

*Российский Государственный Медицинский Университет*

*Кафедра биофизики*

**Э**лектронный  
**П**арамагнитный  
**Р**езонанс

**и его применение в медико-  
биологических исследованиях**

***А. Н. Осипов, Ю.А. Владимиров***

# Электронный Парамагнитный Резонанс

Часть 1. Основы метода ЭПР

# Электронный парамагнитный резонанс

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР, EPR, ESR) - один из основных прямых методов обнаружения и идентификации (изучения строения) **свободных радикалов** и комплексов **металлов переменной валентности**, имеющих **неспаренный электрон** на молекулярной орбитали.

В основе метода лежит резонансное поглощение электромагнитного излучения неспаренными электронами, помещенными в магнитное поле.



Электрон в атоме участвует в двух **видах движения**:

1. **Орбитальном** ( $l$ ) - вокруг ядра атома и
2. **Спиновом** ( $s$ ) - вокруг собственной оси.

Каждый вид движения можно охарактеризовать двумя **моментами**:

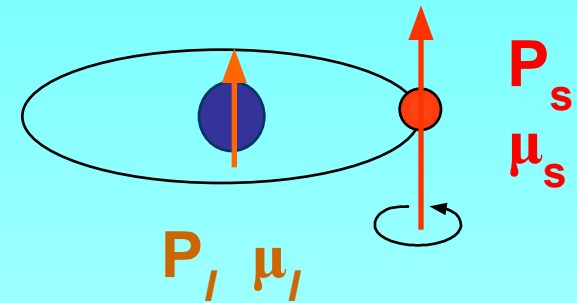
1. **Механическим** ( $P$ ), отражающим движение материальной частицы и
2. **Магнитным** ( $\mu$ ), отражающим движение заряженной частицы.

# Взаимосвязь механического и магнитного МОМЕНТОВ

Из классической механики известно, что момент количества движения электрона на круговой орбите радиуса  $R$

$$P = mvR,$$

где  $m$  - масса электрона, а  $v$  - его скорость.



Движение заряженной частицы по такому же контуру, создает магнитный момент, подобный тому, что возникает при движении тока

$$\mu = IS,$$

где  $I$  - сила тока в контуре ( $I = ve/2\pi R$ ), а  $S$  - площадь контура ( $S = \pi R^2$ ) или

$$\mu = veR/2$$

или, учитывая ( $P = mvR$ )

$$\mu = -eP/2m \text{ (или } \mu/P = -e/2m)$$

Из квантовой механики известно, что

$$P = nh/2\pi,$$

где  $n$  - главное квантовое число. Тогда при  $n=1$  получим

$$\mu = -eh/4\pi m = \beta \text{ (магнетон Бора)}$$

# Суммарный магнитный момент

Таким образом, для орбитального движения

$$\mu_l/P_l = -e/2m$$

Для спинового движения

$$\mu_s/P_s = -e/m$$

Суммарный магнитный момент равен:

$$\mu_j = \mu_l + \mu_s,$$

А суммарный механический равен:

$$P_j = P_l + P_s$$

Однако

$$\mu_j/P_j \neq \mu_l/P_l \neq \mu_s/P_s$$

поэтому вводят коэффициент пропорциональности (g)

$$\mu_j/P_j = -g \cdot e/2m,$$

где g это g-фактор, т.е. коэффициент, показывающий вклад орбитального и спинового момента в суммарный момент.

В конечном итоге, поскольку  $\mu_l \ll \mu_s$ , то  $\mu_j \approx \mu_s$  и

$$\mu_j \approx -g \cdot e/2m \cdot h/2\pi \cdot S = -g\beta S$$

# Энергия электрона в магнитном поле

равна

$$E = \mu * H * \cos(\mu, H),$$

где  $\mu$  - суммарный магнитный момент электрона,

$H$  - напряженность магнитного поля,

$\cos(\mu, H)$  - угол между векторами  $\mu$  и  $H$  (обычно = 1 или -1),

тогда подставив значение  $\mu$  получим

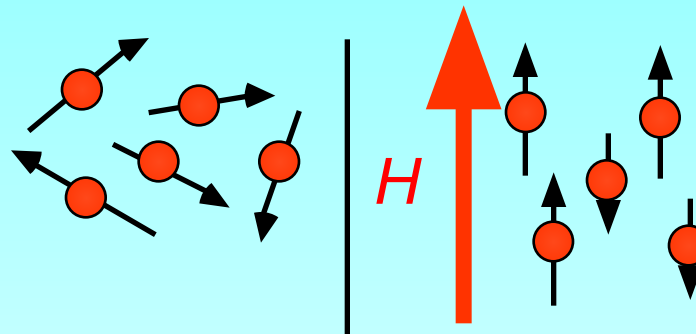
$$E = -g\beta SH,$$

Где  $S$  - спиновое квантовое число = +1/2 или -1/2. В итоге

$$E = \pm 1/2 g\beta H$$

# Ориентация электронных спинов в магнитном поле

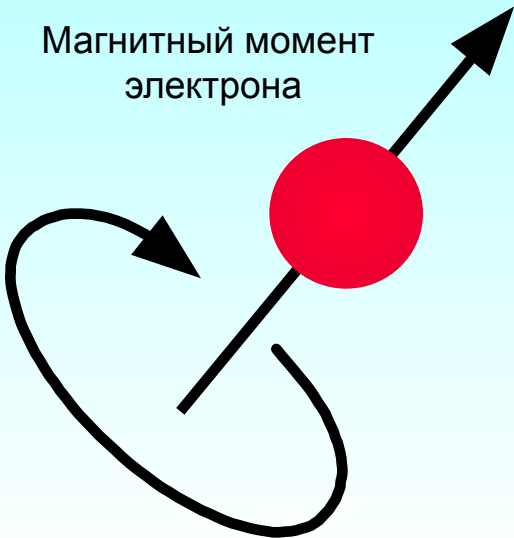
В отсутствие внешнего магнитного поля все механические и магнитные спиновые моменты электрона ориентированы случайным образом



В отсутствие магнитного поля

При включенном магнитном поле

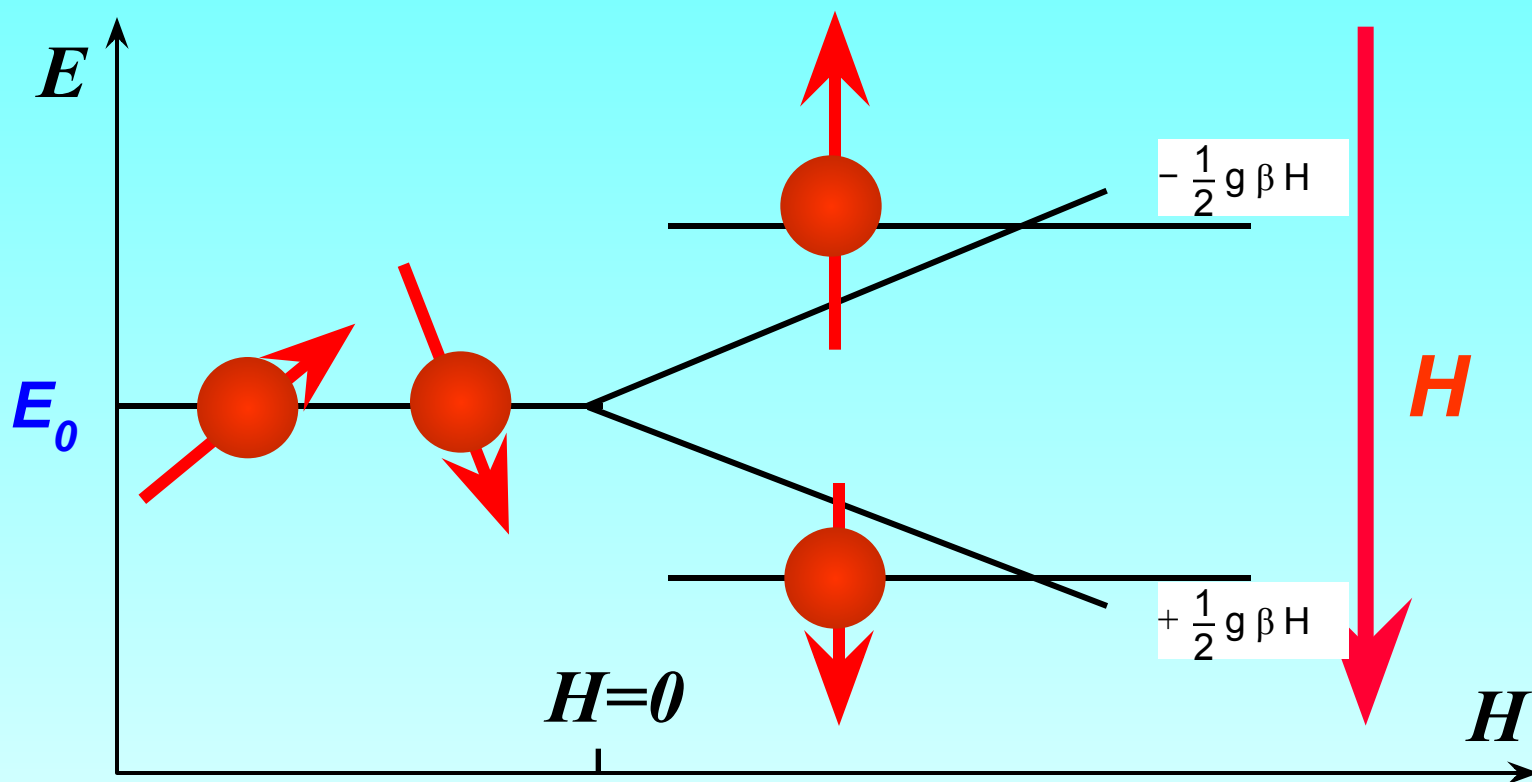
Магнитный момент электрона



В присутствии внешнего магнитного поля они могут быть ориентированы только двумя способами:

**по полю** или **против поля.**

# Расщепление энергетических уровней в магнитном поле (эффект Зеемана)



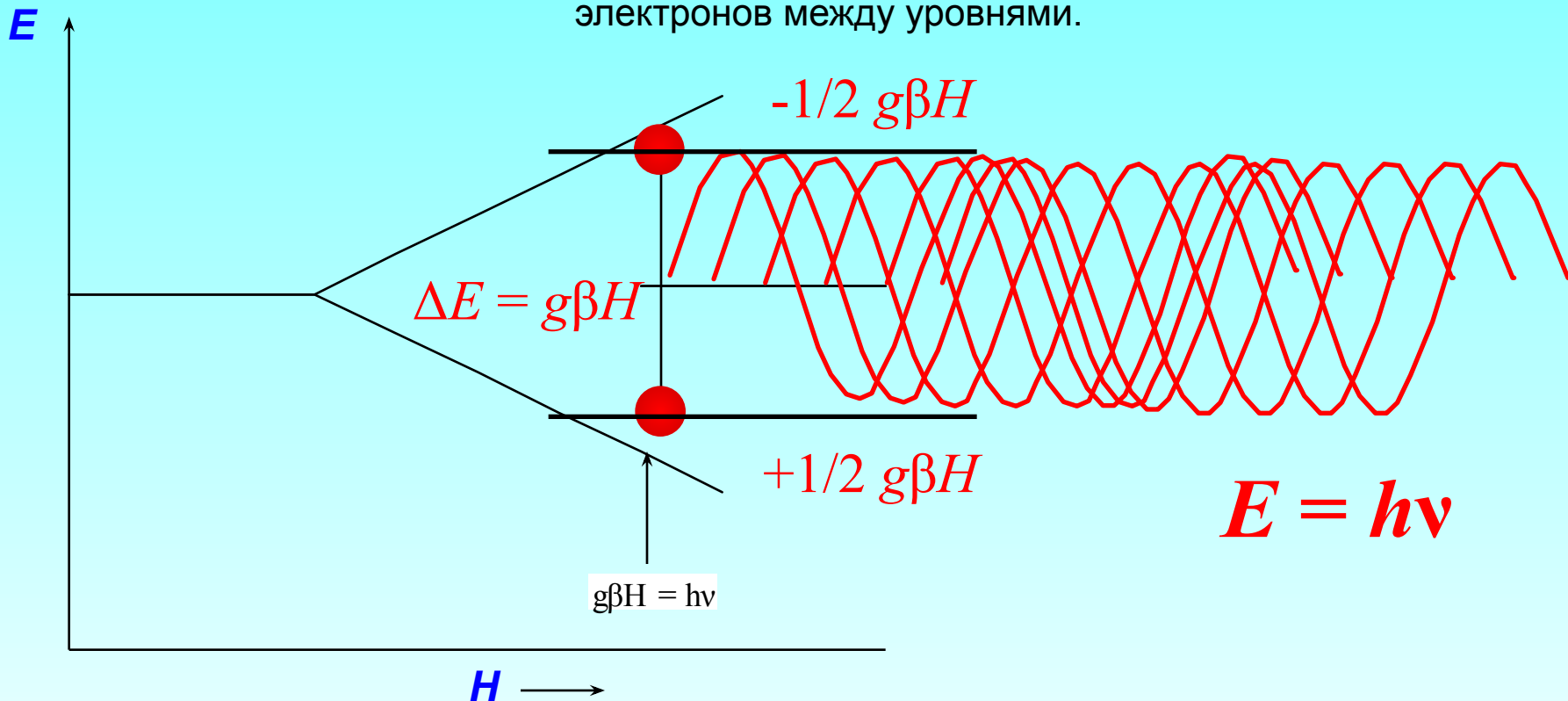
В отсутствие внешнего магнитного поля электроны ориентированы случайным образом и имеют практически одинаковую энергию ( $E_0$ )

При наложении магнитного поля магнитные моменты электронов ориентируются по полю или против поля. Их энергии изменяются, а энергетический уровень расщепляется на два.



# Поглощение электромагнитных волн (явление ЭТР)

Система, где электроны распределены между двумя энергетическими уровнями, может **поглощать электромагнитное излучение**. При определенных значениях величины энергии падающего кванта ( $h\nu$ ), будут происходить переходы электронов между уровнями.

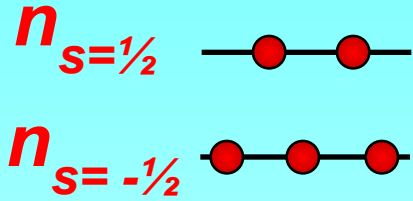


Поглощение будет происходить при условии равенства энергий поглощаемого кванта и энергии перехода между уровнями, т.е. когда

$$h\nu = g\beta H$$

Это выражение называется – основным уравнением резонанса

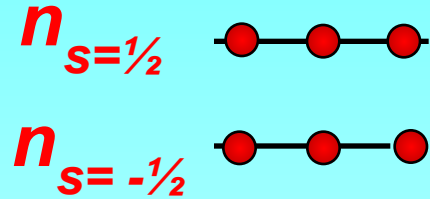
# Почему ЭПР можно наблюдать только у парамагнетиков?



парамагнетик

$n_{s=1/2}$  - число электронов с  $S=1/2$ .

$n_{s=-1/2}$  - число электронов с  $S=-1/2$ .



диамагнетик

Разность между числом электронов (*заселенностью*) на двух разных энергетических уровнях в парамагнетиках определяется уравнением Больцмана:

$$\frac{n_{s=1/2}}{n_{s=-1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{g\beta H}{kT}}$$

$$n_{s=-1/2}$$

$$\frac{n_{s=1/2}}{n_{s=-1/2}} \Big|_{H=0.3T} = 0.002; \Big|_{H=1T} = 0.05$$

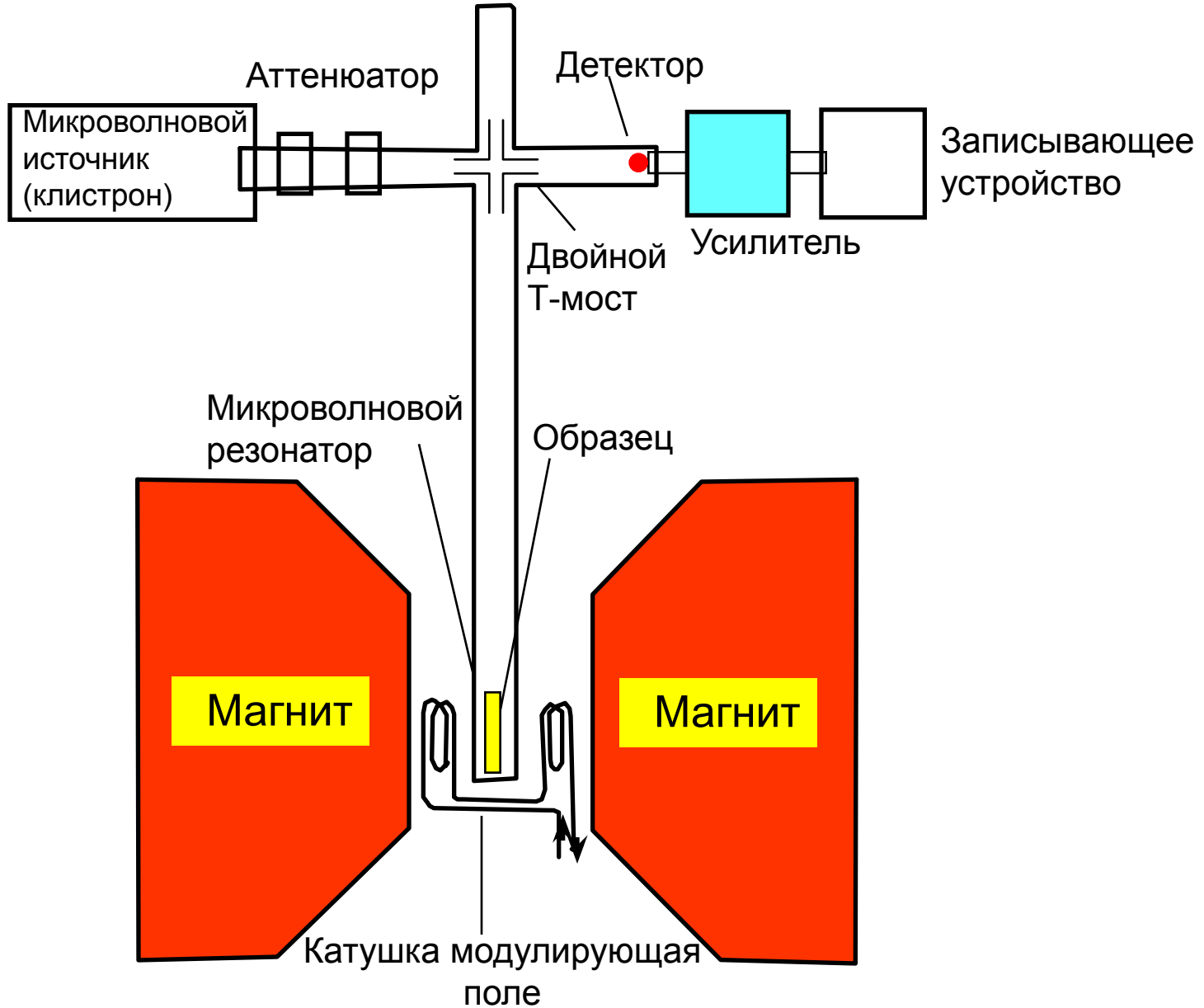
$$\frac{n_{s=1/2}}{n_{s=-1/2}} \Big|_{T=300K} = 0.002; \Big|_{T=4K} = 0.2$$

# *История открытия явления ЭПР*

Метод был открыт Евгением Константиновичем Завойским в Казанском Университете в 1944 году. Он заметил, что монокристалл  $\text{CuCl}_2$ , помещенный в постоянное магнитное поле **поглощает радиоволны в микроволновом диапазоне**.

Пионерами применения ЭПР в биологических исследованиях были Л.А. Блюменфельд и А.Э. Калмансон, которые в 1958 с помощью метода ЭПР обнаружили свободные радикалы полученные под действием ионизирующего излучения на белки.

# ЭПР спектрометр



# В Казанском ГУ



ЗДЕСЬ РАБОТАЛА ЛАБОРАТОРИЯ  
В КОТОРОЙ В 1944 ГОДУ  
ЕВГЕНИЕМ КОНСТАНТИНОВИЧЕМ  
ЗАВОЙСКИМ  
БЫЛО ОТКРЫТО ЯВЛЕНИЕ  
ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО  
РЕЗОНАНСА  
В ЛАБОРАТОРИИ  
ЕВГЕНИЙ КОНСТАНТИНОВИЧ  
ЗАВОЙСКИЙ  
ТОЧКА ЭЛЕКТРОННОЙ  
ПАРАМАГНИТ. РЕЗОНАНС ЭФФЕКТА  
АНТИ



**ОТЧЕТ**  
о научно-исследовательской работе по кафедре  
экспериментальной физики К.Т.У. за январь-июль 1941г.

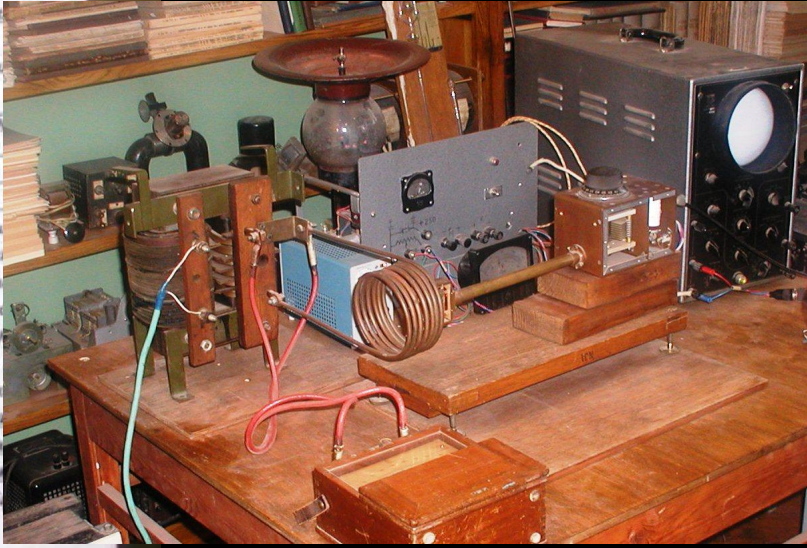
В конце 1-го квартала 1941 г. основные темы по разделу колебаний были изменены. Причиной этому послужили результаты работ Gorter'a, Rabi и др. по парамагнитной релаксации и определению магнитных моментов атомных ядер.

Научную попытку Gorter'a определить магнитные моменты атомных спинов мы объяснили чувствительностью прибора или калориметрической методики измерений. Цель в распоряжении более легкой методики (метод селективного тока), мы сделали попытку определить магнитные моменты цели оценки порядка чувствительности повторены и Gorter'a парамагнитной релаксации в некоторых других соединениях. Результаты этих измерений подтверждают, что чувствительность условия для измерения магнитных спинов ядер, если судить численно, проверены согласно теории Heitler'a и др.

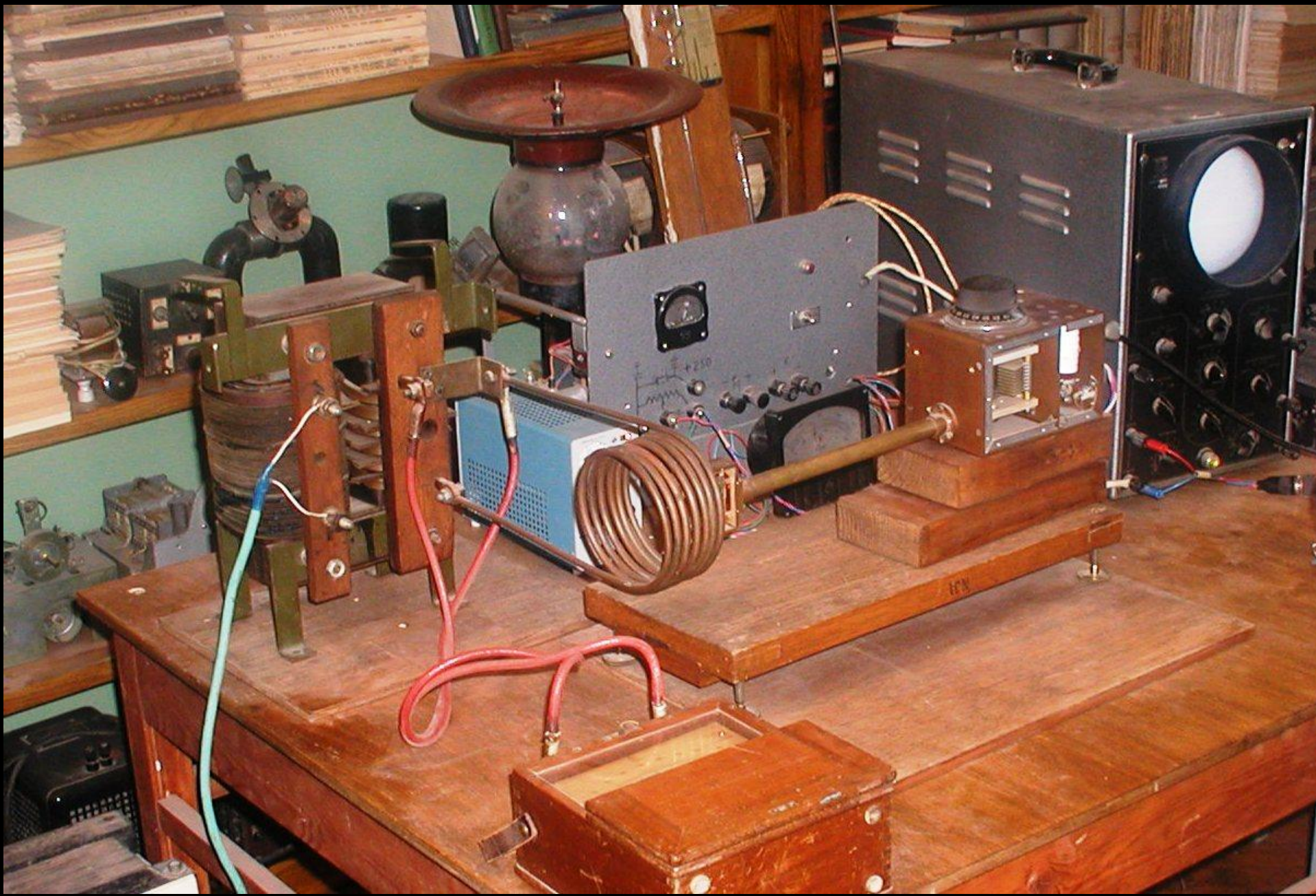
На основании этого все темы по разделу колебаний, исключая тему И.М. Рабиновича, были заменены на парамагнитной релаксации и определению атомных магнитных моментов. К разработке ее привлечены: Завойский, Алмазов, Савилов. В перспективе можно включить в этот раздел работы других работников кафедры...

19/VI.41г.

Завойский



# Прибор Завойского для измерения ЯМР и ЭПР



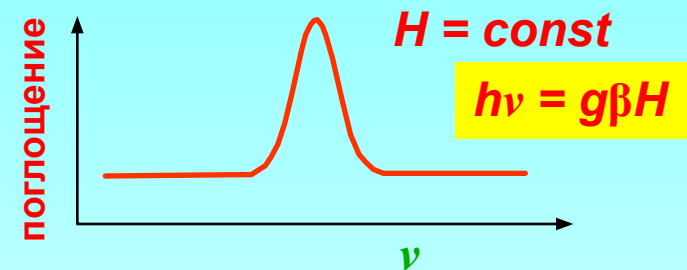
# Прибор Завойского для измерения ЭПР



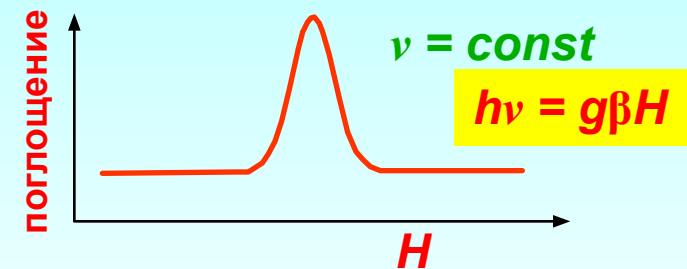
# Как получить сигнал ЭПР ?

Поглощение электромагнитных волн в радиоспектрометре ЭПР можно определять двумя способами:

**1** - При постоянном магнитном поле, мы можем **изменять частоту излучения**. Максимальное поглощение будет наблюдаться при резонансе, когда  $h\nu = g\beta H$ . При этом ожидаемый спектр будет таким:



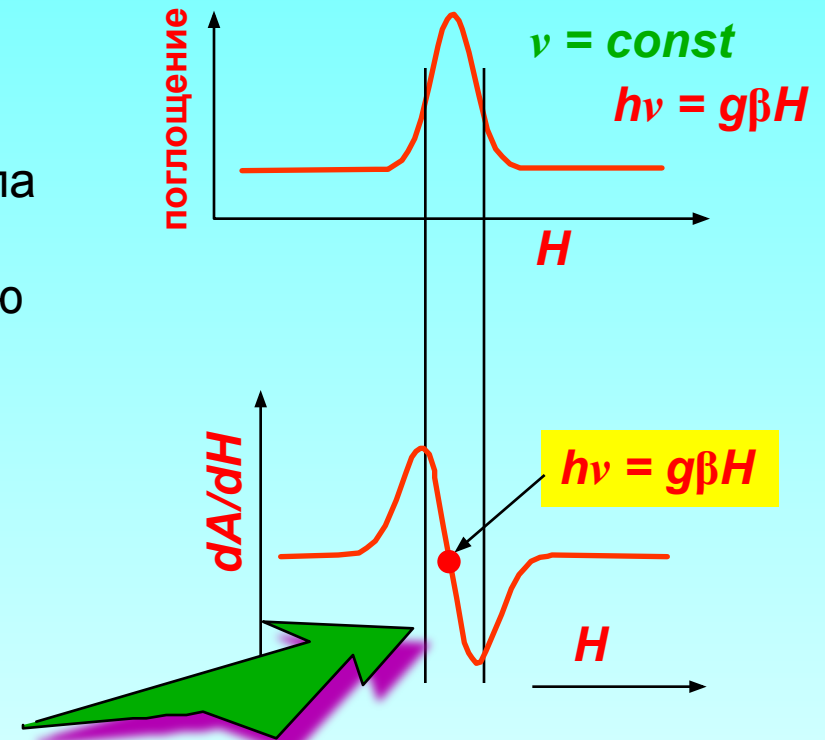
**2** - По техническим причинам мы поступаем по другому: мы используем микроволновое излучение при постоянной частоте волн и **изменяем магнитное поле**.





# Что такое сигнал ЭПР ?

Кроме того, в результате усиления сигнала ЭПР (путем его модуляции) мы получаем не поглощение  $A$ , а - первую производную поглощения по полю  $dA/dH$ .



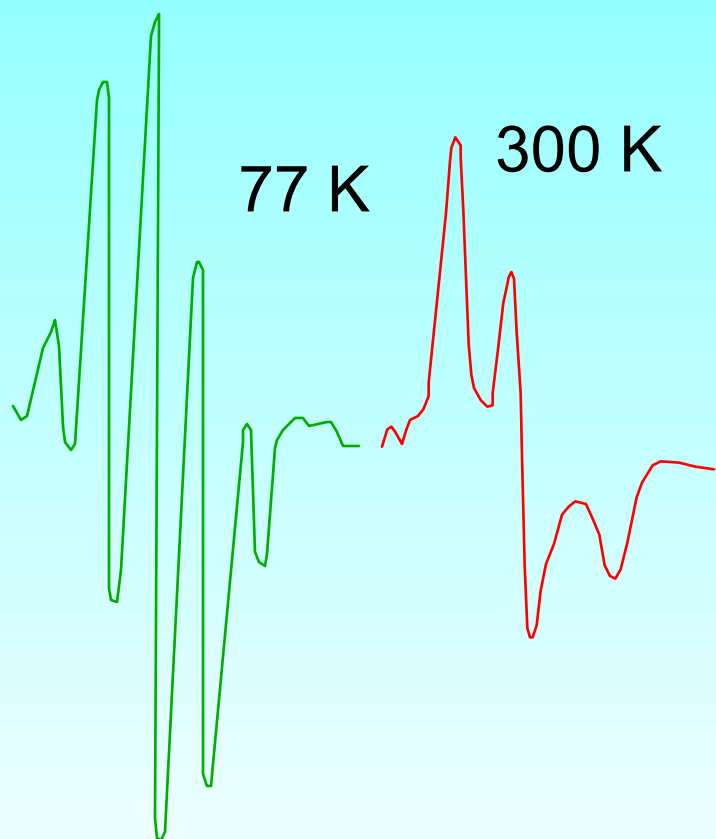
**Вот это мы называем сигналом ЭПР**

# Электронный Парамагнитный Резонанс

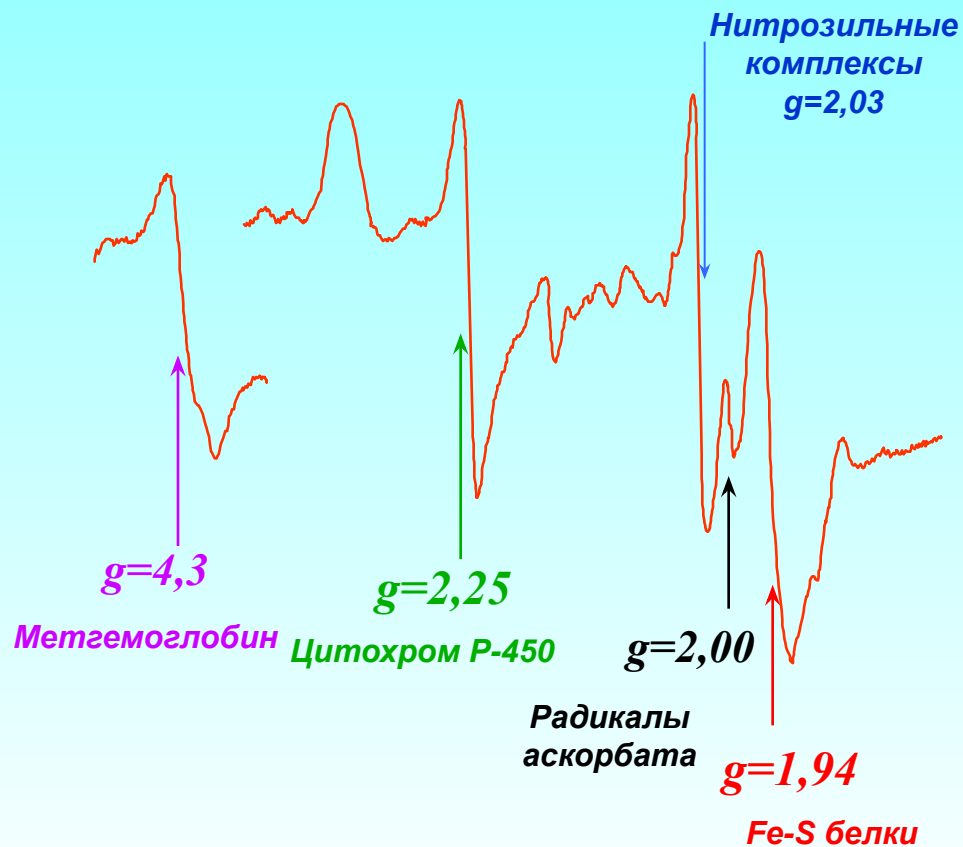
## Часть 2. Спектры ЭПР

# Примеры сигналов ЭПР

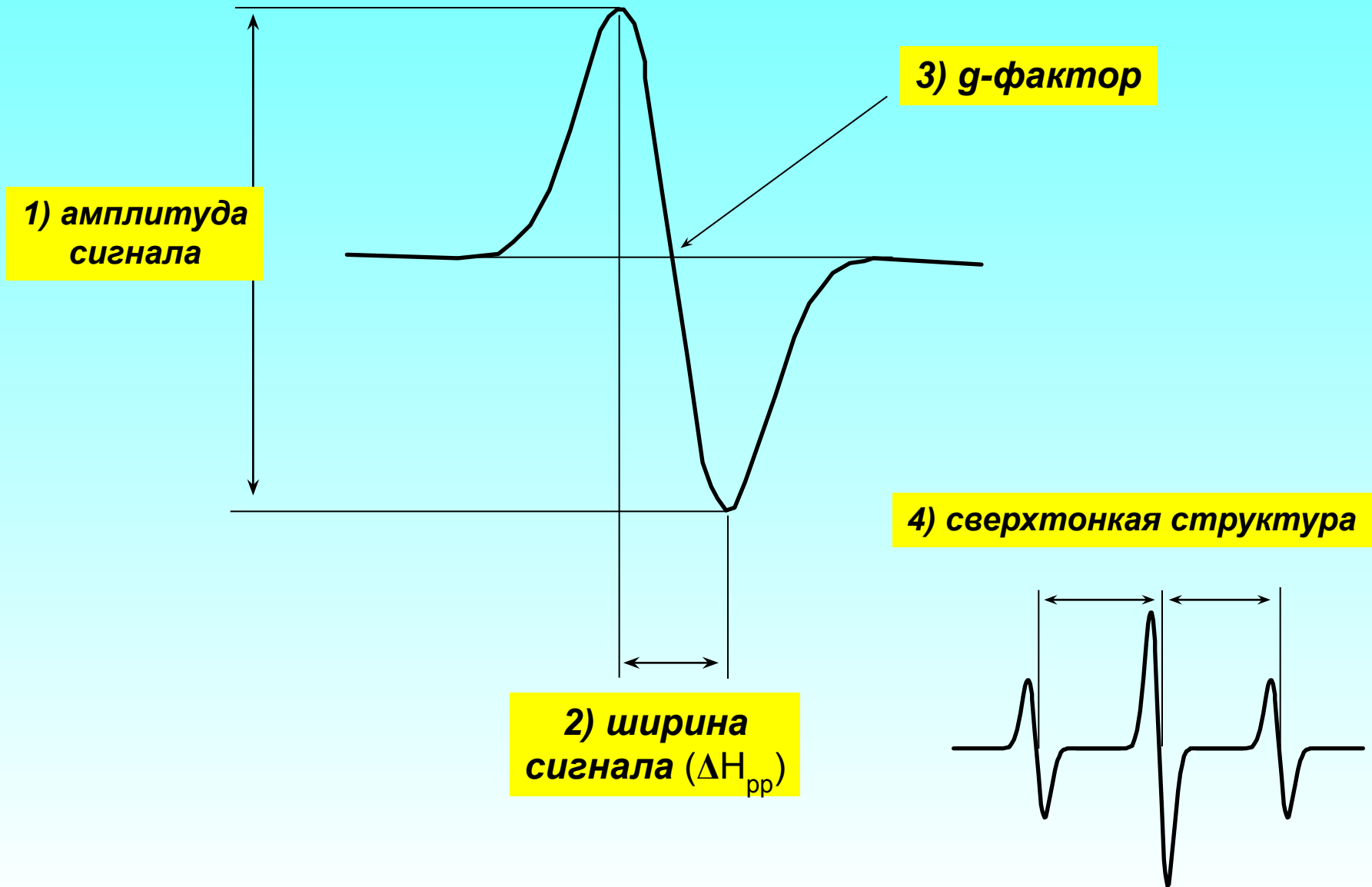
УФ облученный цистеин



Печень крысы при 77 K



# Основные характеристики сигнала ЭТР



# Амплитуда сигнала ЭПР

Амплитуда сигнала ЭПР зависит от количества поглощающих частиц и пропорциональна площади под кривой поглощения, т.е. второму интегралу от сигнала ЭПР.

$$S = k * \int_{-\infty}^{\infty} A * H * dH$$

где  $k$  - коэффициент зависящий от условий измерения.

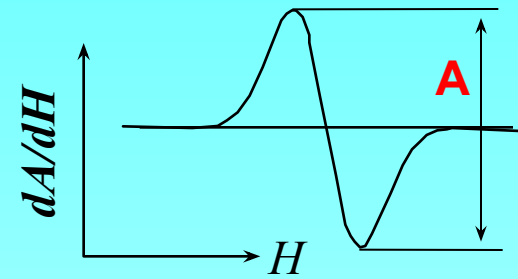
Площадь  $S$  под линией поглощения **прямо пропорциональна** концентрации парамагнитных частиц в измеряемом образце ( $C$ ).

$$C = k * S$$

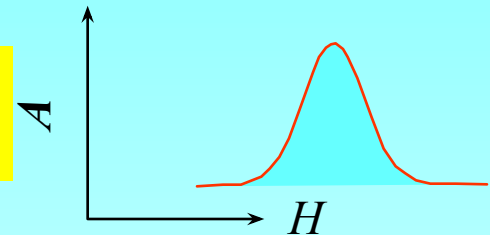
Практически получить значения  $S$  нетрудно. Существенно труднее найти величину  $k$ . Поэтому на практике при вычислении  $C$  обычно пользуются сравнением площади измеряемого образца  $S$  (концентрацию которого надо найти) с площадью эталонного образца  $S_e$  (концентрация  $C_e$  которого известна).

$$C = C_s (S / S_s)$$

сигнал ЭПР



кривая поглощения



площадь под кривой поглощения



Второй интеграл-это площадь ( $S$ ) под кривой поглощения (т.е. это число)

# Ширина сигнала ЭПР

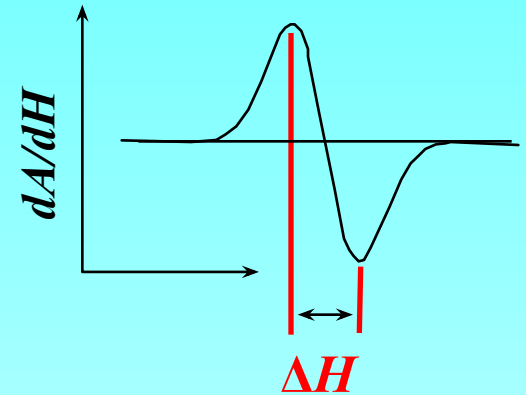
Ширина сигнала ЭПР определяется взаимодействием магнитных моментов электрона с окружением.

Теоретически минимальная ширина линии следует из соотношения неопределенностей Гейзенберга:

$$\Delta E \geq \frac{h}{2\pi} * \frac{1}{\Delta t}$$

где  $\Delta t$  - время измерения и  $\Delta E$  - неопределенность энергии системы.

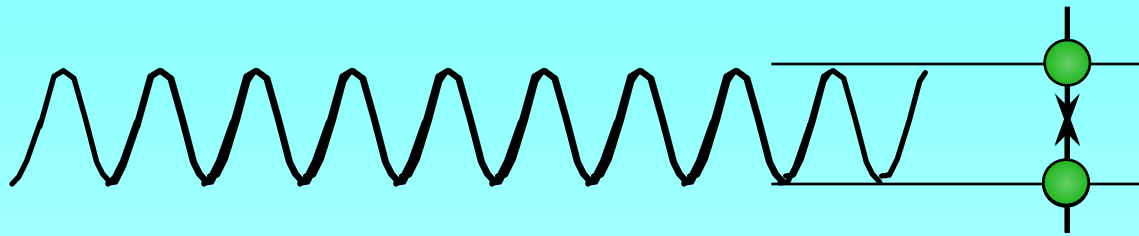
Рассматриваемый процесс - это поглощение электромагнитного кванта, такое, что  $\Delta t$  может быть интерпретировано как время нахождения электрона на верхнем энергетическом уровне (время релаксации  $T$ ), а  $\Delta E$  как энергия системы в нашем случае  $= g\beta H$ , отсюда



$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{1}{T}$$

# Время релаксации

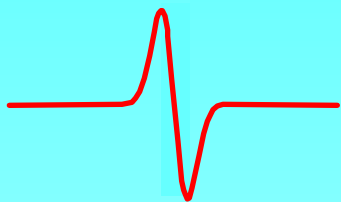
Релаксация - процесс восстановления заселенности энергетических уровней после поглощения кванта электромагнитного излучения.



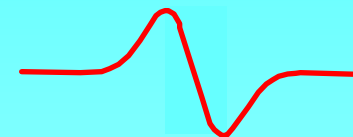
Процесс релаксации характеризуется временем релаксации. Время релаксации (т.е. время нахождения электрона в состоянии с большей энергией) зависит от двух процессов: *спин-решеточной* и *спин-спиновой релаксации*.

**Спин-решеточная релаксация ( $T_1$ )** обусловлена взаимодействием магнитного момента электрона с решеткой (т.е. средой в которой находятся парамагнитные частицы).

**Спин-спиновая релаксация ( $T_2$ )** Обусловлена взаимодействием— с другими парамагнитными частицами (т.е. спинами)



$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{1}{T}$$



Большое  $T$   
Малое  $\Delta H$

Малое  $T$   
Большое  $\Delta H$

Зависимость суммарного времени релаксации ( $T$ ) от  $T_1$  и  $T_2$  выражается формулой:

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2} = \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2}$$

Тогда выражение для ширины сигнала ЭПР будет выглядеть так:

$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2}$$

Комплексы металлов -  $T_1=1$  нс  $\Delta H=10$  мТ  
Свободные радикалы -  $T_1=0,1$  мс  $\Delta H=100$  мкТ

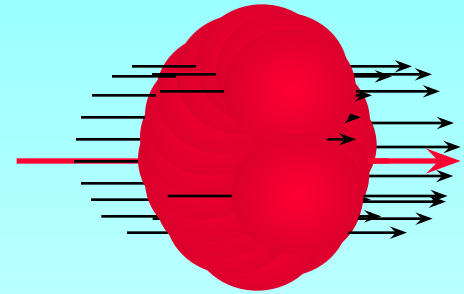


# Механизмы уширения сигнала ЭПР :

1. Взаимодействие магнитных моментов двух парамагнитных частиц (радикалов или ионов) приводит к уширению по диполь-дипольному механизму

$$\Delta H = \frac{\mu}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

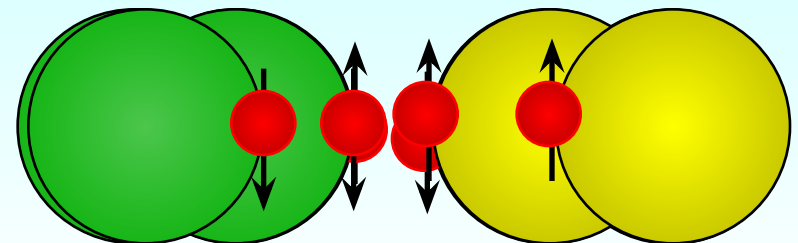
2. Взаимодействие спинового магнитного момента электрона с орбитальным магнитным моментом электрона приводит к уширению сигнала в результате анизотропии g-фактора



3. Взаимное превращение форм радикала вызывает динамическое уширение сигнала



4. Соударение радикала с другим радикалом или парамагнитным ионом лежит в основе уширения за счет спинового обмена



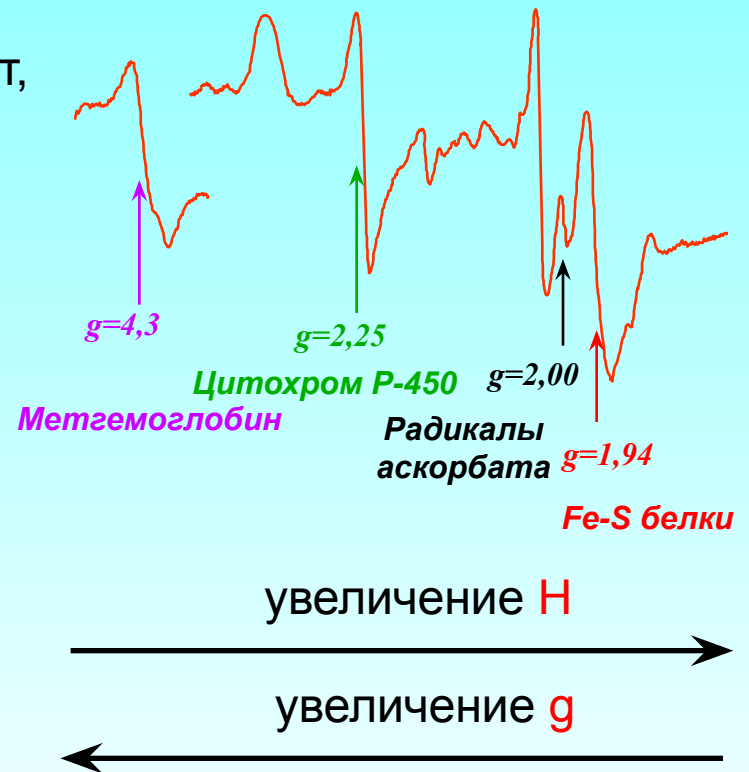
# g-фактор

**g-фактор** сигнала ЭПР - это не только параметр, отражающий **вклад орбитального и спинового моментов** в суммарный магнитный момент, но и характеристика, показывающая **положение сигнала ЭПР во всем диапазоне магнитного поля**.

Из основного уравнения резонанса следует, что

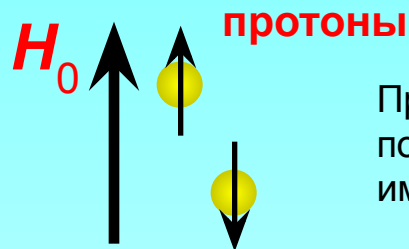
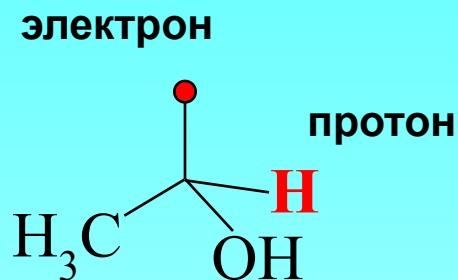
$$g * H = \frac{h\nu}{\beta} = const \quad \text{при } \nu = const$$

Следовательно, при увеличении  $H$  происходит снижение  $g$ , и наоборот. Однако, величину  $H$  нельзя считать характеристикой сигнала ЭПР, т.к. при изменении  $\nu$  резонанс будет происходить уже при других значениях  $H$ . Величина  $g$  не изменяется при изменении  $H$  (т.е. она инвариантна от метода измерения), и поэтому **g-фактор** - характеристика сигнала ЭПР.



# Сверхтонкое взаимодействие

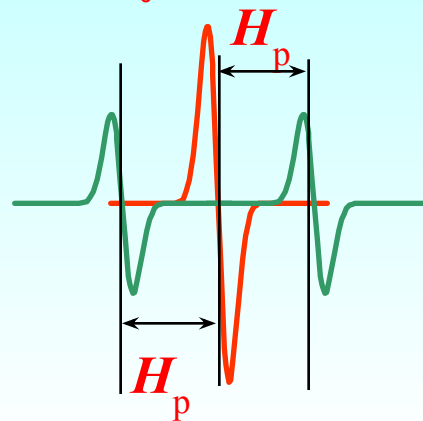
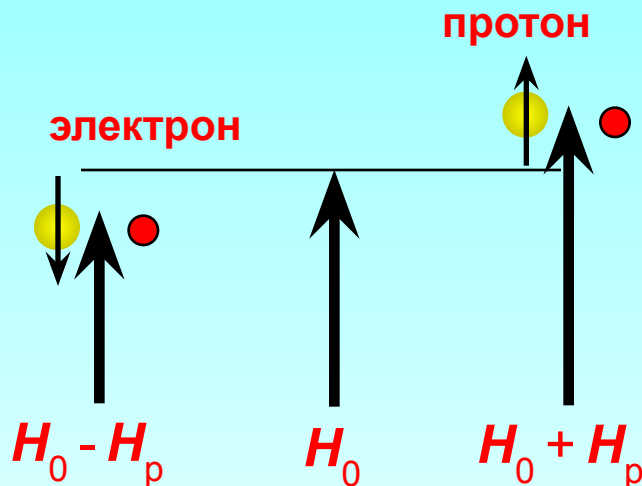
Взаимодействие магнитного момента неспаренного электрона с магнитным моментом ядра соседнего атома (например, H или N) называется **сверхтонким взаимодействием** и приводит к появлению сверхтонкой структуры сигнала ЭПР



Протон имеет магнитный момент который ориентирован во внешнем магнитном поле ( $H_0$ ) в двух направлениях (вдоль и поперек поля) т.к. подобно электрону, имеет спиновое число  $S = \pm 1/2$ .

Магнитный момент протона создает магнитное поле ( $+H_p$  или  $-H_p$ , зависящее от ориентации протона), которое складывается с внешним магнитным полем ( $H_0$ ).

Отсюда следует, что суммарная величина поля, приложенного к неспаренному, электрону будет немного больше ( $H_0 + H_p$ ) (если спин протона =  $1/2$ ) или немного меньше ( $H_0 - H_p$ ), чем в отсутствие протона ( $H_0$ ) (если спин протона =  $-1/2$ ).



В результате такого взаимодействия, сигнал ЭПР (который бы в отсутствие протона состоял из одной линии) будет состоять из двух линий

Расстояние между линиями будет зависеть от величины магнитного поля создаваемого протоном в месте нахождения неспаренного электрона, которое в свою очередь зависит от расстояния между электроном и протоном

$$H = \frac{\mu}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

# Сверхтонкая структура

Неспаренный электрон в радикале может быть расположен близко к **двум** протонам, как в радикале

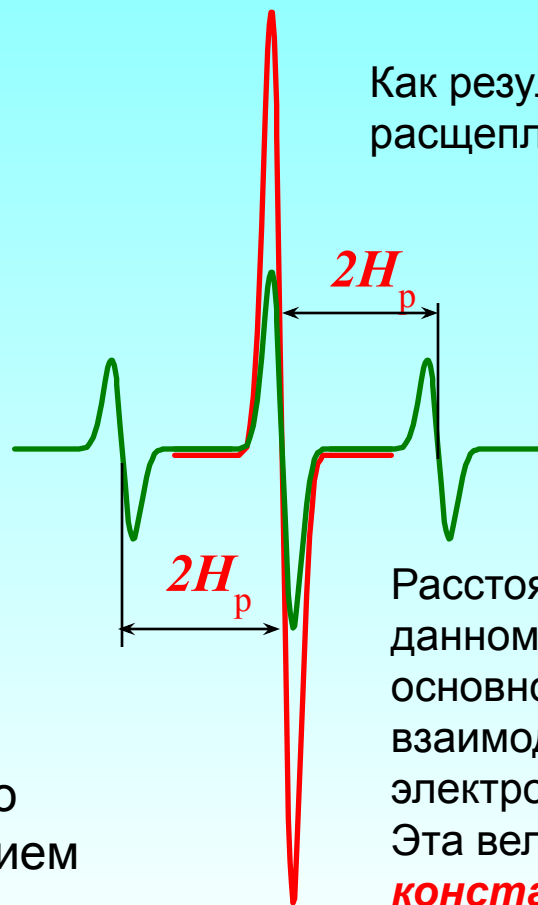
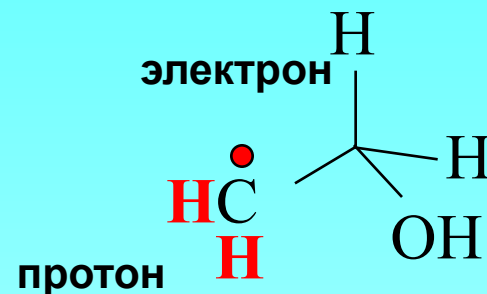
этанола ( $\cdot\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ )

Магнитное поле вокруг неспаренного электрона теперь может иметь следующие значения:

$$\begin{array}{l} H_0 + H_{p1} + H_{p2} = H_0 + 2H_p \\ H_0 + H_{p1} - H_{p2} = H_0 \\ H_0 - H_{p1} + H_{p2} = H_0 \\ H_0 - H_{p1} - H_{p2} = H_0 - 2H_p \end{array}$$

Состояние  $H=H_0$  реализуется **двумя способами** (а  $H=H_0+2H_p$  или  $H=H_0-2H_p$  только одним), следовательно вероятность этого состояния (и интенсивность сигнала) будут вдвое больше.

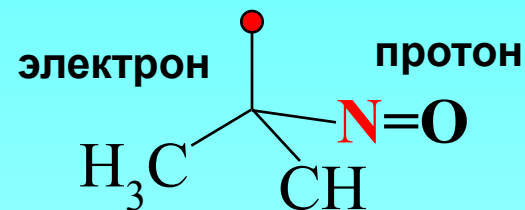
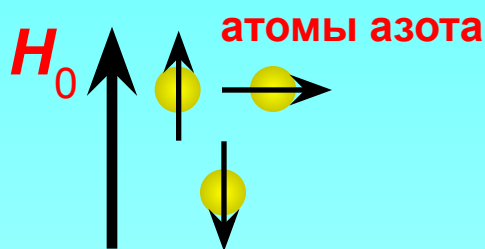
В конечном итоге вместо одного сигнала будет три с соотношением интенсивностей **1:2:1**



Как результат, сигнал ЭПР радикала расщепляется на **3** линии

Расстояние между линиями (в данном случае  $2H_p$ ) является основной характеристикой взаимодействия неспаренного электрона с магнитным ядром. Эта величина называется, также, **константой сверхтонкого взаимодействия**.

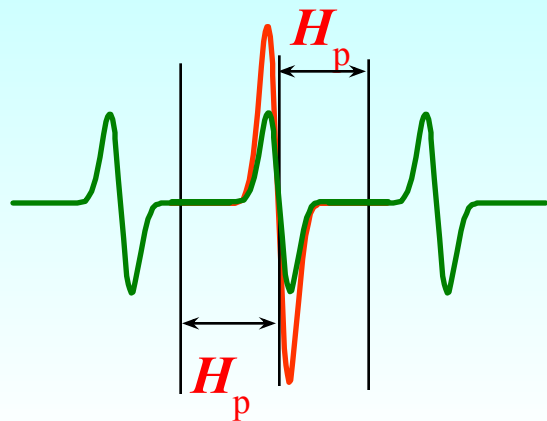
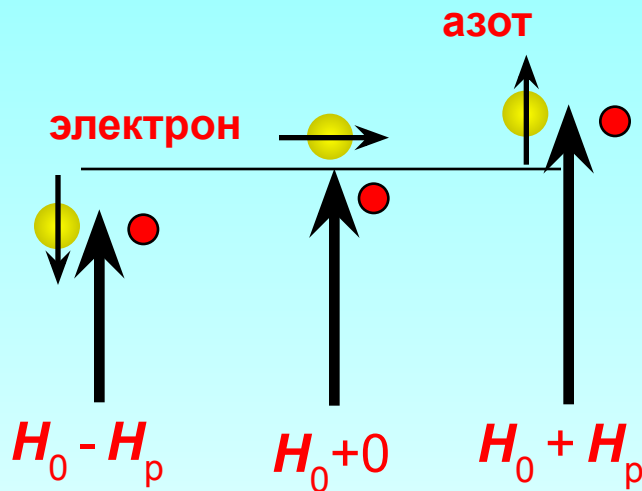
# Сверхтонкое взаимодействие (продолжение)



Атом азота имеет магнитный момент который ориентирован во внешнем магнитном поле ( $H_0$ ) в трех направлениях (вдоль поля, против поля и «поперек» поля) имеет спиновое число  $S = \pm 1$  и  $0$ .

Магнитный момент азота создает магнитное поле ( $+H_p$  или  $-H_p$ , и  $H=0$ ), которое складывается с внешним магнитным полем ( $H_0$ ).

Отсюда следует, что суммарная величина поля, приложенного к неспаренному, электрону будет немного больше ( $H_0 + H_p$ ) (если спин азота= $1$ ) или немного меньше ( $H_0 - H_p$ ), чем в отсутствии азота ( $H_0$ ) (если спин азота= $-1$ ), либо не изменяется, если спин  $=0$ .



В результате такого взаимодействия, сигнал ЭПР (который бы в отсутствии протона состоял из одной линии) будет состоять из трех линий

$$H = \frac{\mu}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

# Электронный Парамагнитный Резонанс

**Часть 3. Практическое применение  
в медико-биологических  
исследованиях**

# Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

- 1. естественные сигналы ЭПР**
- 2. метод спиновых меток и зондов**
- 3. метод спиновых ловушек**

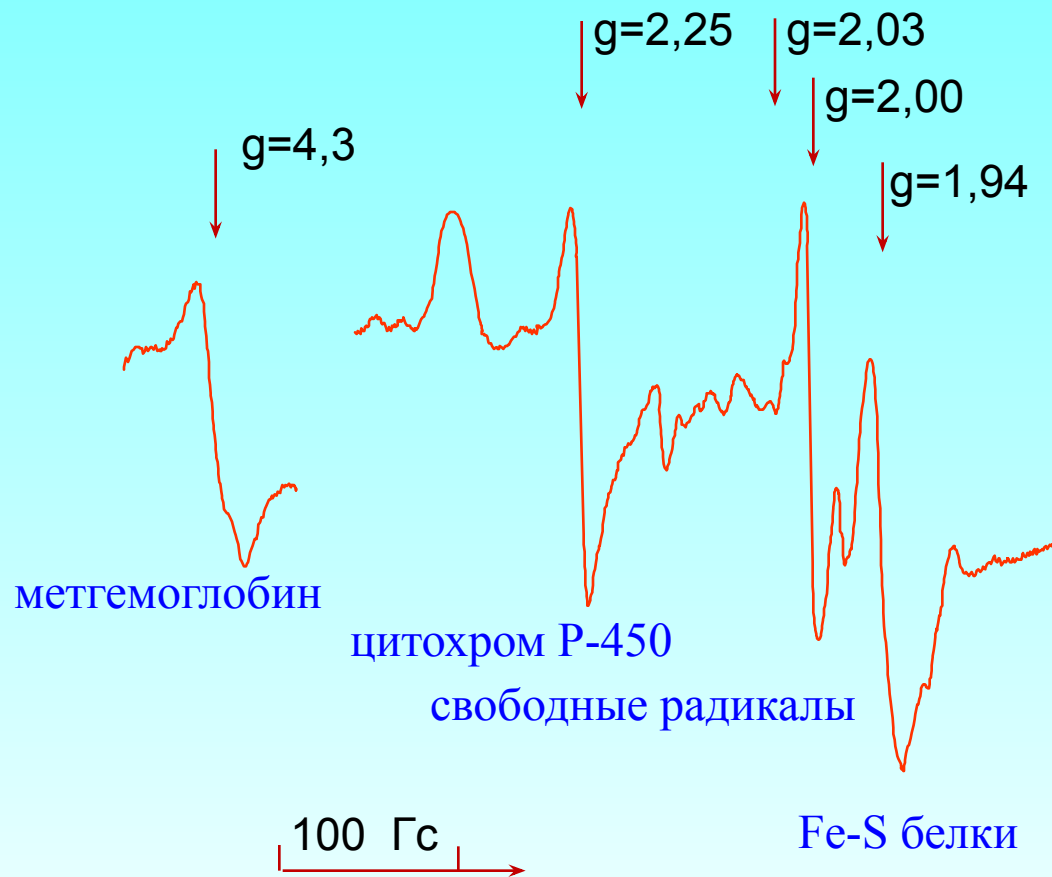
# Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

- 1. естественные сигналы ЭПР**
- 2. метод спиновых меток и зондов**
- 3. метод спиновых ловушек**

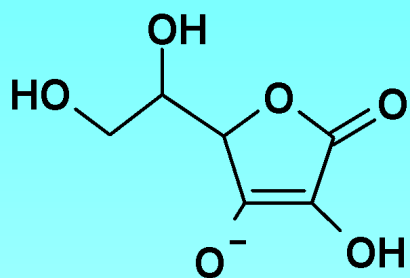


# Спектр ЭПР печени крысы

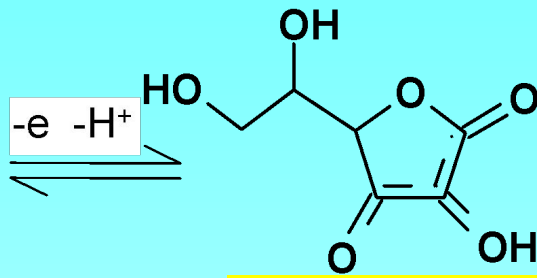
Если взглянуть на спектр ЭПР, например, печени крысы, то можно увидеть сигналы цитохрома P-450, сигнал метгемоглобина и сигнал свободных радикалов, принадлежащий семихинонным радикалам аскорбиновой кислоты и флавинов. Благодаря коротким временам релаксации сигналы ЭПР металлопротеинов можно наблюдать только при низкой температуре, например, температуре жидкого азота (77 К).



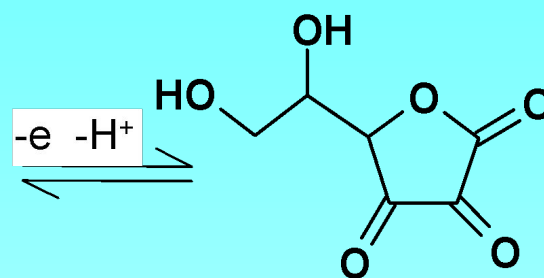
# Радикал аскорбата



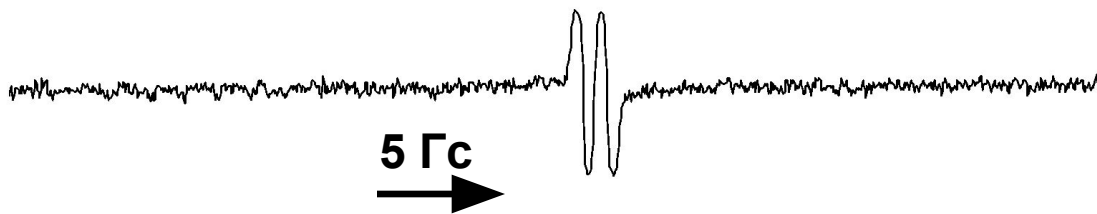
аскорбат



радикал аскорбата



дегидроаскорбат



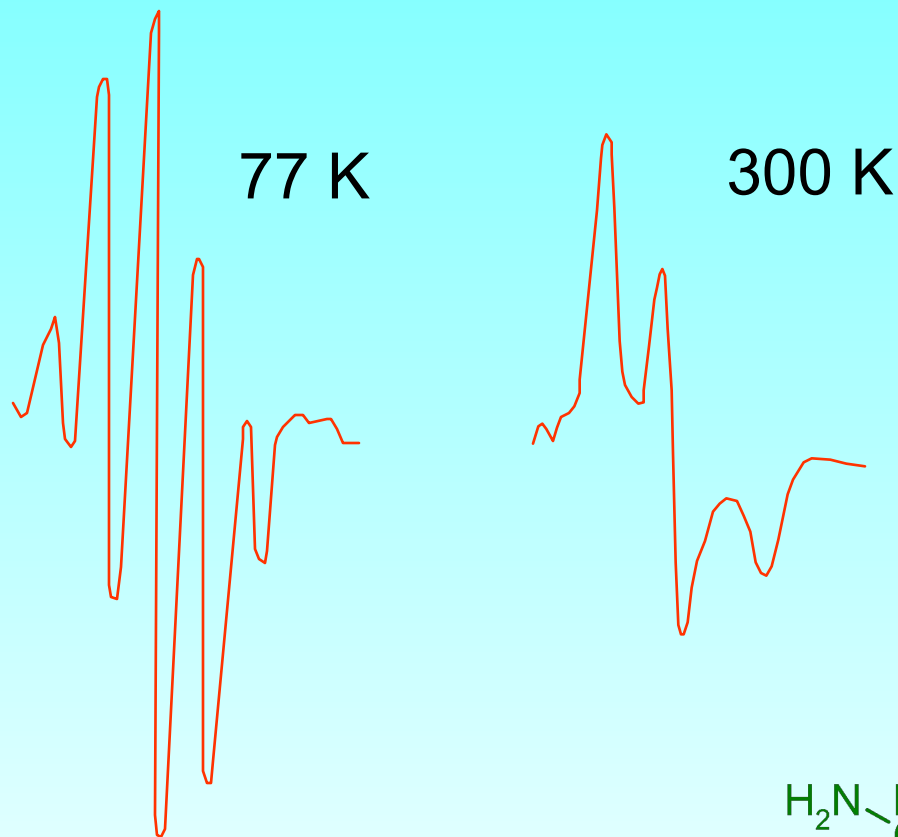
+ пероксидаза



Сигнал ЭПР радикала аскорбата можно наблюдать непосредственно в крови или плазме.

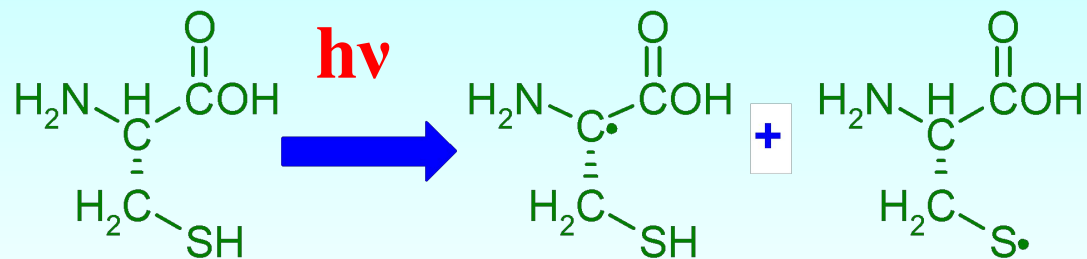
Добавление пероксидазы приводит к увеличению сигнала ЭПР и последующему его исчезновению. Длительность кинетики пропорциональна концентрации аскорбата в крови.

# Естественные сигналы ЭПР, наблюдаемые в биологических системах



Повысить концентрацию свободных радикалов, для избежания трудностей при их изучении, можно затормозив их гибель и повысив скорость их образования. Это можно сделать путем облучения (УФ или ионизирующей радиацией) биологических объектов находящихся при низкой температуре.

Спектр ЭПР облученного УФ  
светом цистеина



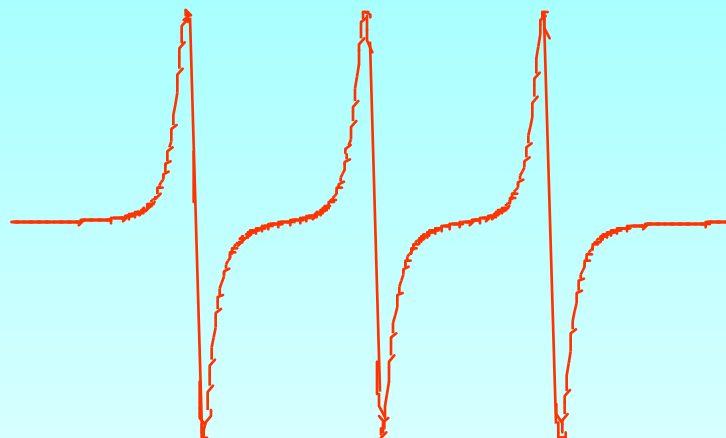
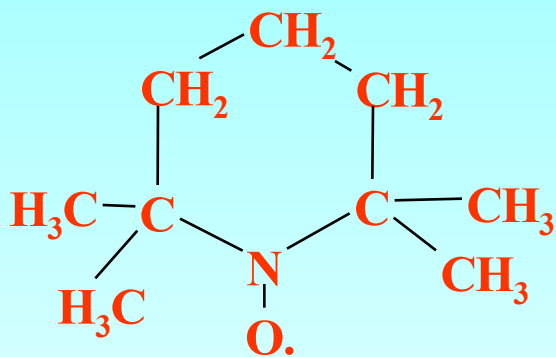


# Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

1. **естественные сигналы ЭПР**
2. **метод спиновых меток и зондов**
3. **метод спиновых ловушек**

# Метод спиновых зондов

Спектр ЭПР нитроксильных радикалов состоит, в простейшем случае, из трех линий равной интенсивности, благодаря взаимодействию неспаренного электрона с ядром атома азота, имеющим целочисленный спин, равный  $\pm 1$  или  $0$ .



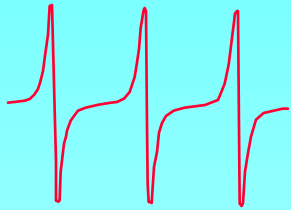
Формула и спектр ЭПР нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО).

# Спектр ЭПР ТЕМПО при разных $\tau_c$

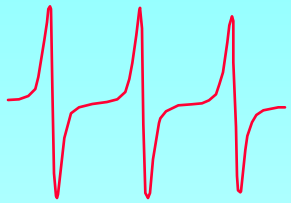
Время

корреляции  $\tau_c$

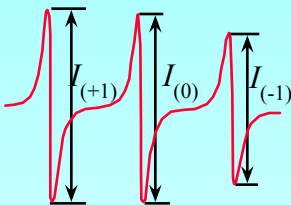
$3 \cdot 10^{-12}$  s



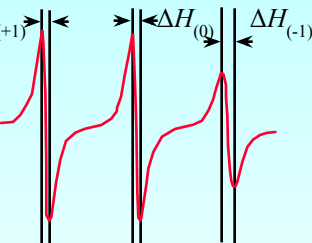
$3 \cdot 10^{-11}$  s



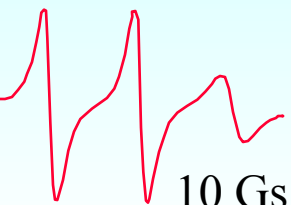
$1 \cdot 10^{-10}$  s



$3 \cdot 10^{-10}$  s



$1 \cdot 10^{-9}$  s



Если нитроксильный радикал находится в водном растворе, то его вращение является изотропным и достаточно быстрым. Это движение можно охарактеризовать временем корреляции ( $\tau_c$ ):

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

где  $\Delta H_{+1}$  - ширина низкопольной компоненты

$I_{+1}$  - амплитуда низкопольной компоненты

$I_{-1}$  - амплитуда высокопольной компоненты

При уменьшении скорости вращения проявляются анизотропные взаимодействия, которые приводят к уширению линий и соответственно изменению амплитуд компонент спектра, а затем и к сдвигу крайних компонент.

# Время корреляции нитроксильного радикала непосредственно связано с микровязкостью среды

Используя уравнение Стокса-Эйнштейна можно определить значение вязкости в соответствующей макроскопической системе

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

где  $R$  - эффективный радиус нитроксильного радикала.

$T$  – абсолютная температура

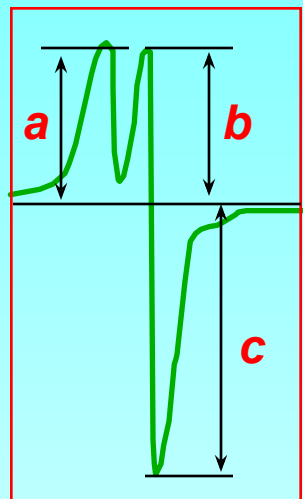
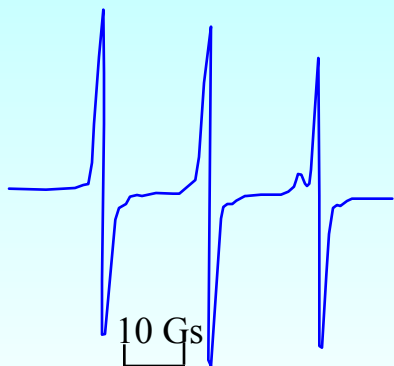
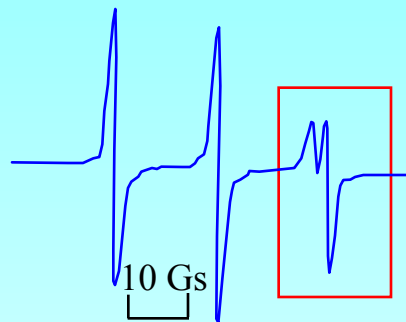
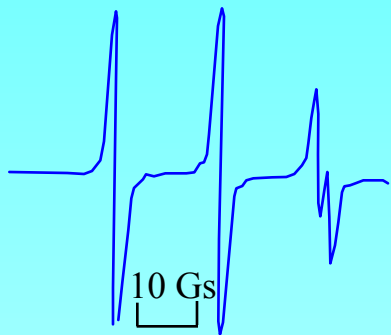
$\tau$  - время корреляции

$\eta$  - вязкость

Из уравнения видно, что используя нитроксильный радикал в качестве зонда, можно определить микровязкость среды, в которой находится радикал. В биологических исследованиях этот прием широко используется для измерения микровязкости биологических мембран.



# Параметр гидрофобности $f$

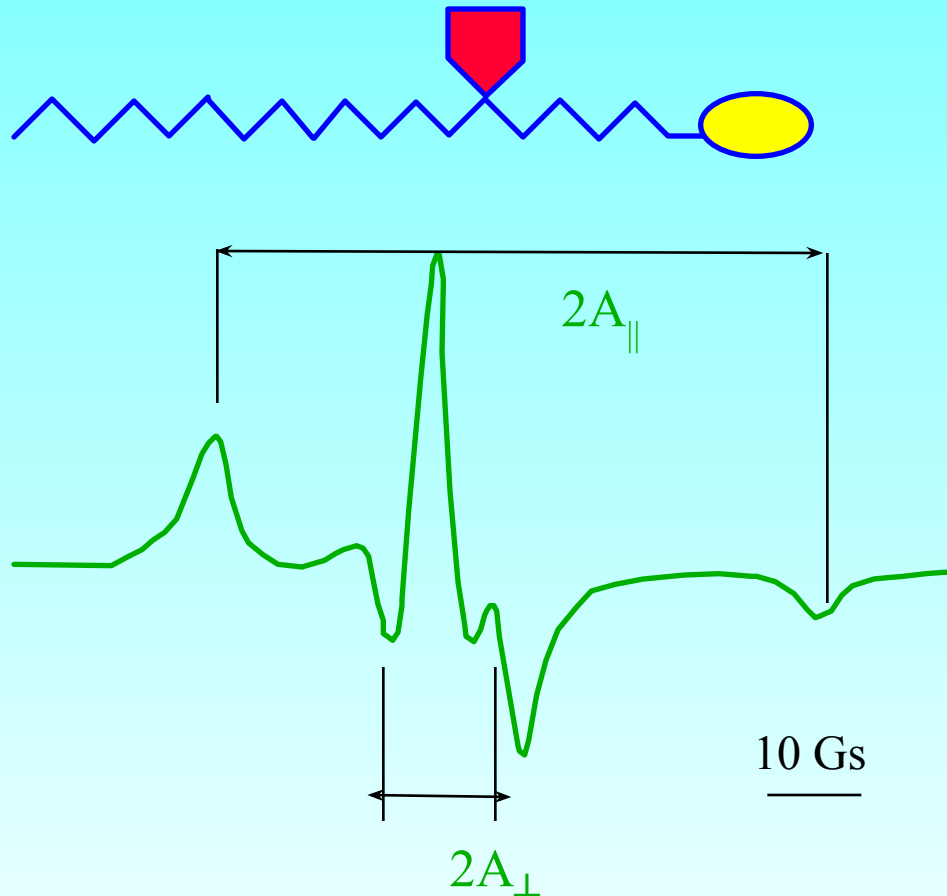


$$f = \frac{a}{a+b}$$

$$f = \frac{a}{c}$$

Представленные спектры ЭПР отражают поведение зонда ТЕМПО в средах с различной гидрофобностью. Определив отношения  $a / (a + b)$  или  $(a / c)$  в этом спектре, можно посчитать параметр гидрофобности  $f$ , показывающий сколько и в какой фракции мембраны содержится зонда. Параметр  $f$  удобен при изучении процессов перекисного окисления в мембранах.

# Спектр ЭПР спинового зонда 5-доксил стеарата в мембране эритроцита



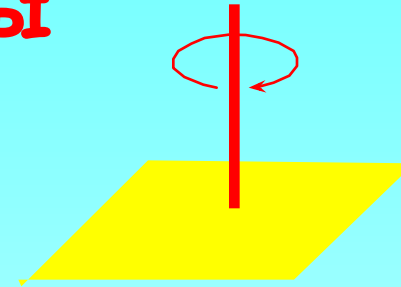
При анизотропном вращении стеариновой кислоты вокруг длинной оси сигнал ЭПР будет сильно зависеть от степени анизотропии вращения, который количественно характеризуется так называемым параметром упорядоченности **S**

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{\parallel} + 2A_{\perp}} * 1,66$$

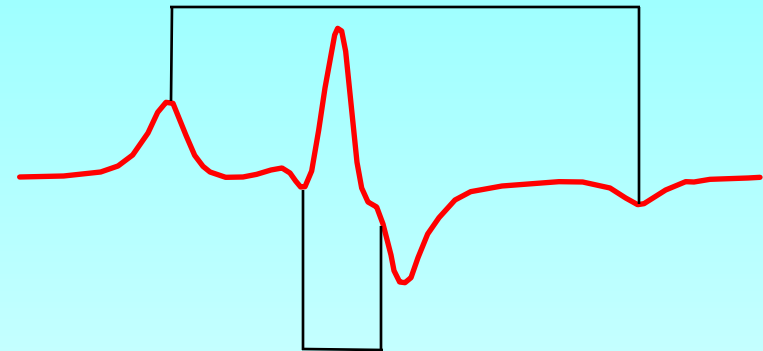
Определить параметр упорядоченности **S**, можно измерив константы сверхтонкого расщепления –  $A_{\parallel}$  и  $A_{\perp}$  и подставив их значения в формулу

# Параметр упорядоченности и вязкость мембраны

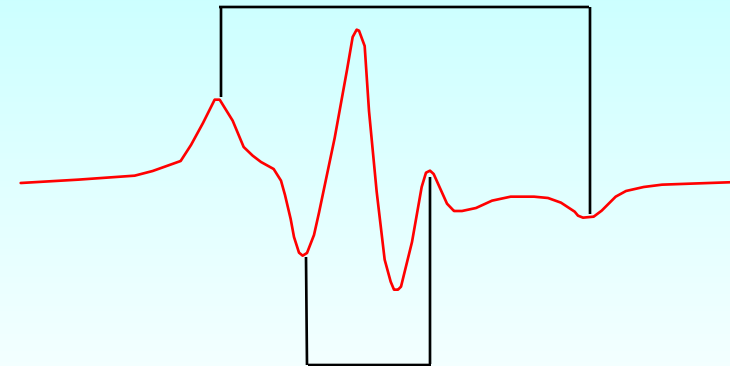
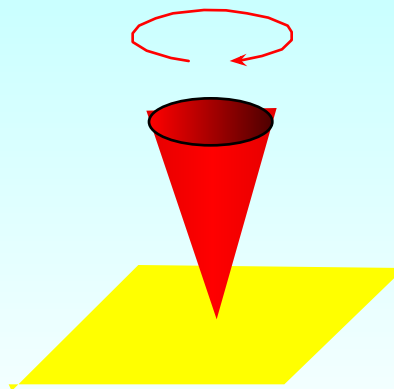
Параметр упорядоченности **S** равен 1, если вращение зонда происходит только вокруг нормали к плоскости мембраны.



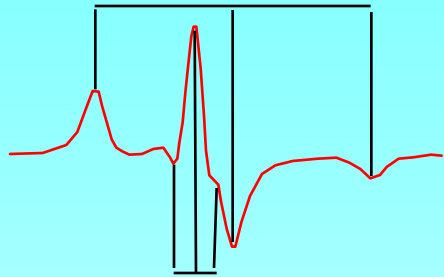
В «замороженных» мембранах, где липиды находятся в кристаллическом состоянии параметр упорядоченности **S** близок к 1.



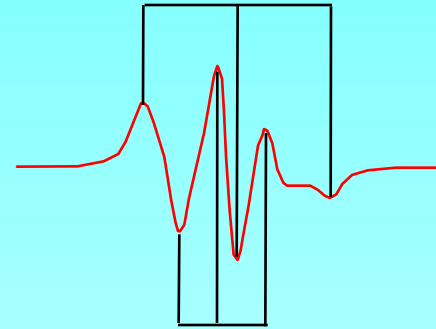
В «жидких» мембранах отклонение конуса вращения возрастает и **S** снижается, что вызывает изменения в спектре ЭПР.



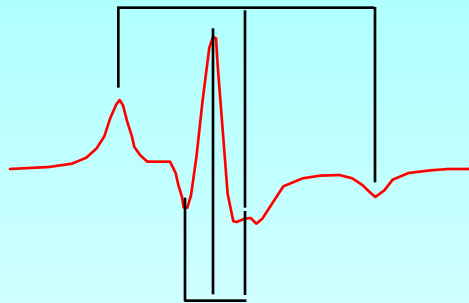
# Изменения сигнала ЭТР при уменьшении $S$ и возрастании угла отклонения конуса вращения $\gamma$



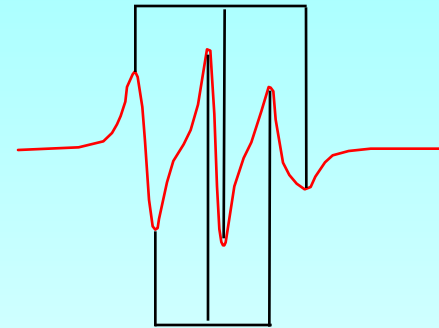
$S=1.0; \gamma=0^\circ$



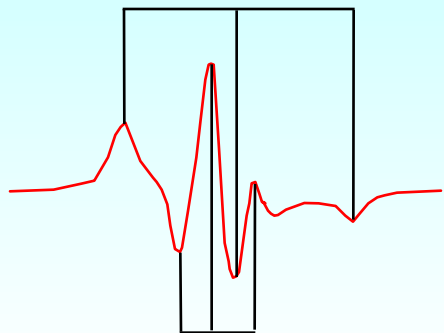
$S=0.4; \gamma=58.3^\circ$



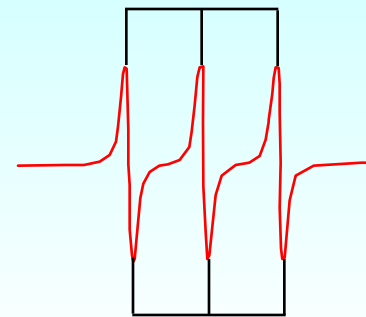
$S=0.8; \gamma=30.7^\circ$



$S=0.2; \gamma=72.2^\circ$

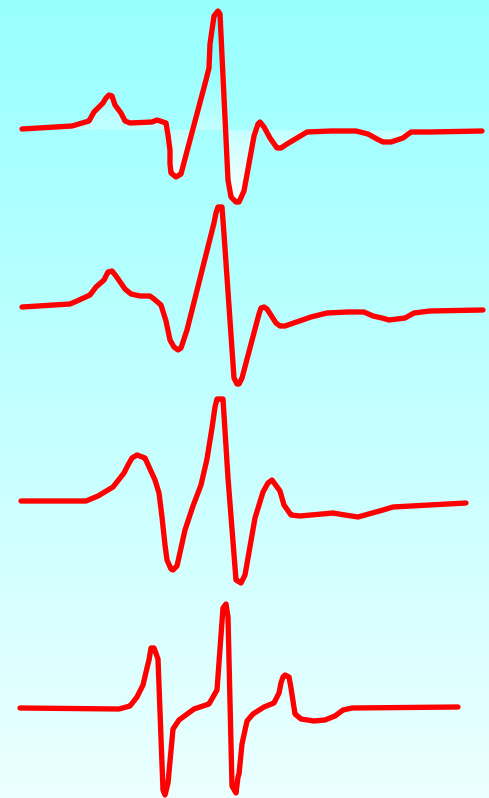
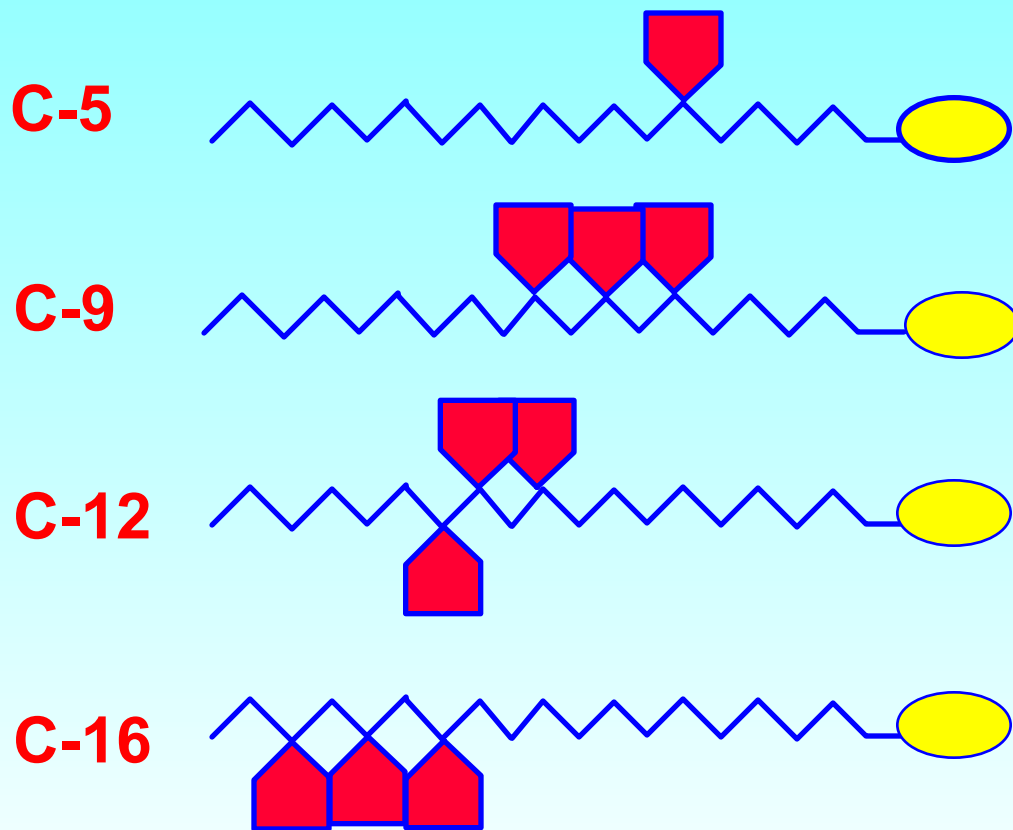


$S=0.6; \gamma=45.2^\circ$

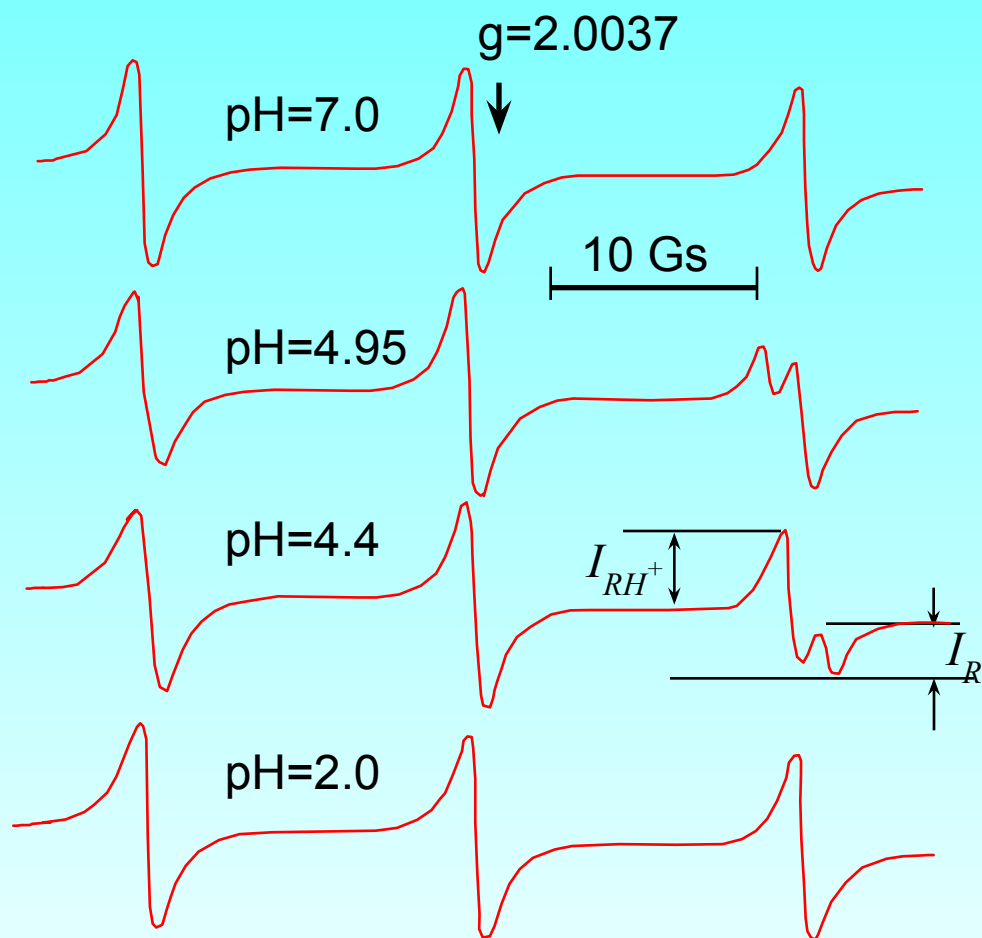


$S=0; \gamma=90^\circ$

# Изменения сигнала ЭПР при удалении нитроксильного радикала от полярной карбоксильной группы жирной кислоты



# Спектр ЭПР рН чувствительного зонда (pK=4,7) при разных рН



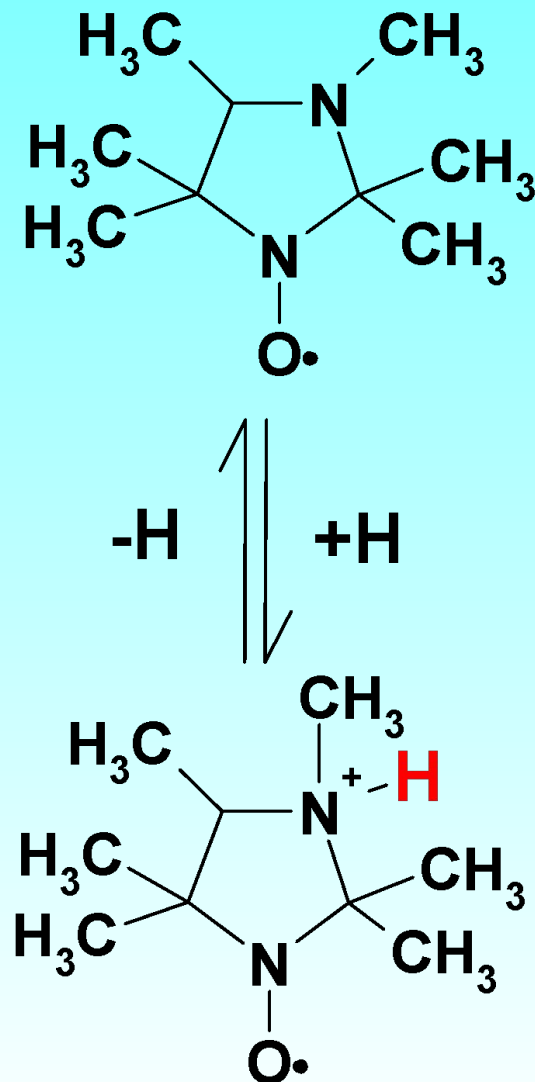
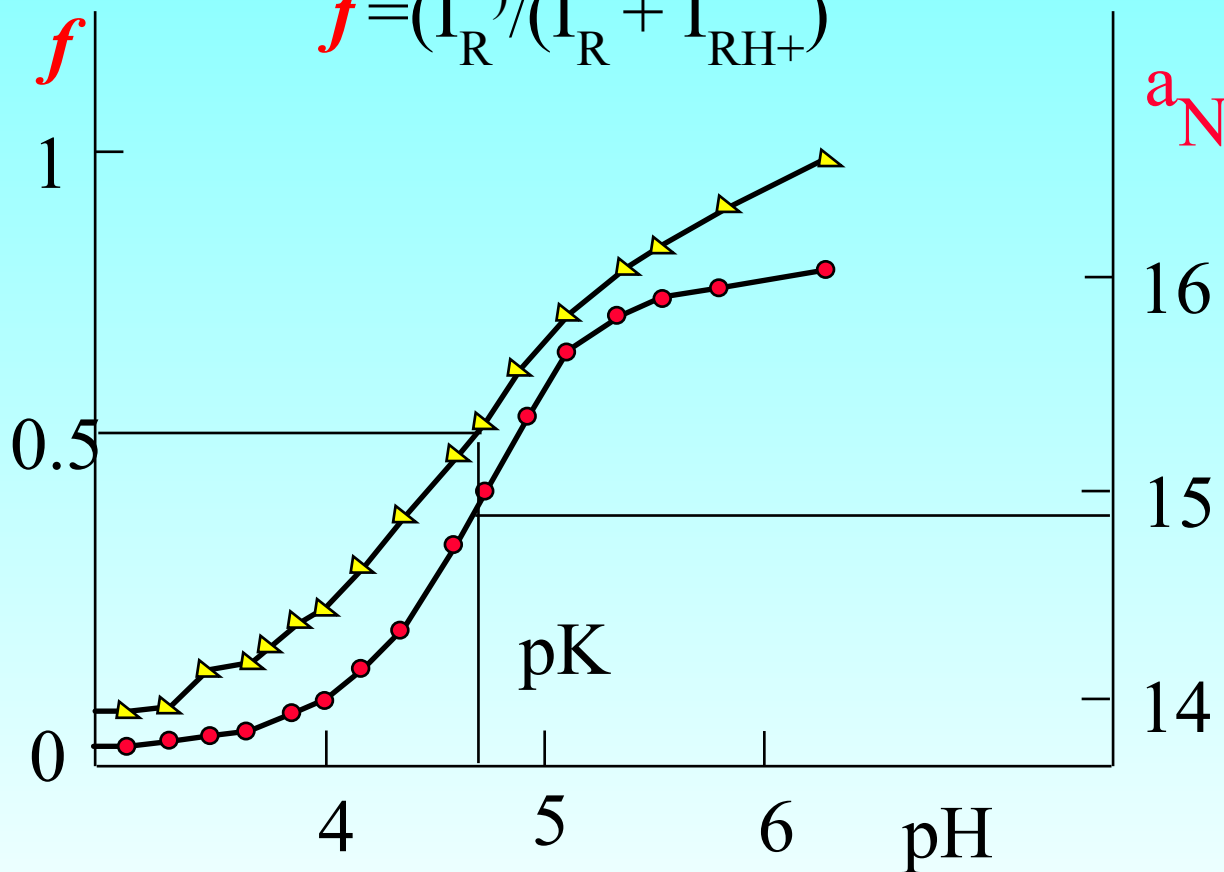
Казалось бы, что измерение рН достаточно легко и точно можно проводить с помощью рН-электродов, однако очень трудно если не невозможно измерить рН внутри лизосомы или фагоцитирующего лейкоцита. Для этих целей и применяют рН-чувствительные спиновые зонды. В основе метода рН-чувствительных зондов лежит способность зонда давать отличные друг от друга спектры ЭПР в протонированной и депротонированной формах.

Таким образом, существует узкий диапазон рН в котором и происходит его протонирование и соответствующее изменение спектра ЭПР зонда.

# Зависимость параметра $f$ и $a_N$ от pH

$$a_N = (a_N^R + a_N^{RH^+}) / 2$$

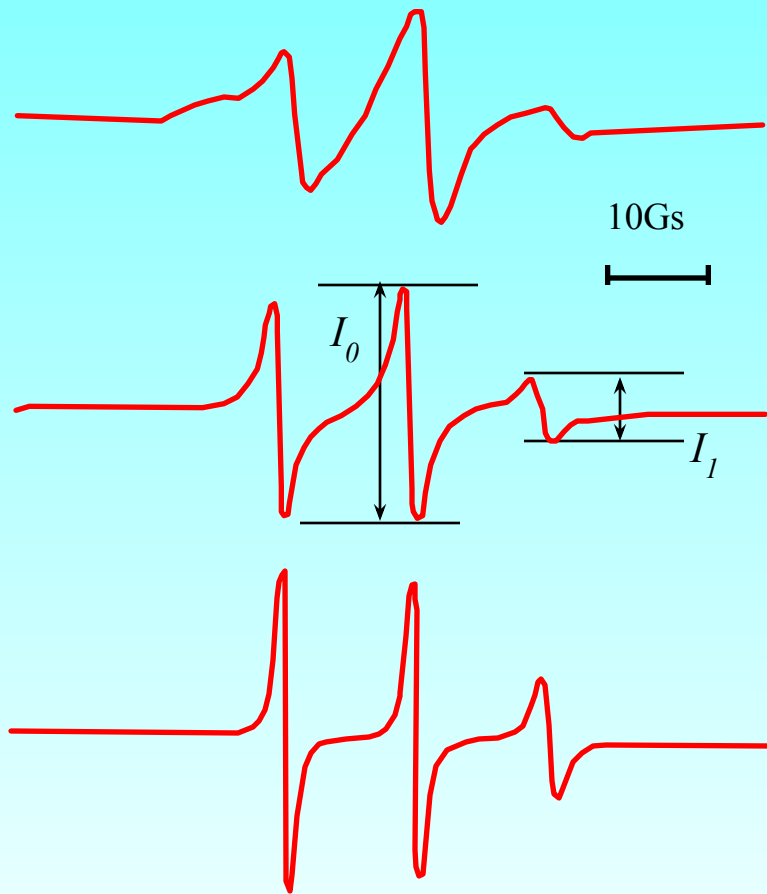
$$f = (I_R) / (I_R + I_{RH^+})$$



$a_N^R$  и  $a_N^{RH^+}$  константы СТВ радикалов R и  $RH^+$

$I_R$  и  $I_{RH^+}$  амплитуды сигналов ЭПР радикалов R и  $RH^+$

# Спектр ЭПР химотрипсина с присоединенной спиновой меткой



Спектр ЭПР нативного химотрипсина, помеченного спиновой меткой.

Соотношение величин  $I_0$  и  $I_1$  используется для количественной характеристики подвижности спиновой метки.

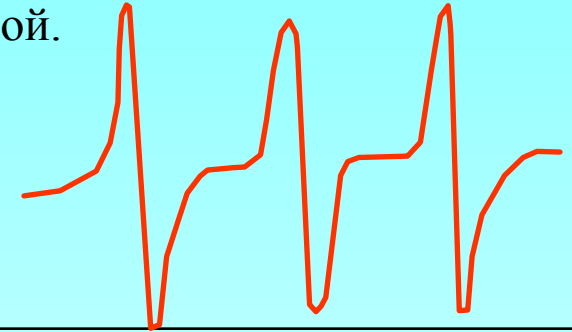
Денатурация белка приводит к увеличению подвижности полипептидных цепей и соответственно увеличению подвижности спиновой метки.



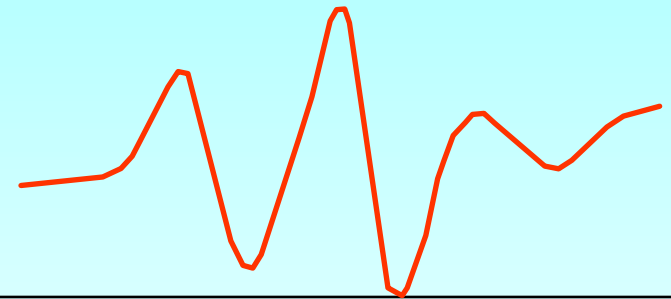
# Спектры ЭПР спиновой метки при взаимодействии с SH-группами белка

В основе метода спиновых меток лежит тот же принцип изменения спектра ЭПР нитроксильного радикала в зависимости от скорости и изотропности его вращения. Отличием же метода является тот факт, что спиновая метка ковалентно связывается с другой более или менее крупной молекулой или макромолекулой.

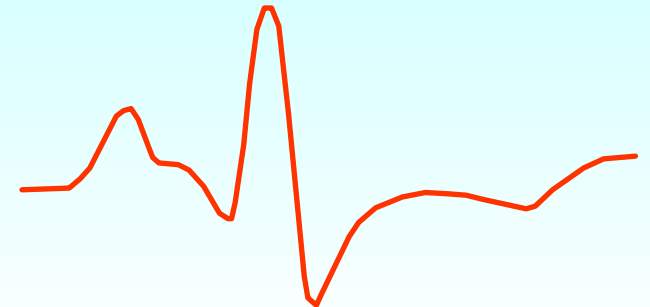
1. Водная фаза



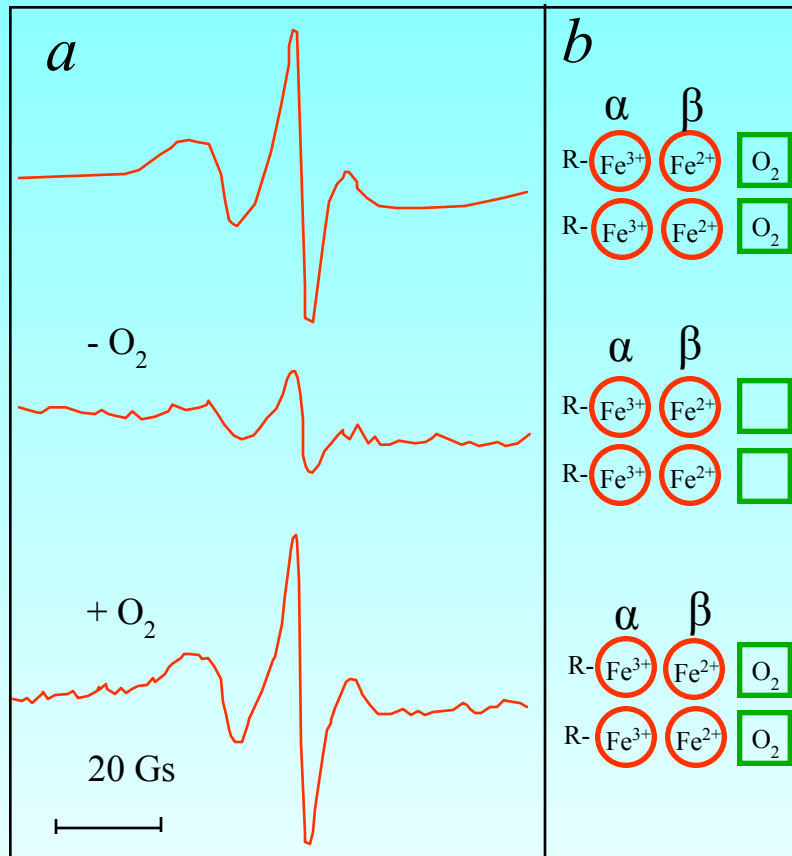
2. Поверхностный слой



3. Глубинный участок



# Сигнал ЭПР спиновой метки в гемоглобине



Аллостерические эффекты в гемоглобине, меченым иминоксольным радикалом в геминовой группе при 25С.

*a* - спектры ЭПР,  
*b* - путь включения метки в  $\alpha$ -цепи гемоглобина и присоединение  $O_2$  к геминовой группе в  $\beta$ -цепях.  
R - spin labels.

# Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

1. **естественные сигналы ЭПР**
2. **метод спиновых меток и зондов**
3. **метод спиновых ловушек**

# Основы метода спиновых ловушек (spin trapping assay)

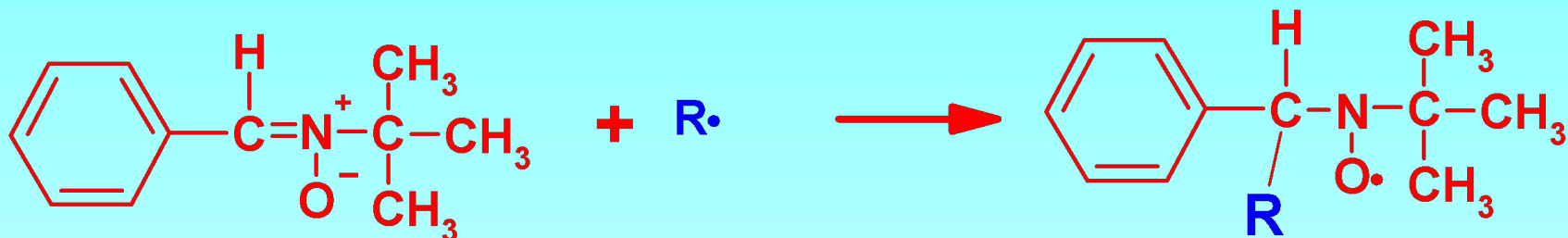
---

- Концентрация свободных радикалов в клетках и тканях не превышает **10 нМ**.
- Минимальная концентрация свободных радикалов, которую можно обнаружить методом ЭПР **100 нМ**



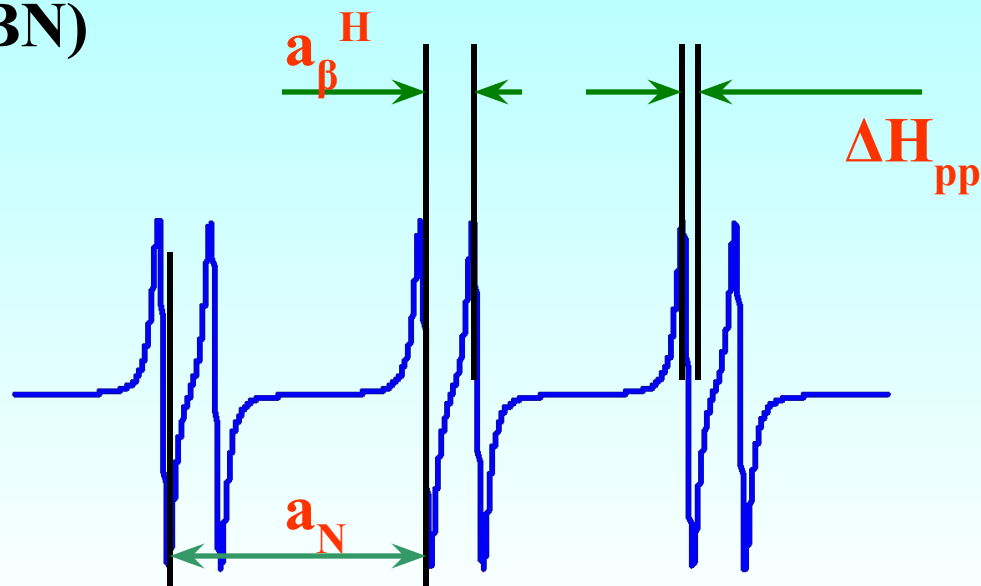
Предложен в 1965-67 независимо Копака Т. (Япония), R. Lagercranz (Швеция) и E. Janzen (Канада).

# Характеристики спектра ЭПР спиновых аддуктов



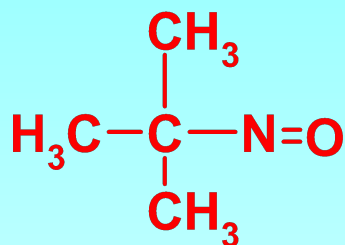
$\alpha$ -фенил-N-трет-бутил  
нитрон (PBN)

PBN спиновый аддукт

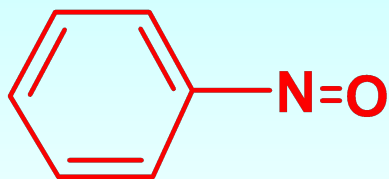


# Основные виды спиновых ловушек

нитрозосоединения

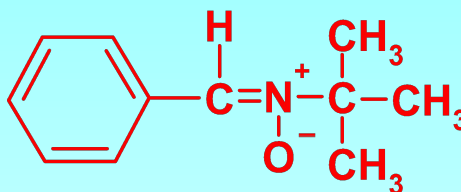


трет-нитрозобутан

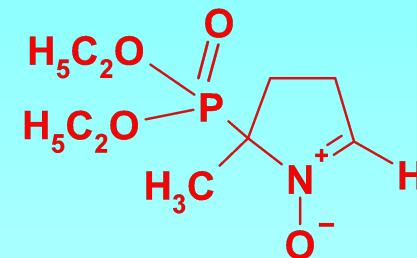


нитробензол

нитроны

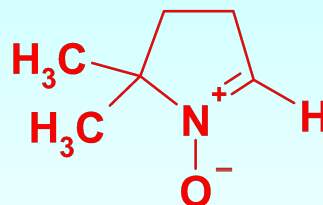


PBN



DEPMPO

Нитронил-  
нитроксилы



DMPO



NNR

# Основные требования к спиновым ловушкам

---

- Быстрые реакции с радикалами
- Отсутствие побочных реакций
- Образование стабильных аддуктов
- Отличие в параметрах спектра ЭПР спиновых аддуктов у разных радикалов

# Кинетические и спектральные характеристики спиновых аддуктов

---

Радикал	Константа скорости	Р-ритель	$a_N$	$a_\beta^H$	$\Delta H_{pp}$
$R_3-C\cdot$	$4.3 \cdot 10^7$	вода	15.3	3.4	0.8
$R-O\cdot$	$1.2 \cdot 10^8$	вода	15.2	3.0	0.5
$R-OO\cdot$	$4.0 \cdot 10^2$	вода	15.4	3.0	0.5
$OH\cdot$	$8.5 \cdot 10^9$	вода	14.9	2.8	0.5
$O_2\cdot$	$5.0 \cdot 10^8$	вода	14.9	2.7	0.5



# Идентификация радикалов по спектрам ЭПР спиновых аддуктов

*Если известны: (1) тип СЛ, (2) Р-ритель, (3)  $a_N$  (мТ) и (4)  $a_\beta^H$  (мТ) СА можно легко идентифицировать в базе данных <http://epr.niehs.nih.gov> спектров ЭПР.*

DMPO
aqueous
1.49
1.49



OH•; Morgan D.D. et al., Photochem. Photobiol. 1985, v. 42, p. 93-99
OH•; Thornalley P.J. et al., Biochem. Biophys. Acta 1985, v. 827, p. 36-44
OH•; Makino K. et al., Biochim. Biophys. Res. Commun. 1986, v. 141, p. 381-386
OH•; Minotti G. et al., J. Biol. Chem. 1987, v. 262, p. 1098-1104

# Рекомендуемая литература:

1. Дж. Вертц и Дж. Болтон Теория и практические приложения метода ЭПР. Мир, Москва, 1975.
2. Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике. Под редакцией А.Б. Рубина. Высшая школа, Москва, 1988.
3. Метод спиновых Меток. Теория и применение. Под редакцией Л. Берлинера. Мир, Москва, 1979.
4. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. Наука, Москва, 1976.
5. Зубарев В.Е. Метод спиновых ловушек. Издательство МГУ, Москва, 1984.