



Elektron Paramagnetsna Rezonancija

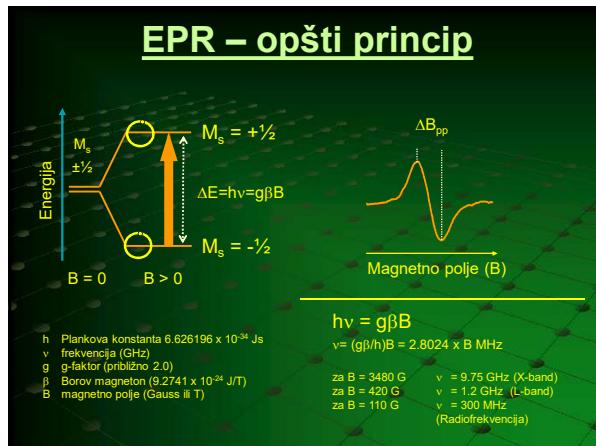
OSNOVNI PRINCIPI I NEKE PRIMENE

EPR je rezonantna apsorpcija mikrotalasnog zračenja od strane nesparenog elektrona u prisustvu magnetnog polja

Terminologija

Electron Paramagnetic Resonance (EPR)
Electron Spin Resonance (ESR)
Electron Magnetic Resonance (EMR)

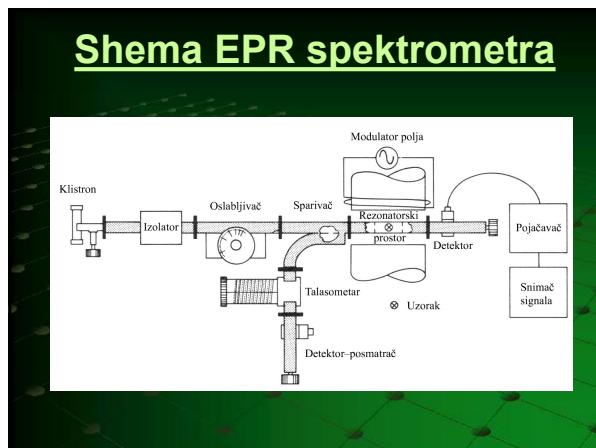
EPR = ESR = EMR



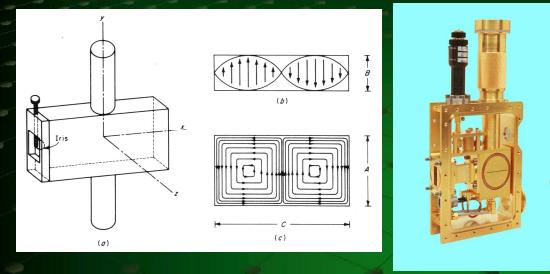
Kako se može dobiti EPR signal?

- © Drži se konstantna mikrotalasna frekvencija a kontinualno se menja magnetno polje (starije CW mašine)
- © Na konstantnom magnetnom polju primeni se puls elektromagnetičnih talasa (novije mašine) – analogno FT NMR

Razvoj pulsnih EPR spektrometara je dugo bio ograničen nepostojanjem elektronike koja radi u nanosekundnim režimima i koja može da registruje FID koji potiče od relaksacija elektrona (mikrosekunde ili manje).

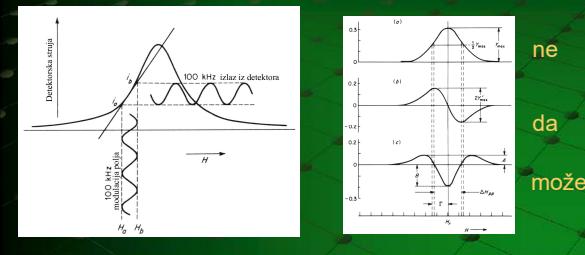


EPR cavity (rezonator)



Princip detekcije signala u EPR spektroskopiji modulacija magnetnog polja

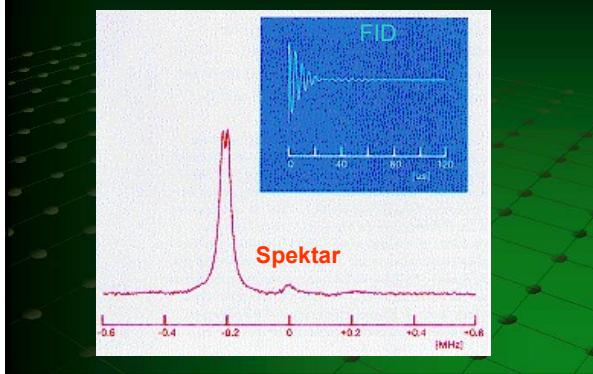
Modulacija magnetnog polja 'skenira' apsorpcionu liniju i EPR spektar je prvi izvod apsorpcione linije



Klasični EPR instrument



Pulsni EPR



Pitanje:

Čemu snimati spektar nesparenog elektrona i za to koristiti instrumente koji su jako skupi, ako se dobije samo ovo.. ?!



Odgovor:

Pitanje ne uzima u obzir različite interakcije spinova u sistemu i mogućnosti da se iz toga izvuku informacije o sistemu koji se istražuje

EPR Hamiltonijan

Opšti princip – čestice sa nesparenim spinovima rezonantno apsorbuju elektromagnetsko zračenje kada se nalaze u magnetnom polju

Ukupni Hamiltonijan

$$H_m = H_{BS} + H_{BI} + H_{SS} + H_{IS}$$

magnetska spinska energija

$$H_e = H_{Ee} + H_{Ek} + H_Q$$

elektrostatička energija

H_{BS} - Zemanova energija elektronskih spinova

H_{BI} - Zemanova energija nuklearnih spinova

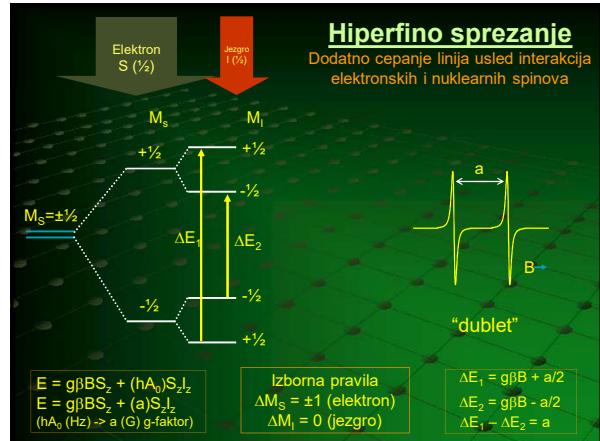
H_{SS} - interakcija elektronskih spinova sa elektronskim spinovima

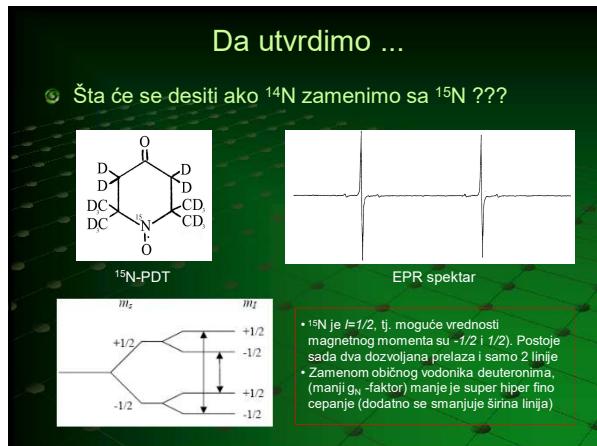
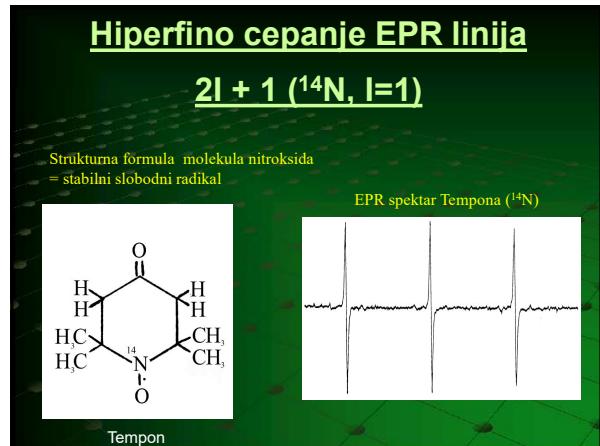
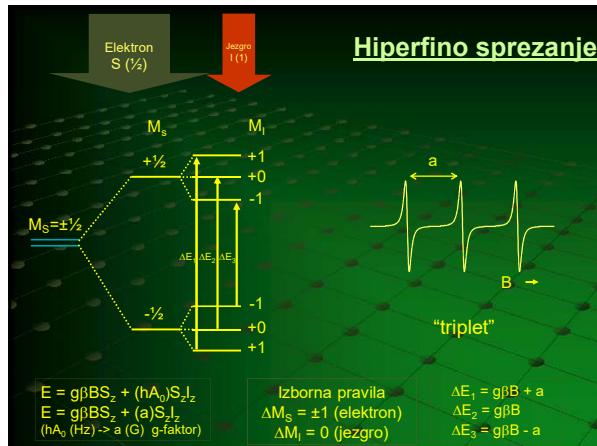
H_{IS} - interakcija elektronskih spinova sa nuklearnim spinovima

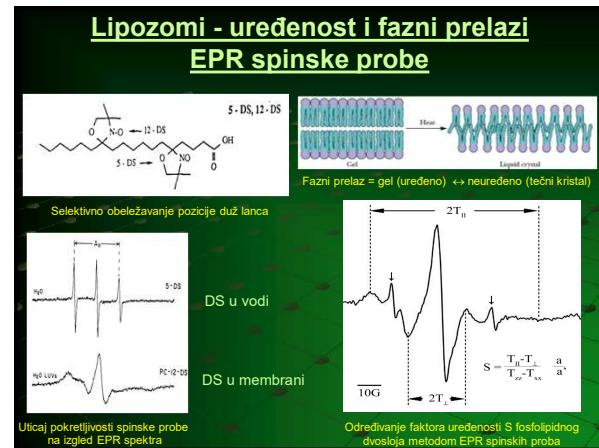
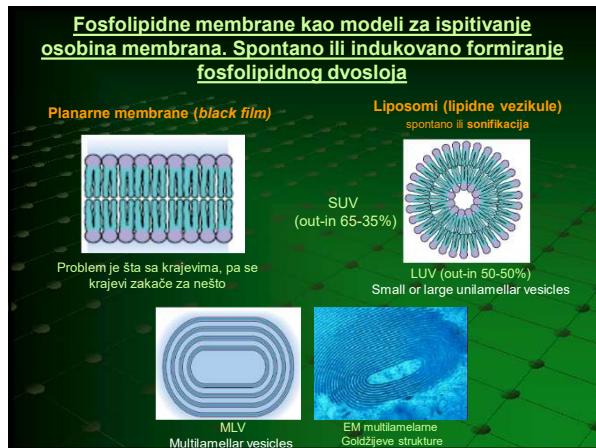
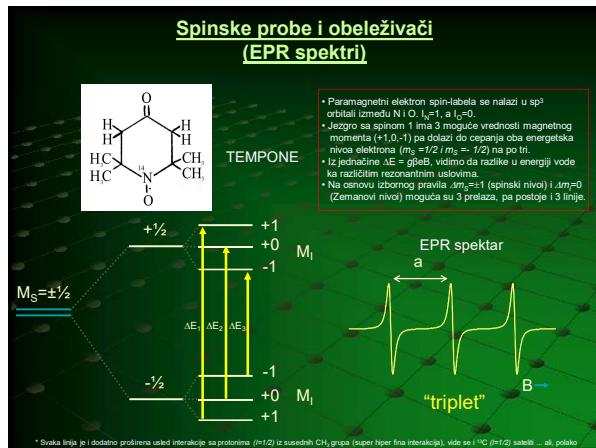
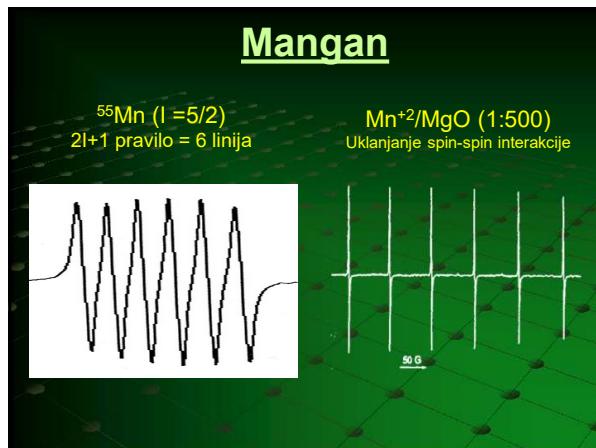
H_{Ee} - interakcija elektrona sa spoljašnjim električnim poljem

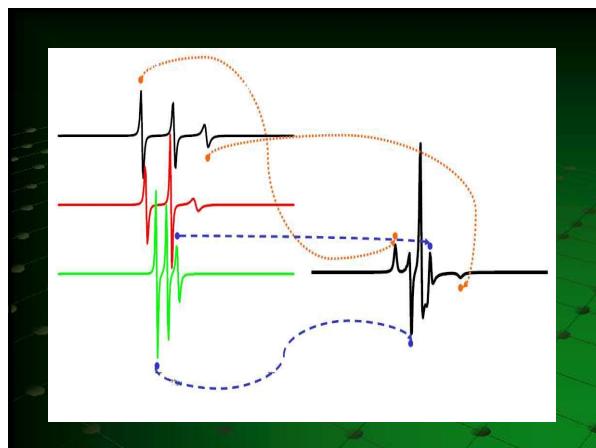
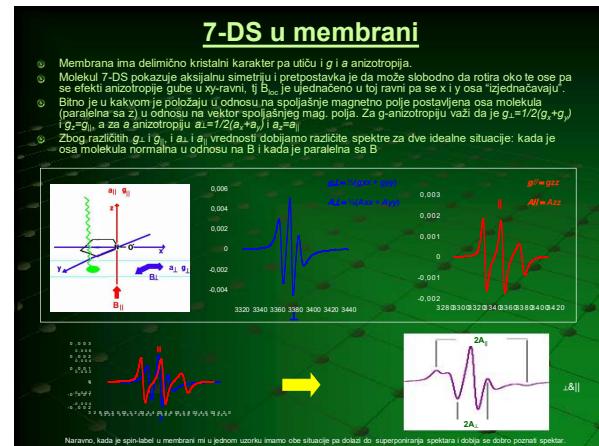
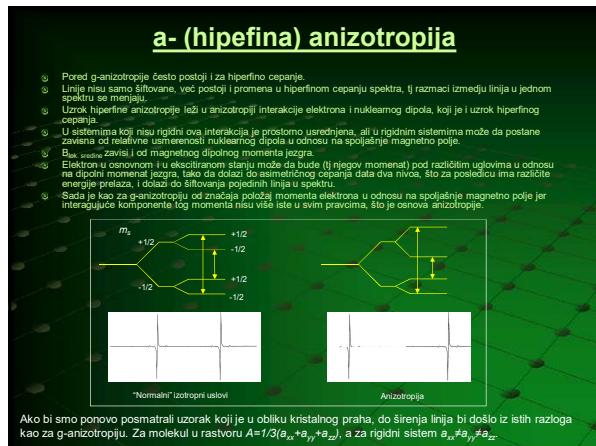
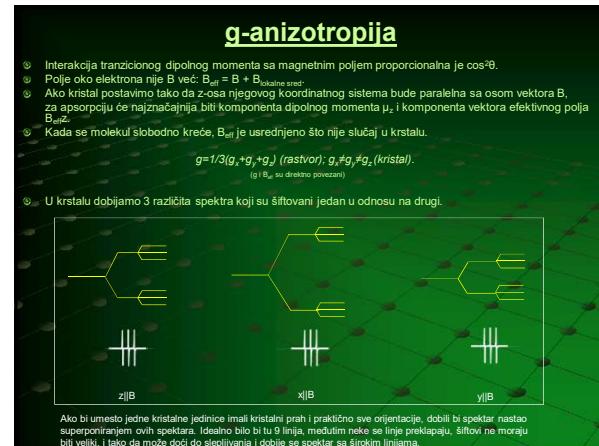
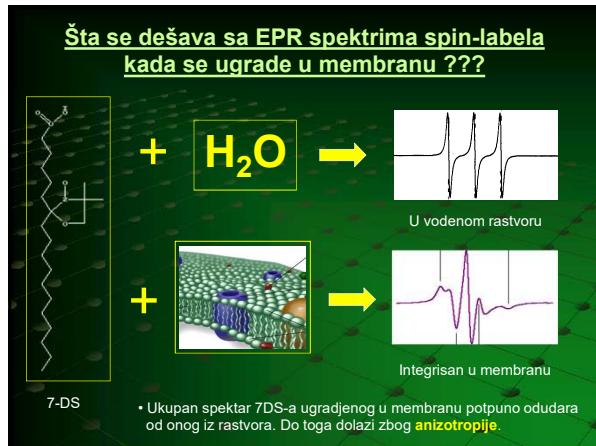
H_{Ek} - interakcija jezgra sa spoljašnjim električnim poljem

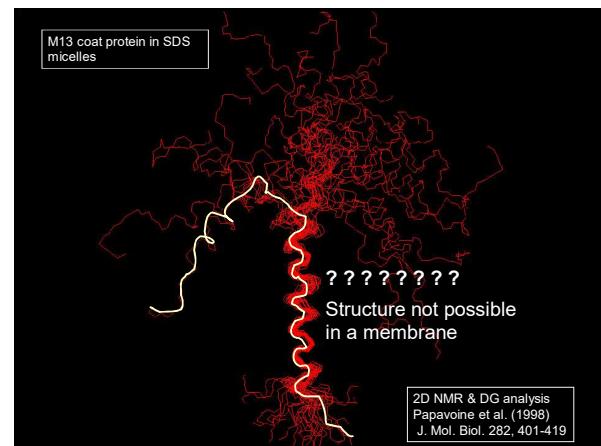
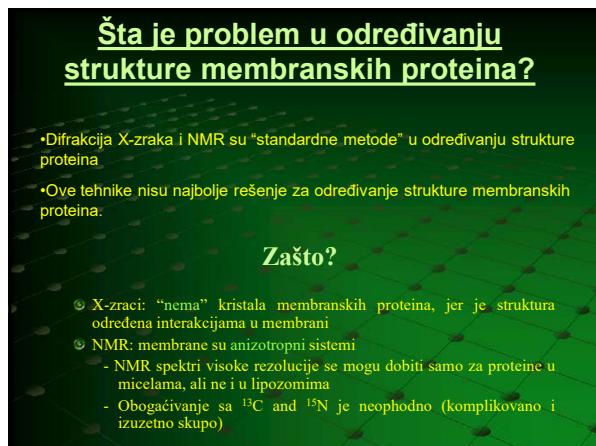
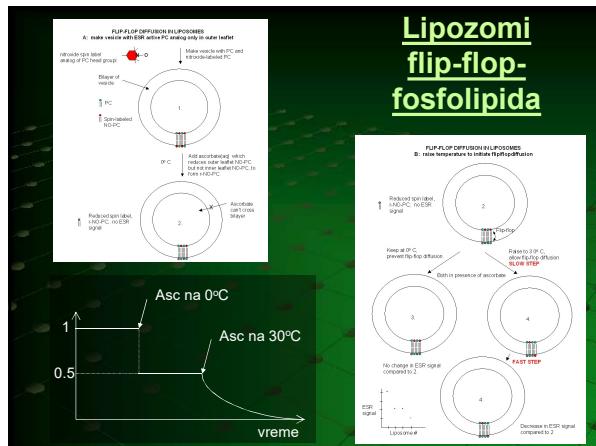
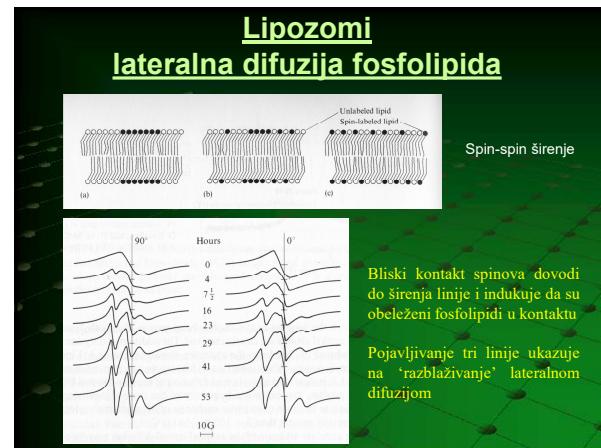
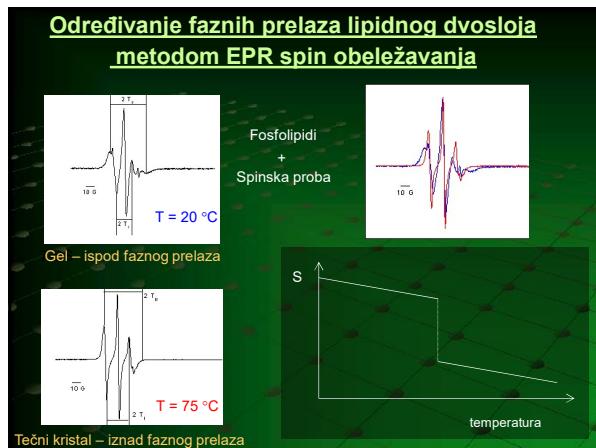
H_Q - električna kvadrupolna interakcija











Site-Directed spektroskopija

- Ispitivani protein: **M13 coat protein**
 - 50 amino kiselinskih ostataka
 - Transmembranski protein
- Spektroskopija bazirana na site-directed mutagenezi
 - Kao mesto oboježavanja koristi se Cys

- Počinje se sa proteinom bez Cys
 - Pripremi se mutant sa jednom Cys (relativno bezbedne mutacije Cys zamenjuje Ala, Ser, ili Thr)
 - Cys se oboježi podobnim oboježivačem za EPR ili fluorescentnu spektroskopiju
 - Protein se ubaci u fosfolipidni dvostroj

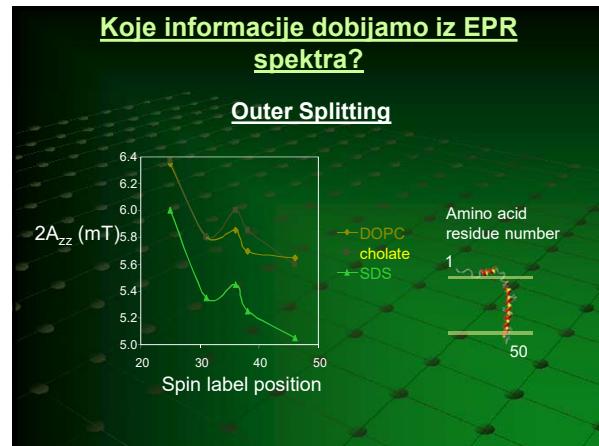
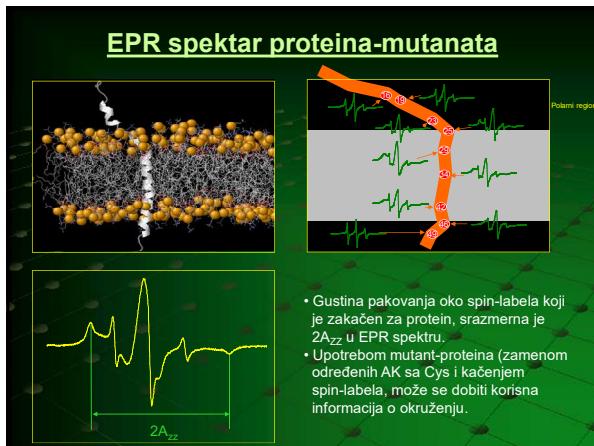
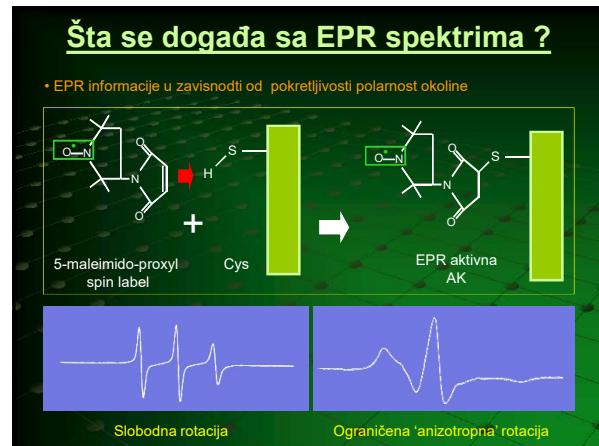


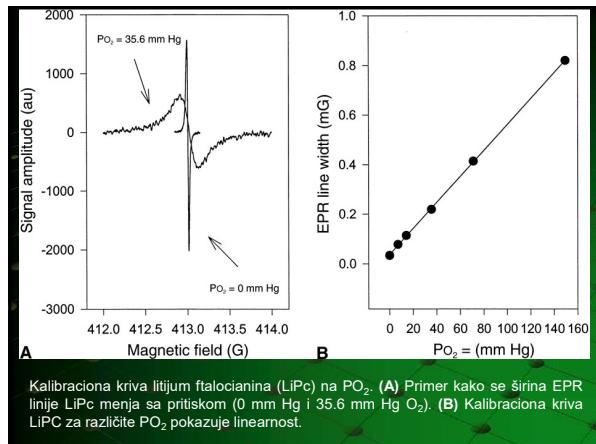
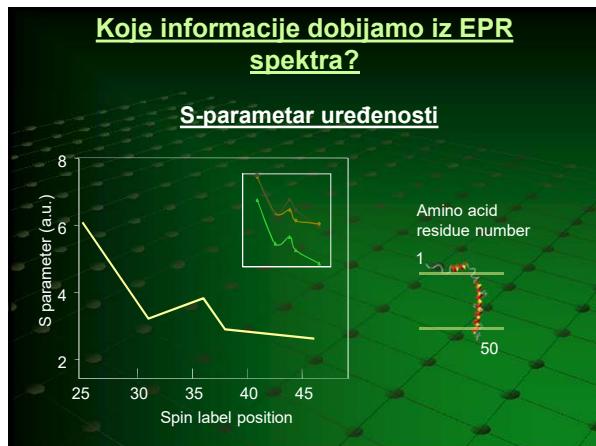
Oboježavanje spiskim oboježivačem

ZNACI:

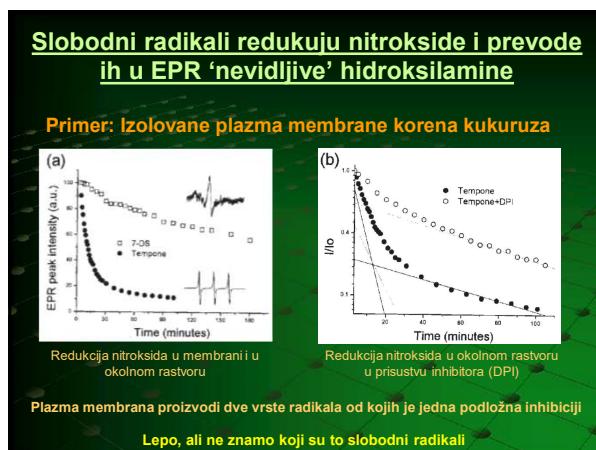
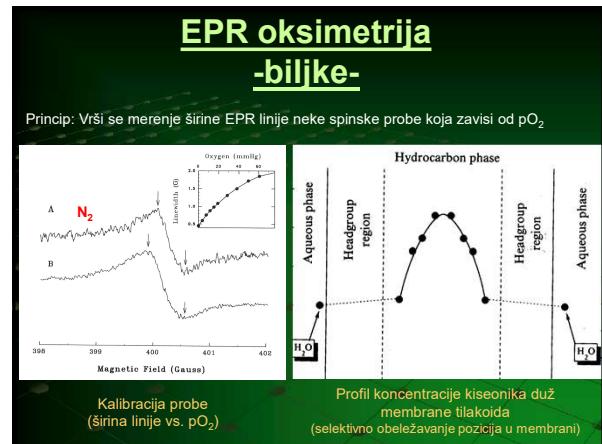
- Na Cys se nakači spin-label
- Može se raditi i izmena Ala, Ser ili Thr sa Cys (pravljenje protein-mutanata)
- Analiza EPR spektara dobijenih labela može nam pomoći da odredimo strukturu membranskih proteinâ.
- Evo kako se to radi ...

Reakcija maleimido-proxyl spin labela sa proteinom koji ima cisteine





Kalibraciona kriva litijum ftalocianina (LiPc) na PO₂. (A) Primer kako se širina EPR linije LiPc menja sa pritiskom (0 mm Hg i 35.6 mm Hg O₂). (B) Kalibraciona kriva LiPc za različite PO₂ pokazuje linearnost.



**Da li možemo koristiti EPR u biološkim sistemima
"in vivo" ili "ex vivo" ?**

Da! Ali postoji jedan "mali" problem!

Biološki uzorci su "vodeni" i zbog toga podležu nespecifičnoj (nerezonantnoj) apsorpciji mikrotalne energije, zato je dubina prodiranja mikrotalasa u uzorak mala. Ako povećamo mikrotalasu snagu, dubina prodiranja se povećava ali



Problem dubine prodiranja se može rešiti i smanjenjem frekvencije mikrotalasa.

Frekvencija	-300 MHz	-750 MHz	1-2 GHz	-3 GHz	9-10 GHz
Dubina prodiranja	> 10 cm	6-8 cm	1-1.5 cm	1-3 mm	1 mm
Biološki uzorak	Ljudi, pacov	Pacov, miš	Miš, srce pacova	Mišji rep, koža	Uzorci "in vitro" (~100 µl)

Da, ali smanjenje frekvencije smanjuje vrednost B_0 a time i osetljivost
Nema EPRI za lude i verovatno ga nikada neće biti :(
EM zračenje slab i zbog dielektričnih gubitaka (B prolazi ali ne E jer mi nismo čista voda)

EPRI
(Electron Paramagnetic Resonance Imaging)

- Dobijanje slike pomoću EPR-a (Spectral-spatial CW-EPRI):

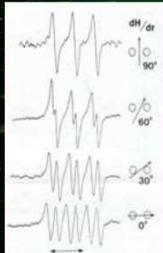
Kako saznati prostorni položaj paramagnetičnih vrsta?
Princip je menjati orientaciju **gradijenta** magnetnog polja u odnosu na uzorak i zatim uraditi rekonstrukciju slike.

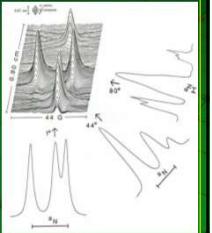
Kako napraviti sliku u više od 1 dimenzije?
Praviti gradijente B duž svih osa (X,Y,Z).

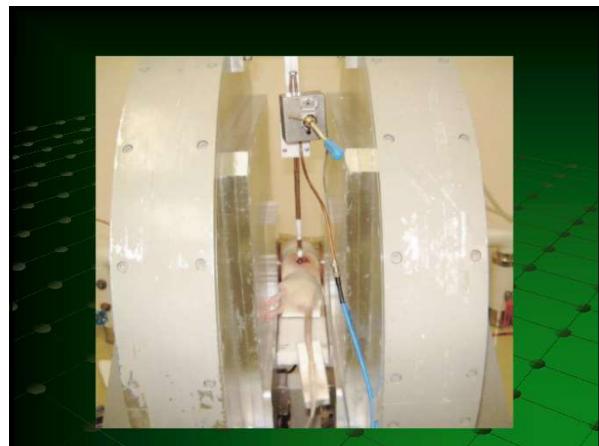
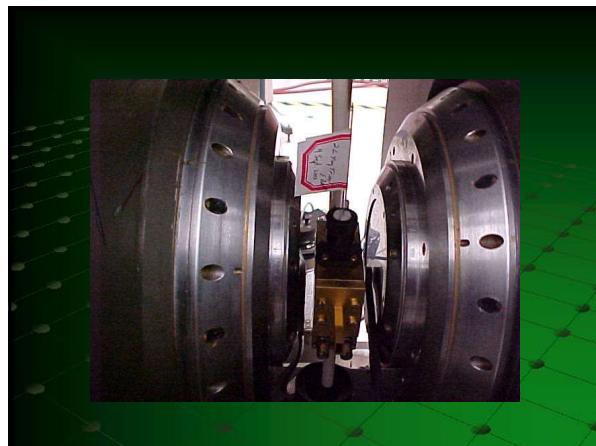
Problemi?

Uzorci često nemaju samo 1 pik (kao H u NMR-u) a širina signala utiče na preklapanje pikova.

Sta je dobro?
Može se praviti image bilo čega što utiče na EPR spektar (ne samo 3D image već + nova dimenzija kao osobina sistema).


Zavisnost oblika EPR signala iz 2 lastova nitroksida od smere orisiranja magnetnog polja B


Spectral-spatial X-band CW-EPR Image



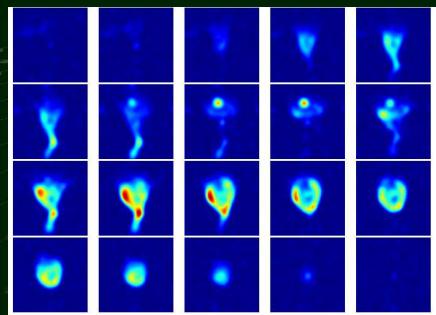
Imidžing korišćenjem EPR-a

- Direktna detekcija kontrastnog agensa pomoću EPR-a
- Korišćenje gradijenata magnetnog polja i generisanje (kolekcija) slike
- Imidžing distribucije spinske probe
- pO_2 mape dobijaju se preko T_2^*W imidžinga



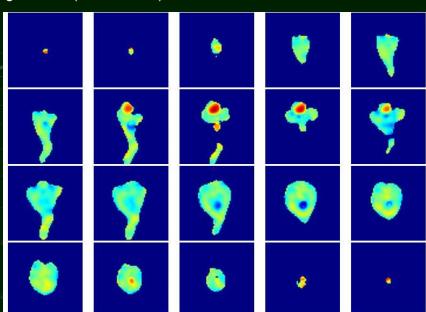
Intensity Image

Sagital View (1mm Slices)



Line Width Image

Sagital View (1mm Slices)



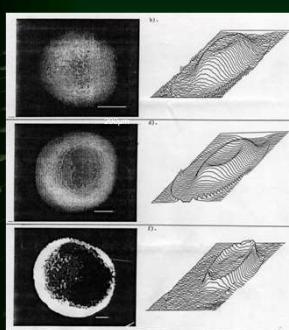
MRI v.s. EPRI

- Postoje bitne razlike u osobinama jezgara i elektrona (žiromagnetski odnosi, hiperfine konstante cepljanja, relaksaciona vremena).
- Zbog toga se MRI uvek izvodi u pulsnom režimu (RF-puls + frekventni, fazni i "slice" gradijenti magnetnog polja, uz razne sekvence tipa spin-echo.., 2D FT i rekonstrukcije slike iz voxela).
- EPRI se često izvodi u CW režimu uz rotirajuće magnetne gradijente.
- MRI ima do 10^6 puta veću koncentraciju spinova u sistemu, kao i do 10^6 duže relaksaciono vreme za te iste spinove.
- Prosečna širina EPR pikova je znatno veća u odnosu na raspoloživ opseg magnetnog polja u odnosu na NMR signal H koji se posmatra u MRI.
- Pulski EPRI zato zahteva vrlo preciznu i naprednu elektroniku uz brze računare koji će zadavati sekvence i dešifrovati dobijene rezultate.

	NMR imaging	EPR imaging
T_1	hundreds of ms to seconds	5.9-6.2 μs trityls; <1 μs nitroxyls
T_2	tens of ms to seconds	4.3-5.3 μs trityls; <0.5 μs nitroxyls
echo time	tens of ms	a few μs

EPRI primena

EPR i tumori *in vitro*



Objekat:
Sferoidi (model za solidne tumore)

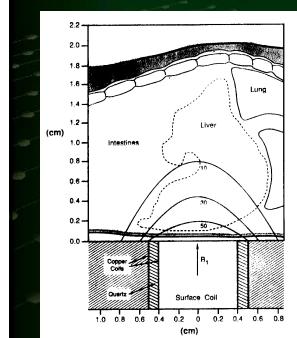
Cilj:
Ispitivanje viabilnosti tumora

Tehnika:
X-band EPRI

Senzor:
 $^{15}\text{N-PDT}$ (sve ćelije)
'Kontrastni agens':
Fe ('mrtve' ćelije)

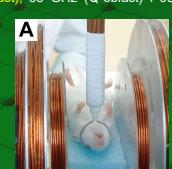
$^{15}\text{N-PDT}$ ulazi svuda a Fe-kompleks ulazi samo u mrtve ćelije (a ne i u žive).

In vivo spektroskopija - površinska zavojnica-



- Princip EPR snimanja putem korišćenja površinske zavojnice
- Dubina prodiranja bitno zavisi od frevencije mikrotalasa (dielektrične osobine i E vektor EM zračenja)

- Koriste se manje frevencije mikrotalasa (sve smo bliže RF oblasti) (L, S, X band).
- Da se podsetimo:
1-2 GHz (L-oblaster), 2-4 GHz (S-oblaster),
8-10 GHz (X-oblaster), 35 GHz (Q-oblaster) i 95 GHz (W-oblaster)



Surface-coil
resonator

