

WŁAŚCIWOŚCI SKÓRY LUDZKIEJ UZYSKANE W TESTACH MECHANICZNYCH I TECHNIKĄ SPEKTROSKOPII RAMANA

SYLWIA SZOTEK^{1*}, ROMUALD BĘDZIŃSKI¹,
MAGDALENA KOBIELARZ¹, MARLENA GAŚSIOR-GŁOGOWSKA², MAŁ-
GORZATA KOMOROWSKA², KRZYSZTOF MAKSYMOWICZ³,
JERZY HANUZA^{4,5}, KRZYSZTOF HERMANOWICZ⁴

¹POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,
INSTYTUT KONSTRUKCJI I EKSPLOATACJI MASZYN, ZAKŁAD IN-
ŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MECHANIKI EKSPERYMENTALNEJ,
UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLSKA

²POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, WYDZIAŁ PODSTAWOWYCH PROBLE-
MÓW TECHNIKI, INSTYTUT INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I POMIAROWEJ,
PLAC GRUNWALDZKI 13, 50-377 WROCŁAW, POLSKA

³AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU,
KATEDRA MEDYCZYNY SĄDOWEJ,

UL. MIKULICZA-RADECKIEGO 4, 50-368 WROCŁAW, POLSKA

⁴INSTYTUT NISKICH TEMPERATUR I BADAŃ STRUKTURALNYCH, POL-
SKA AKADEMIA NAUK, UL. OKÓLNA 2, 50-422 WROCŁAW, POLSKA

⁵UNIWERSYTET EKONOMICZNY WE WROCŁAWIU, WYDZIAŁ INŻY-
NIERII JNO-EKONOMICZNY, KATEDRA CHEMII BIOORGANICZNEJ,
UL. KOMANDORSKA 118/120, 53-345 WROCŁAW, POLSKA

*MAILTO: SYLWIA.SZOTEK@PWR.WROC.PL

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było porównanie charakterystyk otrzymanych w testach wytrzymałościowych i z pomiarów spektroskopowych. W pracy wyznaczono podstawowe parametry mechaniczne skóry, które są zdeterminowane ułożeniem włókien kolagenowych. Następnie zarejestrowano widma ramanowskie badanej tkanki, zidentyfikowano pasma charakterystyczne dla białka kolagenowego. Na podstawie analizy uzyskanych wyników, dla kolejnych etapów rozciągania skóry, zaobserwowano między innymi różnice w położeniu maksimum pasma amidu I (1658cm^{-1}) w zależności od kierunku rozciągania próbki. Porównanie, w obu metodach charakterystycznych zakresów, zachodzących zmian wykazało możliwość stosowania Spektroskopii Ramana w celu wyznaczenia kierunku ułożenia włókien kolagenowych w trakcie rozciągania co jest istotne z punktu widzenia przeszczepów skóry.

Słowa kluczowe: skóra, test jednoosiowego rozciągania, spektroskopia ramanowska, właściwości mechaniczne, białka strukturalne, włókna kolagenowe.

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 208-210]

Wprowadzenie

Skóra jako najbardziej zewnętrzny i największy organ człowieka jest najczęściej narażona na uszkodzenia, stąd niezwykle istotne jest poznanie jej właściwości mechanicznych, które są zależne od ułożenia i orientacji włókien kolagenowych oraz naprężeń powierzchniowych występujących na jej powierzchni a mających związek z rozkładem linii Langer'a. Linie te, stanowią obszary o zmniejszonym naprężeniu i są ułożone prostopadłe do długich osi mięśni [1].

Właściwości mechaniczne skóry in vitro najczęściej wyznaczane są przy użyciu maszyn wytrzymałościowych w testach jednoosiowego rozciągania [2]. Spektroskopia

HUMAN SKIN PROPERTIES DETERMINED BY MECHANICAL TESTS AND RAMAN SPECTROSCOPY

SYLWIA SZOTEK^{1*}, ROMUALD BĘDZIŃSKI¹,
MAGDALENA KOBIELARZ¹, MARLENA GAŚSIOR-GŁOGOWSKA², MAŁ-
GORZATA KOMOROWSKA², KRZYSZTOF MAKSYMOWICZ³,
JERZY HANUZA^{4,5}, KRZYSZTOF HERMANOWICZ⁴

¹WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, INSTITUTE OF MACHINE
DESIGN AND OPERATION, DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING
AND EXPERIMENTAL MECHANICS,
ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLAND

²WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF FUNDAMENTAL PROBLEMS OF TECHNOLOGY, INSTITUTE
OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND INSTRUMENTATION,
PLAC GRUNWALDZKI 13, 50-377 WROCŁAW, POLAND

³WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY,
DEPARTMENT OF FORENSIC MEDICINE,
MIKULICZA-RADECKIEGO 4, 50-368 WROCŁAW, POLAND

⁴INSTITUTE OF LOW TEMPERATURE AND STRUCTURE RESEARCH,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
OKÓLNA 2, 50-422 WROCŁAW, POLAND

⁵WROCŁAW UNIVERSITY OF ECONOMICS, FACULTY OF INDUSTRY
AND ECONOMICS, DEPARTMENT OF BIOORGANIC CHEMISTRY,
KOMANDORSKA 118/120, 53-345 WROCŁAW, POLAND

*MAILTO: SYLWIA.SZOTEK@PWR.WROC.PL

Abstract

The aim of the investigations was to compare the characteristics obtained from strength tests and spectroscopic measurements. The basic skin parameters dependent on the arrangement of collagen fibres were determined. Then Raman spectra of the investigated tissue were recorded and bands characteristic of collagen protein were identified. An analysis of the results for the successive stages of skin stretching showed, among other things, differences in the location of the amid I band maximum (1658cm^{-1}) depending on the direction of specimen stretching. A comparison of the characteristic ranges of change determined by the two methods showed that Raman spectroscopy can be used to ascertain the orientation of collagen fibres in the course of stretching, which information is essential for skin transplantation.

Key words: skin, uniaxial tension test, Raman spectroscopy, mechanical properties, structural proteins, collagen fibres.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 208-210]

Introduction

Skin as the most outer and largest human organ is most often exposed to damage. Hence it is vital to identify its mechanical properties. The latter are determined by the arrangement and orientation of collagen fibres and by the stresses (connected with the distribution of Langer lines) occurring on the skin's surface. Langer lines constitute areas with reduced stress and run perpendicularly to the longitudinal axes of muscles [1].

The mechanical properties of skin in vitro are usually determined by uniaxial tension tests in testing machines [2]. Raman spectroscopy is commonly used to investigate

Ramana jest powszechnie stosowaną metodą badań materiałów biologicznych, w tym tkanek miękkich. Jest to metoda nieinwazyjna, nadająca się do zastosowań in-vivo [3,4].

Materiał i metody

Płat skóry do badań in vitro pobrano z obszaru uda, ze zwłok męczyzny w wieku 53 lat. Próbkę wycięto za pomocą specjalnego wykrojnika w dwóch kierunkach: wzdłuż i w poprzek do linii Langera. Do momentu wykonania pomiarów były one przechowywane w temperaturze pokojowej w roztworze soli fizjologicznej. Widma ramanowskie zostały uzyskane przy pomocy spektrofotometru Bruker RFS 100, wykorzystującego laser Nd:Yag (1064nm) o mocy 450mW, jako źródło promieniowania wzbudającego. Wykonywano 128 skanów, rozdzielczość wynosiła 4cm^{-1} . Próbkę skóry umieszczano w specjalnie zaprojektowanym aparacie pozwalającym na kontrolę stopnia rozciągnięcia próbki, który umieszczano w spektrofotometrze. Widma rejestrowano dla kolejnych etapów rozciągania próbki skóry (początkowo, co 0,5mm, a po przekroczeniu 6mm wartości wydłużenia próbki, co 1mm) aż do osiągnięcia maksymalnego rozciągnięcia. Równolegle przeprowadzono badania mechaniczne. Zastosowano maszynę wytrzymałościową MTS Synergie 100, dzięki której wykonano testy jednoosiowego rozciągania (w podobny sposób, jak w trakcie badań spektroskopowych) dzięki czemu wyznaczono podstawowe parametry mechaniczne.

Wyniki i dyskusja

Dla wszystkich badanych próbek uzyskano nieliniowe charakterystyki odkształceniowo – naprężeniowe (FIG.1), co jest charakterystyczne dla tkanek miękkich [6].

Wyznaczono umowny moduł Younga i wartość przy której dochodziło do uszkodzenia próbki. Otrzymane wartości wyznaczonych parametrów mechanicznych były prawie dwukrotnie większe dla próbek skóry pobranych zgodnie z liniami Langera. Dla uzyskanych charakterystyk można było wyróżnić charakterystyczne przedziały odpowiadające poszczególnym etapom testu, które są związane z kierunkiem ułożenia włókien kolagenowych w skórze [5,6].

Położenie pasm drgań amidu I i amidu III w widmie skóry ludzkiej, odpowiednio przy 1658cm^{-1} oraz 1266m^{-1} świadczy o tym, że białka skóry występują głównie w konformacji α -helikalnej. Taką konformację struktur białkowych potwierdza także obecność w widmie skóry pasma związanego z drganiem rozciągającym C-C łańcucha około 939cm^{-1} . Pasma przy 859 i 876cm^{-1} są związane z drganiami $\nu(\text{C}-\text{C})$ proliny i hydroksyproliny, aminokwasów typowych dla kolagenu [7,8].

Rozciąganie próbki skóry spowodowało zmiany w położeniu omawianych pasm w widmie (RYS.2). Przesunięcie się pasma amidu I wraz ze wzrostem wartości odkształcenia było widoczne zwłaszcza dla próbki pobranej wzdłuż linii Langera. Zwracają uwagę punkty charakterystyczne na krzywej zależności przesunięcia pasma w funkcji odkształcenia: $\sim 5\%$, $\sim 20\%$ i $\sim 40\%$. W tych punktach obserwujemy gwałtowne przesunięcia się pasma typowego

biological materials, including soft tissues. It is a noninvasive technique suitable for in-vivo applications [3,4].

Materials and methods

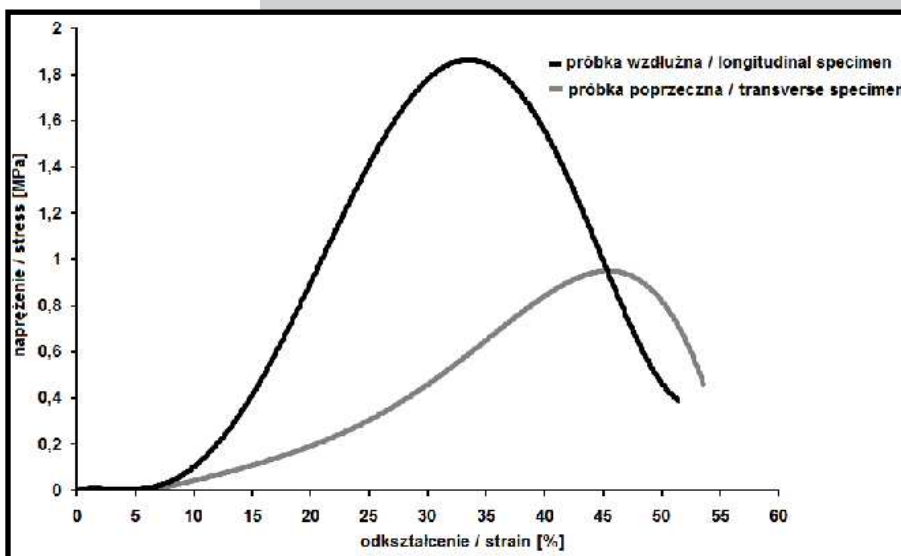
A skin for in vitro investigations was taken from a male (aged 53) cadaver's thigh area. Specimens were excised in two directions: along and across the Langer lines, using a special punch. The specimens were stored in physiological saline at room temperature until measurements. Raman spectra were obtained using a Bruker RFS 100 spectrophotometer with a 450mW Nd:Yag laser (1064nm) as the excitation radiation source. 128 scans were performed at a resolution of 4cm^{-1} . A skin specimen was installed in a specially designed apparatus (making it possible to control the degree of specimen stretching) which was placed in the spectrophotometer. Spectra were recorded for the consecutive stages of skin specimen stretching (initially at every 0.5mm and once 6mm specimen elongation was reached, at every 1mm) until rupture. Simultaneously mechanical tests were carried out. An MTS Synergie 100 testing machine was used to carry out (in a similar way as during the spectroscopic investigations) uniaxial tension tests in order to determine major mechanical parameters.

Results and discussion

Nonlinear stress-strain dependencies (FIG.1), characteristic of soft tissues, were obtained for all the specimens [6].

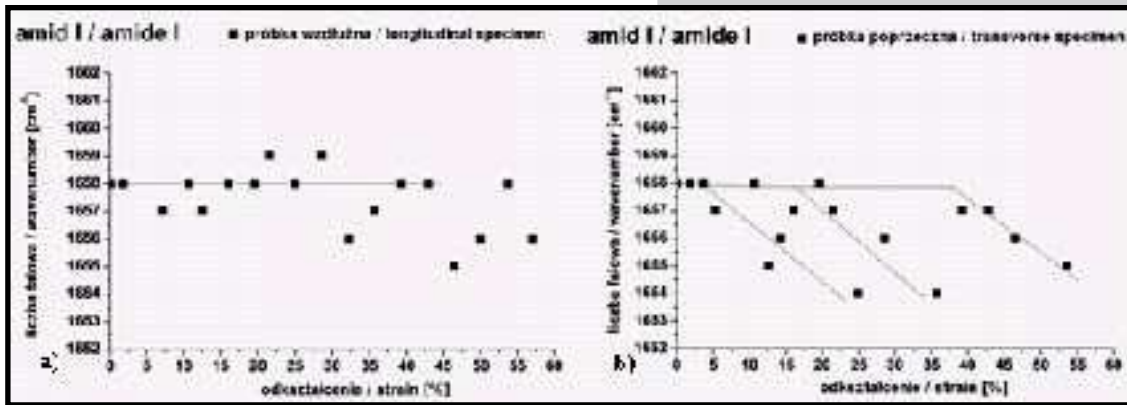
Conventional Young's modulus and the value at which the specimen failed were determined. The determined values of the mechanical parameters were twice higher for the skin specimens excised along Langer lines. Characteristic intervals (corresponding to the particular test stages), connected with the orientation of the collagen fibres in the skin, could be distinguished [5,6].

The location of amid I and amid III vibration bands in the human skin spectrum at respectively 1658cm^{-1} and 1266cm^{-1} shows that skin proteins occur mainly in an α -helical conformation. The presence of a band associated with the C-C chain stretching vibrations at circa 939cm^{-1} corroborates this



RYS.1. Przykładowe charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe otrzymane dla próbek skóry ludzkiej wyciętych z obszaru uda: wzdłuż i w poprzek do linii Langera.

FIG.1. Stress-strain curves typical for human skin specimens excised along and across Langer lines from thigh area.



RYS.2. Położenie pasma amidu I w funkcji odkształcenia: a) próbka skóry wycięta wzdłuż linii Langera, b) próbka skóry wycięta w poprzek linii Langera.

FIG.2. Amide I location as function of strain: a) skin specimen excised along Langer lines, b) skin specimen excised across Langer lines.

dla kolagenu w kierunku niższych wartości liczb falowych świadczące o porządkowaniu się części włókien kolagenowych w kierunku działającego naprężenia. Zrywanie się włókien kolagenu odbywa się stopniowo, aż po osiągnięciu 40% odkształcenia wszystkie włókna białka biorą udział w przenoszeniu obciążeń. W przypadku próbki pobranej wzdłuż linii Langera do wartości odkształcenia około 33%, odpowiadającemu maksymalnemu odkształceniu, w przybliżeniu nie obserwuje się przesunięć w położeniu pasma amidu I.

Podsumowanie

W przeprowadzonych równolegle testach mechanicznych i pomiarach spektroskopowych otrzymano porównywalne wartości zakresów w których zachodzą zmiany, w trakcie rozciągania próbek skóry ludzkiej. Podobne rezultaty autorzy otrzymali we wcześniej przeprowadzonych badaniach na materiale zwierzęcym. Otrzymane wyniki są obiecujące, świadczą o możliwości zastosowania spektroskopii Ramana jako nieinwazyjnej metody, która umożliwi określenie kierunku ułożenia włókien kolagenowych w skórze w trakcie jej rozciągania. Informacja ta jest niezwykle istotna z punktu widzenia zabiegów operacyjnych, zwłaszcza w transplantacji skóry, ponieważ zachowanie odpowiedniego przebiegu włókien kolagenowych sprzyja m.in. lepszemu gojeniu się ran i zmniejszeniu widoczności blizny [1].

Acknowledgements

Praca wykonana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N 518 038 31/3666.

Piśmiennictwo

- [1] Arumugam V., Naresh M.D., Sanjeevi R.: Effect of strain rate on the fracture behavior of skin. *Journal of Biosciences* 19 (1994) 307–313.
- [2] Edwards Ch., Marks R.: Evaluation of Biomechanical Properties of Human Skin. *Clinics in Dermatology* 13 (1995) 375–380.
- [3] Schrader B., Dippel B., Erb I., Keller S., Löchte T. Schulz H., Tatsch E., Wessel S.: NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects. *Journal of Molecular Structure* 480–481 (1999) 21–32.
- [4] Olsztyńska-Janus S., Szymborska K., Komorowska M., Lipinski J.: Usefulness of spectroscopy for biomedical engineering. *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 10 (2008) 45–9.

conformation. The bands at 859 and 876 cm^{-1} are connected with the vibrations of $\nu(\text{C}-\text{C})$ proline and hydroxyproline – amino acids typical for collagen [7,8].

The stretching of the skin resulted in the shift of the bands in the spectrum (FIG.2). The shift of the amide I band with the increase in strain was particularly visible for the specimen taken along Langer lines.

Characteristic points: ~5%, ~20% and ~40% on the band shift-strain curve are notable. Abrupt shifts of the band typical for collagen towards lower wavenumber values occur in these points. The shifts indicate that some of the collagen fibres arrange themselves consistently with direction of the stress. The rupture of the collagen fibres is gradual. When 40% of the strain is reached, all the protein fibres take part in load carrying. In the case of the specimen taken along Langer lines, no shifts in the amide I location are observed up to about 33% strain (the maximum strain).

Conclusion

The mechanical tests and the spectroscopic measurements, conducted simultaneously, yielded comparable ranges of changes taking place during the stretching of human skin. The previous investigations on animal material carried out by the authors yielded similar results. This is promising and indicates that Raman spectroscopy as a noninvasive technique can be used to determine the orientation of collagen fibres in skin as the latter is being stretched [1]. This information is vital from the surgical procedure point of view, particularly in skin transplantation, since the preservation of the proper arrangement of the collagen fibres contributes to better healing of wounds and reducing scar visibility [1].

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education within the framework of grant No. N 518 038 31/3666.

References

- [5] Daly, C. H.: Biomechanical properties of dermis. *Journal of Investigative Dermatology* 79 (1982) 17–20.
- [6] Fung Y.C.: *Biomechanics: Mechanical properties of living tissues*. Springer-Verlag New York, Inc. 1993.
- [7] Gniadecka M., Nielsen O.F., Heidenheim M., Christensen D.H., Wulf H.Ch.: Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *The Journal of Investigative Dermatology* 111 (1998) 1129–1133.
- [8] Gniadecka M., Nielsen O.F., Christensen D.H., Wulf H.Ch.: Structure of water, proteins and lipids in intact human skin, hair and nail. *The Journal of Investigative Dermatology* 110 (1998) 393–398.