

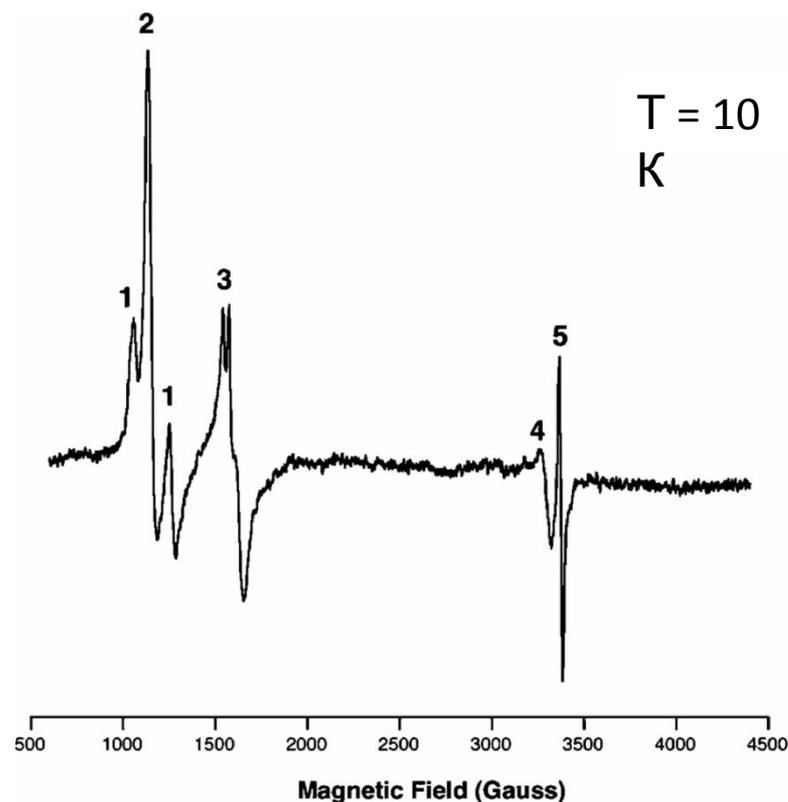
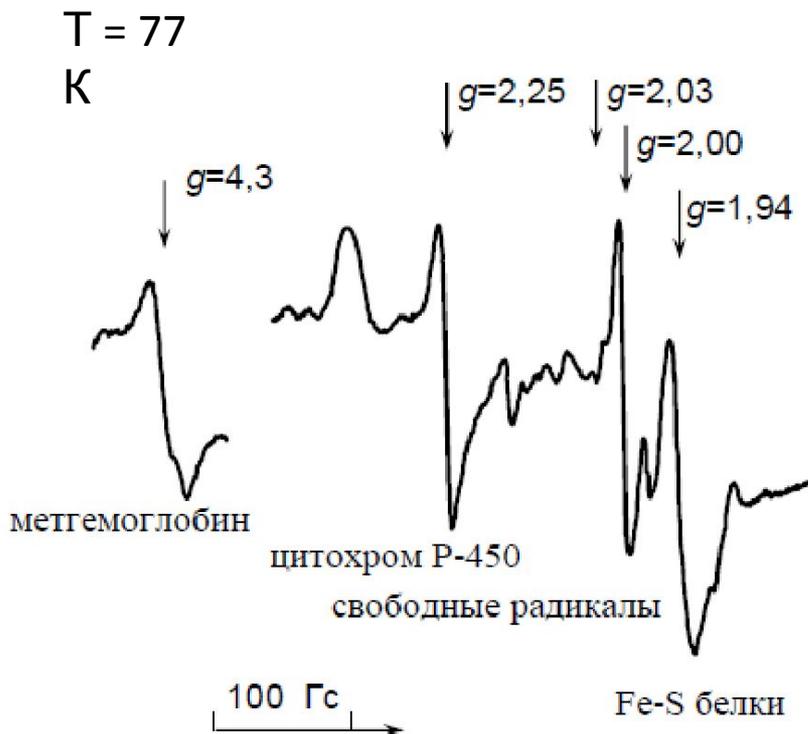
Основные направления применения ЭПР-спектроскопии в биологических исследованиях

1. Исследование нативных биологических объектов (свободные радикалы и ионы металлов переменной валентности)
2. Исследование свободных радикалов с использованием спиновых ловушек
3. Применение спиновых меток и зондов

Основные направления применения ЭПР-спектроскопии в биологических исследованиях

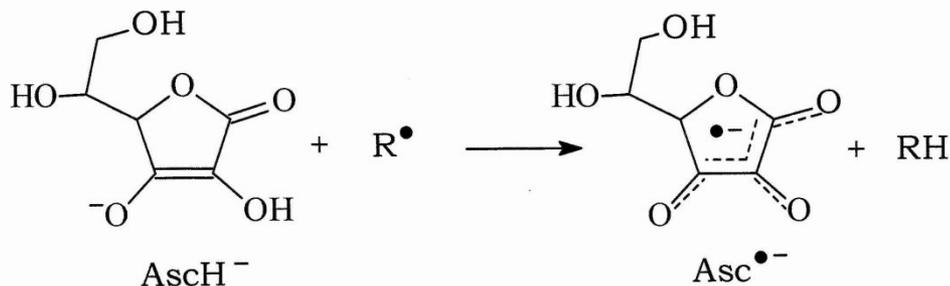
1. Исследование нативных биологических объектов (свободные радикалы и ионы металлов переменной валентности)
2. Исследование свободных радикалов с использованием спиновых ловушек
3. Применение спиновых меток и зондов

Сигналы ЭПР печени и крови



- 1- гемовое железо каталазы
- 2- гемовое железо метгемоглобина
- 3- негемовое железо трансферина
- 4- медь церулоплазмينا
- 5- свободный радикал глобина

Сигнал ЭПР радикала аскорбата



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

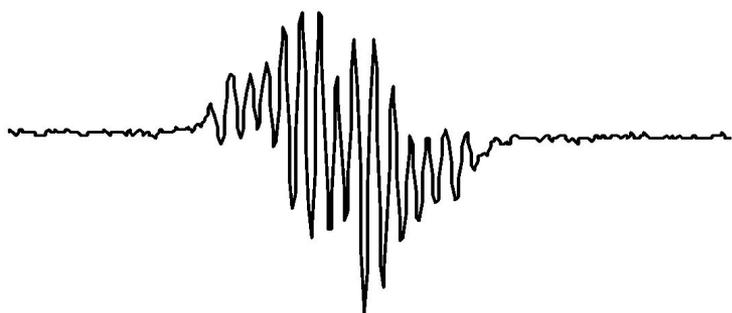
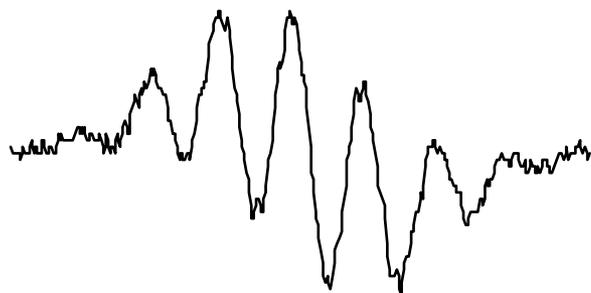
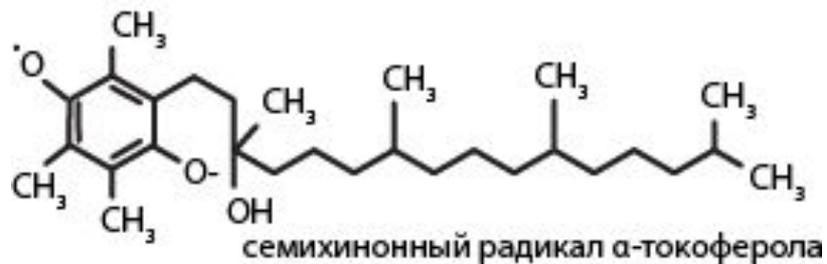
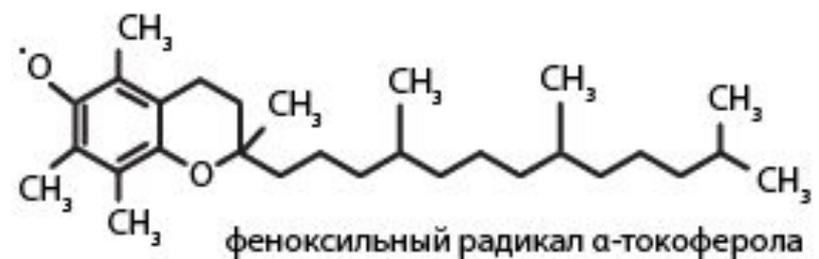
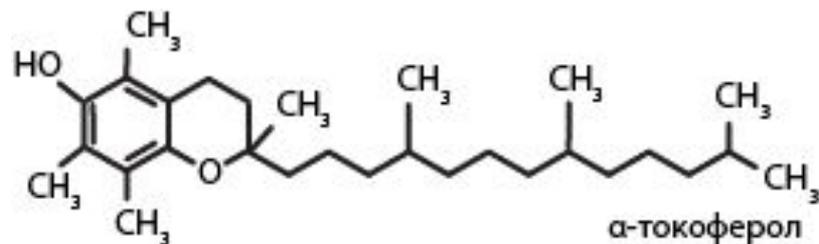


аскорбат + пероксидаза

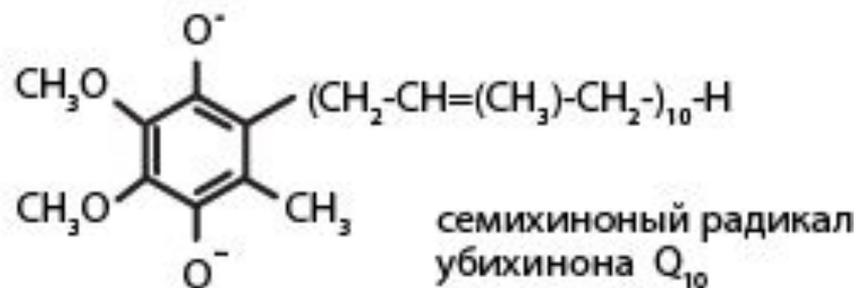
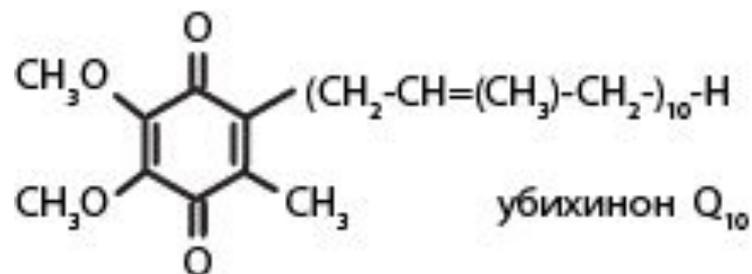
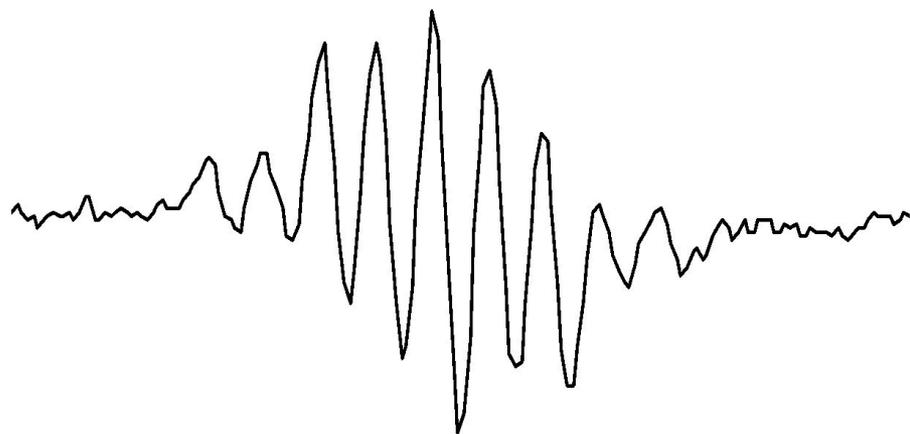
Добавление пероксидазы приводит к увеличению сигнала ЭПР и последующему его исчезновению. Длительность кинетики пропорциональна концентрации аскорбата в крови.



Спектры ЭПР радикалов α -токоферола



Спектр ЭПР семихинонного радикала убихинона Q₁₀



Спектр ЭПР облученного УФ светом цистеина

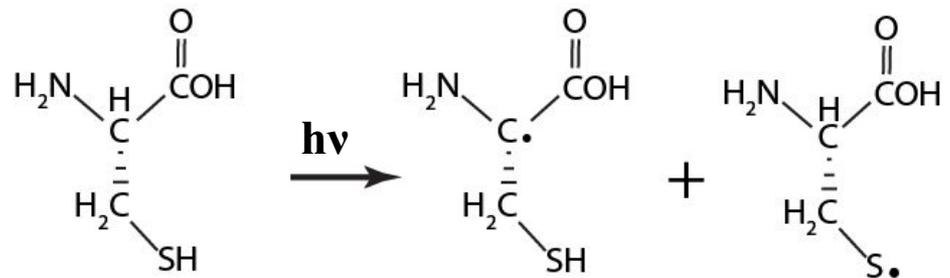
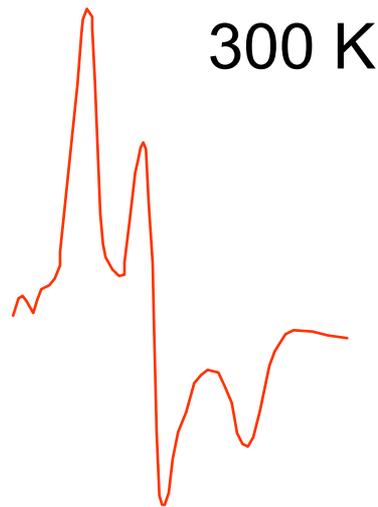
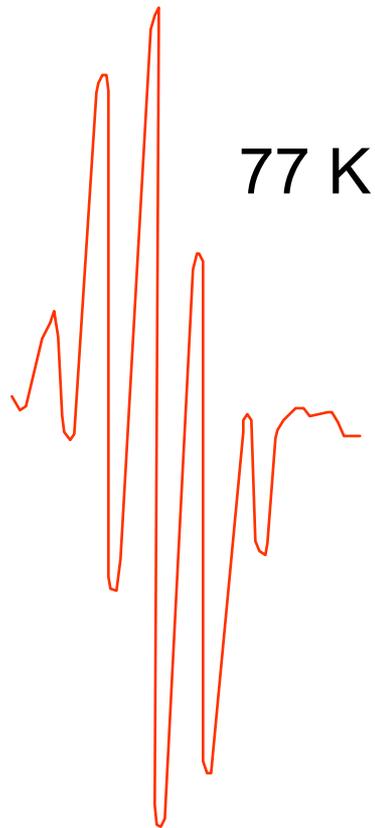
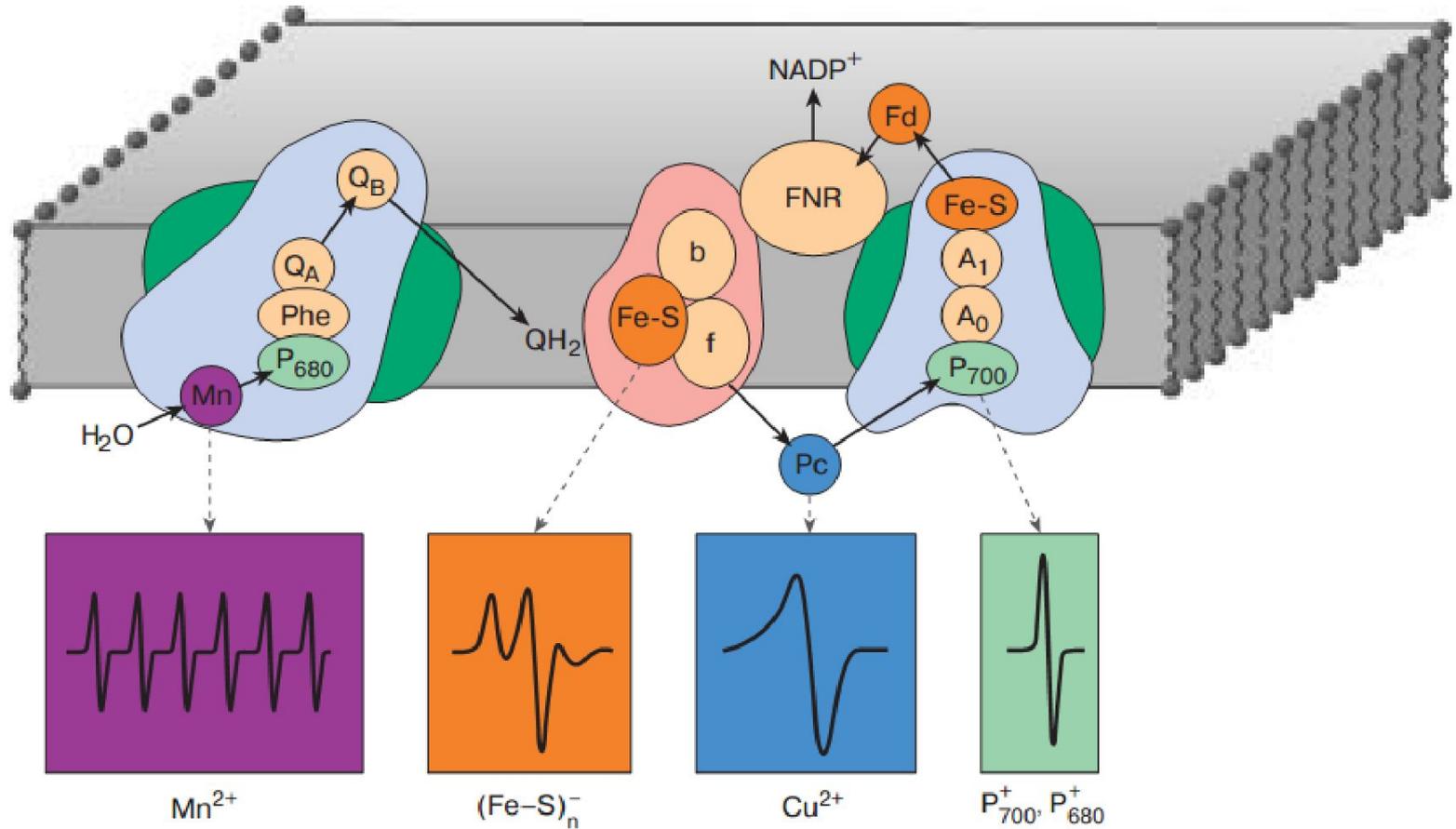
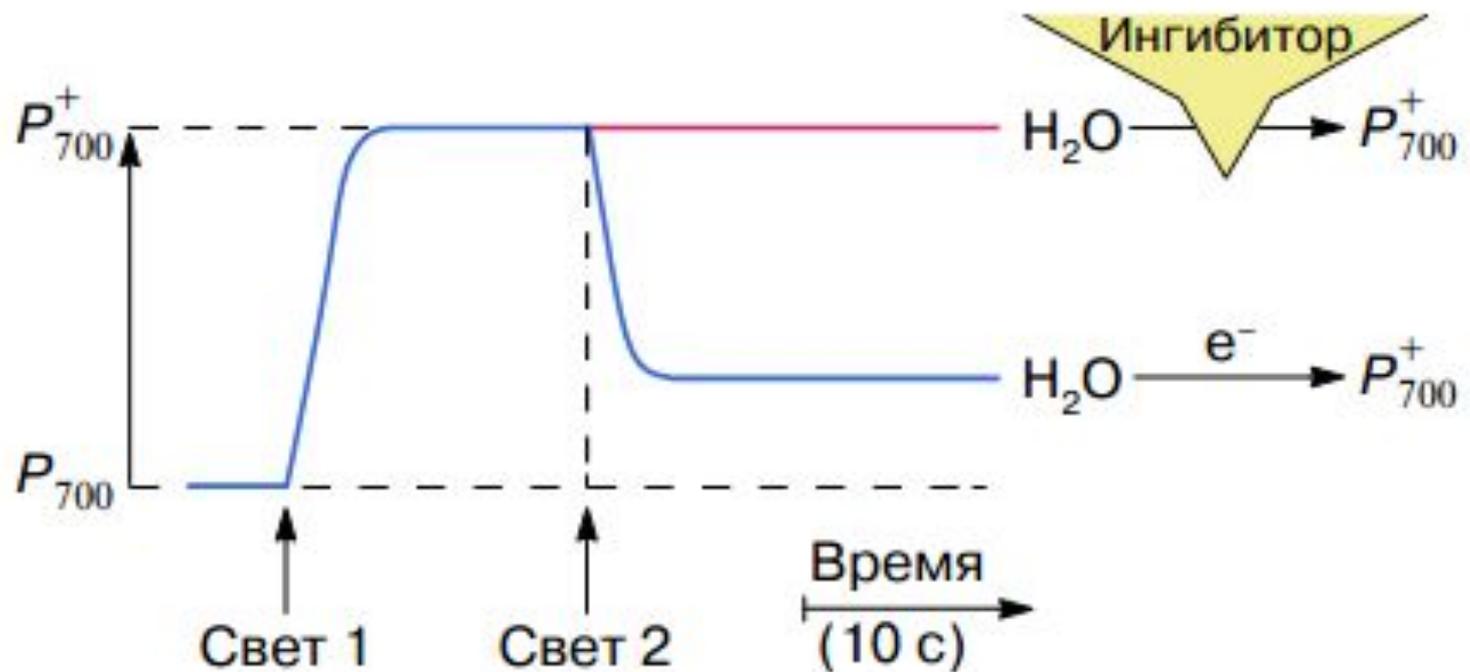


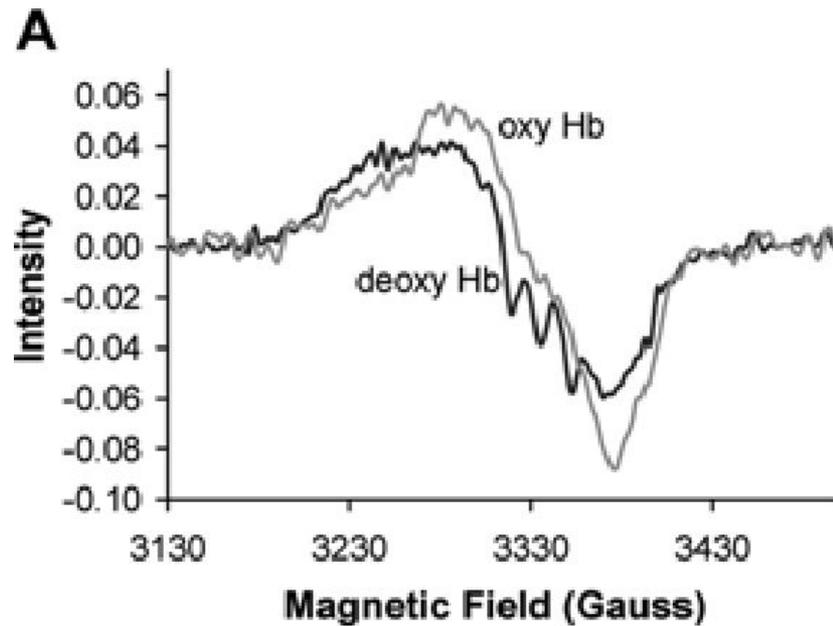
Схема расположения электронных переносчиков в тилакоидной мембране хлоропласта и типичные спектры ЭПР переносчиков



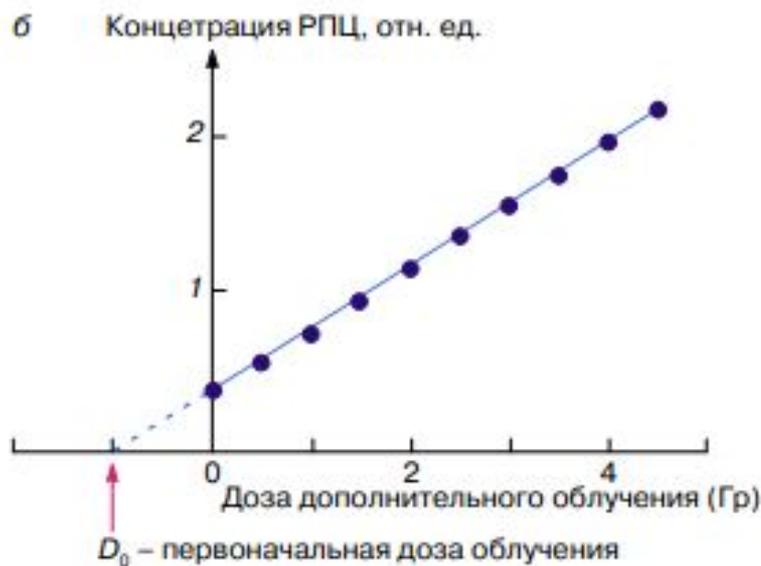
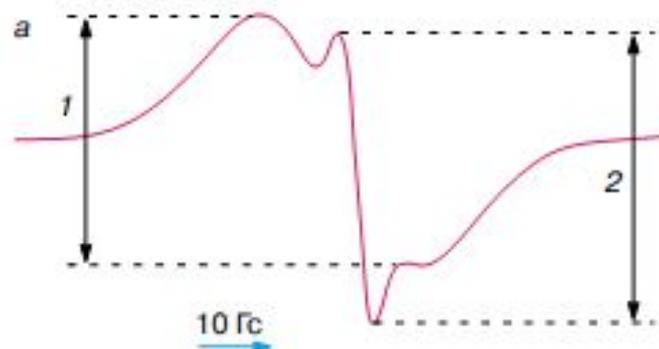
Кинетика изменения сигнала ЭПР 1 от окисленных реакционных центров фотосистемы 1 в хлоропластах, вызванных действием света с различной длиной волны



Спектры ЭПР гемоглобина в присутствии NO



Спектр ЭПР эмали зубов и зависимость интенсивности радиационно-индуцированного сигнала 2 от дозы дополнительного ионизирующего излучения

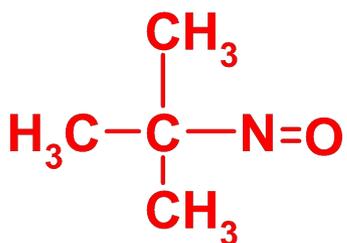


Основные направления применения ЭПР-спектроскопии в биологических исследованиях

1. Исследование нативных биологических объектов (свободные радикалы и ионы металлов переменной валентности)
2. Исследование свободных радикалов с использованием спиновых ловушек
3. Применение спиновых меток и зондов

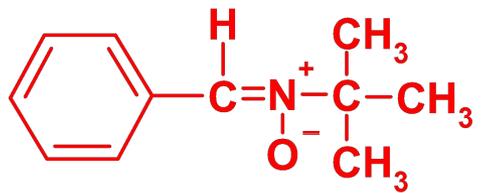
Основные виды спиновых ловушек

нитрозосоединения

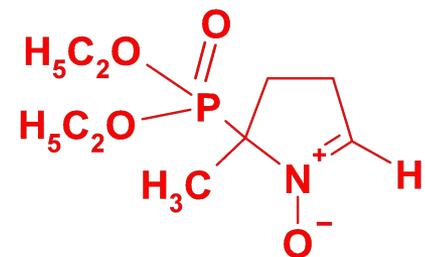


трет-нитрозобутан

нитроны

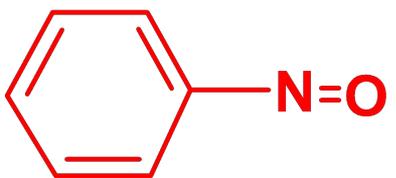


PBN

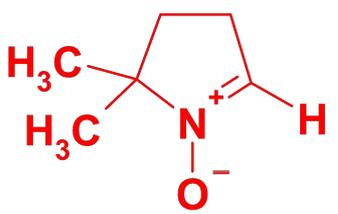


DEPMPO

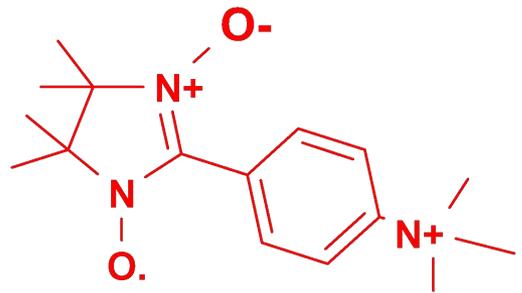
Нитронил-нитроксилы



нитробензол



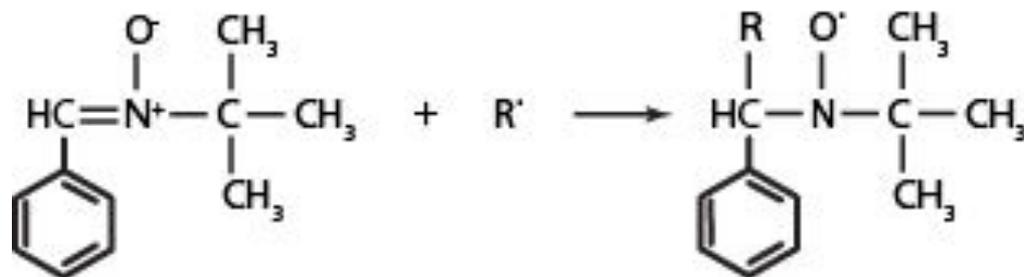
DMPO



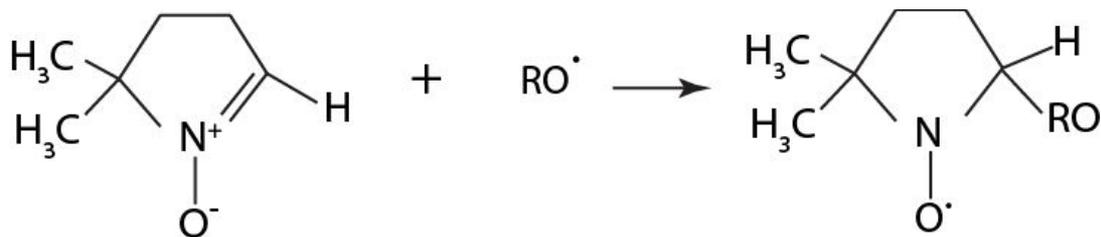
NNR

Взаимодействие PNB и DNPO со свободными радикалами

PNB



DNPO



Спектры ЭПР PNB



Pre- (A) and postexercise (B) electron spin resonance (ESR) spectra of α -phenyl-*tert*-butylnitron (PNB) adduct in human plasma after maximal aerobic exercise.

Ashton et al. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. Journal of Applied Physiology Published 1 December 1999 Vol. 87 no. 6, 2032-2036

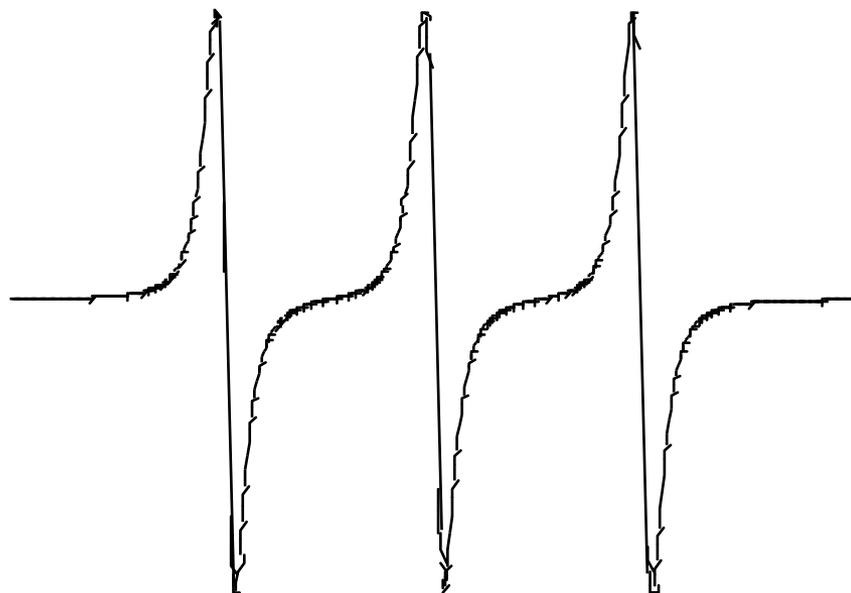
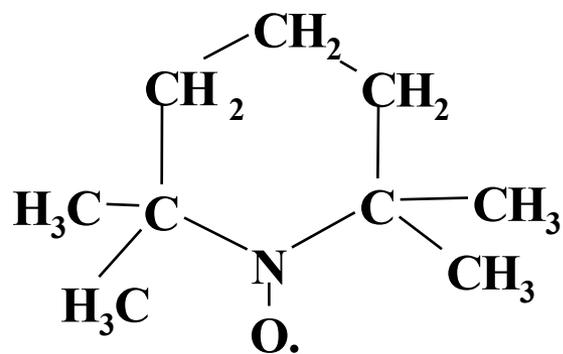
Кинетические и спектральные характеристики спиновых аддуктов

Радикал	Константа скорости	Растворитель	a_N	a_β^H
$R_3-C\cdot$	$4.3 \cdot 10^7$	вода	15.3	3.4
$R-O\cdot$	$1.2 \cdot 10^8$	вода	15.2	3.0
$R-OO\cdot$	$4.0 \cdot 10^2$	вода	15.4	3.0
$OH\cdot$	$8.5 \cdot 10^9$	вода	14.9	2.8
$O_2\cdot$	$5.0 \cdot 10^8$	вода	14.9	2.7

Основные направления применения ЭПР-спектроскопии в биологических исследованиях

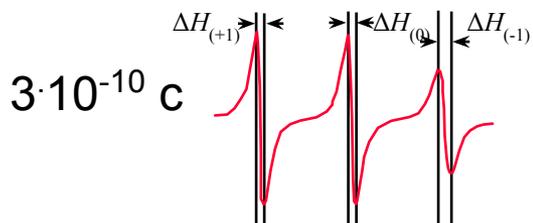
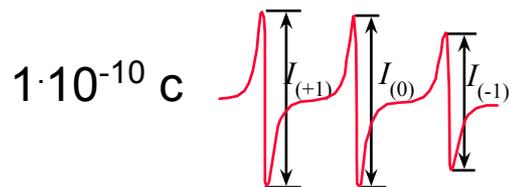
1. Исследование нативных биологических объектов (свободные радикалы и ионы металлов переменной валентности)
2. Исследование свободных радикалов с использованием спиновых ловушек
3. **Применение спиновых меток и зондов**

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



Спектр ЭПР ТЕМПО при разных τ_c

Время корреляции,



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

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

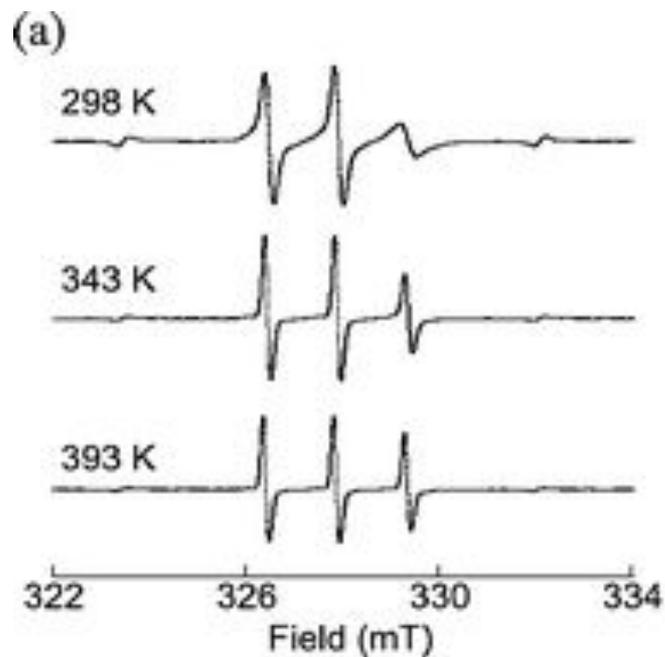
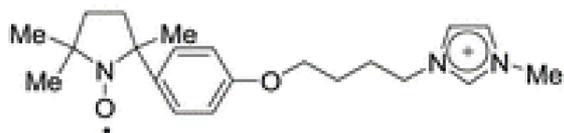
где ΔH_{+1} - ширина низкопольной компоненты

I_{+1} - амплитуда низкопольной компоненты

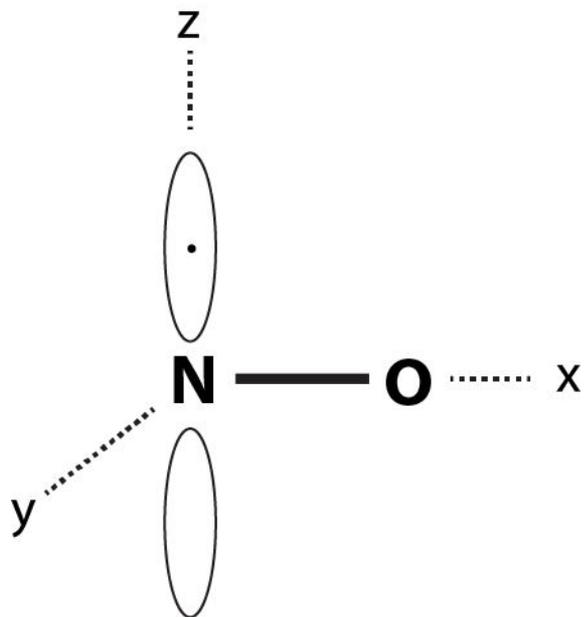
I_{-1} - амплитуда высокопольной компоненты

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

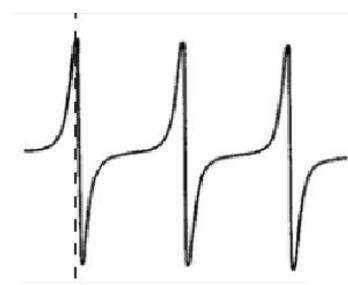
Влияние температуры на форму спектра ЭПР спинового зонда



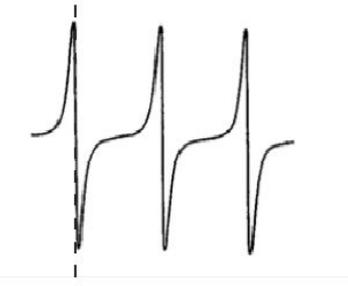
Молекулярные оси парамагнитного фрагмента нитроксильных радикалов и спектры ЭПР жестко ориентированного нитроксила



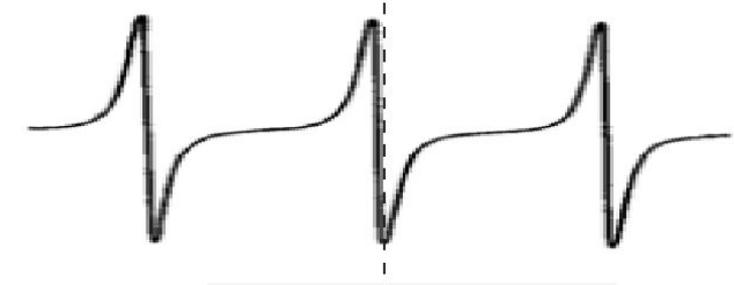
x



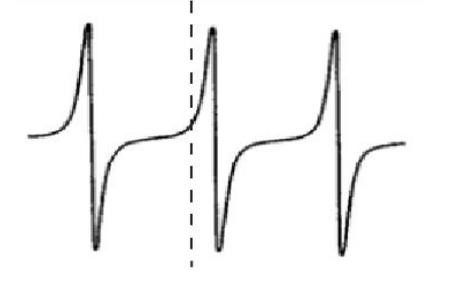
y



z

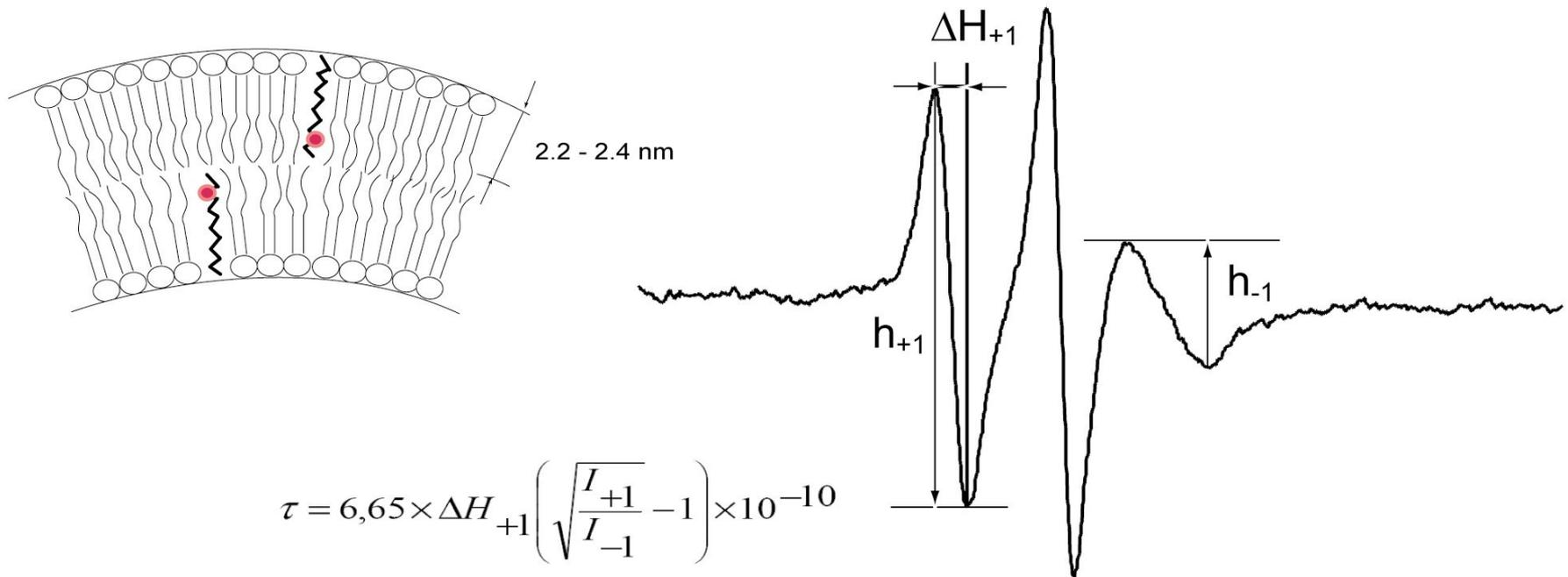


раство
р



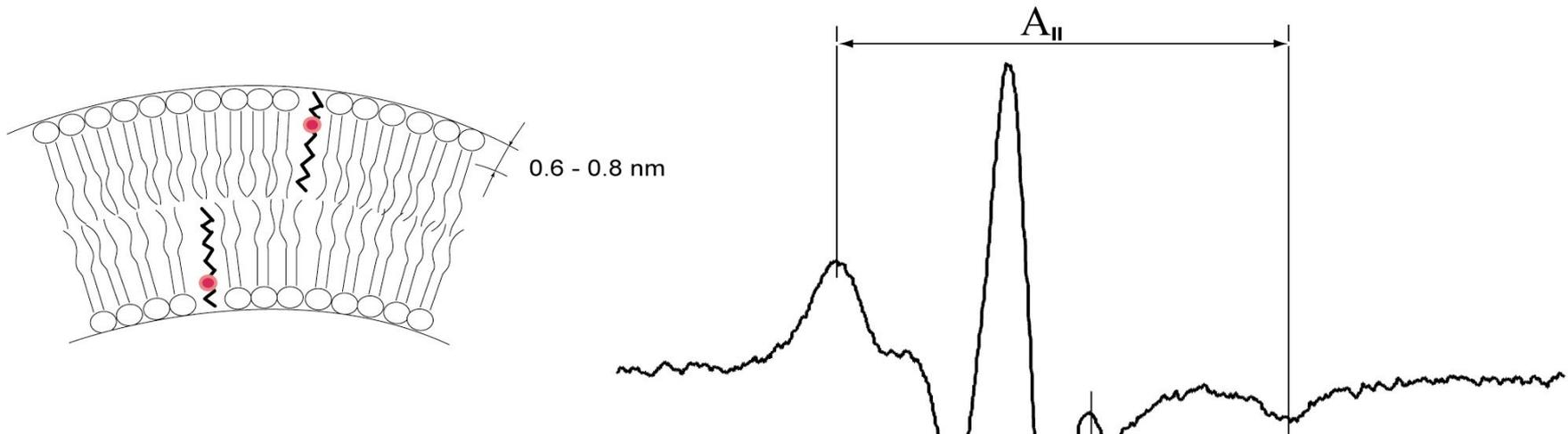
Спектр ЭПР 16-доксил стеариновой кислоты в мембране и схема определения параметра τ

16-doxylstearic acid



Спектр ЭПР 5-доксил стеариновой кислоты в мембране и схема определения параметра S

5-doxylstearic acid



$$S = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} * \frac{a}{a'}$$

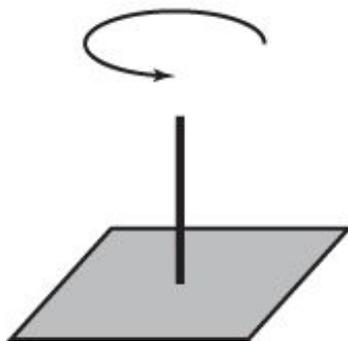
$$a = \frac{1}{3}(A_{zz} + A_{xx} + A_{yy})$$

$$a' = \frac{1}{3}(A_{||} + 2A_{\perp})$$

$$A_{zz} = 6.3Gs \quad A_{xx} = 5.8Gs \quad A_{yy} = 33.6Gs$$

Параметр упорядоченности S

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



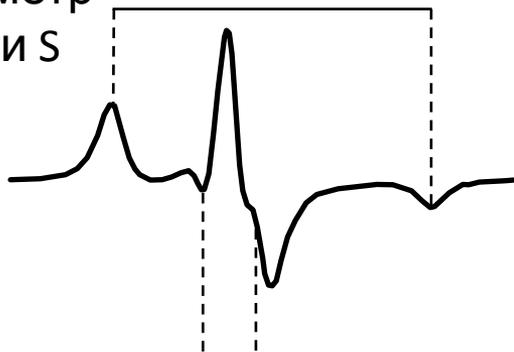
$$S = 1$$

Параметр упорядоченности S меньше 1, если вращение зонда происходит по конусу вокруг нормали к плоскости мембраны.

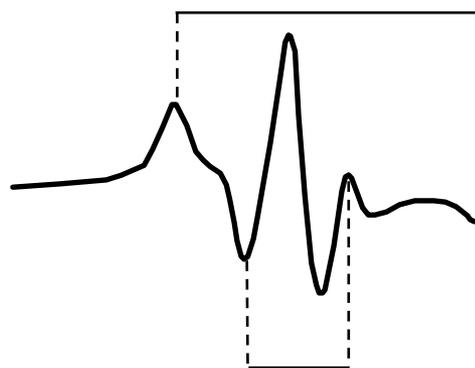


$$0 < S < 1$$

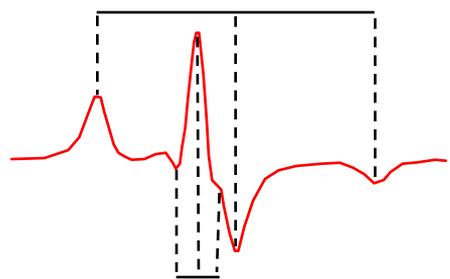
В «замороженных» мембранах, где липиды находятся в кристаллическом состоянии параметр упорядоченности S близок к 1.



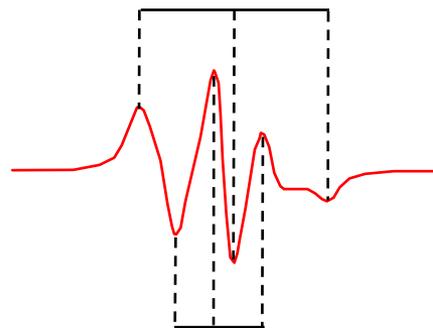
В «жидких» мембранах отклонение конуса вращения возрастает и S снижается, что вызывает изменения в спектре ЭПР.



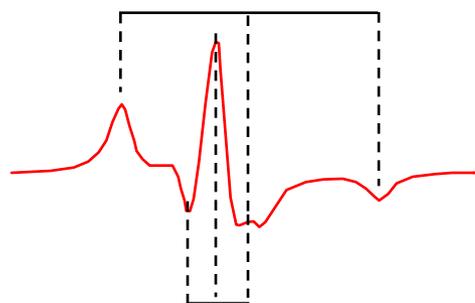
Изменения сигнала ЭПР при уменьшении S и возрастании угла отклонения конуса вращения γ



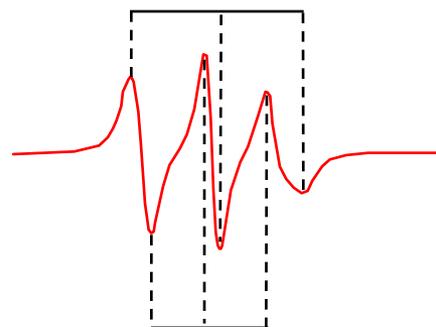
$S=1.0; \gamma=0^\circ$



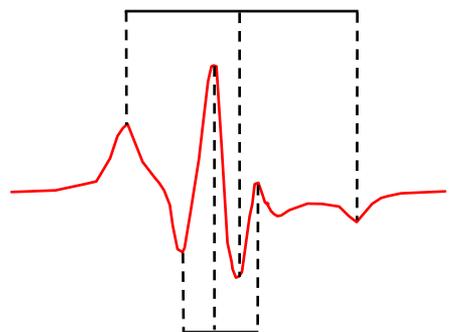
$S=0.4; \gamma=58.3^\circ$



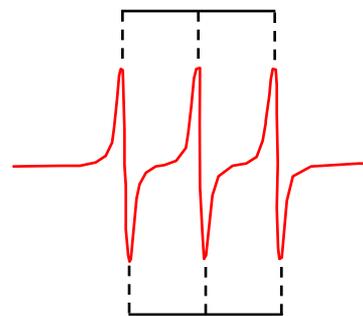
$S=0.8; \gamma=30.7^\circ$



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

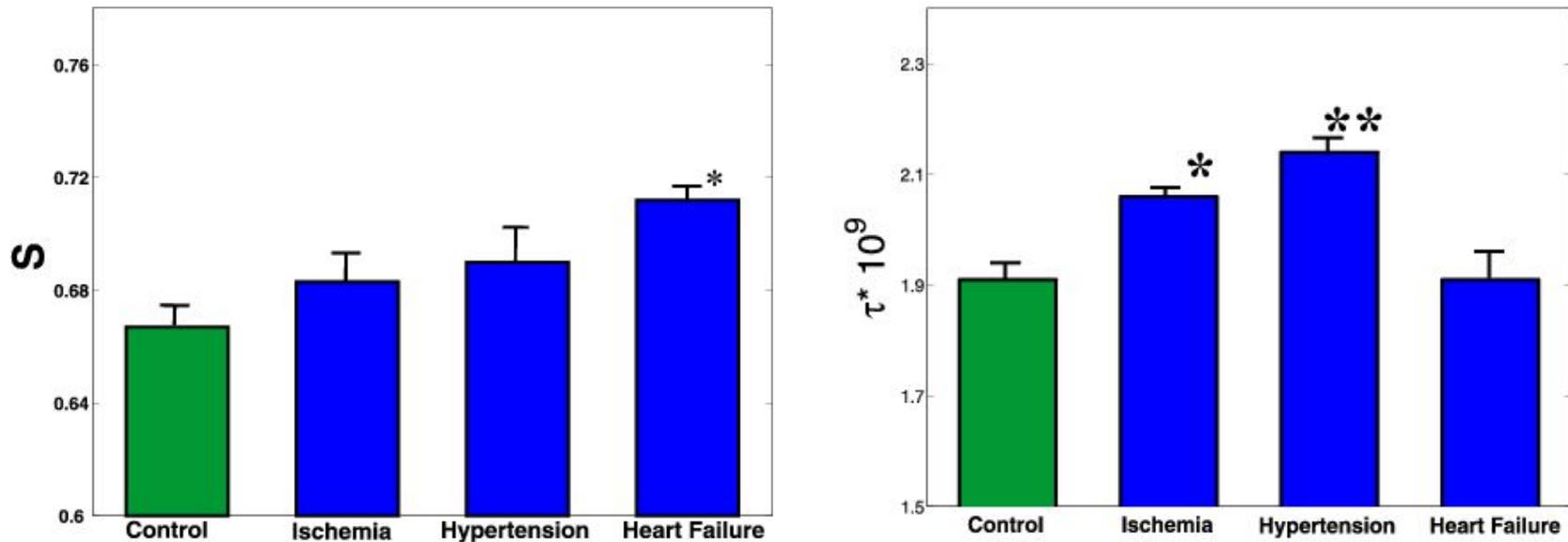


$S=0.6; \gamma=45.2^\circ$



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

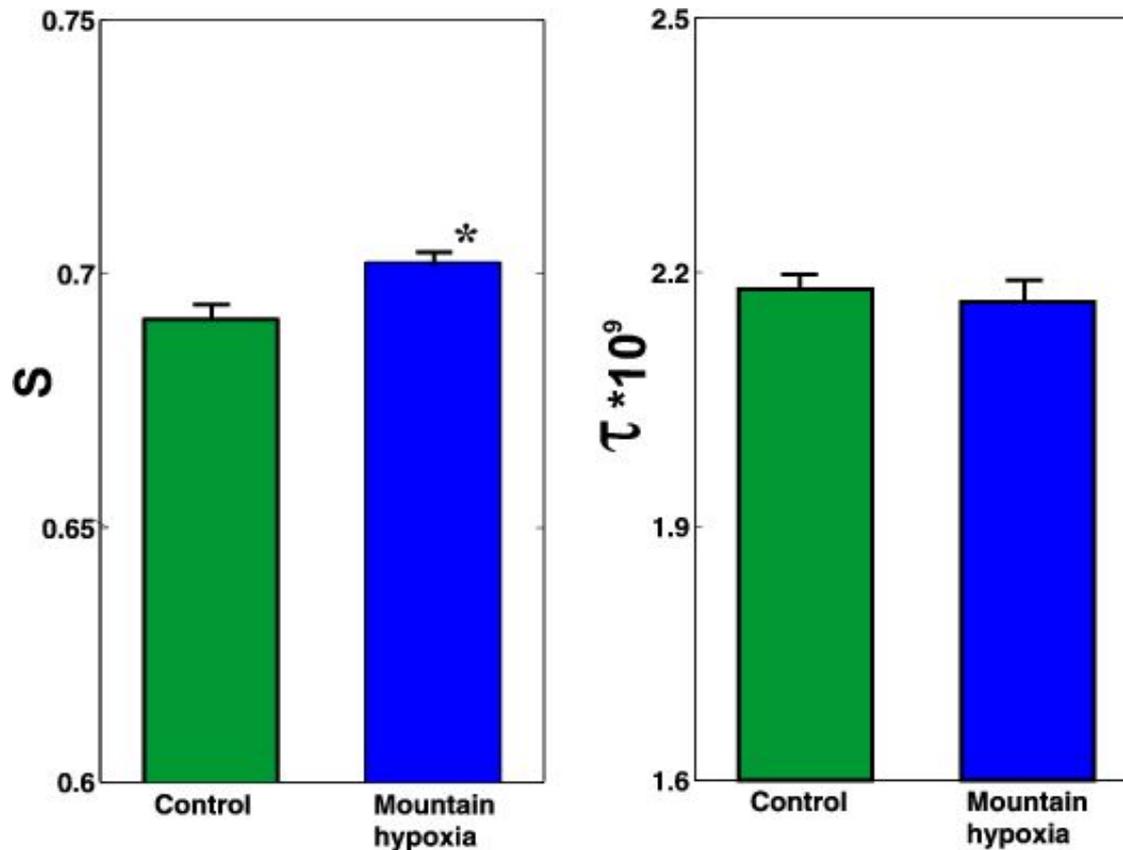
Значения параметров S и τ у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями



Estimation of the erythrocytes plasma membrane fluidity in the regions of 0.6-0.8 nm (A) and 2.2-2.4 nm (B) from the membrane surfaces. The increase in the S- and τ -parameters means the decrease in the membrane fluidity. Heart failure decreases fluidity in the surface regions of the membrane and ischemia and hypertension – in the deeper membrane regions

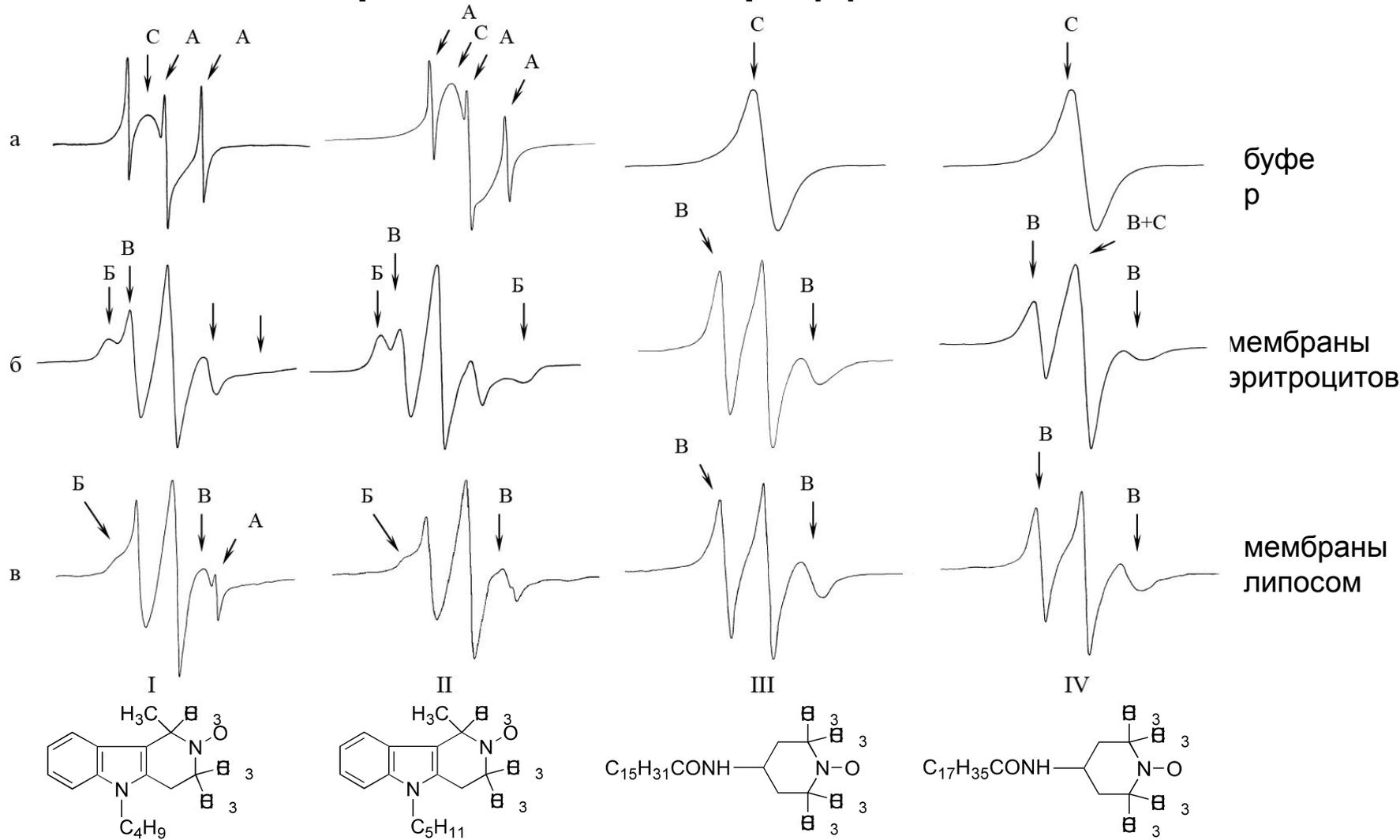
Vertical bars indicate S.D., * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Высокогорная гипоксия

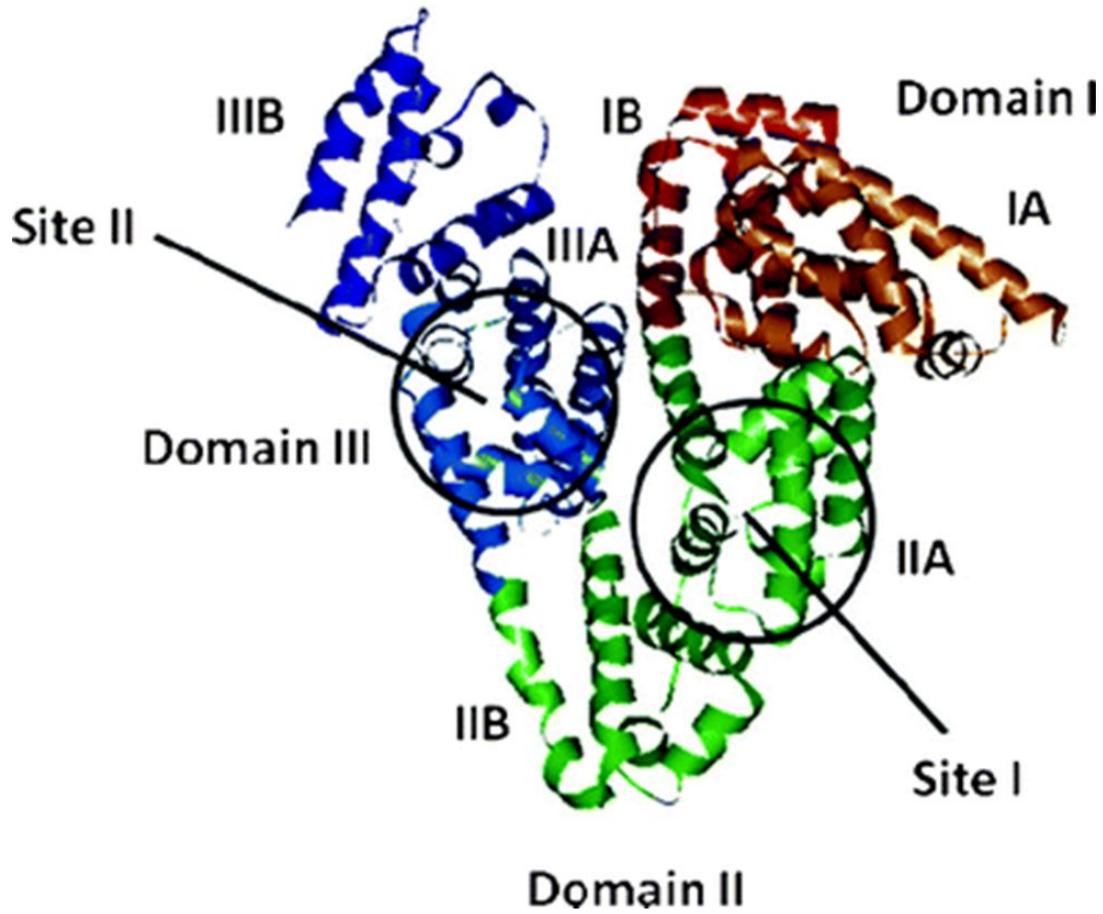


Mountain hypoxia (as well as heart failure) decreases plasma membrane fluidity of erythrocytes near the membrane surface (A) and does not affect deeper regions (B). Vertical bars – S.D., * $p < 0.05$

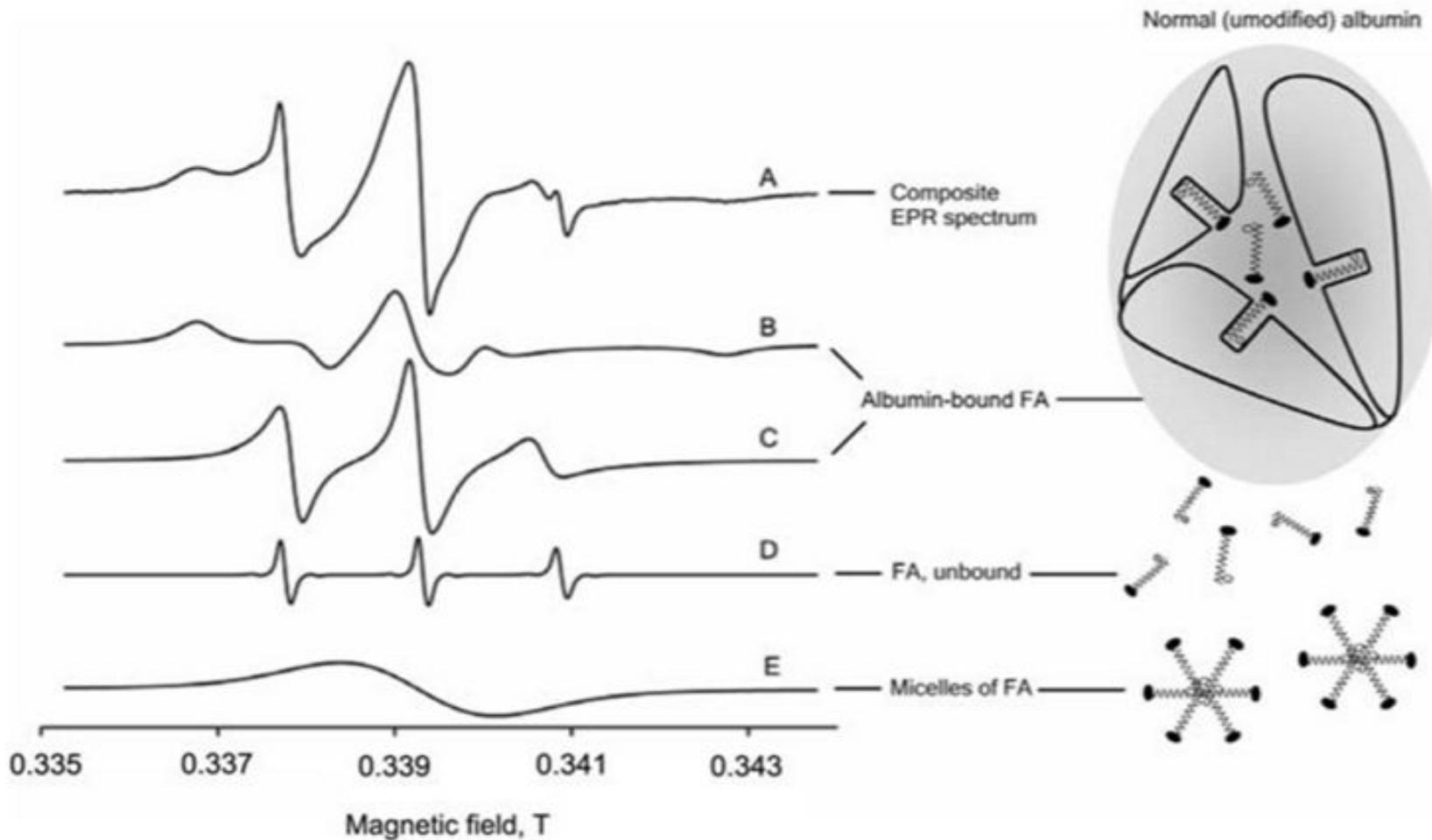
Спектры ЭПР спиновых зондов в различных средах



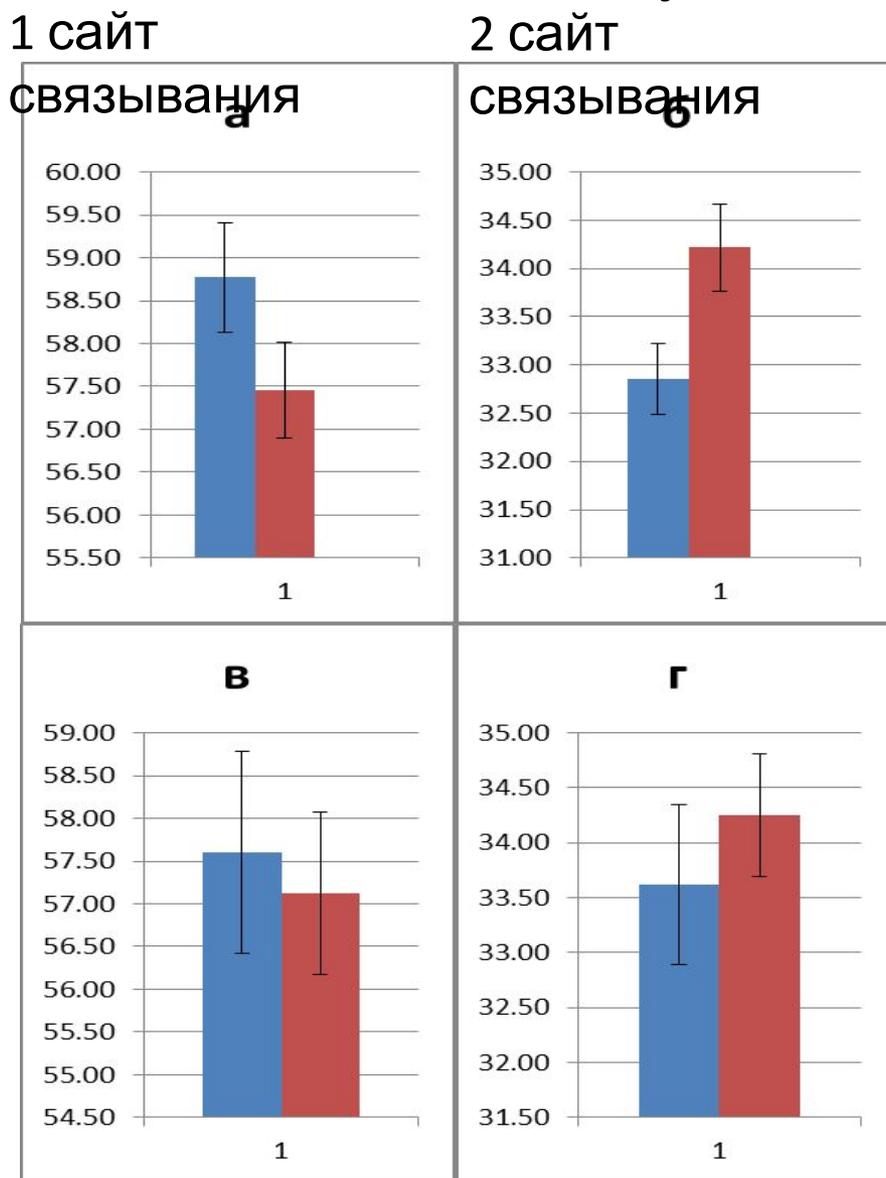
Альбумин



Сигналы ЭПР спинового зонда 16-DS в компонентах плазмы крови



Распределение спинового зонда между 1 и 2 сайтом связывания жирных кислот человеческого сывороточного альбумина



Группа I

Кровь отбиралась до введения препарата Оксаком

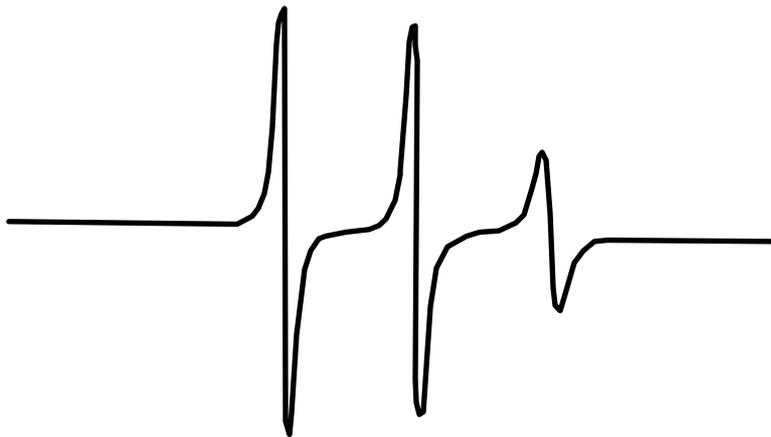
Группа II

Кровь отбиралась через 15-20 мин после введения препарата Оксаком

Спектр ЭПР химотрипсина с присоединенной спиновой меткой



Спектр ЭПР нативного химотрипсина, помеченного спиновой меткой.



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