

**Электронный
Парамагнитный
Резонанс**
**и его применение в медико-
биологических исследованиях**

А. Н. Осипов, Ю.А. Владимиров

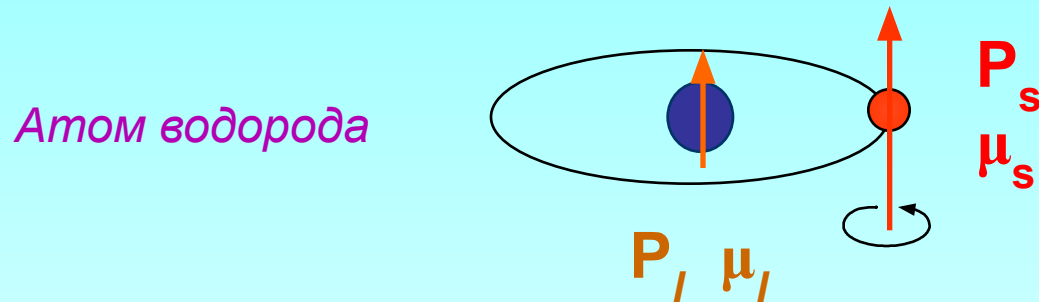
Электронный Парамагнитный Резонанс

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**:

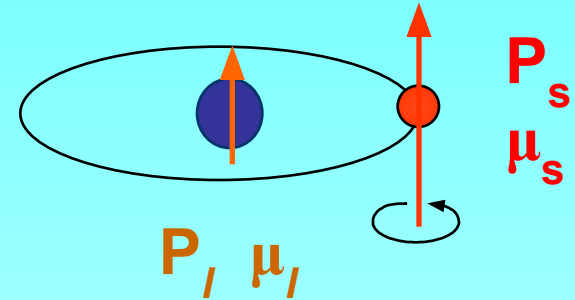
1. **Механическим** (P), отражающим движение материальной частицы и
2. **Магнитным** (μ), отражающим движение заряженной частицы.

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)

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

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

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

Энергия электрона в магнитном поле

равна

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

где μ - суммарный магнитный момент электрона,

H - напряженность магнитного поля,

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

тогда подставив значение μ получим

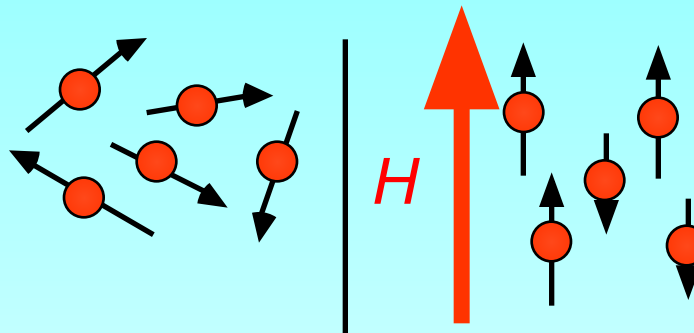
$$E = -g\beta SH,$$

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

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

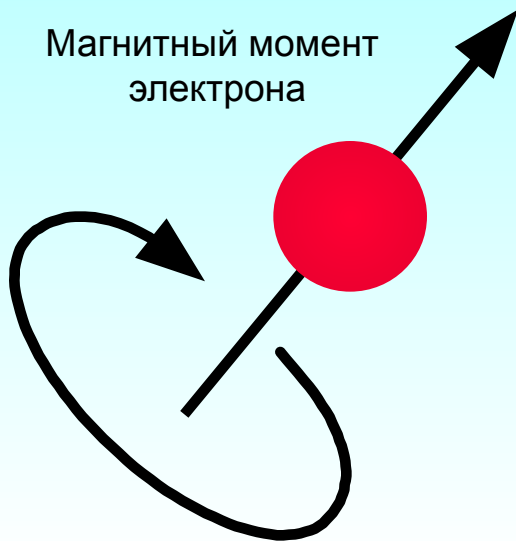
Ориентация электронных спинов в магнитном поле

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



В отсутствие магнитного поля

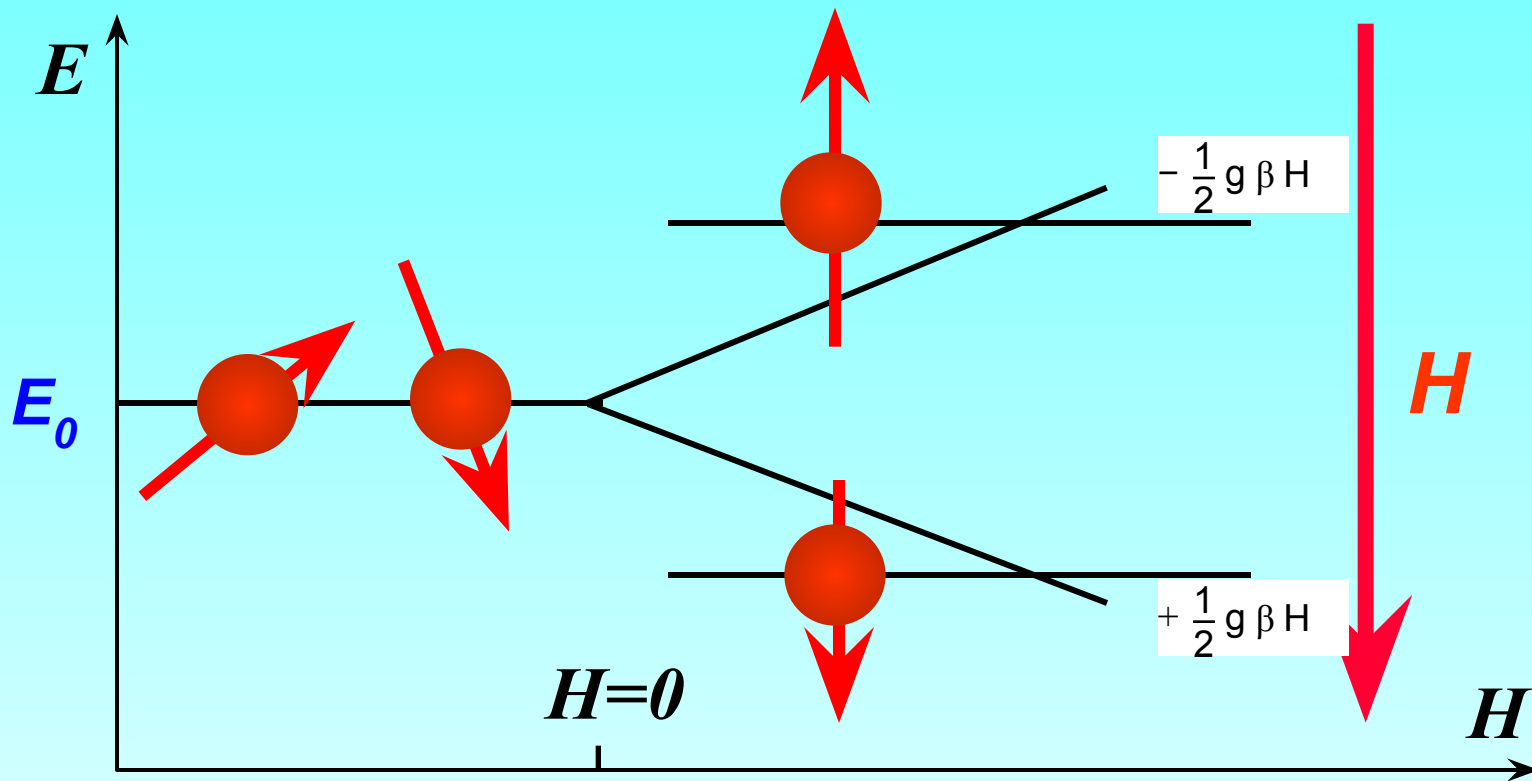
При включенном магнитном поле



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)

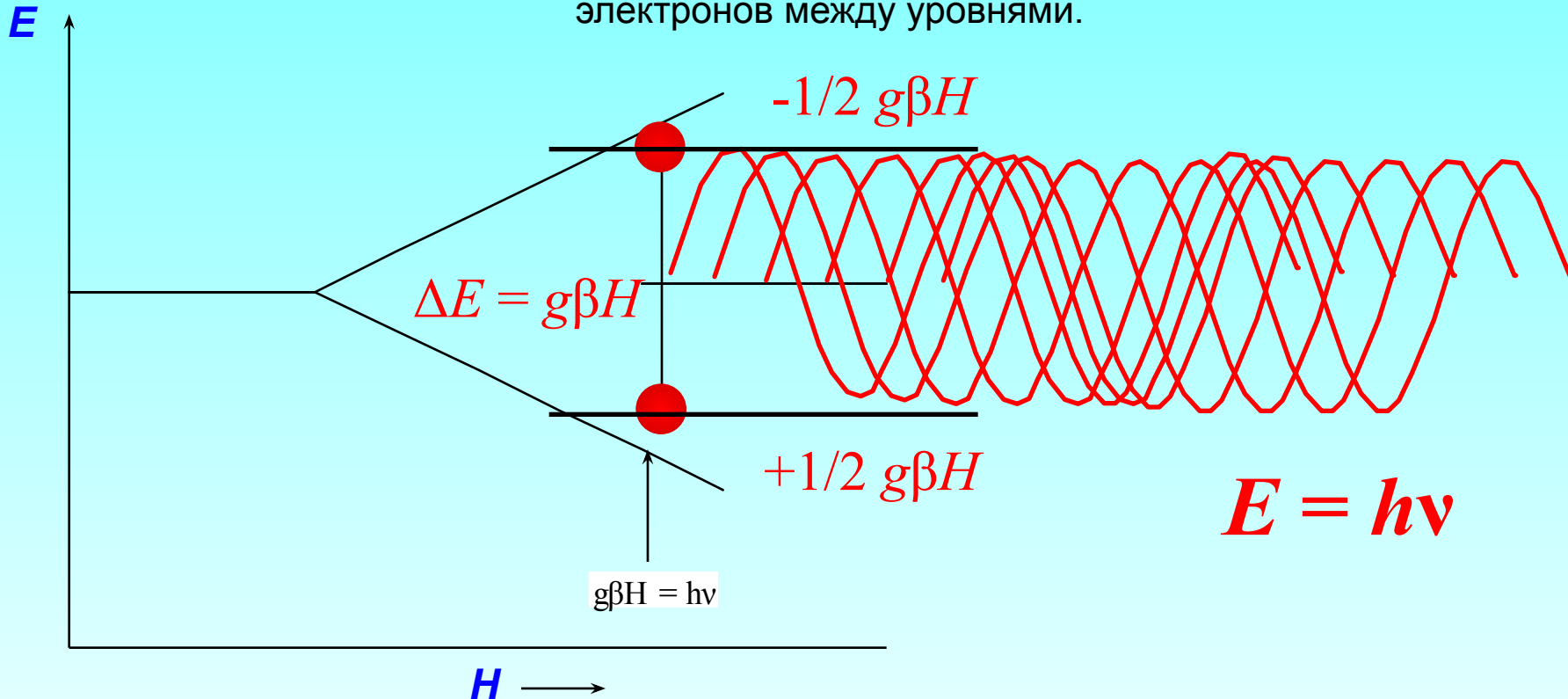


В отсутствие внешнего магнитного поля электроны ориентированы случайным образом и имеют практически одинаковую энергию (E_0)

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 ЭПР)

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.

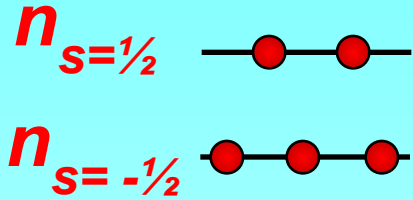


Поглощение будет происходить при условии равенства энергий поглощаемого кванта и энергии перехода между уровнями, т.е. когда

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

Это выражение называется – основным уравнением резонанса

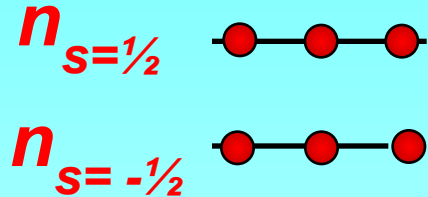
Почему ЭПР можно наблюдать только у парамагнетиков?



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:

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

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

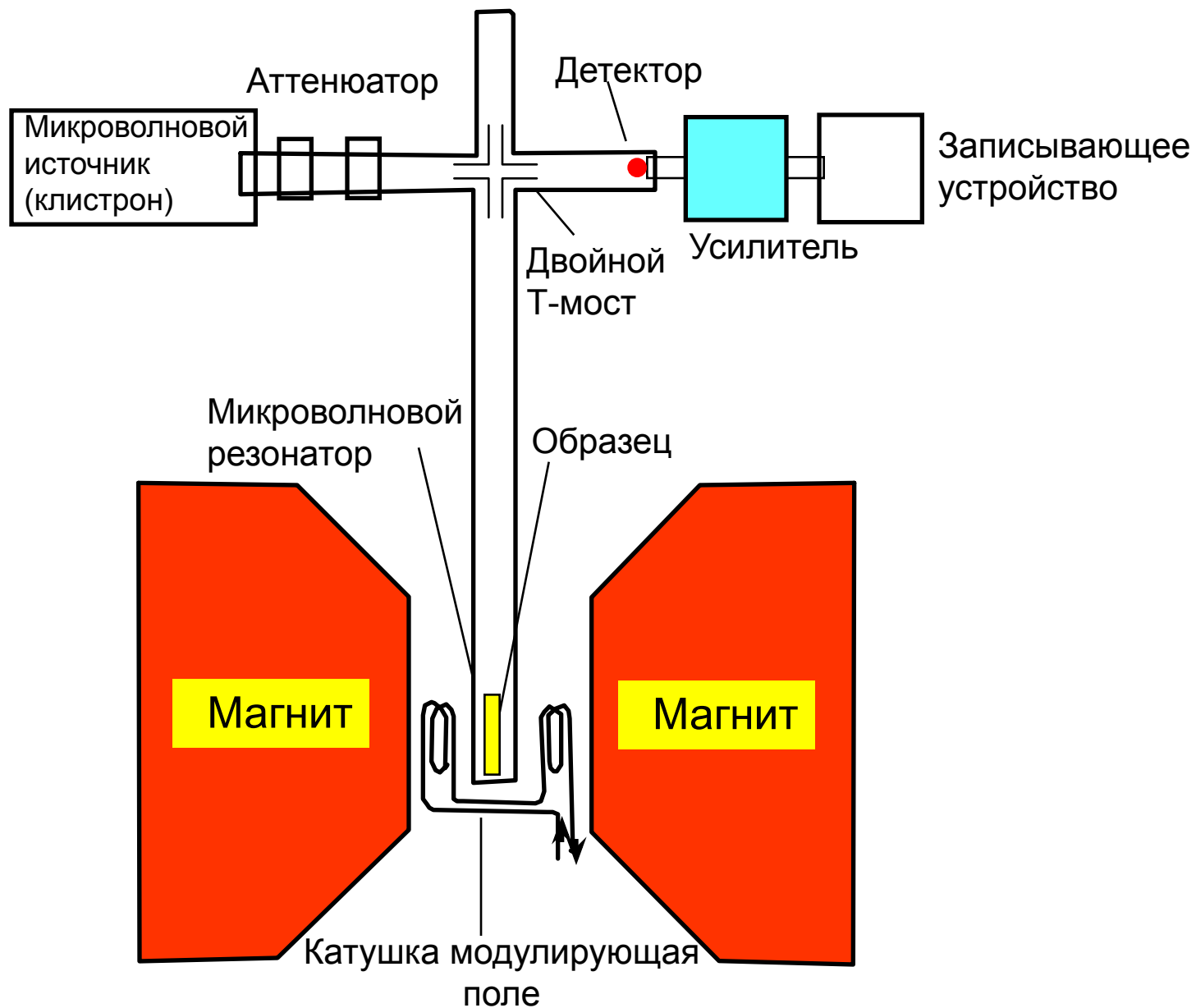
$$\frac{n_{s=1/2}}{n_{s=-1/2}} \Big|_{T=300K} = 0.002; \Big|_{T=4K} = 0.2$$

История открытия явления ЭПР

Метод был открыт Евгением Константиновичем Завойским в Казанском Университете в 1944 году. Он заметил, что монокристалл 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 ПОЯВИЛАСЬ ЛАБОРАТОРИЯ
В ИТОГЕ В 1944 ГОДУ
ЕВГЕНИЕМ КОНСТАНТИНОВИЧЕМ
ЗАВОЙСКИМ
БЫЛО ОТКРЫТО ЯВЛЕНИЕ
ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО
РЕЗОНАНСА
В ЛАБОРАТОРИИ
ЕВГЕНИЙ КОНСТАНТИНОВИЧ
ЗАВОЙСКИЙ
ТОЧЕКА ЭЛЕКТРОННОЙ
ПАРАМАГНИТ. РЕЗОНАНС ЭФФЕКТА
АНТИ



ОТЧЕТ

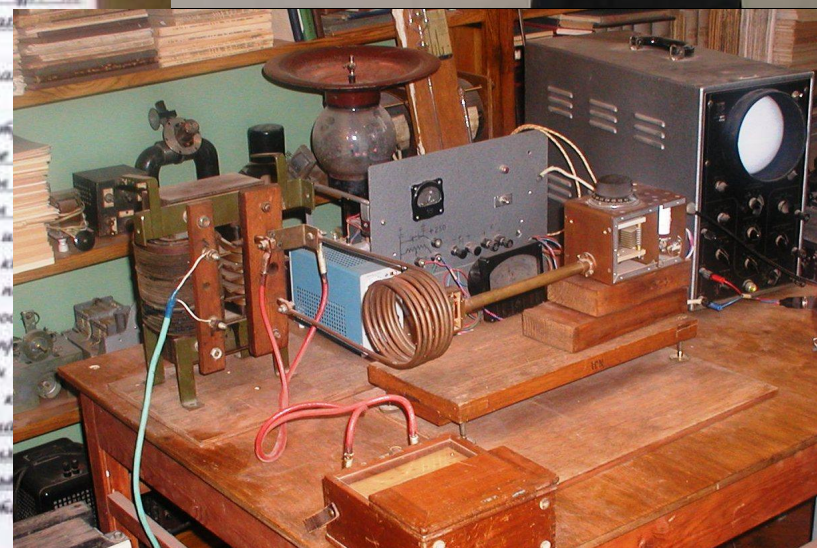
о научно-исследовательской работе по кафедре
экспериментальной физики К.Т.У. за январь-июль 1941г.

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 маг-
моментов атомных ядер.

Направленную попытку Gorter'a определить маг-
моменты ядерных спинов мы объяснили
чувствительностью прикладной или калоримет-
рической измерений. Имея в распоряжении более
метод измерений (метод селективного тока), мы
сделали попытку определить магнитные моменты
целию оценки порядка чувствительности повторены и
Gorter'a парамагнитной релаксации в некоторых
других соединениях. Результаты этих измерений
подтверждают, что чувствительность установки доста-
точно для измерения магнитных спинов ядер, если су-
ществуют, проведенные согласно теории Heitler'a и

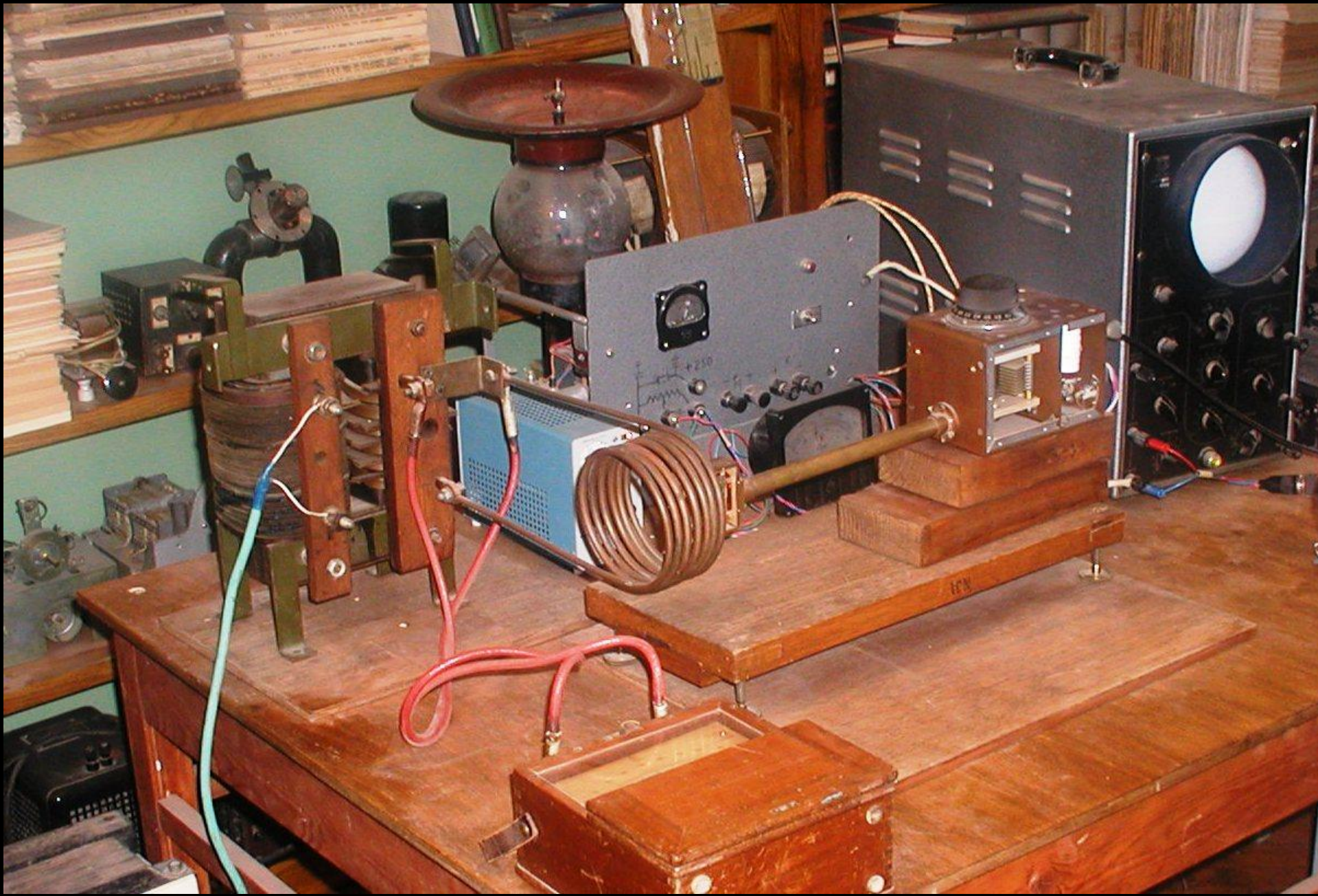
На основании этого все темы по разделу
исключая тему И.И. Раманова, были заменены по
парамагнитной релаксации и определению ядерных
к разработке ее привлечены: Завойский, Ал-
Самков. В перспективе можно включить в э-
других работников кафедры...

14/VI.41г.



Завойский

Прибор Завойского для измерения ЯМР и ЭПР



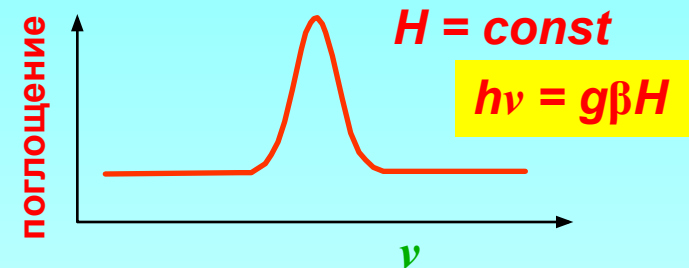
Прибор Завойского для измерения ЭПР



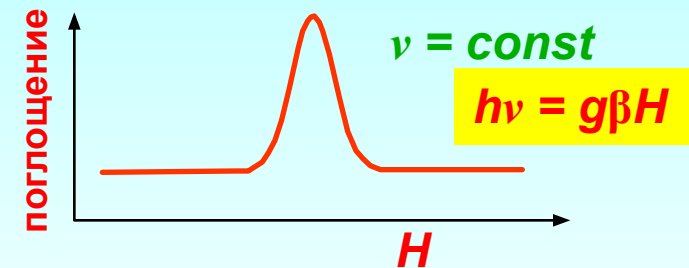
Как получить сигнал ЭПР ?

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:

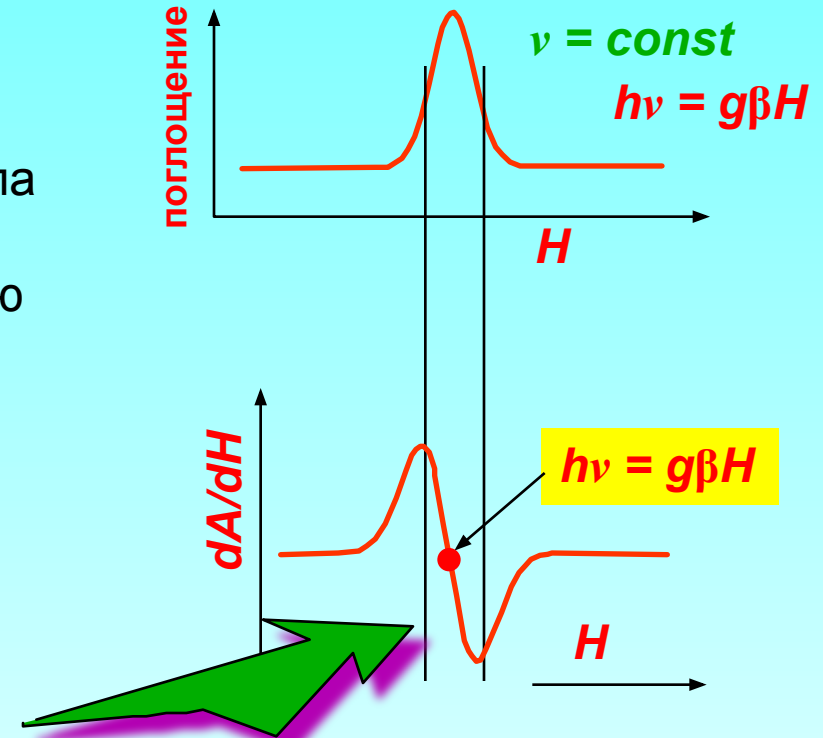


2 - По техническим причинам мы поступаем по другому: мы используем микроволновое излучение при постоянной частоте волн и **изменяем магнитное поле**.



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**.



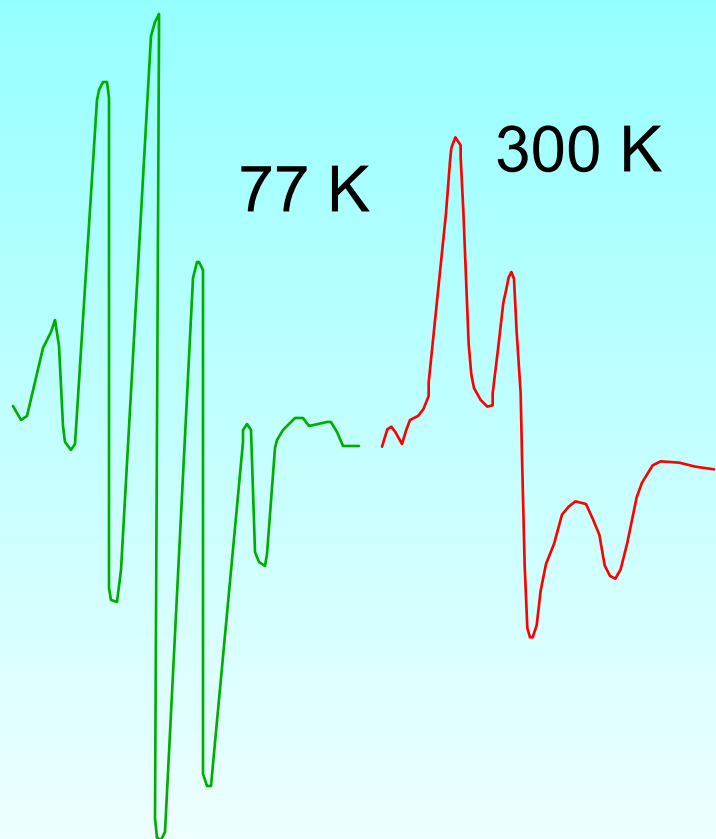
Вот это мы называем сигналом ЭПР

Электронный Парамагнитный Резонанс

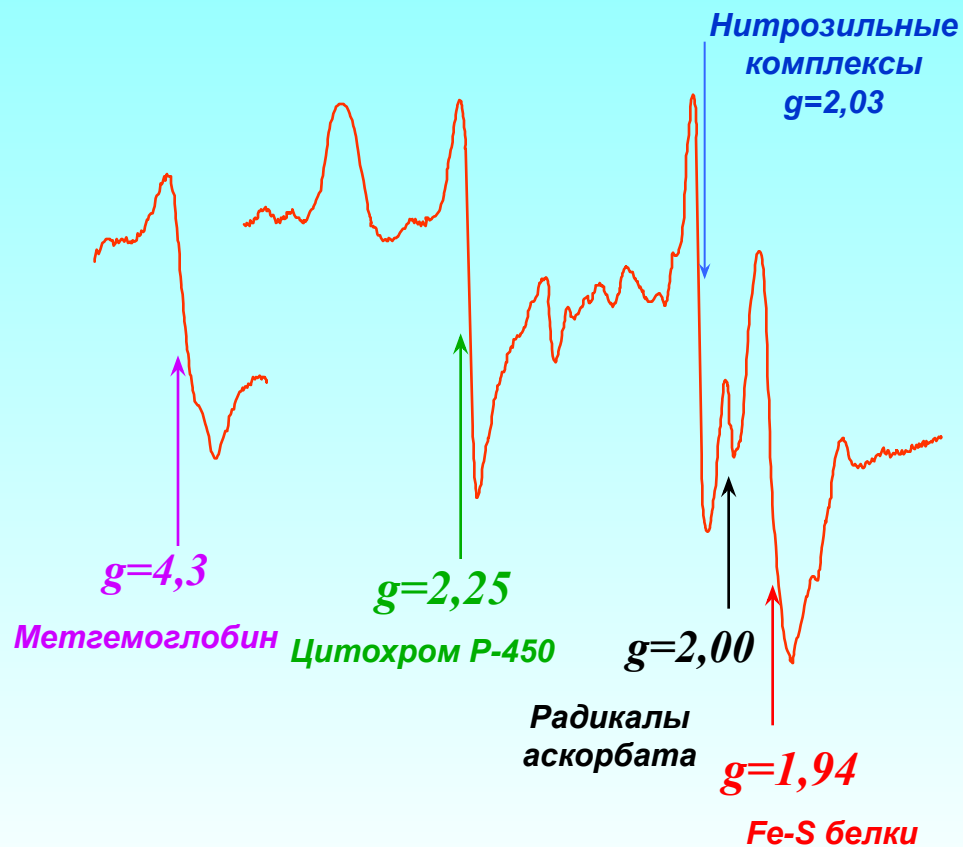
Часть 2. Спектры ЭПР

Примеры сигналов ЭПР

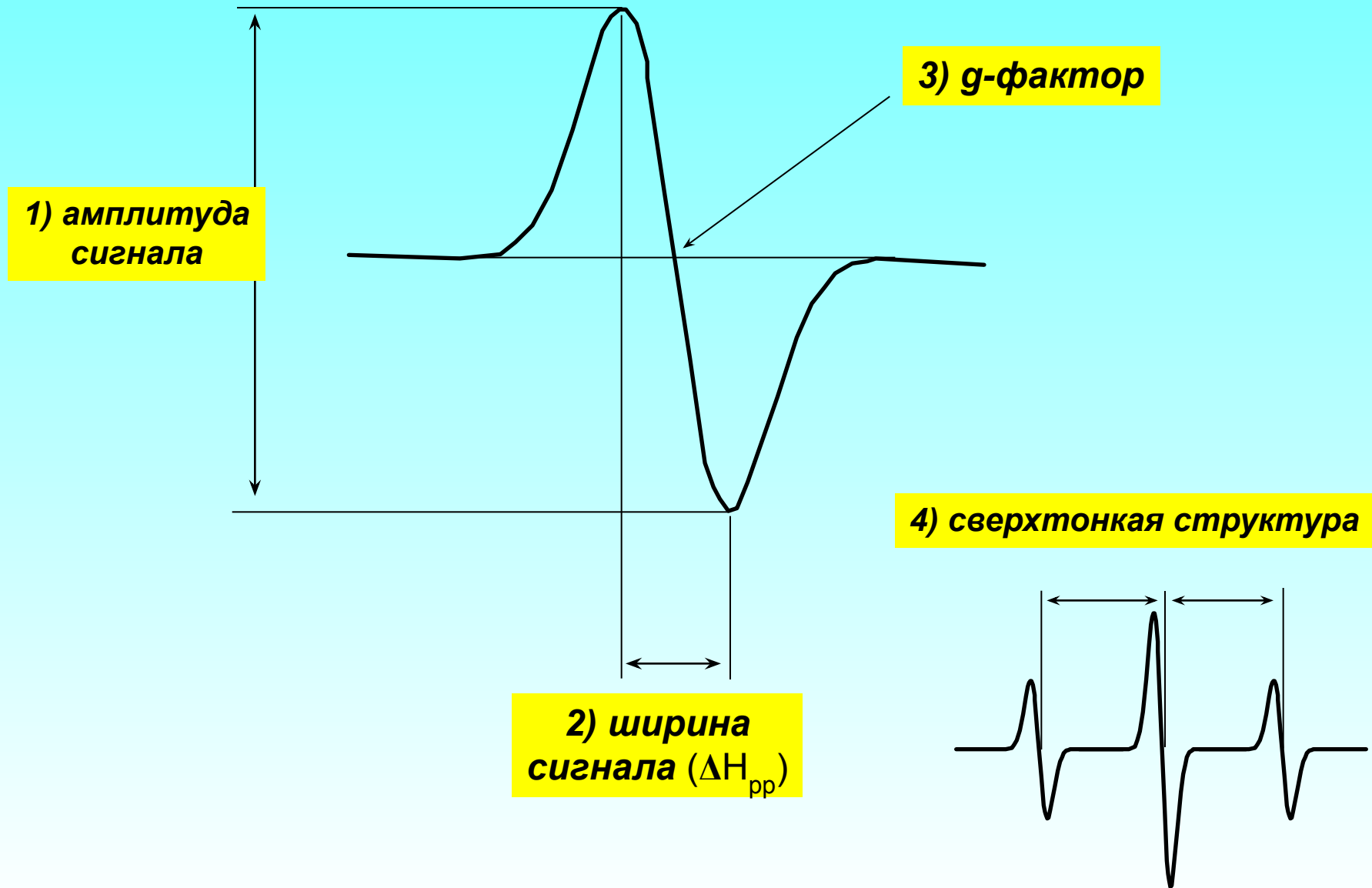
УФ облученный цистеин



Печень крысы при 77 K



Основные характеристики сигнала ЭПР



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.

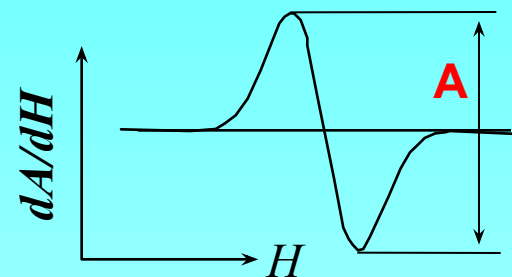
Площадь **S** под линией поглощения **прямо пропорциональна** концентрации парамагнитных частиц в измеряемом образце (**C**).

$$C = k * S$$

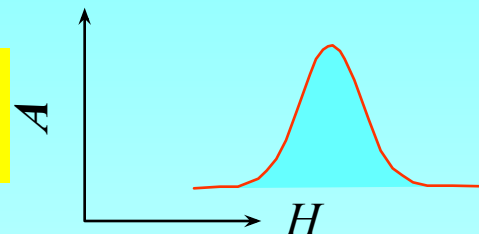
Практически получить значения **S** нетрудно. Существенно труднее найти величину **k**. Поэтому на практике при вычислении **C** обычно пользуются сравнением площади измеряемого образца **S** (концентрацию которого надо найти) с площадью эталонного образца **S_e** (концентрация **C_e** которого известна).

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

сигнал ЭПР



кривая поглощения



площадь под кривой поглощения



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

Ширина сигнала ЭПР

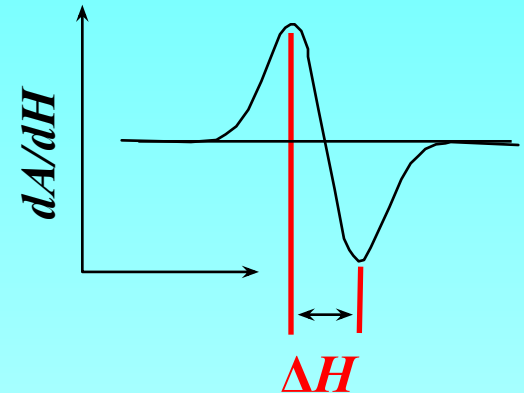
Ширина сигнала ЭПР определяется взаимодействием магнитных моментов электрона с окружением.

Теоретически минимальная ширина линии следует из соотношения неопределенностей Гейзенберга:

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

где Δt - время измерения и ΔE - неопределенность энергии системы.

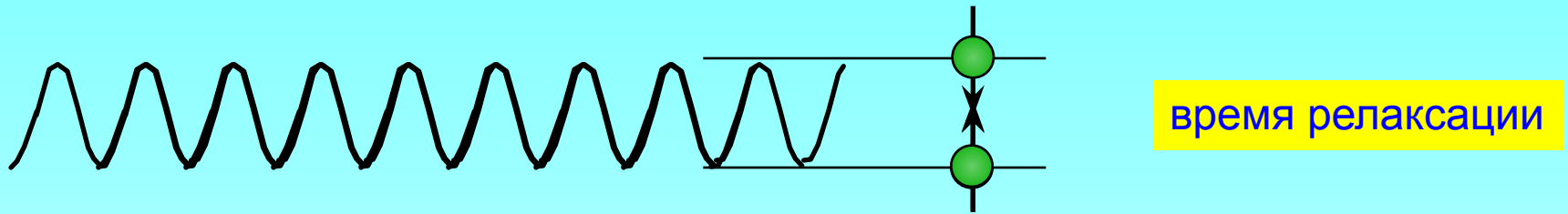
Рассматриваемый процесс - это поглощение электромагнитного кванта, такое, что Δt может быть интерпретировано как время нахождения электрона на верхнем энергетическом уровне (время релаксации T), а ΔE как энергия системы нашем случае $= g\beta H$, отсюда



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

Время релаксации

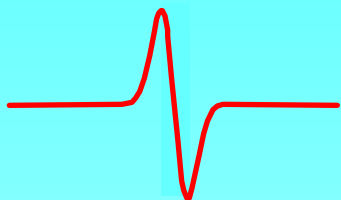
Релаксация - процесс восстановления заселенности энергетических уровней после поглощения кванта электромагнитного излучения.



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).

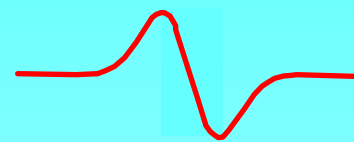
Спин-спиновая релаксация (T_2) Обусловлена взаимодействием— с другими парамагнитными частицами (т.е. спинами)



Большое T
Малое ΔH



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



Малое T
Большое ΔH

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:

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

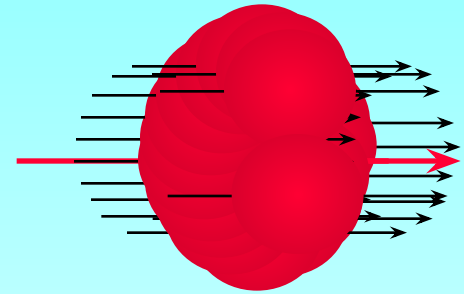
Комплексы металлов - $T_1=1$ нс $\Delta H=10$ мТ
Свободные радикалы - $T_1=0,1$ мс $\Delta H=100$ мкТ

Механизмы уширения сигнала ЭПР :

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

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

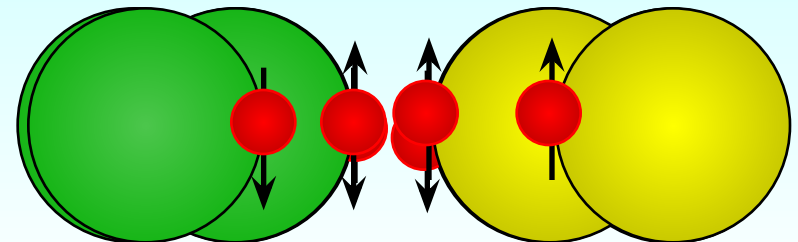
2. Взаимодействие спинового магнитного момента электрона с орбитальным магнитным моментом электрона приводит к уширению сигнала в результате анизотропии g-фактора



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



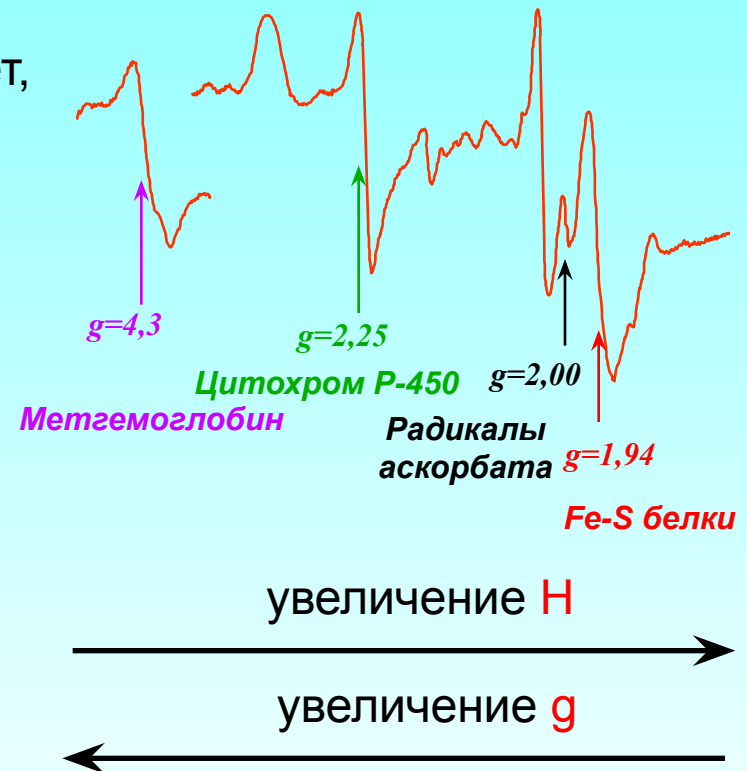
g-фактор

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 ν 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.

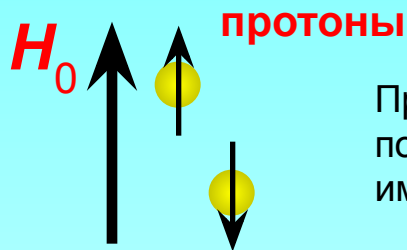
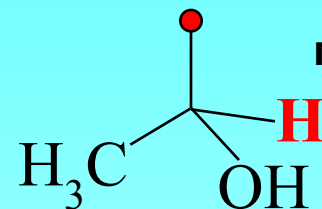


Сверхтонкое взаимодействие

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

электрон

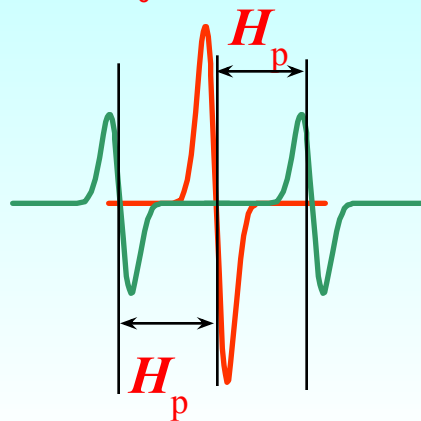
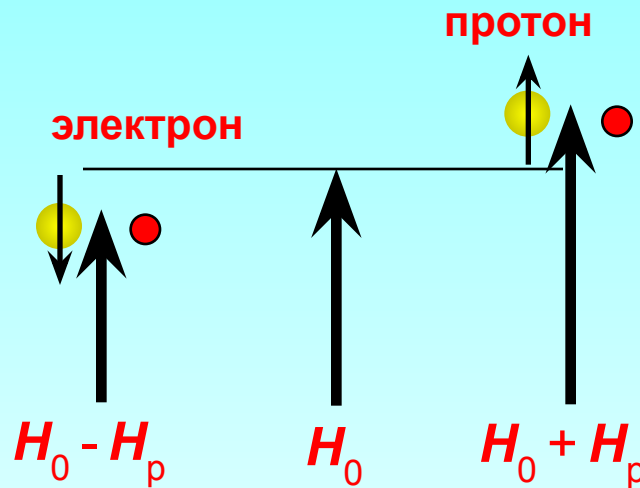
протон



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 отсутствии протона (H_0) (если спин протона $= -1/2$).



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

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

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

Сверхтонкая структура

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

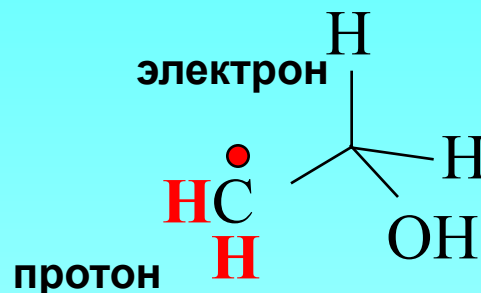
этанола ($\cdot\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$)

Магнитное поле вокруг неспаренного электрона теперь может иметь следующие значения:

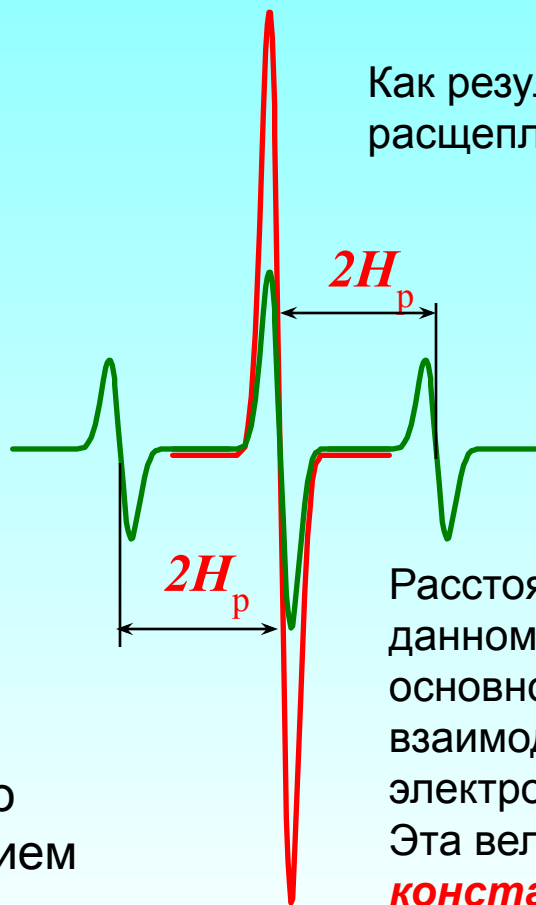
$$\begin{array}{l} H_0 + H_{p1} + H_{p2} = H_0 + 2H_p \\ H_0 + H_{p1} - H_{p2} = H_0 \\ H_0 - H_{p1} + H_{p2} = H_0 \\ H_0 - H_{p1} - H_{p2} = H_0 - 2H_p \end{array}$$

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**

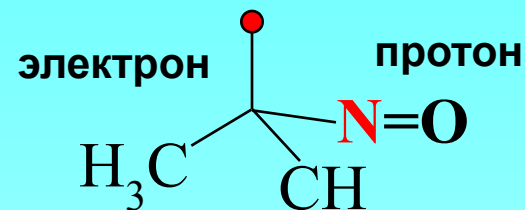
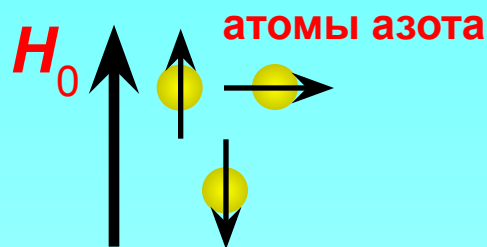


Как результат, сигнал ЭПР радикала расщепляется на **3** линии



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

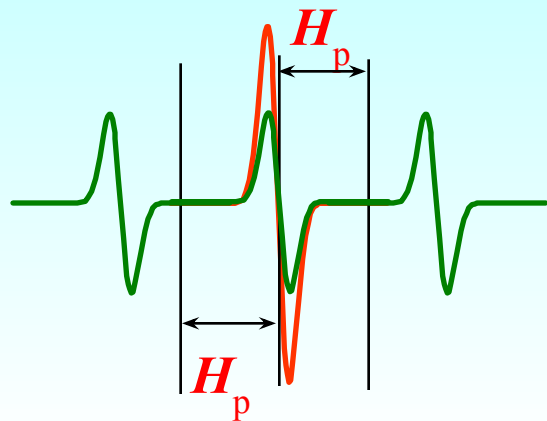
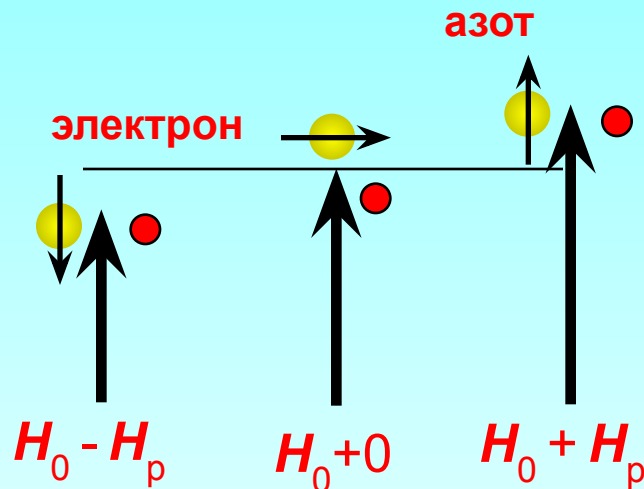
Сверхтонкое взаимодействие (продолжение)



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:

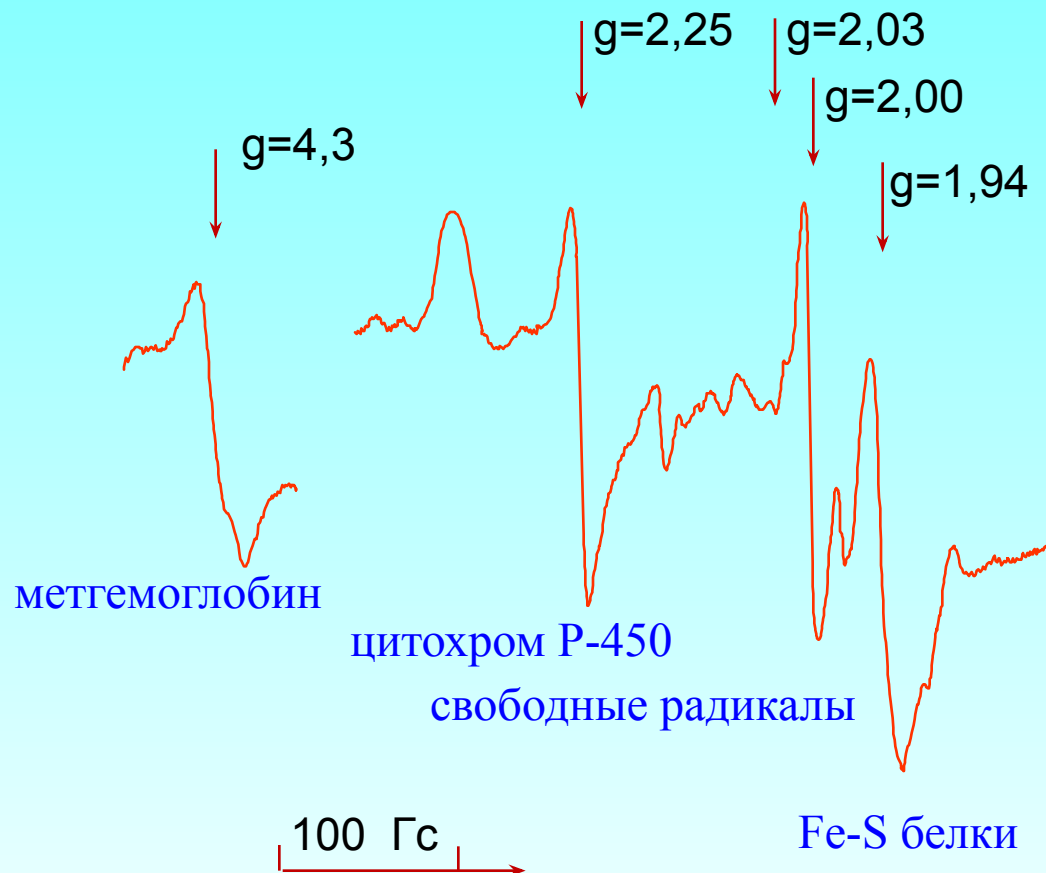
1. **естественные сигналы ЭПР**
2. **метод спиновых меток и зондов**
3. **метод спиновых ловушек**

Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

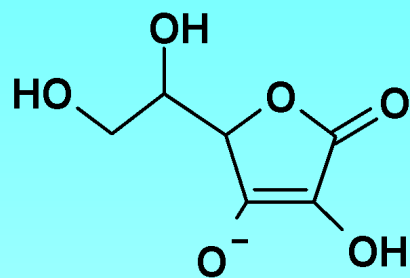
1. **естественные сигналы ЭПР**
2. **метод спиновых меток и зондов**
3. **метод спиновых ловушек**

Спектр ЭПР печени крысы

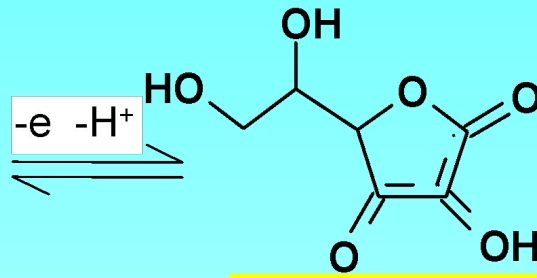
Если взглянуть на спектр ЭПР, например, печени крысы, то можно увидеть сигналы цитохрома Р-450, сигнал метгемоглобина и сигнал свободных радикалов, принадлежащий семихинонным радикалам аскорбиновой кислоты и флавинов. Благодаря коротким временам релаксации сигналы ЭПР металлопротеинов можно наблюдать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



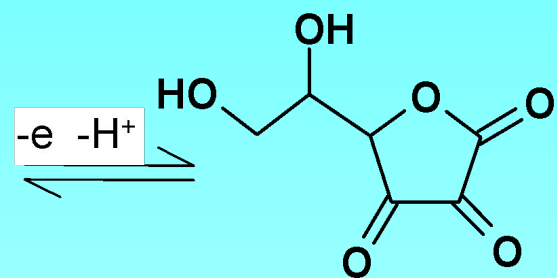
Радикал аскорбата



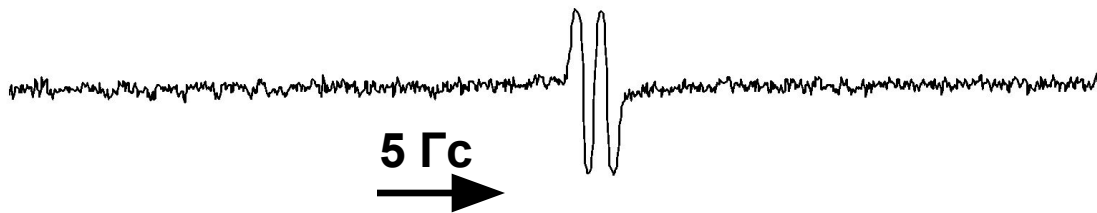
аскорбат



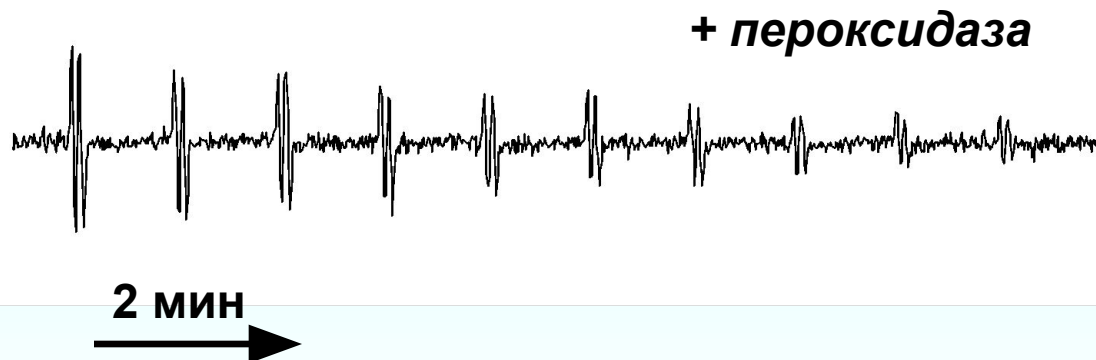
радикал
аскорбата



дегидроаскорбат

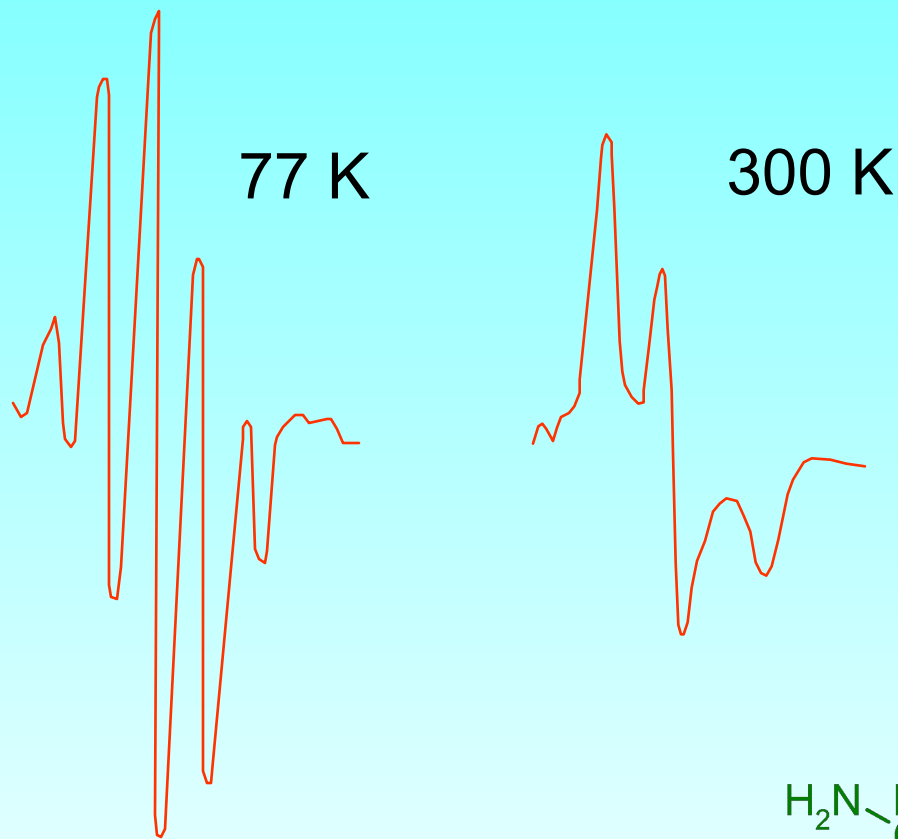


Сигнал ЭПР радикала аскорбата можно наблюдать непосредственно в крови или плазме.



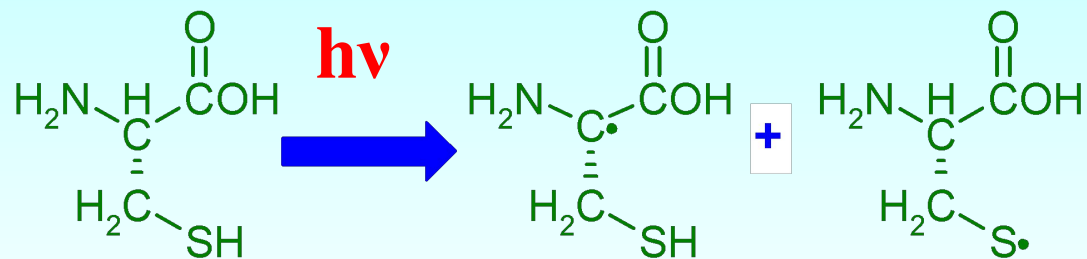
Добавление пероксидазы приводит к увеличению сигнала ЭПР и последующему его исчезновению. Длительность кинетики пропорциональна концентрации аскорбата в крови.

Естественные сигналы ЭПР, наблюдаемые в биологических системах

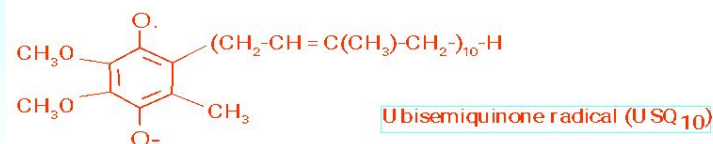
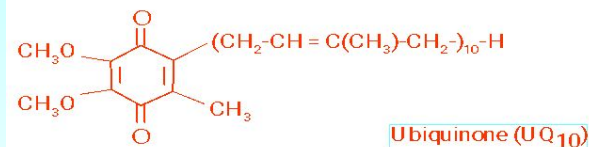
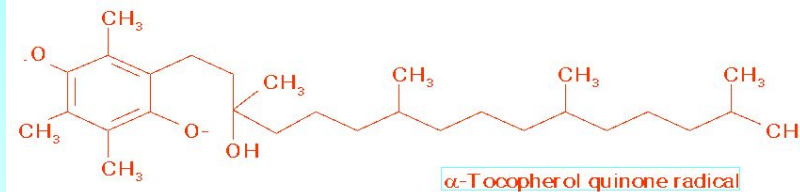
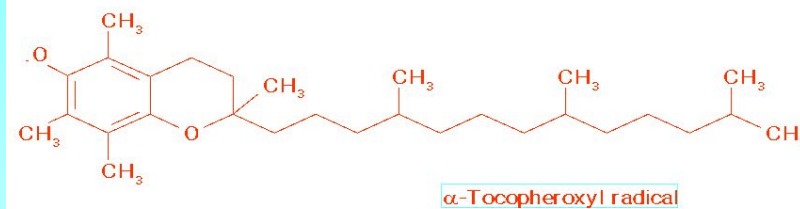
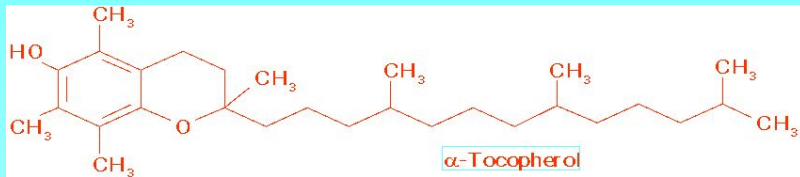


Спектр ЭПР облученного УФ
светом цистеина

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.



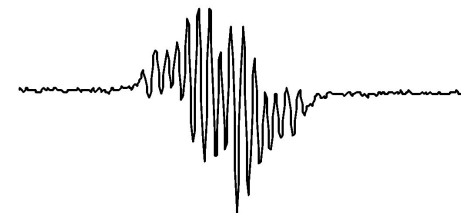
Сигналы ЭПР семихинонных или феноксильных радикалов



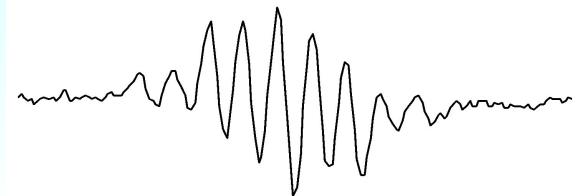
феноксильный радикал α -токоферола



семихинонный радикал α -токоферола



семихинонный радикал убихинона Q_{10}

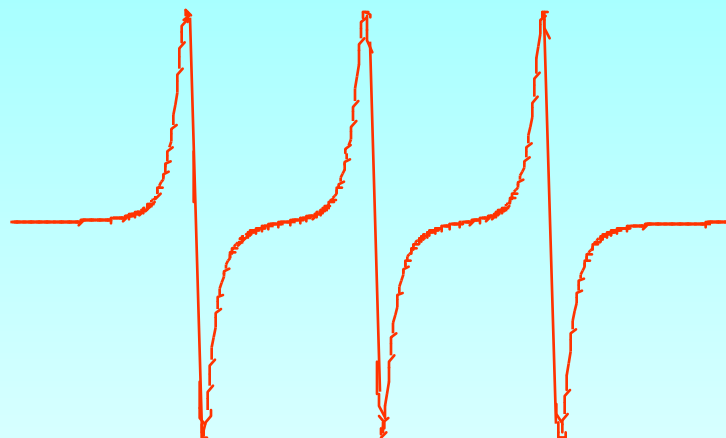
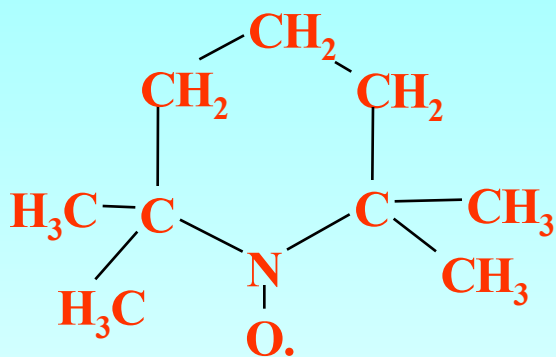


Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

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 ± 1 или 0.

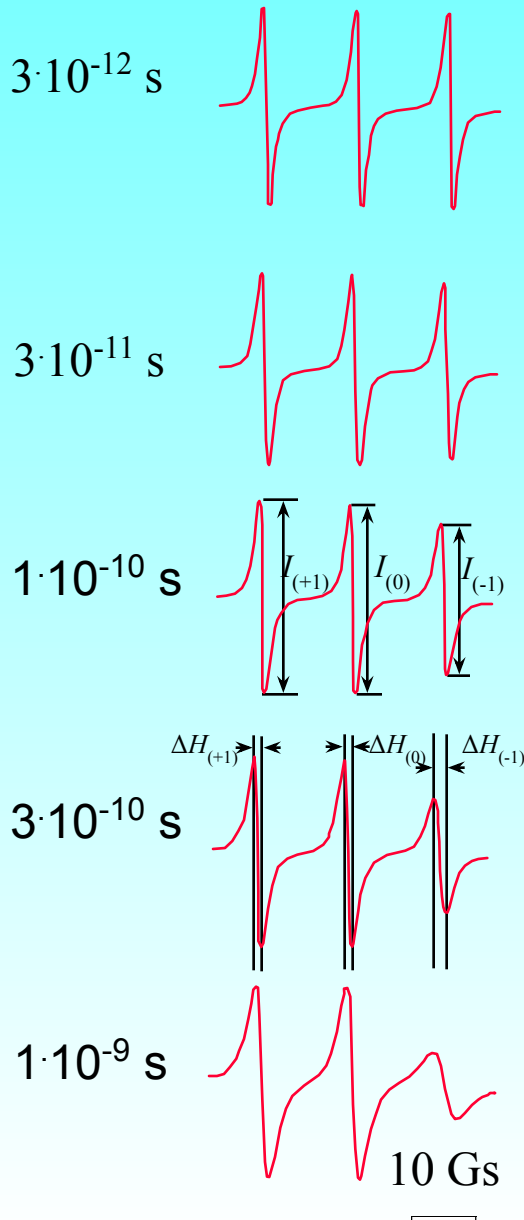


Формула и спектр ЭПР нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО).

Спектр ЭПР ТЕМПО при разных τ_c

Время

корреляции τ_c



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

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

где ΔH_{+1} - ширина низкочастотной компоненты

I_{+1} - амплитуда низкочастотной компоненты

I_{-1} - амплитуда высокочастотной 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.

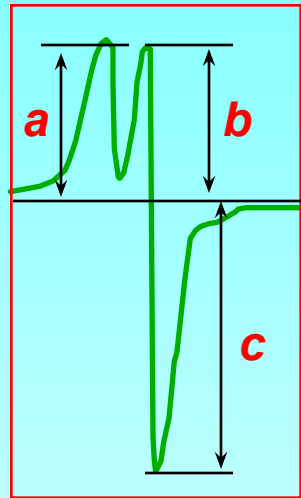
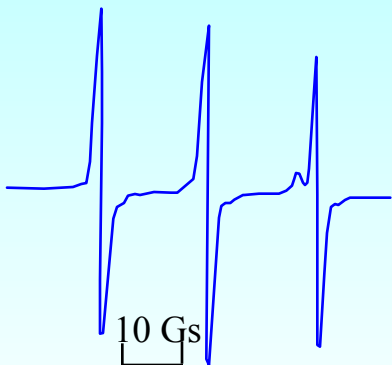
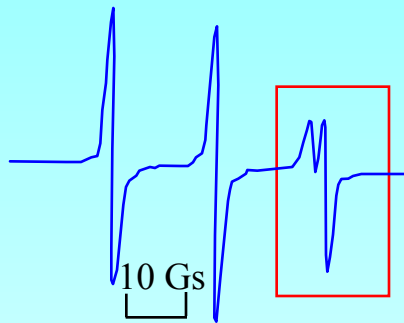
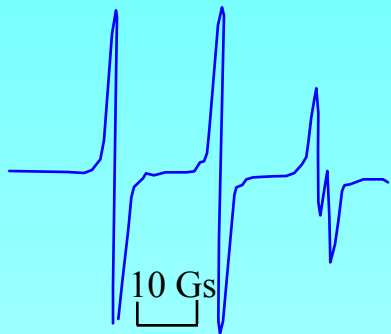
T – абсолютная температура

τ - время корреляции

η - 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

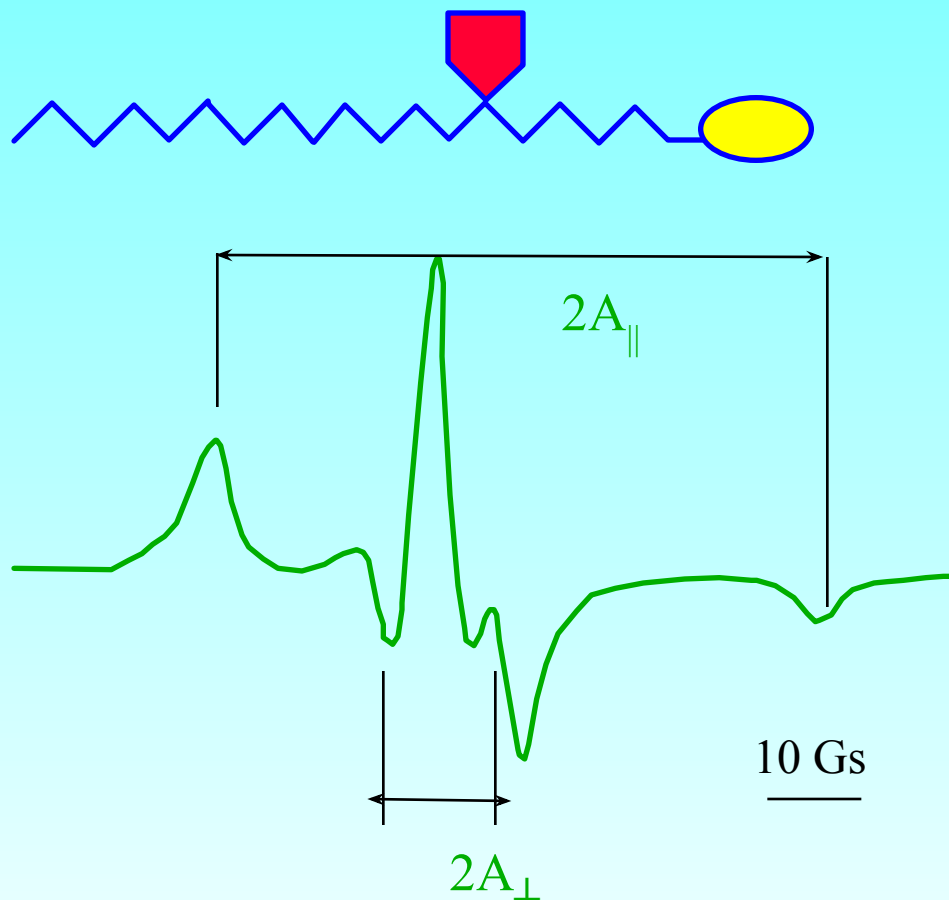


$$f = \frac{a}{a+b}$$

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

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



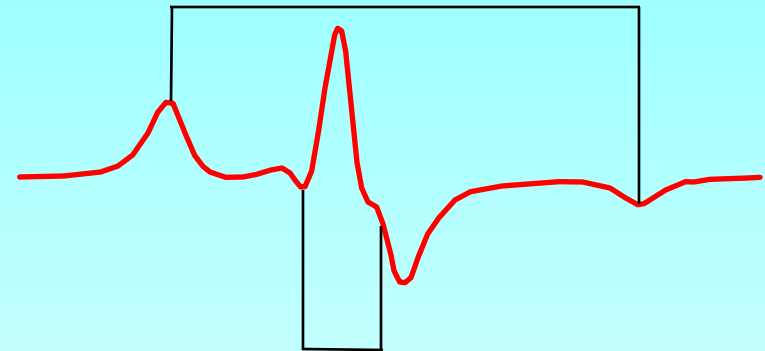
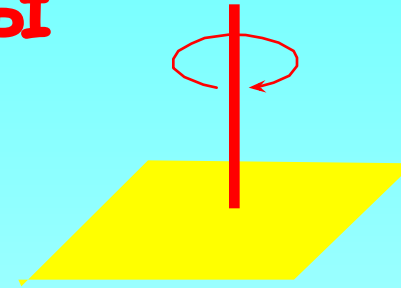
При анизотропном вращении стеариновой кислоты вокруг длинной оси сигнал ЭПР будет сильно зависеть от степени анизотропии вращения, который количественно характеризуется так называемым параметром упорядоченности **S**

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

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

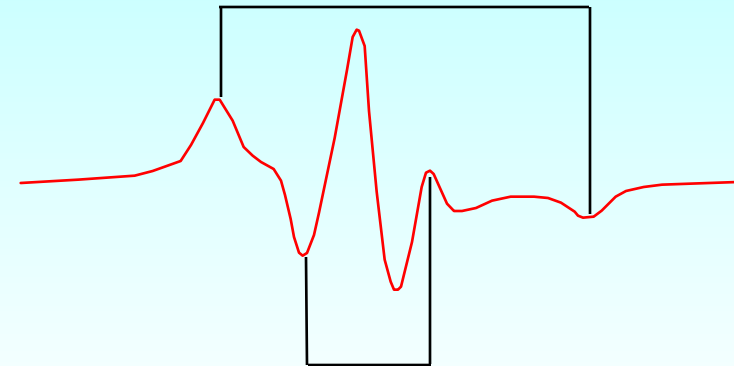
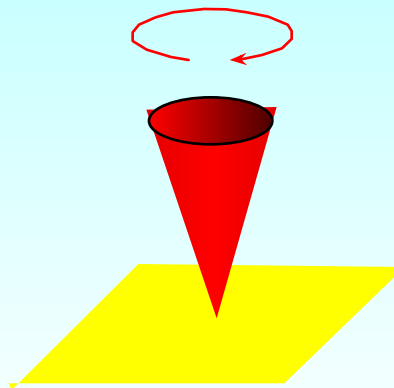
Параметр упорядоченности и вязкость мембраны

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

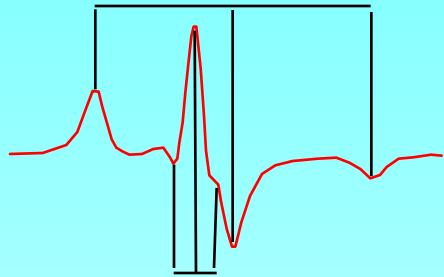


В «замороженных» мембранах, где липиды находятся в кристаллическом состоянии параметр упорядоченности **S** близок к 1.

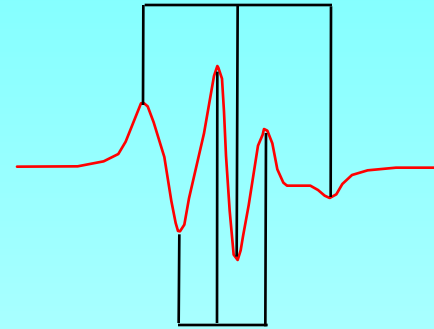
В «жидких» мембранах отклонение конуса вращения возрастает и **S** снижается, что вызывает изменения в спектре ЭПР.



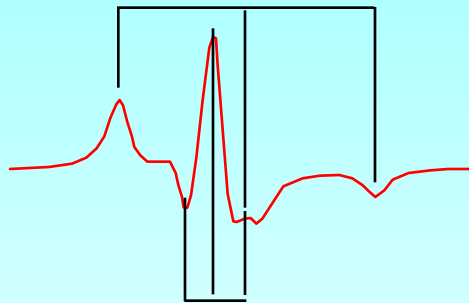
Изменения сигнала ЭТР при уменьшении S и возрастании угла отклонения конуса вращения γ



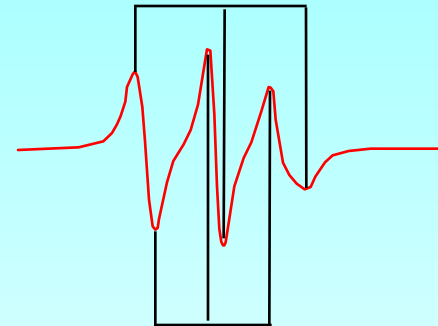
$S=1.0; \gamma=0^\circ$



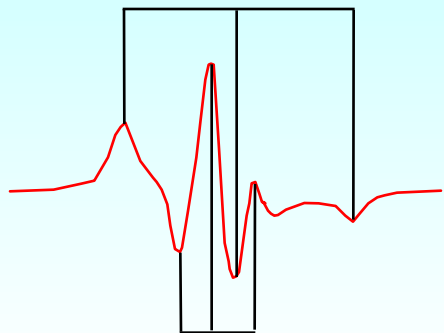
$S=0.4; \gamma=58.3^\circ$



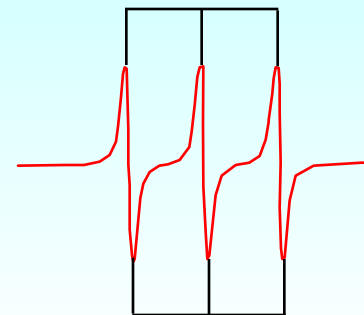
$S=0.8; \gamma=30.7^\circ$



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

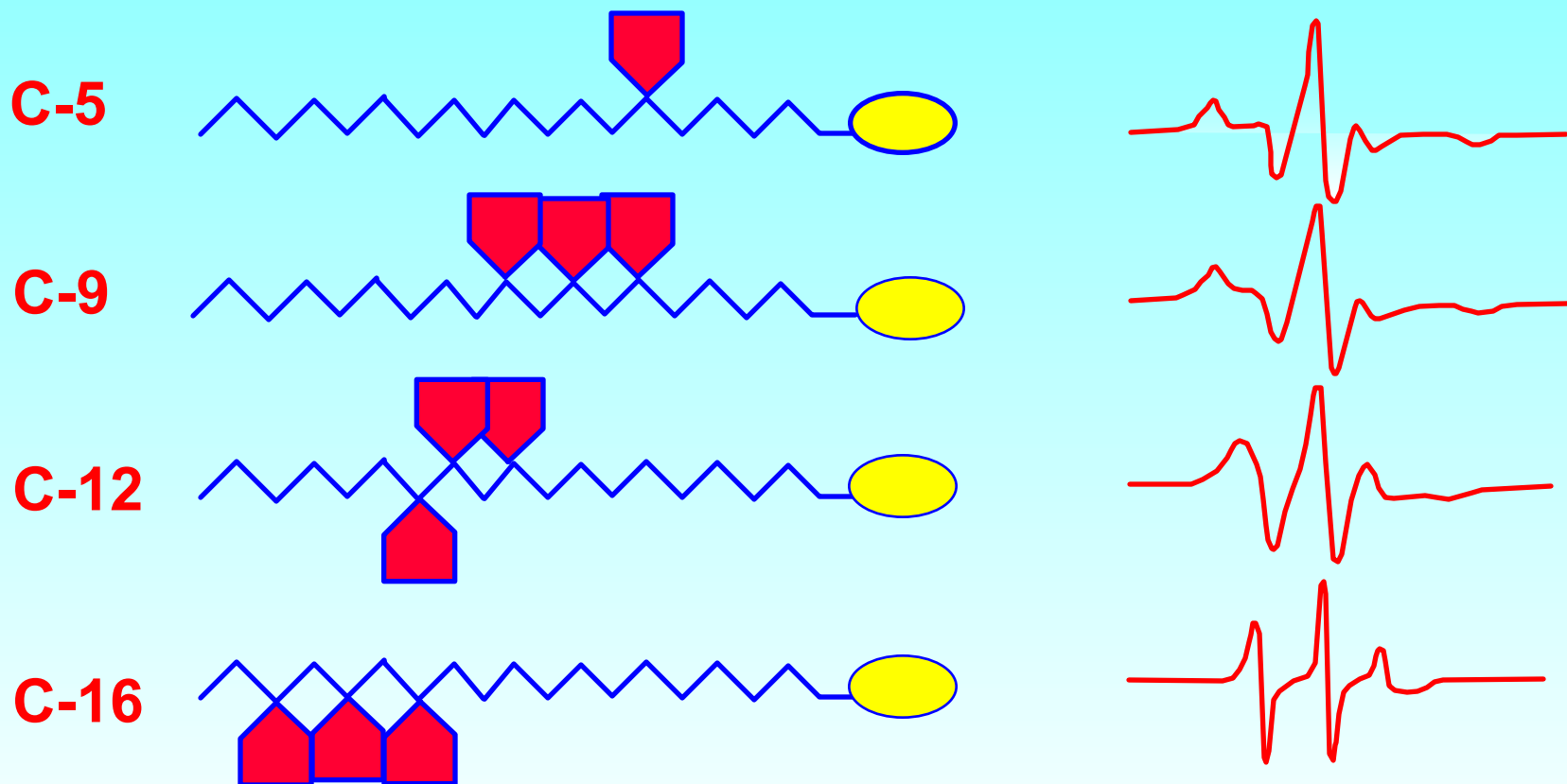


$S=0.6; \gamma=45.2^\circ$

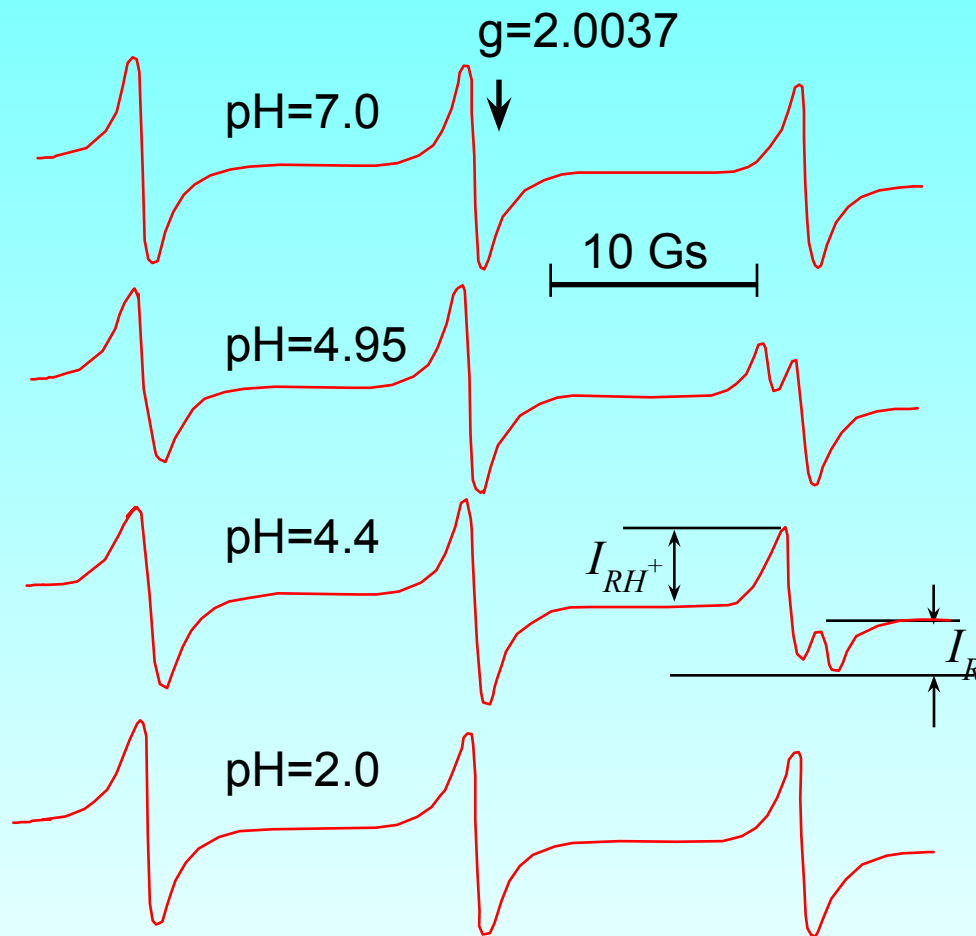


$S=0; \gamma=90^\circ$

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



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



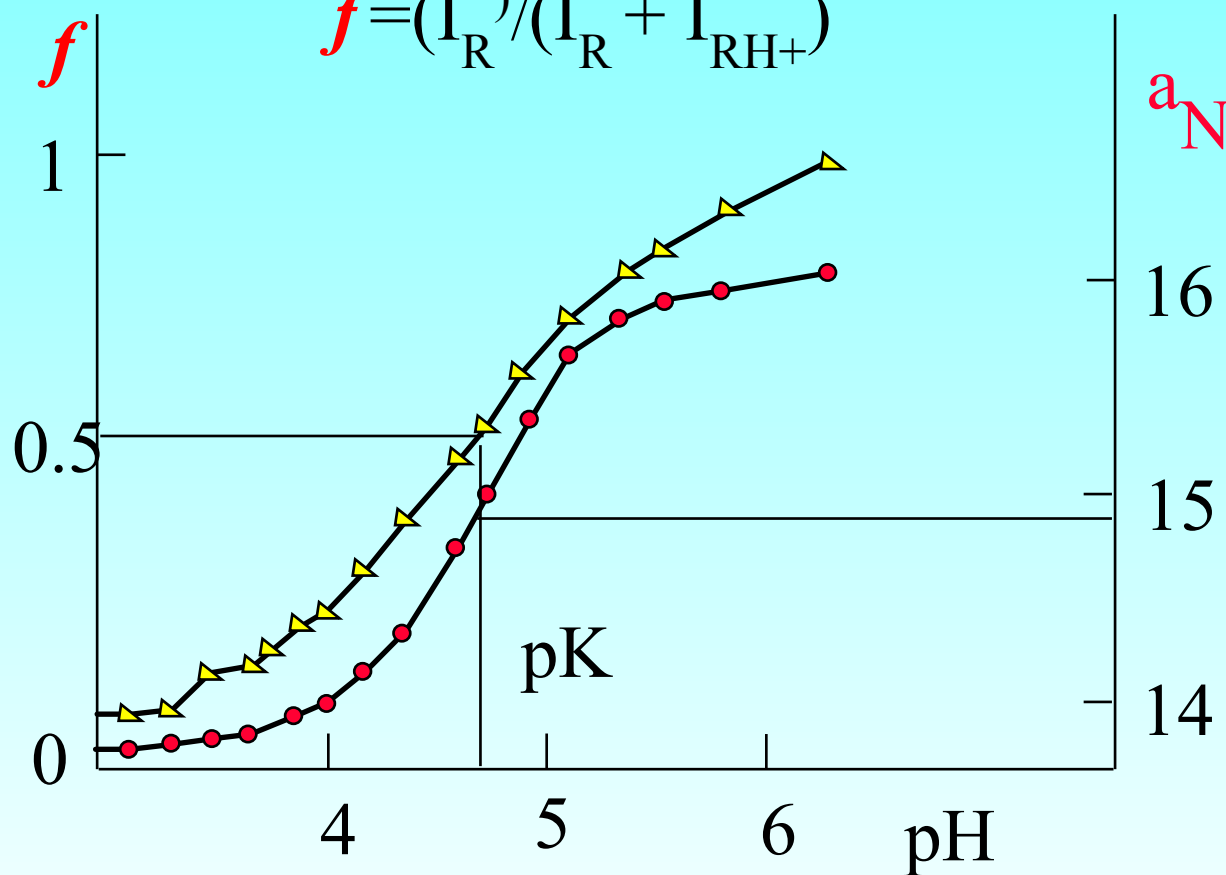
Казалось бы, что измерение рН достаточно легко и точно можно проводить с помощью рН-электродов, однако очень трудно если не невозможно измерить рН внутри лизосомы или фагоцитирующего лейкоцита. Для этих целей и применяют рН-чувствительные спиновые зонды. В основе метода рН-чувствительных зондов лежит 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

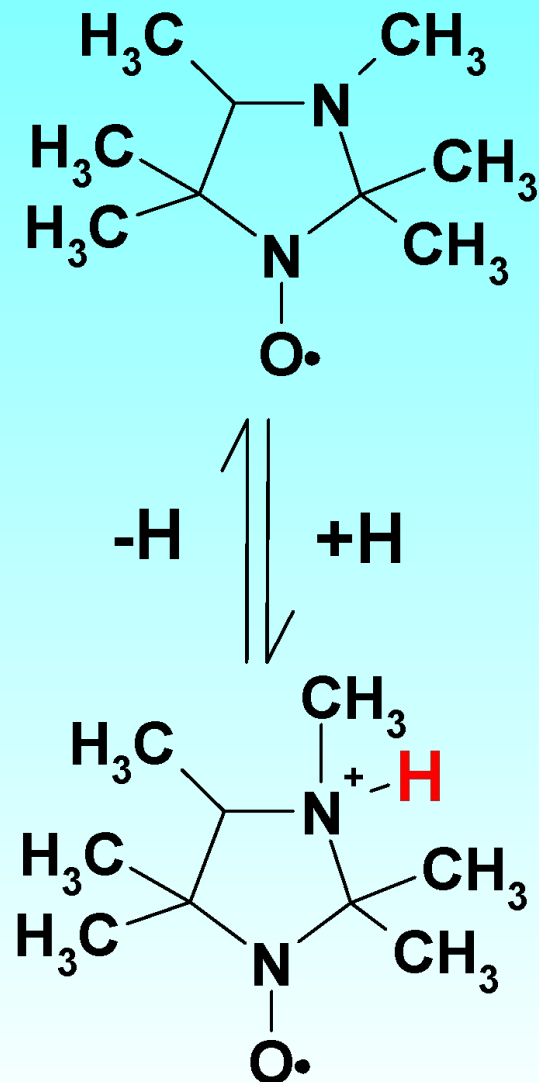
$$a_N = (a_N^R + a_N^{RH+})/2$$

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

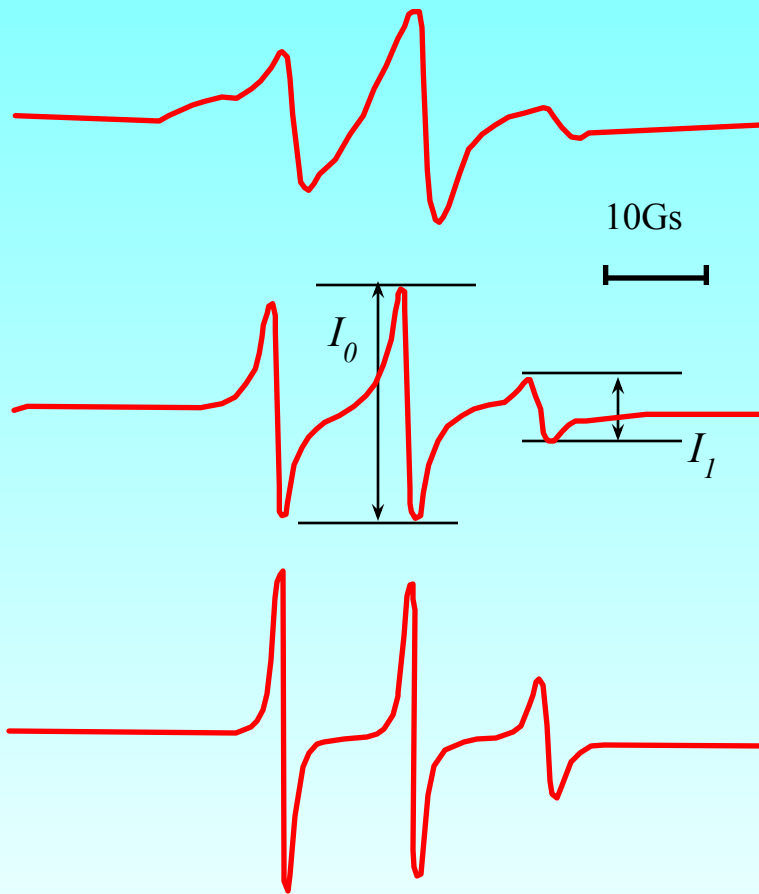


a_N^R и a_N^{RH+} константы СТВ радикалов R и RH⁺

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.

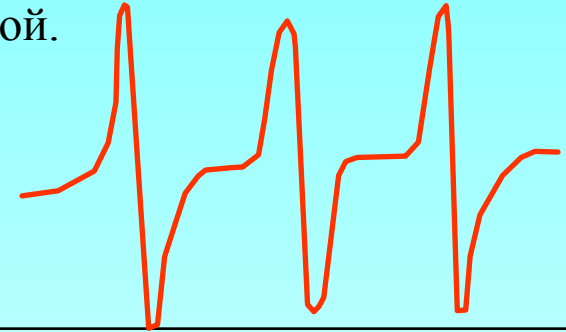
Соотношение величин I_0 и I_1 используется для количественной характеристики подвижности спиновой метки.

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

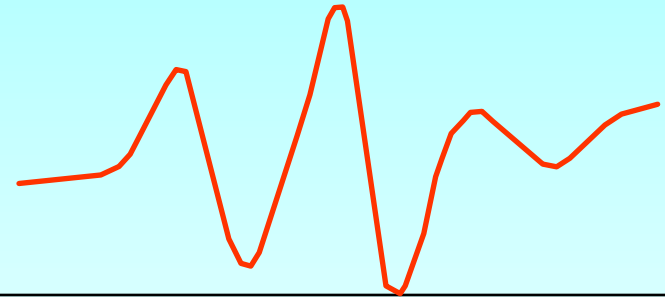
Спектры ЭПР спиновой метки при взаимодействии с SH-группами белка

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.

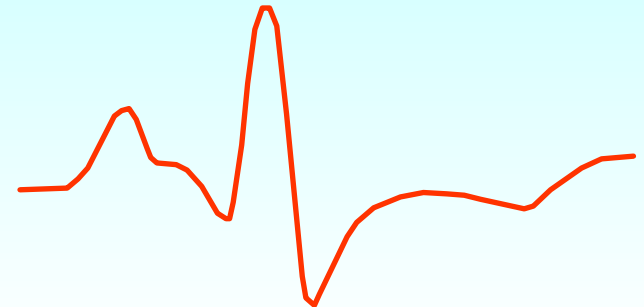
1. Водная фаза



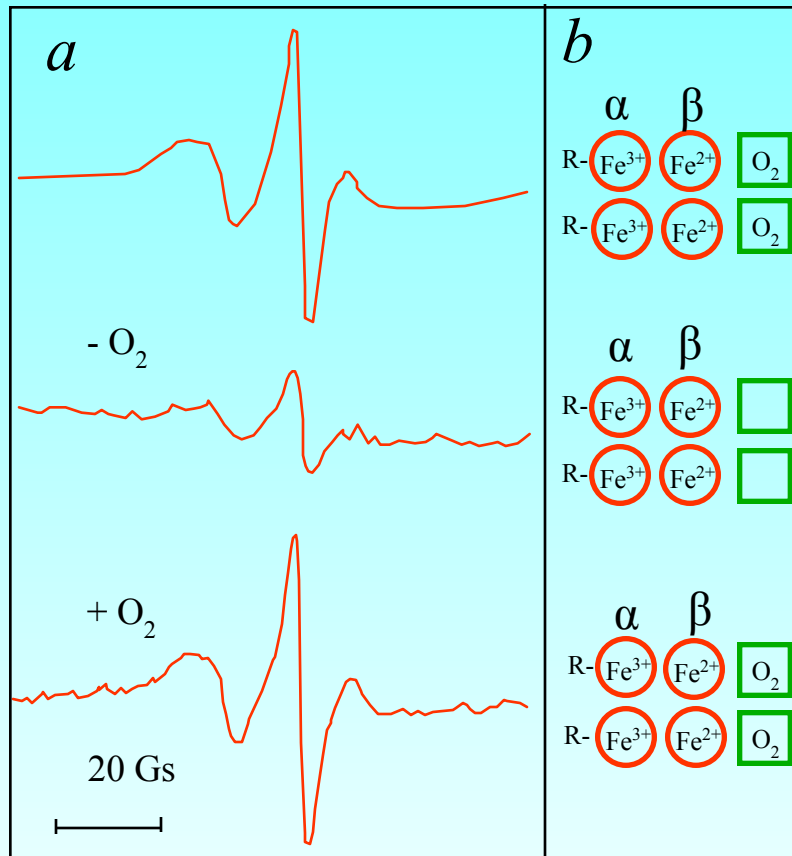
2. Поверхностный слой



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 α -цепи гемоглобина и присоединение O_2 к геминовой группе в β -цепях.

R - spin labels.

Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

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

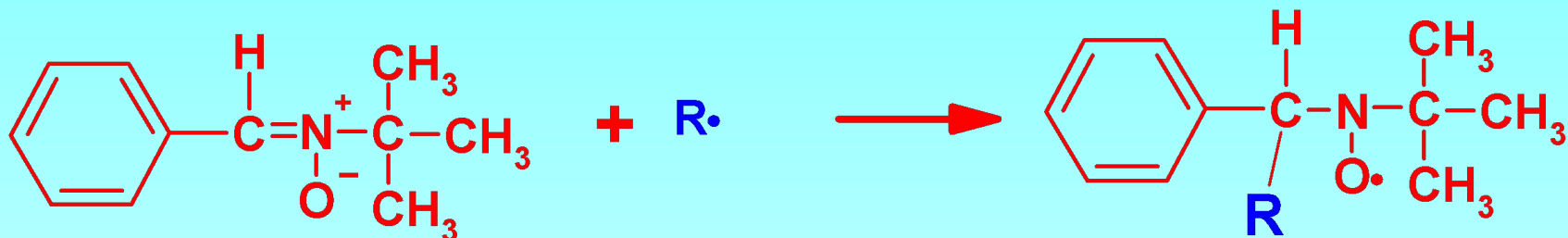
Основы метода спиновых ловушек (spin trapping assay)

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



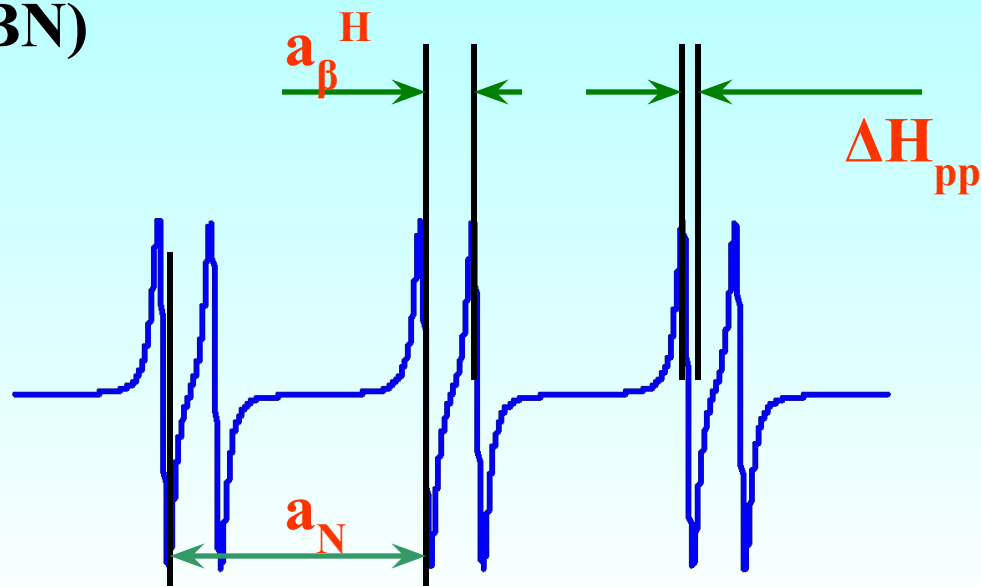
Предложен в 1965-67 независимо Кока Т. (Япония), R. Lagercranz (Швеция) и E. Janzen (Канада).

Характеристики спектра ЭПР спиновых аддуктов



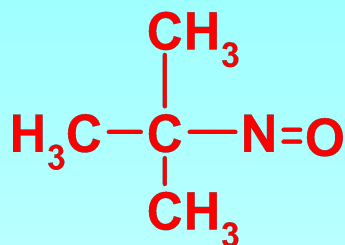
**α -фенил-N-трет-бутил
нитрон (PBN)**

PBN спиновый аддукт

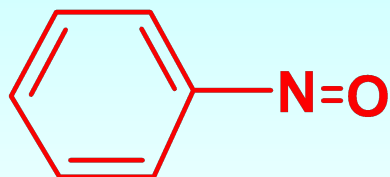


Основные виды спиновых ловушек

нитрозосоединения

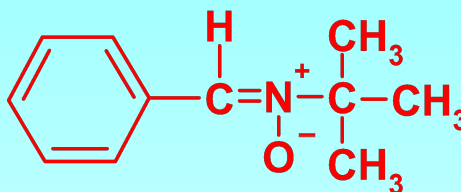


трет-нитрозобутан

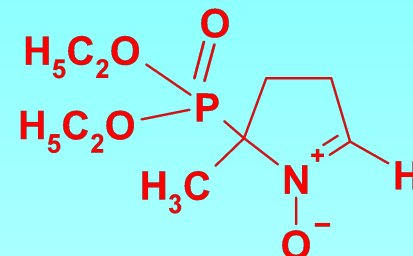


нитрозобензол

нитроны

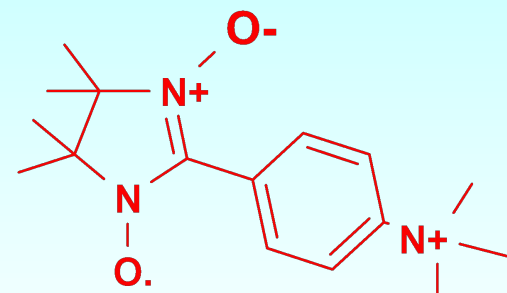


PBN

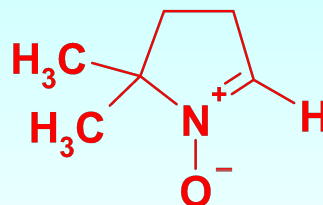


DEPMPO

Нитронил- нитроксилы



NNR



DMPO

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_β^H	ΔH_{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_β^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.