

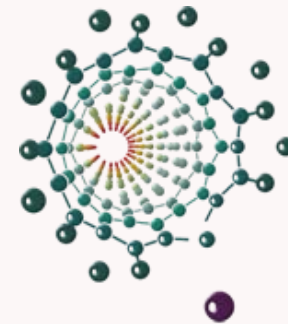


BioScope Labs

www.bioscope.ffh.bg.ac.rs

EPR

- primene u biologiji i medicini -



Miloš Mojović

Fakultet za fizičku hemiju
Univerzitet u Beogradu

milos@ffh.bg.ac.rs

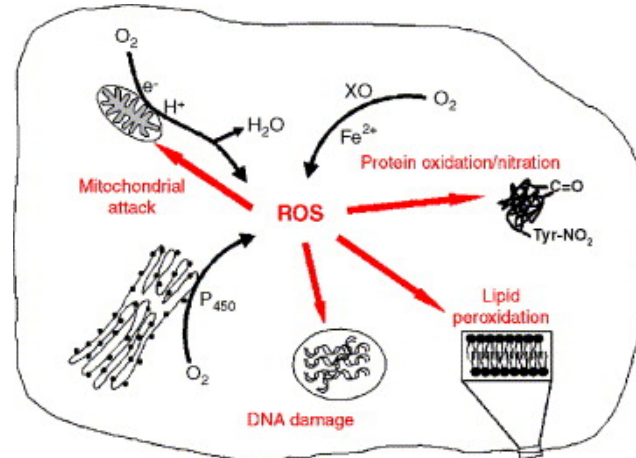


Korišćenje EPR za proučavanje nervnog tkiva kod ALS

- Razlozi za pojavu i mehanizmi za progresiju ALS su i dalje nepoznati.
- Ne postoje biomarkeri za ranu detekciju ove neurodegenerativne bolesti.
- **Q:** Da li je pojava ALS vezana za poremećaj u funkciji nervnih ćelija koji je uzrokovan narušenim metabolizmom ROS/RNS?



Lou Gehrig



- **Q:** Da li postoji povećana količina slobodnog gvožđa u mozgu?
- Ako postoji, **•OH radikali**, koji se generišu u Fentonovoj reakciji, mogu biti glavni krivci za oštećenja neurona.
- Odlučujući faktor može da bude ne samo količina gvožđa, već i njegova redoks aktivnost.
- EPR nam može dati informaciju ne samo o količini metala nego i o njegovoj formi.



Korišćenje EPR-a u proučavanje nevnog tkiva kod ALS modela

- Intaktna nervna tkiva se ubacuju direktno u EPR kvarcne kivete.
- Uzorci: Moždano stablo (BS), kičmena moždina (SC), korteks (CTX), hipokampus (HC).
- Merjenja na 4-77K.
- **EPR je detektovao:** Citochrom c, slobodno, nespecifično vezano Fe, Fe-S klastere iz ETC kompleksa i Mn iz MnSOD.
- SC pokazuje **nov signal iz ALS pacova** u poređenju sa WT.



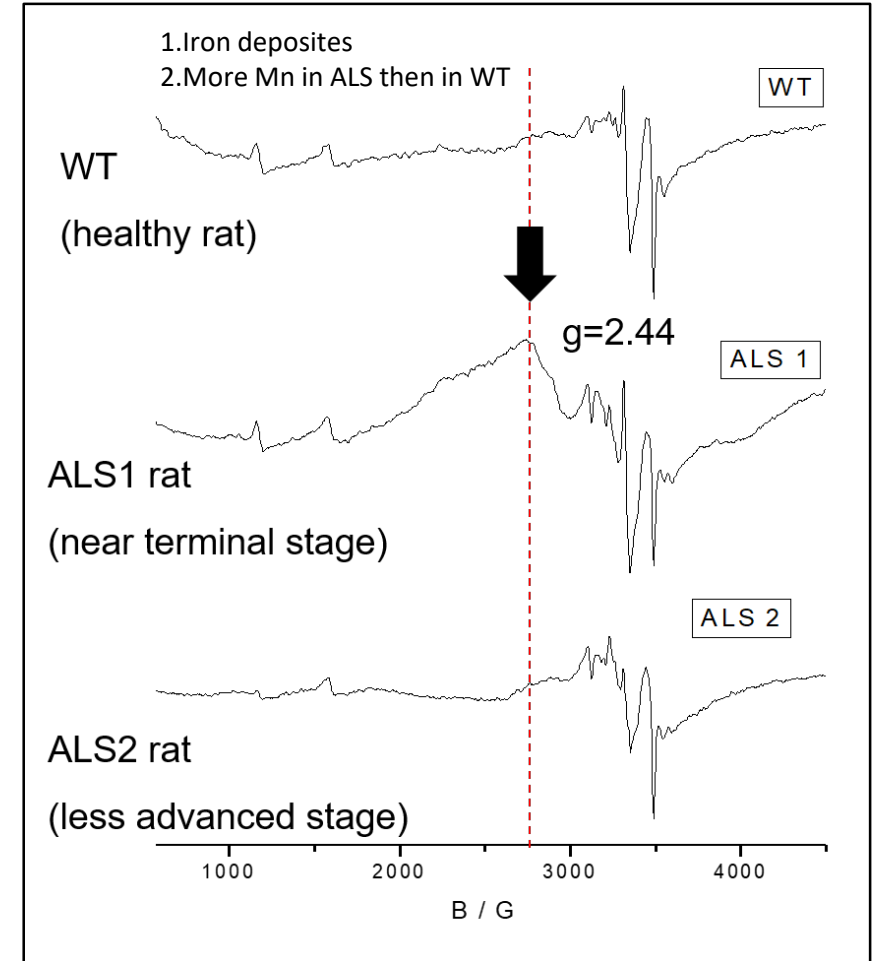
TG rats of Sprague-Dawley breed with a larger number of copies of the human SOD1 gene and inserted G93A mutation.

Promene:

Detektovano više Fe-O agregata i MnSOD.

Pretpostavka:

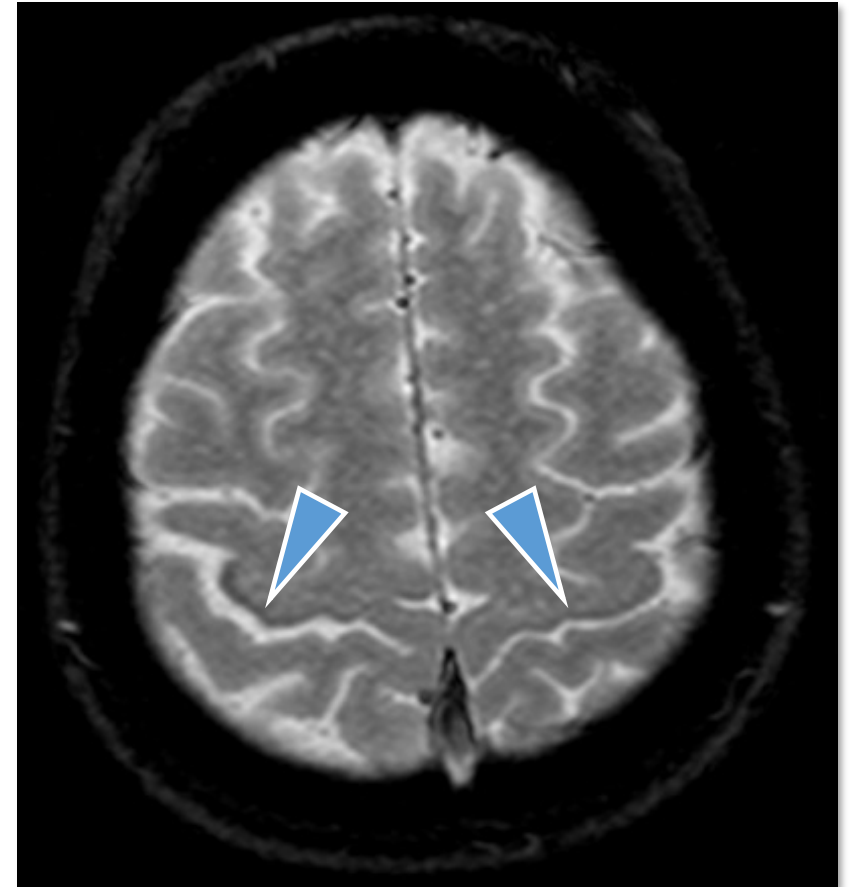
Depoziti redoks aktivnog Fe mogu biti uključeni u oksidativna oštećenja.





EPR za proučavanje propustljivosti BBB kod ALS

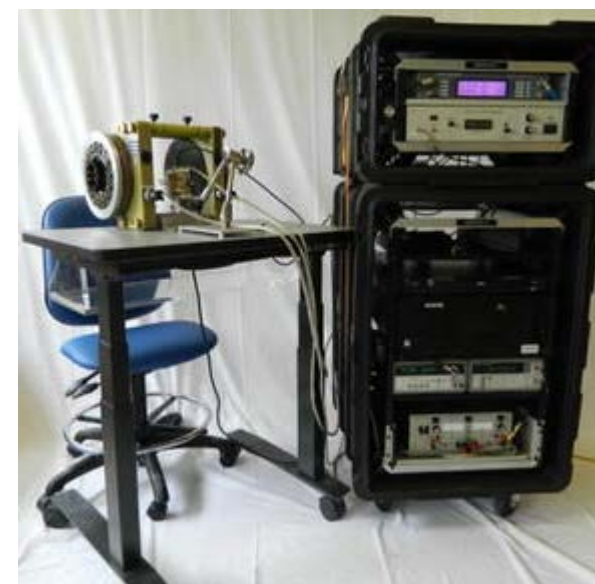
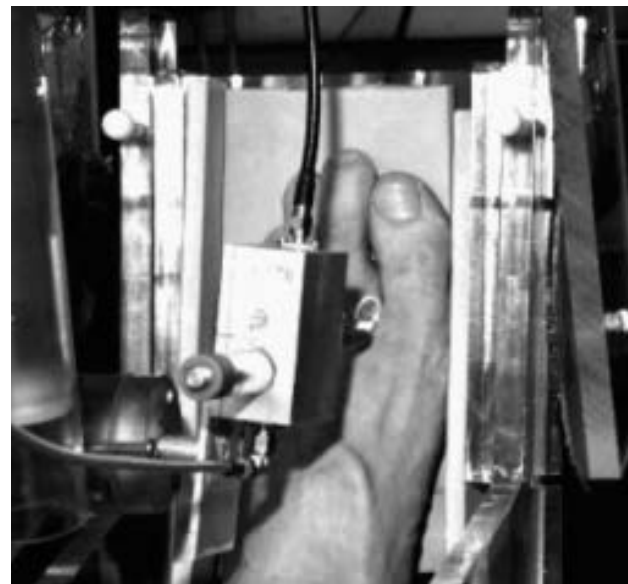
- Naši MRI rezultati pokazuju prisustvo Fe depozita u motornom korteksu ALS pacijenata.
- **Q:** Da li postoji „curenje“ Fe u CSF kroz oštećenu BBB?
- Pokušaj da je potvrdi ova pretpostavka.
- Takođe, bila bi veoma korisna i informacija o ukupnom redoks statusu moždanog tkiva.
- Za to treba koristiti **in vivo L-band EPR spektroskopiju** i specijalne spinske probe.



Depoziti gvožđa u mozgu
ALS pacijenta



EPR za ljude?



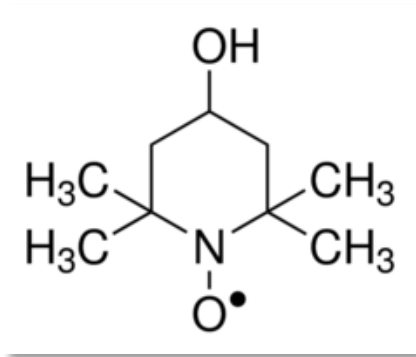
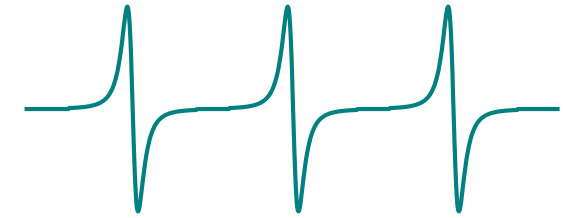
- EPR platforma koja se koristi za pozicioniranje i stabilizaciju stopala radi merenja pO₂ u stopalu. NMR Biomed. 2004;17:335–351
- EPR platforma koje se koristi za dozimetriju zuba. Doborvoljac ima rezonator koji je smešten u usta.



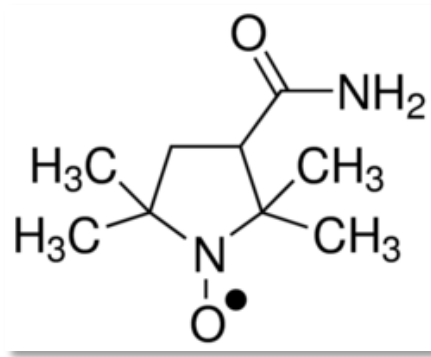
Upotreba EPR-a za proučavanje propustljivosti BBB kod ALS modela pacova

- Testirane su 3 spinske-probe (TEMPOL, 3CP, 3CxP).
 - TEMPOL (može proći i kroz CM, i kroz BBB)
 - 3CP (može proći kroz CM, ali ne kroz BBB)
 - 3CxP (ne može proći ni kroz CM, ni kroz BBB)

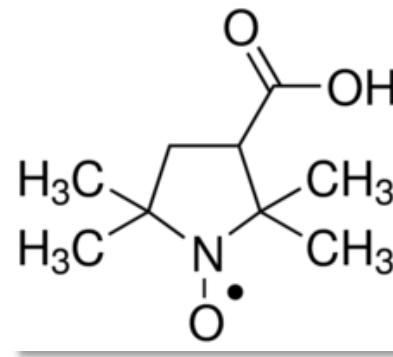
EPR signal je isti



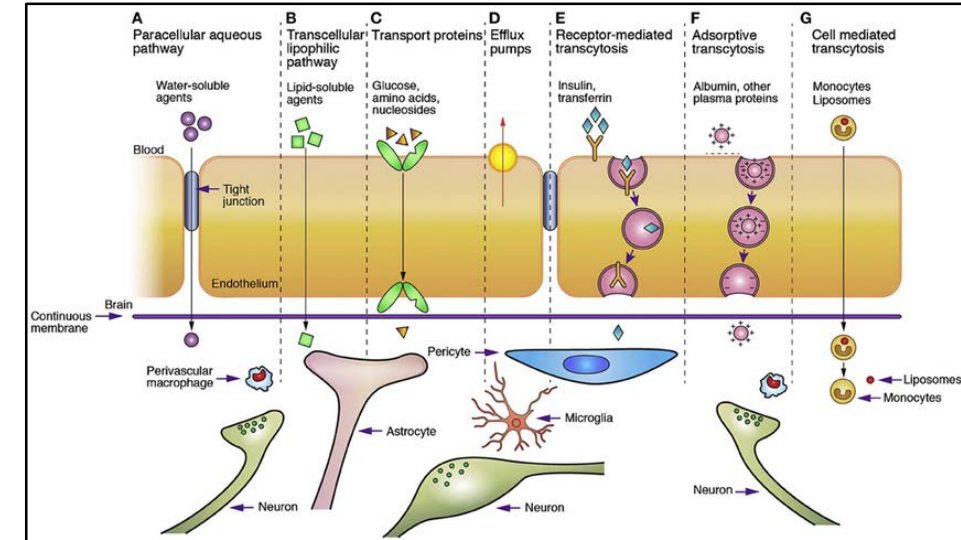
4-Hydroxy-TEMPO
(TEMPOL)



3-Carbamoyl-PROXYL
(3CP)



3-Carboxy-PROXYL
(3CxP)

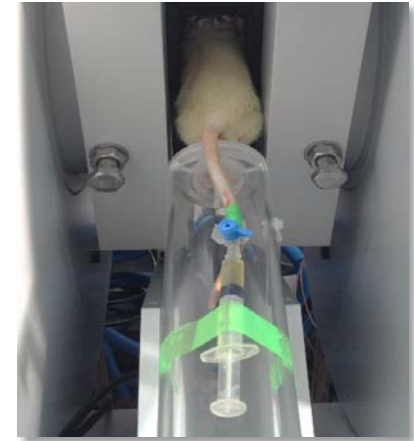


Transport pathways across blood brain barrier (Chen and Liu, 2012.)



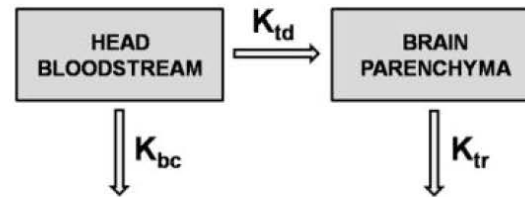
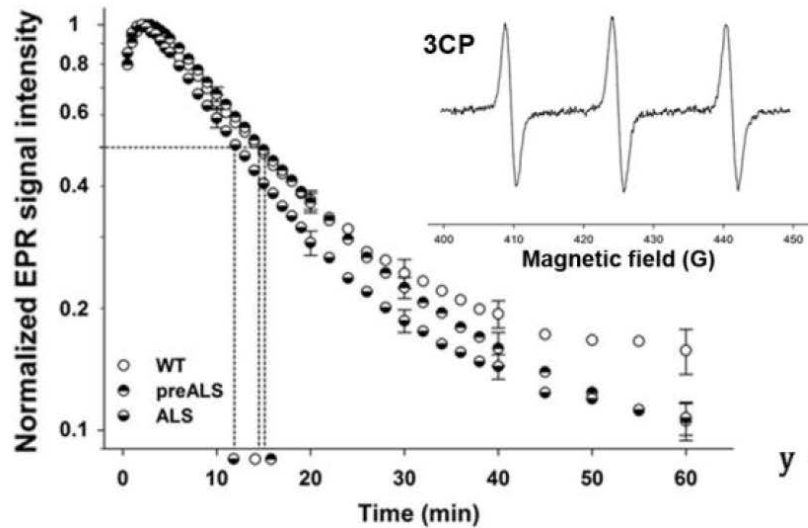
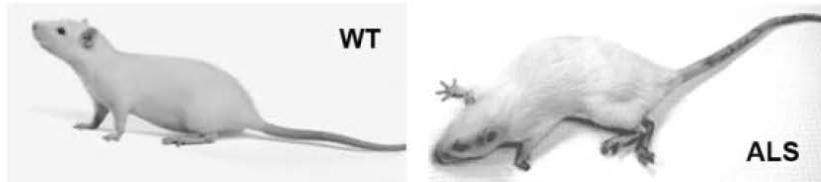
Upotreba EPR-a za proučavanje propustljivosti BBB kod ALS modela pacova

- Pacovima se daje anestezija ketamin-xylazin.
- U repnu venu se injektuje rastvor spinske probe ($2 \mu\text{mol/g b.wt.}$).
- Glava pacova se postavlja u rezonator L-band BLGR36.
- Odmah nakon injektiranja, snima se spektar.
- EPR signal spinske-probe se raspada pod uticajem reaktivnih vrsta, koji probu redukuju u EPR nevidljivu vrstu.





Upotreba EPR-a za proučavanje propustljivosti BBB kod ALS modela pacova



$$y = \left(1 + \frac{k_{td}}{k_{tr} - k_{td} - k_{bc}}\right) e^{-(k_{bc} + k_{td})x} - \frac{k_{td}}{k_{tr} - k_{td} - k_{bc}} e^{-k_{tr}x}$$

k_{bc} konstanta brzine redukcije putem krvi, k_{td} konstanta brzine distribucije u tkiva, k_{tr} konstanta redukcije u tkivima.

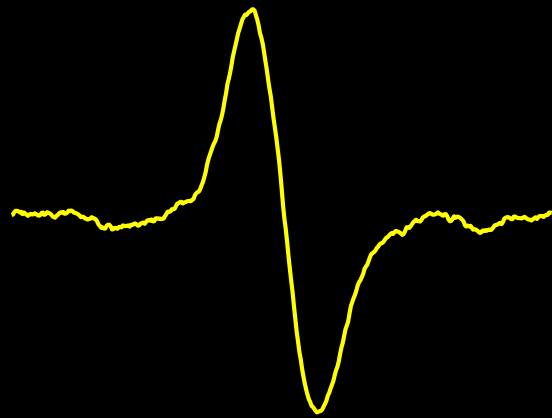
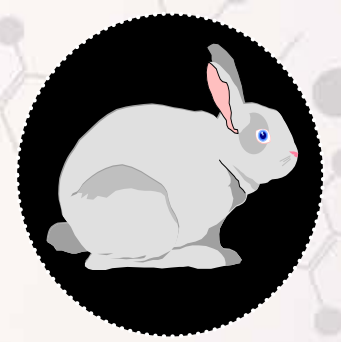
- Uočene su 3 različite kinetike.
- Simptomatski ALS pacovi redukuju reduce 3CP najbrže.
- Za objašnjenje kinetike upotrebljen je model iz 3 kompartmenta, i uočena su 3 faktora koji doprinose redukciji probe:

- (i) redukcija putem krvi
- (ii) distribucija u tkiva
- (iii) redukcija u tkivima

• Ova studija je otkrila da postoji narušena BBB i promenjen oksidativni status u moždanom tkivu SOD1G93A pacovskog modela ALS.



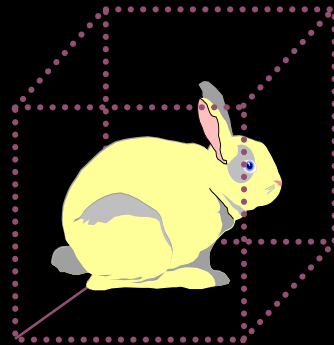
EPR imidžing



EPR spektroskopija

Nema prostorne raspodele

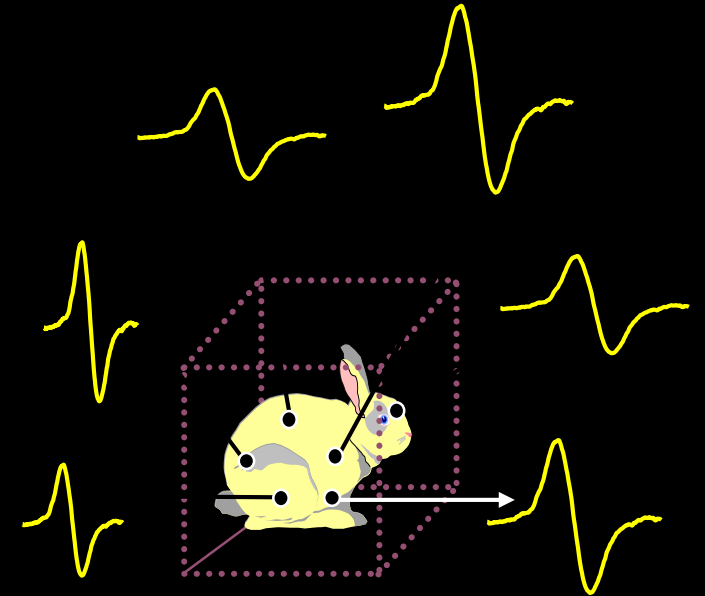
0 + 1 dim.



EPR prostorni imidžing

Postoji prostorna raspodela Spinske gustine

3 + 0 dim.

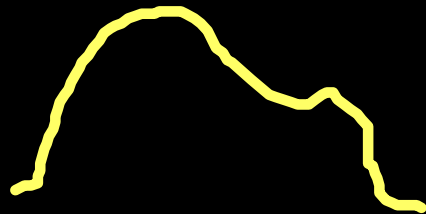
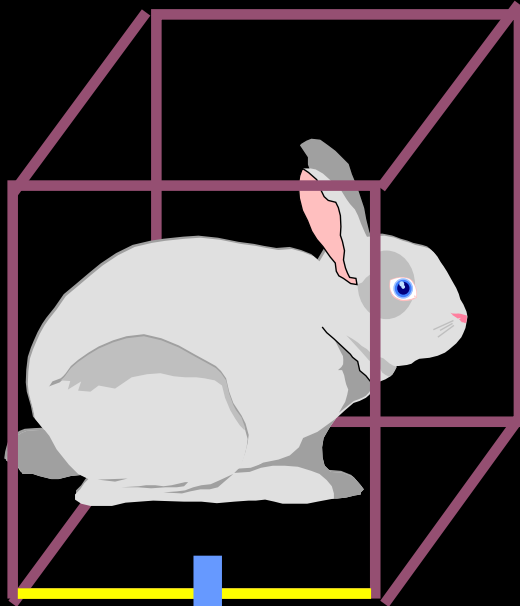
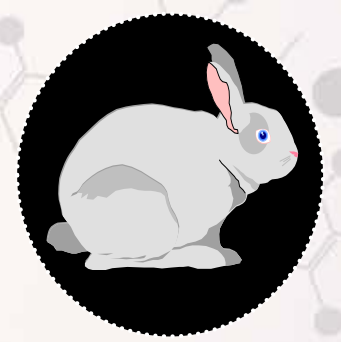


Spektranlo-prostorni midžing

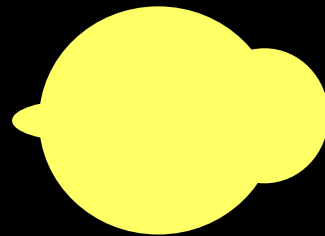
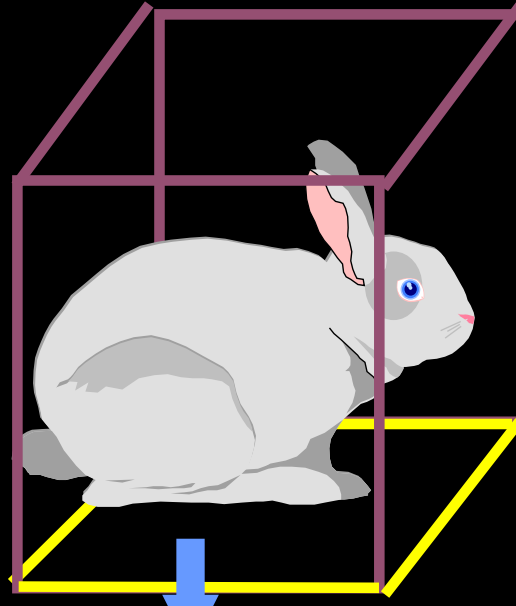
Prostorna raspodela + Izgled spektra
3 + 1 dimensional



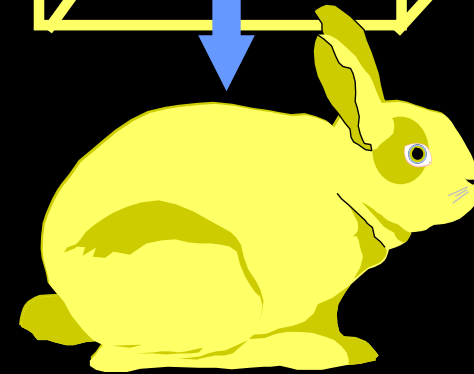
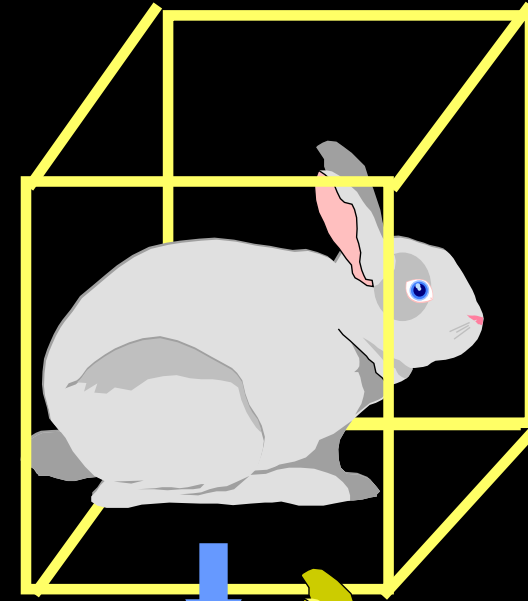
Tipovi prostornog imidžinga



1D PROSTORNI



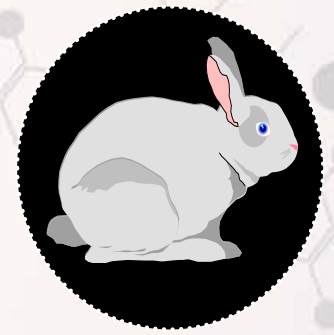
2D PROSTORNI



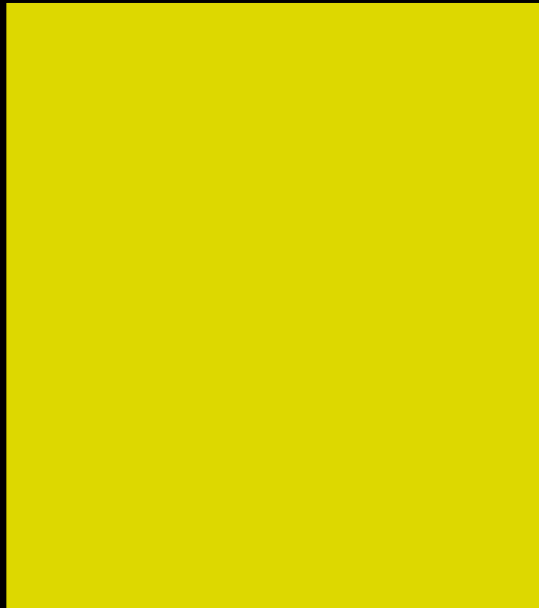
3D PROSTORNI



Gradijent magnetnog polja

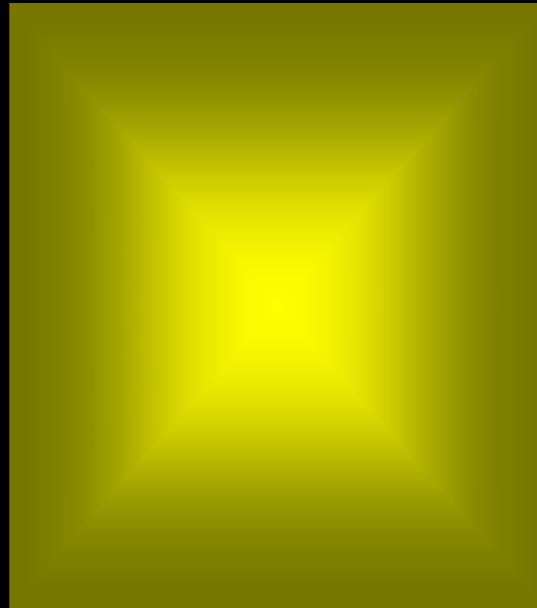


Homogeno
(Spektroskopija)



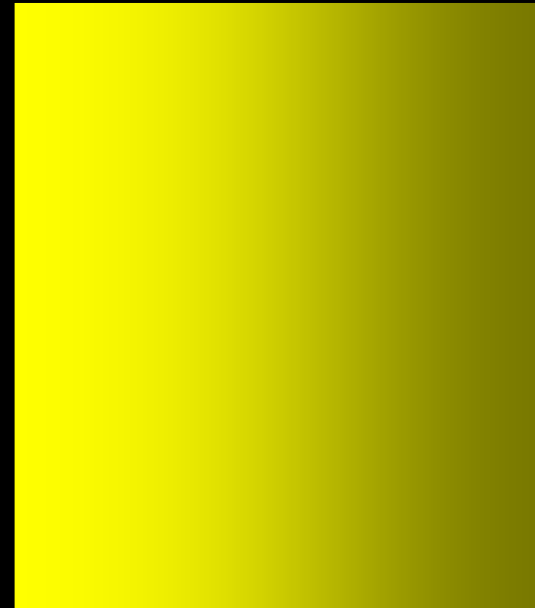
Rastojanje --->

Ne-homogeno
(Neupotrebljivo)



Rastojanje --->

Gradijent
(Imidžng)



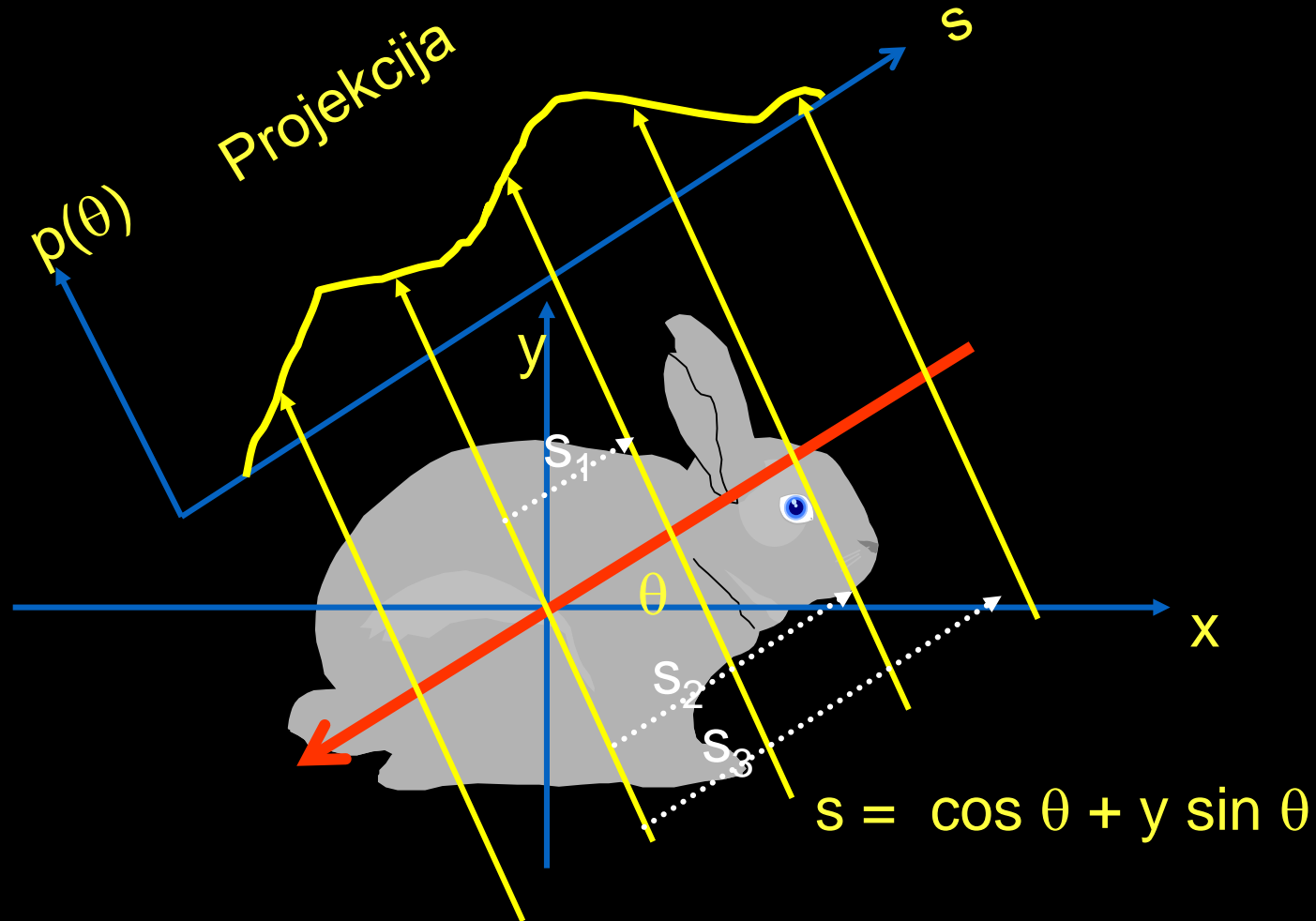
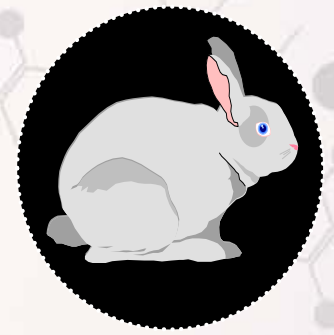
Rastojanje --->



<----- Magnetno polje

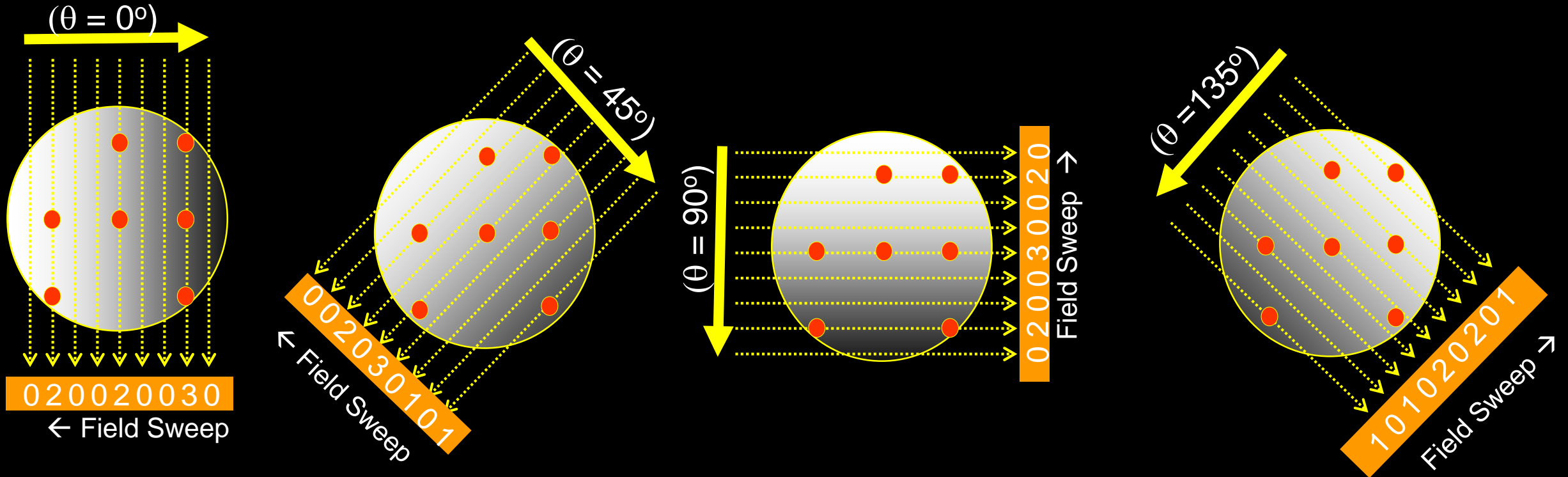
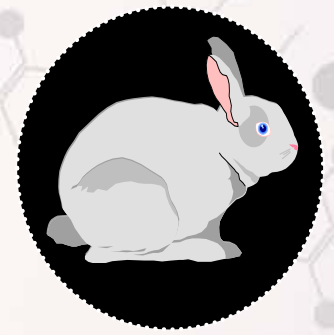


Projekcija





Akvizicija spektra



● Spinska gustina

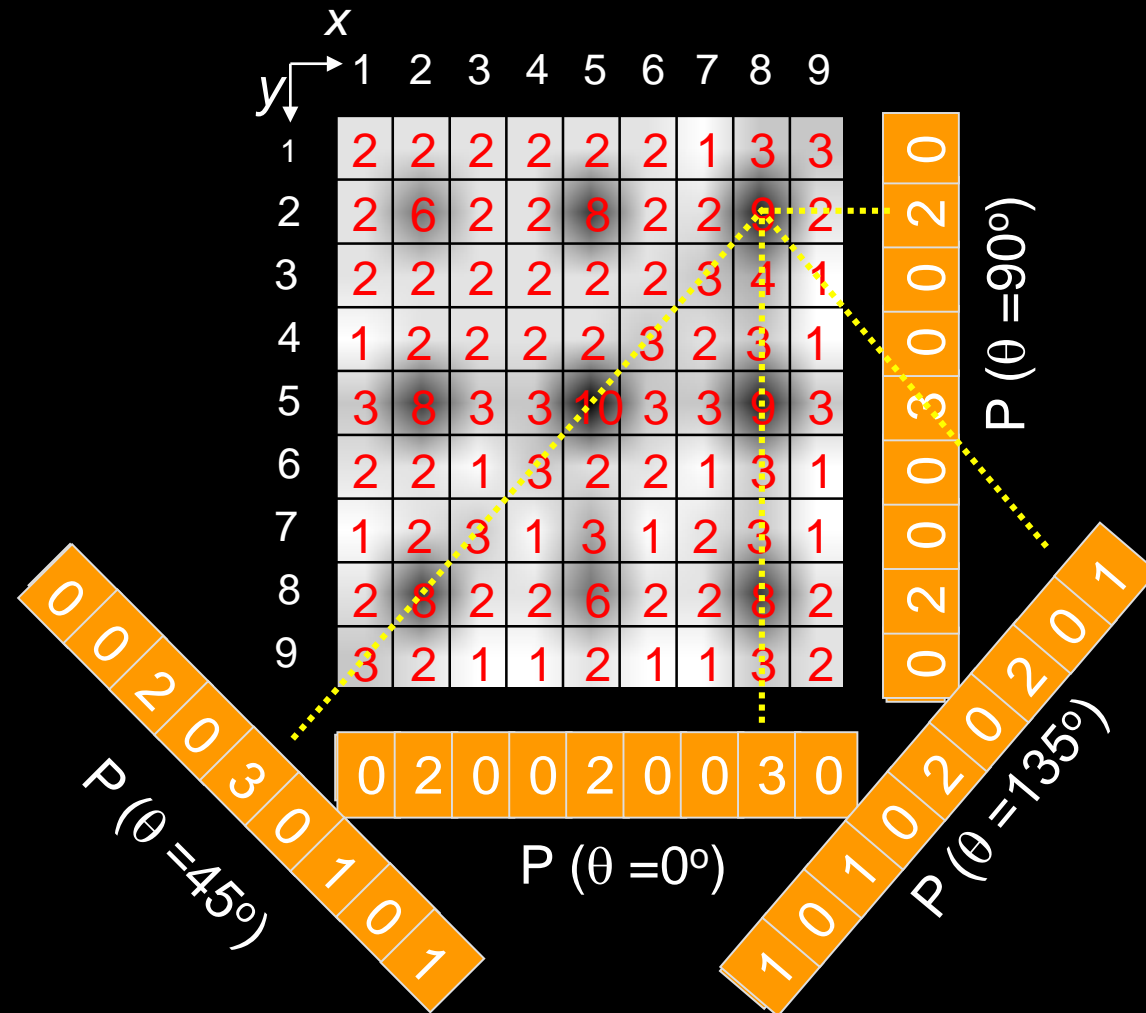
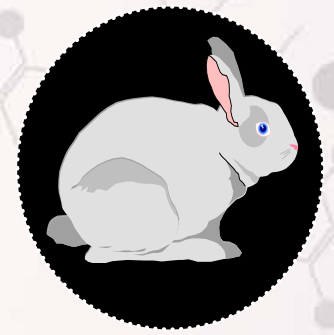
..... Smer

———— Gradijent polja

Projekcija

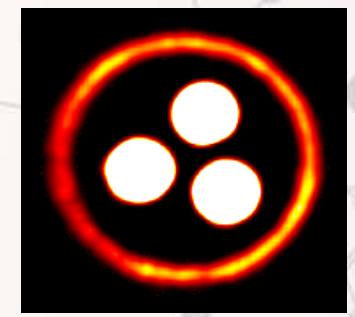


Rekonstrukcija slike (backprojection)

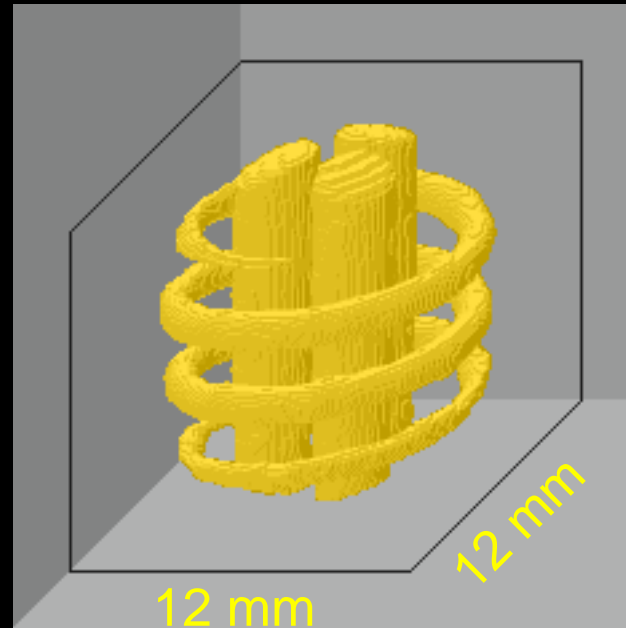




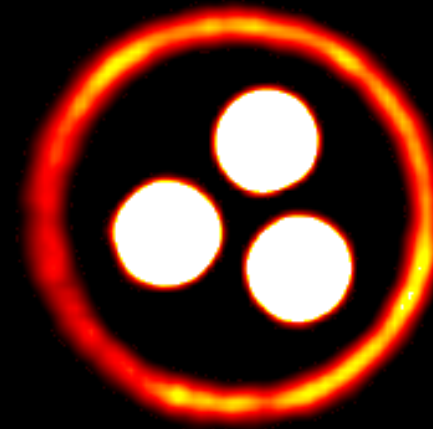
3D imidžing spiralni fantom



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



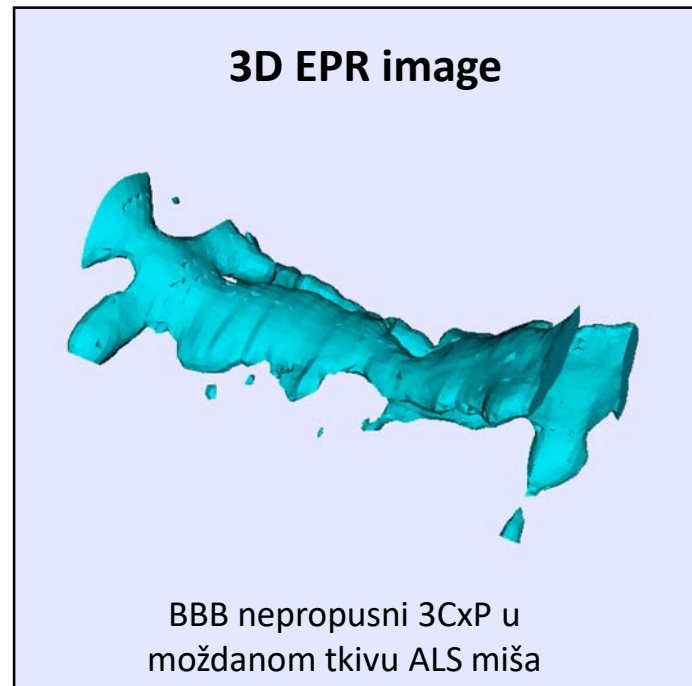
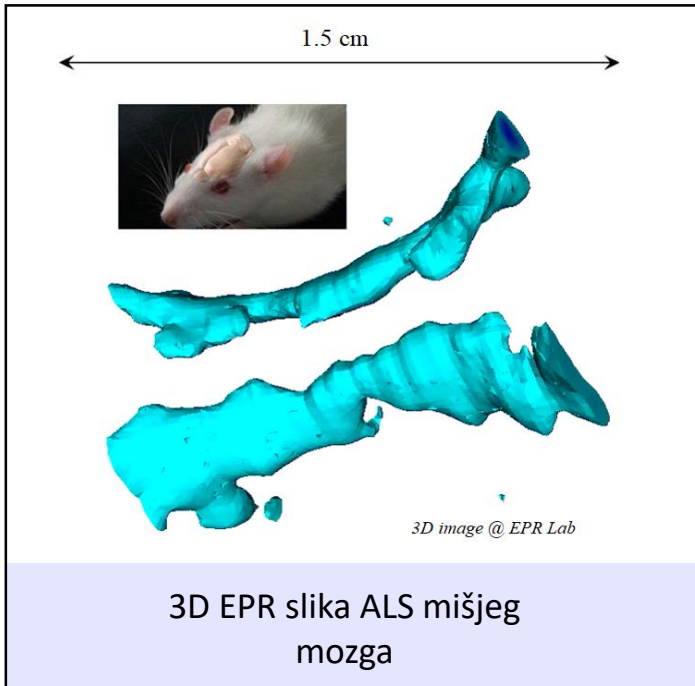
3D kompozitna slika



2D projekcija slike



Upotreba EPR-a za proučavanje propustljivosti BBB kod ALS modela pacova



- Uočene su 3 različite kinetike.
- Simptomatski ALS pacovi redukuju reduce 3CP najbrže.
- Za objašnjenje kinetike upotrebljen je model iz 3 kompartmenta, i uočena su 3 faktora koji doprinose redukciji probe:
 - (i) redukcija putem krvi
 - (ii) distribucija u tkiva
 - (iii) redukcija u tkivima

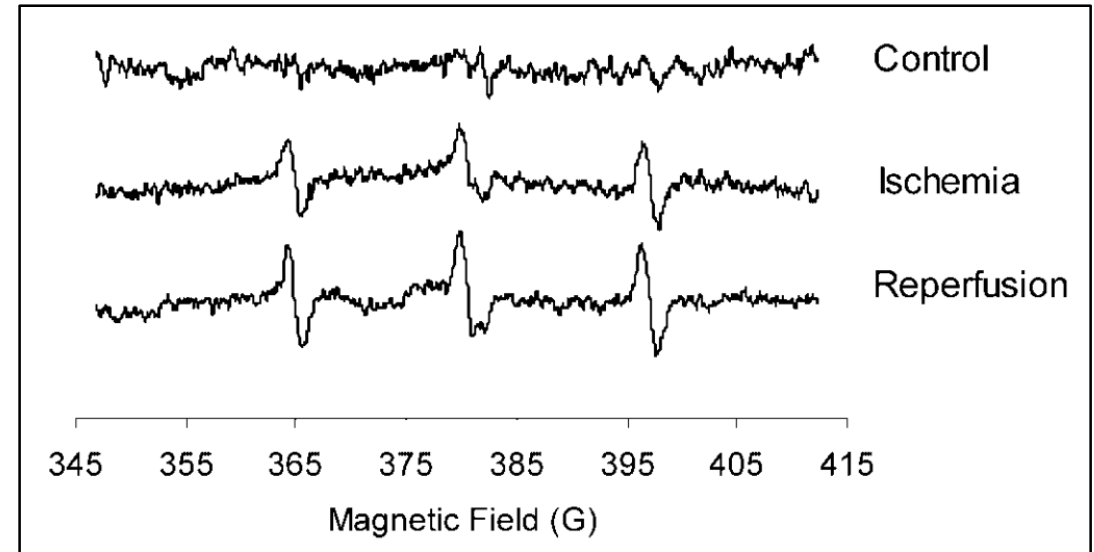
k_{bc} konstanta brzine redukcije putem krvi, k_{td} konstanta brzine distribucije u tkiva, k_{tr} konstanta redukcije u tkivima.

- Ova studija je otkrila da postoji narušena BBB i promenjen oksidativni status u moždanom tkivu SOD1G93A pacovskog modela ALS.

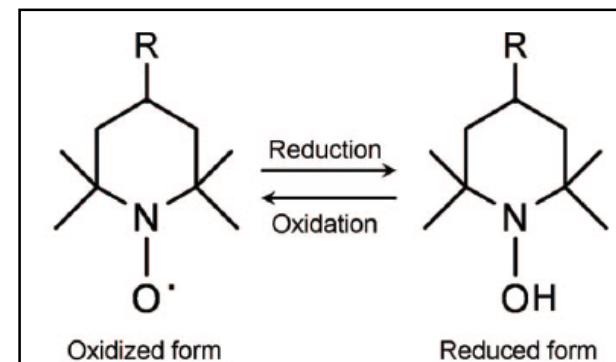


EPR za detekciju ROS *in vivo*

- Veoma težak zadatak, pošto su ROS kratkoživeći.
- Treba koristiti **spin-trapove**.
- Ali, spin-adukti su takođe kratkoživeći *in vivo* jer se veoma lako redukuju do hidrosilamina.
- Jedno od rešenja je injektirati HA i pratiti njegovu reoksidaciju od strane ROS.
- Eksperiment: i.p. Injektiranje hidrosilamina CP-H.
- Tokom okluzije srednje cerebralne arterije (MCAO) pacova, EPR signal oksidovanog CP-H se povećava nakon MCAO, što pokazuje generisanje ROS zbog cerebralne ishemije, (reaktivne vrste reaguju sa HA proizvodeći EPR-vidljivi nitroksid).
- Nakon ishemije, signal oksidovane probe CP-H i dalje raste, što pokazuje da se u nastavku dešava još intenzivnije formiranje ROS, kao posledica reperfuzije.



EPR merenje oksidativnos stresa u mozgu tokom cerebralne ishemije i reperfuzije



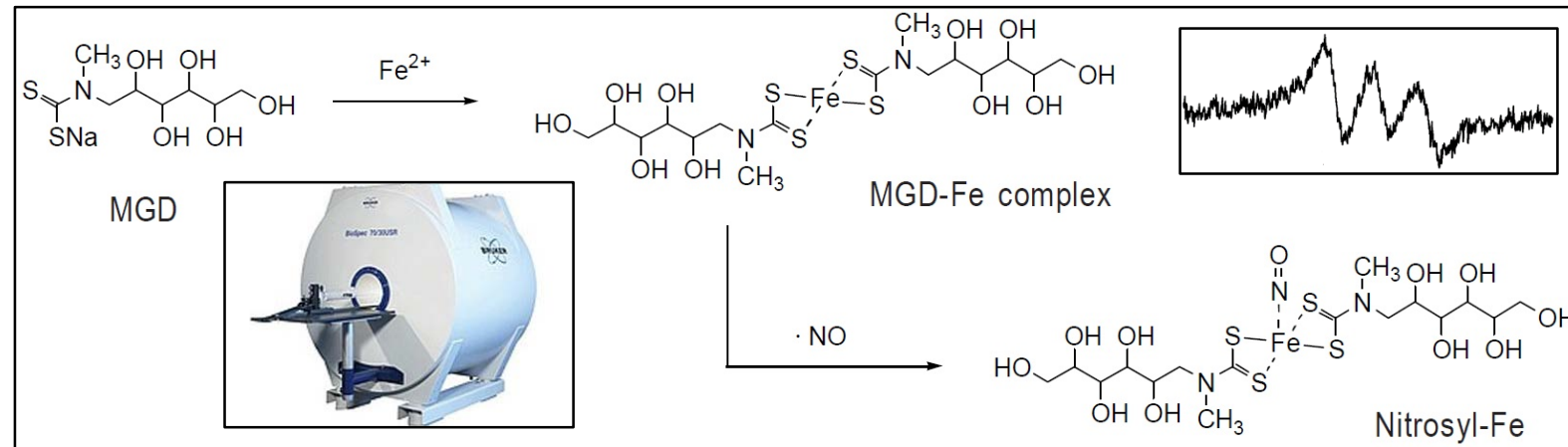
Reoksidacija
hidrosilamina do
aminoksil radikala



Imidžing NO• radikala *in vivo*

- Da li možemo napraviti EPR imidžing slobodnih radikala *in vivo*?
- **Problem:** Trapovani radikali (adukti) uvek imaju multiplete usled hiperfinog cepanja linija. Često ima više od jedne vrste adukta.
- **Moguće rešenje:** Koristiti MRI i paramagnetne osobine spin-adukata (MRI kontrastni agenasi).
- **Primer:** Detektovati distribuciju NO• *in vivo*, indukovanog lipopolisaharidnim (LPS) septičkim šokom kod pacova.

- Spin-adukti se najpre detektuju EPR *in vivo* i *ex vivo* tehnikama.
- Distribucija radikala se vizualizuje pomoću MRI zbog smanjenja T1 i T2 relaksacionih vremena.



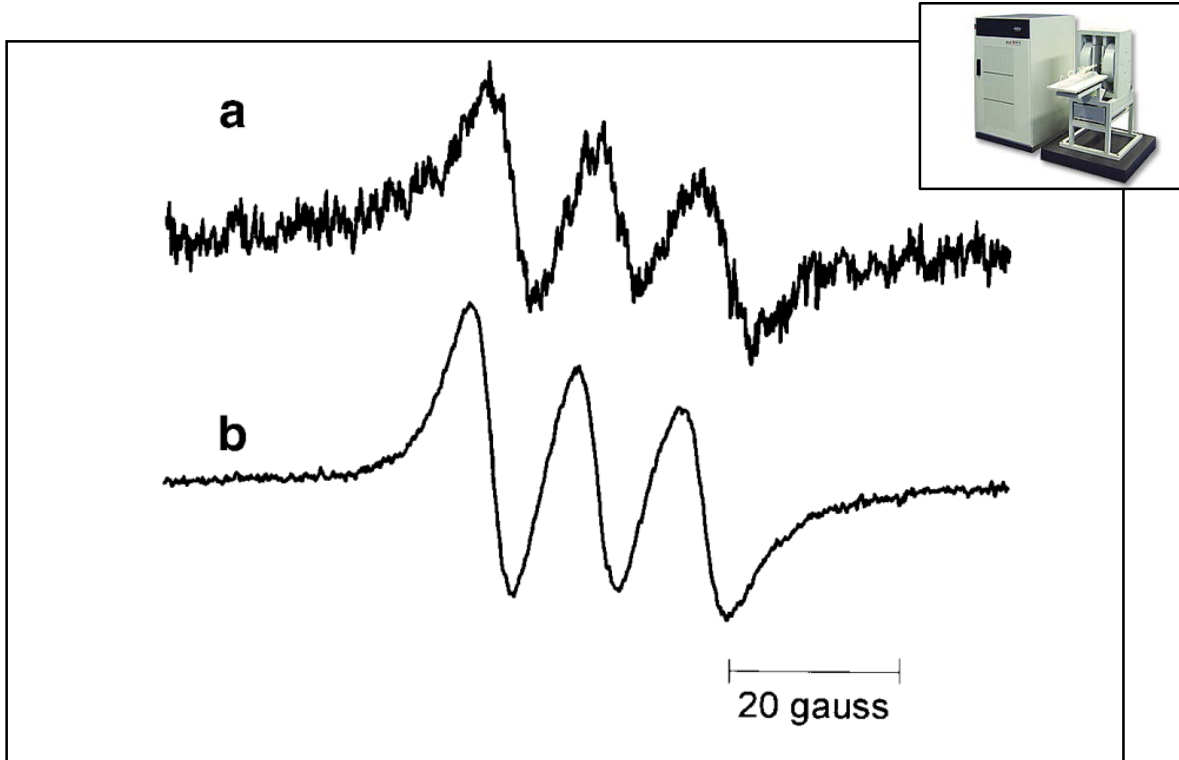
NO• se ugrađuje u helatni kompleks Fe(II) sa N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate - MGD), koji zatim daje EPR aktivni (MGD)₂-Fe(II)-NO



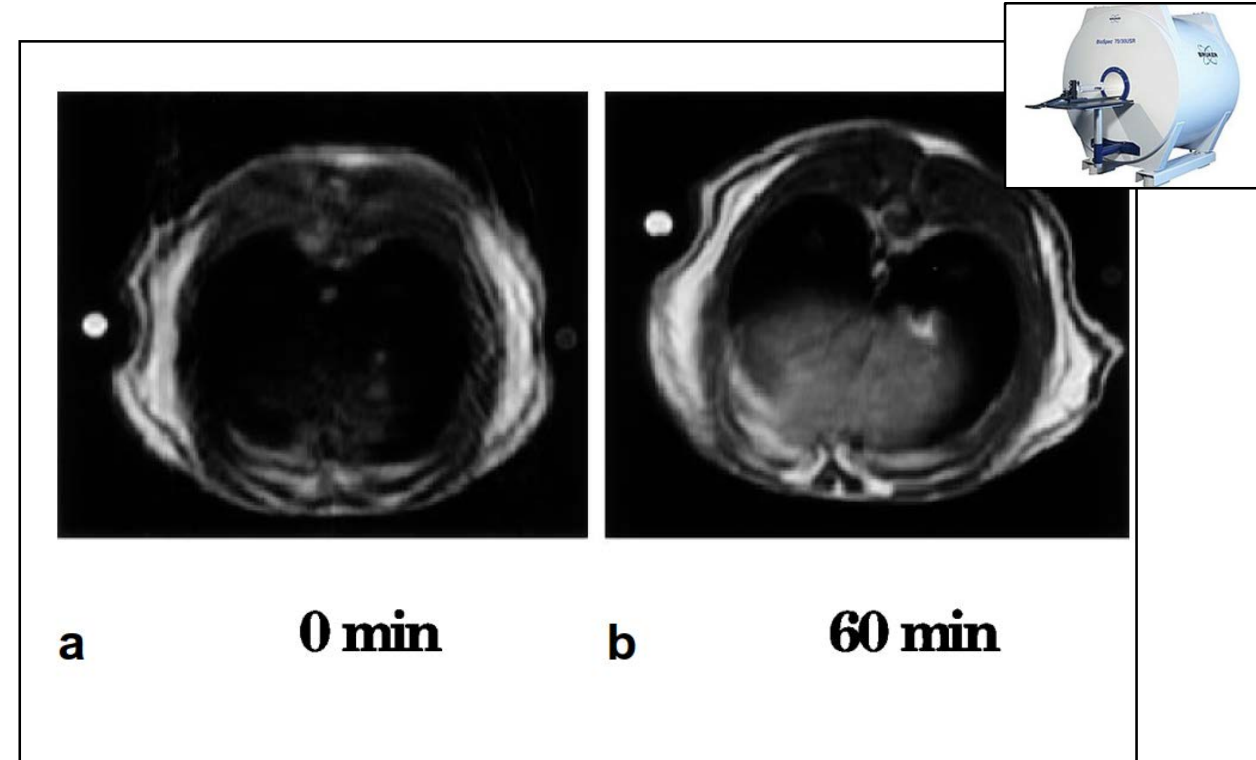
Surface coil over liver



Imidžing NO• *in vivo* pomoću EPR + MRI



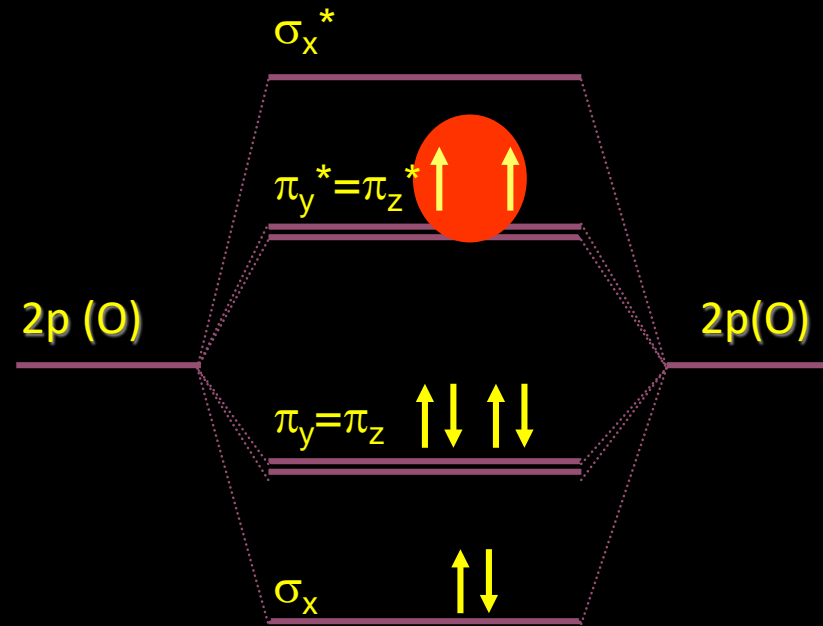
EPR spektri $(MGD)_2\text{-Fe(II)-NO}$ kod LPS-tretirane životinje.
a: In vivo L-band EPR spektar u oblasti jetre posle 2 sata.
b: Ex-vivo X-band EPR spektar isečka jetre posle 1 sata.



T1-naglašena MR slika u aksijalnoj ravni u oblasti jetre.
a: Kontrola, pre injektiranja kompleksa MGD;
b: 60 min nakon injektiranja MGD kompleksa.



Molekularni kiseonik je paramagnetik



Molekularni 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, molekularni kiseonik možemo indirektno detektovati i kvantifikovati korišćenjem spin-label oksimetrije.



EPR oksimetrijske probe

Čvrste probe (partikule)

Lithium phthalocyanine (LiPc)

Sugar chars

Fusinite

Coal

India ink

Rastvorne probe

Nitroxides

Trityl radicals

Šta se može detektovati?

- pO_2 (mmHg/Torr)
- Lokalizovana merenja
- Rezolucija < 0.2 mmHg
- Ponovljena merenja
- Satbilni od više dana do nedelja
- Ne zavise od medijuma

- Koncentracija (mM)
rastvorenog kiseonika
- Rezolucija 2-10 mmHg
- Neinvazivni



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

Sendhil Velan, S., Spencer, R.G.S., Zweier, J. L. & Kuppusamy P. *Magn. Reson. Med.* 43, 804-809 (2000)

