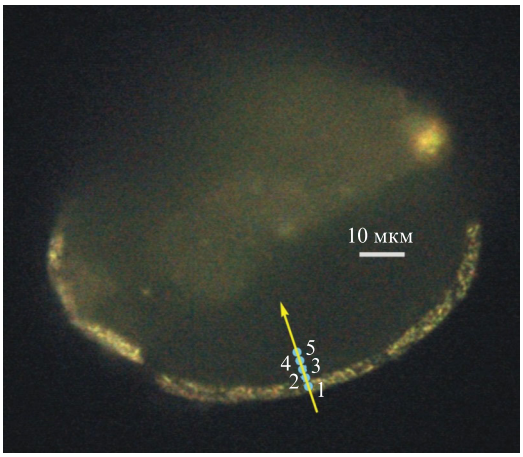

Рис.3. Микрофотография сечения волоса, сделанная с помощью длиннофокусного объектива Olympus LMPlanFL N 50X/0.5 BD. Цифрами обозначены точки фокусировки возбуждающего лазерного излучения при измерении спектров с соответствующими этим точкам номерами на рис.2.

(см., напр., [22]). Некоторые авторы считают, что полоса на частоте 935 см$^{-1}$ обусловлена скелетными колебаниями полипептидной цепи (деформационные колебания $N-C_{\alpha}-C$) и характеризует содержание спиральных структур. На той же частоте могут наблюдаться валентные колебания C–N и $N-C_{\alpha}$, а также маятниковые колебания CH_3 [23]. Линия на частоте 1040 см$^{-1}$ обусловлена симметричными валентными колебаниями S=O цистеиновой кислоты. Увеличение интенсивности этой линии может быть связано с уменьшением содержания свободных тиолов [24]. Интенсивность линии амид III на частоте 1243 см$^{-1}$ характеризует неупорядоченную структуру в белковых молекулах (см., напр., [19]). Из рис.2,*а* видно, что существенные изменения спектров вблизи 1340 см$^{-1}$ (рис.2,*б*) связаны с изменением интенсивности двух пиков на частотах 1316 и 1338 см$^{-1}$. Первая линия соответствует колебаниям $C_{\alpha}-H$, а вторая – изгибным колебаниям CH_2 и колебаниям триптофана [25].

Для идентификации спектральных компонент, входящих в состав линии амид I вблизи частоты 1660 см$^{-1}$, на вставке к рис.2,*а* приведены вторые производные первого и последнего спектров в серии (производные спектров 2–4 имеют те же спектральные особенности в данной области). Для вторых производных спектров хорошо различимы три основные компоненты линии амид I на частотах 1652, 1670 и 1688 см$^{-1}$. Относительные интенсивности этих компонент пропорциональны содержанию в молекулах α-спиралей, β-листов и β-шпилек (β-turns) соответственно [26]. Линия на частоте 1688 см$^{-1}$ может быть обусловлена также колебаниями амидных групп боковых цепей аспарагина и глутамина [24]. Отметим, что изменения спектров на частотах 935 см$^{-1}$ ($N-C_{\alpha}-C$), 1316 см$^{-1}$ ($C_{\alpha}-H$) и 1652 см$^{-1}$ (α-спираль) хорошо коррелируют друг с другом.

Таким образом, при переходе от кутикулы к кортексу наиболее выражены следующие молекулярные изменения:

– Содержание дисульфидных связей уменьшается, а часть дисульфидных мостиков переходит от ggg к tgt конформации.

– Содержание α-спиральных участков молекул возрастает за счёт уменьшения содержания β-структурированных и неупорядоченных элементов.

– Концентрация свободных тиолов увеличивается.

Все перечисленные выводы полностью согласуются с известными литературными данными (см., напр., [27]).

На рис.4,*а* для сравнения приведены спектры волоса, измеренные в горизонтальной (спектр 1 на рис.1,*а*) и вертикальной (спектр 1 на рис.2,*а*) конфигурациях, а на рис.4,*б* построена разность первого и второго спектров. Видно, что основные различия спектров заключены в изменении интенсивностей линий вблизи частот 508, 897, 935, 1001, 1243, 1316, 1652 и 1688 см$^{-1}$. В первую очередь, различия в спектрах, измеренных при горизонтальном и вертикальном расположении волоса, могут быть связаны с поляризационной чувствительностью КР-сигнала. При измерении спектров с помощью используемого в настоящей работе КР-микроскопа возбуждающее излучение деполяризовано. Следовательно, при вертикальном расположении волоса поляризация возбуждающего излучения перпендикулярна оси волоса, при горизонтальном расположении половина фотонов возбуждающего излучения в среднем имеет поляризацию, параллельную оси волоса (ось *x*), а другая половина – перпендикулярную ей (ось *y*). В рассеянном сигнале регистрируются как *x*-, так

и y-компоненты поля. В работе [28] были измерены КР-спектры человеческого волоса при возбуждении светом на длине волны 785 нм с x- и y- поляризациями. Для каждой поляризации анализатор в канале регистрации рассеянного излучения также устанавливался либо параллельно (по оси x), либо перпендикулярно (по оси y) оси волоса. В результате были измерены спектры S_{xx}, S_{xy}, S_{yx} и S_{yy} (первый индекс соответствует ориентации поляризатора, второй – ориентации анализатора). В отсутствие анализатора при деполяризованном возбуждающем излучении регистрируемый спектр в случае горизонтального расположения волоса можно оценить как сумму $S_h = 0.5(S_{xx} + S_{xy} + S_{yx} + S_{yy})$. При вертикальном расположении волоса измеряемый спектр может быть оценен как $S_v = S_{yx} + S_{yy}$. Мы использовали результаты работы [28] и рассчитали разность спектров $S_h - S_v$ (рис.4,*в*). Видно, что все имеющиеся в ней спектральные особенности (дублет на частотах 897 и 935 см$^{-1}$, линии на частотах 1316 и 1652 см$^{-1}$) присутствуют в разности спектров (рис.4,*б*) и характеризуют поляризационную чувствительность α-спиралей в составе молекул белка, оси которых расположены преимущественно вдоль оси волоса. Отметим, что поляризационная чувствительность линий амид проявляется также и в ИК спектрах отдельных фибрилл коллагена [29].

Остальные изменения спектров на рис.4,*б* могут быть обусловлены следующим. Как отмечалось выше, вклад в КР-сигнал при горизонтальном расположении волоса дают как кутикула, так и кортекс (пунктирная кривая на рис.4,*а*), а при вертикальном – только кутикула (сплошная кривая). Следовательно, разность спектров должна характеризовать изменение содержания элементов структуры молекул при переходе от поверхности к центру волоса. Аналогичные изменения должны присутствовать в разности спектров δ_{41} (разность спектров, измеренных в вертикальной конфигурации в точках 4 и 1 на рис.3), показанной на рис.4,*г*. Действительно, для обеих разностей спектров (рис.4,*б* и *г*) видно увеличение содержания аминокислотных остатков фенилаланина (1001 см$^{-1}$), уменьшение содержания дисульфидных связей (508 см$^{-1}$) и элементов неупорядоченной структуры (1243 см$^{-1}$), что соответствует литературным данным [24].

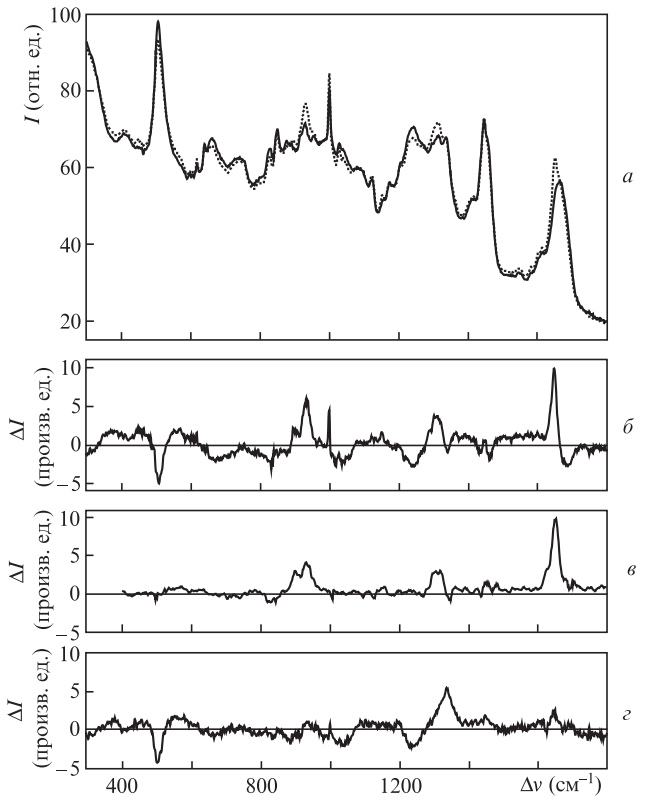

Рис.4. КР-спектры волоса, измеренные при фокусировке возбуждающего излучения на его поверхность при горизонтальном расположении (пунктирная кривая), и в точке 1 (рис.3) при вертикальном расположении (сплошная кривая) (*а*), и разность этих спектров (*б*); разность спектров $S_h - S_v$, рассчитанная с использованием результатов работы [28] (см. текст) (*в*); разность КР-спектров, измеренных в точках 4 и 1 (рис.3) (*г*).

4. Заключение

В настоящей работе предложена методика подготовки для измерения поперечного среза волоса без использования фиксирующих веществ с помощью заморозки в жидком азоте. Показано, что процедура заморозки не влияет на спектральные характеристики волоса, и, следовательно, структура волоса при этом не меняется. При исследовании зависимости параметров молекулярной структуры волоса от радиальной координаты КР-спектры срезов волоса могут быть измерены с пространственным разрешением, превышающим разрешение при измерениях в конфокальном режиме в случае горизонтального расположения волоса. Сравнение спектров, полученных при фокусировке излучения на поверхность горизонтально расположенного волоса и при фокусировке на кутикулу на срезе волоса, позволило определить поляризационно-чувствительные линии в спектрах волоса, а также изменение содержания элементов структуры белков при переходе от кутикулы к кортексу. Исследование поперечного сечения волоса, находящегося в вертикальном положении, с помощью коммерчески доступных конфокальных систем можно проводить с субмикронным разрешением, задаваемым размером перетяжки возбуждающего лазерного пучка, что значительно меньше толщины кутикулы. При этом в спектры не вносятся искажения, обусловленные кривизной поверхности волоса, а также изменением рассеяния и поглощения излучения при фокусировке возбуждающего излучения в глубину волоса, что необходимо учитывать при конфокальном зондировании горизонтально расположенного волоса. С другой стороны, выбор горизонтальной конфигурации необходим для проведения поляризационно-чувствительных измерений, которые позволяют делать выводы о преимущественной ориентации α-спиральных участков белков волоса относительно его оси.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретённого за счёт средств Программы развития Московского университета, и при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-02-00932).

1. Гаджигороева А.Г. *Клиническая трихология* (М.: Практическая медицина, 2014).
2. Leszek J.W. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **48** (6), 106 (2003). DOI: 10.1067/mjd.2003.276.
3. Araujo R., Fernandes M., Cavaco-Paulo A., Gomes A. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **125**, 121 (2011). DOI: 10.1007/10_2010_88.
4. Miranda-Vilela A.L., Botelho A.J., Muehlmann L.A. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **36** (1), 2 (2014). DOI: 10.1111/ics.12093.
5. Rogers M.A., Langbein L., Winter H., Beckmann I., Praetzel S., Schweizer J. *J. Invest. Dermatol.*, **122** (1), 147 (2004). DOI: 10.1046/j.0022-202X.2003.22128.x.

6. Rogers G.E. *Cosmetics*, **6** (2), 32 (2019). DOI: 10.3390/cosmetics 6020032.
7. Fellows A.P., Casford M., Davies P. *Appl. Spectrosc*., **74** (12), 1540 (2020). DOI: 10.1177/0003702820933942.
8. Takahashi T. *Int. J. Cosmet. Sci*., **43** (2), 254 (2021). DOI: 10.1111/ics.12691.
9. Osorio F., Tosti A.J. *J. Cosmet. Dermatol*., **24** (11), 533 (2011).
10. Franca-Stefoni S.A., Dario M.F., Sa-Dias T.C., Bedin V., de Almeida J.A., Baby A.R., Velasco M.V.R. *J. Cosmet. Dermatol*., **14** (3), 204 (2015). DOI: 10.1111/jocd.12151.
11. Chavanas S., Bodemer C., Rochat A., Hamel-Teillac D., Ali M., Irvine A.D., Bonafé J.-L., Wilkinson J., Taïeb A., Barrandon Y., Harper J.I., de Prost Y., Hovnanian A. *Nat. Genet*., **25**, 141 (2000). DOI: 10.1038/75977.
12. Pande C.M., Jachowicz J.J. *J. Soc. Cosmet. Chem*., **44**, 109 (1993).
13. Kuzuhara A. *Biopolymers*, **79** (4), 173 (2005). DOI: 10.1002/bip.20329.
14. Zhang G., Senak L., Moore D.J. *J. Biomed. Opt*., **16** (5), 056009 (2011). DOI: 10.1117/1.3580286.
15. Kuzuhara A. *J. Mol. Struct*., **1047**, 186 (2013). DOI: 10.1016/j.molstruc.2013.04.079.
16. Pudney P.D.A., Bonnist E.Y.M., Mutch K., Stanfield S. *Appl. Spectrosc*., **67** (12), 1408 (2013). DOI: 10.1366/13-07086.
17. Dos Santos J.D., Edwards H.G.M., Oliveira L.F.C. *Heliyon*, **5** (5), e01582 (2019). DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01582.
18. Lam S.E., Mat Nawi S.N., Sani A., Khandaker M.U., Bradley D.A. *Sci. Rep*., **11**, 1 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-86942-4.
19. Schlücker S., Liang C., Strehle K.R., DiGiovanna J.J., Kraemer K.H., Levin I.W. *Biopolymers*, **82** (6), 615 (2006). DOI: 10.1002/bip.20515.
20. Brandt N.N., Chikishev A.Yu., Chulichkov A.I., Ignatiev P.A., Lebedenko S.I., Voronina O.V. *Laser Phys*., **14** (11), 1386 (2004).
21. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **36** (12), 1111 (2006) [*Quantum Elecrton*., **36** (12), 1111 (2006)].
22. Sugeta H., Go A., Miyazawa T. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46** (11), 3407 (1973). DOI: 10.1246/bcsj.46.3407.
23. Tuma R. *J. Raman Spectrosc*., **36** (4), 307 (2005). DOI:10.1002/jrs.1323.
24. Church J.S., Corino G.L., Woodhead A.L. *Biopolymers*, **42** (1), 7 (1997). DOI: 10.1002/(sici)1097-0282(199707)42:1<7::aid-bip2> 3.0.co;2-s.
25. Carter E.A., Fredericks P.M., Church J.S., Denning R.J. *Spectrochim. Acta*, **50** (11), 1927 (1994). DOI: 10.1016/0584-8539(94)80205-x.
26. Lefevre T., Rousseau M.-E., Pezolet M. *Biophys. J*., **92** (8), 2885 (2007). DOI: 10.1529/biophysj.106.100339.
27. Fedorkova M.V., Brandt N.N., Chikishev A.Yu., Smolina N.V., Balabushevich N.G., Gusev S.A., Lipatova V.A., Botchey V.M., Dobretsov G.E., Mikhalchik E.V. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **164**, 43 (2016). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.021.
28. Ackermann K.R., Koster J., Schlücker S. *J. Biophotonics*, **1** (5), 419 (2008). DOI: 10.1002/jbio.200810015.
29. Bakir G., Girouard B.E., Wiens R., Mastel S., Dillon E., Kansiz M., Gough K.M. *Molecules*, **25** (18), 4295 (2020). DOI: 10.3390/molecules25184295