

Пятая международная конференция • Школа молодых учёных

ФИЗИКА — НАУКАМ О ЖИЗНИ

Санкт-Петербург • 16–19 октября • 2023



Применение ЭПР для медико-биологических исследований

ст.н.с., к.г.м.н. Сухаржевский Станислав Михайлович; (НП СПбГУ)
доцент, к.ф.м.н. Юрий Викторович Богачев; (СПбГЭТУ)

Email: stanislav.sukharzhevskii@gmail.com; тел. +7 921 422-09-08

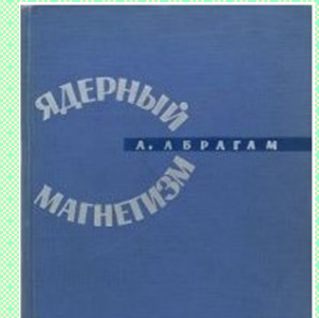
Email: Yu.Bogachev@mail.ru; тел. +7 921 384-39-61

1983 год, Анатолий Абрагам:

« Разрешите мне обратиться на минутку к нашим коллегам и друзьям – к биологам, молниеносные успехи которых, по мнению некоторых, вызывают нашу зависть. Не верьте им: если мы искренно радуемся вашим успехам, это потому, что мы считаем их своими. Вы заимствовали наше оборудование и нашу технику, то, что компьютерщики зовут *hardware*. Но, что важно, вы заимствовали наше мышление, наш *software*, а в этом все. Товарищи физики живой материи, я вас приветствую. »



Анатолий Абрагам
(1914, Москва, – 2011,
Париж).



Что такое жизнь ?

Многие современные философы и ученые биофизики, определяют « **ЖИЗНЬ** » следующим образом: «жизнь – это эндоэнергетический физико-химический процесс, представляющий собой циклическое окисление и восстановление углеродных соединений, осуществляемое автокаталитическими, самопроизводящимися макромолекулами (организмами). Процесс непрерывный, и биосфера остается в состоянии, далеком от термодинамического равновесия, ибо репликация макромолекул идет с ошибками, поэтому состав макромолекул постоянно и хаотично меняется ...» [Weiner J. *Życie i ewolucja biosfery. Podręcznik ekologii ogólnej [Life and evolution of biosphere. A handbook on general ecology]. Warszawa: PWN; 1999. p. 53.].* Больше число таких реакций протекают по радикальному типу.

Свободными радикалами (СР) называют частицы - атомы или молекулы, которые на внешней, валентной оболочке содержат один или несколько неспаренных электронов и вследствие этого, они обладают парамагнетизмом. В силу своего **электронного** строения, **свободные радикалы** обладают высокой реакционной способностью.

Свободные радикалы могут быть:

- a) Стабильными - $\cdot H$, $\cdot N$, $\cdot NO$, $\cdot O_2$ и другие
- b) Не стабильными, имеющими короткое время жизни – микросекунды $\cdot - OH$, и менее .

Они могут образовываться из устойчивых молекул в результате :

- одноэлектронного окисления или восстановления в процессе химических реакций либо между органическими молекулами, либо при взаимодействии органической молекулы с окислителем – например, кислородом;
- воздействия на молекулы ионизирующих излучений различной физической природы (меланин и др.).

Методы изучения свободных радикалов и реакций, в которых они участвуют, в биологии и медицине:

1. Непрямые методы изучения реакций, в которых участвуют радикалы –
 - определение концентрации конечных продуктов реакции;
 - применение ингибиторов.
2. Прямые методы изучения радикалов -:
 - Хемилюминесценция - энергия фотонов излучения определяется структурой МО реагентов (*химической структурой*), а его интенсивность - концентрацией агентов и скоростью их реакции.
 - Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) - спектроскопические характеристики линий в спектре позволяют устанавливать физическую природу (*химическую структуру*) радикала, его концентрацию и их изменения под влиянием изменения внешних условий. **Первое прямое определение СР методом ЭПР было зафиксировано в Казани в 1947**

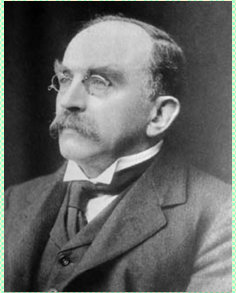
В 2024 г. мировое научное сообщество будет отмечать 80-летие с момента открытия Е.К.Завойским явления электронного парамагнитного резонанса - ЭПР. Открытие явилось завершающим этапом многовекового интереса естествоиспытателей к феномену магнитных свойств веществ. В 1961 г. Анатолий Абрагам, основываясь на принципе взаимности, подводит итог многолетним поискам магнитного резонанса следующим образом «... поскольку магнитный резонанс есть взаимодействие электромагнитного поля и вещества, то в процессе этого взаимодействия изменяются как свойства вещества, так и свойства поля. В соответствие с этим они и могут быть зафиксированы... ».

В настоящее время, практически невозможно, найти область научных знаний, в которой с помощью ЭПР не были бы получены важнейшие научные и практические результаты. Не являются исключением биология и медицина, которые непосредственно связаны с науками о жизни.

Что такое электронный парамагнитный резонанс (ЭПР, ЭСР, ESR, EPR) ?

« избирательное поглощение электромагнитной энергии $h\nu$ в диапазоне радиочастот веществами, помещенными в постоянное поляризирующее магнитное поле B_0 , и обусловленное квантовыми переходами между магнитными подуровнями электронных систем »

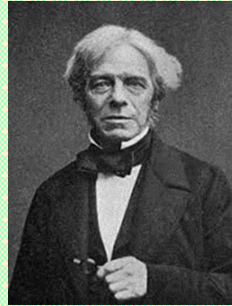
Онтология развития представлений о магнетизме и резонансном поглощении электро-магнитной энергии веществом



Сэр Джозеф Лармор
(11.07.1857 г. – 19.05.1942 г.)



Пьер Кюри
(15.05.1859 г. – 19.04.1906 г.)



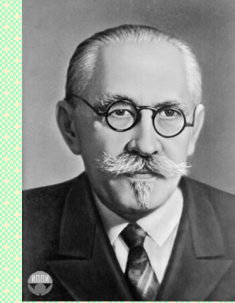
Майкл Фарадей
(22.09.1791 г. – 25.08.1867 г.)



Уильям Гильберт (24.05.1544 г. – 30.11.1603 г.)
Лейб-медик королевы Елизаветы



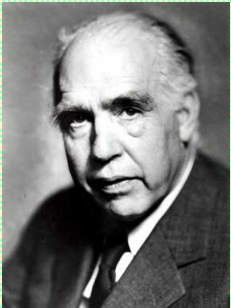
Питер Зееман
(25.05.1865 г. – 09.11.1943 г.)



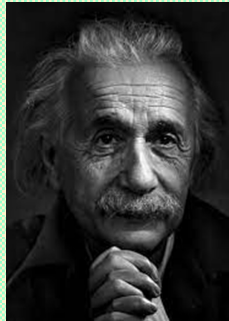
Поль Ланжевен
(23.01.1872 г. – 19.12.1946 г.)



Арнольд Иоганнес
Вильгельм Зоммерфельд
(05.12.1868 г. – 26.04.1951 г.)



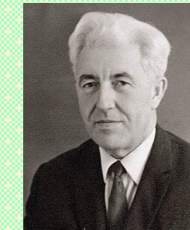
Нильс Хенрик Давид Бор
(07.10.1885 г. – 08.11.1962)



Альберт Эйнштейн
(14.03.1879 г. – 18.04.1955 г.)



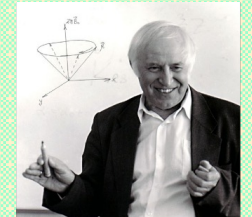
Академик АН СССР Евгений Константинович Завойский (28.09.1907 г. – 09.10.1976 г.)
Физик-экспериментатор, Герой Социалистического Труда, Лауреат Ленинской премии.



Семен Александрович Альтушулер
(24.09.1911 г. – 24.01.1983)
Член-корреспондент АН СССР



Борис Михайлович Козырев
(04.05.1905 г. – 21.10.1979 г.)
Член-корреспондент АН СССР



Кев Минуллович Салихов
Академик РАН



Джордж Юджин Улсбек (06.12.1900 г. – 31.10.1988 г.)
Самюэль Абрахам Гаудемир (11.07.1902 г. – 04.12.1979 г.)

*Очень немногим учёным удаётся добиться счастья начать новую страницу в истории своей науки.
Это счастье в полной мере испытал Евгений Константинович Завойский.*

С.А. Альтушулер, Б.М. Козырев

Спин-гамильтониан - уравнение энергетических состояний иона в матрице вещества

$$H_{sp} = H_{ee} + H_{SL} + H_{CF} + H_{ZS} + H_{SI} + H_{SI}^L + H_{ad}$$

H_{ee} – электрон-электронные взаимодействия, определяющие строение атома, иона;

$H_{SL} = \lambda_{SL} \widehat{S} \widehat{L}$ – энергия спин-орбитального взаимодействия;

$H_{CF} = \sum_n \sum_{-m}^m b_n^m O_n^m$ – энергия в кристаллическом поле;

$H_{ZS} = g\beta BS$ – энергия электронной оболочки в магнитном поле (Зеемановская энергия);

$H_{SI} = g_n \beta_n BI + A_0 SI$ – сверхтонкие взаимодействия (СТВ) между электронами и ядром ;

$H_{SI}^L = g_n^L \beta_n^L BI^L + A_0^L SI^L$ – супер сверхтонкое взаимодействие (ССТВ) электронов с ядрами лигандов;

H_{ad} – дополнительные взаимодействия более низкого уровня .

$$V_{CF} = \frac{1}{3} b_2^0 O_2^0 + \frac{1}{60} b_4^0 (O_4^0 + 5O_4^4)$$

λ_{SL} – константа спин-орбитального взаимодействия

$$A_0 \sim (8\pi/3) |\psi(0)|^2 \mu_{S_z} \mu_{I_z}; \quad \psi \approx \alpha_s \psi + \alpha_p \psi + \alpha_d \psi + \alpha_f \psi + \sum_i \alpha_i^L \psi_i^L; \quad \alpha_s^2 \sim A_0$$

В приближении модели Рассела-Саундерса:

$$g = 1 + \frac{J(J+1) - L(L+1) + S(S+1)}{2J(J+1)}$$

$L = 0, S \neq 0: J = L + S = S, g = 2$ (2.0023) – **спиновый магнетизм**

$S = 0, L \neq 0: J = L + S = L, g = 1$ – **орбитальный магнетизм**

Физическая сущность явления ЭПР (на примере водорода)

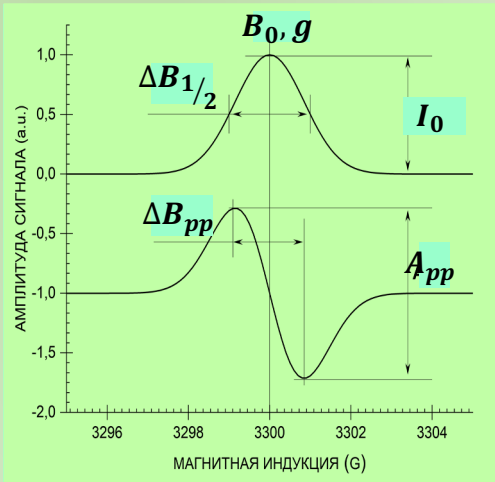
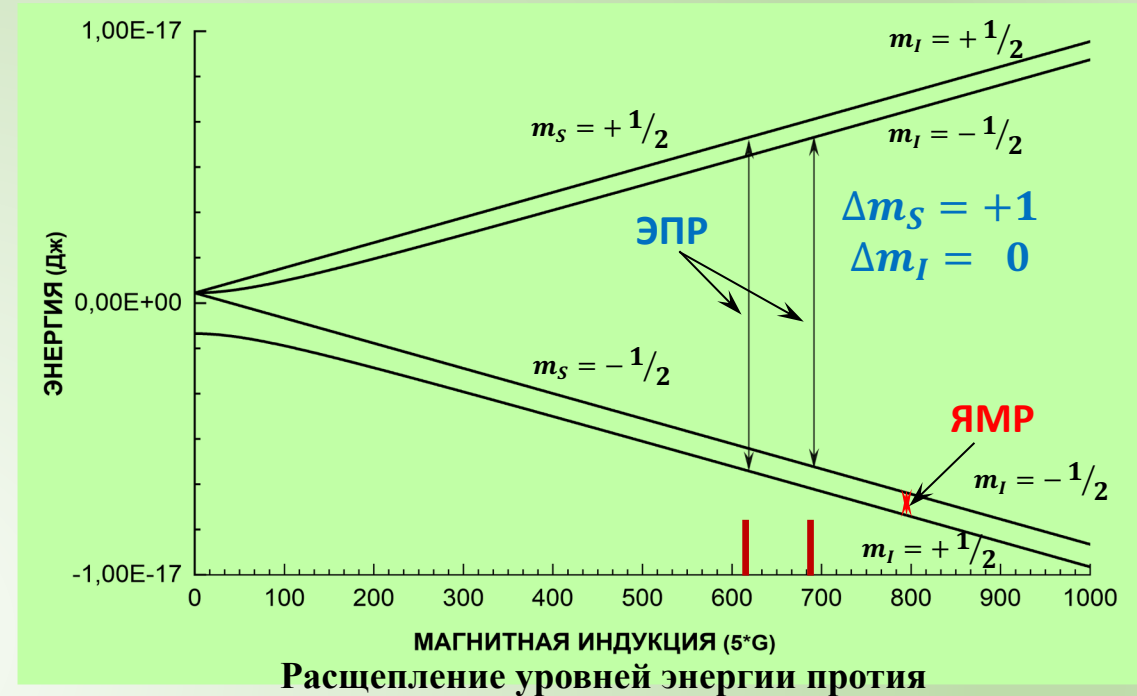
${}^1_1\text{H}(p^+, e^-) - 1s^1; S = 1/2; I = 1/2; N = 99.985\%$ протий
 ${}^2_1\text{H}[D](n^0, p^+, e^-) - 1s^1; S = 1/2; I = 1; N = 0.015\%$ дейтерий

Спин-гамильтониан (уравнение) состояний атома водорода в магнитном поле

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + g\beta\hat{B}\hat{S} + \hbar A_0\hat{S}\hat{I} - g_I\beta_I\hat{B}\hat{I}$$

$$A_0 \sim \left(\frac{8\pi}{3}\right) |\Psi_S(0)|^2 \hat{\mu}_{S_z} \hat{\mu}_{I_z}; \quad \Psi_e \sim a_s \Psi_s + a_p \Psi_p + \sum_l a_{l_i} \Psi_{l_i}; \quad a_s^2 \sim A_0$$

Ψ_S – волновая функция неспаренного электрона,
 $a_{s,p,l}$ – вклад s -, p -АО орбиталей неспаренного электрона и электронов атомов лигандов в МО ПЦ,
 B – индукция магнитного поля,
 g – g -фактор Ланде; g_I – g -фактор протона,
 β, β_I – магнитный момент электрона и ядра соответственно,
 S, I – спин электрона и ядра соответственно,
 A_0 – константа сверхтонкого взаимодействия (СТВ) между электроном и ядром.



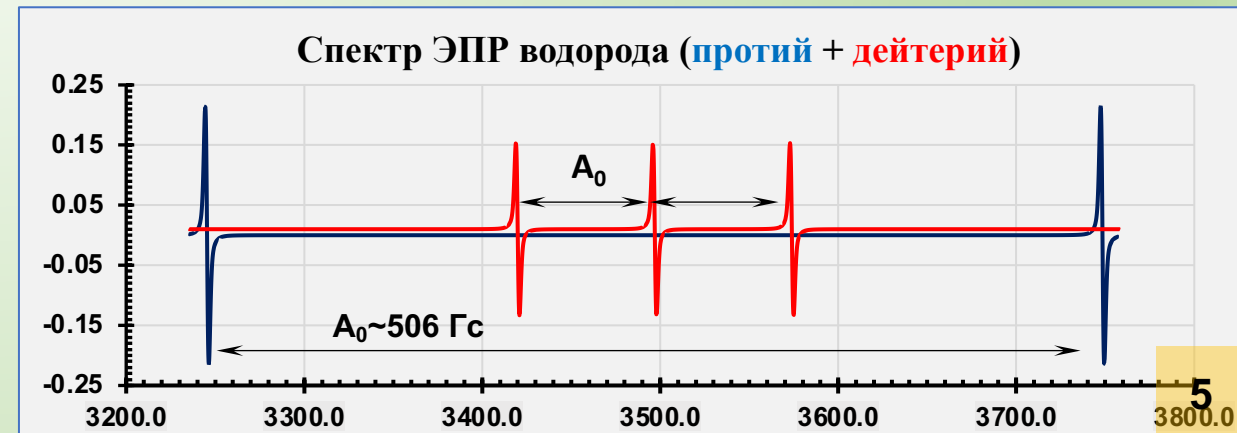
$\hbar\nu = g\beta B_0$ - основное уравнение

$g = 0.714485 \nu \text{ МГц} / B_0 \text{ Гс}$

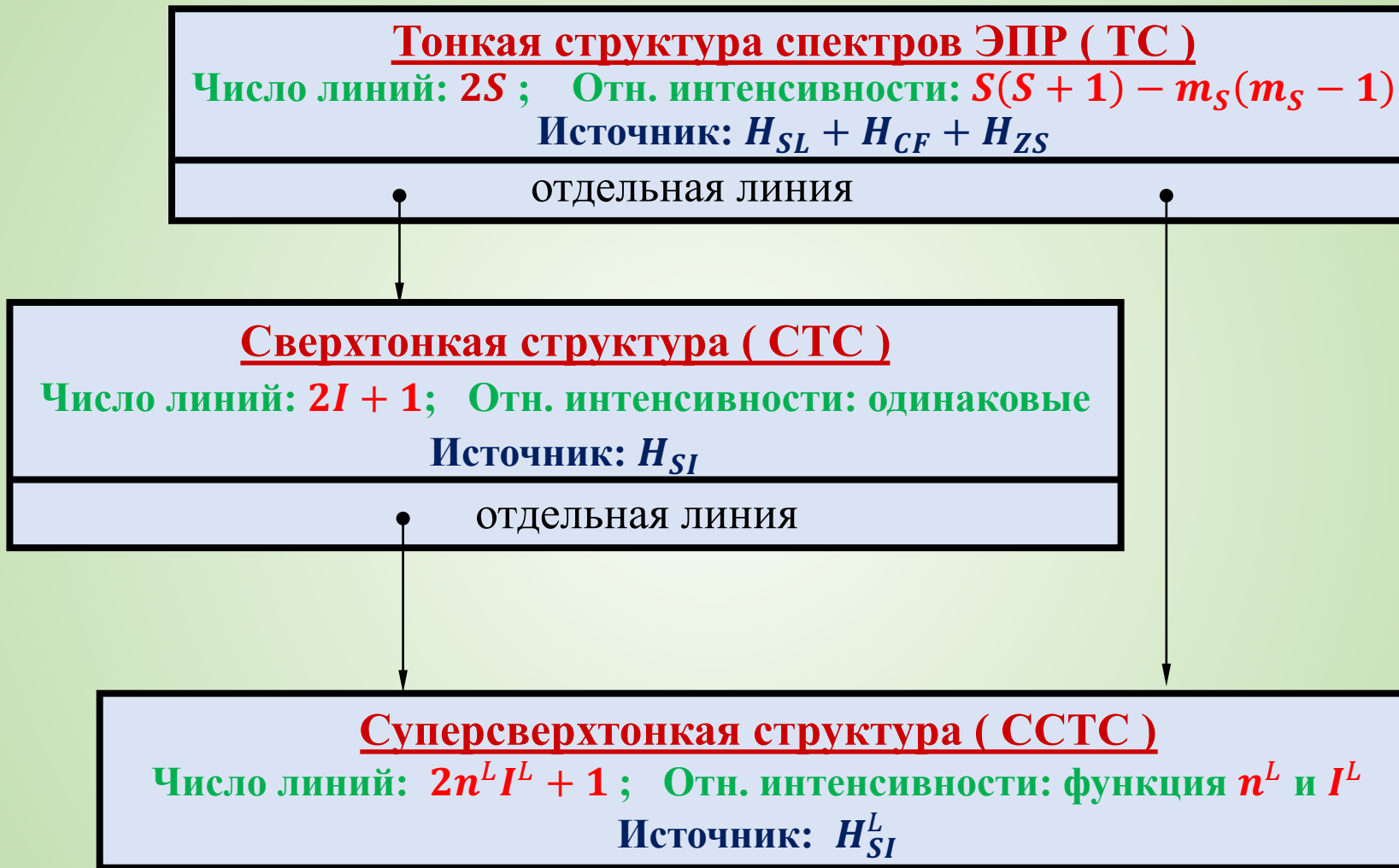
$g_e = 2.0023(19)$

ПАРАМЕТРЫ СПЕКТРА ЭПР

g – основная характеристика ПЦ
 A_{pp} – Амплитуда сигнала
 ΔB_{pp} – Ширина линии
 $A_0 \equiv A_{iso}$ – Константа СТС
 Форма линии – Гуссова, Лоренцева



Алгоритм расщеплений линий в спектрах ЭПР

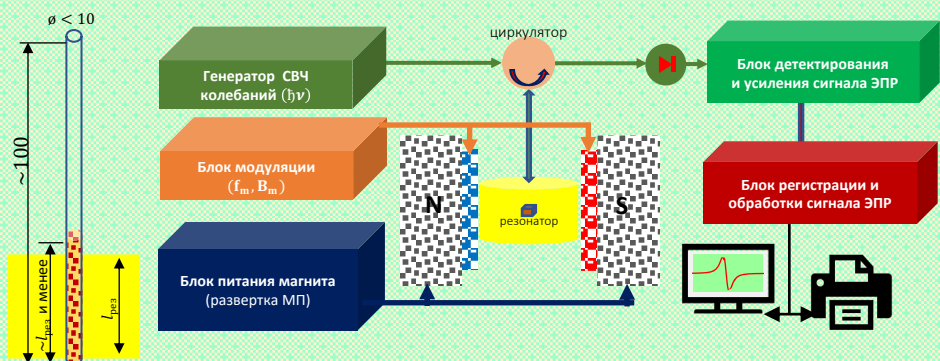


Спектр ЭПР Mn^{2+} в CaF_2 (флюорит): $\left[S_{Mn} = \frac{1}{2}, I_{Mn} = \frac{5}{2}, I_F = \frac{1}{2}, n_F = 8 \right]$ состоит из –
 $2S_{Mn} \times (2I_{Mn} + 1) \times (2n_F I_F + 1) = 270$ линий

Рабочие диапазоны спектрометров ЭПР

Индекс диапазона	Длина волны (мм)	Частота (МГц)	Глубина (мм)	B_0 для g_e (Гс/Тл)	Применение
VHF	1500	200	>35	60/0.006	Био-медицинские объекты (in-vivo, in-situ) EPR, EPRI, Томография
L	300	1000	~35	300/0.03	Био-медицинские объекты (in-vivo)
S	100	3000	<35	1100/0.11	Био-медицинские объекты (in-vivo) EPR, EPRI
X	30	10000		3300/0.33	Био-медицинские объекты (ex-vivo) EPR
Q	8	40000		13000/1.3	Био объекты (ex-vivo) EPR
W	3	95000		34000/3.4	Био объекты (ex-vivo) EPR

Как получить спектр ЭПР ?



БЛОК-СХЕМА стандартного ЭПР спектрометра



Установка , на которой Е.К.Завойский впервые наблюдал явление ЭПР

Музей Е.К.Завойского на физическом факультете КФУ (90% процентов оборудования является оригинальным)

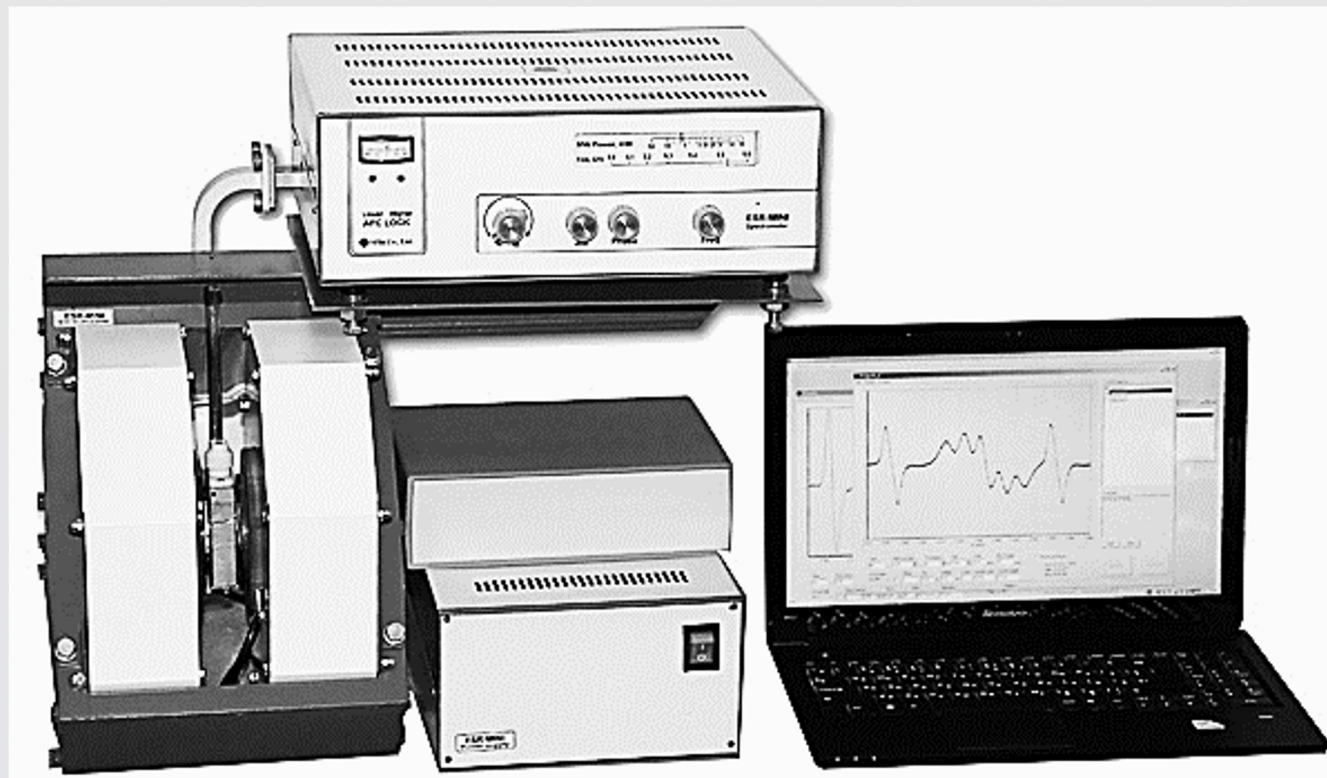


**Спектрометр ЭПР (X-Band) ELEXSYS E580 фирмы BRUKER
Лаборатория ЭПР в Ресурсном центре Научного парка СПбГУ**

Перспективные разработки и предложения в Санкт-Петербурге

СВ-ЭПР10-МИНИ (ГРАНАТ) – разработчик и производитель СПбГЭТУ (ЛЭТИ)

Девайсы: 85-473К



- Количественное измерение оксида азота (NO) в сосудистой системе, клетках и тканях, крови
- АФК и окислительный стресс
- Количество АФК в клетках, тканях, в биологических жидкостях (кровь, слёзная жидкость и др.)
- Детектирование синглетного кислорода и гидроксильных радикалов при фотодинамической терапии (PDT)
- Детектирование супероксидных анион-радикалов, генерированных при работе ферментативных систем (ксантиноксидаза)

ЛАБОРАТОРИИ ЭПР

(производитель **ZHONGTAI** -Китай, можно купить на рубли/юани)

ГАДЖЕТ ДЛЯ РУТИННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ

Площадь помещения: -;
Масса: настольный;
Девайсы: широкий набор;
Климат контроль: +;
Персонал : 1 чел.;
Проф. Подготовка: среднее (специальное)

СТАЦИОНАРНАЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ

Площадь помещения: » 30 м²;
Масса: » 500 кг;
Девайсы: широкий набор;
Климат контроль: ++;
Персонал : 3 и более чел.;
Проф. подготовка: высшее, среднее, специальное



СW-ЭПР спектрометр **ZT6500**)



СW-ЭПР спектрометр **ZT15C**



ЭПР спектрометр **ZT15P**

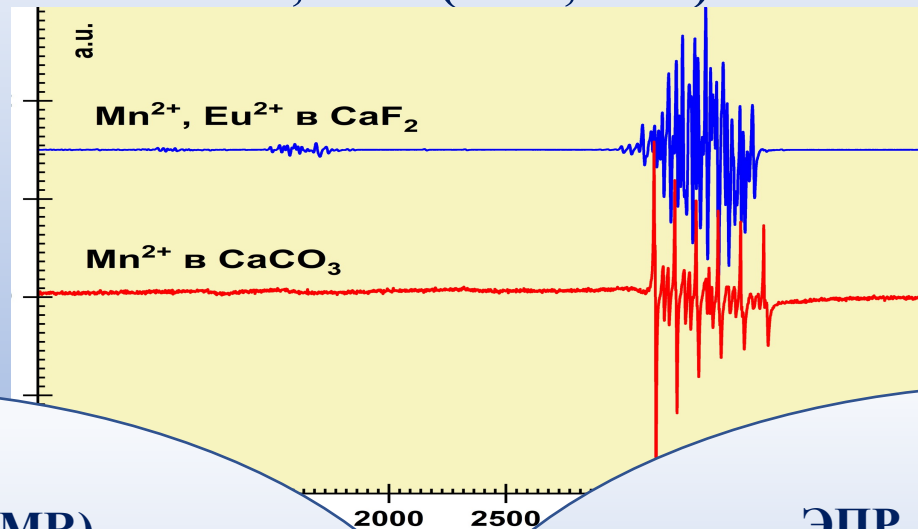
Режимы (X-BAND) – СW и FT

Методики –

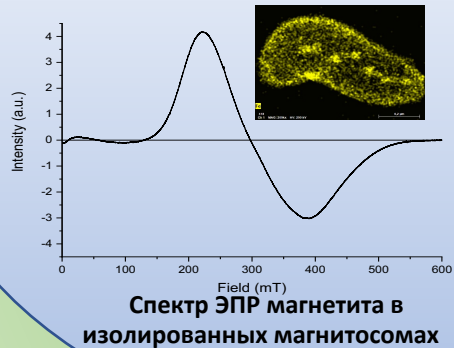
СПИН ЭХО, ESEEM, 2D-HYSCORE,
ELDOR, ENDOR

Классификация (условная) спектроскопии ЭПР

ЭПР, ЭСР (EPR, ESR)

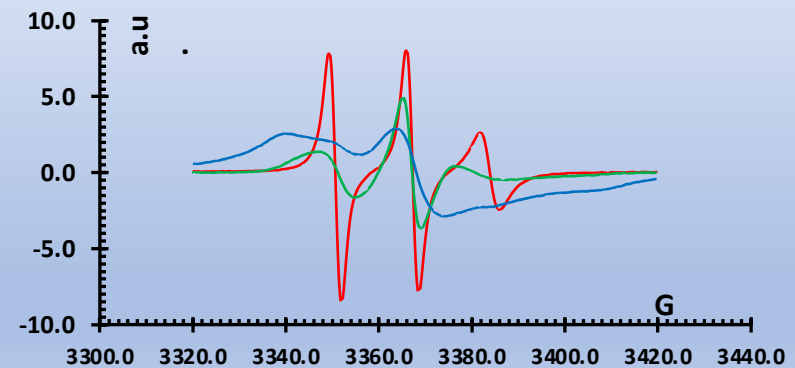


ЭПР, ЭМР (EPR, EMR)



ЭПР, ЭСР (EPR ~ ESR)

Спектры спиновой метки TEMPO



ПРЕИМУЩЕСТВА метода ЭПР:

- высокая чувствительность, до 10^{10} спинов (10^{-12} г/моль вещества на образец);
- малое количество пробы – 50-100 мг. до 500 мг.;
- высокая однозначность и достоверность интерпретации экспериментальных данных;
- высокая чувствительность параметров спектра ЭПР к физико-химическим условиям среды существования ПЦ;
- возможность исследовать медицинскую пробу в среде, близкой к физиологической;
- возможность воздействовать на пробу, непосредственно во время измерений, внешними стрессовыми факторами (облучение и др.) или реагентами;
- возможность избирательно исследовать кинетику поведения ПЦ;
- наличие большого количества разнообразных гаджетов, позволяющих решать широкий ассортимент задач.

НЕДОСТАТКИ метода ЭПР:

- высокая стоимость оборудования;
- высокий уровень подготовки обслуживающего технического персонала (научное специальная подготовка);
- каждый вид работ (регистрация СР, различия в природе объектов исследования, и пр.) требует предварительной настройки оборудования и отработки методики.

МЕТОДОЛОГИЯ «РЕПОРТЕРНОЙ ГРУППЫ»

(Burr M. Koshland D.E. Jr., Proc. Nat. Sci. U.S., 52, 1017-1024, 1964)

Для получения информации о свойствах биологической системы следует найти в ней или ввести в ее состав какой либо молекулярный зонд:

Этот зонд – **репортерная группа** должен удовлетворять следующим требованиям:

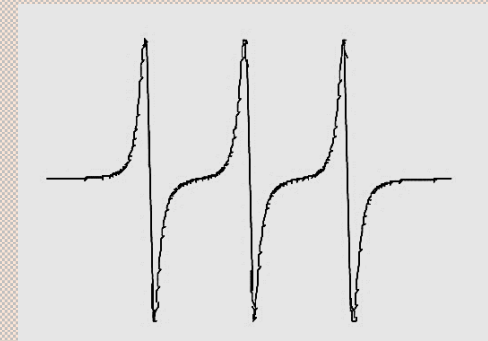
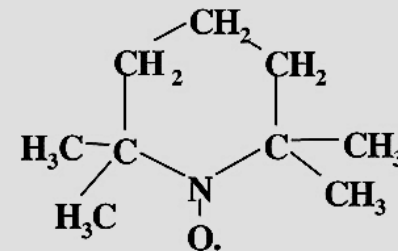
- 1) представлять собой частицу, чувствительную к свойствам микроокружения;
- 2) физические принципы, которые позволяют регистрировать такие частицы, должны быть уникальными или принципиально отличаться от свойств исследуемой системы;
- 3) необходимо, чтобы частица фиксировала изменения внутри системы, а не создавала их.

Репортерная группа называется **спиновым зондом**, если она не образует ковалентные связи с молекулами среды. В большинстве случаев спиновые зонды представляют собой свободные радикалы, которые, как правило, содержат группу: $\bullet N = O$ ($S = 1/2$; $I_N = 1$)

Репортерная группа называется **спиновой меткой** если она образует ковалентные связи с молекулами среды. В качестве спиновых меток обычно используют стабильные радикалы. Несмотря на разнообразие химического строения спиновых меток они, как правило, содержат одинаковый парамагнитный фрагмент - химически стабильный нитроксильный радикал ($>N-O\cdot$).

Пример нитроксильного радикала:

2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил,
нитроксильный радикал TEMPO и его спектр ЭПР



Классификация радикалов, образующихся в нашем организме

1. Природные -

- **Первичные** - образуются при участии определенных ферментных систем (выполняют полезные функции для организма)

Молекулы, образующие свободные радикалы.

Название	Структура	Образуются	Биологическая роль
Перекись водорода	$HOOH$	Супероксид-дисмутаза	Субстрат миелопероксидазы
Гидроперекиси липидов	$LOOH$	Цикло-оксигеназа	Фактор расслабления сосудов
Гипохлрит	$HOCl$		Антибактериальная

Название	Структура	Образуются	Биологическая роль
Супероксид	$\cdot OO^-$	НАДФН-оксидаза	Антимикробная защита
Нитроксид	$\cdot NO$	NO-синтаза	Фактор расслабления сосудов
Убихинол	$\cdot Q$	Дыхательная цепь митохондрий	Переносчик электронов

- **Вторичные** - образуются при реакциях с неферментативными системами (обладают скорее разрушительным действием на клеточные структуры и с полным основанием могут быть названы *вредными радикалами*. Считается, что их образование приводит к развитию *патологических состояний* и лежит в основе *канцерогенеза, атеросклероза, хронических воспалений и нервных дегенеративных болезней*)

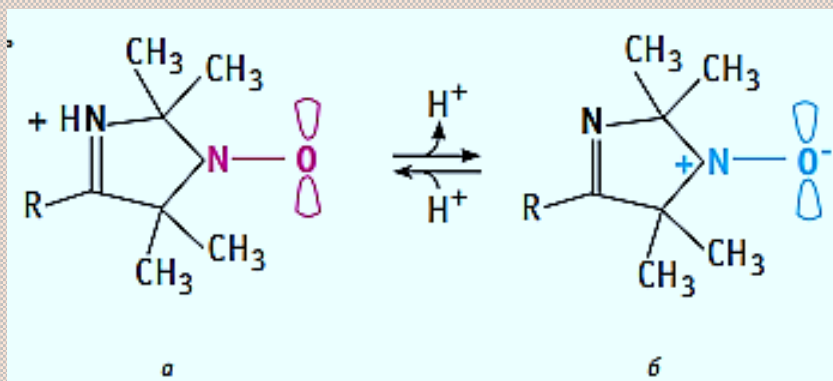
Название	Структура	Реакции образования
Радикал гидроксила	$\cdot OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + \cdot OH$ $Fe^{2+} + ClO^- \rightarrow Fe^{3+}Cl^- + \cdot OH$
Липидные радикалы	$LO \cdot$ $L \cdot$ $LOO \cdot$	$Fe^{2+}LOOH \rightarrow Fe^{3+}HO^- + \cdot OH$ $LO \cdot + LH \rightarrow LH + L \cdot$ $L \cdot + O_2 \rightarrow LOO \cdot$

- **Третичные** - ловушки (перехватчики) свободных радикалов, которые после реакции с вторичными радикалами превращаются в радикалы – антиоксиданты (служат для защиты от повреждающего действия вторичных радикалов в организме).

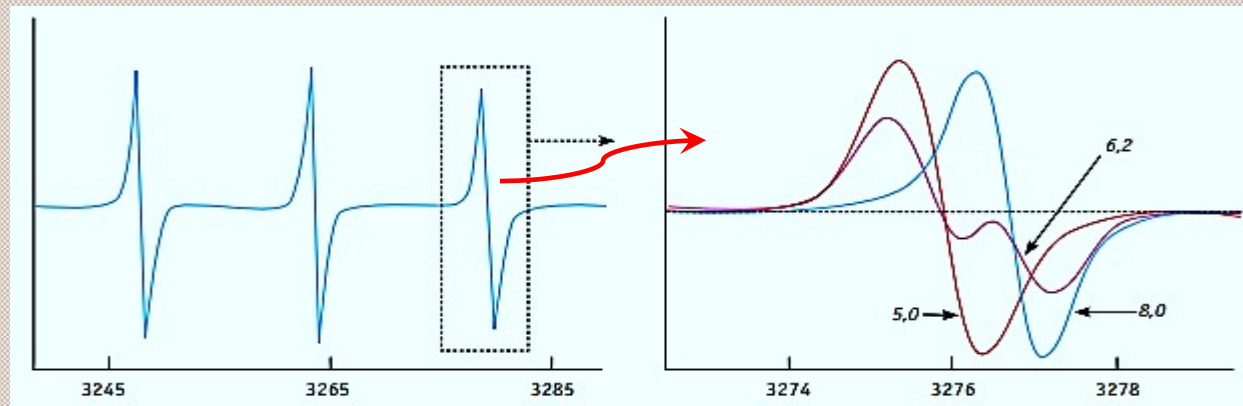
2. Чужеродные -

- Результат воздействия ионизирующих излучений;
- Результат воздействия УФ и лазерного излучений;
- Ксенобиотики – радикалы токсических веществ в организме

рН-чувствительный зонд

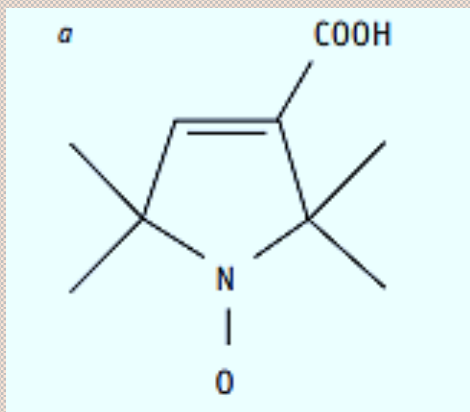


2-е валентные структуры нитроксильного радикала.

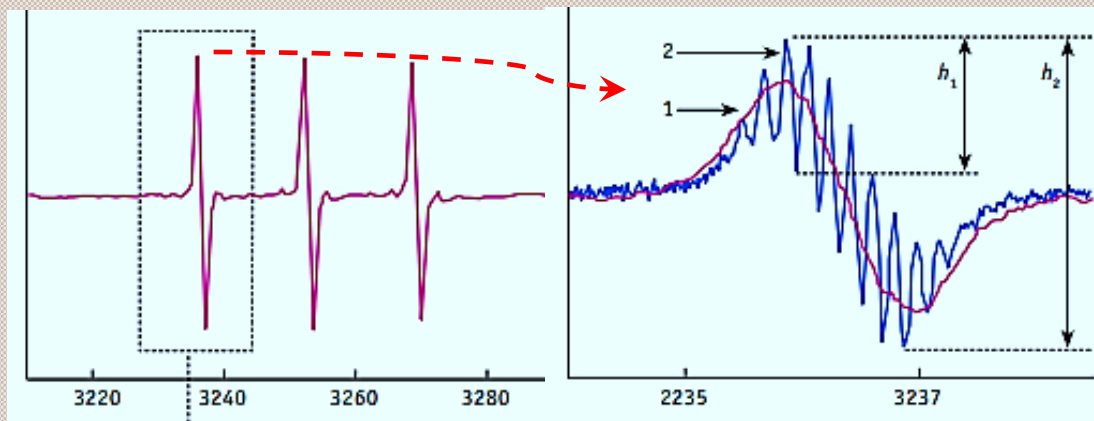


Спектр ЭПР рН-чувствительного зонда при различных значениях рН.

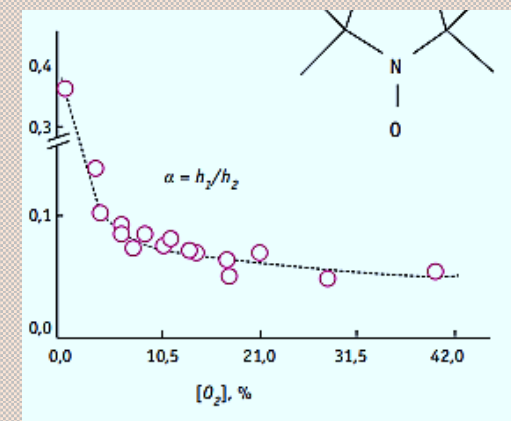
O₂-чувствительный зонд



Спиновый зонд карбоксилтетраметил
(2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксила)



Полный спектр ЭПР зонда и его низкополевой компоненты
(1 — при нормальных условиях, 2 — в деаэрированной среде);



Концентрация O₂ в растворе,
уравновешенная его содержанием в воздухе
(равновесие с окружающей средой)

Влияние подвижности нитроксильных радикалов на вид их спектра ЭПР

(используется для оценки вязкости физиологических растворов)

Изотропное вращение зонда

Время вращательной корреляции
(время поворота молекулы на 90°)

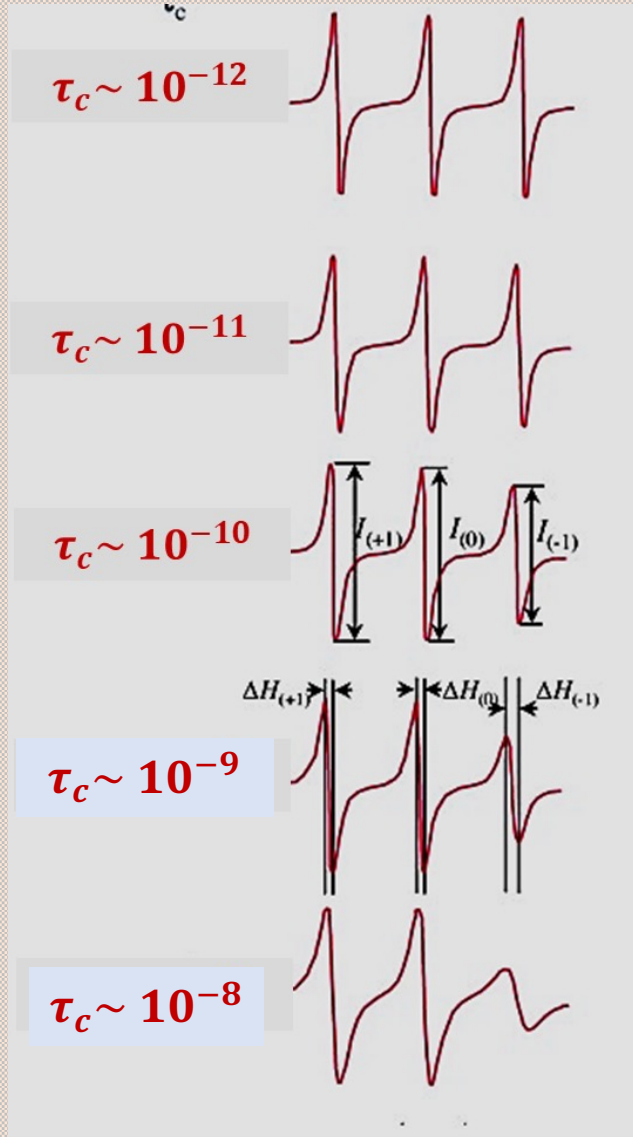
$$\tau_c = \lambda / c$$

λ – длина волны СВЧ поля;
 c – скорость света

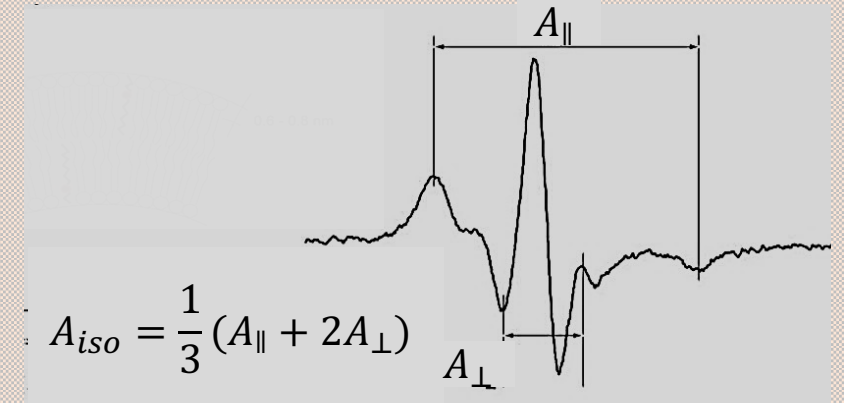
$$\tau_c \cong 6,65 \Delta H_{+1} \left(\sqrt{I_{+1}/I_{-1}} - 1 \right) 10^{-10} \text{сек}$$

$$\eta = \tau_c \frac{3kT}{4\pi R^3}$$

R – эффективный радиус молекулы зонда



Анизотропное вращение зонда

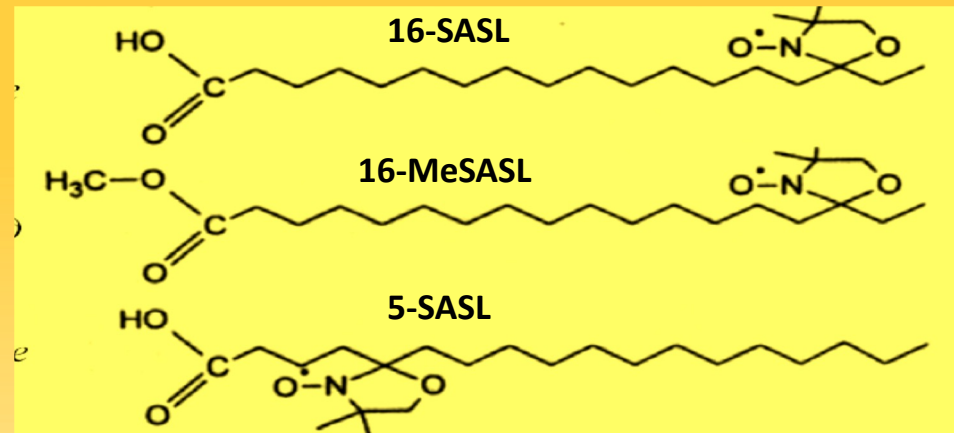


Спектр ЭПР метки 5-SASL с зондом TEMPO

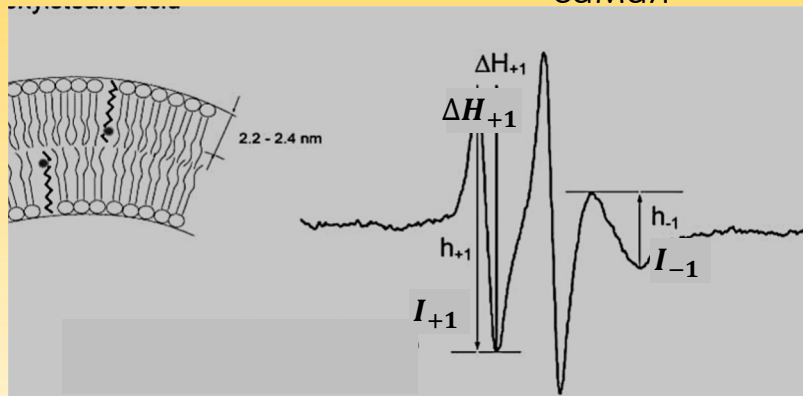
$$S = \frac{A'_{\parallel} - A'_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})}$$

Изменение спектра ЭПР зонда TEMPO
в зависимости от вязкости среды

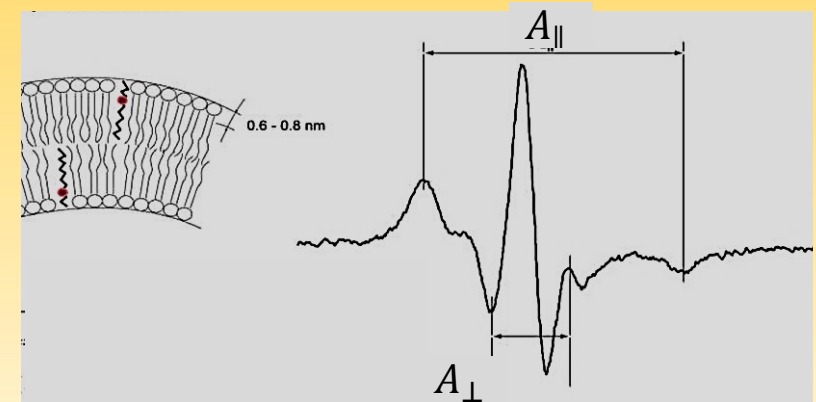
Спиновые метки 5-SASL, 16-SASL, 16- MeSASL -
5-диоксилстеарат, 16-диоксилстеарат и метил-16-диоксилстеарат соответственно
(Используются для изучения проницаемости мембран)



самая



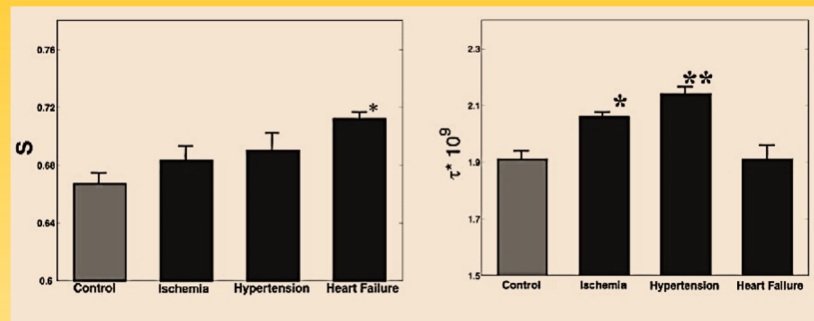
Спектр ЭПР 16-SASL



Спектр ЭПР 5-SASL

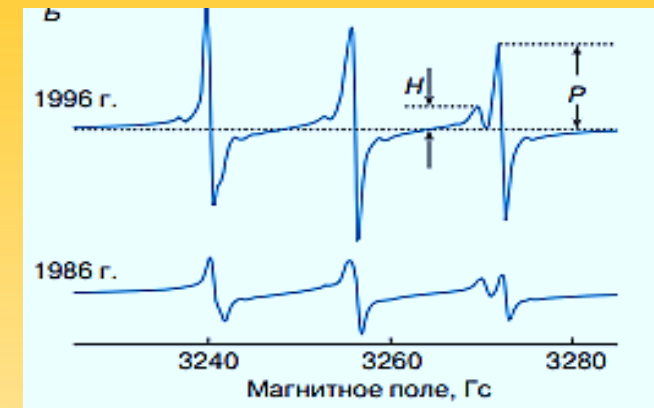
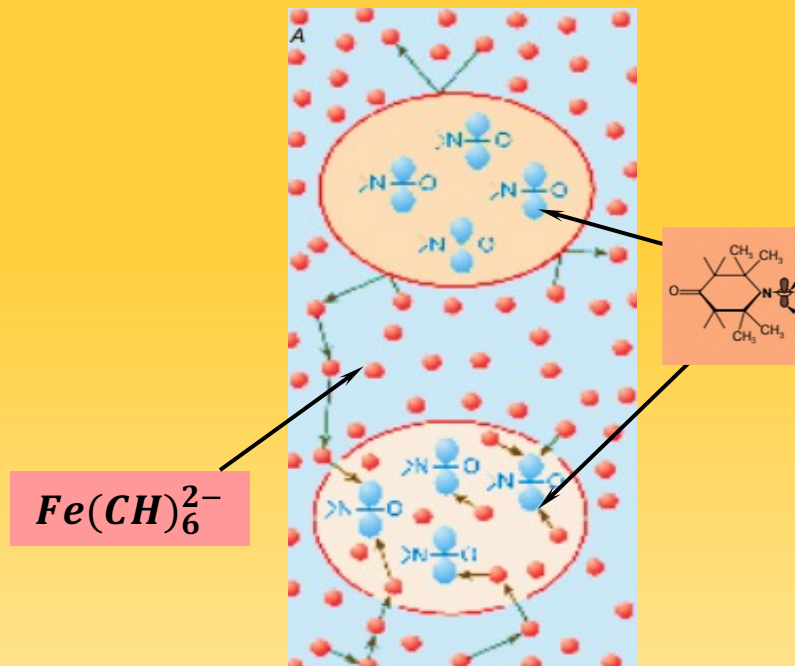
Стеариновая кислота - ($C_{17}H_{35}COOH$). Соли и эфиры данного соединения называют стеаратами.

Спин-зонд (метка) для диагностики состояния мембран



Оценка текучести плазматической мембраны эритроцитов в области 0,6-0,8 нм (А) и 2,2-2,4 нм (Б) от поверхности мембраны.

Увеличение S - и τ -параметров означает снижение мембранной текучести. При сердечной недостаточности снижается текучесть в мембране, а при ишемии и гипертензии — в более глубоких отделах мембраны.

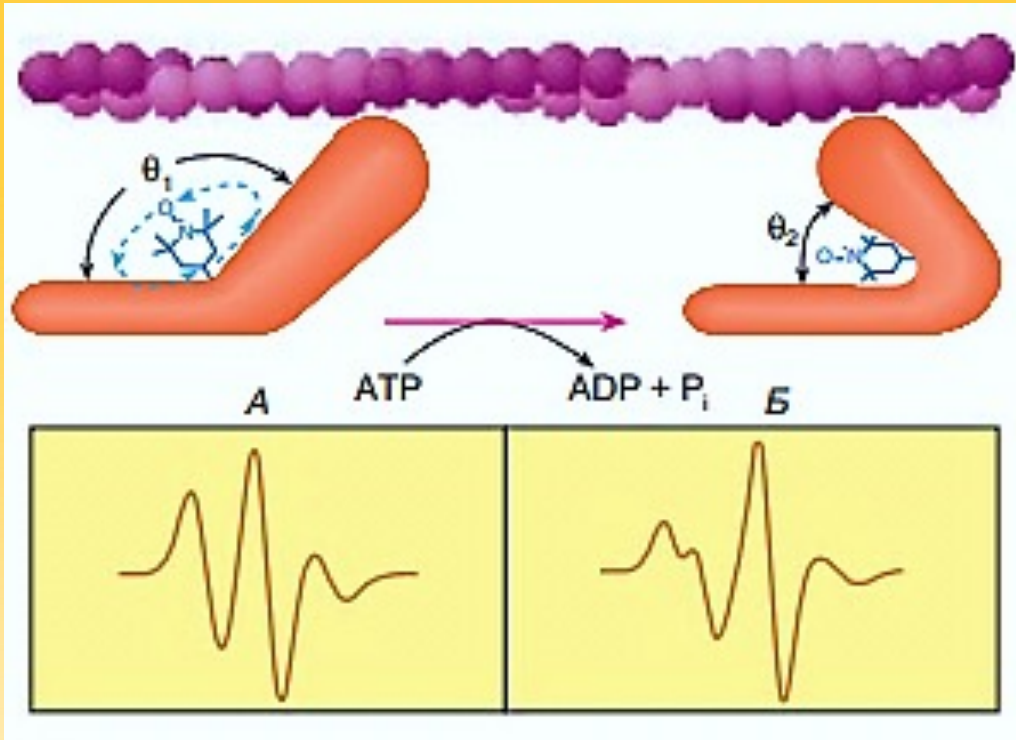


Контроль целостности клеточных мембран

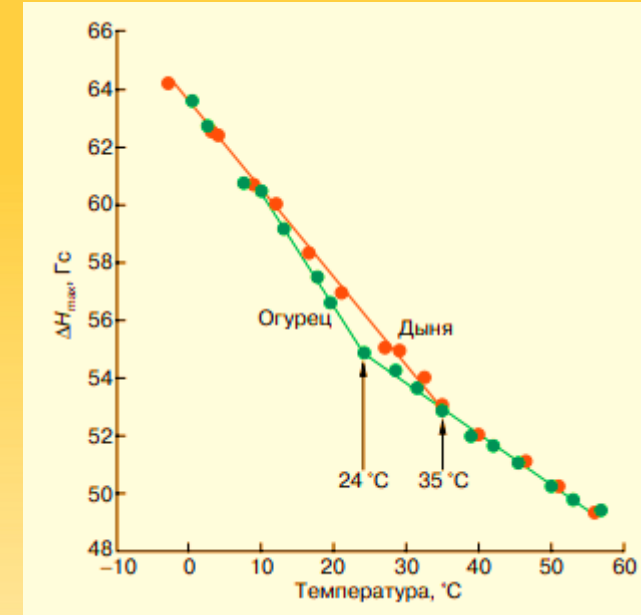
по спектрам ЭПР спиновой метки в клетках зародыша семян пшеницы

- Столкновения феррицианида с молекулами спиновой метки вызывают уширение линий в спектре.
- Компоненты спектра H и P принадлежат молекулам метки, локализованным внутри мембраны и в цитоплазме, соответственно. Разделение спектра на компоненты P и H обусловлено влиянием полярности среды на эффективность сверхтонкого взаимодействия. Компонента P наблюдается в клетках зародыша из жизнеспособных семян (урожай 1996 года), но почти отсутствует в клетках старых семян (урожай 1986 года), у которых целостность мембран нарушена

Зависимость спектра ЭПР от структурной перестройки белка



Конформационная перестройка спиновой метки в миозине, вызванная сокращением мышц

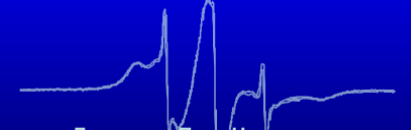


Температурные зависимости ширины линии (ΔH_{pp}) спектра ЭПР спиновой метки, локализованной в липидном бислое мембран хлоропластов огурца и дыни

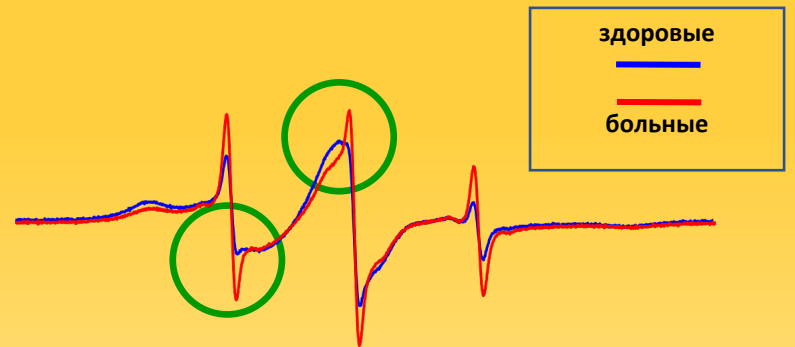
Характерные изломы на графиках температурных зависимостей при 24°C (огурец) и 35°C (дыня), обусловлены переходом мембранных липидов из твердокристаллического в жидко-кристаллическое состояние.

(Примечательно, что при этих же температурах хлоропласты огурца и дыни проявляют максимальную функциональную активность.)

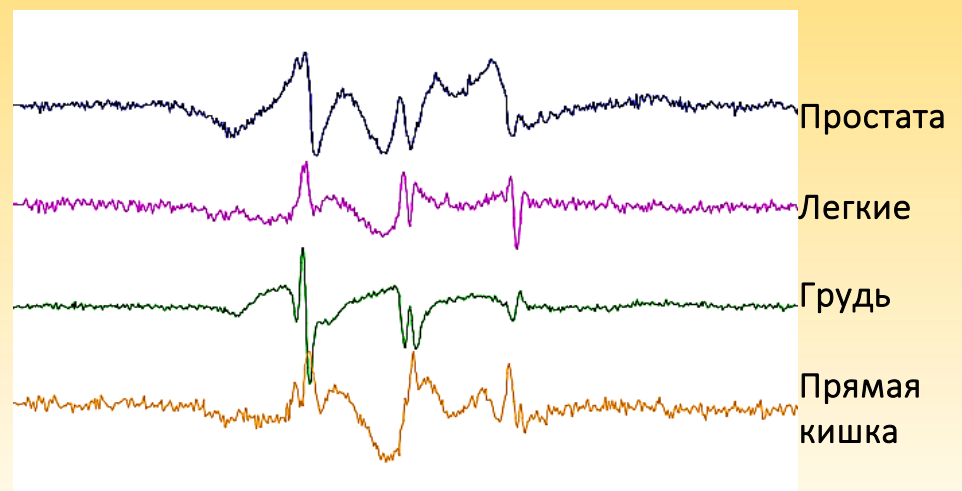
Новые возможности диагностики рака с помощью ЭПР-теста



Дмитриев Петр Николаевич
Генеральный директор Российского представительства
p.dmitriev@medinnovation.de
+79637522856



Злокачественные процессы изменяют конформацию альбумина и нарушают функции связывания и транспорта жирных кислот



Вариации спектра ЭПР нитросильного радикала в зависимости от органа где радикал локализован

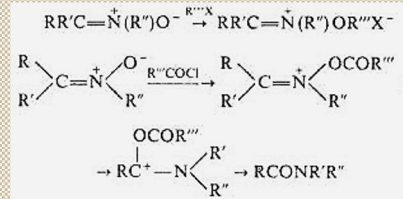
Тип онкологии	Традиционные онкомаркеры		Чув-ть ЭПР
	Онкомаркер	Чув-ть	
Рак простаты	ПСАсвоб/ПСА	24-71%	79%
Рак толстого кишечника	РЭА, АФП, СА19-9	20-43%	90%
Рак легких	NSE, SCC, Cyfra, РЭА, АФП	10-71%	100%
Рак мочевого пузыря	ТПА, Cyfra	24-58%	100%
Рак груди	РЭА, СА 15-3, АФП, СА 19-9, СА 72-4, СА 125	19-91%	90%
Рак прямой кишки	РЭА, АФП, СА19-9	24-78%	88%
Рак яичника	NSE, SCC, CYFRA, РЭА, АФП	24-66%	100%
Рак матки	SCC, РЭА	24-69%	100%

Спиновые ловушки -

Химические соединения, способные вступать в реакцию с коротко живущими СР, образуя при этом стабильные парамагнитные соединения – спиновые аддукты. При комнатной температуре они способны давать характерный, легко интерпретируемый спектр ЭПР.

В качестве спиновых ловушек, чаще всего используют:

нитроны



и

нитрозосоединения - органические молекулы, содержащие группу $\text{R} - \dot{\text{N}} = \text{O}$. В этом случае продукты реакции относятся к нитроксильным радикалам.

Не так давно под термином «спиновые ловушки» стали понимать также комплексы ионов металлов и гемопротеинов.

Спиновая ловушка должна удовлетворять следующим требованиям:

- Результат реакции должен образовывать стабильные аддукты;
- Быстро реагировать с широким рядом радикалов, или наоборот избирательно;
- Обладать устойчивостью по отношению к внешним факторам (освещению, изменениям температуры и др.), а также к воздействию различных химических и биохимических компонентов, включая ферменты;
- Образовывать аддукты, которые с легкостью поддаются экстракции, сепарации и полному описанию;
- Легко синтезироваться в чистом виде, а также в формах, включающих изотопы;
- Быть нетоксичными и физиологически инертными.

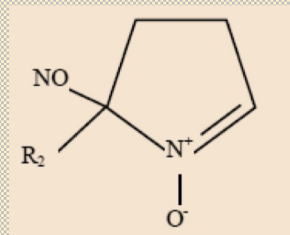
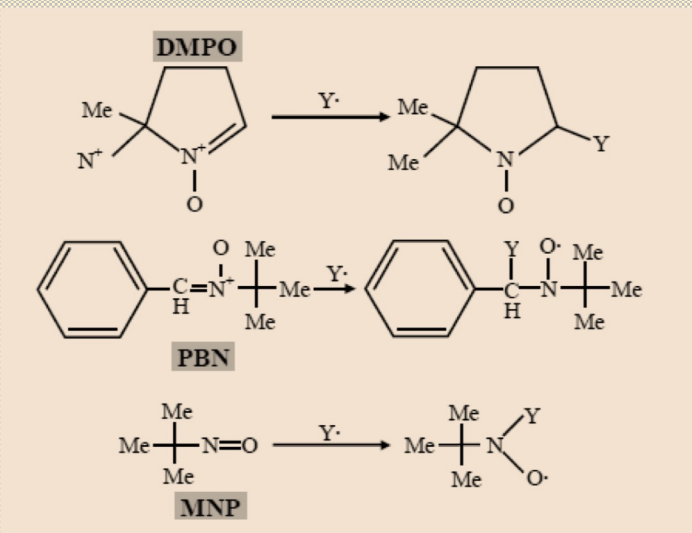
Упрощенная классификация спиновых ловушек:

- соединения, родственные циклическому нитрону 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксиду (**DMPO**)
- соединения, родственные ациклическому нитрону N-трет-бутил-α-фенилнитрону (**PBN**)
- нитрозосоединения (типа **MNP**).

Схемы образования аддуктов некоторых спиновых ловушек:

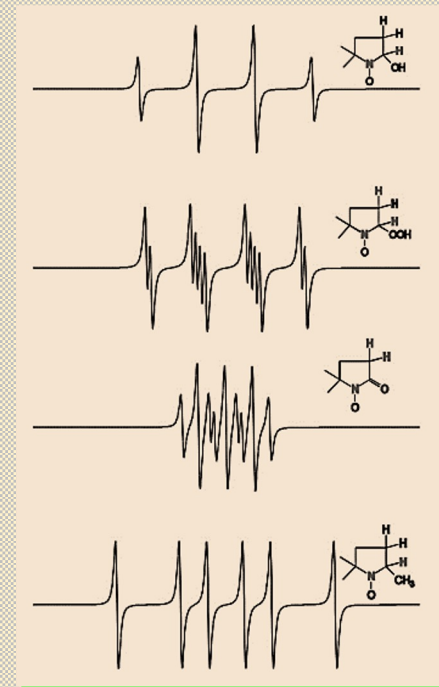
5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида (**DMPO**), N-трет-бутил-α-фенилнитрона (**PBN**), 2-нитро-2-метилпропана (**MNP**)

Структура простейших циклических
нитронных спиновых ловушек



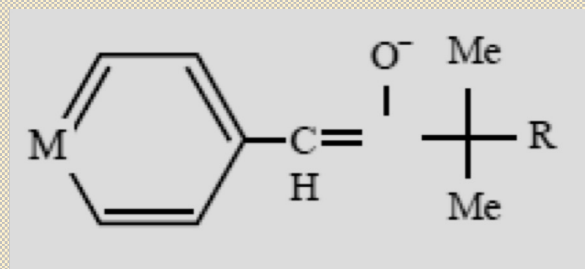
R1=R2= Me - **DMPO**
 R1=Me, R2=P(O)(OEt)2 - **DEPMPO**
 R1=Me, R2= CO2Et - **EMPO**
 R1=Me, R2= CO2Bu - **BMPO**

Возможные спектры ЭПР
аддуктов спиновых
ловушек типа DMPO

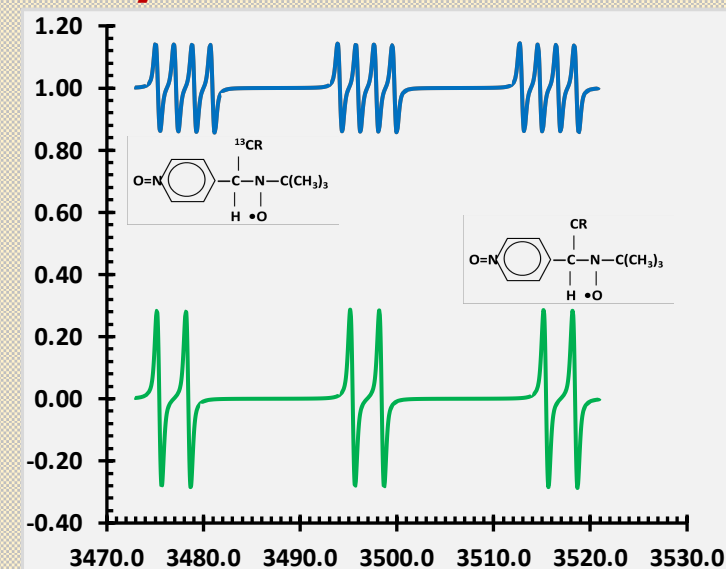


Структура простейших ациклических нитронных спиновых ловушек

Большинство успешных исследований проведено с использованием именно ациклических нитронов (*спиновых ловушек этого класса достаточно легко синтезировать в чистом виде или приобрести в значительных количествах*).

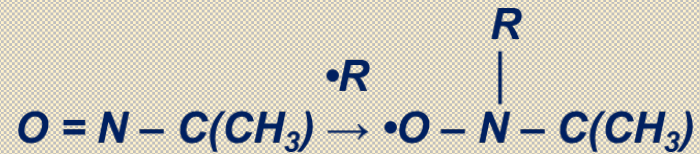


X= CH, R= Me - **PBN**
 X= N+-O-, R= Me - **POBN**
 X= CH, R= P(O)(OEt)2 - **PPN**
 X= N, R= P(O)(OEt)2 - **4PyPPN**

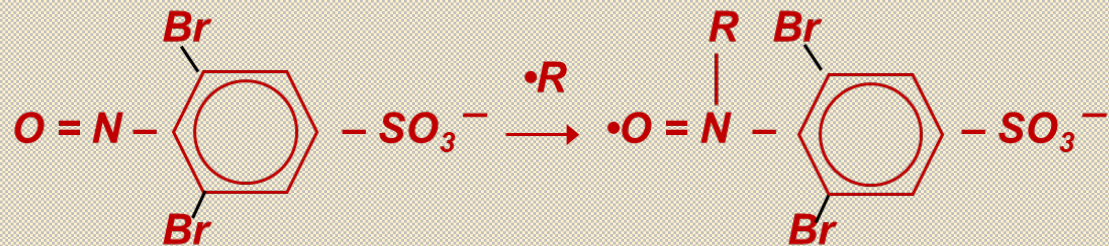


Структура простейших нитрозильных спиновых ловушек

Число нитрозосоединений, синтезированных для использования в качестве спиновых ловушек, уступает числу ациклических нитронных ловушек (могут быть синтезированы обогащенными изотопами ^2H , ^{13}C или ^{15}N)



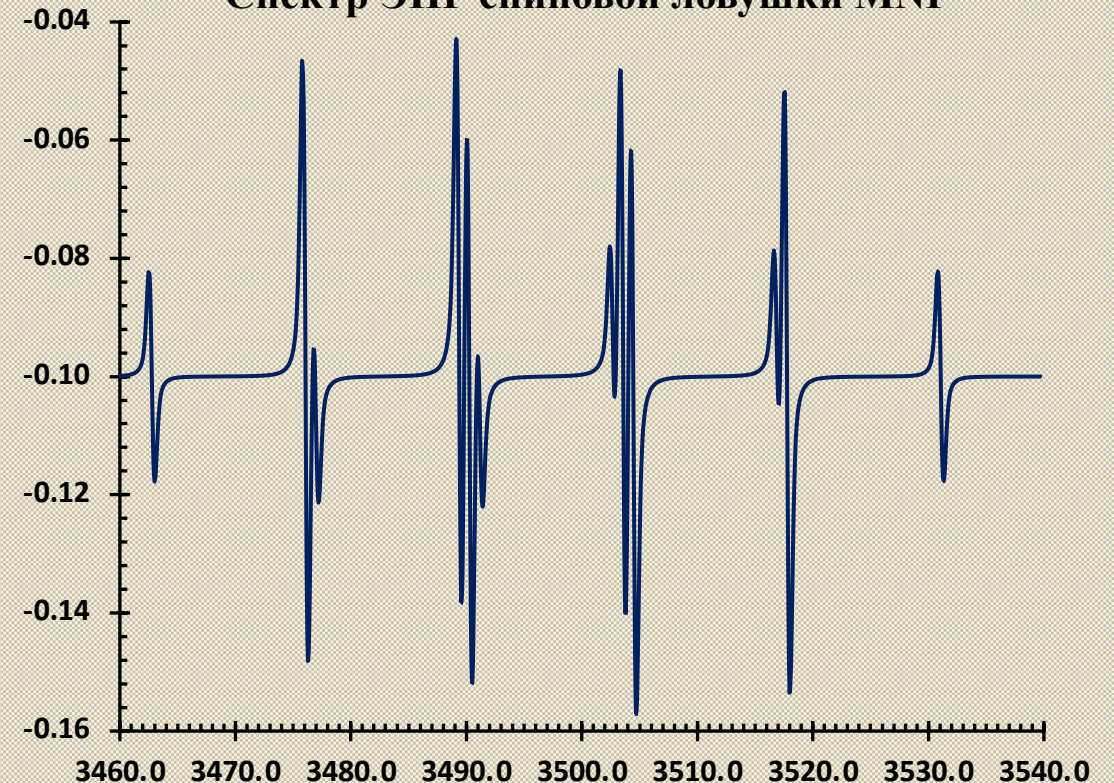
MNP (2-нитро-2-метилпропана)



DBNBS (3,5-дибром-4-нитрозобензолсульфонат)

Наиболее часто используемая ловушка этого класса

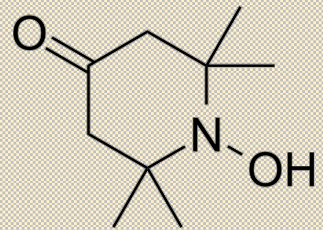
Спектр ЭПР спиновой ловушки MNP



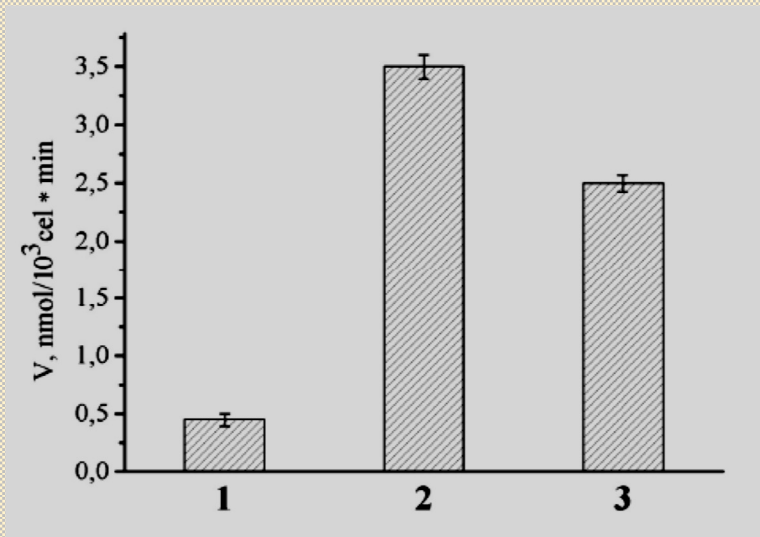
Регистрация активных форм кислорода (АФК)

К АФК относят производные кислорода радикальной природы супероксидрадикал или анион-радикал $\bullet O^{2-}$ - гидроперекисный радикал $HO^{2\bullet}$, гидроксил-радикал $\bullet OH$, и его реактивные производные - перекись водорода H_2O_2 , синглетный кислород 1O_2 и пероксинитрит $ONOO\bullet$.

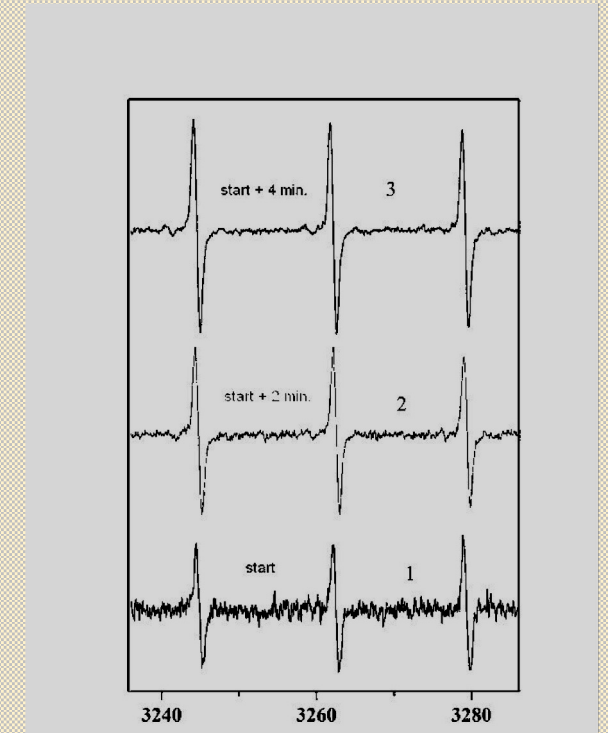
Пример применения спиновой ловушки TEMPONE-H для определения скорости генерирования супероксидного радикала



хлоргидрат гидроксиламина-2,2,6,6 тетраметил-4-оксипиперидина (TEMPONE-H),



Скорость генерирования супероксидных радикалов в костном мозге: 1- интактных животных: 2- животных с карциномой Герена: 3- в карциноме Герена



Изменения спектра ЭПР СВ во времени, непосредственно в ампуле спектрометра ЭПР после введения в суспензию клеток ловушки в костный мозг лабораторных мышей с привитой карциномой Герена.

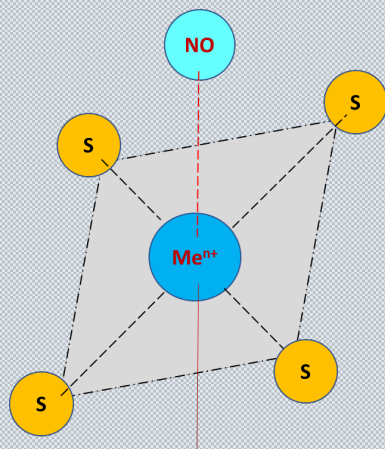
ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ Fe-ДТК В КАЧЕСТВЕ СПИНОВОЙ ЛОВУШКИ ДЛЯ •NO

(Одно из преимуществ данной методики - это возможность проводить эксперименты *in vivo*)

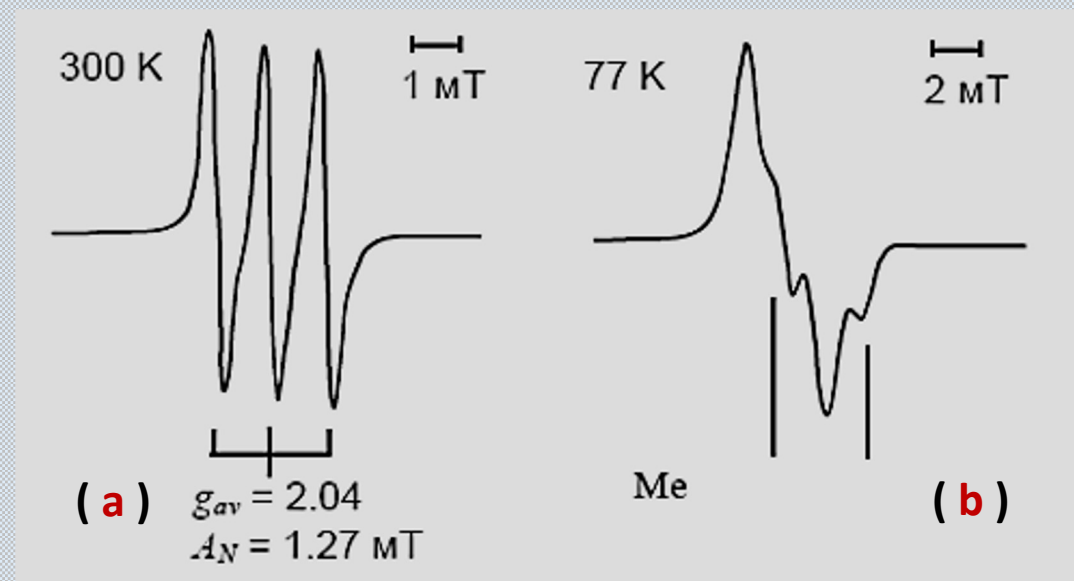
Производные дитиокарбаматов (ДТК) могут образовывать различные комплексы с ионами железа:



Регистрация NO при помощи комплексов $Fe(ДТК)_n$ в качестве спиновой ловушки основана на формировании стабильного парамагнитного комплекса $Fe^{II}(NO)(ДТК)_2$.



В присутствии кислорода комплексы $Fe^{II}(ДТК)_2$ и $Fe^{III}(ДТК)_3$ способны непосредственно реагировать с NO с образованием соединения $Fe^{II}(NO)(ДТК)_2$.

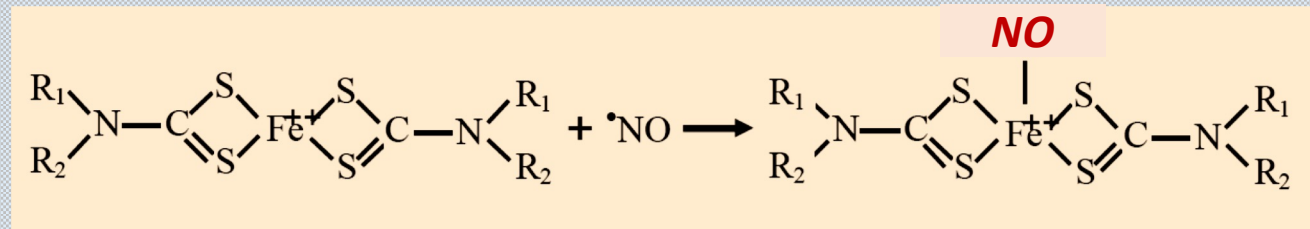


Типичные спектры ЭПР $Fe^{II}(NO)(ДТК)_2$:

- a) спектр - $g_{av} \sim 2.4$, $T = 300 \text{ K}$, $[^{14}\text{N}]$;
- b) спектр - $g_{\perp} = 2.037$, $g_{\parallel} = 2.015$, $T = 77 \text{ K}$, $[Fe^{+3}]$

Регистрации и химические особенности NO

Молекула $\bullet NO$ парамагнитна, но ее линии в спектре ЭПР могут, в силу физико-химических особенностей, иметь значительную ширину, что понижает чувствительность ее применения. Для повышения чувствительности применяют спиновые ловушки, имеющие высокое сродство к молекуле NO и образующие с ней стабильный парамагнитный комплекс. Эта молекула, достаточно легко, может образовывать стабильные лигандные связи с некоторыми комплексами железа образуя нитрозильные соединения.



Реакция спинового захвата NO комплексами

$Fe^{II}(D\dot{T}K)_2$, ($R1 = R2 = C_2H_5$) или $Fe^{II}(M\dot{G}D)_2$ ($R1 = CH_3$ и $R2 = CH_2(CHOH)_4-CH_2OH$).

Эту особенность молекулы оксида азота образовывать комплексы железа $Fe^{II}(D\dot{T}K)_2$, группа исследователей под руководством А.Ф. Ванина в 1991 г. начала применять дитиокарбамат (ДТК) в качестве спиновой ловушки для регистрации NO в биологических образцах. В настоящее время считается, что среди новых методов регистрации эндогенного NO , метод спиновых ловушек в сочетании с ЭПР-спектроскопией является наиболее точным и надежным.

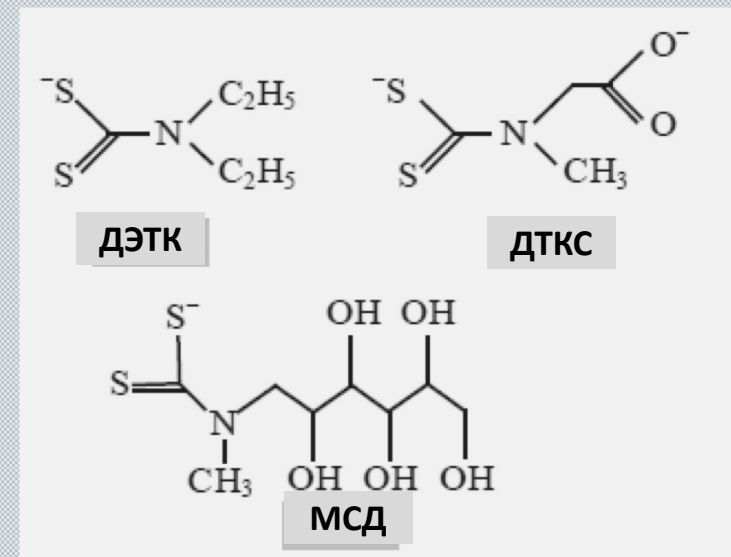
Все производные ДТК могут быть использованы в качестве спиновых ловушек.

В соответствии с растворимостью в воде, производные комплекса ДТК с Fe^{II} можно разделить на две группы :

- 1- нерастворимые в воде комплексы - N,N-диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) и пирролидиндитиокарбамата (ПДТК);
- 2- водорастворимые комплексы N-метил-D-глюкаминдитиокарбамат (МГД), N-(дитиокарбоксии)саркозин (ДТКС), L-пролиндитиокарбамат (ПроДТК) и N-метил-L-сериндитиокарбамат (МСД).

Модификация функциональной группы ДТК позволяет избирательно исследовать распределение (аккумуляцию) NO по различным органам.

Например, комплексы дитиокарбоксии-4-транс-метоксиметил-L-пролина (ДТКМП)₂ с Fe^{II} обладают уникальным свойством образовывать соединения с оксидом азота исключительно в крови.



Некоторые производные дитиокарбамата, используемые в качестве спиновых ловушек

Трудности:

Спектр ЭПР является интегральной характеристикой пробы, представляющей суперпозицию сигналов ЭПР от каждого компонента биологической системы. Для разделения сигналов необходимо знать характеристики сигнала составляющих компонент. Разложение интегрального сигнала на составляющие не является элементарной процедурой и сопровождается понижением точности измерений.

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА NO ПРИ НАЛИЧИИ В ПРОБЕ ЭЛЕМЕНТОВ ПЕРЕХОДНОЙ ГРУППЫ

(на примере ионов Cu^{2+} в нервной ткани)

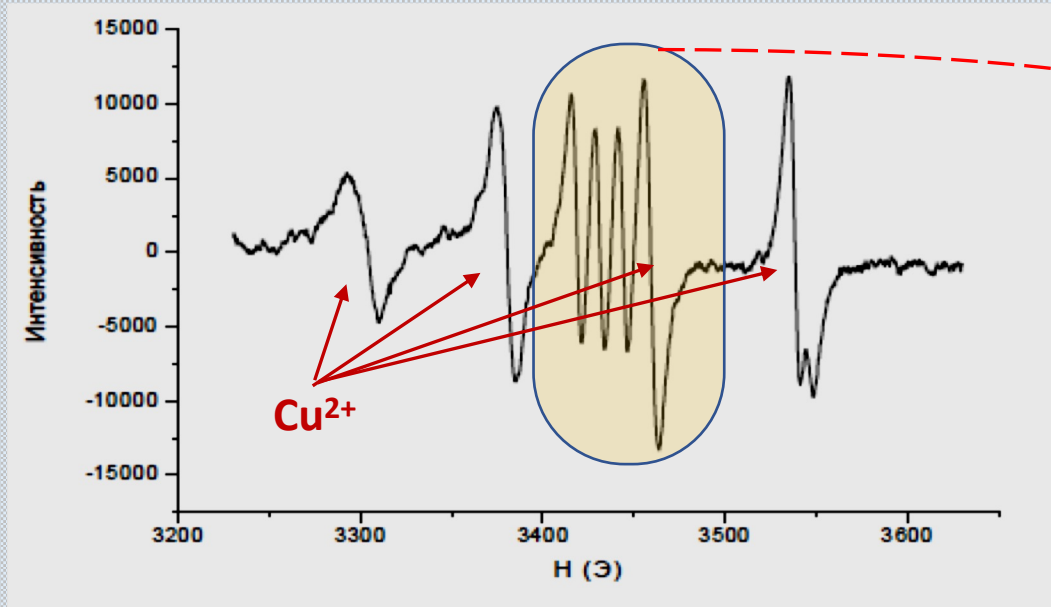
Приготовление спиновых ловушек для образования парамагнитных комплексов $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$ и $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ (образцы спинного мозга крысы, забранные из области дозированного контузионного повреждения, или образцов из периферической нервной системы, как то фрагменты седалищного нерва крысы на разных сроках регенерации или спинальных ганглий поясничного отдела).

- 1) Введение 1 мл буфера на основе N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновой кислоты – HEPES (50 мМ, рН 7.4) с добавками 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина – BSA, 1 мг/мл NaДЭТК (5.8 мМ) и 0.4 мг/мл FeSO_4 (2.6 мМ) - образуются ЭПР-активные комплексы $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$ и $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$;**
- 2) Инкубация реакционной смеси в течение 30 минут при температуре 37°C ;**
- 3) Охлаждение смеси, добавление 0.2 мл свежеперегнанного этилацетата, предварительно насыщенного водой;**
- 4) Интенсивное взбалтывание смеси в течение 3 минут и последующее центрифугирование при 6000g в течение 8 минут; .**
- 5) Отделение органической фазы и помещение ее в стандартные ампулы с внутренним диаметром 3 ± 0.1 мм.**

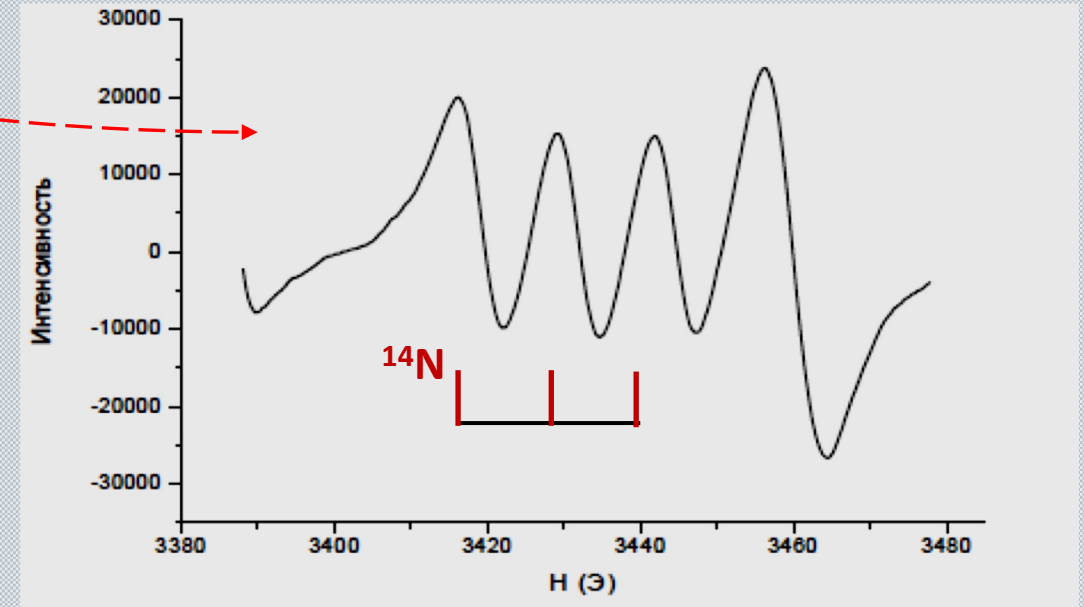
Описанный метод позволяет экстрагировать гидрофобные комплексы $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$ и $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ из водной фазы в органическую – этилацетат. Поэтому:

- а. нет необходимости замораживать пробу до 77К или использовать капилляры малого диаметра;**
- б. пробы можно хранить до проведения измерений в течение долгого времени.**

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СПЕКТРА ЭПР ПРИГОТОВЛЕННОЙ ПРОБЫ



Характерный спектр образца, содержащего комплексы $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ДЭТК})_2$ и $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$ в ацетилацетате, при $T=300\text{K}$.



Выделенный фрагмент спектра (СТС от ^{14}N ($I=1$): $A_{\text{СТС}} = 12.0 \pm 1.0$ Гс, $g = 2.038$)

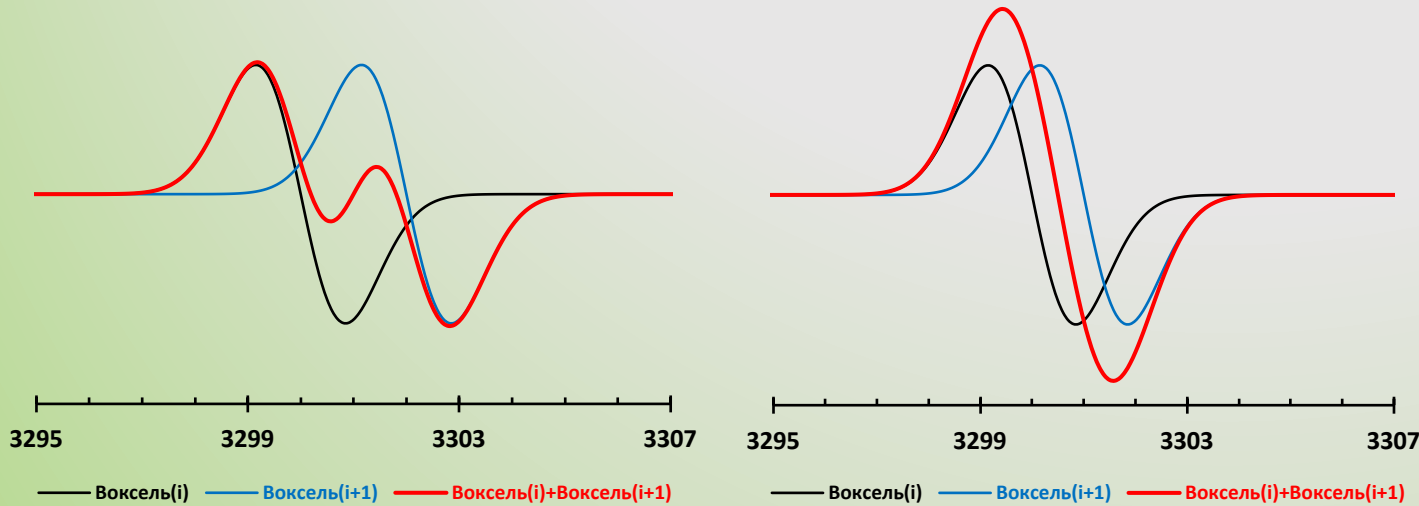
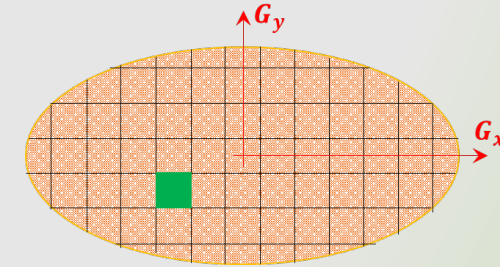
Кроме комплексов $\text{Fe}(\text{II})$ с дитиокарбаматами, для регистрации NO используют также другой класс парамагнитных соединений - нитронилнитроксилы (ННР). Хотя химический состав этих соединений с NO сильно отличается от соединений NO с Fe^{II} , ННР имеют высокую специфичность и могут быть использованы для проведения количественного анализа NO методом ЭПР в водной среде. Кроме того, ННР применяются в качестве показателя расширения сосудов и в качестве антагониста NO в различных органах, а также в других областях биологии для изучения противомикробного действия NO .

Принцип получения EPRI

Как получить изображение?

Воксель (V) — элемент объёмного изображения пробы в трёхмерном пространстве.

1. Для каждого вокселя пробы необходимо создать резонансные условия $\hbar\nu = g\beta B_0$ — достигается созданием градиента G магнитного поля по направлениям .
2. Необходимо получить разрешённый сигнал ЭПР. Параметр — $R = \Delta B_{pp} / G$ определяет размер вокселя ($\Delta B_{pp} \sim 1G$; $G \sim 100 \frac{G}{sm} \rightarrow V \sim 1mm^3$)



$$R_\alpha < R_\beta$$

$$G_\alpha > G_\beta$$

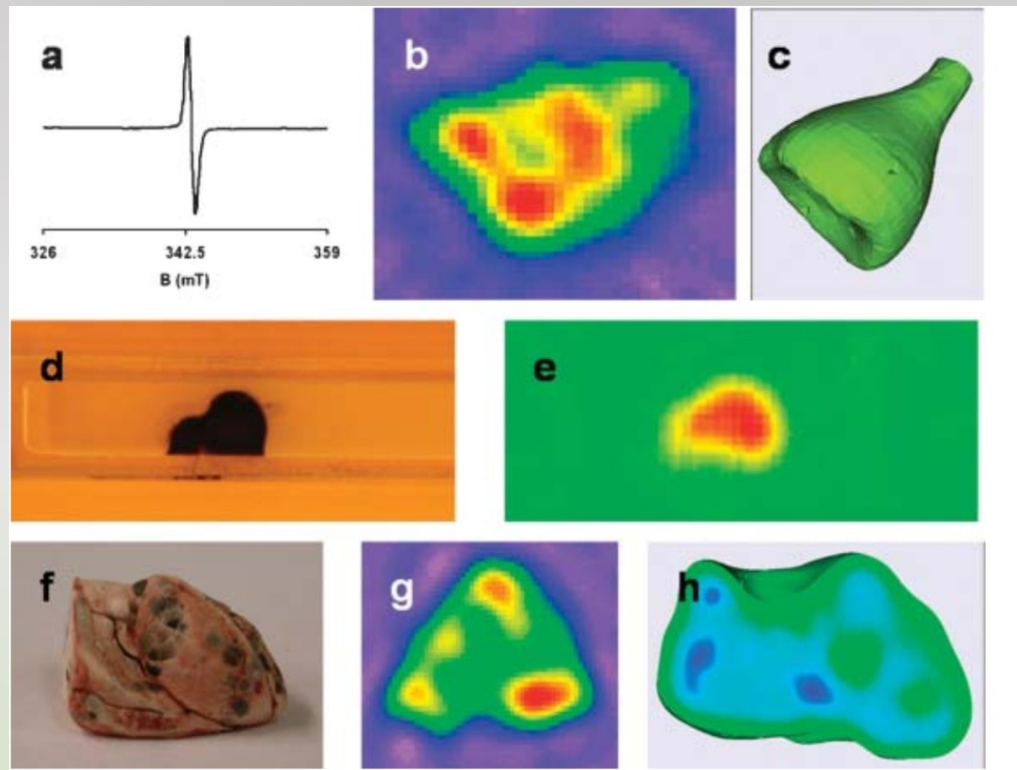
3. Количество спинов в одном вокселе должно быть : $N_V \geq 1 mM$
4. Изображение получается путем измерения стандартного спектра для каждого вокселя с последующей компьютерной обработкой спектров



Сигнал ЭПР спиновой ловушки ТЕМПОЛ от 2-х concentрических ампул

EPRI органов

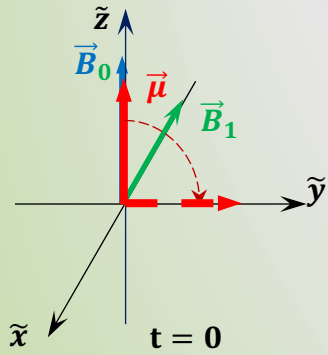
(из доклада д. Уве Айхов на молодежной школе «SPINUS»)



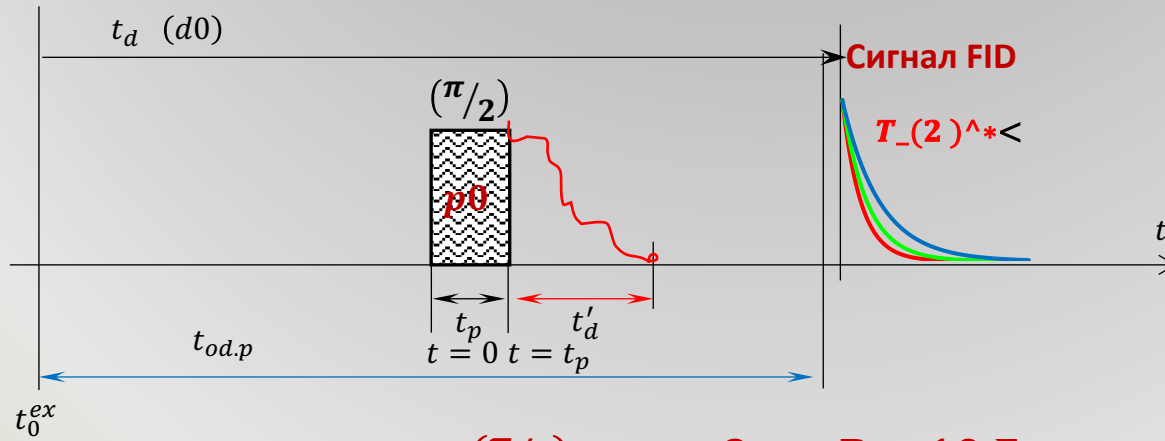
Спектры ЭПР in vitro и изображения меланомы B16 в легких мыши
a:-спектр лиофилизированной меланомы; **b**: 2D-изображение; **c**: 3D-изображение;
d: изображение свежего среза меланомы; **e**: соответствующее изображение ЭПР;
f: изображение лиофилизированных легких с метастазами;
g: 2D поперечное изображение ЭПР; **h**: продольный разрез трехмерного ЭПР-изображения.

К сокращению времени получения томограмм приводит использование импульсных технологий ЭПР.

Физическая сущность импульсных методик ЭПР (FT-методики). Фурье спектроскопия.



Поведение $\vec{\mu}$ в ВСК

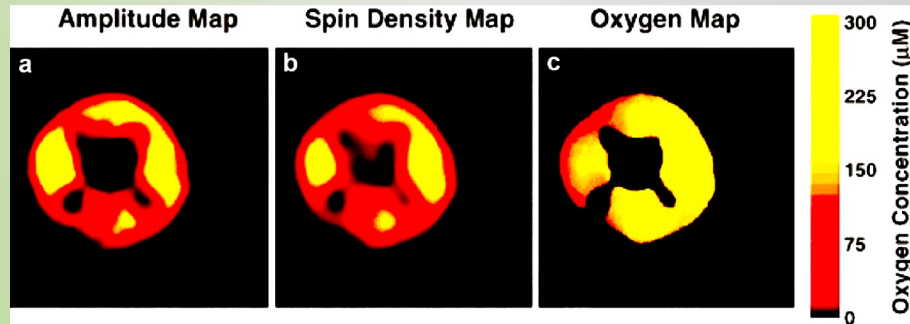


X-диапазон, импульс $(\pi/2)_{-x}$, $t_p \sim 9 \text{ ns}$, $B_1 \sim 10 \text{ Гс}$

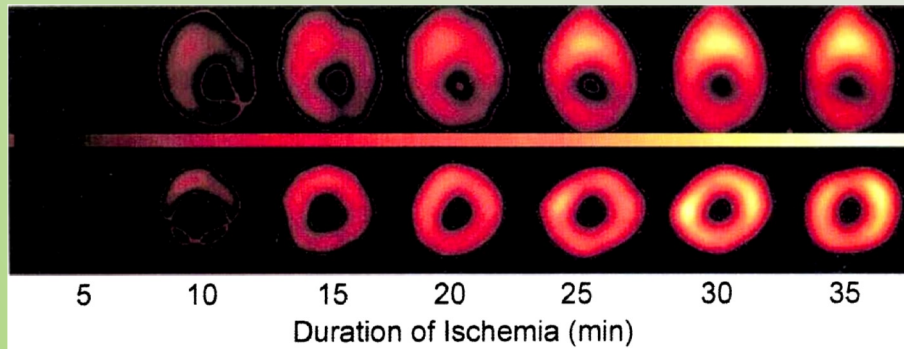
Схема регистрации сигнала релаксации:
FID – The Free Induction Decay, Сигнал Свободной Индукции [ССИ];
 t_0^{ex} – время начала эксперимента;
 $t_{od.p}$ – длительность заporного импульса;
 $t_d(d0)$ – время парализации;
 $t_p(p0)$ – длительность импульса;
 t'_d – мертвое время;

	ЭПР	ЯМР
Времена релаксации	нсек	мксек и мсек
Сложность и стоимость аппаратуры	значительно дороже	
Требования к вычислительной технике (производительность и пр.)	значительно выше	
Подготовка биологической пробы и время получения информации	Сложнее и больше	
Чувствительность по отношению к CW	Одного порядка	На 3 порядка выше
Наличие аксессуаров	Больше	
Применение	Изучение еae функциональных процессов медико-биологических систем	Томография, имиджинг
Перспективы	Большие	Возможности близки к завершению

*На сегодня разработано большое количество экспериментальных импульсных методик
ЭПР исследований*



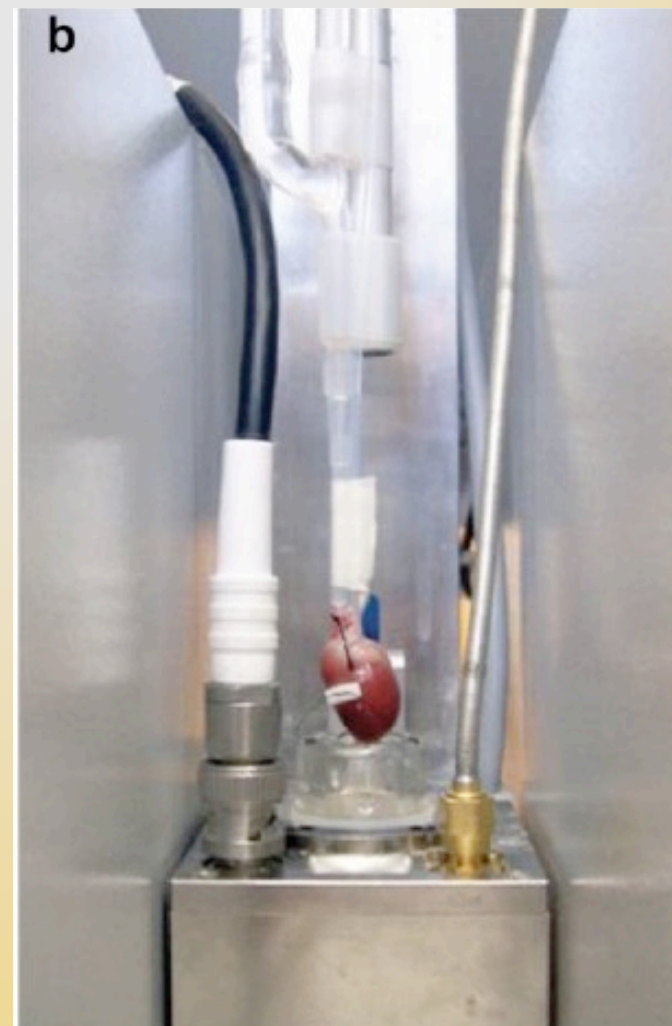
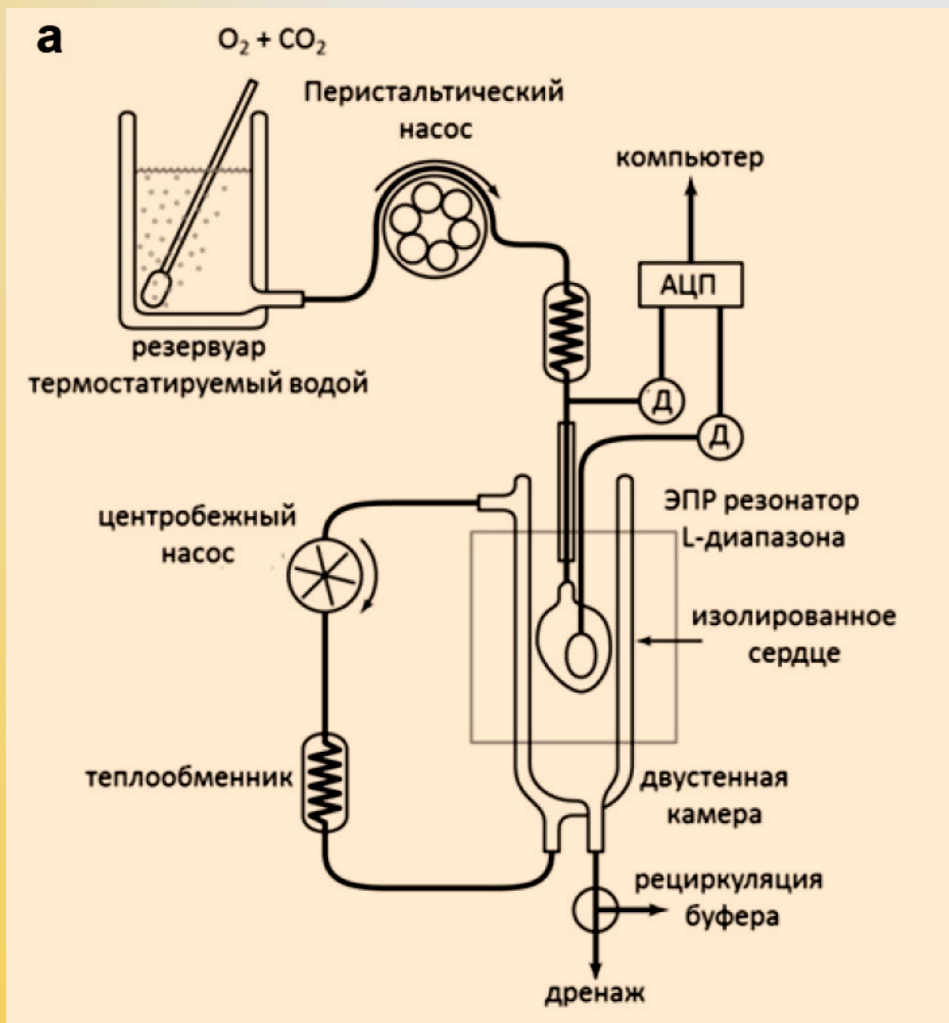
Карта оксигенации живого объекта (хвост крысы). Концентрация кислорода определялась с помощью спинового зонда 3-карбоксихромила. На карте отчетливо видно различие между артериями и венами, а также можно отличить кровеносные сосуды и мышечные волокна, разделенные костной тканью.



Серия продольных и поперечных срезов трехмерной карты интенсивности сигнала спиновых ловушек NO ($\text{Fe}(\text{MGD})_2\text{NO}$) в сердце крысы в зависимости от продолжительности ишемии.

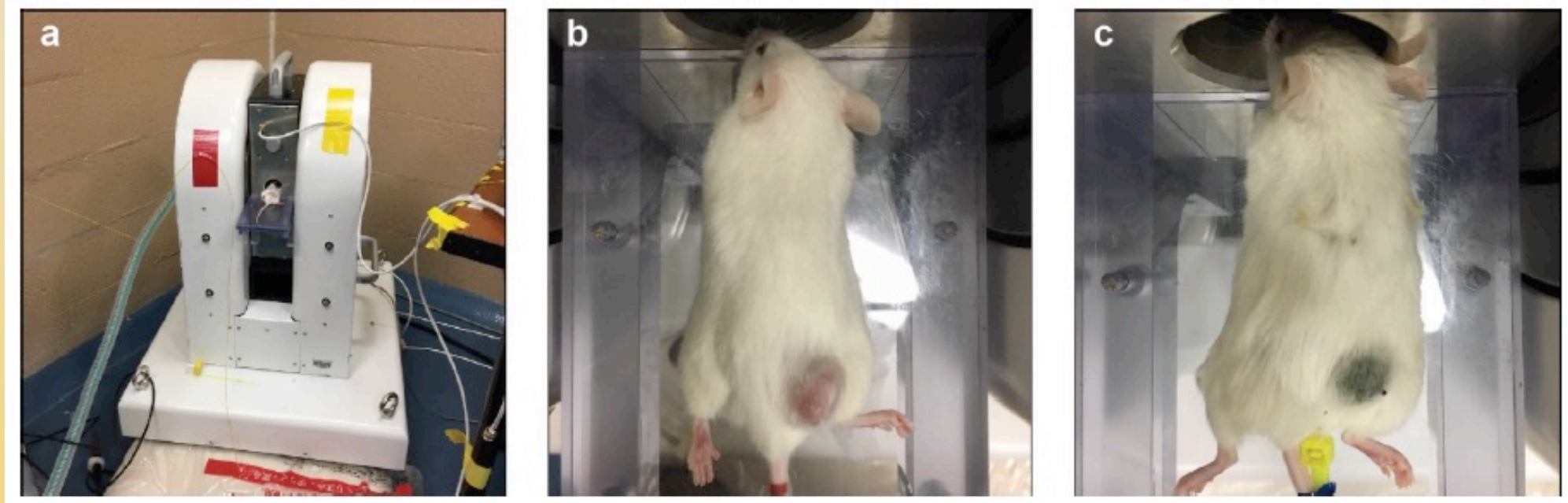
Исследования проведены на ЭПР спектрометре X-диапазона с томографической приставкой

Схема эксперимента (а) и фото (б) фрагмента спектрометра ЭПР во время эксперимента для перфузии изолированного сердца



Эксперименты проводились на спектрометре ELEXSYS E580 (BRUKER, ФРГ), в конфигурации для L-диапазона.

**Эксперименты по ОМРТ на настольном томографе ОМРТ
Keller JXI-KC02 (Japan Redox Ltd.), с применением стандартной импульсной
последовательности спинового эха
в магнитном поле 16мТл. (~500 МГц)**



Анестезия животных осуществлялась путем ингаляции смеси воздух-изофлуран с использованием анестезирующей машины (DRE VP3 ,DRE veterinary, USA). Трубка с газовой смесью была присоединена к обратной стороне резонатора, обеспечивая постоянный поток в течение всего эксперимента.

Подобные эксперименты не влияют на жизненные функции мышей, и после проведения необходимых процедур мыши возвращаются в клетку. Эксперименты с использованием одной и той же мыши проводились не чаще, чем 2 раза в неделю, чтобы животные могли отдохнуть от стресса.

Благодарим



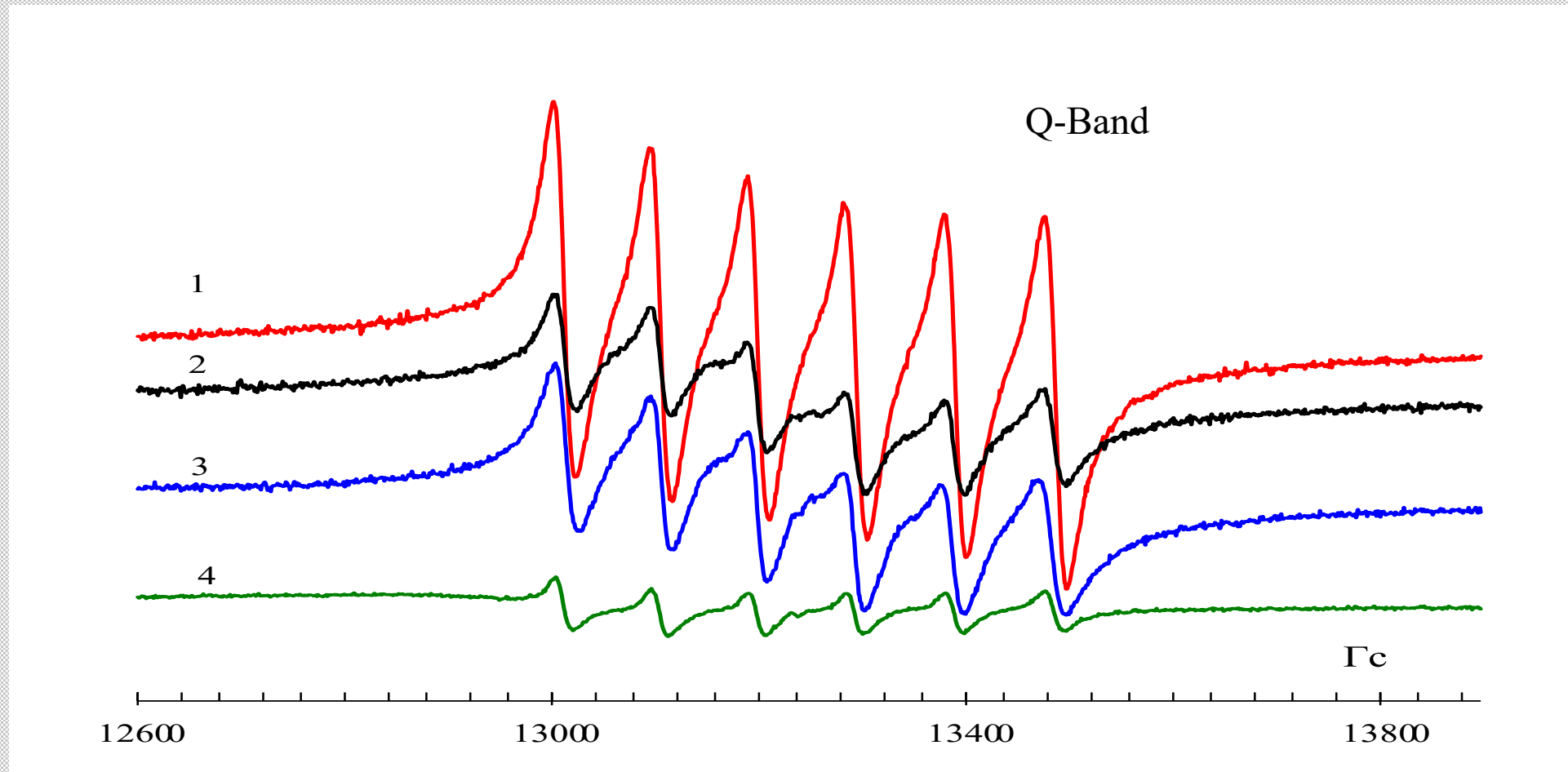
за



вниманию

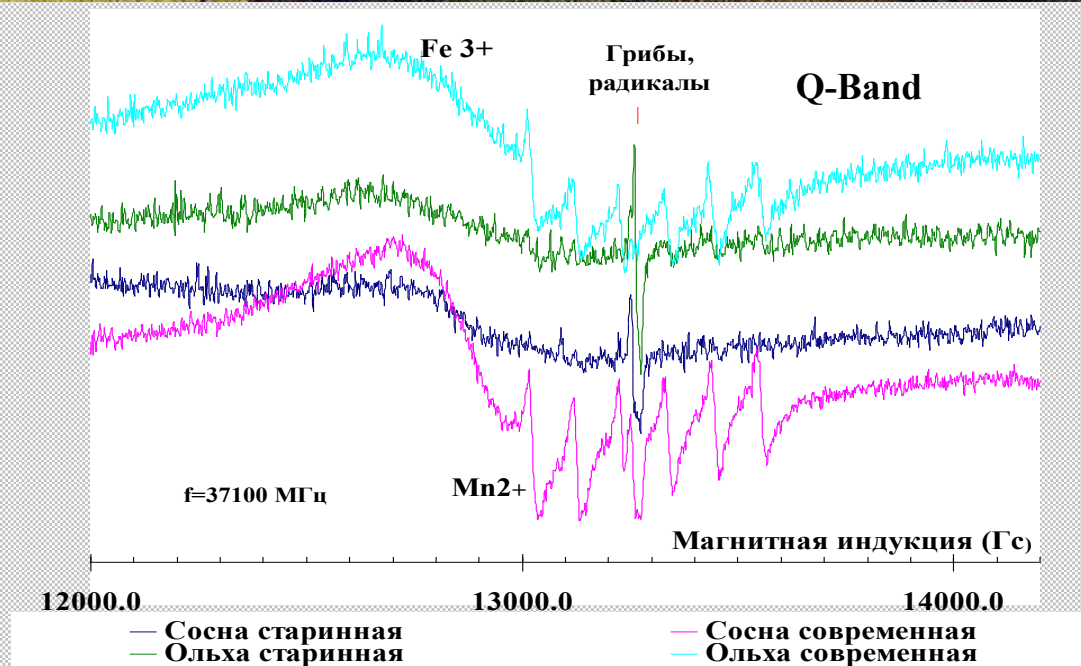
Желаем творческих успехов !

Спектры ЭПР растений из леса в районе п. Шалово:
1-игла сосны; 2-игла можжевельника; 3-игла вереска; 4-ягель.

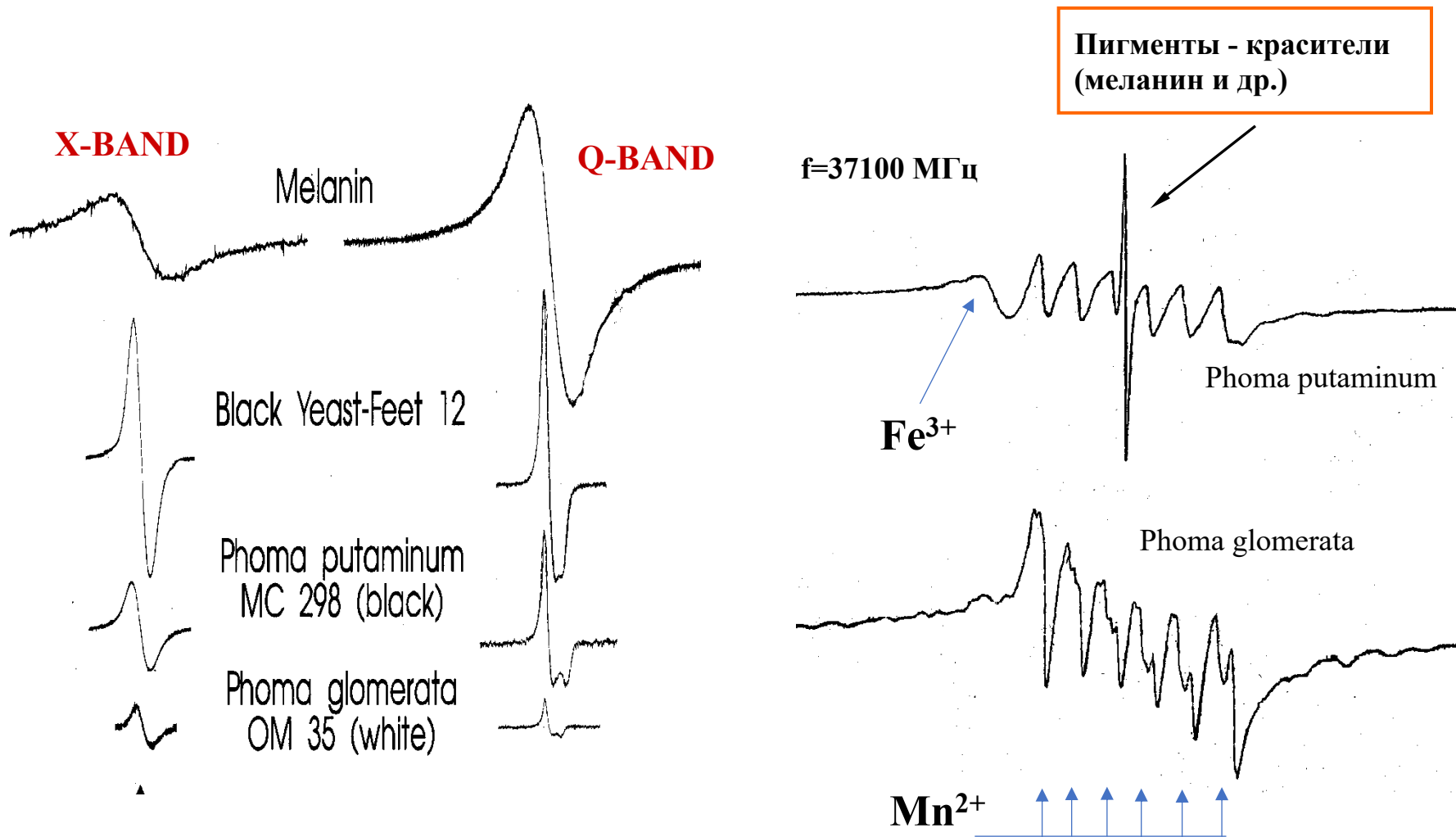




Спектры ЭПР древесины современной и с лафетов музейных орудий XVIII-XIX века



Спектры чистого меланина и микрогрибов, выращенных на:
питательной среде (агар-агар) мраморе (CaCO_3)



Спектр ЭПР атомарного водорода (^1H)
в зубе человека, облученного рентгеновскими лучами
(комнатная температура, $\nu = 9495$ МГц (X-Band))

