



# EPRI

## princip metode i primene u biofizičkoj hemiji



Miloš Mojović

# Elektron Paramagnethna Rezonancija

## OSNOVNI PRINCIPI I NEKE PRIMENE

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

### Terminologija

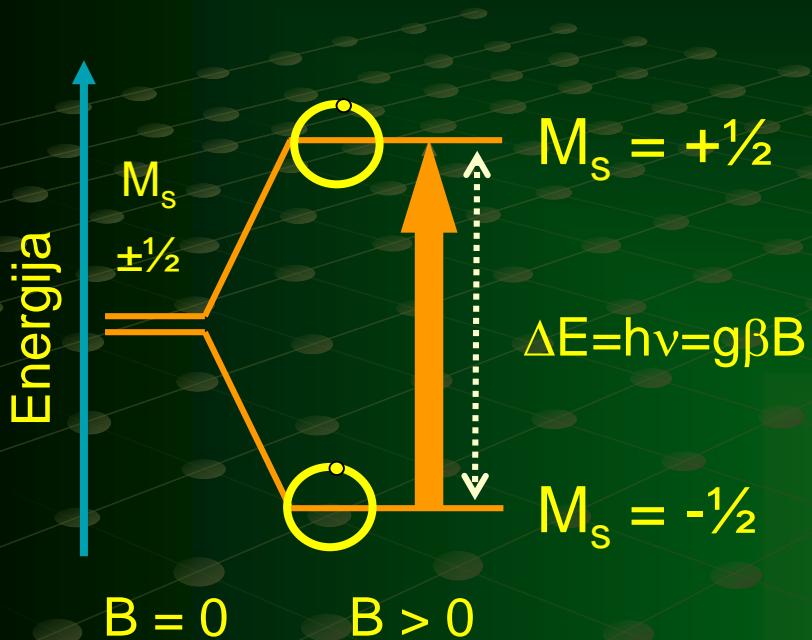
Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

Electron Spin Resonance (ESR)

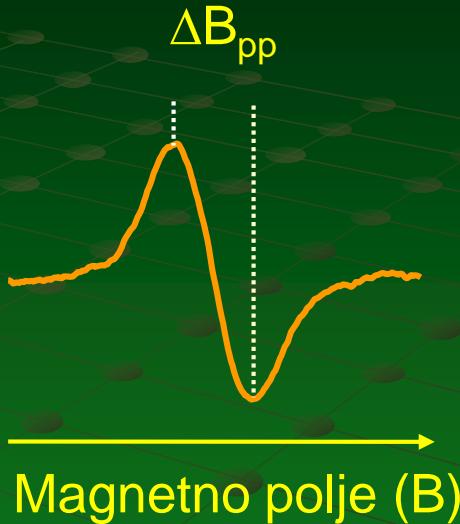
Electron Magnetic Resonance (EMR)

EPR = ESR = EMR

# EPR – opšti princip



h Plankova konstanta  $6.626196 \times 10^{-34}$  Js  
ν frekvencija (GHz)  
g g-faktor (približno 2.0)  
β Borov magneton ( $9.2741 \times 10^{-24}$  J/T)  
B magnetno polje (Gauss ili T)



$$\hbar\nu = g\beta B$$
$$\nu = (g\beta/h)B = 2.8024 \times B \text{ MHz}$$

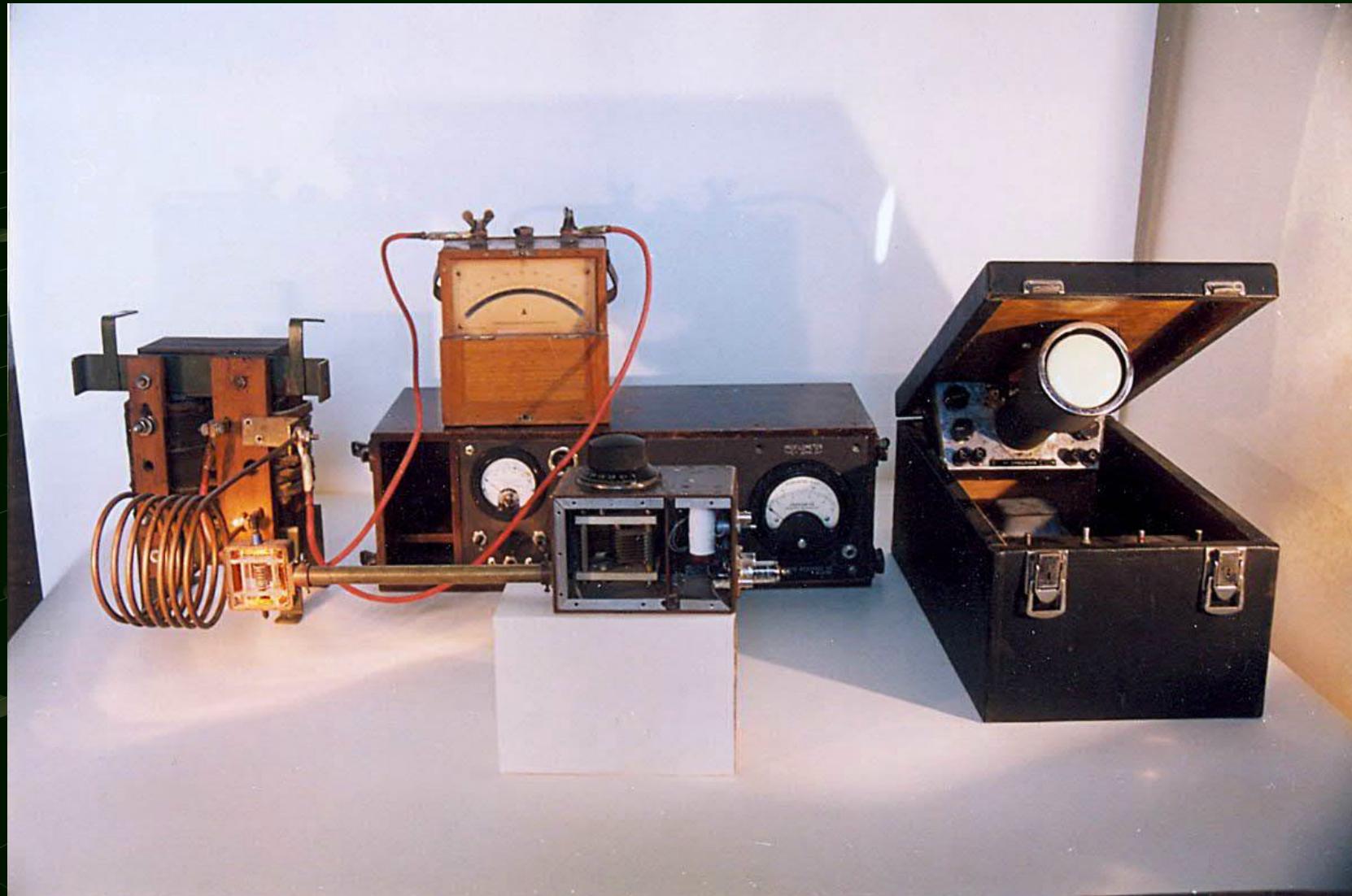
za  $B = 3480$  G       $\nu = 9.75$  GHz (X-band)  
za  $B = 420$  G       $\nu = 1.2$  GHz (L-band)  
za  $B = 110$  G       $\nu = 300$  MHz (Radiofrekvencija)

# 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 elektromagnetsnih 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).

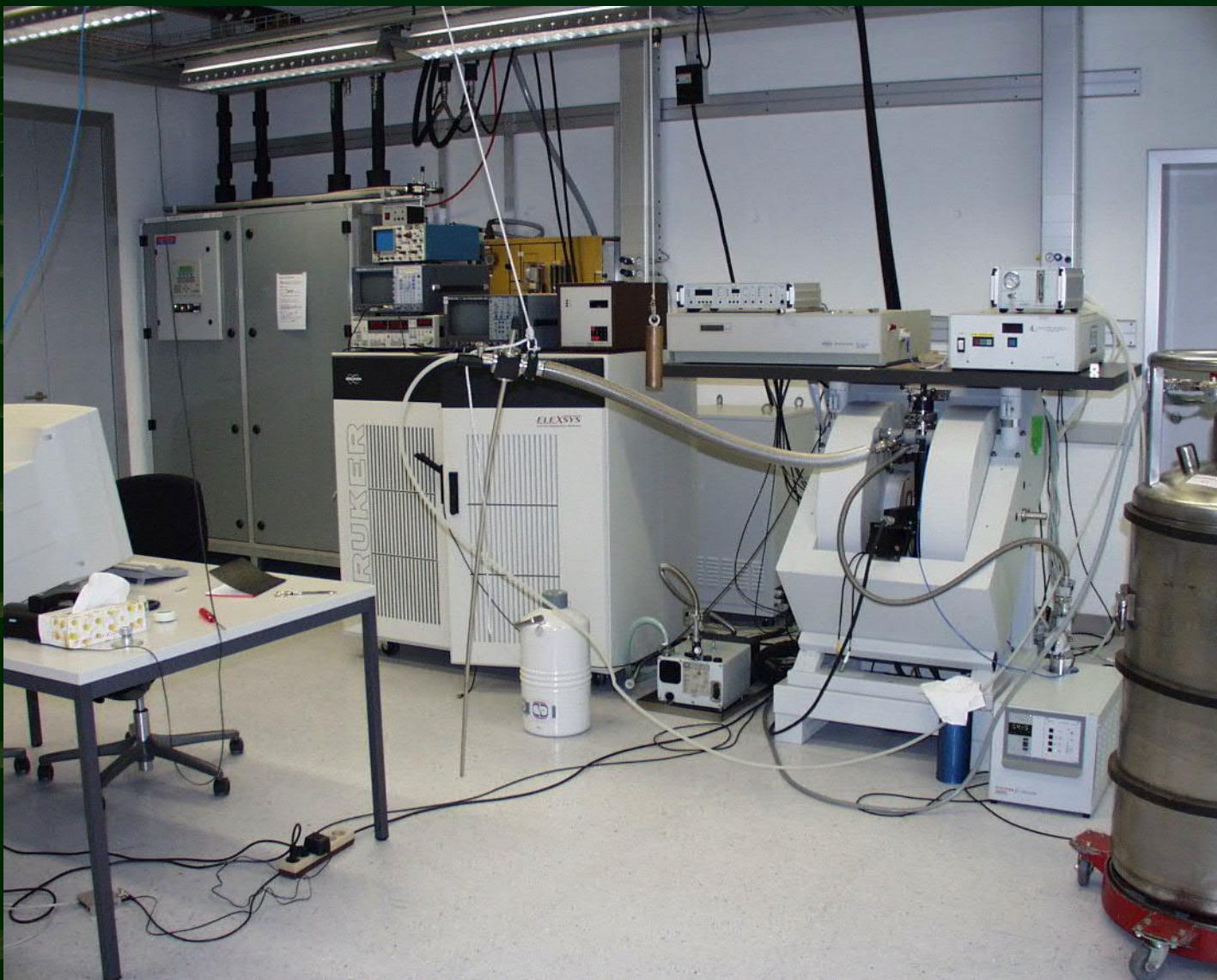
*First EPR machine of E. Zavoisky: 10 MHz (still working)*



# *Bruker Elexsys 580/680 (2006): X and W -bands*



# Klasični EPR instrument



# Da li možemo koristiti EPR u biološkim sistemima

## "in vivo" ili "ex vivo" ?

Microwave Band	Frequency (GHz)	$B_{res}$ (G)
L	1.1	390
S	4.0	1430
X	9.75	3480
Q	34.0	12100
W	94.0	33500

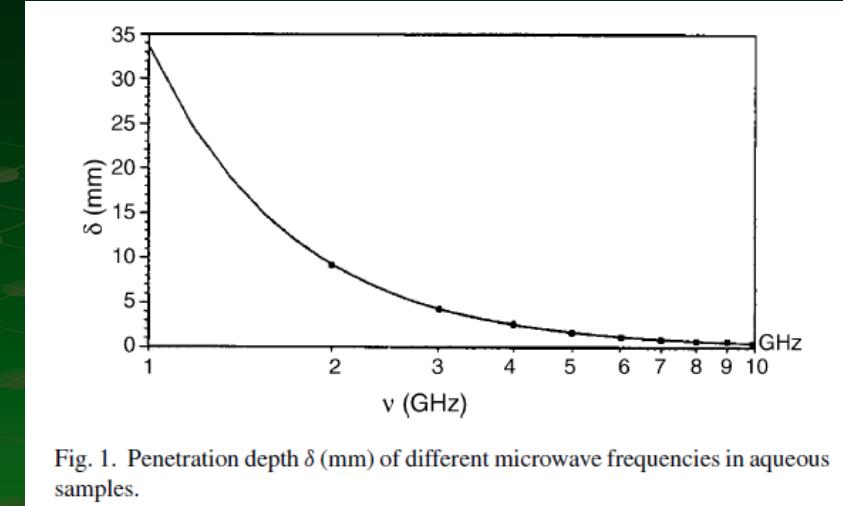


Fig. 1. Penetration depth  $\delta$  (mm) of different microwave frequencies in aqueous samples.

Penetration depth  $\delta$  of microwaves of different frequencies and the minimum number of detectable spins

Frequency $\nu_0$ (GHz)	Penetration depth $\delta$ (mm)	Number of spins $N_{min}$ /concentration
9.5 (X-band)	0.5	$10^{12} = 10^{-9} M$
3.0 (S-band)	5.0	$10^{11} - 10^{13} = 10^{-6} - 10^{-8} M$
1.0 (L-band)	10.0	$10^{12} - 10^{14} = 10^{-7} - 10^{-5} M$

Da, ali smanjenje frekvencije smanjuje vrednost  $B_0$  a time i osetljivost EPR

$$hv = g\beta B_0$$

EM zračenje slab zbog dielektričnih gubitaka (B prolazi ali ne E jer mi nismo čista voda)

# Snimanja u L-oblasti:



- 1) Mogu se raditi i EPR spektroskopska i EPR imidžing (1D, 2D, 3D) merenja.
- 2) Životinja se može termostatirati (tokom anestezije) i imamo joj pristup tokom merenja.
- 3) Površinska zavojnica ima prodornost 1-2cm u tkivo.
- 4) EPR imidžing snimanja traju minimalno 20min i za to vreme objekat mora da miruje (toleriše se disanje i manja pomeranja tokom trajanja anestezije).

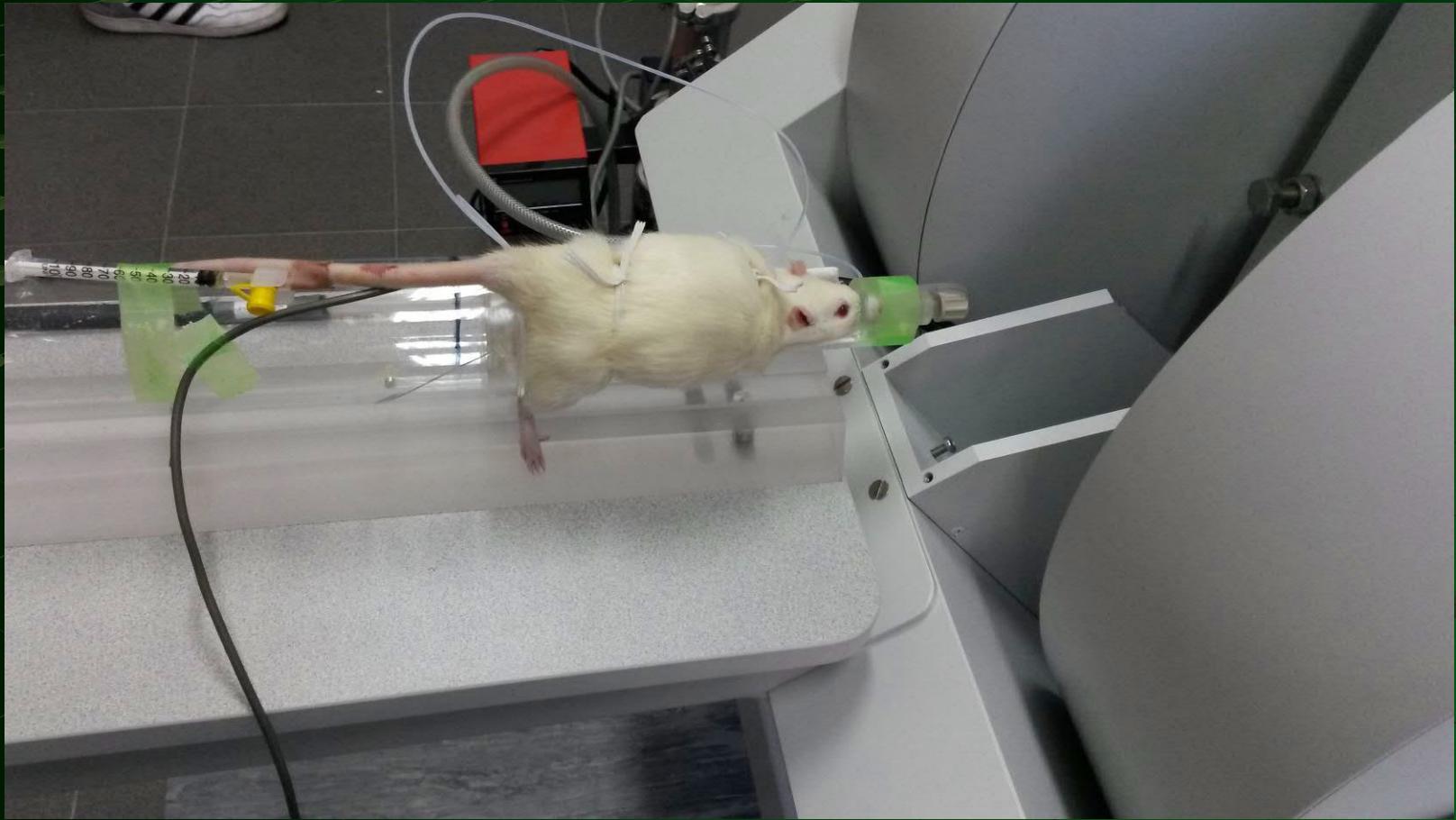
# Snimanje miša



# Snimanje miša



# Snimanje pacova

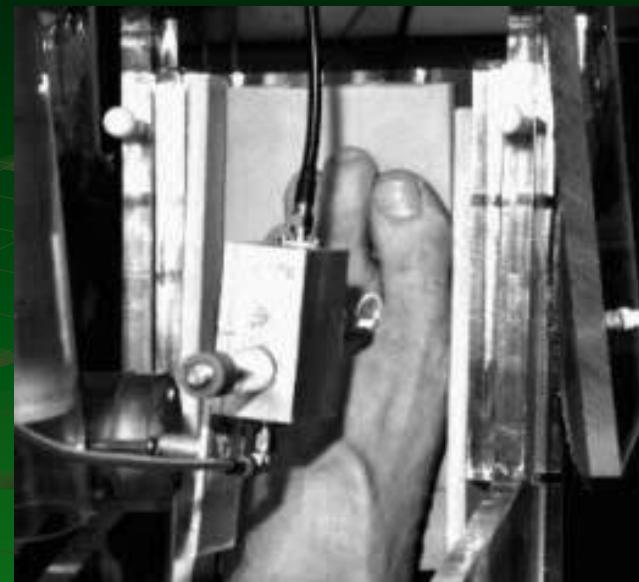




# Snimanje pacova



# Postoji i EPR za ljudе ...



A platform to position and stabilize the foot for measurements of pO<sub>2</sub> in the foot.

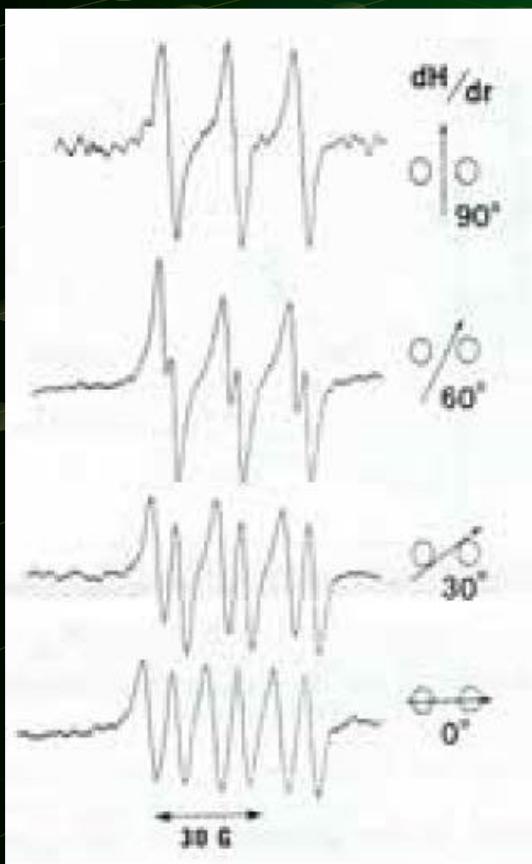
NMR IN BIOMEDICINE NMR Biomed.  
2004;17:335–351

The subject can lie on the bed that slides into the gap between the sides of the magnet. The volunteer has a tooth dosimeter resonator placed in the mouth

# EPRI

## (Electron Paramagnetic Resonance Imaging)

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



Zavisnost oblika EPR signala iz 2 rastvora nitroksida od smera gradijanta magnetnog polja  $B$ .

Kako saznati prostorni položaj pramagnetičnih vrsta?

Princip je menjati orijentaciju **gradijenta** magnetnog polja u odnosu na uzorak i zatim uraditi rekonstrukciju slike.

Kako napraviti sliku u više od 1 dimenzije?

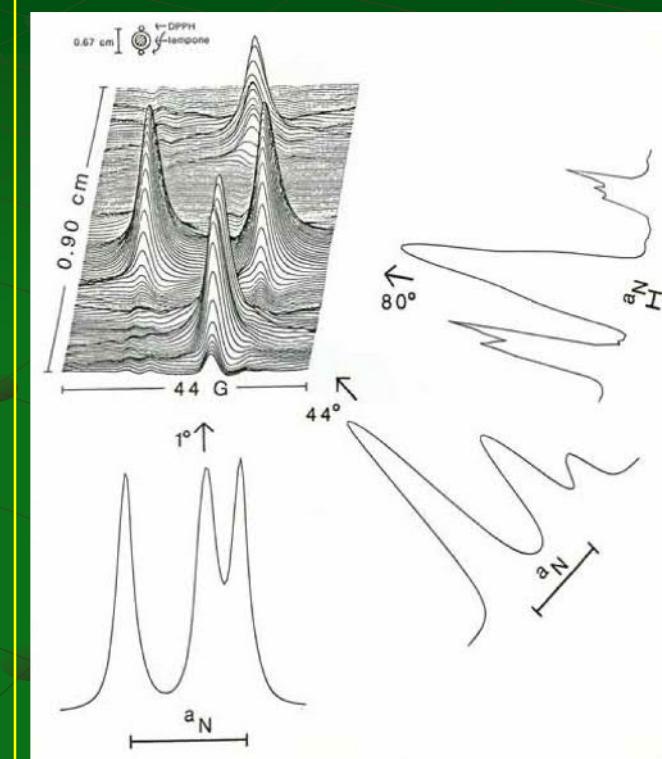
Praviti gradijente  $B$  duž svih osa (X,Y,Z).

Problemi?

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

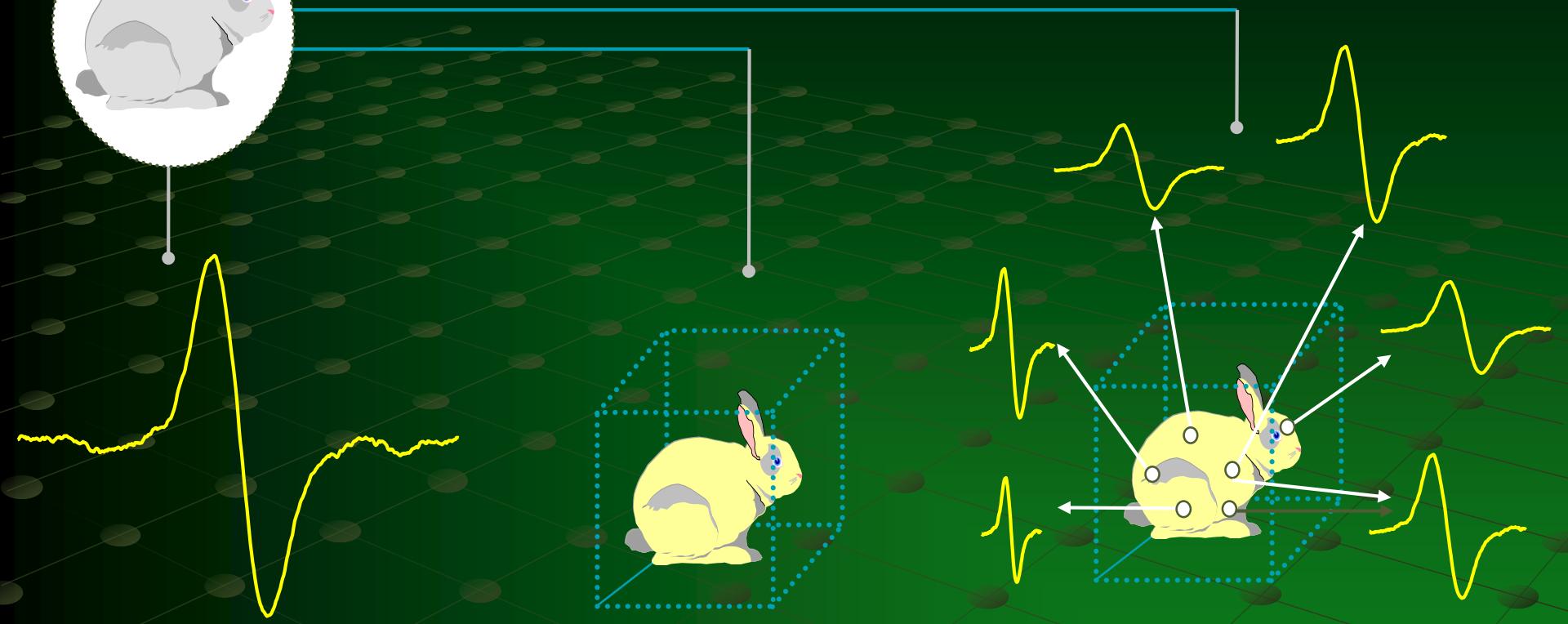
Sta je dobro?

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



Spectral-spatial X-band CW-EPR image

# EPRI se može koristiti za merenje distribucije paramagnetnih vrsta u tkivu



EPR spektroskopija

Nema prostorne raspodele

0 + 1 dim.

EPR prostorni imidžing

Postoji prostorna raspodela  
Spinske gustine

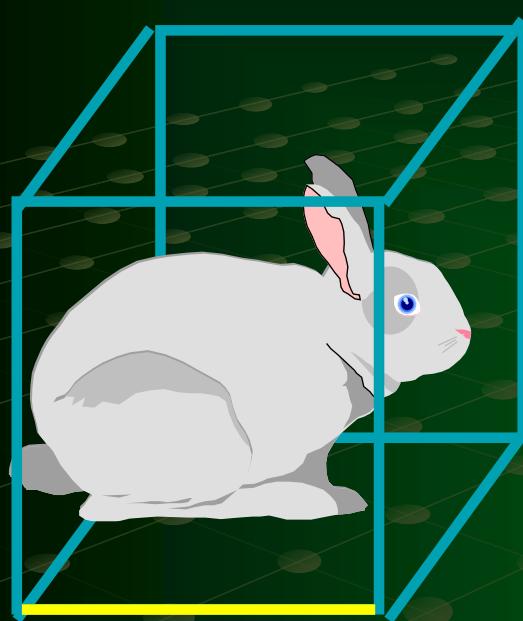
3 + 0 dim.

Spektranlo-prostorni imidžing

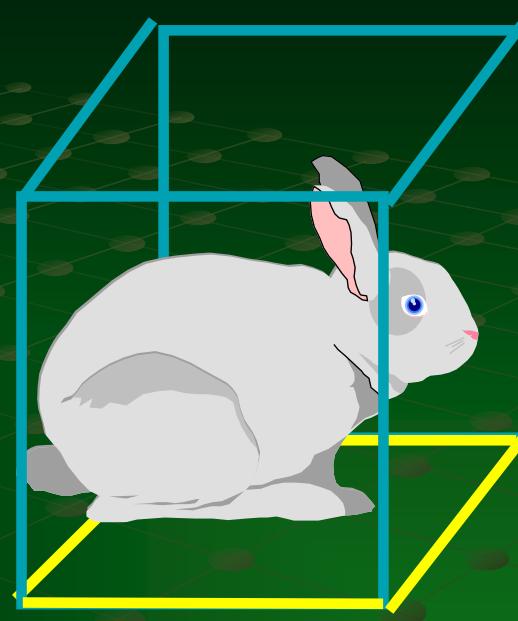
Prostorna raspodela +  
Izgled spektra

3 + 1 dimensional

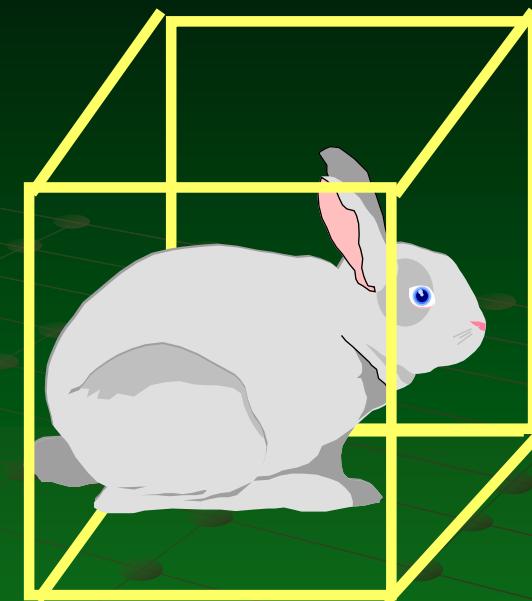
# Tipovi prostornog imidžinga



1D PROSTORNI



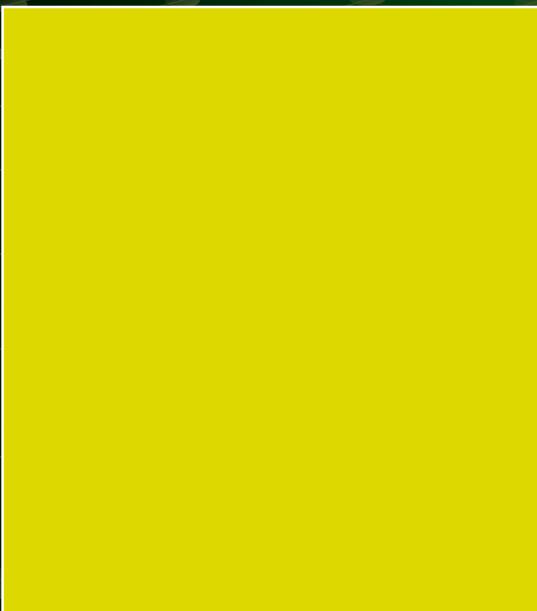
2D PROSTORNI



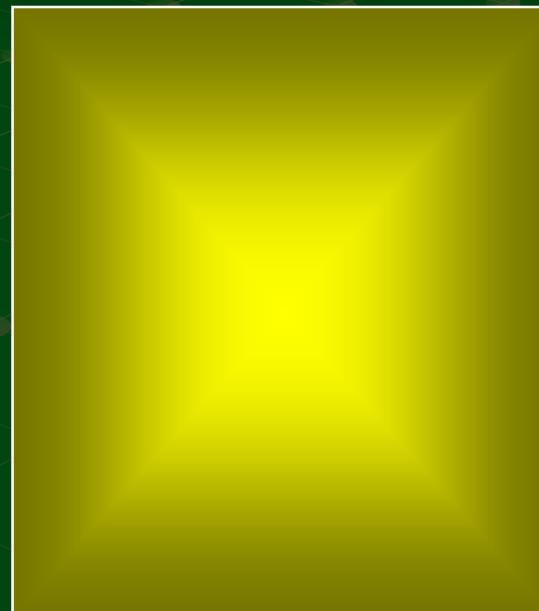
3D PROSTORNI

# Gradijent magnetnog polja

Homogeno  
(Spektroskopija)



Ne-homogeno  
(Neupotrebljivo)

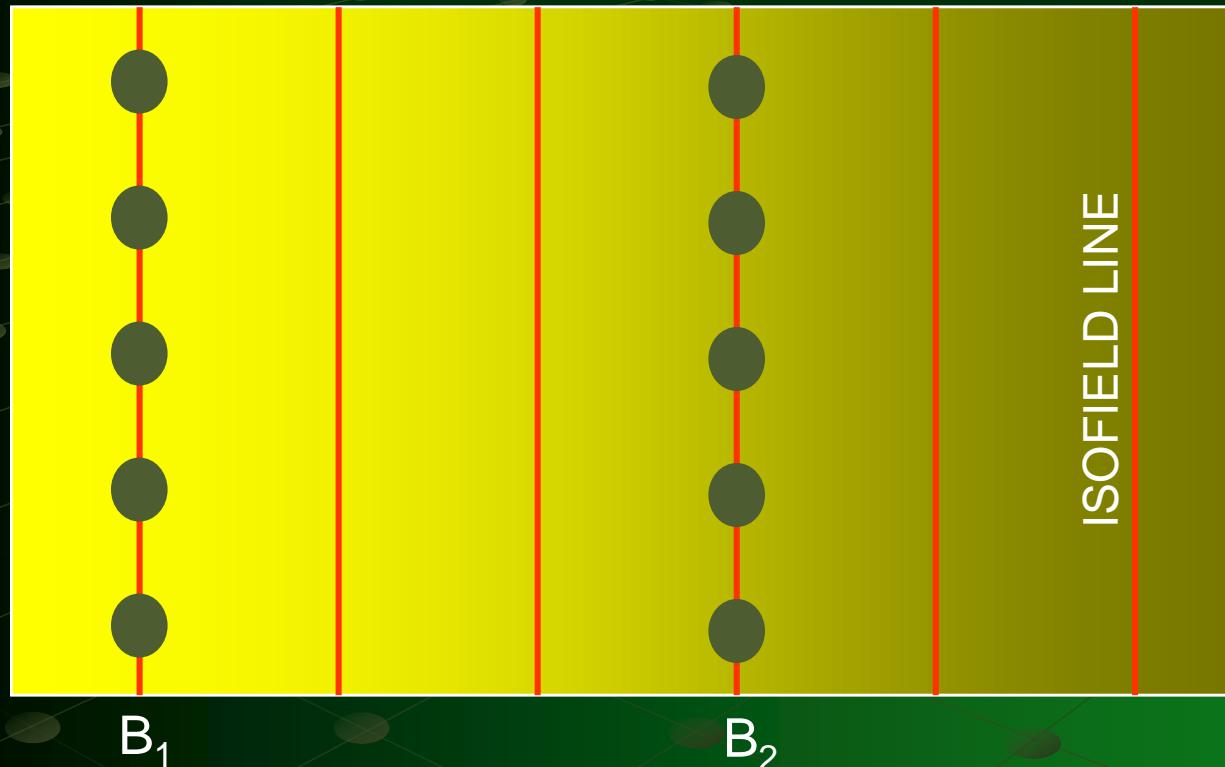


Gradijent  
(Imidžng)



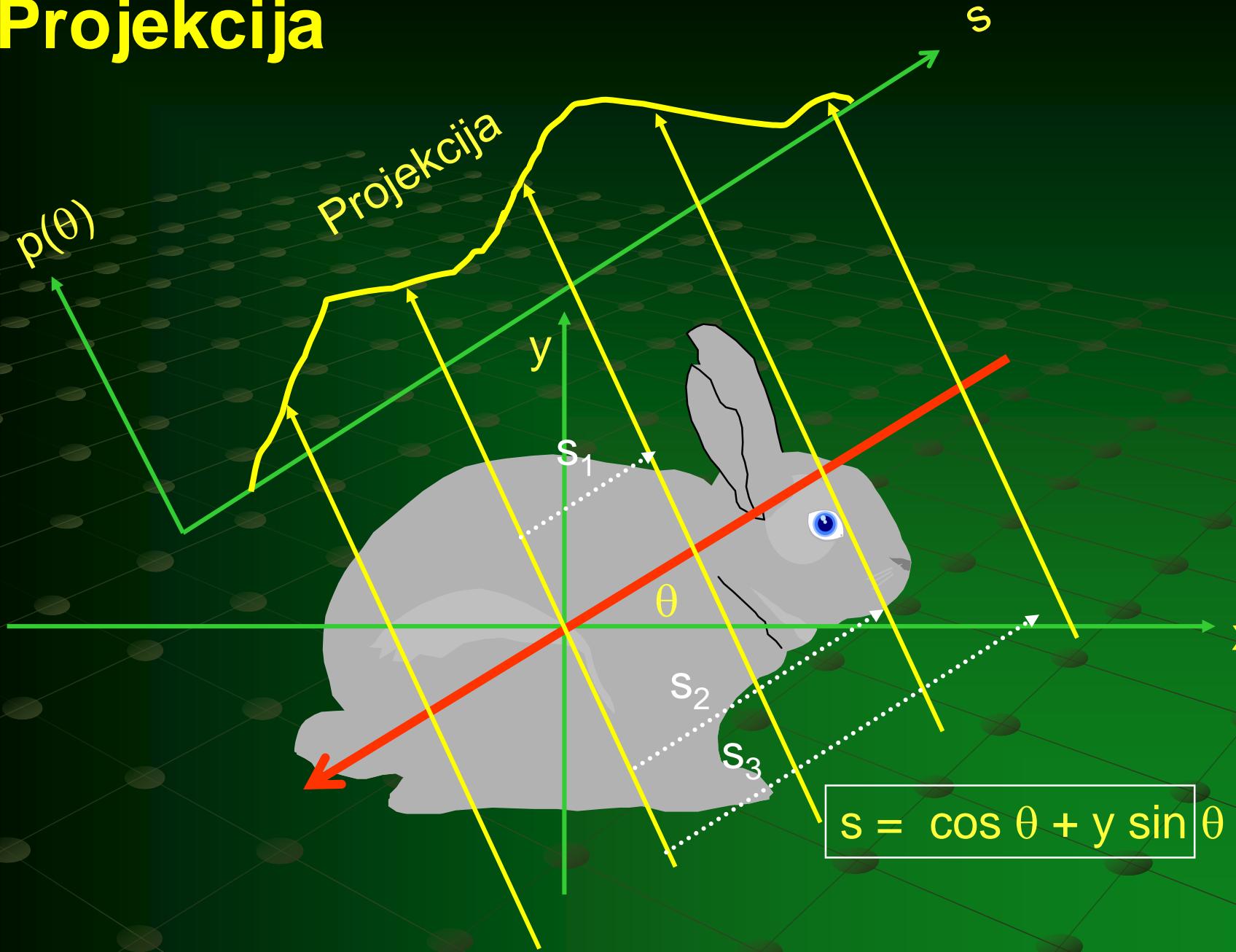
<---- Magnetno polje

# Gradijent magnetnog polja

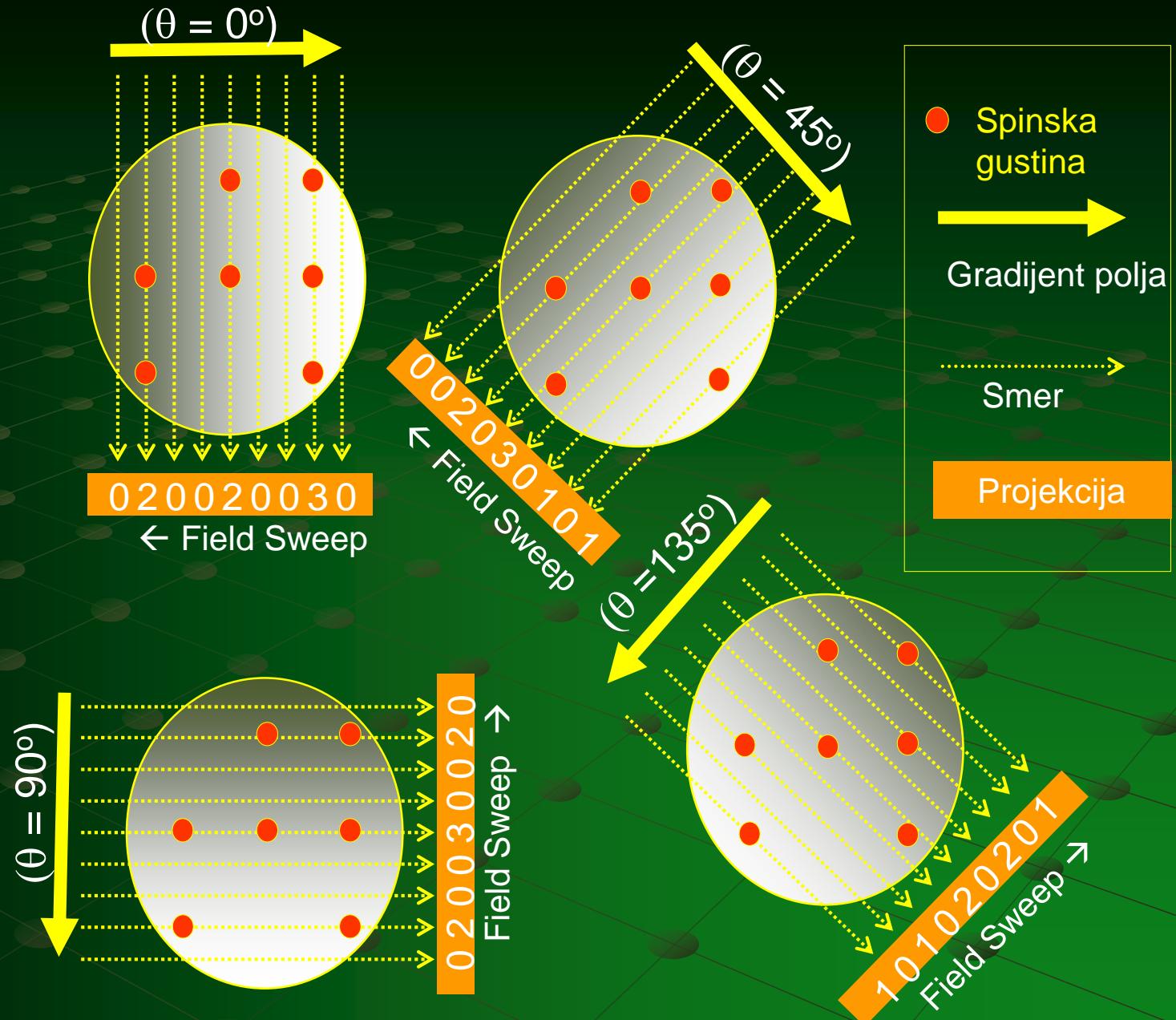


$$B_1 > B_2$$

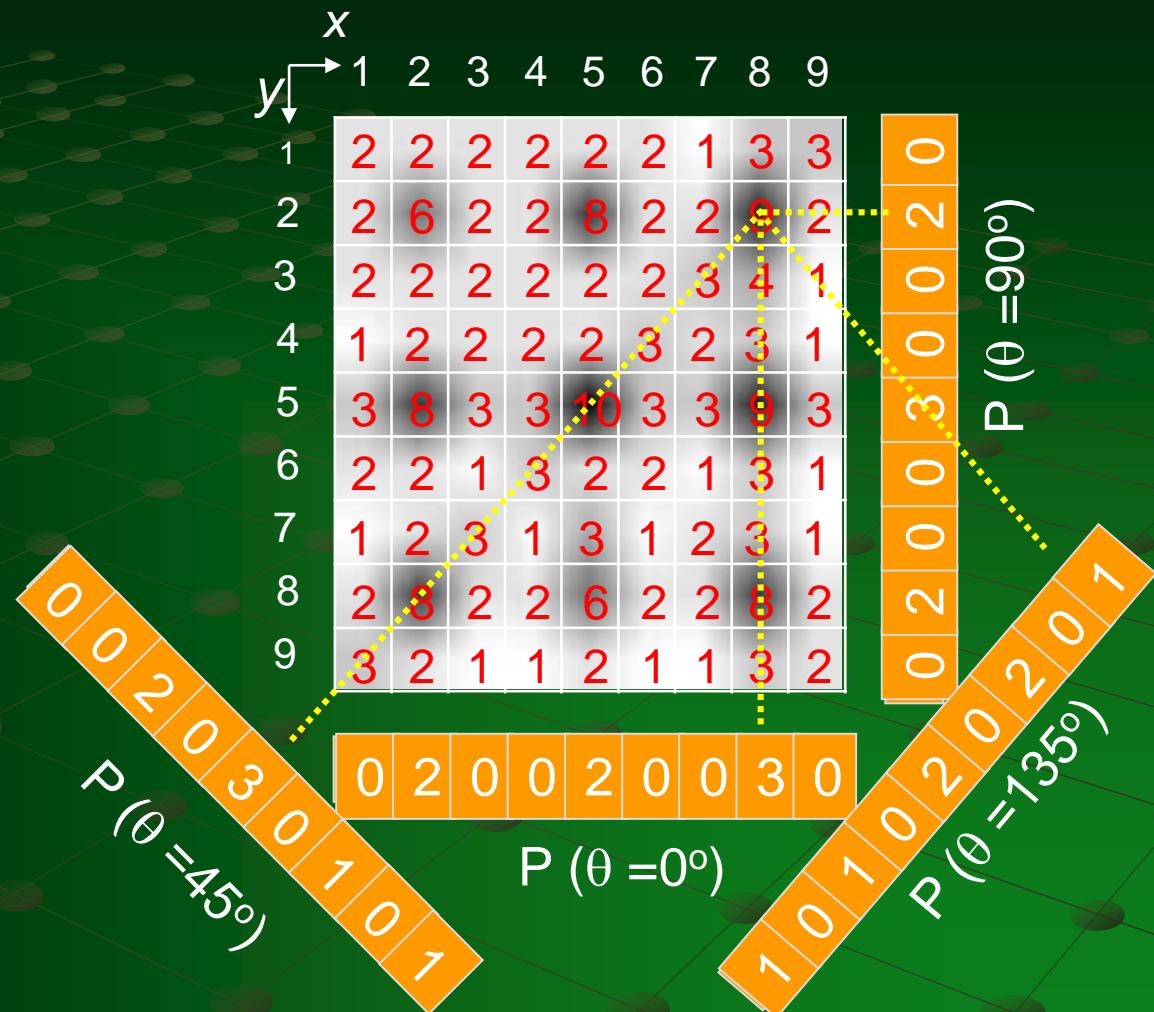
# Projekcija



# Akvizicija spektra

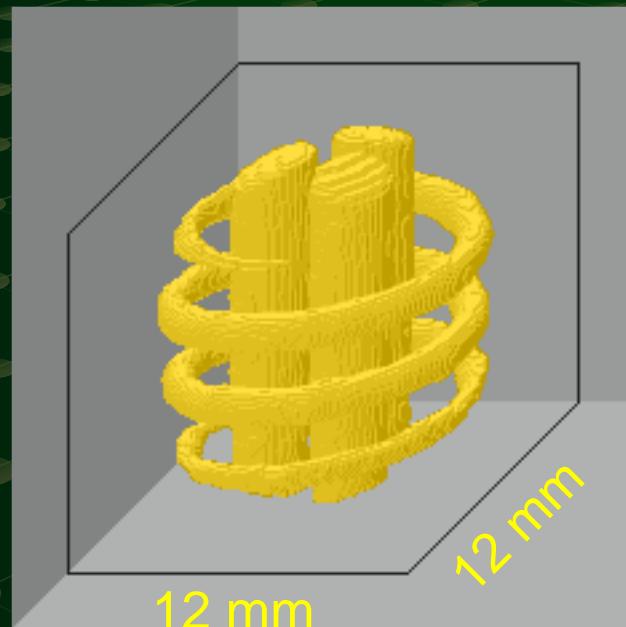


# Rekonstrukcija slike (backprojection)



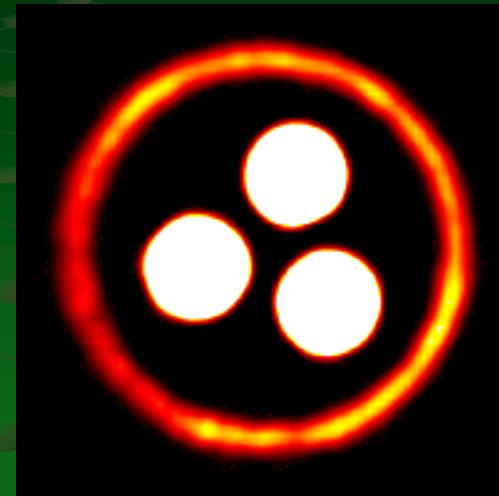
# 3D IMIDŽING - SPIRALNI FANTOM

Tri cevcice (i.d.: 3 mm) and a i crevce (id: 1.1 mm) koje ide oko njih.  
Cevcice se pune 0.5 mM rastvorom TAM (triarylmethyl radical)



0 256

3D kompozitna slika



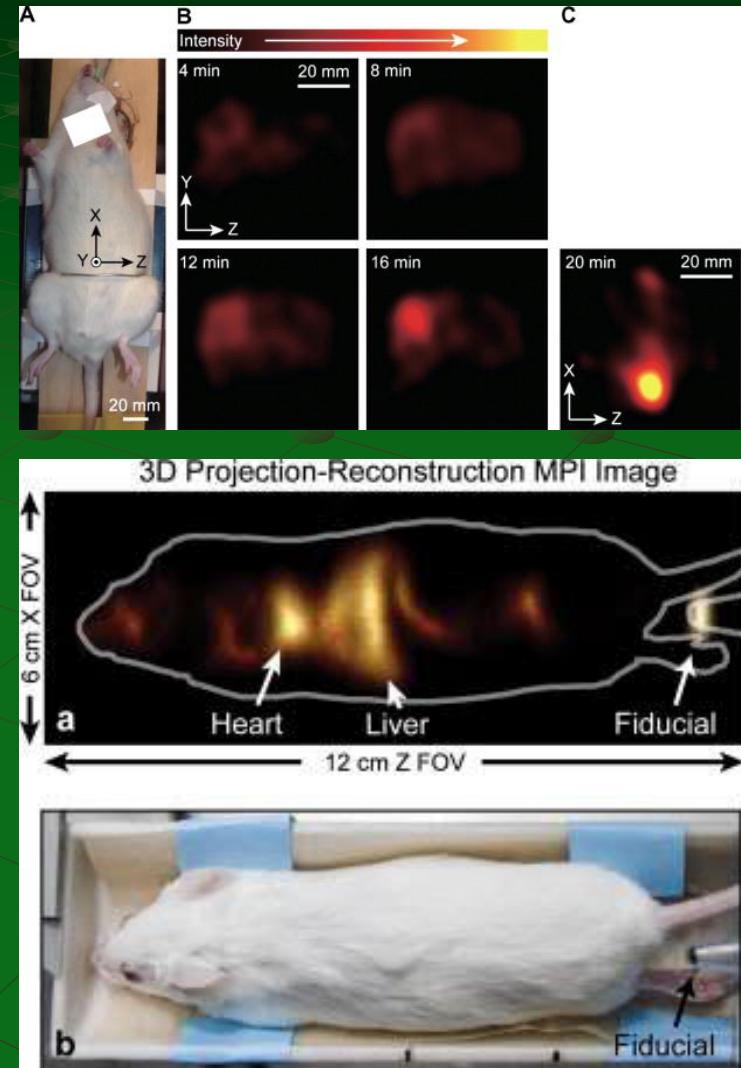
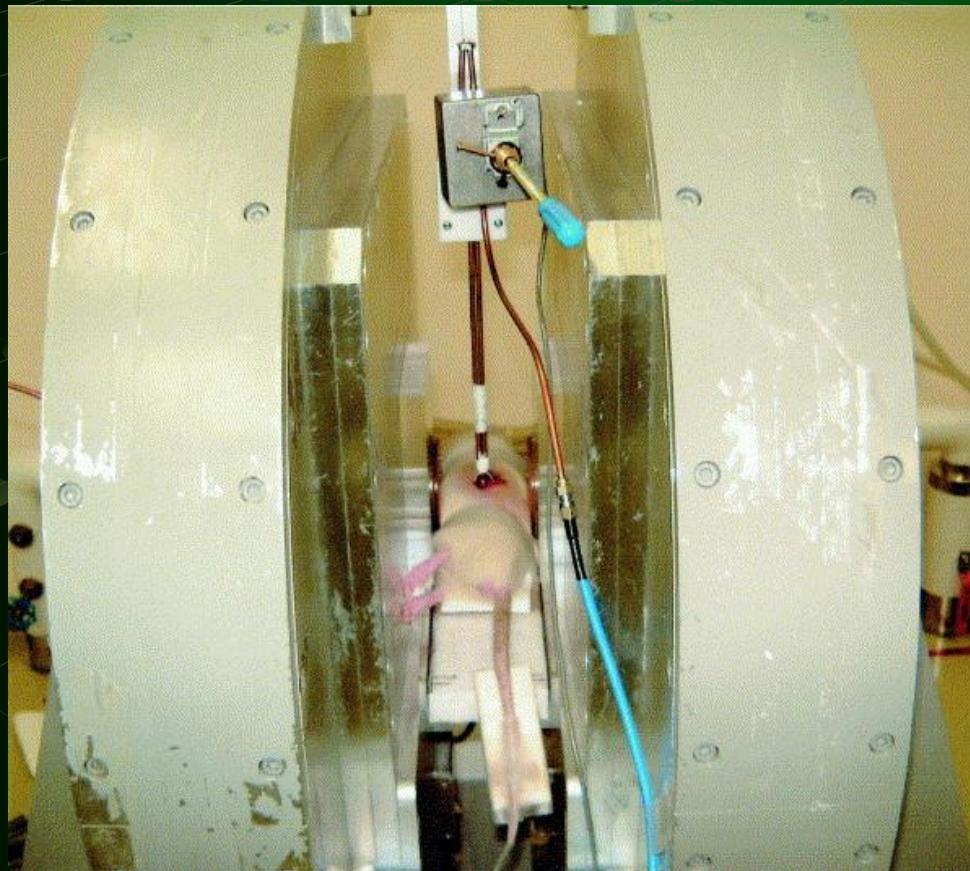
0 256

2D projekcija slike

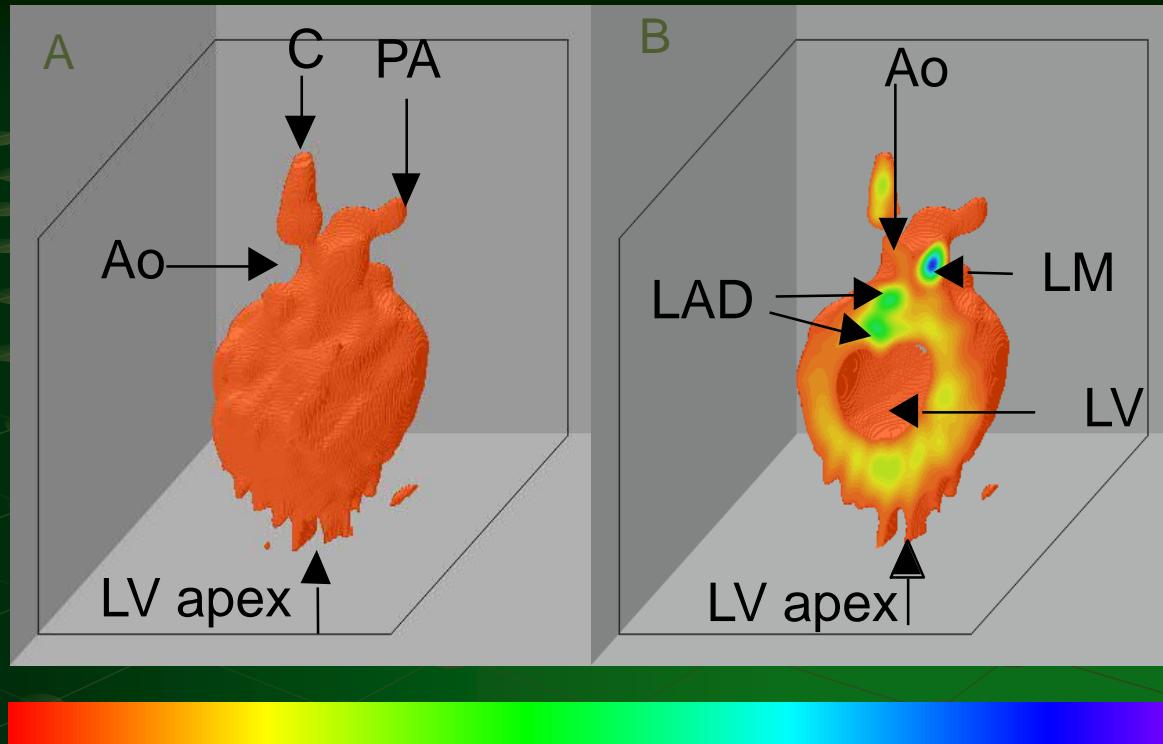
Proj., 1024; gradient, 10 G/cm; acq. time, 51.6 min; resolution, 100 mm.

# Imidžing korišćenjem EPR-a - metode

- 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



# 3D slika – srce pacova perfundovano probom



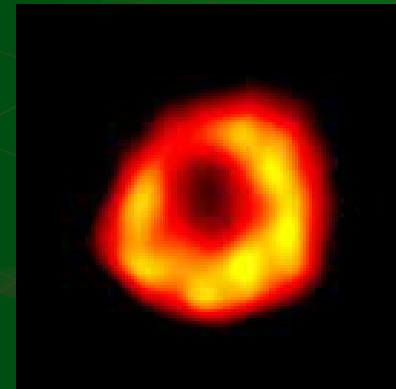
3D EPR slika ishemičkog srca pacova u koji je ubaćena infuzija sa glukozom i suspenzijom grafita (oksimetrija sproba). **A:** 3D slika **B:** 2D presek koji pokazuje strukturu srca; Ao, koren aorte; PA, plućna arterija; LM, leva glavna koronarna arterija; LAD, arterija; LV, leva ventrikularna šupljina.

# Imidžing sike srca pacova

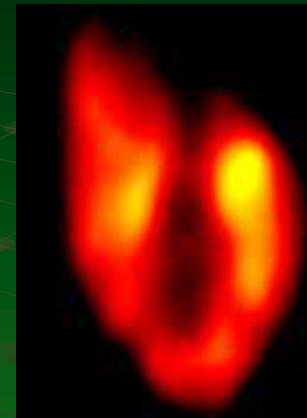
Transverzalni  
presek



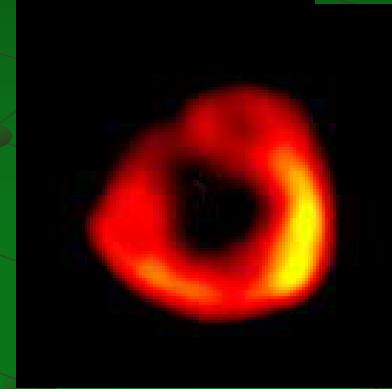
Longitudinalni  
presek



Sistola



Dijastola

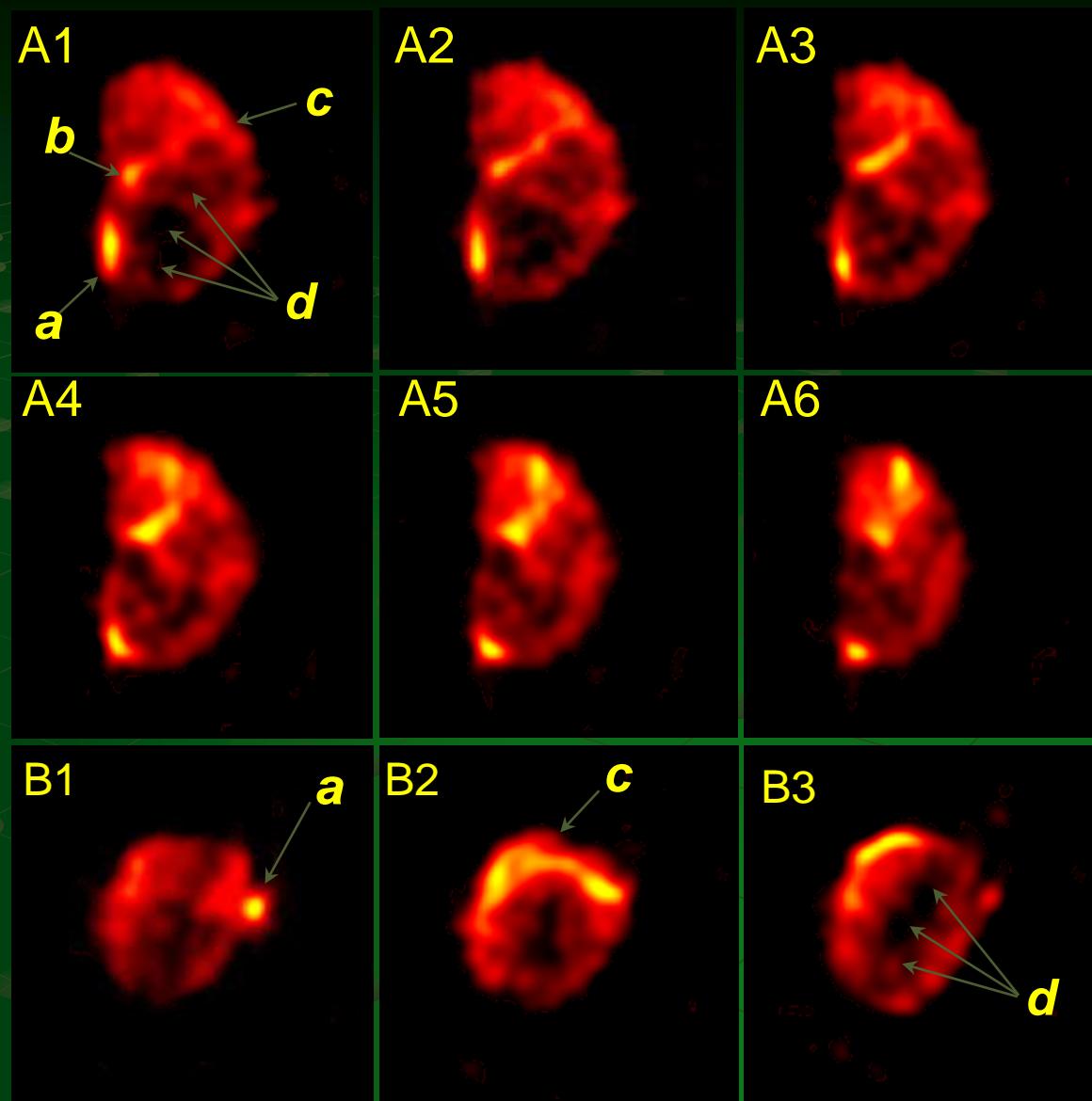


# Imidžing jetre pacova perfundovane sa TAM

Reprezentativni preseci  
( $24 \times 24 \text{ mm}^2$ , debljine,  
 $0.19 \text{ mm}$ ) dobijenih iz 3D  
prostornog imidža.

A1-A6: Vertikalni preseci  
B1-B3: Transverzalni  
preseci

Proj, 1024;  
grad, 25.0 G/cm;  
acq. time, 76.8 min;  
rezolucija, 200 um

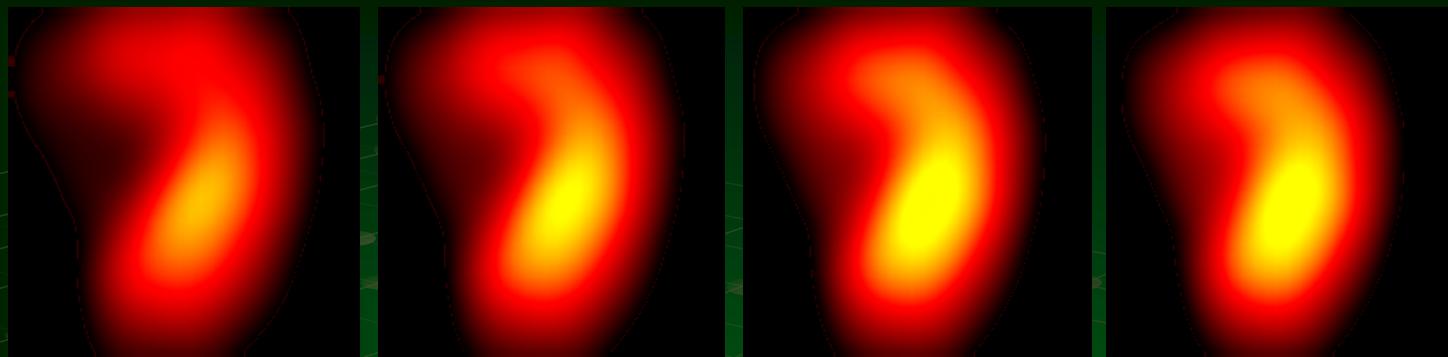


Intezitet →

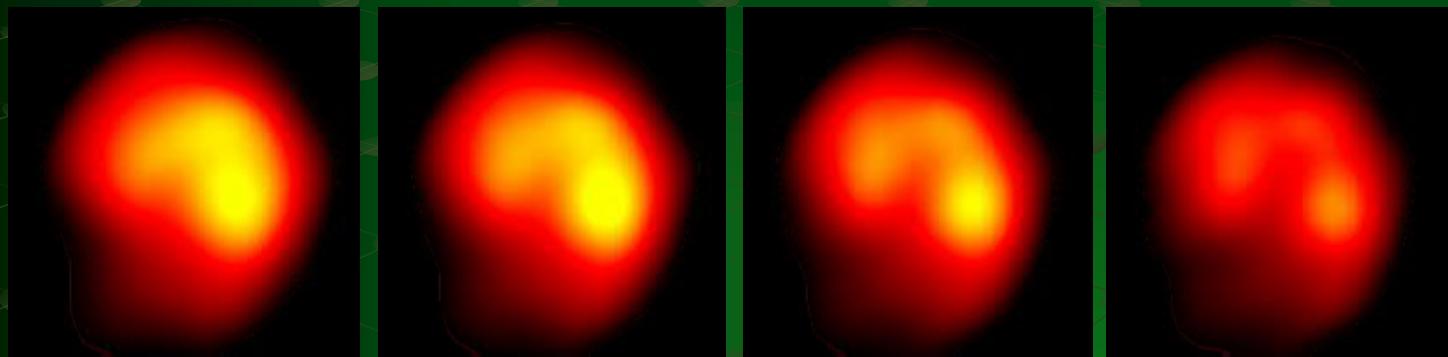
# 3D imidžing distribucije nitroksida u tumorima

PRESECI (0.3 MM) IZ 3D SLIKE TUMORA (3-CP; 100 mg/kg)

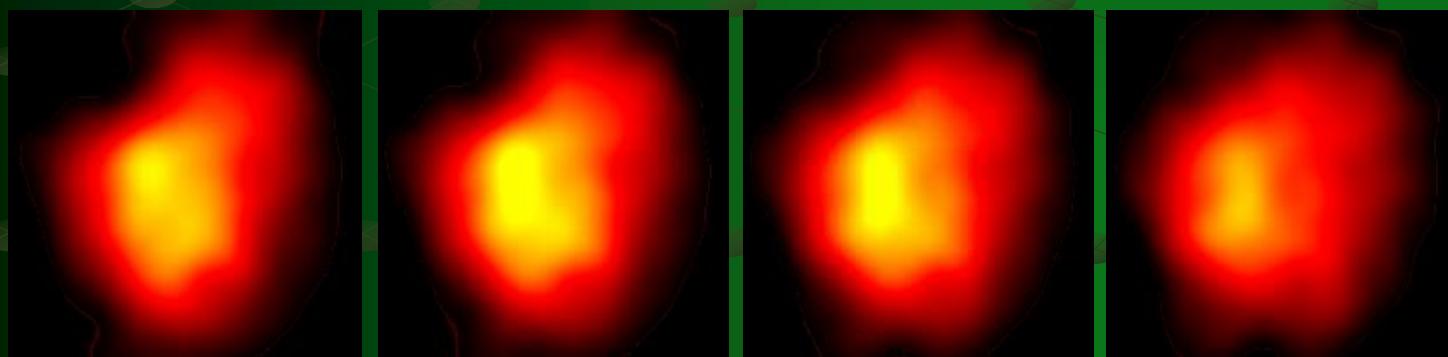
NORMAL



RIF-1



SCCVII

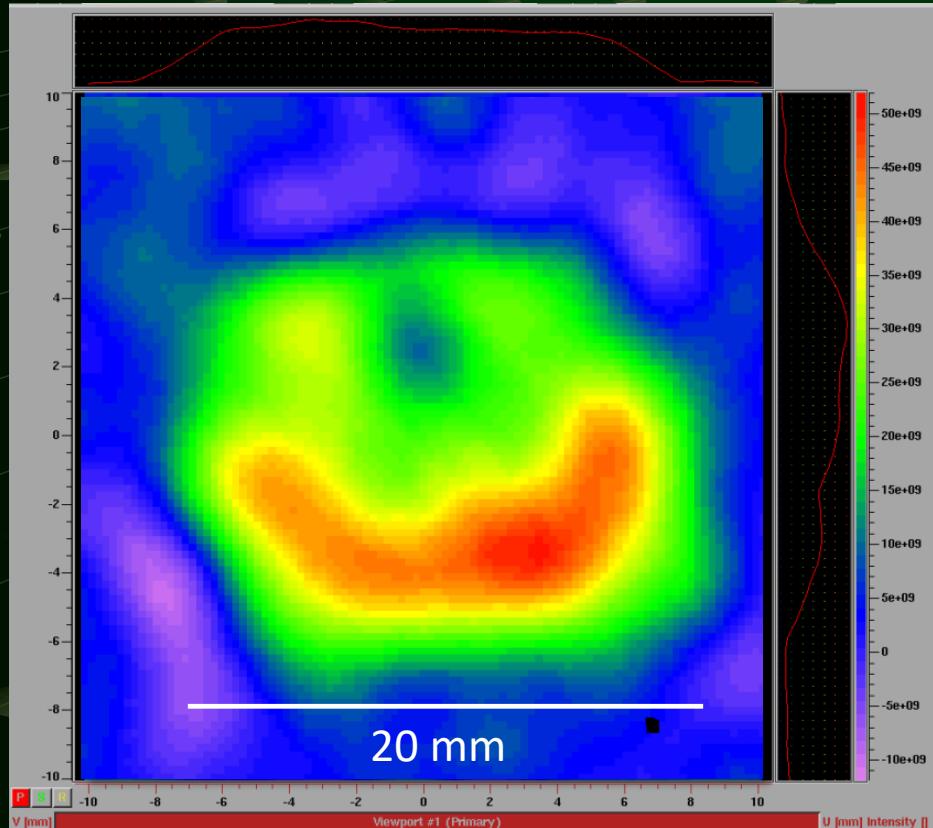


Intenzitet -->

C3H mice; gradient 20 G/cm; 144  
projections; 10x10 mm<sup>2</sup>

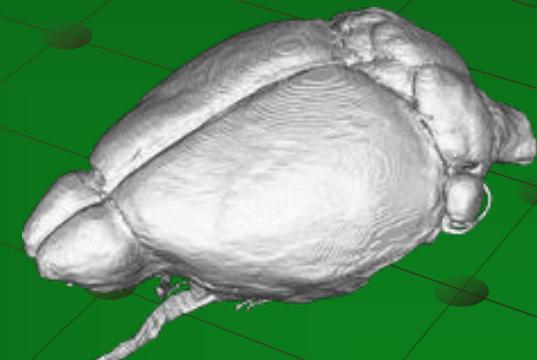
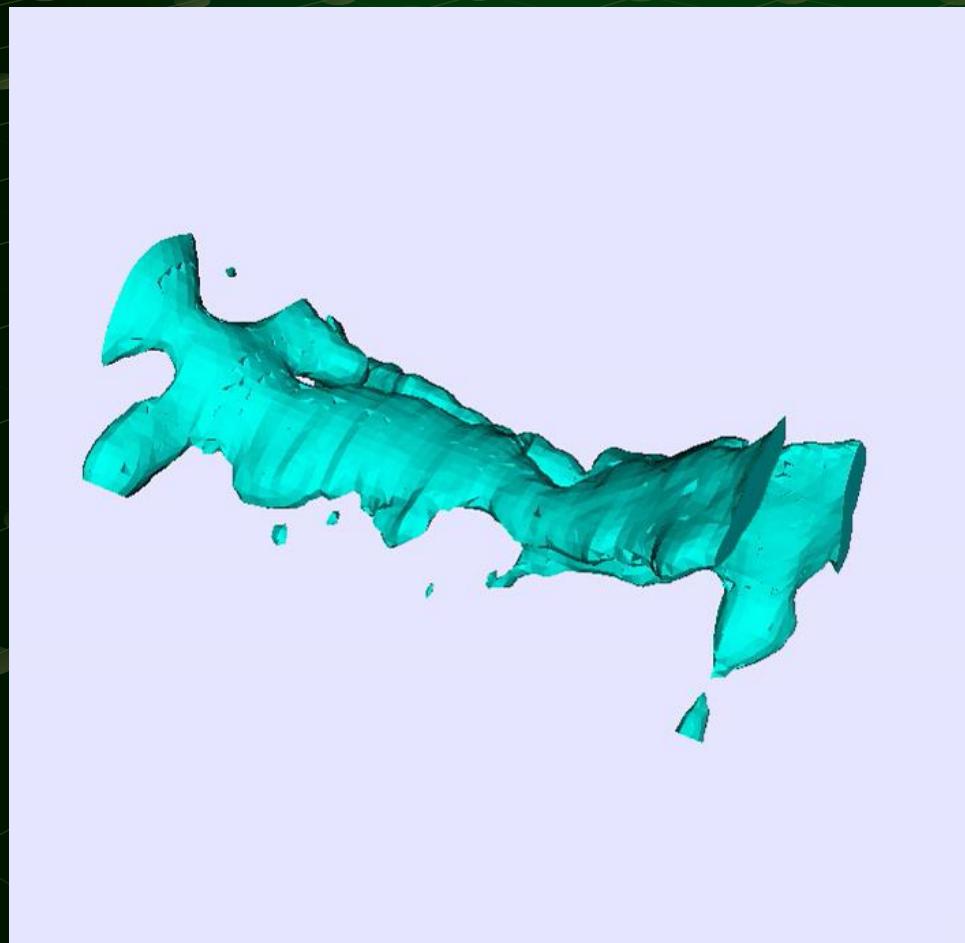
Kuppusamy, P., et al. Cancer Research, 58, 1562-1568 (1998).

# 2D EPR imidžing vratne regije miša



- 2D slika preseka vratne regije miša 22 min nakon što mu je intraperitonealno dat nitroksid.
- Spinske probe koje koristimo potpuno su bezopasne za životinje.

# 3D imidžing distribucije spinske probe u mozgu miša

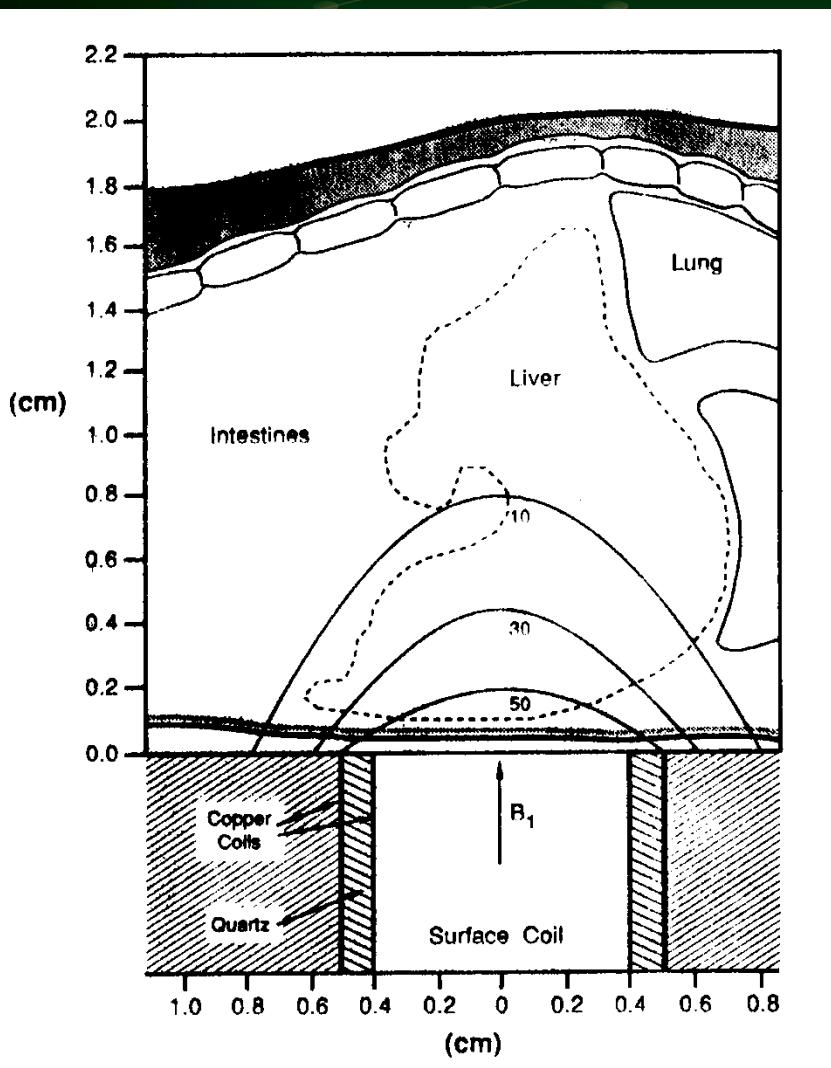


# MRI v.s. EPRI

- Postoje bitne razlike u osobinama jezgara i elektrona (žiromagnetski odnosi, hiperfine konstante cepanja, 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 voksa).
- 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.
- Pulsni EPRI zato zahteva vrlo preciznu i naprednu elektroniku uz brze računare koji će zadavati sekvence i dešifrovati dobijene rezultate.

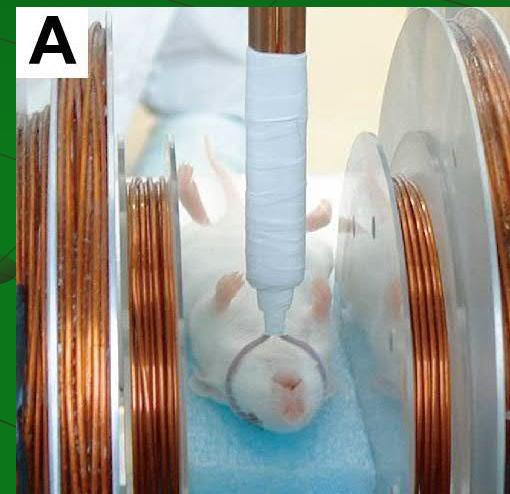
	NMR imaging	EPR imaging
T <sub>1</sub>	hundreds of ms to seconds	5.9-6.2 μs trityls; <1μs nitroxyls
T <sub>2</sub>	tens of ms to seconds	4.3-5.3 μs trityls; <0.5μs nitroxyls
echo time	tens of ms	a few μs

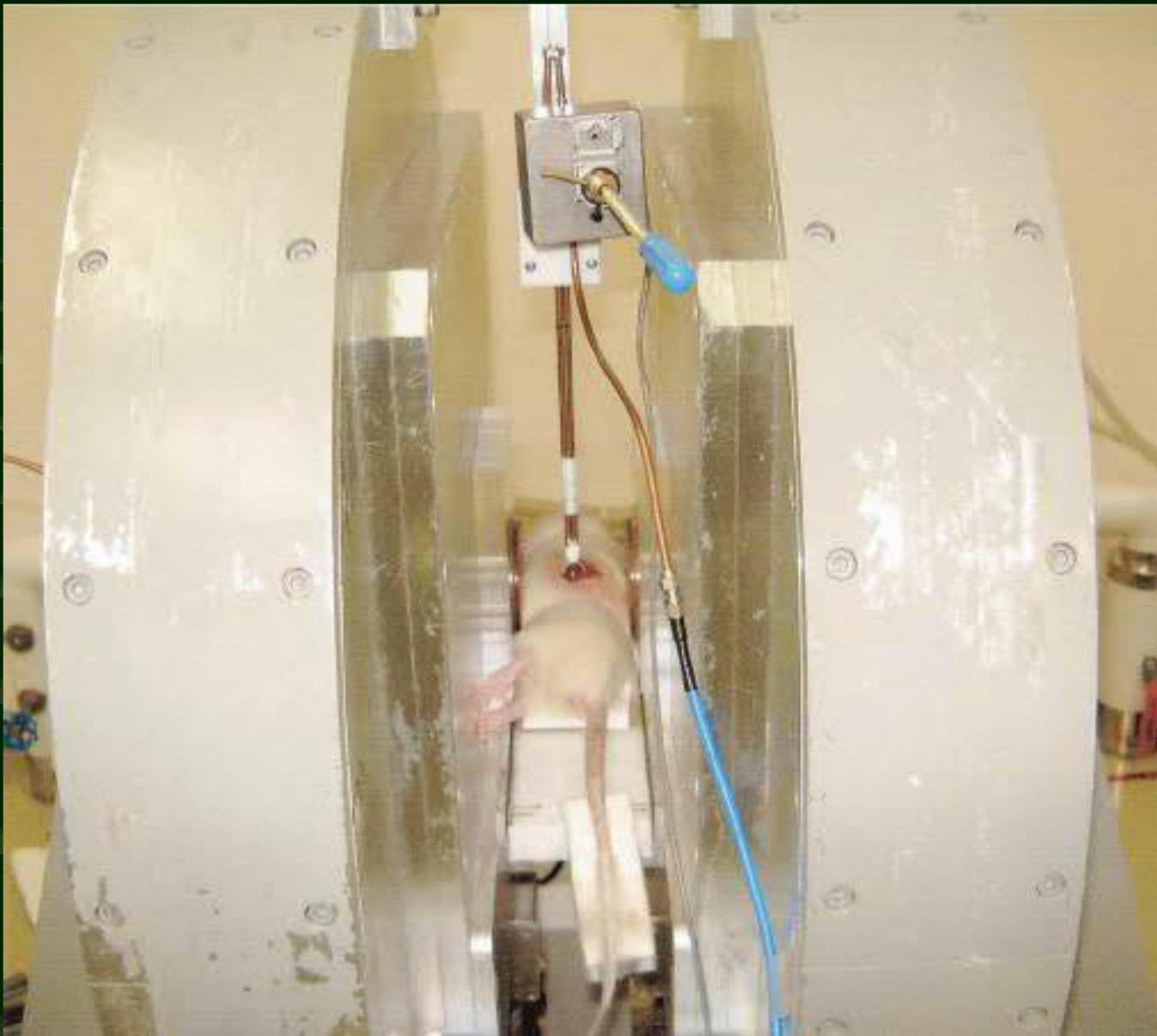
# In vivo spektroskopija -površinska zavojnica-



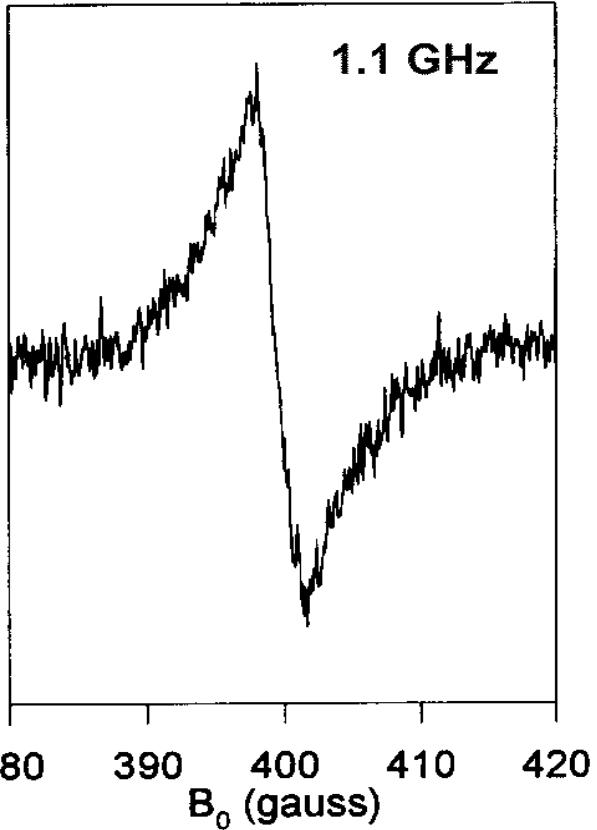
- Princip EPR snimanja putem korišćenja površinske zavojnice
- Dubina prodiranja bitno zavisi od frekvencije mikrotalasa (dielektrične osobine i  $E$  vektor EM zračenja)
- Koriste se manje frekvencije mikrotalasa (sve smo bliže RF oblasti) (L, S, X band).
- Da se podsetimo:  
**1-2 GHz (L-oblasc), 2-4GHz (S-oblasc),  
8-10 GHz (X-oblasc), 35 GHz (Q-oblasc) i 95 GHz (W-oblasc)**

Surface-coil  
resonator





# IN VIVO spektroskopija -KOŽA-



Slobodni radikal indukovani  
antralinom (lek za psorijazu)

- Psorijaza: Autoimuno oboljenje kože čili je uzrok nepoznat (veruje se da ima genetsku komponentu).

- Jedan od načina tretmana protiv ove bolesti je tretman pomadama koje sadrže dithranol (anthralin).

- Proučava se delovanje Antralina koji u interakciji sa određenim supstancama u koži stvara slobodne radikale. Kako ih izmeriti?

- Koristi se L-band EPR oblast i površinska zavojnica koja se stavlja direktno na kožu

- Upotrebljava se eksperimentalni nude-mouse

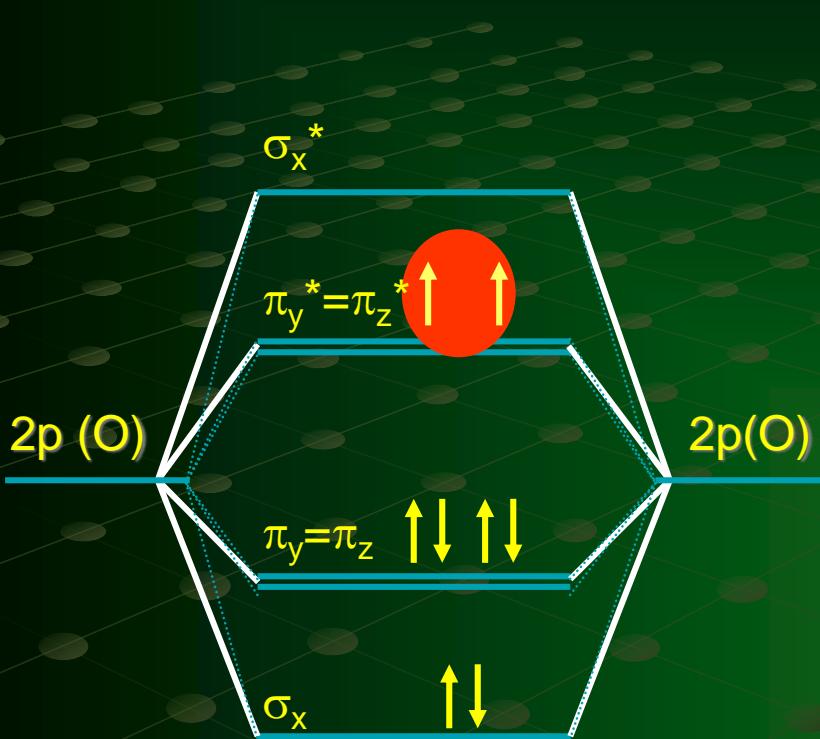


Osoba obolela od psorijaze



Nude mouse

# Molekuski kiseonik je paramagnetik



Molekulski kiseonik ima dva  
nesparena elektrona

- Kiseonik daje jake EPR signale u gasnoj fazi.
- Na žalost, nema EPR signala kiseonika rastvorenog u fluidima (prešrok signal).
- Samim tim, nemoguće je direktno detektovati kiseonik u biološkim sistemima pomoću EPR spektroskopije.
- Ipak, molekulski kiseonik možemo indirektno detektovati i kvantifikovati korišćenjem spin-label oksimetrije.

# EPR oksimetrijske probe

## Particulate (Solid) probes

Lithium phthalocyanine (LiPc)

Sugar chars

Fusinite

Coal

India ink

## Soluble probes

Nitroxides

Trityl radicals

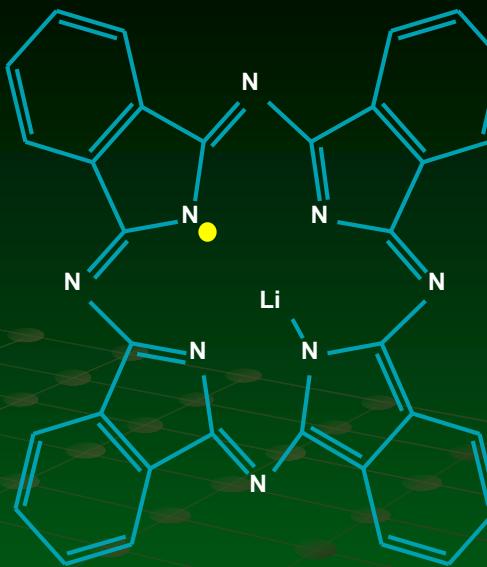
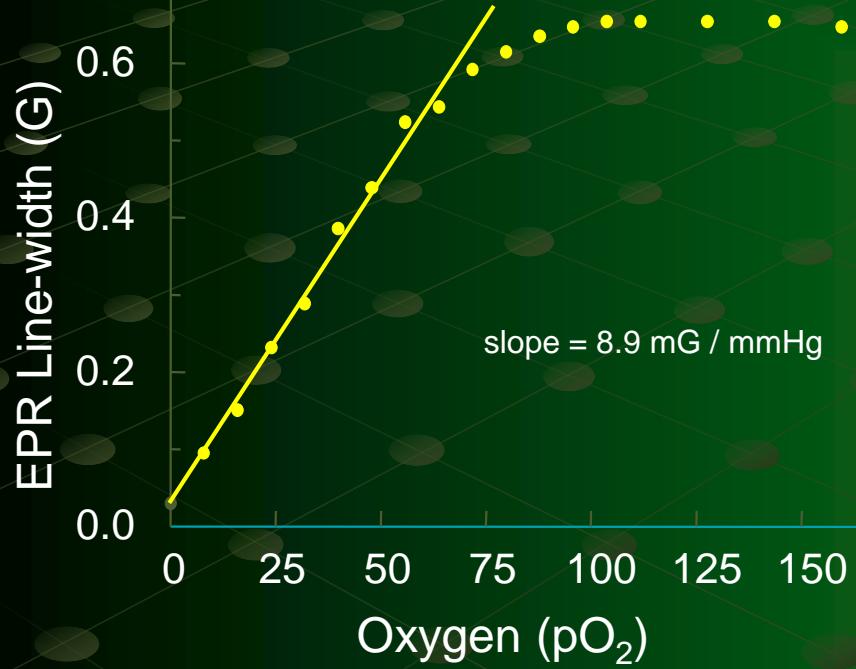
## What is reported?

- $pO_2$  (mmHg/Torr)
- Localized Measurement
- Resolution < 0.2 mmHg
- Repeated Measurements
- Stable for days to weeks
- Independent of medium

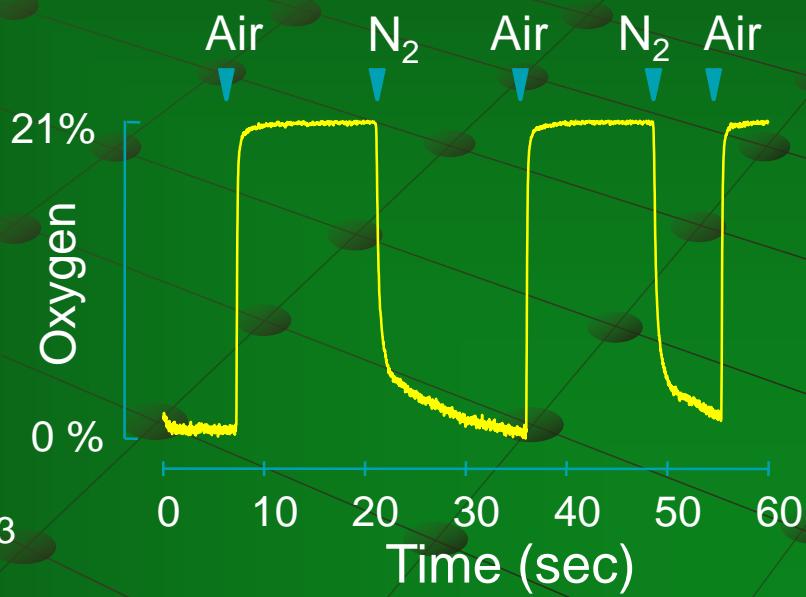
- Concentration ( $\mu M$ ) of dissolved oxygen in the bulk volume
- Resolution 2-10 mmHg

# LiPc (Lithium Phthalocyanine) Oxygen sensitive ( $T_2$ ) EPR probe

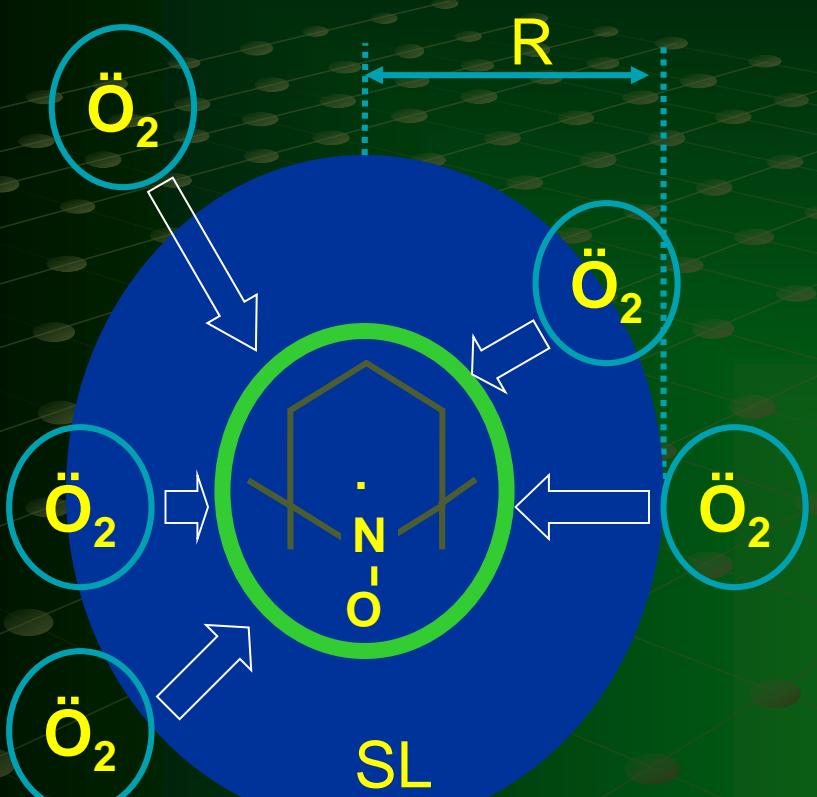
Response to Oxygen



Oxygen Time Response



# Princip EPR oksimetrije



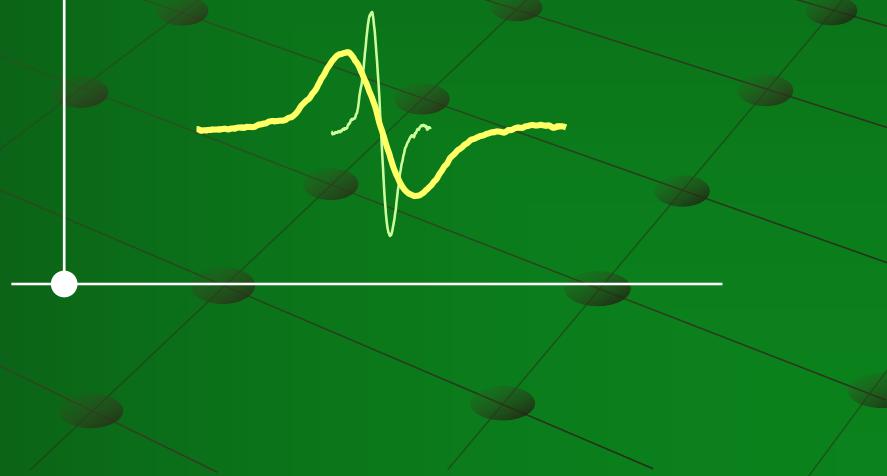
Bimolekularni sudari između spinske probe i molekula kiseonika dovodi do Hajzenbergove spinske razmene

Frekvencija sudara  $w$ , u skladu sa teorijom sfere Smoluchowskog je:

$$\omega = 4\pi R p(D_{SL} + D_{O_2}) [O_2]$$

Što prouzrokuje širenje EPR linije kao:

$$\Delta w = k D_{O_2} [O_2]$$



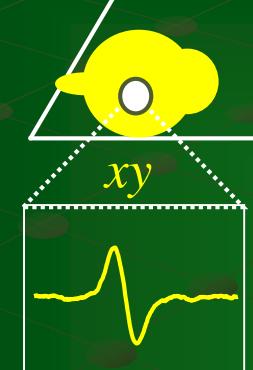
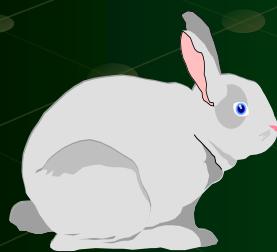
# Mapiranje kiseonika

Mapiranje kiseonika u biološkim uzorcima moguće je korišćenjem spektralno-prostornog EPR imidžinga

Objekat

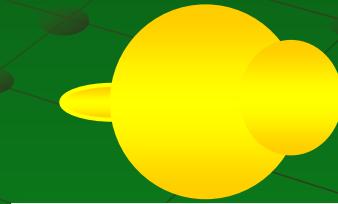
Podatak

Informacija



Spektralno-  
prostorni EPR  
imidžing

Spinska gustina



Raspodela kiseonika

# EPR mapiranje kiseonika (EPROM)

Fantom  
epruvete sa  
 $^{15}\text{N}$ -PDT

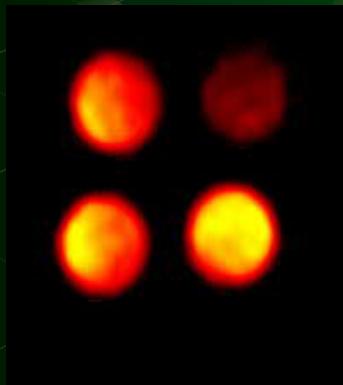
[PDT, mM]



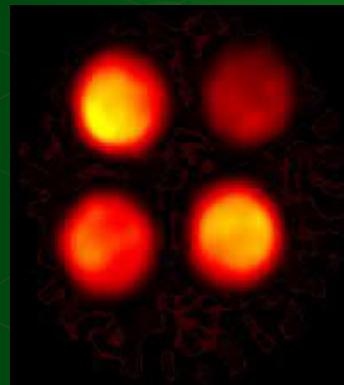
[Oxygen]



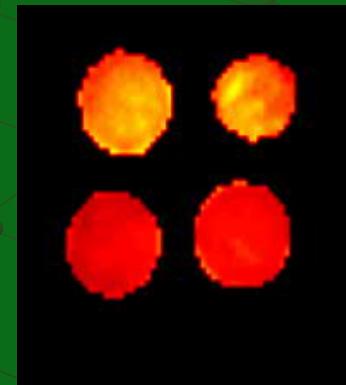
Amplitude Map



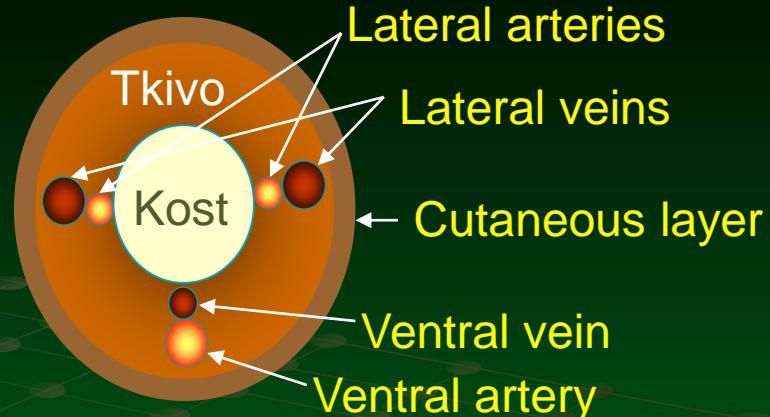
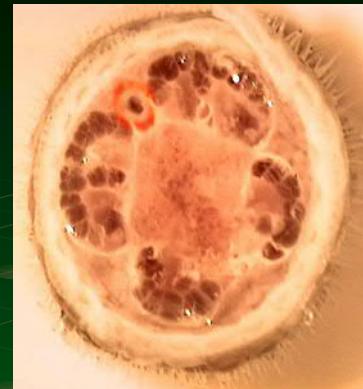
Spin Density Map



Oxygen Map



# Mapiranje količine kiseonika u arterijama i venama u repu pacova *in vivo*

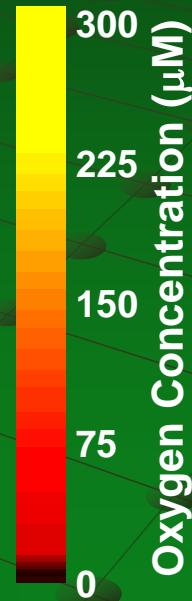
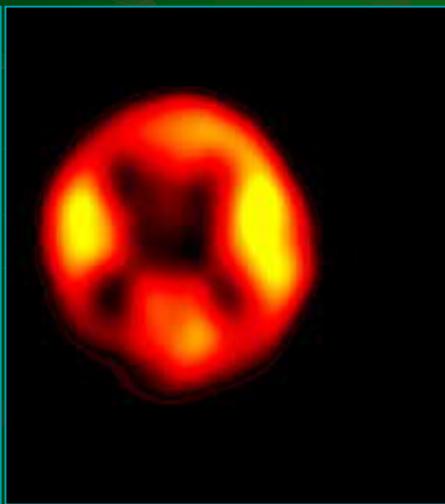
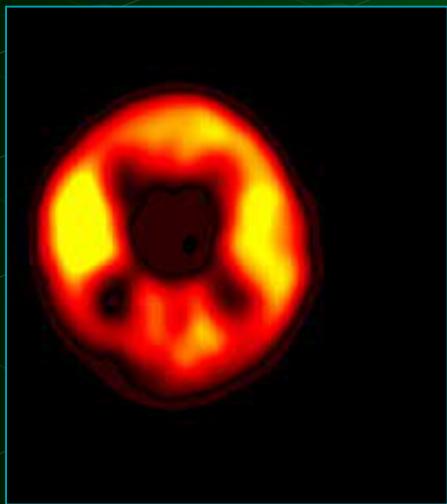


Amplitude Map

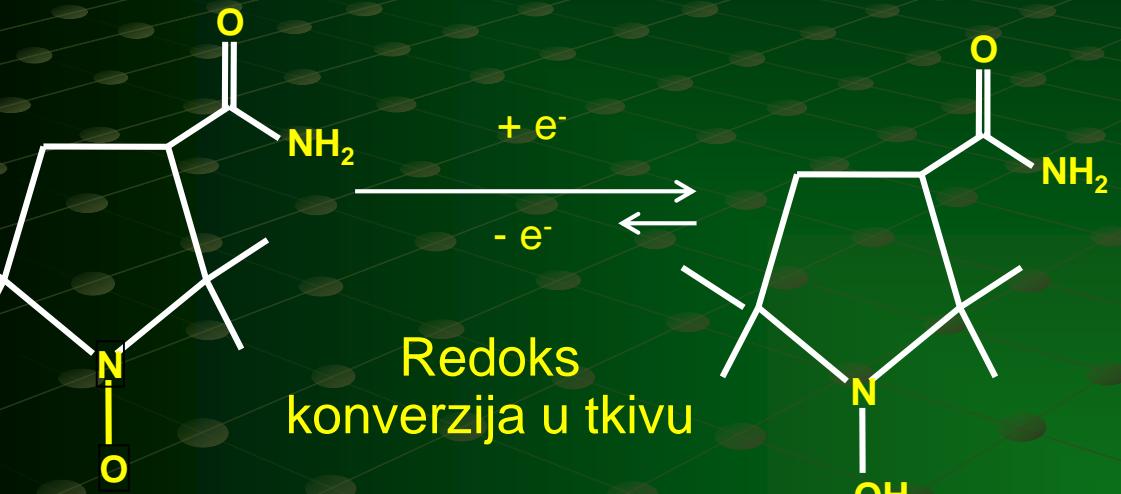
Spin Density Map

Oxygen Map

3-D spectral-spatial  
L-band, 3-CP probe

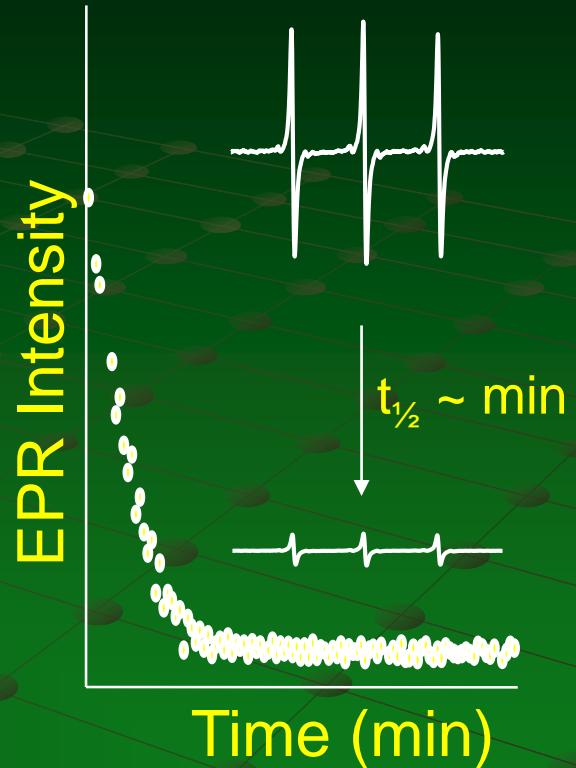


# Nitroksidi kao probe za određivanje redoks-statusa



Nitroksid  
EPR 'aktiviran'

Hidroksilamin  
EPR 'neaktivan'

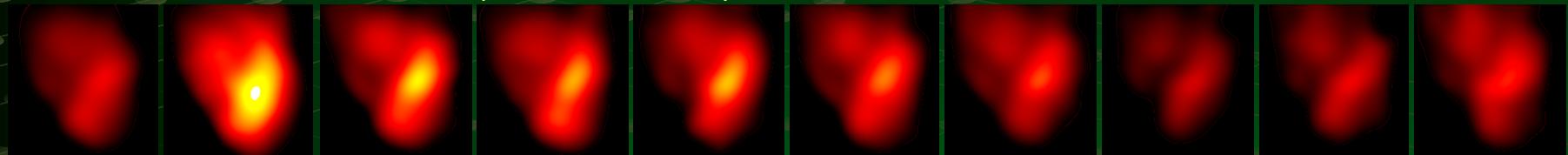


- Swartz et al, Free Radic. Res. Commun., 9, 399-405 (1990)  
Kuppusamy et al, Cancer Research, 58, 1562-1568 (1998)  
Krishna et al, Breast Disease, 10, 209-220 (1998)

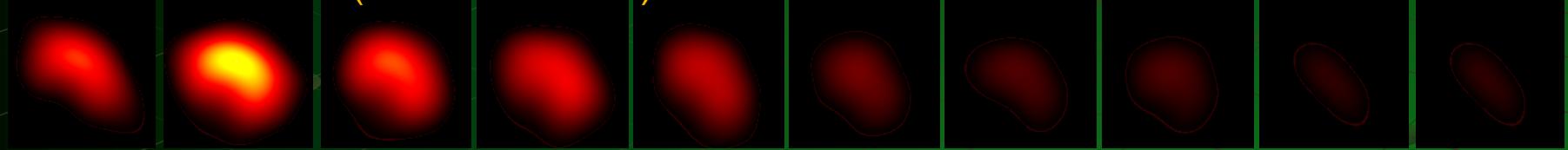
# Redkcija 3-CP u normalom i tkivu tumora



NORMALNO TKIVO (LEVA NOGA)



RIF-1 TUMOR (DESNA NOGA)



3.0 4.5 6.0 7.5 9.0 10.5 12.0 13.5 15.0 16.5

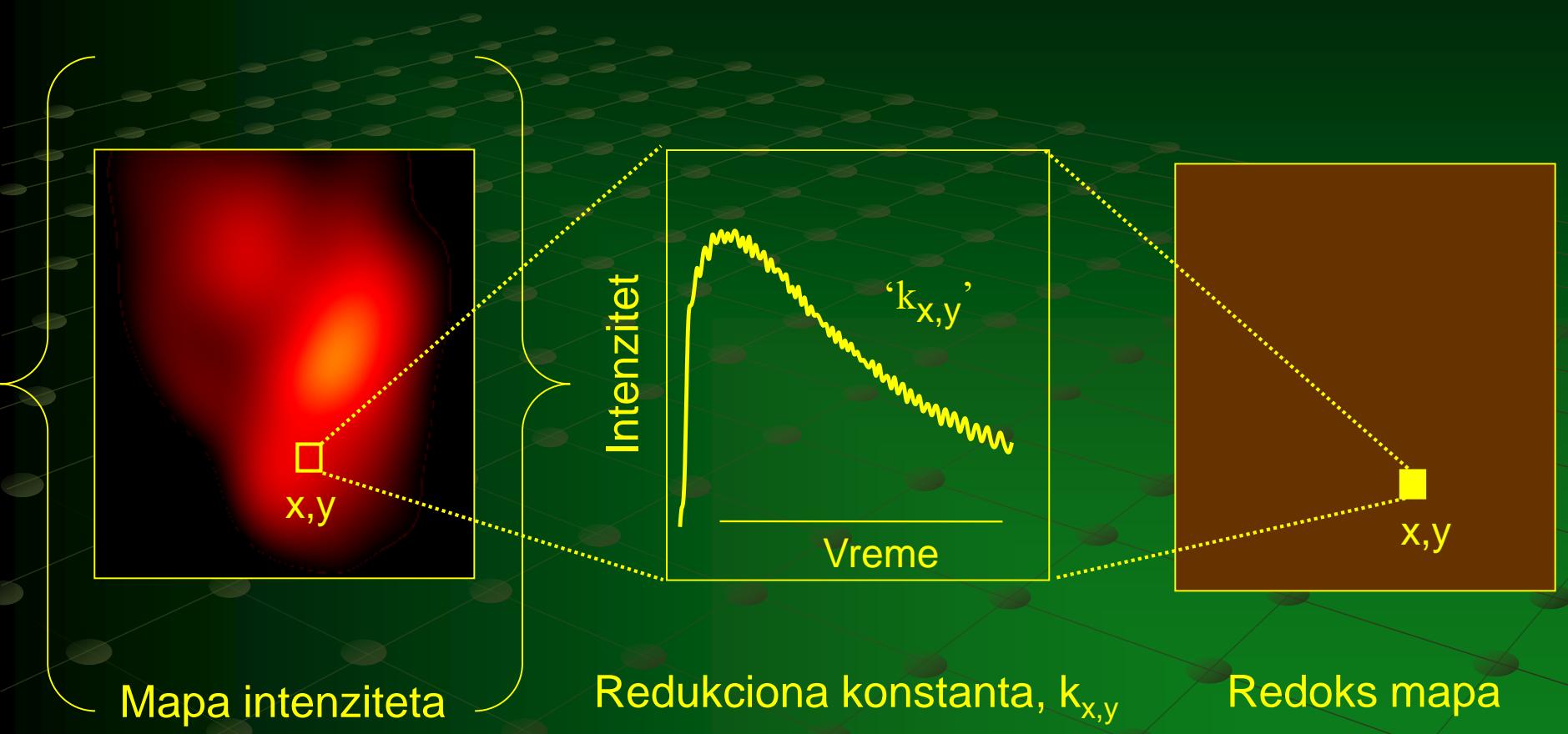
Vreme (min)

Intenzitet -->

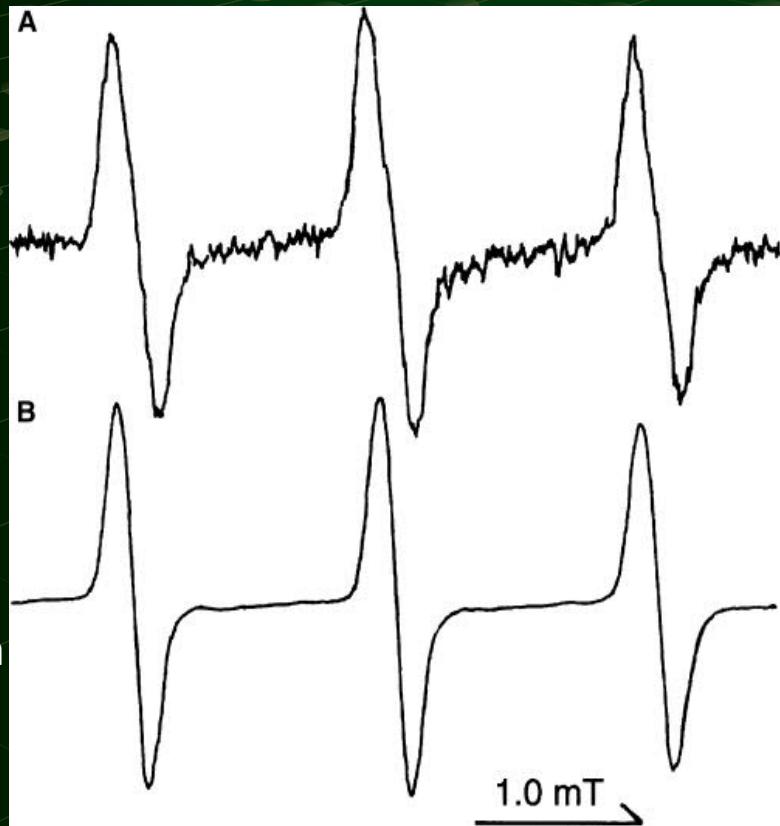
C3H mice with RIF-1 tumor; ~30 g bw; dose: 100 mg/kg, iv; Measured *in vivo* using surface resonator at L-band (1.25 GHz); Images: 10x10 mm<sup>2</sup>

Kuppusamy, P., et al. Cancer Research, 58, 1562-1568 (1998).

# Kreiranje redoks mape (rekonstrukcija imidža redoks statusa tkiva)

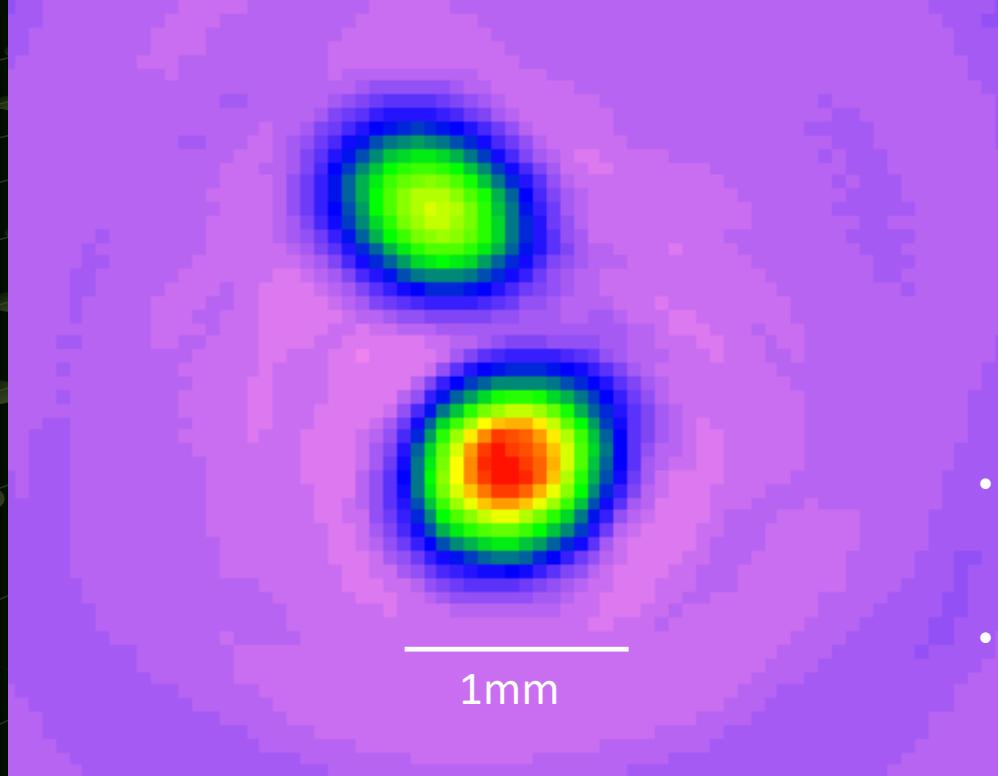


# Primer klijanja semena pšenice



- Kao primer smo snimili seme prečnika 1mm koje je stavljeno u kapilaru napunjenu nitroksidom.
- Posmatrali smo apsorpciju nitroksida od strane semena i napravili 2D sliku u cilju procene redukcionog potencijala semena u toku početka njegovog klijanja.

# 2D EPR imidžing preseka semena pšenice tokom procesa klijanja

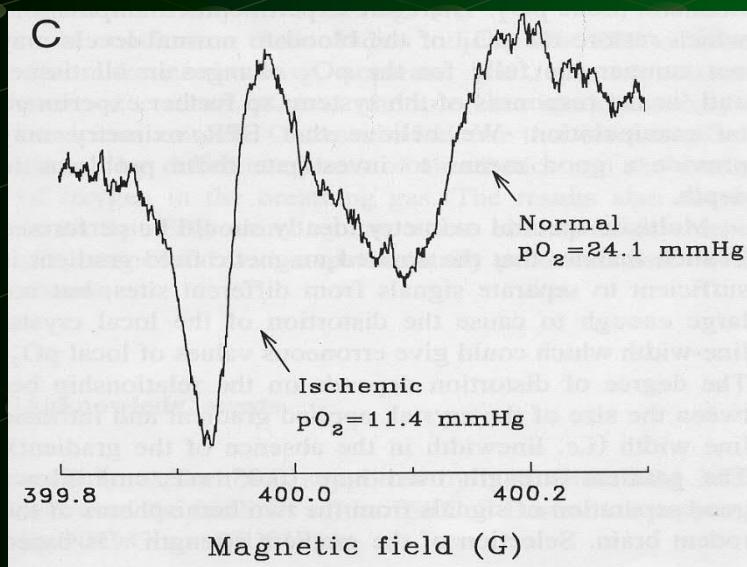


- Kao primer smo snimili seme prečnika 1mm koje je stavljeno u kapilaru napunjenu nitroksidom.
- Posmatrali smo apsorpciju nitroksida od strane semena i napravili 2D sliku u cilju procene redukcionog potencijala semena u toku početka njegovog klijanja.

# EPR oksimetrija. Lokalizovane (implantirane) EPR oksimetrijske probe ( $pO_2$ )

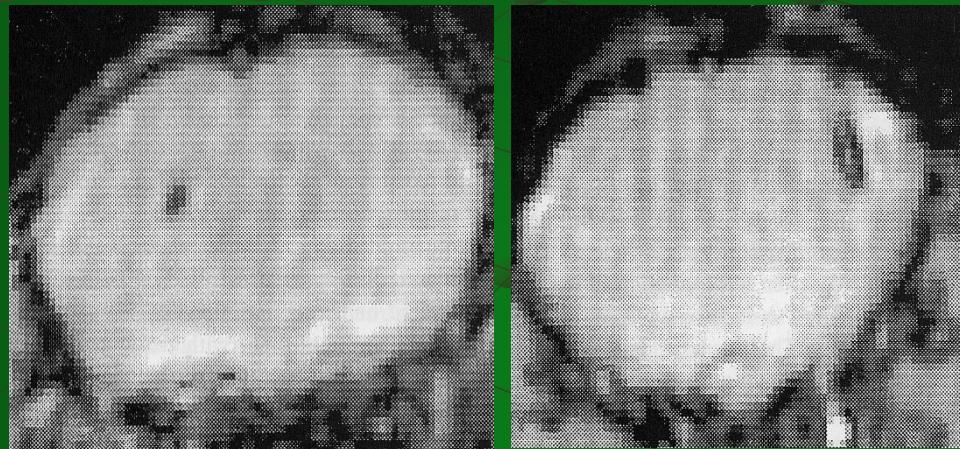
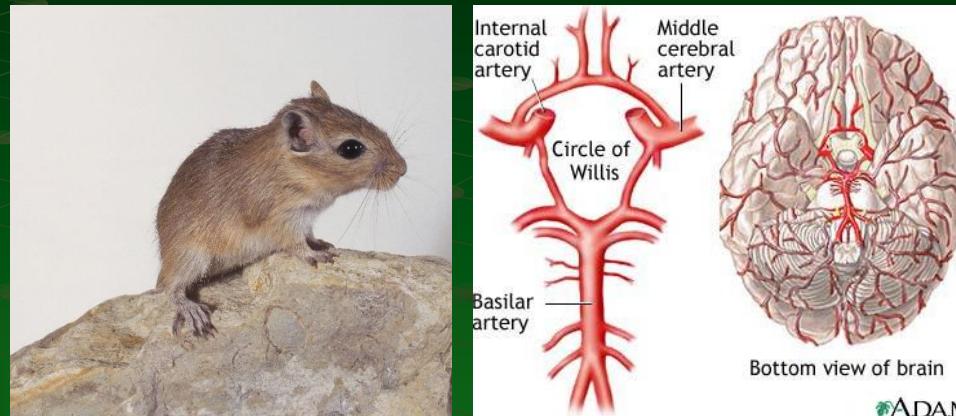
Simultano merenje  $pO_2$  na 2 mesta u mozgu korišćenjem LiPC kristala

- Subjekat: Mongolski gerbils
- Nekopletan Willisov krug dozvoljava indukciju ishemije samo jedne strane mozga unilateralnom karotidnom okluzijom
- Metod za praćenje ishemije



Gradijant magnetnog polja

EPR spektar dva LiPC kristala u dva režnja odražava razliku  $pO_2$  nakon unilateralne karotidne okluzije.



$T_2^*$  - nagnašena MRI slika mozga u koji su implantirani LiPC (po jedan u svaki rezanj mozga). Tamne regije su veće od veličine LiPC kristala ( $<100 \mu\text{m}$ ) zbog namerno izazvanih artefakata susceptibilnosti