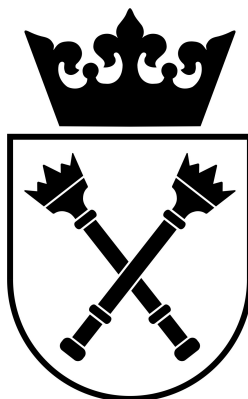


Lech Wiktor Skórski



Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytetu Jagiellońskiego

*Zastosowanie metod relaksacyjnych NMR
do badania procesów w układach
biologicznych*

Praca na stopień doktora nauk fizycznych, wykonana
w Zakładzie Radiospektroskopii na Wydziale
Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,
pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Blicharskiej

Kraków 2014

Oświadczenie

Ja niżej podpisany *Lech Wiktor Skórski* (nr indeksu: 1096779) doktorant Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „Zastosowanie metod relaksacyjnych NMR do badania procesów w układach biologicznych” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Blicharskiej. Pracę napisałem samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadom, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia 20.07.2014

Lech Skórski
podpis doktorantki/doktoranta

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Moim Mentorom - Pani profesor Barbarze Blicharskiej za wskazanie tematyki i zakresu pracy, troskliwą opiekę i cierpliwość;

Panu profesorowi Jerzemu Blicharskiemu za przyjemność dzielenia pokoju, niezliczone rozmowy o astronomii i fizyce oraz za wiele pięknych historii z życia wziętych; dziękuję również za wspólnie spędzony czas nad teorią relaksacji jądrowej, a także za pomoc w opracowaniu teorii dla relaksacji MRJ w obecności jonów paramagnetycznych;

Kierownikowi studiów doktoranckich Panu profesorowi Bogusławowi Kamysowi za życzliwość i zawsze trafne porady;

Kierownikowi Zakładu Radiospektroskopii Panu profesorowi Kazimierzowi Łątce;

Panu doktorowi habilitowanemu Hubertowi Harańczykowi za „moment pędu”, od którego zaczęła się moja przygoda z rezonansem magnetycznym;

Panu inżynierowi Tomaszowi Malarzowi za najbardziej ciche i konkretne wsparcie merytoryczno-techniczne;

Koleżankom i kolegom z Pracowni Pokazów Fizycznych oraz z Zakładów Fizyki Jądrowej, Optyki Atomowej i Fotoniki za wszelkie dyskusje, a także uwagi i pomoc przy napisaniu tej pracy;

Na końcu wszystkim moim najbliższym, którzy mnie wspierali.

Lech Skórski

Streszczenie

Metody relaksacyjne NMR dostarczają wartościowych narzędzi do otrzymania informacji na temat wielowymiarowych struktur makromolekuł biologicznych, oddziaływań międzymolekularnych, a także ich dynamiki. W zasadzie same wartości czasów relaksacji nie są wykorzystywane w diagnostyce medycznej, lecz w niektórych przypadkach mogą być użyte w celu potwierdzenia wstępnej diagnozy.

Choroby takie, jak choroba Wilsona, bądź też anemia, powodowane są istotnym wzrostem wolnych jonów paramagnetycznych obecnych we krwi. Rutynowa diagnostyka wprowadzie wykrywa całościową zawartość Fe i Cu, ale za jej pomocą nie da się wyróżnić wolnych jonów. Powszechnie wiadomo, że obecność jonów paramagnetycznych skraca czasy relaksacji w osoczu krwi. Skrócenie tych czasów było kontrolowane poprzez dodanie niektórych środków chelatujących (np. D-pen) do osocza. Powodowało to powstanie stałych, rozpuszczalnych w wodzie kompleksów wolnych jonów, co redukowało efekt skrócenia czasów relaksacji badanych roztworów. Po chelatacji łatwo można było zmierzyć wydłużenie się czasów relaksacji. Stanowiło to dowód na obecność wolnych jonów w osoczu krwi.

Wolne rodniki (ROS) zostały wskazane jako czynnik przyspieszający procesy starzenia się organizmów. Tworzą się one w wielu procesach biologicznych. Działanie ROS wpływa na białka, tłuszcze i struktury DNA, niszcząc je. Przyczynia się to do powstania chorób takich, jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, MS i wiele innych. ROS posiadają właściwości paramagnetyczne i znacząco skracają czasy relaksacji. Wolne rodniki tlenowe mogą być produkowane z wody utlenionej w reakcji Fentona. Osocze krwi to substancja wieloskładnikowa, zawierająca m.in.: białka, tłuszcze i mikroelementy. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, z punktu widzenia NMR, składnikami osocza wpływającymi na czasy relaksacji są białka i jony paramagnetyczne, zwłaszcza Fe i Cu, zaś tłuszcze mogą zmieniać jego lepkość. W niniejszej pracy zbadano wpływ dodania wody utlenionej do osocza i wybranych roztworów białek na czasy relaksacji w celu określenia ich właściwości antyoksydacyjnych.

Relaksacja NMR *in vitro* przynosi również wiele rozwiązań dla zastosowań obrazowania tkanek *in vivo*. Metoda relaksacji NMR, nazywana „profilami dyspersji”, została zastosowana w badaniach nad właściwościami układów makromolekuł. Istnieje bowiem zależność czasu relaksacji $T_{1\rho}$ w wirującym układzie współrzędnych od niskiego pola magnetycznego B_1 . Zaletą tej metody jest możliwość obserwacji wolnych ruchów molekularnych i wymiany protonów, w typowym zakresie dla wody związanej z białkiem bądź makromolekułami. Parametry takie, jak czas korelacji, energia aktywacji i wymiana protonów są powiązane z właściwościami makromolekuł w badanych układach.

Abstract

Nuclear magnetic resonance relaxation methods provide powerful tools to get information about macromolecular three-dimensional structure, dynamics properties and intermolecular interactions. In general, absolute values of relaxation times have not been proven to be helpful for defining pathologies, but in some cases, relaxation times measurements can be used to confirm preliminary diagnosis. Illnesses, such as Wilson's disease or anemia, are caused by significant increase of free paramagnetic ions circulating in the blood stream. Routine diagnostic tests detect the total content of Fe, Cu or Zn, but these aren't sensitive to distinguish free ions. It is well known that the presence of free paramagnetic ions shortens the relaxation times of blood serum. Addition of the selective chelating agent (i.e.: D-penicillamine (D-pen)) to serum causes the formation of stable and water soluble complexes of free ions and this nulls the effect of shortening of relaxation times of solution. After chelation one can easily measure the prolongation of relaxation times and this fact can be used as evidence of presence of free ions in blood serum.

Reactive oxygen species (ROS) were indicated as a factor accelerating ageing process. There are produced in a number of biological processes. Cytotoxic action of ROS includes protein, lipid and DNA structure damage and can be primary to many human diseases, such as cancer, Parkinson's, Alzheimer's, multiple sclerosis, Huntington's and many others. ROS have paramagnetic properties and they significantly shorten relaxation times. Hydroxyl free radicals can be produced from hydrogen peroxide in a Fenton type reaction. Blood serum is a solution of many components: proteins, lipids, carbohydrates and microelements. From NMR point of view the components which may have influence on measured value of relaxation time are: protein and paramagnetic ions like Fe and Cu and lipids which can change the viscosity of serum. Here, I compare the effects of adding hydrogen peroxide to human blood serum and selected protein solutions on relaxation times to evaluate their antioxidative effects.

NMR relaxation measurements *in vitro* provide also a powerful tools for investigation in vivo of tissue anatomy and functional imaging. Other NMR relaxation method called "dispersion profile" has been additionally used in research on the properties of macromolecules systems: There is a dependence of spin-lattice relaxation time $T_{1\rho}$ in the rotating frame plotted as a function of low magnetic field B_1 . The advantage of this method is an opportunity to observe the slow molecular motion and protons exchange rate in the range typical for water associated with proteins or bio-macromolecules. The obtained results can be a base of construction of theoretical molecular dynamics model in biological systems. It is demonstrated how parameters of this model, namely, correlation time, activation energy and proton exchange rate are connected with macromolecular properties of investigated systems.

Spis treści

1	Wstęp	1
2	Motywacja wyboru tematyki pracy	5
3	Ogólny opis procesów relaksacji NMR	9
3.1	Wprowadzenie do relaksacji NMR	9
3.2	Oddziaływania molekularne wpływające na procesy relaksacji protonowej	13
3.3	Oddziaływania dipolowe	14
3.4	Procesy relaksacji w obecności jonów paramagnetycznych . . .	20
3.5	Oddziaływania skalarne	28
3.6	Relaksacja $T_{1\rho}$ w układzie wirującym	29
4	Relaksacja w układach biologicznych	33
4.1	Relaksacja w roztworach makromolekuł biologicznych	33
4.2	Relaksacja w obecności paramagnetyków	37
5	Materiały	41
5.1	Reaktywne formy tlenu (ROS)	41
5.1.1	Tlen	43
5.1.2	H_2O_2	44
5.2	Osocze i surowica krwi	45
5.2.1	Osocze krwi króliczej	47
5.2.2	Albumina	47

5.3	Jony paramagnetyczne	47
5.3.1	Miedź	48
5.3.2	Żelazo	50
5.3.3	Mangan	50
5.4	Chelaty	52
5.4.1	D-penicylamina	53
5.4.2	Ryboflawina	53
5.5	Antyoksydanty	54
5.5.1	Witamina C	54
5.5.2	Glutation	56
6	Metody badawcze i opis eksperymentów	57
6.1	Bruker Minispec 60 MHz	57
6.1.1	Metody badawcze	58
6.1.2	Pomiary czasów T_1	58
6.1.3	Pomiary czasów T_2	60
6.1.4	Pomiary czasów $T_{1\rho}$	60
6.1.5	Preparatyka próbek	61
6.2	Bruker BioSpec 400 MHz	64
7	Wyniki pomiarów i ich dyskusja	67
7.1	Relaksacja w roztworach białek i surowicy krwi	67
7.2	Relaksacja w obecności jonów paramagnetycznych	70
7.2.1	Wodne roztwory jonów miedzi	70
7.2.2	Wodne roztwory jonów żelaza	75
7.2.3	Wodne roztwory jonów manganu	78
7.3	Relaksacja w obecności środków chelatujących	81
7.3.1	D-penicylamina	81
7.3.2	Ryboflawina	83
7.4	Relaksacja w roztworach nadtlenku wodoru	88
7.5	Relaksacja w osoczu po dodaniu nadtlenku wodoru	92
7.6	Relaksacja po dodaniu antyoksydantów	97

7.7 Relaksacja w układzie wirującym	102
8 Wnioski	107
A Spis komunikatów, wystąpień ustnych i publikacji	109
A.1 ESMRMB Meetings	109
A.2 Ampere NMR Schools	110
A.3 Seminaria grudniowe Instytutu Fizyki Jądowej w Krakowie . .	111
A.4 Inne	111
A.5 Publikacje	112
A.5.1 Publikacje w trakcie przygotowania	112
B Staże i praktyki	115
B.1 ISMRM	115
B.2 Staże	115
C Aparatura badawcza	117
D Ciekawostki	121
Spis tablic	123
Spis rysunków	125
Literatura	131

Rozdział 1

Wstęp

Intensywny rozwój medycyny i nauk biologicznych pociąga za sobą konieczność znajdowania narzędzi badawczych dostarczających bardziej szczegółowych informacji na temat budowy i własności materiałów, z których zbudowane są organizmy żywe. Do takich narzędzi zaliczyć można niewątpliwie magnetyczny rezonans jądrowy, którego wykorzystanie w biochemii i obrazowaniu jest powszechnie znane.

Sygnał NMR (Nuclear Magnetic Resonance, po polsku MRJ – Magnetyczny Rezonans Jądrowy) otrzymany został 70 lat temu. W Polsce pionierem badań NMR był Instytut Fizyki Jądrowej w Krakowie, gdzie w połowie ubiegłego stulecia, w grupie kierowanej przez prof. Jacka W. Hennela, prowadzone badania wpływu obecności makromolekuł biologicznych na czasy relaksacji dały początek metodzie relaksacyjnej NMR [1]. Obok spektroskopii i tomografii, w chwili obecnej metoda ta nabiera coraz większego znaczenia w rozwiązywaniu szczegółowych problemów przydatnych w diagnostyce medycznej oraz w badaniach własności leków [2], [3].

Przedmiotem badań niniejszej pracy są układy biologiczne, począwszy od roztworów białek poprzez surowice krwi, aż do całych tkanek. Zastosowanie metod relaksacyjnych przedstawione jest od teorii relaksacji do eksperymentu. Główny nacisk pracy został skierowany na fizyczne aspekty metody, a w szczególności na możliwości jej konkretnych zastosowań. Z tego powodu

analiza i interpretacja wyników nie skupia głównej uwagi na aspektach biologicznych, lecz na możliwościach metod relaksacyjnych.

Prac dotyczących badań materiału biologicznego metodami NMR ukazuje się corocznie bardzo wiele. Przegląd najnowszych osiągnięć i tendencji przedstawiany jest w trakcie spotkań fizyków, biologów, lekarzy i inżynierów na kongresach ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) oraz ESMRMB (European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology), w których od 2009 roku miałem okazję uczestniczyć i kilkakrotnie prezentować nasze prace (Dodatek A), a dotyczyły one:

- wpływu jonów paramagnetycznych i środków chelatujących na procesy relaksacji, w tym zastosowań metody relaksacyjnej do diagnostyki i terapii wybranych chorób,
- badań własności oksydacyjnych roztworów H_2O_2 oraz antyoksydacyjnych układów biologicznych (osocza),
- zastosowań metod dyspersyjnych $T_{1\rho}$ i T_2 CPMG w badaniach dynamiki molekularnej materiałów biologicznych.

Materiały tych komunikatów, jak i doświadczenie zdobyte w trakcie studiów doktoranckich poprzez uczestnictwo w licznych stażach i szkołach stanowią bazę niniejszej pracy (Dodatek B i C). W pracy zamieszczono również, związane z dziedziną, a ocierające się o tematykę pracy, obrazy MRI mojej głowy (Dodatek D).

Wprowadzenie do tematyki dotyczącej teorii opisu procesów relaksacyjnych przedstawione zostało w rozdziale 3 i 4. W rozdziale 3 rozwinięto szczegółowo opis teoretyczny relaksacji w obecności jonów paramagnetycznych, porównując go do konkretnych wyników eksperymentalnych, dotyczących relaksacji jonów miedzi, przedstawionych w rozdziale 7. Przyjęty przez nas model teoretyczny daje dobrą zgodność z wynikami doświadczalnymi. Są to obliczenia oryginalne. Następnie w rozdziale 5 i 6 omówiono użyte materiały (pochodzenie i preparatykę próbek), stosowane metody oraz opisano aparaturę badawczą, przeprowadzono również dyskusję czynników wpływających

na błędy pomiarowe. W rozdziale 7 przedstawione zostały wyniki wykonanych pomiarów wraz z ich interpretacją. W rozdziale 8 zaprezentowano najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonej pracy badawczej.

Rozdział 2

Motywacja wyboru tematyki pracy

Jony metali takie, jak: żelazo, miedź, mangan, cynk i inne, w niewielkiej ilości są obecne w organizmie ludzkim i spełniają ważną rolę mikroelementów. Ich nieprawidłowa gospodarka ma negatywny wpływ na organizm i związana jest z występowaniem schorzeń, m.in. stanowi źródło chorób: Parkinsona, Wilsona i Alzheimerera.

Od dawna wiadomo, że obecność jonów paramagnetycznych wpływa na procesy relaksacji, zjawisko to wykorzystuje się w projektowaniu środków kontrastowych wspomagających diagnostykę obrazowania MR. Jony paramagnetyczne występujące w organizmie, gdy są w zbyt dużej koncentracji, są także przyczyną powstawania artefaktów w tomografii MR. Stąd badania nad ich wpływem są ciągle rozwijane. Kolejnym, również nie do końca poznanym, zjawiskiem jest obecność i wytwarzanie się wolnych rodników, które, jak wiadomo, są przyczyną starzenia się organizmów oraz źródłem chorób cywilizacyjnych. W każdym żywym organizmie zachodzą setki procesów biochemicznych związanych z wolnymi rodnikami, którym towarzyszą reakcje obronne przed ich szkodliwym działaniem. Można je badać różnymi metodami fizycznymi, najbardziej powszechną z nich jest EPR (Electron Paramagnetic Resonance) [4], [5], [6]. Stąd przypuszczenie, że badania relak-

sacyjne NMR, zastosowane do układów biologicznych, mogą również wносить pożyteczny wkład do tej problematyki.

Stanowi to motywację wyboru tematyki niniejszej pracy. Zaletą techniki NMR jest nieinwazyjność oraz największa czułość na wszechobecnie występujący w materiale biologicznym pierwiastek, jakim jest wodór. Z drugiej strony procesy biologiczne są procesami bardzo skomplikowanymi, dlatego otrzymane wyniki badań NMR (szczególnie *in vivo*) nie znajdują prostej interpretacji. Mogą one natomiast być, w wielu przypadkach, cennymi badaniami komplementarnymi. Dlatego, aby otrzymać istotną informację, należy w specjalny sposób ustawić tak eksperyment, aby sformułować pytanie, na które chcemy otrzymać odpowiedź. Wymaga to często pominięcia istotnych, z punktu widzenia biologów, aspektów. Jednakże z drugiej strony, stosując metody relaksacyjne NMR, otrzymać możemy, nieosiągalne innymi metodami, informacje na poziomie molekularnym, bez zaburzania ich funkcji życiowych. Wprawdzie same pomiary czasów relaksacji NMR nie są często bezpośrednio wykorzystywane w diagnostyce medycznej, jednakże, w niektórych przypadkach, stanowią alternatywne źródło dodatkowych informacji [7],[8]. W tym kontekście praca skupia się na pokazaniu możliwości zastosowanej metody. Przykładowo pokażemy, że pomiary czasów relaksacji osocza krwi *ex vivo* dają możliwość monitorowania podwyższonej obecności swobodnych jonów Cu i Fe, co jest istotne w diagnozowaniu choroby Wilsona lub anemii. W osoczu zdrowego człowieka jony te są zwykle wiązane w kompleksy z białkami, zaś powszechnie używane do ich oceny metody spektrofotometryczne rejestrują całkowitą ilość atomów miedzi, nie rozstrzygając, czy są to jony wolne, czy związane.

W przeprowadzonych w pracy badaniach relaksacyjnych otrzymano nowe ciekawe wyniki, którymi są między innymi:

- przydatność ryboflawiny jako środka chelatującego wybrane jony paramagnetyczne,
- obserwacja reakcji obronnych na procesy utleniania, występujących w surowicy krwi.

Komplementarnie do obserwacji wolnych ruchów molekularnych posłużono się dodatkowymi metodami relaksacyjnymi ($T_{1\rho}$), wykorzystując tzw. profile dyspersji.

Wszystkie eksperymenty w pracy wykonano *in vitro*, jednakże ich wyniki zostały otrzymane w taki sposób, że łatwo można odnieść je do uzyskanych *in vivo*. Użyta główna aparatura badawcza pracowała przy częstotliwości rezonansowej dla protonów 60 MHz, co odpowiada polu $B_0 \approx 1,5$ T, i jest to częstotliwość stosowana w najbardziej popularnych tomografach MR. Z tego powodu przedstawione wnioski mogą być wprost wykorzystane w diagnostyce medycznej.

Rozdział 3

Ogólny opis procesów relaksacji NMR

3.1 Wprowadzenie do relaksacji NMR

Relaksacja to proces powrotu układu do stanu równowagi termodynamicznej po zaburzeniu, którym może być zmiana parametrów układu, takich jak: ciśnienie, stężenie, temperatura itp. Proces ten jest nieodwracalny i towarzyszy mu rozproszenie energii. Jeśli odchylenie od stanu równowagi jest małe, relaksacja przebiega zgodnie z wzorem $y = y_0 e^{-t/T_i}$, gdzie y_0 to wartość początkowa funkcji y , zaś T_i to czas relaksacji. W fizyce obserwuje się różne rodzaje relaksacji: akustyczną, magnetyczną, naprężeń, dielektryczną itp. [9].

W magnetycznym rezonansie jądrowym relaksacja to powrót układu spinów jądrowych do stanu równowagi w obecności stałego zewnętrznego pola magnetycznego $\vec{B}_0$, po wcześniejszym zaburzeniu polem magnetycznym $\vec{B}_1$ (zwanym impulsem o częstotliwości radiowej lub „impulsem rf”), które obraca wektor magnetyzacji próbki względem kierunku pola $\vec{B}_0$ [10]. Proces ten określony jest poprzez czasy relaksacji T_i (T_1 spin-sieć, T_2 spin-spin, $T_{1\rho}$ w układzie wirującym, T_{1e} relaksacja efektywna). Czasy relaksacji zależą od:

- rodzaju jądra,
- częstotliwości rezonansu ($\omega = \gamma B_0$),

- temperatury,
- dynamiki molekularnej spinów,
- obecności jonów paramagnetycznych lub wolnych rodników.

Inne czynniki wpływające na szybkość relaksacji to: mikrostruktura próbki, pH, podatność magnetyczna, koncentracja i rodzaj makromolekuł.

W przypadku czystej wody na relaksację NMR wpływa dynamika molekularna, czyli procesy reorientacji pojedynczej molekuly wody, które przebiegają bardzo szybko. Są to ruchy rotacyjne i ruchy translacyjne. Jeśli dodamy do wody inne molekuly, takie jak białka, to molekuly wody zaczną z nimi oddziaływać. Chwilowe związanie wody radykalnie zmienia czas reorientacji jej molekuly. W celu określenia szybkości ruchów wody wprowadza się czas korelacji τ_c , który określa minimalny czas obrotu molekuly o jeden radian. W rezultacie spowolnienia dynamiki obecność makromolekuł w roztworach wodnych skraca mierzony czas relaksacji.

Bardzo duży wpływ na relaksacje ma także obecność jonów i molekuly paramagnetycznych. Jony paramagnetyczne posiadają niesparowane elektrony, które są źródłem silnego oscylującego pola magnetycznego i w efekcie znacząco skracają czas relaksacji. Typowe substancje paramagnetyczne zawierają jony Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Gd^{3+} , także tlen molekularny i wolne rodniki.

Biologiczna próbka, oprócz wody, jest mieszaniną wielu różnych składników chemicznych. Czasy relaksacji takiej próbki zależne są od fizycznych i chemicznych właściwości otoczenia obserwowanych przez NMR jąder wodoru. Jeśli otoczenie nie jest jednorodne w obrębie całej próbki, wówczas uzyskany czas T_i będzie uśredniał własności relaksacyjne badanego układu. Jednakże w większości przypadków ze względu na wymianę chemiczną i przy niskiej rozdzielczości, obserwowana jest jedna dominująca składowa od protonów wody, która determinuje proces relaksacji.

Do opisu magnetycznej polaryzacji całej próbki wprowadza się magnetyzację $\vec{M}$, która jest sumą wszystkich momentów magnetycznych jąder zawartych w jednostce objętości. W chwili przyłożenia pola $\vec{B}_0$ makroskopowy

wektor polaryzacji magnetycznej próbki wykonuje precesję, ustawiając się zgodnie z kierunkiem pola. W wyniku braku koherencji w ruchu precesyjnym wszystkich składowych μ_x i μ_y następuje zerowanie się składowych namagnesowania M_x i M_y , które są prostopadłe do $\vec{B}_0$. Natomiast składowe μ_z są ustawione równoległe do kierunku pola, tworząc wypadkowy wektor namagnesowania $\vec{M}_0$. Stąd w obecności pola $\vec{B}_0$ w stanie równowagi magnetyzacja $\vec{M}$ ma składowe: $M_x=0$, $M_y=0$, $M_z=M_0$. Namagnesowanie wzdłuż osi z osiąga maksymalną wartość po pewnym czasie od umieszczenia próbki w polu $\vec{B}_0$, a jej ewolucję w czasie opisuje równanie różniczkowe. Jest to wektorowe równanie Blocha [11], [12], [13]:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma[\vec{M} \times \vec{B}] - \frac{M_x\vec{i} + M_y\vec{j}}{T_2} - \frac{(M_z - M_0)\vec{k}}{T_1}, \quad (3.1)$$

które po rozpisaniu na składowe daje:

$$\frac{dM_Z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1}, \quad (3.2)$$

$$\frac{dM_{\perp}}{dt} = \frac{M_{\perp}}{T_2}, \quad (3.3)$$

gdzie T_1 i T_2 są czasami charakterystycznymi dla procesu polaryzacji magnetycznej próbki. Dla składowej M_Z rozwiązanie ich ma postać:

$$M_Z(t) = M_0[1 - e^{-t/T_1}], \quad (3.4)$$

zaś dla składowej poprzecznej $M_{\perp}$:

$$\frac{dM_{\perp}}{dt} = \frac{M_x\vec{i} + M_y\vec{j}}{T_2}, \quad (3.5)$$

$$M_{\perp}(t) = M_0 e^{-t/T_2}. \quad (3.6)$$

Jak widać, M_Z narasta wykładniczo od wartości zero do wartości M_0 . Charakterystyczne T_1 jest czasem relaksacji zdefiniowanym jako czas, po którym wartość składowej namagnesowania $M_Z(t)$ w polu $\vec{B}_0$ wzrasta od zera do wartości $(1 - e^{-1})M_0$. Maksymalną wartość M_0 magnetyzacja osiąga po

około $5T_1$. Analizując zależność namagnesowania od czasu, czas T_1 jest czasem procesu narastania składowej namagnesowania $M_Z(t)$ lub jej zaniku wzdłuż kierunku osi z . Stąd czas relaksacji T_1 nazywany jest również czasem relaksacji podłużnej. Przyrost składowej M_Z w czasie następuje w wyniku zwiększania się liczby spinów zorientowanych w kierunku pola $\vec{B}_0$, co prowadzi do zmniejszenia się energii próbki. Najmniejsza energia występuje wtedy, gdy wektor namagnesowania $\vec{M}_0$ jest równoległy do kierunku pola $\vec{B}_0$. Traktując próbkę jako układ izolowany, ten nadmiar energii od układu spinów musi przejąć reszta próbki, zwana siecią. Zatem wzór 3.2 opisuje szybkość przepływu energii z układu spinów do sieci, stąd czas relaksacji T_1 nazywany jest też czasem relaksacji spin-sieć.

Impulsowe przyłożenie pola $\vec{B}_1$ prowadzi do powstania składowej poprzecznej wektora namagnesowania, jeśli precesja poszczególnych momentów magnetycznych jest spójna. Składowa ta, którą można rozłożyć na składowe M_X i M_Y , nie pojawia się natychmiast po przyłożeniu pola $\vec{B}_1$ i nie znika zaraz po jego wyłączeniu, lecz maleje zgodnie z równaniem 3.6, którego rozwiązaniem jest funkcja wykładnicza z czasem relaksacji T_2 . Czas T_2 nazywany czasem relaksacji poprzecznej, gdyż jest on związany z narastaniem lub zanikiem namagnesowania prostopadłego do $\vec{B}_0$. Określa on czas ustalania się równowagi w układzie spinów i dlatego nazywany jest również czasem relaksacji spinowo-spinowej.

W niejednorodnym polu $\vec{B}_0$ precesja magnetyzacji nie odbywa się w różnych częściach próbki z jednakową prędkością. Powoduje to rozfazowanie spinów, co przyspiesza proces relaksacji poprzecznej. Dlatego w eksperymencie, szczególnie w obecności gradientu pola $\vec{B}_0$, otrzymuje się inny czas T_2^* . Z reguły $T_2^* < T_2$, gdzie T_2^* jest mierzonym czasem relaksacji spinowo-spinowej, zaś T_2 rzeczywistym czasem relaksacji spinowo-spinowej.

3.2 Oddziaływania molekularne wpływające na procesy relaksacji protonowej

Istnieją dwa teoretyczne modele opisujące proces relaksacji. Pierwszy z nich (fenomenologiczny) opiera się, jak pokazano wyżej, na równaniach Blocha, drugi opis, kwantowy, jest opisem ścisłym, który wprowadza macierz gęstości σ wyrażoną za pomocą równania Liouville’a [8], [14], [15], [16] :

$$\frac{d\sigma(t)}{dt} = -i[H, \sigma(t)] = i\sigma(t)H - iH\sigma(t), \quad (3.7)$$

gdzie H jest hamiltonianem oddziaływań w jednostkach rad/s. Lokalnie oscylujące pole zaburza i łączy niezależny od czasu hamiltonian H_0 z zależnym od czasu hamiltonianem sieci:

$$H = H_0 + H'(t). \quad (3.8)$$

Należy pamiętać, że H_0 daje wartości średnie i odpowiedzialny jest za otrzymanie widma NMR, natomiast $H'(t)$ daje odchylenie od wartości średnich i to właśnie w nim znajdują się przyczynki wpływające na procesy relaksacji NMR.

Jeśli układ spinów poddajemy działaniu silnego pola magnetycznego, wówczas następuje oddziaływanie spinów z tym polem (oddziaływanie ze-emanowskie). Dodatkowo zachodzą również oddziaływania wewnątrz samego układu spinów. Badania procesów relaksacyjnych dostarczają informacji dotyczących tych oddziaływań, modyfikowanych przez dynamikę molekularną w badanym układzie biologicznym. Dodatkowo poszczególne oddziaływania spinowe mogą się wzajemnie nakładać, co nazwano „interferencją oddziaływań” [17]. W wyniku ciągłych oddziaływań spinów z polami wewnętrznymi, wytwarzanymi przez momenty magnetyczne elektronowe i jądrowe lub ładunki elektryczne znajdujące się w sąsiednich atomach lub drobinach, magnetyzacja powraca po zaburzeniu do swojej wartości równowagowej ukierunkowanej zgodnie z zewnętrznym polem magnetycznym.

W szczególności na procesy relaksacji mają wpływ oddziaływania, takie jak [12], [18]:

- oddziaływanie dipolowe, intra- i intermolekularne, H_D ,
- oddziaływanie skalarne, H_{CS} ,
- oddziaływanie jąder z niesparowanymi elektronami, H_{para} ,
- anizotropia przesunięcia chemicznego, H_{p-chem} ,
- oddziaływanie kwadrupolowe, H_q .

W niniejszej pracy szerzej zostaną omówione te oddziaływania, które mają znaczący wpływ na przebiegi procesów relaksacji w badanych układach biologicznych. W szczególności są to oddziaływania dipolowe, dia- i paramagnetyczne oraz skalarne. Wtedy ogólny hamiltonian oddziaływań (Wzór 3.8) przedstawia wzór:

$$H = H_z + H_D(t) + H_{SK}(t). \quad (3.9)$$

3.3 Oddziaływania dipolowe

Jeżeli spiny jądrowe są pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego, to oddziałują z tym polem, co nazywamy oddziaływaniem zeemanowskim. Dodatkowo wewnątrz układu spinów występują oddziaływania innego typu, z których najważniejszym w układach biologicznych jest oddziaływanie dipolowe (homo- i heterojądrowe) [11], [17], [19], [20], [21].

Wszystkie jądra, których spin i moment magnetyczny jest różny od zera, możemy traktować jako dipole magnetyczne generujące lokalne pola magnetyczne. Spośród oddziaływań dipolowych możemy wyróżnić oddziaływania:

- dwóch identycznych spinów jądrowych (proton-proton),
- dwóch różnych spinów jądrowych (proton-inne jądro),

- spinu jądrowego i jonu paramagnetycznego (proton-jon paramagnetyczny).

Rozważmy najpierw dwa dowolnie wybrane spiny jądrowe j, k o momentach magnetycznych $\vec{\mu}_j, \vec{\mu}_k$ [11], [12], [17], [22]. Moment magnetyczny (dipol) $\vec{\mu}_j$ oddziałuje wtedy z polem lokalnym wytworzonym przez dipol magnetyczny $\vec{\mu}_k$. Energia tego oddziaływania wyrażona jest za pomocą wzoru:

$$E_{jk}^{(d)} = \frac{\vec{\mu}_j \vec{\mu}_k - 3(\vec{n}_{jk} \vec{\mu}_j)(\vec{n}_{jk} \vec{\mu}_k)}{r_{jk}^3}, \quad (3.10)$$

gdzie r_{jk} jest odległością oddziałujących dipoli, a $\vec{n}_{jk}$ jest wektorem skierowanym od jądra j do jądra k .

Pełny hamiltonian oddziaływań dipolowych dla układu wielu spinów otrzymać można ze wzoru (3.10), biorąc sumę energii wszystkich par spinów j, k , a także traktując wielkości $\vec{\mu}_j, \vec{\mu}_k$ jako operatory, które są proporcjonalne do odpowiadających im operatorów spinowych ($\vec{\mu}_j = \gamma_j \hbar \vec{I}_j$):

$$\hbar H^d = \hbar \sum_{j < k} H_{jk}^d = \hbar \sum_{j < k} d_{jk} [\vec{I}_j \vec{I}_k - 3(\vec{n}_{jk} \vec{I}_j)(\vec{n}_{jk} \vec{I}_k)], \quad (3.11)$$

gdzie $d_{jk} = \hbar \gamma_j \gamma_k r_{jk}^{-3}$ jest stałą oddziaływania dipolowego jąder j, k .

Ogólny hamiltonian oddziaływania dipolowego (Równ. 3.8) można zapisać jako sumę [23]:

$$H_0 = H_Z + \langle H_{II}^d \rangle + \langle H_{IS}^d(t) \rangle, \quad (3.12)$$

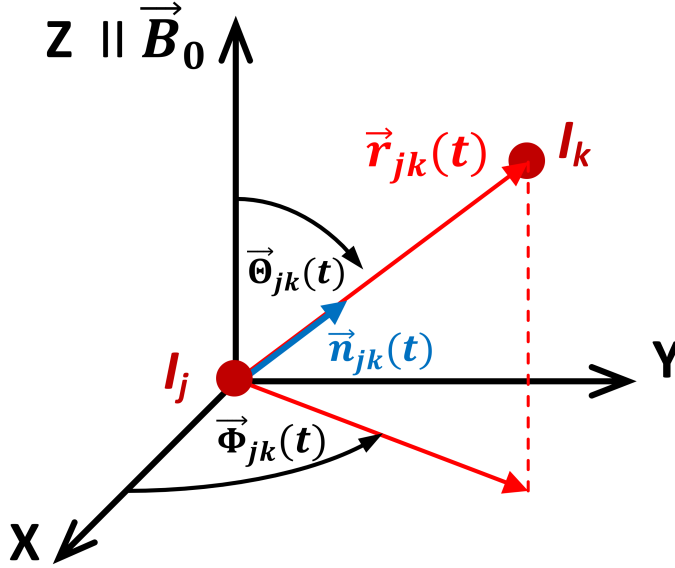
oraz

$$H'(t) = H(t) - \langle H(t) \rangle. \quad (3.13)$$

Należy pamiętać, że $Tr H_0 \neq 0$, zaś $Tr H'(t) = 0$.

W szczególności dla spinów jądrowych j, k hamiltonian H_{jk}^d można zapisać za pomocą tensorów kartezjańskich we współrzędnych spinowych i przestrzennych [23]:

$$H_{jk}^d = \sum_{pq} (I_{jp} I_{kq}) S_{pq}^{jk}, \quad (3.14)$$



Rysunek 3.1. Orientacja wektora $\vec{r}_{jk}$ w układzie laboratoryjnym

gdzie

$$S_{pq}^{jk} = -3d_{jk}(n_{jkp}n_{jkq}) - \frac{1}{3}\delta_{jk}, \quad (3.15)$$

gdzie n_{jkp} są współrzędnymi wektora $\vec{n}_{jk}$. W procesie redukcji powyższych tensorów otrzymuje się tensory kuliste drugiego rzędu w postaci:

$$T_{2M}(\vec{n}_{jk}) = C_{2M}(\Theta_{jk}, \Phi_{jk}), \quad (3.16)$$

gdzie: Θ_{jk} i Φ_{jk} opisują orientacje wektora $\vec{r}_{jk}$ i wektora $\vec{n}_{jk}$ w układzie laboratoryjnym (Rys. 3.1).

Po tej operacji hamiltonian oddziaływania dipolowego otrzymuje postać sumy iloczynów skalarnych tensorów kulistych drugiego rzędu:

$$H_{jk}^d(t) = - \sum_{j < k} d_{jk} \hat{A}_{2M}(\hat{I}_j \hat{I}_k) C_{2M}^*(\Theta_{jk}(t) \Phi_{jk}(t)), \quad (3.17)$$

gdzie: A_{2M} i C_{2M} dane są wzorami:

$$A_{2M}(\vec{I}_j \vec{I}_k) = (\vec{I}_j \nabla) (\vec{I}_k \nabla) (r^2 C_{2m}(\Phi \Theta)), \quad (3.18)$$

$$C_{2M}(\Theta\Phi) = \sqrt{\frac{4\pi}{2L+1}} Y_{2M}(\Theta\Phi), \quad (3.19)$$

a kąty Θ_{jk} i Φ_{jk} to przypadkowe funkcje czasu na skutek molekularnych reorientacji, $C_{LM}(\Theta\Phi)$ są funkcjami Racaha, zaś $Y_{LM}(\Theta\Phi)$ są funkcjami kulistymi [11], [17].

Dla szczególnego przypadku oddziaływania dwóch jednakowych spinów, gdy $\omega_j = \omega_k$, $I_j = I_k = I$, $\gamma_j = \gamma_k = \gamma_I$ oraz stałe ekranowania $\sigma_j = \sigma_k = \sigma$, hamiltonian ten ma postać:

$$H_{II}^d = H_{jk}^d(t) = - \sum_{i < j} d_{ij} A_{2M}(\vec{I}_i, \vec{I}_j) \left[C_{2M}^* \left(\Theta_{jk}(t) \Phi_{jk}(t) \right) - \left\langle C_{2M}^* \left(\Theta_{ij}(t) \Phi_{ij}(t) \right) \right\rangle \right], \quad (3.20)$$

gdzie gwiazdki oznaczają część urojoną (sprzężenie zespolone $e^{i\phi*} = e^{-i\phi}$).

Podobnie dla różnych spinów:

$$H_{IS}^d = H_{jk}^d(t) = \sum_{jk} d_{jk} A_{2M}(\vec{I}_j, \vec{S}_k) X_{2M}^{jk*}(t), \quad (3.21)$$

gdzie

$$X_{2M}^{jk*}(t) = \left[C_{2M}^* \left(\Theta_{jk}(t) \Phi_{jk}(t) \right) - \left\langle C_{2M}^* \left(\Theta_{ij}(t) \Phi_{ij}(t) \right) \right\rangle \right]. \quad (3.22)$$

W magnetycznym rezonansie jądrowym badany układ statystyczny składa się z dwóch podukładów: spinów jądrowych i sieci. Ze względu na złożoność takich układów konieczne jest stosowanie metod przybliżonych, czyli tak zwanej półklasycznej metody rezonansu jądrowego. Wprowadza się wtedy zredukowany operator gęstości, będący śladem operatora gęstości po zmiennych sieciowych, dla których $\sigma = \text{Tr} \rho$. Operator gęstości σ podlega kwantowomechanicznemu równaniu ruchu [17]:

$$\frac{d\sigma}{dt} = -i [H, \sigma]. \quad (3.23)$$

To równanie różniczkowe można rozwiązać, ograniczając się do przybliżeń drugiego stopnia:

$$\frac{d\sigma^*}{dt} = -\frac{1}{2} \int_{-\infty}^{\infty} \langle [H^*(t), [H^*(t+\tau), \sigma^* - \sigma_0]] \rangle d\tau, \quad (3.24)$$

gdzie za pomocą gwiazdki oznaczono:

$$X^* = e^{iH_0 t} X e^{-iH_0 t}, \quad (3.25)$$

dla takich X , jak σ, Q, H .

Korzystając z definicji na szybkości relaksacji $Q_i = \frac{1}{T_i}$ dla $i = 1, 2, 1\rho$:

$$\frac{d\langle Q^* \rangle}{dt} = (\langle \Lambda^*(Q) \rangle - \langle \Lambda^*(Q) \rangle_0), \quad (3.26)$$

gdzie

$$\langle \Lambda^*(Q) \rangle = \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{\infty} \langle [\Lambda^*(t), [\Lambda^*(t+\tau), \Lambda^*]] \rangle d\tau. \quad (3.27)$$

Po wyliczeniach otrzymujemy wzory na szybkości relaksacji R_1 i R_2 :

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = \frac{\langle \Lambda^*(I_Z) \rangle}{\langle I_Z \rangle}, \quad (3.28)$$

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{\langle \Lambda^*(I_+) \rangle}{\langle I_+ \rangle}. \quad (3.29)$$

Ostatecznie po dalszych przekształceniach otrzymuje się znane wzory, które można sprawdzić eksperymentalnie [24]. Dla relaksacji spinowo-sieciowej:

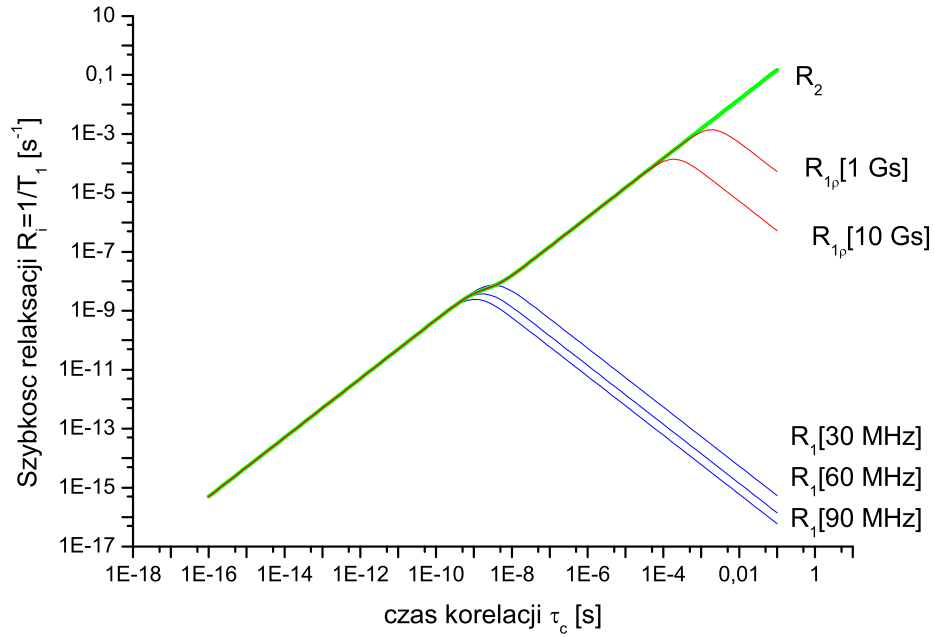
$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{5} A r^{-6} \left(\frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right), \quad (3.30)$$

gdzie: $A = \frac{5\gamma^4 \hbar^2}{18}$, $\omega = \gamma B_0$, zaś $\tau_c = \tau_0 e^{E/kT}$ jest zależnym od temperatury, zgodnie z wzorem Arrheniusa, czasem korelacji. Czas ten jest równy czasowi potrzebnemu na obrót drobinę średnio o kąt $\sqrt{\frac{2}{3}}$ radiana.

Ze wzoru 3.30 wynika, że dla szybkich ruchów (czyli dla krótkiego czasu korelacji), gdy (dla 60 MHz) $\omega \tau \ll 1$, szybkość relaksacji $R_1 = 1/T_1$ jest proporcjonalna do τ , co na wykresie arrheniusowskim daje liniową zależność R_1 od odwrotności temperatury. Dla ruchów wolnych (dla długiego czasu

korelacji), gdy $\omega \tau \gg 1$, wtedy $\frac{1}{T_1} \approx \frac{1}{\omega^2 \tau}$, co oznacza kwadratową zależność T_1 od częstości rezonansu, czyli od pola magnetycznego. Nazywamy to dyspersją czasów relaksacji.

Dla pośrednich wartości, konkretnie dla $\omega \tau = 0,616$, szybkość relaksacji $1/T_1$ osiąga maksimum (Rys. 3.2).



Rysunek 3.2. Symulacje zależności szybkości relaksacji R_1 , R_2 i $R_{1\rho}$ od czasów korelacji τ dla różnych $\omega_0 = \gamma B_0$ oraz $\omega_1 = \gamma B_1$

Podobnie czas relaksacji poprzecznej (spin-spin) przedstawia wzór:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{6} A r^{-6} \left(3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^4 \tau_c^2} \right). \quad (3.31)$$

Przechodząc do układu wirującego, otrzymuje się wzór na szybkość relaksacji $R_{1\rho}$, który ma postać [25]:

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{2}{5} A r^{-6} \left(\frac{5\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{2\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + 4\omega_1^2 \tau^2} \right). \quad (3.32)$$

W wodzie destylowanej, dejonizowanej i odgazowanej wartości czasów relaksacji T_1 i T_2 dla 60 MHz, gdy $\omega\tau \ll 1$ (w tzw. *extreme narrowing case*) są takie same, natomiast w ciałach stałych i roztworach makromolekuł czas T_2 jest znacząco krótszy względem czasu T_1 .

Jak pokazano, istniejąca teoria procesów relaksacji, oparta na rozważaniach modelu ruchu i teorii kwantowej, daje możliwość otrzymania analitycznych wzorów opisujących zależności czasów relaksacji od siły pola magnetycznego, temperatury, koncentracji itp.[13].

Zdarza się jednak, że w niektórych substancjach otrzymane eksperymentalne zależności dyspersyjne nie pasują do przebiegów przedstawionych na rysunku 3.2. Przyczyną tego faktu jest istnienie w bardziej złożonych układach (np. w polimerach) więcej niż jednego czasu korelacji τ . Wtedy zależności szybkości relaksacji R_1 mają dwa lub więcej dobrze rozdzielonych lub nakładających się maksimów [26], [27]. Niekiedy konieczne jest wprowadzenie ciągłego rozkładu czasów korelacji, m.in. Cole-Cole lub logarytmiczno-gausowskiego (log-gauss) i dopasowanie symulacji do eksperymentalnych zależności dyspersyjnych [28].

3.4 Procesy relaksacji w obecności jonów paramagnetycznych

W przypadku, gdy w roztworze wodnym obecne są jony paramagnetyczne jako jądra o niezerowym spinie S (np. Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+}), na szybkość relaksacji protonów I wody wpływają także oddziaływania dipolowe homoi heterojądrowe, które zależą od: siły momentów magnetycznych, ilości niesparowanych elektronów jonów paramagnetycznych S , ich ruchliwości oraz odległości pomiędzy nimi i protonami. Wypadkowa szybkość relaksacji jest sumą przyczynków rotacyjnych i translacyjnych [11], [29], [30], [31],:

- $1/T_{1II}$ oddziaływań protonów między sobą,
- $1/T_{1IS}$ oddziaływań protonów z jonami.

Ponadto relaksacja w obecności jonów paramagnetycznych zależy od innych czynników, m.in.:

- liczby molekuł wody w kompleksie,
- czasu reorientacji molekuly,
- czasu obecności molekuly wody w kompleksie,
- odległości pomiędzy jonem i protonem wody,
- siły zewnętrznego pola magnetycznego.

Zapisując to wzorem [31]:

$$\frac{1}{T_{1I}} = \left[\left(\frac{1}{T_1} \right)_{II} + \left(\frac{1}{T_1} \right)_{IS_{trans}} \right] (1-p) + \left[\left(\frac{1}{T_1} \right)_{II_{rot}} + \left(\frac{1}{T_1} \right)_{IS_{trans}} \right] p, \quad (3.33)$$

gdzie p jest ułamkiem protonów wody zaabsorbowanych na jonie paramagnetycznym. Przykładowo: dla jonów miedzi Cu^{2+} , przyjmując, że jon Cu łączy się z 12 drobinami wody, wtedy liczba protonów $N_p = 2N_{H_2O}$ wchodzi do wzoru na ułamek p :

$$p = \frac{12N_j}{N_p + 12N_j} \ll 1. \quad (3.34)$$

Jeśli liczba jonów paramagnetycznych N_j jest mała w porównaniu z liczbą drobin wody, wówczas $\frac{N_j}{N_{H_2O}} \ll 1$. Można wtedy człony ze wzoru 3.33 mnożone przez p zaniedbać i wtedy w przypadku *extreme narrowing case* wzór ten redukuje się tylko do sumy dwóch oddziaływań, z których drugie jest zależne liniowo od stężenia jonów:

$$\frac{1}{T_{1I}} = \left(\frac{1}{T_1} \right)_{II} + \left(\frac{1}{T_1} \right)_{IS_{trans}} = \left(\frac{1}{T_1} \right)_{II} + b_0 c, \quad (3.35)$$

gdzie c jest stężeniem molarnym jonów Cu. W celu oszacowania wartości b_0 rozpisujemy:

$$b_0 = \left(\frac{1}{T_1} \right)_{IS_{trans}} = \gamma_I \langle \mu^2 \rangle \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{4\pi}{5} \left[\frac{1}{3} J(\omega_s - \omega_I) + J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_s) \right], \quad (3.36)$$

Ponieważ $\omega_s \gg \omega_I$, można przyjąć, że $\omega_s \pm \omega_I \approx \omega_s$. W przypadku gdy $\omega_I^2 \tau_C^2 \ll 1$, gdzie τ_C to czas korelacji protonów, zaś ω_I to częstość rezonansu protonowego, wtedy $J(\omega_I) = J(0)$ i wzór 3.36 redukuje się do:

$$\frac{1}{T_{1IS}} = \gamma_I^2 \langle \mu^2 \rangle \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 J(0) \left[1 + \frac{7}{3} f(\omega_s) \right], \quad (3.37)$$

gdzie $f(\omega_s) = \frac{J(\omega_s)}{J(0)} \leq 1$.

Dalej zgodnie z teorią R.J. Abrahama [11]:

$$J(0) = \frac{2}{15} \frac{N_j}{dD} = \frac{2}{15} \frac{N_j \eta}{k_B T} = \frac{2\pi}{5} \frac{10^3 N_A \eta}{k_B T} c = \frac{2\pi}{5} 10^3 \frac{N_A \eta}{RT} c, \quad (3.38)$$

gdzie d to odległość najmniejszego zbliżenia proton-jon, (Rys. 3.3), zaś D związane jest z czasem korelacji przez relację $\tau = d^2/2D$, wtedy wzór 3.36 możemy zapisać jako liniową zależność od koncentracji jonów, gdzie nachylenie prostej b_0 jest zgodne z wzorem:

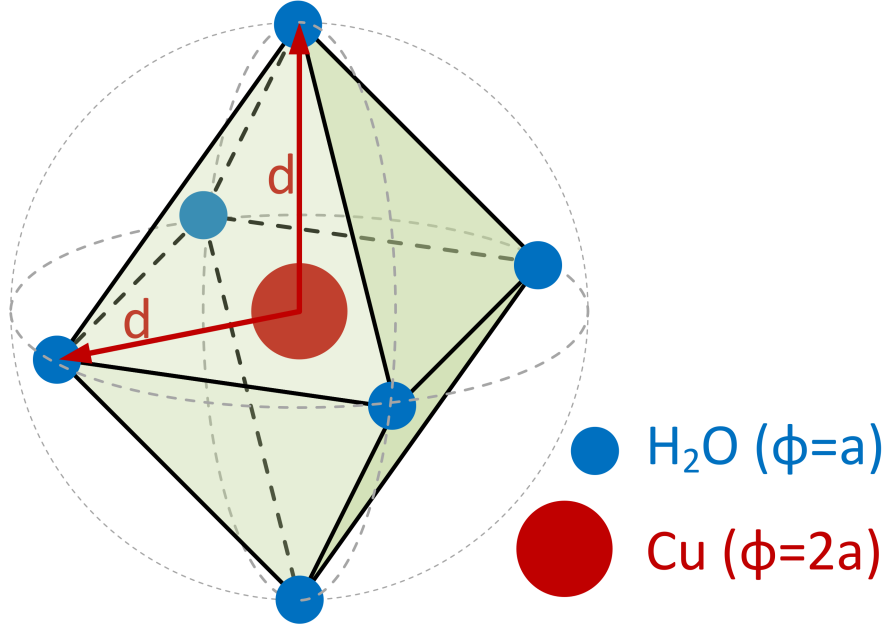
$$b_0 = \frac{\left[\left(\frac{1}{T_1} \right)_I - \left(\frac{1}{T_1} \right)_{II} \right]}{c} = \left[\frac{2\pi}{5} \gamma_I \gamma_J \hbar \mu_0 N_A \right]^2 \frac{2J(J+1)}{RT} 10^3 \eta \left[1 + \frac{7}{3} f(\omega_s) \right]. \quad (3.39)$$

Przechodząc do konkretnych obliczeń numerycznych, przyjmujemy że $g_s = 2$ i dalej

$$\gamma_S \hbar = g_S \mu_B = g_S \frac{e \hbar}{2m_e} \Rightarrow \frac{g_S}{2} \frac{e}{m_e} = \frac{e}{m_e}. \quad (3.40)$$

Zgodnie z zasadą, że $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$, dla rozważanych przez nas jonów miedzi Cu^{2+} , gdzie: $L = 2, S = 1/2, J = 5/2$ - konfiguracja elektronowa ma postać: $^2D_{\frac{5}{2}}, 5d^9$, wtedy [32]:

$$\gamma_J \hbar = g_J \mu_B = g_J \frac{e \hbar}{2m_e}. \quad (3.41)$$



Rysunek 3.3. Schemat jonu Cu o średnicy $2a$ otoczonego molekułami wody o średnicy a , d to odległość najmniejszego zbliżenia proton-jon

Następnie zakładamy, że rozważany teoretycznie mechanizm jest dobrze opisany przez sprzężenie Russell-Saundersa, co daje:

$$g = g_j = \frac{3}{2} + \frac{S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} = \frac{6}{5}, \quad (3.42)$$

stąd

$$\gamma_J = \frac{g_J}{2} \left(\frac{e}{m_e} \right) = 0,6\gamma_S = 1,055 \cdot 10^{11} \frac{\text{C}}{\text{kg}}. \quad (3.43)$$

Po dalszych obliczeniach otrzymujemy w jednostkach [l/mol s], że:

$$b_0 = 353,4 \left[1 + \frac{7}{3} f(\omega_s) \right]. \quad (3.44)$$

Wzór ten da się porównać z eksperymentem (Rys. 3.8), gdzie otrzymane dane przedstawiono jako liniową zależność $1/T_1$ od stężenia jonów miedzi.

Wcześniej jednak pozostaje oszacować wartość $f(\omega_s)$, jako funkcję całki:

$$f(\omega_s) = \frac{15}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\left(\cos u - \frac{\sin u}{u}\right)^2}{(u^4 + \omega_s^2 \tau^2)} du. \quad (3.45)$$

Całka ta jest rozwinięciem funkcji Bessela, gdzie u jest zdefiniowane w literaturze [11].

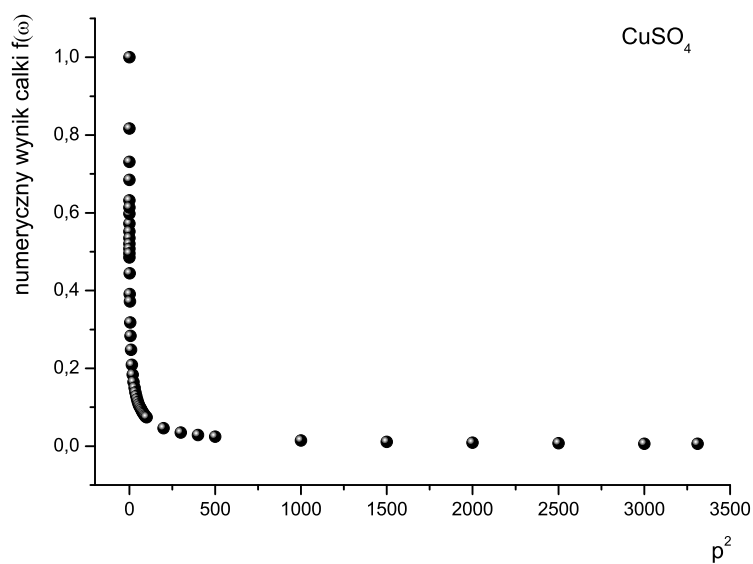
W celu oszacowania $f(\omega_s)$ wykonano symulację powyższej całki dla czasu translacji $\tau_t = 9\tau_c$ za pomocą programu „Mathematica” z zadanymi parametrami, zmieniając $p^2 = \omega_s^2 \tau^2$ w zakresie 0,5-100 co jeden rząd wielkości (Rys. 3.4).

W kolejnych etapach, aby otrzymać wyraźniejszy przebieg funkcji, z pierwotnej symulacji całki wykonano:

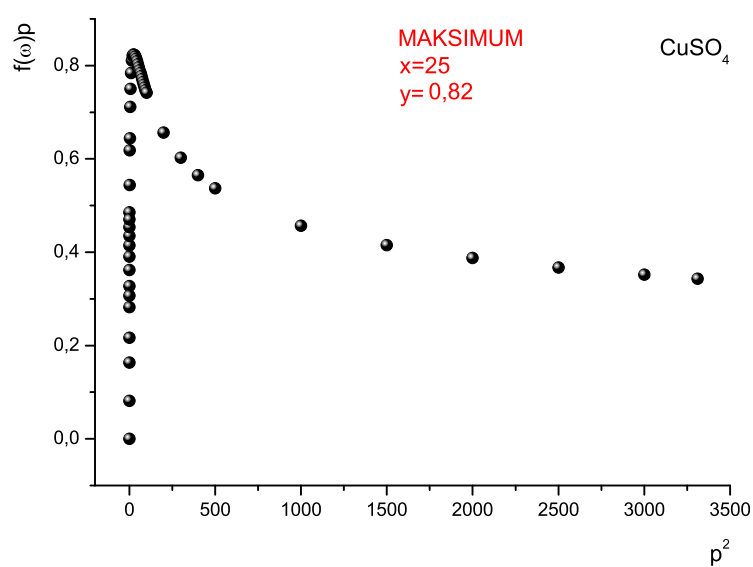
- w pierwszym etapie dane z rysunku 3.4 pomnożono przez wynik całki ($y = f'(p) = f(\omega)p$) i przedstawiono na rysunku 3.5,
- w drugim etapie, celem dokładniejszej interpretacji wykresów 3.4 i 3.5, spierwiastkowano oś x (Rys. 3.6) oraz pomnożono przez p (Rys. 3.7).

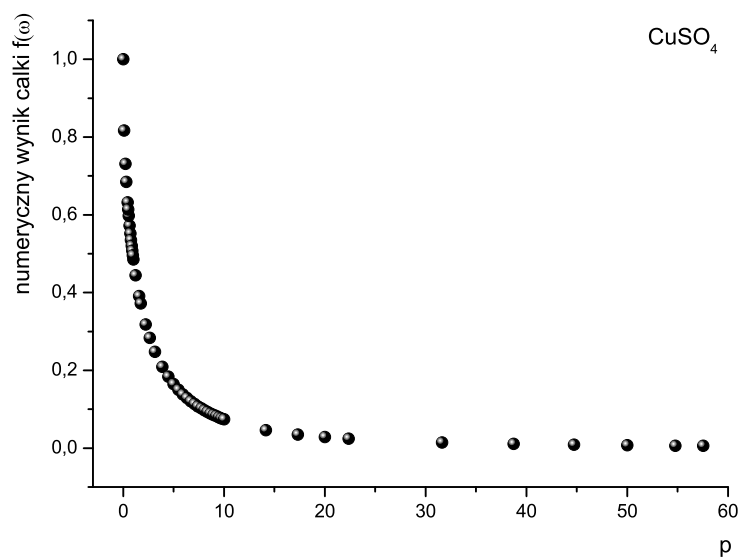
W ostatecznym wyniku otrzymaliśmy funkcję $f'(p)$, która dla określonych wartości p , osiąga maksimum (Rys.3.7).

W naszych eksperymentach częstość rezonansu protonowego wynosiła 60 MHz (w Krakowie). Dla tej częstości z wykresu symulacji otrzymujemy $f(7)=0,25$, co daje wartość nawiasu $\left[1 + \frac{7}{3}f(\omega_s)\right]=1,66$. Wstawiając tę wartość do wzoru 3.39, wyliczamy b_0 . Podobnie, przy założeniu że $\tau_c = 1$ ps, wtedy $\tau_t = 9$ ps i odczytujemy z wykresu symulacji: $f(\omega_i, \omega_t) = 0,5$, co daje $\left[1 + \frac{7}{3}f(0,5)\right]=2,16$ i dalej $b_0 = 700$ [l/mol s] (Tab. 3.1). Tę wartość b_0 można teraz porównać z wartością otrzymaną w eksperymencie (Rys. 3.8) dla częstości 60 MHz. Eksperymentalne nachylenie wynosi 750 ± 50 [l/mol s], co daje dobrą zgodność z wartością teoretyczną dla b_0 , przyjmując $\tau = 1$ ps. Fakt ten potwierdza poprawność przyjętego modelu relaksacji protonów w obecności jonów paramagnetycznych.

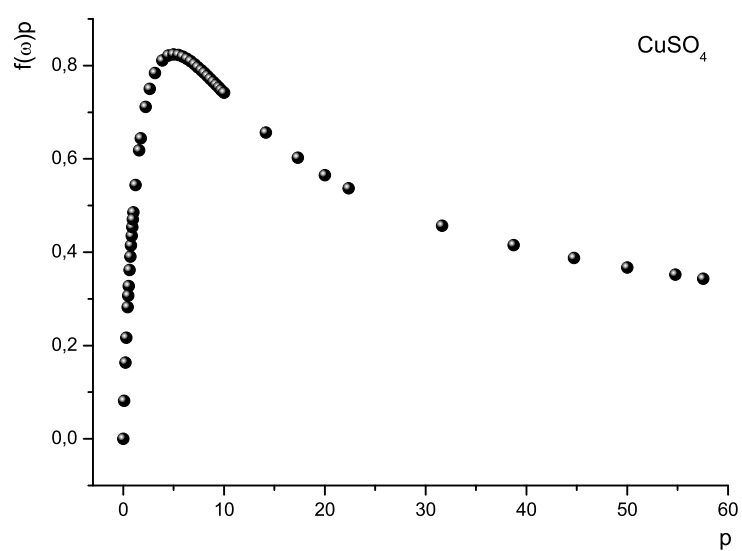


Rysunek 3.4. Wynik symulacji całki 3.45

Rysunek 3.5. Wynik symulacji całki pomnożony przez p



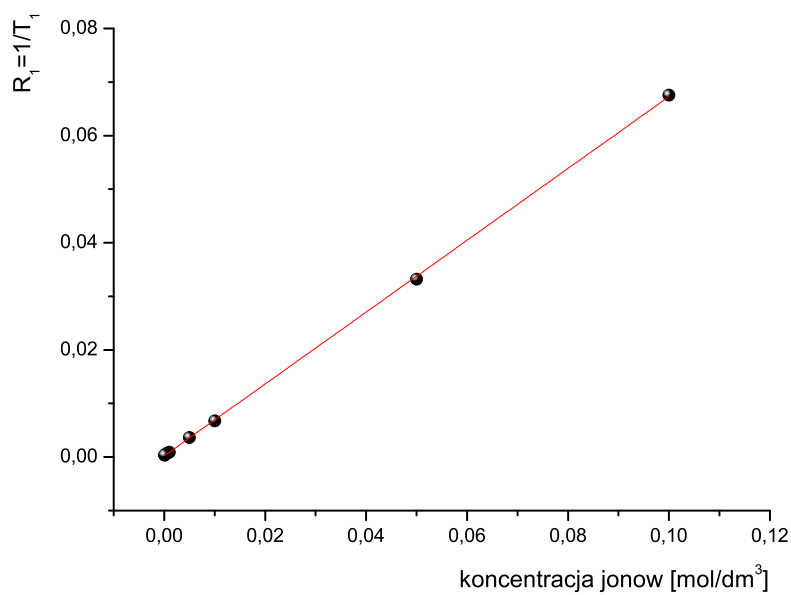
Rysunek 3.6. Wynik symulacji całki w funkcji p



Rysunek 3.7. Wynik symulacji całki pomnożony przez p , w funkcji p

τ_c [ps]	$\omega_s \tau_{trans}$	$f(p)$	$1 + [7/3f(p)]$	b_0
1	1,34	0,5	2,16	768
1,5	2	8,4	1,93	681
5,2	6,97	0,25	1,58	558
7,2	9,65	0,08	1,19	420

Tabela 3.1. Wyliczone z symulacji całki (Rys. 3.5) wartości teoretyczne dla $\tau_c = 1; 1,5; 5,2; 7,2$ ps i częstotści rezonansu protonowego 60 MHz



Rysunek 3.8. Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji jonów CuSO_4 w wodzie, dla częstotści rezonansu protonowego 60 MHz

3.5 Oddziaływania skalarne

Oddziaływanie skalarne jest oddziaływaniem nie wprost pomiędzy dwoma spinami jądrowymi IS , poprzez elektrony uczestniczące w wiązaniu tych jąder [18]. Aby zademonstrować jego pochodzenie, rozważmy molekułę H_2 . Dla prostoty założmy, że orbity molekularne są złożone z dwóch orbit atomowych wodoru. Mimo że w rzeczywistości elektrony nie są zlokalizowane, to jednak istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że jeden elektron jest blisko jądra 1, a inny jest blisko jądra 2. Ten, który jest blisko jądra 1, preferuje mieć spin antyrównoległy do niego. Zgodnie z zasadą Pauliego, wtedy drugi elektron na tej samej orbicie musi być antyrównoległy do pierwszego. Wtedy ten, który jest blisko jądra 2, preferuje być równoległym do jądra 1. Ostatecznie oddziaływanie dipolowe pomiędzy drugim elektronem i jądrem 2 okazuje się być zorientowanym antyrównoległe do jądra 1. Efekt ten nazywany jest sprzężeniem spin-spin, sprzężeniem J , lub sprzężeniem skalarnym, ponieważ jest on niezależny od orientacji molekularnej i natężenia pola zewnętrznego. Oddziaływanie to może być w zasadzie rozszerzone na inne molekuły. Zatem oddziaływanie skalarne może być modelowane przez różne konformacje molekularne. Stąd jego potencjalne możliwości w badaniach biomateriałów. Innymi słowy mechanizm relaksacji skalarnej pojawia się wtedy, gdy jądro 1 poprzez stałą sprzężenia J oddziałuje na inny spin $S = 1/2$ i oddziaływanie to jest modulowane albo przez wymianę chemiczną (oddziaływanie skalarne I rzędu), albo relaksację spinu S , dla $S > 1/2$ (oddziaływanie II rzędu). W wyniku tego mechanizmu, zanika skalarne rozszczepienie widma i dla pojedynczej linii wyliczone teoretycznie szybkości relaksacji przedstawiają wzory 3.46 i 3.47:

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{SC} = \frac{8\pi^2 J^2 S(S+1)}{3} \left[\frac{\tau_{SC}}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_{SC}^2} \right], \quad (3.46)$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_{SC} = \frac{4\pi^2 J^2 S(S+1)}{3} \left[\tau_{SC} + \frac{\tau_{SC}}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_{SC}^2} \right], \quad (3.47)$$

gdzie τ_{SC} to czas korelacji, zaś ω_I i ω_S są częstościami rezonansu jąder I i S [18].

3.6 Relaksacja $T_{1\rho}$ w układzie wirującym

W układzie laboratoryjnym w czasie rezonansu spiny w próbce poddane są działaniu dwóch pól magnetycznych $\vec{B}_0$ i $\vec{B}_1$. Pole $\vec{B}_0$ nie jest wtedy dla spinów polem stałym, gdyż magnetyzacja $\vec{M}$ wykonuje także precesję wokół kierunku pola $\vec{B}_1$. W wirującym układzie współrzędnych pole $\vec{B}_0$ się zeruje, zaś pole $\vec{B}_1$ jest widziane przez spiny jako niezmiennie. Zatem w czasie rezonansu procesy relaksacji odbywać się będą w polu $\vec{B}_1$, które jest dużo mniejsze od pola $\vec{B}_0$ i jego wartość może być regulowana poprzez osłabienie wysokości tzw. impulsu podtrzymującego. Wzór

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{2}{5}Ar^{-6} \left(\frac{5\tau}{1 + \omega^2\tau^2} + \frac{2\tau}{1 + \omega^2\tau^2} + \frac{3\tau}{1 + 4\omega_1^2\tau^2} \right) \quad (3.48)$$

na szybkość relaksacji został wyprowadzony teoretycznie w oparciu o oddziaływanie dipolowe i zawiera dodatkowy człon odnoszący się do precesji magnetyzacji w polu $\vec{B}_1$ [25], [33].

Jeśli w eksperymencie nie zmienia się $\vec{B}_0$ i temperatura pozostaje stała, a zmieniać się będzie tylko wartość $\omega_1 = \gamma B_1$, wówczas wzór 3.48 na $R_{1\rho}$ będzie funkcją B_1 w postaci [34]:

$$R_{1\rho} = \frac{1}{T_{1\rho}} = A + \frac{B}{(1 + CB_1^2)}, \quad (3.49)$$

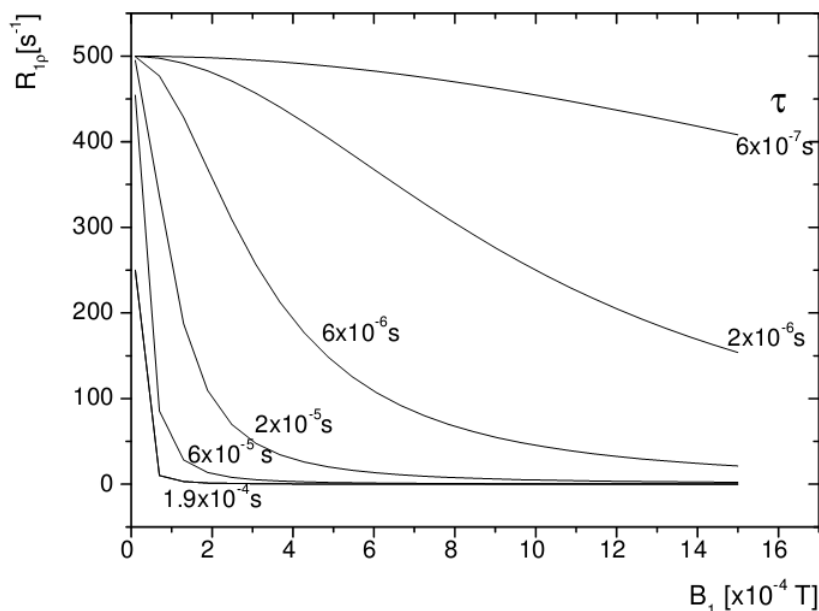
gdzie A i B to stałe, zaś $C = \gamma^2\tau^2$. Jest to zależność $R_{1\rho}$ od B_1 w postaci tzw. profilu dyspersji.

Metoda profili dyspersji oparta na pomiarach zależności procesów relaksacji od pola magnetycznego daje możliwości otrzymywania informacji o dynamice molekularnej badanych substancji. Metoda ta z powodzeniem została zastosowana do układów biologicznych [35]. Eksperymentalnie zmierzony kształt profilu dyspersji $T_{1\rho}$ może zostać dopasowany do wzoru 3.49, skąd z otrzymanej wartości C wyliczyć można wartość średnią czasu korelacji

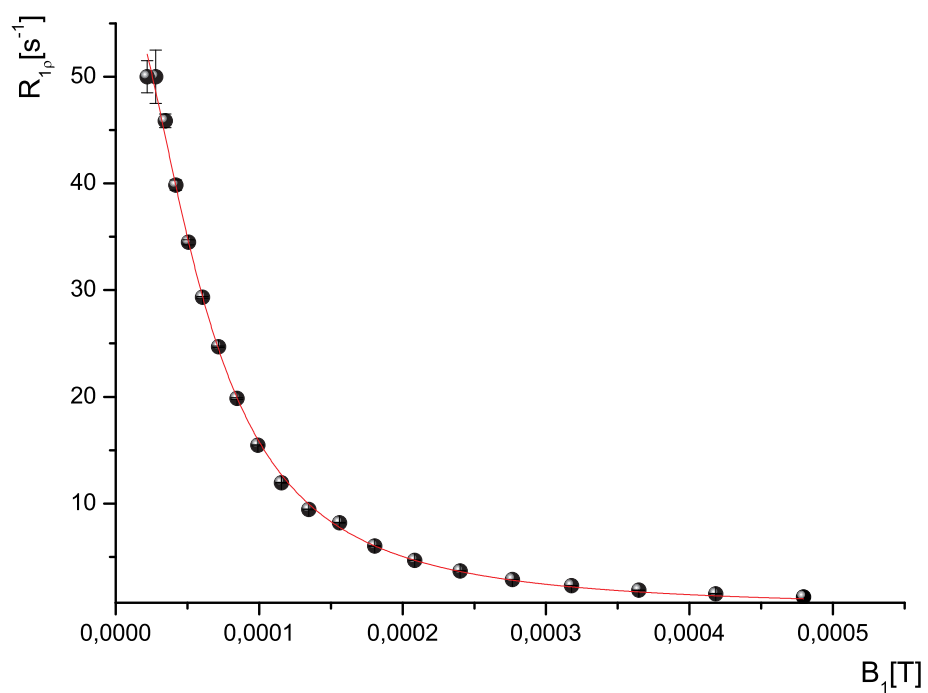
wody hydratacyjnej. Z zależności temperaturowej tego czasu otrzymuje się następny parametr - energię aktywacji. Rysunek 3.9 przedstawia symulacje profili dyspersji z wzoru 3.49 dla różnych czasów korelacji.

Zachodzące w próbce procesy wymiany chemicznej protonów, których czas jest krótszy lub porównywalny z czasem korelacji, zmieniają kształt profilu dyspersji i dlatego metoda ta używana jest również do ich oceny [36].

Zaletą metody dyspersji $T_{1\rho}$ jest możliwość pomiarów w niskich polach magnetycznych (rzędu 10^{-4} T, czyli 1 gaussa), co pozwala na obserwację wolnych ruchów molekularnych. Oszacowanie czasów korelacji możliwe jest w granicach od 10^{-4} do 10^{-7} s, gdyż dla nich w stosowanych spektrometrach NMR w polach $\vec{B}_1$ z zakresu 1-10 Gs dyspersja $1/T_{1\rho}$ jest obserwowana. Przykładowy profil dyspersji $T_{1\rho}$ otrzymany dla roztworu nadtlenu wodoru przedstawia rysunek 3.10. Dopasowana krzywa wynika z omawianego wcześniej wzoru 3.49 [35].



Rysunek 3.9. Symulacja profili dyspersji dla różnych wartości τ



Rysunek 3.10. Profil dyspersji $T_{1\rho}$ otrzymany dla 35% roztworu wodnego nad-tlenku wodoru w temperaturze 25° C

Rozdział 4

Relaksacja w układach biologicznych

4.1 Relaksacja w roztworach makromolekuł biologicznych

Ze względu na fakt, że lista pierwiastków rezonansowych pokrywa się z częstością występowania pierwiastków w materiale biologicznym, bardzo szybko po odkryciu zjawiska NMR zastosowano go jako narzędzie do badań układów biologicznych. Na liście jąder rezonansowych w nich występujących króluje wodór w izotopach ^1H i ^2D , zaś inne pierwiastki to węgiel ^{13}C , tlen ^{17}O , azot ^{23}N , sód ^{23}Na i potas ^{39}K .

Już w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia, jako pierwsza, grupa prof. J. Hennela opublikowała w „Nature” pracę, w której pokazała, że procesy relaksacyjne protonów wody mogą dostarczyć informacji o materiale biologicznym [1]. Próbkami, które wtedy badano, były roztwory białka. Wkrótce potem zmierzono także czasy relaksacji w tkankach, otrzymując ciekawe wyniki różnicujące czasy relaksacji zdrowych i patologicznych komórek [14],[37].

Molekuły biologiczne znajdują się w różnych środowiskach: wewnątrz i na zewnątrz komórek, w cieczach fizjologicznych i innych. Makromolekuły obracają się w koło w sposób przypadkowy (ruchy Browna) i oddziałują z innymi

molekułami, głównie z wodą. Jeden woksel o objętości 1 mm^3 zawierać może ok. 10^{19} molekuł wody, 10^{16} makromolekuł i 10^6 komórek. Sygnał NMR otrzymywany jest przede wszystkim od protonów wody w wielu różnych środowiskach. Molekuły te obracają się, przemieszczają i wymieniają. Obserwowane przez NMR protony wytwarzają pola lokalne zmieniające się wraz z temperaturą, lepkością i obecnością molekuł (Rys. 4.2), (Rys. 4.3). Te lokalne pola są określone przez:

- funkcję autokorelacji, która określa, jak często i w jakich odstępach czasu to pole fluktuuje,
- funkcję gęstości spektralnej, określającą siłę fluktuacji pola w określonej częstotliwości,
- czas korelacji.

Jeśli założymy, że dominującym oddziaływaniem w procesach relaksacji NMR jest oddziaływanie dipolowe pomiędzy protonami (Rozdz. 3), a następnie że woda jest wszechobecna, to w układach biologicznych możemy zmierzyć i opisać za pomocą modelu na poziomie molekularnym zachodzące w nich przebiegi procesów biofizycznych i biochemicznych [24], [36].

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wskazują, że obecność diamagnetycznych białek globularnych (np. albuminy, lizozymu, które możemy traktować jako uwodnione makromolekuły) przyspiesza szybkości relaksacji wody, co opisujemy za pomocą wzoru:

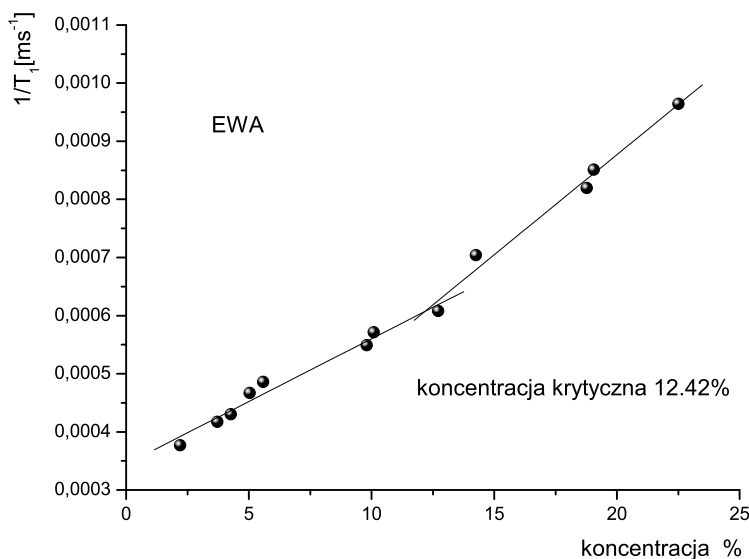
$$\frac{1}{T_i} = \frac{1 - cw}{T_{iw}} + \frac{cw}{T_{ib}}, \quad (4.1)$$

gdzie: $i = 1, 2, 1\rho$, c to stężenie białka [g/100 g], w to ilość wody wiązanej przez drobinę białka, zaś T_{iw} to czas relaksacji wody swobodnej [38].

Dla niskich stężeń ($cw \ll 1$) można napisać:

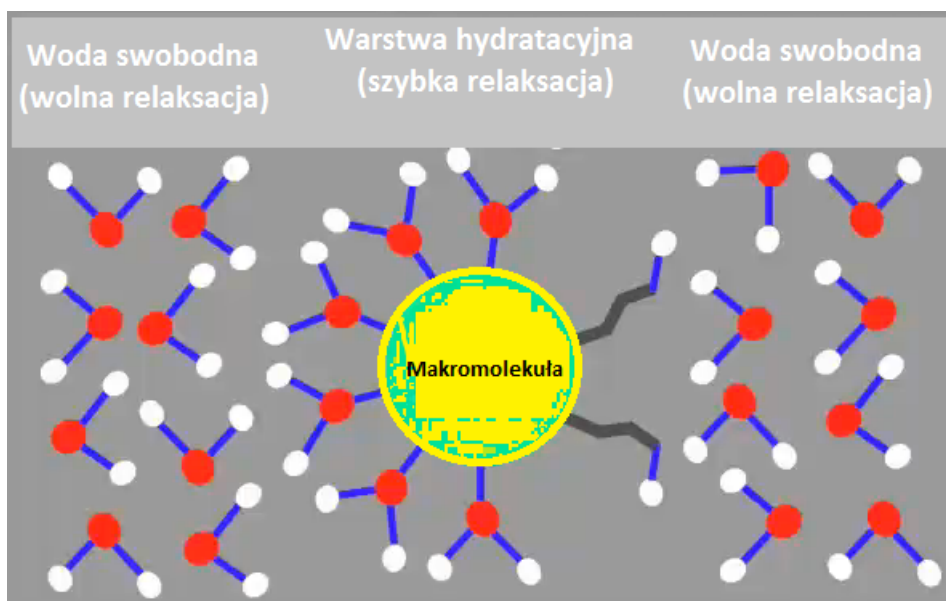
$$R_i = \frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{iw}} + k_i c, \quad (4.2)$$

gdzie k_i jest stałą charakterystyczną dla danego rodzaju białka, która zawiera iloczyn ilości wody związanej z makromolekułą i szybkości relaksacji R_i wody związanej.



Rysunek 4.1. Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji albuminy jaja kurzego

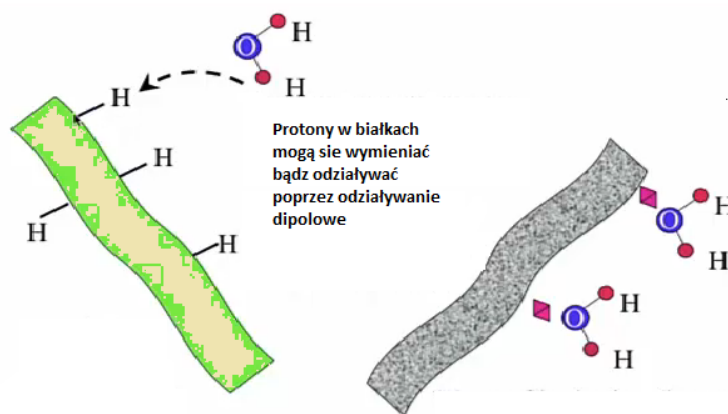
Z wzoru 4.2 wynika, że dla niskich stężeń zależność R_1 od koncentracji białka w wodzie jest liniowa [40]. Ilustruje to rysunek 4.1, na którym przedstawiono R_1 dla wodnych roztworów albuminy jaja kurzego (EWA). W stałej k ukryte są informacje o dynamice molekularnej wody zaabsorbowanej na powierzchni makromolekuły białka. Woda ta, w porównaniu z wodą swobodną (wykonującą ruchy z czasem korelacji τ rzędu 10^{-12} s), ma znacznie dłuższy czas korelacji, bo porusza się z czasem korelacji dużej drobin, który w temperaturze pokojowej jest rzędu 10^{-8} s. Dlatego już w polu magnetycznym $B_0=1$ T, zgodnie z symulacjami (Rys. 3.2), obserwowana jest zależność szybkości relaksacji od zewnętrznego pola magnetycznego (co nazywamy zjawiskiem dyspersji, gdyż poprzez relację $\omega=\gamma B_0$ szybkość relaksacji R_i jest funkcją częstości). Dla koncentracji białka wyższych niż koncentra-



Rysunek 4.2. Schematyczny rysunek oddziaływań dipolowych wpływających na procesy relaksacji w roztworach makromolekuł biologicznych [39]

cja krytyczna (Rys. 4.1), zależność liniowa ulega załamaniu, co tłumaczy się zmianą struktury roztworu [13]. Widać stąd, że dynamika molekularna w materiale biologicznym uwarunkowana jest nie tylko zmianami temperatury i koncentracją makromolekuł w roztworze, ale także zmianami konformacyjnymi, czyli zmianami struktury roztworu. Wpływają one na mierzone szybkości relaksacji, dlatego pomiary zależności T_1 , T_2 i $T_{1\rho}$ od temperatury, pola magnetycznego oraz innych czynników dostarczają informacji o tych układach.

W tkankach zwierzęcych i ludzkich czasy relaksacji w zależności od ich uwodnienia są różne. Dlatego poprzez ich pomiary można je różnicować na tkanki zdrowe i chore. Obserwacja ta ma istotne znaczenie diagnostyczne w obrazowaniu MRI, gdyż w tomografii MR możliwe jest otrzymywanie *in vivo* obrazów T_1 i T_2 zależnych, opartych na ich przestrzennym rozkładzie. Informacje otrzymane z tych obrazów są pomocne w ocenie obserwowanych zmian patologicznych tkanek, np. śródoperacyjnie, w szczególności w badaniach mózgu i nowotworów [41], [42].



Rysunek 4.3. Rodzaje oddziaływań protonów w roztworze makromolekuł

4.2 Relaksacja w obecności paramagnetyków

Jeśli w roztworze makromolekuł biologicznych znajdują się również jony paramagnetyczne w postaci swobodnych jonów metali, lub ich kompleksów, to i one wpływają na szybkości relaksacji [43]. Wówczas do wzoru 4.1 należy dodać człon paramagnetyczny:

$$R_i = \frac{1}{T_i} = \frac{1-c}{T_{iw}} + k_i C + c_{para} \frac{1}{T_{ipara}}, \quad (4.3)$$

gdzie: $i = 1, 2, 1\rho$, c_{para} oznacza koncentrację jonów paramagnetycznych, zaś $1/T_{ipara}$ to szybkość relaksacji paramagnetycznej. Zależność ta dopasowana została do danych eksperymentalnych w rozdziale 7.

W rezultacie dodania członu paramagnetycznego (Wzór 4.3), na wykresie zależności R_1 od koncentracji jonów w osoczu, przedstawionym w skali logarytmicznej (Rys. 7.6), obserwowane są dwa skrajne obszary przebiegu relaksacji. W obu tych obszarach nie ma zależności od koncentracji jonów paramagnetycznych i występują tzw. *plateau*. Jeśli koncentracja jonów jest mała, to dodany człon zawierający C_{para} możemy pominąć, zaś w obszarze, gdzie ta koncentracja jest duża, dodany człon jest członem dominującym,

bowiem przy dostatecznie dużym stężeniu wszystkie drobiny wody odczuwają wpływ jonów. Wtedy dalszy wzrost ich koncentracji nic już więcej nie zmienia.

Pomiędzy tymi obszarami wyróżniamy obszar przejściowy, którego szerokość jest różna dla roztworów i różnych jonów paramagnetycznych. Teoretyczny opis przebiegu relaksacji w tym obszarze został przedstawiony szczegółowo w rozdziale 3.4.

Kompleksowanie jonów paramagnetycznych osłabiające ich wpływ na otoczenie, poprzez środki chelatujące, zmienia relaksację drobin wody w roztworze. Jeśli osocze krwi traktujemy jako roztwór różnych białek (głównie albumin, które są białkami globularnymi), możemy do interpretacji procesów relaksacji stosować wzory 4.1 i 4.3. Innymi słowy, mierząc czasy relaksacji w osoczu, „patrzymy” na ten roztwór oczami wody. Zakładamy przy tym, że nie ma wymiany chemicznej pomiędzy protonami wody i protonami makromolekuł. Protony białek są bowiem mocno związane w strukturę makromolekuły i przy słabej zdolności rozdzielczej spektrometru nie są widziane przez NMR. Jednakże woda związana jest z białkiem poprzez centra uwodnienia, może wymieniać protony z protonami wody swobodnej. Dlatego czasy relaksacji są uśrednione i nierównomierne uwodnienie nie odgrywa roli. Jeśli protony wody wymieniają się wzajemnie, to zamiast czasu korelacji wprowadzamy wypadkowy czas τ , który wiąże oba czasy τ_c i τ_w wzorem [34]:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_w} + \frac{1}{\tau_c}, \quad (4.4)$$

gdzie τ_w to czas wymiany, a τ_c to czas korelacji. Oba te czasy zależą od temperatury $\tau_{c,w} = \tau_0 e^{-E/kT}$ z różnymi τ_0 i energiami aktywacji E .

W *extreme narrowing case* (gdy $\omega\tau_c \ll 1$), dla określonej częstości rezonansu, szybkość relaksacji jest proporcjonalna do wypadkowego czasu τ . $R_i = \frac{1}{T_i} = A\tau$, gdzie

$$\tau = \frac{\tau_w \cdot \tau_c}{\tau_w + \tau_c}. \quad (4.5)$$

Jeśli τ_w wymiany jest dużo krótszy od τ_c , to on decyduje o relaksacji. Tak więc

w zależności od relacji pomiędzy czasem wymiany i czasem korelacji, szybkość relaksacji może mieć różne pochodzenie [44]. Z eksperymentu można rozstrzygnąć, czy w procesie relaksacji dominuje wymiana czy ruchy molekularne. Istnieje kilka sposobów oceny czasu wymiany za pomocą metod NMR: IR, 2D NMR oraz metody dyspersyjne [45].

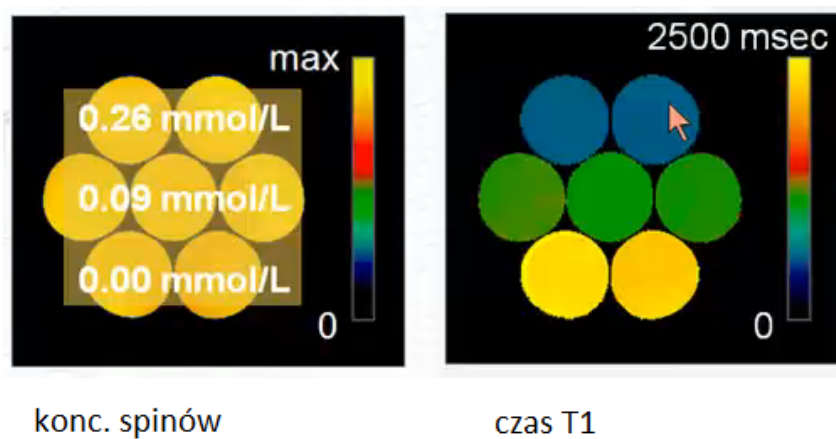
Efekt skrócenia czasów relaksacji spowodowany obecnością paramagnetyków wykorzystywany jest w tomografii MR do uzyskania lepszego obrazowania tkanek za pomocą tzw. środków kontrastowych. Najbardziej znanym z nich jest Gd-DTPA, który został „zapożyczony” z tomografii rentgenowskiej CT (dlatego jego zastosowanie kliniczne w tomografii MR nie wymagało długiego czasu testowania). Obecnie stosowane i badane są także inne środki kontrastowe do MR zawierające jony paramagnetyczne [39], [46]. Znajomość charakterystyki ich wpływu na procesy relaksacyjne pozwoliła wyróżnić dwie grupy: paramagnetyki, zmieniające mocno czasy T_1 i T_2 , oraz superparamagnetyki, zaburzające pole magnetyczne i zmieniające podatność magnetyczną, w wyniku czego skracają czas T_2 . W zależności od potrzeb badanego układu (np. organu ze zmianą nowotworową), w celu lepszego odróżnienia albo podkreślenia zmian, stosuje się przy odpowiednio dobranej sekwencji obrazowania odpowiedni kontrast, zmieniający albo T_1 , albo T_2 . Dodatkową zaletą zastosowania środków kontrastowych jest skracanie się czasu wykonania konkretnego badania [47], [48].

Dla środka kontrastowego wzór 4.3 ma postać:

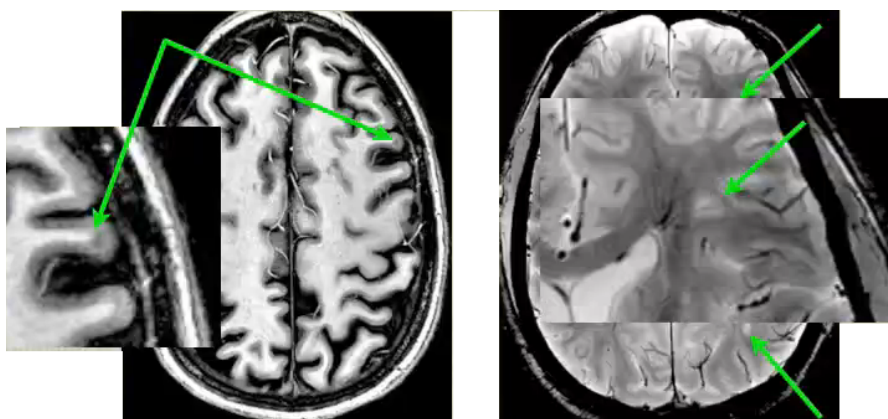
$$R_i(C_{KM}) = \frac{1}{T_i(C_{KM})} = \frac{1}{T_{i(0)}} + r_i C_{KM}, \quad (4.6)$$

gdzie: C_{KM} to koncentracja środka kontrastowego.

Zróznicowanie czasów relaksacji fantomów o różnej koncentracji jonów paramagnetycznych pokazuje rysunek 4.4. Obrazy tomograficzne MR mózgu bez i z użyciem środków kontrastowych widoczne są na rysunku 4.5.



Rysunek 4.4. Obrazowanie fiolek z różną koncentracją jonów paramagnetycznych i ich wpływ na czas relaksacji T_1 [46]



Rysunek 4.5. Przykładowe obrazy diagnostyczne, po zastosowaniu środków kontrastowych w celu uwidocznienia zmian (powiększone fragmenty) [39]

Rozdział 5

Materiały

5.1 Reaktywne formy tlenu (ROS)

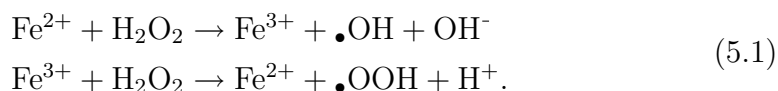
W każdej komórce zachodzą procesy, którym towarzyszy tzw. utlenianie i redukcja cząsteczek. Reakcje te prowadzić mogą do powstania wolnych rodników, które z kolei oddziaływać mogą z kluczowymi makromolekułami obecnymi w komórkach organizmów: białkami, lipidami i kwasami nukleinowymi. Utlenienie tych biomolekuł może wiązać się z uszkodzeniem ich struktury i zaburzeniem pełnionej funkcji, a przez to przyczyniać się do powstania różnorodnych stanów chorobowych [49]. Wolne rodniki są wrogami zdrowia i urody, przyspieszając procesy starzenia się organizmu. To atomy lub cząsteczki zdolne do samodzielnego istnienia, mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów. W literaturze spotykamy się z określeniem „reaktywne formy tlenu” (ROS - reactive oxygen species). Do ROS należą: tlen singletowy, ozon, rodnik wodorotlenkowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, kwas nadtlendioazotowy i jego anion. Atak ROS na części komórek całego organizmu dotyczy struktur DNA, błon komórkowych, lipidów krwi i tkanek, mitochondriów i lizosomów, czyli fundamentalnych struktur każdej komórki [50], [51], [52]. ROS posiadają własności paramagnetyczne oraz bardzo dużą aktywność chemiczną. Z punktu widzenia NMR, ROS skracają czasy relaksacji w badanych układach biologicznych.

Zaburzenie równowagi pomiędzy antyoksydantami a utleniaczami na rzecz utleniaczy, jakimi są reaktywne formy tlenu i wolnorodnikowe produkty reakcji ROS, prowadzi w organizmie do stresu oksydacyjnego, wyrządzającego komórkom wiele szkód, i dezaktywacji pełnionych funkcji [53]. Reaktywne formy tlenu, a w szczególności rodnik hydroksylowy, wchodzi w reakcje ze wszystkimi elementami budulcowymi molekuł biologicznych. Produkcja wolnych rodników następuje w wieloraki sposób. Główną rolę odgrywa tlen, który niezbędny jest w procesach metabolizmu, takich jak oddychanie i stres tlenowy [54],[55]. Może to być spowodowane przez promieniowanie jonizujące (UV), zanieczyszczenia, żywność, co ma bezpośredni wpływ na DNA, białka i tłuszcze. Wpływa on również na pracę mózgu (hiperbaryczne efekty tlenowe, choroba Parkinsona, reakcje neurotoksyczne), erytrocyty (anemia), zmiany nowotworowe i wiele innych [56], [57].

Organizmy żywe wytworzyły mechanizmy obronne. Wyróżniamy główne dwa:

- endogenne enzymy antyutleniające (dysmutaza antyoksydacyjna, katalaza, peroksydaza glutationowa, melatonina),
- egzogenne antyutleniacze - wprowadzone poprzez stosowaną dietę, np. rozpuszczalna w wodzie witamina C, witamina A i D.

Bardzo duże znaczenie ma również, występujący w wyniku pewnych reakcji w organizmie, nadtlenek wodoru. W przeprowadzonych badaniach układów biologicznych, w których obecne są anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru, a także jony metali przejściowych, na procesy relaksacji NMR istotny wpływ ma reakcja Fentona, w wyniku której powstaje rodnik hydroksylowy [58], [59], [60]. W szczególności reakcja Fentona zachodzi w obecności jonów żelaza:



Składa się ona z dwóch zależnych od siebie etapów: pierwszego, reakcji właściwej, gdzie nadtlenek wodoru oddziałuje z jonami żelazowymi i ulega redukcji. Wówczas utleniony jon żelaza Fe^{3+} zostaje zredukowany do Fe^{2+} w reakcji z rodnikiem ponadtlenkowym. Oba etapy opisuje reakcja Habera-Weissa, anionorodnika ponadtlenkowego z nadtlenkiem wodoru, która katalizowana jest przez jony żelaza:



Reakcja ta jest bardzo czuła i do jej skatalizowania wystarczą bardzo niewielkie ilości jonów metali. W badanym przez nas osoczu krwi występują w sposób naturalny zarówno jony żelaza (II), jak i miedzi (I), które odgrywają istotną rolę podczas inicjowania procesu reakcji Fentona. Jak zostanie pokazane w rozdziale 7, obecność ROS zmienia czasy relaksacji w badanych próbkach biologicznych.

5.1.1 Tlen

Tlen jako pierwiastek występuje w dwóch izotopach. Izotop ^{17}O o spinie $I = 5/2$ i abundancji 0,038 jest paramagnetykiem i izotopem rezonansowym. W przyrodzie tlen występuje w kilku postaciach: w postaci molekularnej jako ozon O_3 i O_2 , zaś w organizmie w postaci atomowej. Tlen molekularny nie jest zdolny do działania. Dzięki procesom biochemicznym przekształca się on w tlen atomowy, czyniąc go ogniwem reakcji zarówno ozonu, jak i nadtlenu wodoru. W organizmie trwa ciągły proces tworzenia w komórkach nadtlenu wodoru H_2O_2 i ozonu O_3 z wody H_2O i tlenu cząsteczkowego O_2 . Wydzielają one w procesie rozpadu tlen atomowy, który jest podstawą wszelkich reakcji bioenergetycznych i jednocześnie silnym utleniaczem. Dlatego występujący w organizmie nadtlenek wodoru H_2O_2 należy także do tzw. aktywnych form tlenu, które inicjują procesy utleniania [61].

5.1.2 H_2O_2

Nadtlenek wodoru jest bezwonną, bezbarwną cieczą (w dużych stężeniach lekko niebieskiego koloru). Jest związkiem nietrwałym dobrze rozpuszczającym się w wodzie. Jako silny utleniacz znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. W wysokim stężeniu nadtlenek wodoru jest substancją silnie wybuchową. Z tego powodu nie wolno posiadać płynów, wsiadając do samolotu.

Nadtlenek wodoru występuje w organizmie i uczestniczy w bioorganicznych procesach przemiany materii [54], [61]. W trakcie rozkładu produkuje on tlen atomowy. Powodowany przez H_2O_2 proces utleniania jest reakcją chemiczną przenoszącą elektrony z substancji utlenianej do czynnika utleniania [58], [61]. W zainicjowanych procesach utleniania przenoszone są elektrony wydzielone przy pomocy nadtlenku wodoru i ozonu. W ten sposób powstają tzw. wolne rodniki, które mają między innymi silne właściwości przeciwbakteryjne. Własność tę wykorzystuje się powszechnie do odkażania ran, używając 3% wodnego roztworu H_2O_2 , zwanego potocznie wodą utlenioną. Po polaniu nim rany i zetknięciu z krwią, która zawiera żelazo, gwałtownie powstają pęcherzyki tlenu. Reakcja ta nazywa się reakcją Habera-Fentona i jest ona katalizowana przez jony ciężkich metali.

Jak wspomniano wyżej, nadtlenek wodoru (H_2O_2) występuje również w organizmie i uczestniczy w bioorganicznych procesach przemiany materii. Wytwarzany jest on przez leukocyty i granulocyty układu immunologicznego, które stanowią mechanizm obronny organizmu. Innym źródłem H_2O_2 w organizmie może być bezpośrednio efekt promieniowania jonizującego. Podczas radiolizy napromieniowana woda w dużej mierze przekształca się w rodniki hydroksylowe i wodorowe, a wytwarzanie się wolnych rodników rozpoczyna się po czasie krótszym niż 10^{-10} sekundy. Rodniki te odgrywają dominującą rolę w powstawaniu zmian na poziomie molekularnym w cząsteczkach biologicznych. Rozpuszczony tlen cząsteczkowy sprzyja tworzeniu się również rodników hydroperoksydowych, które biorą udział w tworzeniu nadtlenku wodoru [62].

5.2 Osocze i surowica krwi

Osocze krwi jest płynną istotą międzykomórkową i stanowi ok. 55% objętości krwi. W jego skład wchodzi [9], [63], [64]:

- woda, 90-95%,
- białka, w tym:
 - albuminy,
 - globuliny - mukoproteiny, glikoproteiny, lipoproteiny, globuliny wiążące jony metali (transferyna (1,8-3,3 g/l) i ceruloplazmina (0,18-0,4 g/l)), gammaglobuliny,
 - fibrynogen,
- sole mineralne,
- kationy i aniony (jony sodu i potasu oraz chloru i węgla),
- składniki pozabiałkowe:
 - węglowodany oraz produkty ich przemiany (glukoza (3,9-6,2 mmol/l), kwas mlekowy (0,4-1,7 mmol/l)),
 - produkty przemiany białkowej: m.in. aminokwasy (30-55 mg/l), amoniak (23,6-41,3 mmol/l),
 - produkty przemiany hemu: bilirubina (0,7-6,8 $\mu\text{mol/l}$), urobilino-gen,
 - składniki przemiany wewnątrzkomórkowej, np. kwas moczowy (178-386 $\mu\text{mol/l}$), kreatynina (62-133 $\mu\text{mol/l}$),
- pozostałość (5-8 g/l), wraz z białkami tworzą lipoproteiny:
 - cholesterol,
 - fosfolipidy,

- triacyloglicerole,
- witaminy A,D,E,K,
- hormony steroidowe,
- wolne kwasy tłuszczowe.

Skład osocza jest stosunkowo stały, może się zmieniać w zależności od stanu organizmu. Surowica krwi jest pochodną osocza krwi, z której oddzielono włókna fibrynogenu. Włókna te, pod wpływem czynnika z zewnątrz, podlegają skręceniu, tworząc skrzep. Dwa główne składniki białkowe surowicy to albuminy i globuliny. Albuminy odgrywają głównie rolę w procesach metabolicznych wyższego ustroju i wykazują dużą aktywność antygenową, zaś globuliny zapewniają odporność humoralną ustroju.

Dodatkowo, w osoczu mogą znajdować się również niezwiązane jony metali przejściowych, takie jak jony żelaza uwolnione z ferrytyny, katalizujące reakcję Fentona. Występują również enzymy antyoksydacyjne (EC-SOD, katalaza, GPx), jednakże ich aktywność jest niska, gdyż ich stężenia są bardzo małe. W większych stężeniach występują za to antyoksydanty niskocząsteczkowe, takie jak:

- askorbinian 30-150 $\mu\text{mol/l}$,
- glutation 1-2 $\mu\text{mol/l}$,
- kwas moczowy 160-450 $\mu\text{mol/l}$,
- bilirubina 5-20 $\mu\text{mol/l}$,
- glukoza 4500 $\mu\text{mol/l}$,
- α -tokoferol 15-40 $\mu\text{mol/l}$,
- β -tokoferol 3-5 $\mu\text{mol/l}$,
- ubihydrochinon 0,4-1 $\mu\text{mol/l}$.

W naszych badaniach układem biologicznym były osocza krwi ludzkiej, otrzymane *ex vivo*, oraz osocze królicze otrzymane przez rozpuszczenie zakupionego liofilizatu w wodzie destylowanej.

5.2.1 Osocze krwi króliczej

Osocze królicze otrzymywane jest z krwi dorosłych, zdrowych królików pobranej w obecności antykoagulantu (cytrynianu). Po rozpuszczeniu w wodzie, dwukrotnie destylowanej i dejonizowanej, posiada ono właściwości świeżego osocza i odpowiada płynnemu osoczowi króliczemu.

5.2.2 Albumina

Albumina jest białkiem globularnym występującym m.in. w jajach, jako albumina jaja (EWA), lub krwi bydlęcej (BSA). W surowicy stanowi ok. 60% białka całkowitego. Syntetyzowana jest w wątrobie (15 g/dobę), a czas półtrwania wynosi około 17 dni. Albumina jest odpowiedzialna za utrzymanie objętości krwi krążącej. Jest białkiem o dużej pojemności i niskim powinowactwie wiązania jonów (Ca, Mg, Zn) oraz różnych metabolitów słabo rozpuszczalnych w wodzie (kwasy tłuszczowe, bilirubina, kwas moczowy). Wiąże hormony (T4, T3, kortyzol), leki (salicylany, barbiturany, sulfonamidy, antybiotyki) i aminokwasy [65].

5.3 Jony paramagnetyczne

Jony paramagnetyczne są obecne w układach biologicznych, a zarazem występują w organizmie człowieka w postaci mikroelementów. Odgrywają one bardzo znaczącą rolę w wielu reakcjach biochemicznych warunkujących prawidłowe funkcjonowanie organizmu [7], [66].

5.3.1 Miedź

W ludzkim organizmie występuje naturalnie, jako mikroelement w ilości zazwyczaj około 80 mg. Fizjologiczna zawartość miedzi w osoczu krwi wynosi ok. 70-140 $\mu\text{g/ml}$ u mężczyzn oraz 76-152 $\mu\text{g/ml}$ u kobiet (po przeliczeniu jest rzędu $1,2 - 2,5 \cdot 10^{-5}$ mola/l). Do organizmu wprowadzana jest ona drogą pokarmową, a następnie wchłaniana w żołądku i górnych jelitach. W krwi jest wychwytywana przez albuminę, białko osocza odpowiedzialne m.in. za jej transport. Po dotarciu do wątroby jest w niej pochłaniana, a następnie wiązana z ceruloplazminą, która uwalniana jest do krwi. W surowicy ludzkiej krwi nie obserwuje się obecności wolnych jonów miedzi, gdyż około 90% związane jest z ceruloplazminą, a pozostałe 10% z albuminą lub aminokwasami. Ale nawet niewiele większa ilość wolnych jonów miedzi w osoczu skraca czasy relaksacji T_1 i T_2 , co może być wykorzystane do badań NMR nad ich obecnością [67].

Zła gospodarka i zły metabolizm miedzi powoduje dysfunkcję niektórych organów w wyniku pewnych schorzeń (m.in. choroba Wilsona).

Choroba Wilsona

Jest to zaburzenie metabolizmu miedzi w organizmie, dziedziczone jako autosomalna cecha recesywna. Epidemiologia choroby wynosi 1:30000 żywych narodzin, jest to więc rzadko spotykane schorzenie, choć ostatnio wykrywane coraz częściej. Wyróżniającą się cechą choroby Wilsona jest odkładanie się złogów miedzi w różnych tkankach, głównie w mózgu, wątrobie, nerkach i rogówce oczu.

Za chorobę Wilsona odpowiedzialny jest brak lub redukcja ekspresji genu ATP7b znajdującego się w 13 chromosomie [68]. Gen ten odpowiada za kodowanie białka transportującego metale o charakterze ATP-azy, które uczestniczy w procesie transportowania i wydalania miedzi w obrębie hepatocytów, tworząc między innymi ceruloplazminę, która trafia do obiegu krwi. Wrodzone zaburzenia ekspresji genu ATP7b prowadzą więc do zmniejszenia wydalania miedzi z komórek wątrobowych oraz do zmniejszonej produkcji ceru-



Rysunek 5.1. Charakterystyczne objawy choroby Wilsona a) „miś” panda na obrazie MR w mózgu [67], b) pierścień Kaysera-Fleischera

loplazminy. W zależności od charakteru dysfunkcji genu *ATP7b* choroba przebiegać może w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku złogi miedzi zmagazynowane w wątrobie prowadzą do wczesnej marskości wątroby w pierwszej dekadzie życia, natomiast w drugim przypadku miedź zmagazynowana w nerwach i mózgu prowadzi do degeneracji neurologicznych. W chorobie Wilsona miedź wydostaje się z hepatocytów do obiegu krwi poprzez nekrozę komórek wątrobowych spowodowaną wytwarzaniem przez miedź wolnych rodników, które z kolei prowadzą do szybkiego uszkodzenia mitochondriów. Złogi miedzi w mózgu prowadzą do zaburzeń neuropsychiatrycznych i upośledzenia fizycznego, dlatego ważne jest jej prawidłowe diagnozowanie [69]. Jest to choroba o złym rokowaniu, gdyż nie leczona prowadzi ostatecznie do zgonu. Zwiększoną koncentrację miedzi możemy także obserwować za pomocą obrazów MRI mózgu w postaci tzw. „twarzy misia pandy” (Rys. 5.1a), bądź w postaci złotego pierścienia wokół tęczówki oka, tzw. „pierścień Kaysera-Fleischera”, (Rys. 5.1b) [70].

Stosowana terapia choroby Wilsona polega na dożywotnim zażywaniu zestawu D-penicylaminy w ilości około 1 g/dobę w celu chelatowania swobodnych jonów miedzi, siarczanu potasu w ilości 20 mg/dobę w celu zmniejszenia wchłaniania miedzi w organizmie oraz stosowaniu diety ubogiej w miedź. Do diagnostyki choroby Wilsona najczęściej stosuje się wciąż metodę spektrofotometryczną, mierzącą całkowite stężenie jonów miedzi w surowicy krwi (łącznie z miedzią związaną). Metody relaksacyjne i tomograficzne NMR oce-

niające ilość swobodnych jonów miedzi mogą stać się w tej kwestii metodami uzupełniającymi.

5.3.2 Żelazo

Żelazo jest jednym z najważniejszych mikroelementów w organizmie, gdyż jest niezbędne do produkcji i funkcjonowania czerwonych krwinek. Ilość żelaza w organizmie dorosłego człowieka wynosi około 1200 mg dla mężczyzny i 1000 mg dla kobiety. Fizjologiczne stężenie żelaza w surowicy krwi zawiera się w granicach 6,6-28,3 $\mu\text{mol/l}$. Większość żelaza przyjmowanego z pokarmem występuje w formie utlenionej Fe^{3+} . Aby ułatwić wchłanianie następuje redukcja do formy Fe^{2+} , dzięki kwasowi askorbinowemu (witaminie C). Następnie jony Fe^{2+} w krwi są ponownie utleniane do Fe^{3+} przez ceruloplazminę, aby mogły zostać dalej związane przez transferrinę. W warunkach normalnych wykorzystane jest około 30% możliwości wiązania transferryny. Dzieje się tak dlatego, aby w przypadku pojawienia się nadmiaru jonów żelaza, mogły one zostać natychmiast wychwycone. Około 65% żelaza w organizmie znajduje się w hemoglobinie, 10% w enzymach, mioglobinie i transferrynie. Pozostałe 25% jest zmagazynowane w białkach magazynujących wewnątrzkomórkowych, jako ferrytyna i hemosyderyna, które występują głównie w wątrobie, śledzionie, szpiku kostnym oraz osoczu krwi [71], [72].

5.3.3 Mangan

Mangan jest także pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Ciało ludzkie zawiera około 10 mg manganu, przechowywanego głównie w wątrobie i nerkach oraz w syntetazie glutaminowej w astrocytach w mózgu [73]. Za wartości prawidłowe we krwi przyjmuje się ilości manganu nieprzekraczające 10 $\mu\text{g/l}$. Wspomaga on wiele procesów w organizmie, przez co zwany jest „mikrolokomotywą procesów życiowych”, gdyż jest spotykany w niemal wszystkich rodzajach enzymów. Najlepiej znanym enzymem zawierającym mangan jest arginaza, biorąca udział w cyklu moczniko-

wym, oraz dysmutaza ponadtlenkowa Mn-SOD spotykana w mitochondriach, gdzie osłabia destruktywny wpływ wolnych rodników ponadtlenkowych [74]. Mangan obecny jest również w enzymach odpowiedzialnych za metabolizm witaminy C w organizmie.

Manganizm

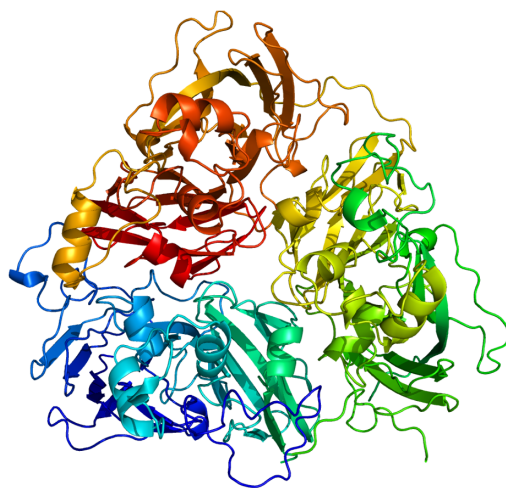
Manganizm jest chorobą polegającą na zatruciu organizmu przez nadmiar jonów manganu. Stan taki może doprowadzić do schorzenia neurologicznego podobnego do choroby Parkinsona, a w niektórych przypadkach do marskości wątroby [75]. Stąd manganizm znany jest także pod nazwą „parkinsonizm wywołany manganem”. Objawy to: zaburzenia mowy, chodu, przodopochylenie tułowia, drżenie spoczynkowe, sztywność mięśni i trudności w inicjacji ruchów dowolnych. Nadmiar manganu tworzy złogi w obszarze gałki bladej kresomózgowia oraz istoty czarnej śródmózgowia, co prowadzi do ww. dysfunkcji. Charakterystyczną cechą pozwalającą na zdiagnozowanie manganizmu może być brak poprawy stanu zdrowia w odpowiedzi na lewodopę, stosowaną w przypadkach choroby Parkinsona. Manganizm jest bardzo rzadko spotykaną chorobą - brak danych epidemiologicznych. Może on występować u osób pracujących w warunkach ciągłej obecności manganu, np. w kopalniach bądź hutach, lub u osób uzależnionych od narkotyków, stosujących dożylnie zastrzyki zawierające metylokatynon, którego produkcja wymaga katalizatora - nadmanganianu potasu (manganian(VII) potasu) KMnO_4 . Ostatnie badania pokazały znaczny przyrost osób chorych na manganizm w krajach byłego Związku Radzieckiego. Jest to spowodowane faktem długoletniego używania w tych krajach preparatu antydepresyjnego Ephedron zawierającego metylokatynon produkowany przy użyciu nadmanganianu potasu.

Oczywistym następstwem zatrucia manganem jest występowanie zwiększonego stężenia wolnych jonów manganu w osoczu krwi. Uzasadnione więc mogą być badania osocza krwi metodami relaksometrycznymi NMR.

5.4 Chelaty

Chelatacja to neutralizowanie szkodliwych związków metali ciężkich przez ich wydalenie czy kompleksowanie prowadzące do utraty ich toksycznych właściwości. W organizmie jony żelaza i miedzi są związane głównie poprzez białka, takie jak ceruloplazmina, ferrytyna i transferyna. Są to naturalne środki obronne organizmu przed powstaniem rodnika hydroksylowego. Poprzez silne wiązanie metali przejściowych organizmy zapobiegają zachodzeniu reakcji Fentona [76].

- Ceruloplazmina (Rys. 5.2) to białko enzymatyczne pełniące główną rolę w metabolizmie miedzi w organizmie, jak również odgrywające ważną rolę w metabolizmie żelaza. Ceruloplazmina jest syntetyzowana w wątrobie, jej masa molekularna wynosi 151 kDa. Normalne stężenie ceruloplazminy we krwi wynosi 200-400 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Może zawierać 6-8 atomów miedzi w swojej strukturze, dzięki temu wiąże około 90% miedzi w osoczu krwi. Nie można jej nazwać białkiem transportującym, jako że nie oddaje miedzi swobodnie ani nie wiąże dodatkowych jej ilości. Aby pozyskać miedź, ceruloplazmina musi być zdegradowana po przeniknięciu do wnętrza komórki.



Rysunek 5.2. Drobiną ceruloplazminy [77]

- Ferrytyna jest to cząsteczka białka przyłączająca atomy żelaza. Cząsteczka ta nie jest w pełni wysycona żelazem, jedynie w 1/5, co daje możliwość ochrony osocza przed wolnymi jonami żelaza.
- Transferyna jest to również białko osocza krwi wiążące atomy żelaza. Podobnie do ferrytyny jest wysycone żelazem w 1/5, co daje możliwość zarówno wiązania wolnego żelaza pojawiającego się w osoczu, jak i żelaza uwolnionego przez ferrytynę.

5.4.1 D-penicylamina

Pierwszym z dwóch stosowanych w naszych badaniach środków chelatujących była D-penicylamina (3-merkato-D-walina), która jest lekiem stosowanym w terapii choroby Wilsona. D-penicylamina o wzorze sumarycznym $C_5H_{11}NO_2S$ i masie molekularnej 149,21 Da jest to organiczny związek chemiczny. Jest ona chelatem wielu metali ciężkich, takich jak Cu, As, Hg, Pb, Au, Fe, Ca, i Zn. Trwały kompleks D-pen z metalem jest rozpuszczalny w wodzie, zaś wpływ paramagnetyczny jonów skracających czasy relaksacji jest ekranowany przez ten chelat [67]. Po podaniu, w organizmie ludzkim D-pen krąży we krwi i jest wydalana z moczem, co jest powszechną metodą na oczyszczenie organizmu z metali ciężkich. Sama D-pen jest jednak substancją toksyczną, a jej nadmiar może prowadzić do stanów chorobowych wątroby i nerek, leukopenii (obniżenie liczby leukocytów w organizmie) lub owrzodzeń skóry.

5.4.2 Ryboflawina

Ryboflawina jest witaminą z grupy witamin B. Jej masa molekularna wynosi 376,36 Da, a wzór sumaryczny to $C_{17}H_{20}N_4O_6$. W organizmie pełni liczne role w metabolizmie tłuszczów, ketonów, węglowodorów i białek. Bierze również udział w procesach utleniania i redukcji. Ryboflawina występuje w wielu produktach spożywczych, a dzienne zapotrzebowanie organizmu wynosi około 1,5 mg. Klinicznie ryboflawina stosowana jest jako dodatek w fototerapii,

jako że rozpada się pod wpływem naświetlania światłem z zakresu UV. Posiada również, nie do końca poznane, własności chelatacji niektórych metali. Zatrucie ryboflawiną nie jest możliwe, nawet przy spożyciu dużego nadmiaru tej witaminy, będzie ona bardzo szybko wydalana z moczem w ilościach proporcjonalnych do spożycia. Fakt ten czyni z ryboflawiny dobry obiekt do badań na żywych organizmach. W pracy wykorzystana zostanie jako alternatywny chelat jonów Cu.

5.5 Antyoksydanty

Wchodząc w reakcje ze związkami utleniającymi, antyoksydanty chronią i opóźniają procesy utleniania lipidów i białek. Antyoksydanty reagują zarówno z reaktywnymi formami tlenu, jak i z produktami utlenienia, co przyczynia się do redukcji reakcji wolnorodnikowych, tym samym hamując procesy starzenia. Ze względu na konieczność użycia roztworu, w pracy wykorzystano tylko dwa antyoksydanty dobrze rozpuszczalne w wodzie.

5.5.1 Witamina C

Witamina C (kwas askorbinowy) o wzorze sumarycznym $C_6H_8O_6$ i masie 176,13 Da, bierze udział w wielu istotnych reakcjach biochemicznych [58], [78]. Między innymi:

- jest kofaktorem w syntezie kolagenu, czyli w procesie tworzenia włókien kolagenowych,
- utrzymuje w stanie zredukowanym żelazo wbudowane w centrum aktywne enzymów katalizujących reakcje hydroksylacji aminokwasów. Niedobór witaminy C i nieprawidłowości w syntezie kolagenu prowadzą do degeneracji naczyń krwionośnych,
- bierze udział w syntezie aminokwasu karnityny, która transportuje kwasy tłuszczowe do mitochondriów, gdzie ulegają spaleni z wytworzeniem

energii, a w odwrotnym kierunku wydala do cytoplazmy reszty kwasów organicznych. Odczucie ogólnego zmęczenia towarzyszące skorbutowi może być spowodowane zaburzeniem w syntezie karnityny i obniżeniem zdolności produkowania energii,

- katalizuje szereg reakcji enzymatycznych - utrzymuje w formie zredukowanej metale przejściowe wchodzące w skład centrów aktywnych enzymów hydrolitycznych,
- stymuluje system immunologiczny - intensywnie pobierana przez białe ciała krwi podczas infekcji bakteryjnej działa jako przeciwutleniacz, osłaniając neutrofile przed szkodliwym działaniem ich własnej broni, czyli wolnymi rodnikami,
- ułatwia wchłanianie jonów żelaza w jelicie cienkim, redukując nierozpuszczalne jony żelazawe Fe^{3+} do jonów żelazowych Fe^{2+} , przyswajalnych przez organizm. Przy niedostatecznej ilości witaminy C przyswajana jest niewystarczająca ilość żelaza do produkcji hemoglobiny, co prowadzi do anemii,
- jako donor elektronów przerywa łańcuch reakcji wolnorodnikowych. Po oddaniu elektronów przechodzi w rodnik askorbylowy, związek trwały i mało reaktywny. Z kolei rodnik askorbylowy oddaje drugi elektron, przechodząc w dehydroaskorbinian - cząsteczkę mało trwałą i ulegającą rozpadowi, o ile nie zostanie stosunkowo szybko wychwycona.

Witaminy C ubywa z organizmu i musi być stale dostarczana z zewnątrz. Dehydroaskorbinian może zostać przywrócony do witaminy C na drodze enzymatycznej, pobierając elektrony z glutationu. W dużych stężeniach askorbinian wykazuje właściwości antyoksydacyjne, natomiast w małych - właściwości prooksydacyjne, redukując jony metali przejściowych. Ta właściwość, w obecności wolnych jonów metali, może stymulować reakcję Fentona, co ma istotne znaczenie np. w przypadku zatrucia metalami.

5.5.2 Glutation

Glutation jest organicznym związkiem chemicznym, o wzorze sumarycznym $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ i masie molekularnej 307,32 Da. Jest to tripeptyd o właściwościach przeciwutleniających, zbudowany z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Występuje we wszystkich organizmach roślinnych i zwierzęcych (poza organizmem jest nietrwały), jest najbardziej rozpowszechnionym i najobfitszym tiolem wewnątrzkomórkowym (składnikiem zawierającym siarkę), występującym w komórkach ssaków oraz drobnocząsteczkowym tripeptydem budującym żywe komórki. Jego silne właściwości antyoksydacyjne są powszechnie znane. W formie zredukowanej chroni komórki przed szkodliwymi działaniami ROS [79], [80], [81]:

- reaguje z wolnymi rodnikami tlenowymi,
- reaguje z wolnymi rodnikami substancji organicznych i przywraca je do postaci zredukowanej,
- utrzymuje grupy tiolowe białek w stanie zredukowanym poprzez odtwierzanie tych, które uległy utlenieniu do wiązań disiarczkowych lub grup sulfonowych,
- bierze udział w detoksykacji ksenobiotyków, endogennych toksyn, leków i innych szkodliwych substancji elektrofilowych poprzez tworzenie S-koniugatów, które są następnie wydalone z komórek,
- chelatuje niektóre jony metali,
- utrzymuje prawidłowy potencjał redoksowy komórek.

Rozdział 6

Metody badawcze i opis eksperymentów

W pracy zaprezentowano głównie wyniki pomiarów relaksacyjnych czasów T_1 , T_2 i $T_{1\rho}$ w układach biologicznych. Pracę eksperymentalną przeprowadzono na dwóch systemach NMR, w większości w Pracowni Zakładu Radiospektroskopii Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego. Druga część pomiarów przeprowadzona była w laboratoriach Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie - Forschungs GmbH w Getyndze w Niemczech, gdzie wykonano dodatkowe pomiary relaksacyjne oraz otrzymano obrazy tomograficzne MR.

Wszystkie otrzymane dane były opracowywane przy pomocy programu Origin.

6.1 Bruker Minispec 60 MHz

Znajdujący się w Pracowni Zakładu Radiospektroskopii Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie spektrometr firmy Bruker typu Minispec pracuje przy częstotliwości rezonansowej dla protonów 60 MHz (Rys. C.1), co odpowiada stałemu polu magnetycznemu równemu 1,41 T. Składa się on z następujących elementów:

- elektromagnesu z zasilaczem stabilizowanym, wytwarzającym jednorodne, stałe pole magnetyczne $\vec{B}_0$,
- generatora wysokiej częstotliwości z synteizatorem częstotliwości i wzmacniaczem mocy,
- głowicy elektromagnesu z cewką nadawczo-odbiorczą, w której umieszczano próbki,
- układu detekcyjnego.

Spektrometr obsługiwany jest przez komputer ze specjalnym oprogramowaniem „The Minispec” firmy Bruker.

Pomiary relaksacyjne mają bardzo szerokie zastosowanie w tomografii MR do obrazowania ciała ludzkiego. Ze względu na wartość zastosowanego pola $\vec{B}_0$, wyniki uzyskane na spektrometrze Minispec mogą być wykorzystane jako wsparcie interpretacji otrzymanych obrazów. Najczęściej stosowane systemy MRI przeważnie działają w polu 1,5 T, z tego też powodu nasze badania *ex vivo* o tej samej częstotliwości rezonansowej są użyteczne i dają możliwość tańszych badań, nie okupując czasu pracy tomografów MR. Powszechnie wiadomo, że czasy relaksacji są zależne od częstotliwości rezonansu. Nasz system gwarantuje, że uzyskane wyniki mogą być wprost porównywane z wartościami uzyskanymi przez tomografy MR.

6.1.1 Metody badawcze

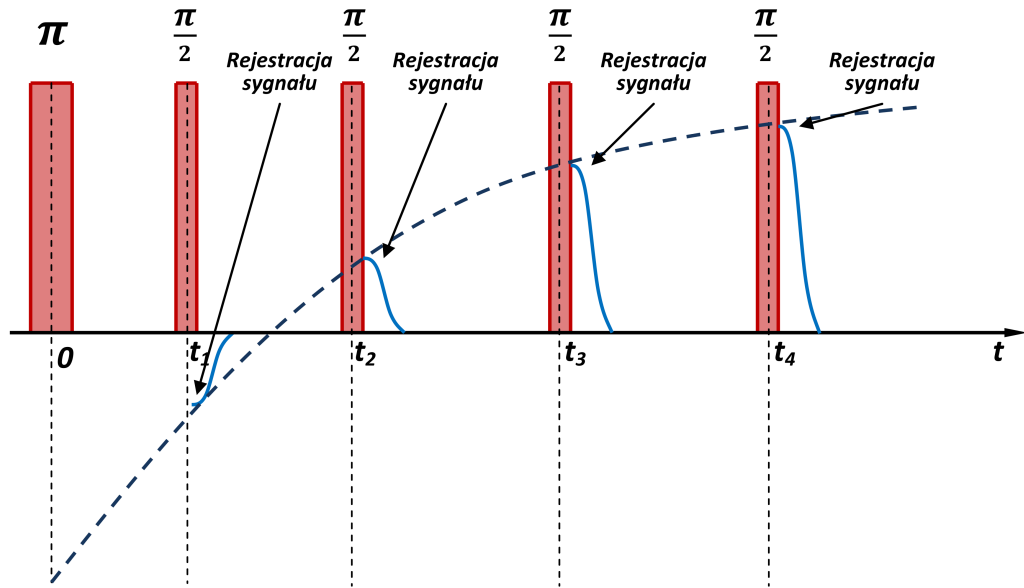
Do określenia czasów relaksacji korzystano z różnych sekwencji pomiarowych, które sterowane były za pomocą komputera, programem „The Minispec”. Przy jego użyciu, zbierano dane pomiarowe oraz dokonywano ich analizy numerycznej.

6.1.2 Pomiary czasów T_1

Do pomiarów czasów relaksacji spinowo-sieciowej podstawowymi metodami są: Inversion Recovery i Saturation Recovery. W pracy wykorzystano głów-

nie metodę inwersyjną (IR) (Rys.6.1). Polega ona na zastosowaniu sekwencji impulsów ($\pi - t - \pi/2$ —FID). Po podaniu odwracającego impulsu π podłużne namagnesowanie powraca do swojej wartości równowagowej zgodnie z wzorem

$$M_z(t) = M_0(1 - 2e^{-t/T_1}). \quad (6.1)$$



Rysunek 6.1. Schemat sekwencji pomiarowej T_1 IR

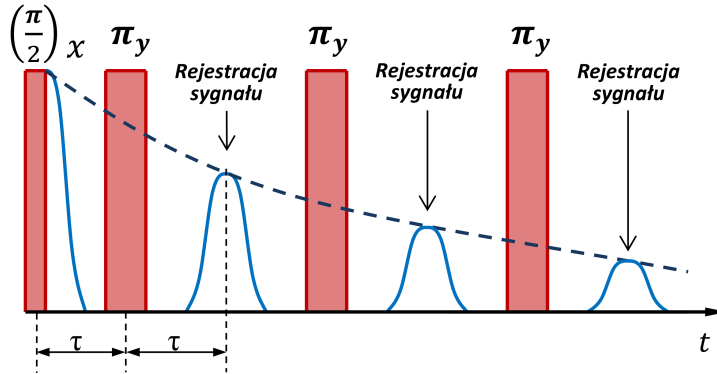
Wartość $M_z(t)$ odczytuje się, mierząc amplitudę FID po impulsie $\pi/2$, który zmienia M_z na $M_\perp$. Impuls $\pi/2$ jest podawany w zmieniającym czasie t po impulsie π . Wielokrotny pomiar wartości $M_z(t)$ dla różnych t , daje możliwość odtworzenia eksponenty, z której wyznacza się parametry M_0 i T_1 . Po czasie $t = \ln(2) T_1 = 0,693 T_1$ namagnesowanie przechodzi przez tzw. punkt zerowy, dzięki czemu możemy szybko oszacować czas relaksacji T_1 . W tej metodzie istotne jest właściwe dobranie długości impulsu π . Niedogodnością jej jest długi czas pomiaru, gdyż poszczególne wartości $M_z(t)$ odczytywane mogą być dopiero po upływie czasu repetycji $T_r = 5T_1$, co przy badaniu roztworów wodnych jest dość czasochłonne.

6.1.3 Pomiary czasów T_2

Czasy relaksacji spinowo - spinowej T_2 mierzono, stosując metodę impulsową CPMG (Carra-Purcella-Meibooma-Gilla) (Rys. 6.2). Sekwencja ta składa się z wielu impulsów π , które następują jeden za drugim w bardzo krótkich odstępach czasu 2τ . Pomiedzy impulsami π występują kolejne sygnały echa spinowego. Obwiednia tych ech zależy eksponencjalnie od czasu zgodnie ze wzorem [13]:

$$|M_{\perp}(t)| = M_0 e^{\frac{t}{T_2} - \frac{\gamma^2 G^2 D}{12f^2} t}, \quad (6.2)$$

gdzie $f = n/t = 1/2\tau$, jest liczbą ech w jednostce czasu, G to wartość gradientu pola magnetycznego, D to współczynnik dyfuzji. Jeśli jednorodność pola jest dobra, drugi człon wykładnika eksponenty można pominąć i założyć, że zanik magnetyzacji zależy tylko od T_2 .



Rysunek 6.2. Schemat sekwencji pomiarowej T_2 CPMG

Metoda dyspersji T_2 CPMG to pomiar zależności T_2 od czasu 2τ . Ostatnio znalazła ona zastosowanie także w badaniach układów biologicznych (roztworów białek), a w szczególności w ocenie szybkości wymiany chemicznej protonów [36], [44].

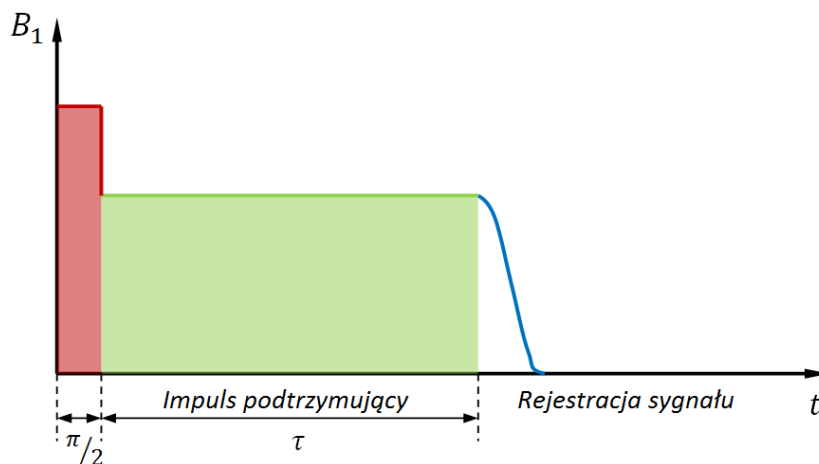
6.1.4 Pomiary czasów $T_{1\rho}$

W celu wyznaczenia czasu relaksacji w wirującym układzie współrzędnych $T_{1\rho}$ stosuje się sekwencję impulsów przedstawioną na rysunku 6.1. Zanik ma-

gnetyzacji w laboratoryjnym układzie współrzędnych opisany jest zależnością:

$$M_x = M_0 e^{-\frac{t}{T_{1\rho}}} \cos(\omega t), \quad (6.3)$$

gdzie $\omega = \omega_0 = \gamma B_0$.



Rysunek 6.3. Schemat sekwencji pomiarowej $T_{1\rho}$

Impuls podtrzymujący jest skierowany prostopadle do $\pi/2$ i $\vec{B}_0$, dlatego po jego wyłączeniu obserwujemy FID. Wysokość sygnału FID zanika eksponencjalnie, zgodnie ze wzorem 6.3, z czego po dopasowaniu wyznaczamy $T_{1\rho}$. Niedogodnością metody jest ogrzewanie się próbki w czasie trwania impulsu podtrzymującego, o czym należy pamiętać i stosować termostabilizację. Zmieniając wysokość impulsu podtrzymującego, dokonuje się zmiany pola magnetycznego $\vec{B}_1$, w którym zachodzi relaksacja, tym sposobem wyznacza się profile dyspersji (patrz rozdział 3).

6.1.5 Preparatyka próbek

Wszystkie badania przeprowadzone były *in vitro*. W fiolkach o średnicy 5 mm, za pomocą pipety, umieszczano ok. 1 cm³ badanej substancji (patrz Rys. 7.37). Pomiaru przeprowadzane były w stabilizowanej temperaturze pokojowej, wynoszącej zwykle +23°C. Celem zminimalizowania ryzyka zanieczyszczeń jonami paramagnetycznymi wewnątrz szkła, fiołki były myte we-

dług następującej procedury: w pierwszej kolejności używano zwykłego detergentu, po wysuszeniu zalewane były mieszaniną kwasów, tzw. chromianką w stosunku 1:1 i pozostawione na jedną dobę. Następnie zalewane były EDTA i pozostawiane na kolejną dobę. Na końcu płukano je wielokrotnie (co najmniej 5 razy) wodą destylowaną i suszono w piecu. Tak przygotowane fiołki gotowe były do użycia.

Używane do pomiarów roztwory nadtlenu wodoru sporządzone były z koncentratów: 35% zakupionego w firmie Aldrich oraz 30% uzyskanego w laboratorium biochemicznym Max Planck w Getyndze, z których poprzez rozcieńczenie wodą dwukrotnie destylowaną sporządzano próbki o mniejszych koncentracjach. W niektórych eksperymentach używano także 3% wody utlenionej zakupionej w aptece.

Surowicę ludzką otrzymywano w postaci płynnej z Zakładu Patomorfologii CMUJ jako resztę niewykorzystaną we wcześniejszych badaniach klinicznych pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego Collegium Medicum UJ. Użyte surowice miały oszacowaną spektrofotometrycznie zawartość jonów żelaza i miedzi w niej występujących. Wartości te różniły się dla każdej próbki w zależności od płci, wieku, a także stanu zdrowia poszczególnych pacjentów.

Osocze królicze w postaci liofilizatu zakupione było w Wytwórni Surowic i Szczepionek w Krakowie. Do pomiarów osocze to było wagowo rozcieńczane w wodzie destylowanej.

Ze względu na duży wpływ ilości jonów paramagnetycznych na wartości czasów relaksacji, wodne roztwory jonów paramagnetycznych były sporządzane ze szczególną pieczołowitością. Pomiary dla jonów paramagnetycznych zostały wykonane dla następujących próbek:

- roztworów miedzi wykonanych z soli $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,
- roztworów manganu wykonanych z soli $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,
- roztworów żelaza Fe^{2+} wykonanych z leku Hemofer firmy GlaxoSmith-Kline w postaci ciekłej.

Roztwory molowe wykonywane były w dużym zakresie stężeń, które uzyska-

wano przez ważenie z dokładnością 10^{-3} g poszczególnych składników, a także proporcjonalne rozcieńczanie wodą podwójnie destylowaną i dejonizowaną.

Zastosowane środki chelatujące to:

- D-penicylamina, uzyskana z leku Cuprenil (Polfa Kutno Polska), łatwo rozpuszczalna w wodzie destylowanej po usunięciu otoczki leku,
- ryboflawina firmy Sigma Aldrich, która była słabo rozpuszczalna w wodzie. Dlatego stosuje się jej roztwory zasadowe w proporcjach 10 mg/ml ryboflawiny, którą rozpuszczano w roztworze 0,1 M NaOH.

Zastosowane antyoksydanty to:

- witamina C - kwas askorbinowy w postaci kropeł, była badana dla kilku stężeń. Witamina była dodawana do osocza króliczego i do surowicy ludzkiej w takich samych proporcjach,
- glutation przygotowany był w kilku stężeniach i dodawany tak jak witamina C do osocza króliczego i surowicy ludzkiej.

Do ww. próbek dodawano w celu inicjacji procesu utleniania wody utlenionej (w różnych koncentracjach, w zależności od przeprowadzanego eksperymentu) w proporcjach 1:1:8 (wit.C:roztwór H_2O_2 :osocze).

Stosowane albuminy to:

- liofilizowana albumina jaja kurzego (EWA) (MW 44 287 Da),
- liofilizowana albumina osocza wołowego (BSA) (MW 66 382 Da),
- liofilizowany lizozym jaja kurzego (MW 14 500 Da)

- zakupione w firmie SIGMA ALDRICH Company. Roztwory białek w różnych koncentracjach sporządzane były z liofilizatu w podwójnie destylowanej i dejonizowanej wodzie przez ważenie z dokładnością 10^{-3} g. Część z tych próbek była następnie denaturowana poprzez podgrzanie do temperatury $80^{\circ}C$ w czasie co najmniej 15 minut. Wszystkie pomiary były przeprowadzane w stabilizowanej temperaturze $23^{\circ}C$.

Otrzymane wartości czasów relaksacji są obarczone błędami pomiarowymi statystycznymi oraz błędami grubymi, wynikającymi z natury preparatyki próbek. Błędy pomiarowe mieściły się z dużą powtarzalnością w zakresie ok. 2%, co na wykresach nie wykracza poza wymiar punktu. Jak wspomniano wyżej, substancje ważone były z dokładnością 10^{-3} g, temperatura w pomieszczeniu badawczym była temperaturą pokojową, zaś ta wewnątrz magnesu stabilizowana była z dokładnością do $\pm 1^\circ\text{C}$.

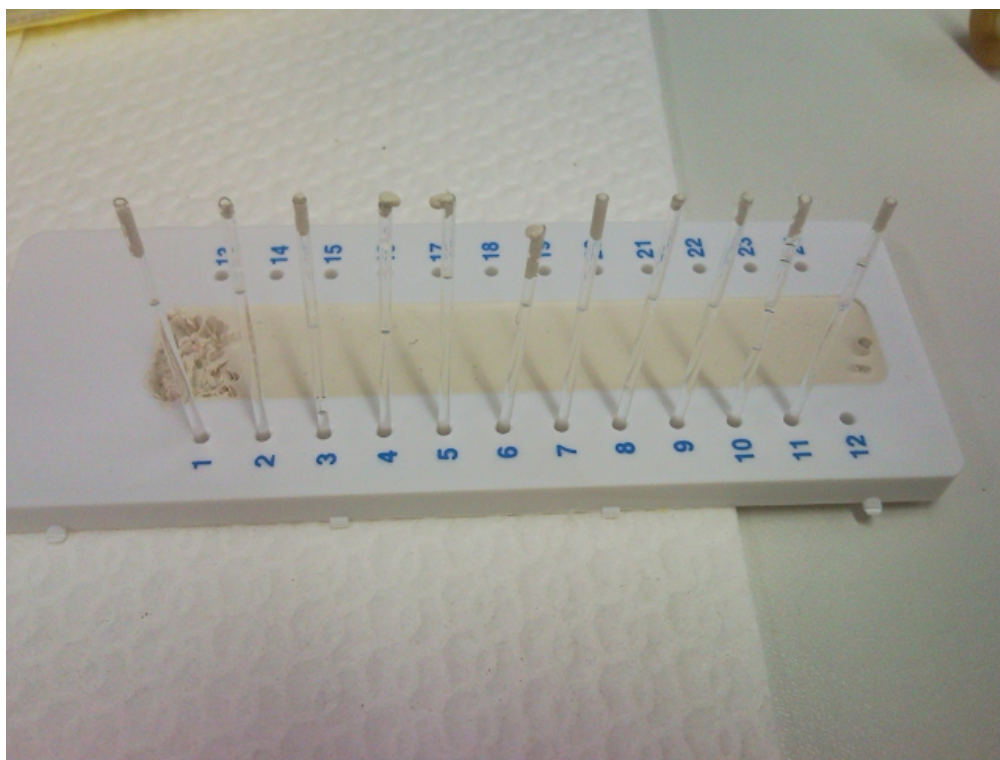
6.2 Bruker BioSpec 400 MHz

Badania wpływu ryboflawiny na czasy relaksacji roztworów miedzi Cu^{2+} wykonano w laboratorium NMR Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie Forschungs GmbH w Getyndze w Niemczech. Posługiwano się tam tomografem pracującym przy częstotliwości protonów 400 MHz (Rys. C.2), co odpowiada stałemu polu magnetycznemu równemu 9,4 T, umożliwiającym zarówno obrazowanie, jak i pomiary relaksacyjne. Głównymi elementami tomografu marki Bruker typu BioSpec, wyprodukowanego w Ettlingen w Niemczech są:

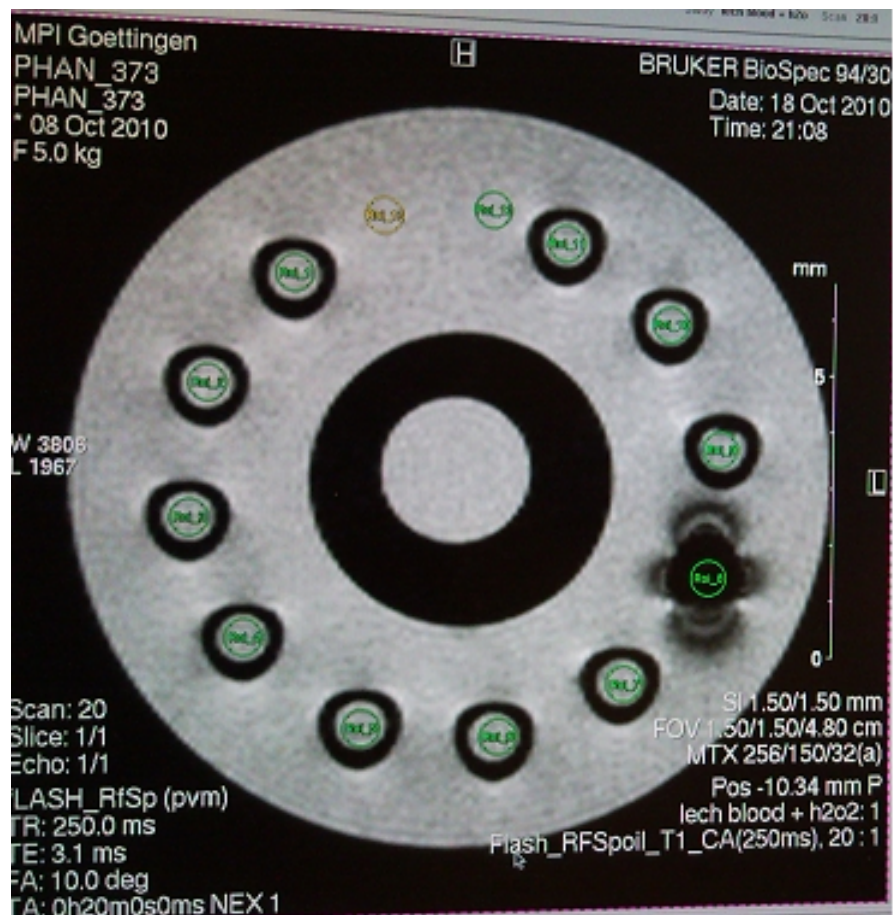
- magnes nadprzewodzący: BioSpec 94/30 USR (9,4 T, średnica szczeliny magnesu „gantry” wynosiła 30 cm),
- system gradientowy: BGA 12S o sile 660 mT/m, o średnicy zewnętrznej 116 mm,
- cewka typu: „Circular polarized ^1H birdcage resonator” (średnica zewnętrzna 70 mm),
- układ odbiorczy.

Aparatura sterowana była komputerem przy pomocy programu Paravision 4.0, za pomocą którego pomiary były planowane, a dane zbierane i obrabiane. Wykorzystany system to spektrometr BRUKER BioSpec, który dawał również możliwość pomiarów relaksacyjnych. Wykorzystano sekwencje 3D-flash

do T_1 oraz 3D-CPMG do T_2 i otrzymywano obrazy zależne w różnych sekwencjach. Do rekonstrukcji obrazów używano algorytmu o nazwie "Trapezoid". Preparatyka próbek była inna niż w opisywanym powyżej systemie 60 MHz. Roztwory umieszczane były w kapilarach o średnicy 2 mm (Rys. 6.4). Dziesięć kapilar umieszczano się w fantomie i następował sterowany komputerem pomiar relaksacyjny dziesięciu próbek jednocześnie. Czasy relaksacji były odczytywane z zaciemnienia obrazu poszczególnych kapilar (Rys. 6.5).



Rysunek 6.4. Fotografia serii próbek o średnicy 2 mm z różnymi koncentracjami jonów Cu, przed włożeniem do fantomu



Rysunek 6.5. Przykładowy wynik pomiaru relaksacji, otrzymywany z zaciemnienia obrazu tomograficznego MR

Rozdział 7

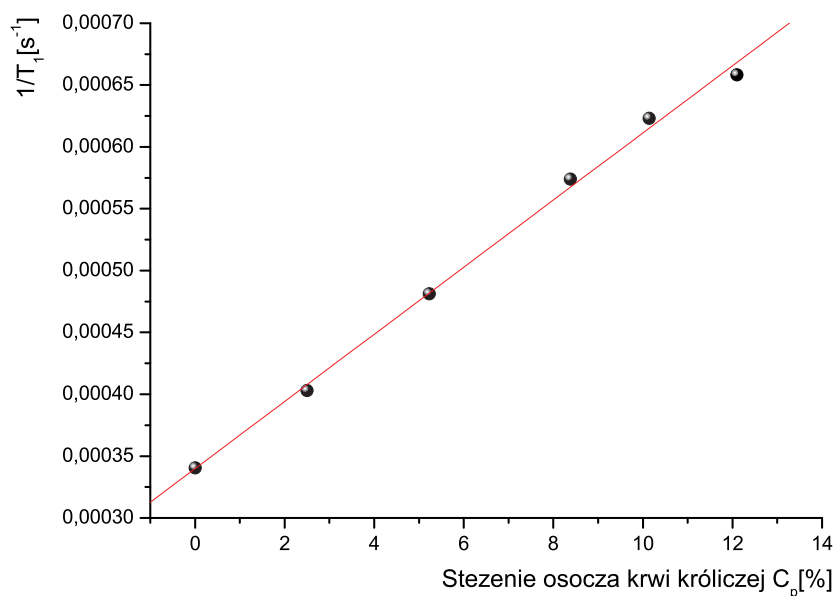
Wyniki pomiarów i ich dyskusja

W niniejszym rozdziale przedstawione zostaną wyniki eksperymentów własnych, zarówno tych nowatorskich, jak i tych, które mimo że są już opublikowane, to wykonano je powtórnie. Zrobiono to po to, aby można było porównać je w dyskusji z nowymi wynikami otrzymanymi w tych samych warunkach laboratoryjnych.

7.1 Relaksacja w roztworach białek i surowicy krwi

Białka spełniają wiele różnorodnych funkcji w układach biologicznych. Mogą służyć jako elementy budulcowe, aktywne czynniki ruchu i transportu, a także jako magazyny energii pochodzącej z metabolizmu [82]. Wiele płynów fizjologicznych, m.in. osocze krwi, można traktować jako wodne roztwory białek. Jak pokazano w rozdziale 4, szybkość relaksacji NMR wodnego roztworu białka zależy od jego stężenia, przyczyną tej zależności jest zjawisko adhezji molekuł wody do cząsteczek białka. Związana z białkiem woda porusza się wolniej i poprzez dłuższy czas korelacji zwiększa szybkość relaksacji (Równ. 4.1). Zakładając, że mamy szybką wymianę pomiędzy protonami wody swo-

bodnej i związanej, w roztworze o stężeniu mniejszym od 15% (wagowo) uśredniona szybkość relaksacji jest proporcjonalna do stężenia białka. Ilustruje to rysunek 4.1, pokazując, że eksperymentalna zależność szybkości relaksacji R_1 od stężenia osocza krwi króliczej (w granicach 0-12%) dopasowana jest prostą.



Rysunek 7.1. Zależność szybkości relaksacji od stężenia wodnego roztworu osocza krwi króliczej w temperaturze pokojowej

Dla wysokich stężeń białka, zależność R_i od koncentracji przestaje być liniowa. Punkt załamania liniowości związany jest z rozmiarami drobiny białka, a pośrednio z jej ciężarem molekularnym (Rys. 4.1). Dla tej „granicznej” koncentracji zmienia się sposób upakowania białka w roztworze. Przykładowe wartości graniczne dla różnych białek podaje tabela 7.1.

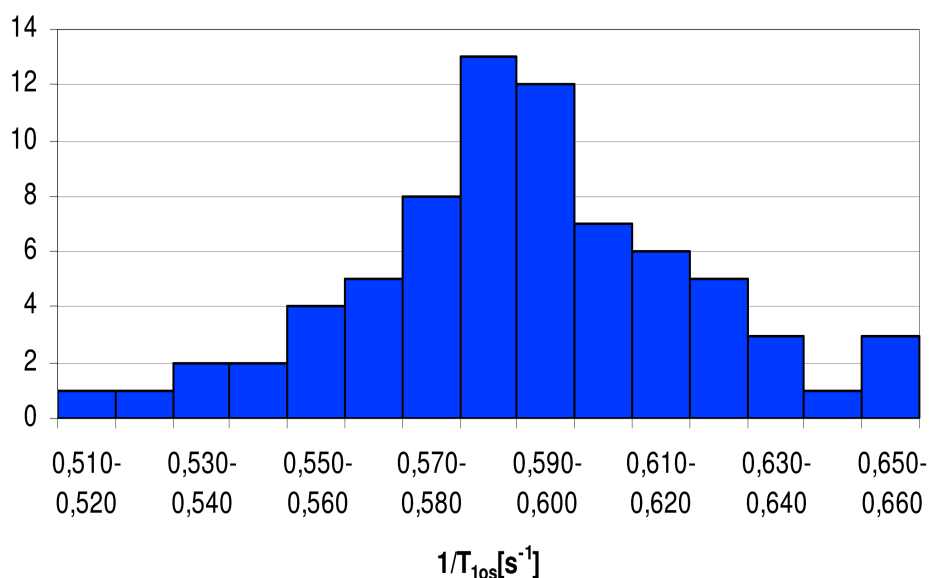
Osocze krwi zawiera białka, lipidy i wiele mikroelementów. Jednak z punktu widzenia NMR, składnikami, które mają wpływ na wartości relaksacji, są białka (ok. 7%) oraz jony paramagnetyczne naturalnie w nim występujące. Są to głównie: żelazo Fe, miedź Cu i mangan Mn. Niewielki wpływ na szyb-

Białko	MW [Da]	Stężenie graniczne [%]
Albumina jaja kurzego (EWA)	44287	$12,8 \pm 0,1$
Albumina krwi bydlęcej (BSA)	66382	$7,2 \pm 0,5$
Lizozym	14600	17 ± 1

Tabela 7.1. Wartości stężeń granicznych dla poszczególnych białek

kość relaksacji mają także lipidy, które mogą zmieniać lepkość osocza. Rysunek 7.1 pokazuje liniową zależność T_1 od ilości rozpuszczalnika w wodzie liofilizatu krwi króliczej.

Ze względu na różnorodny skład surowicy ludzkiej, wartości mierzonego czasu relaksacji T_1 są zróżnicowane. Diagram na rysunku 7.2 ilustruje rozkład T_1 zmierzony dla 70 próbek *ex vivo* osocza pacjentów i wolontariuszy szpitala klinicznego Collegium Medicum UJ [83]. Widać z tego diagramu, że wartość T_1 rozciąga się w granicach od 1,5 s do 2 s, w przybliżeniu przypominając rozkład Gaussa.



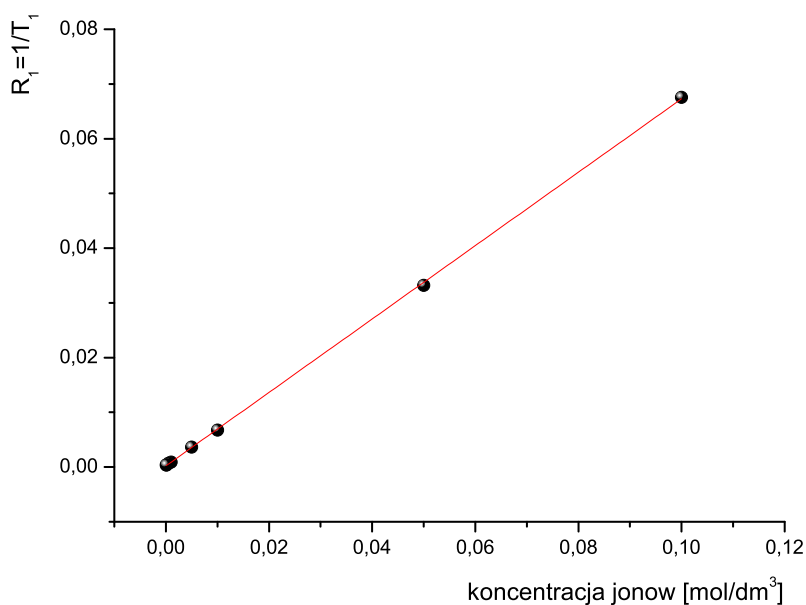
Rysunek 7.2. Histogram wartości szybkości relaksacji R_1 w próbkach osocza ludzkiego, zdrowych wolontariuszy i pacjentów szpitala uniwersyteckiego Collegium Medicum w Krakowie [83]

7.2 Relaksacja w obecności jonów paramagnetycznych

Aby lepiej poznać mechanizmy relaksacji paramagnetycznej, opisane w rozdziale 3, wykonano na nowo pomiary czasów relaksacji wodnych roztworów dla różnych koncentracji jonów paramagnetycznych. Były to jony Cu, Fe i Mn [84].

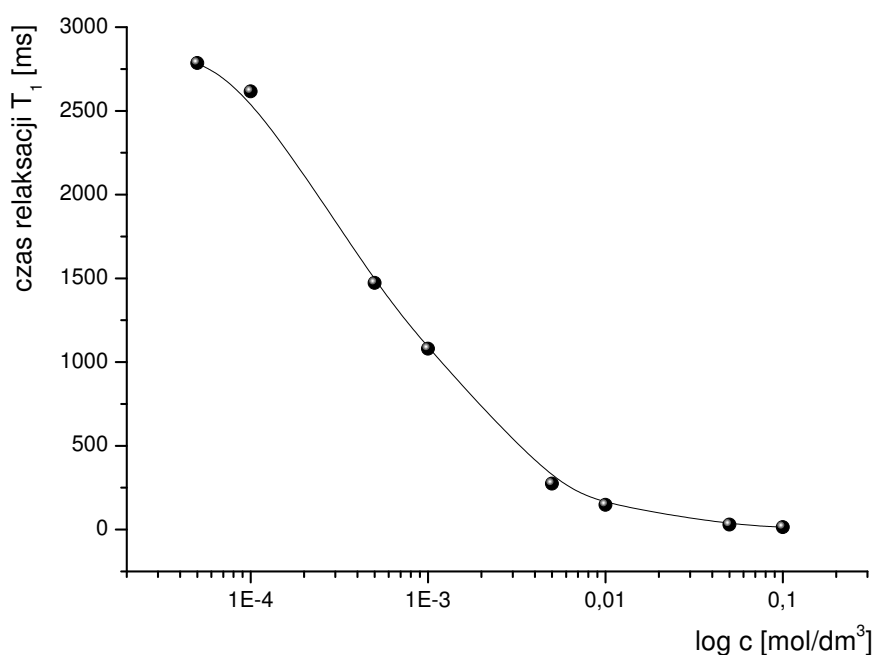
7.2.1 Wodne roztwory jonów miedzi

Badania relaksacyjne roztworów wodnych CuSO_4 przeprowadzono dla różnych stężeń Cu w granicach od 10^{-2} do 10^{-5} mola/litr. Założenia teoretyczne przewidują liniową zależność pomiędzy szybkością relaksacji a koncentracją jonów paramagnetycznych (Rozdz. 3). Na rysunku 7.3 przedstawiono taką właśnie zależność otrzymaną z eksperymentu przy częstotliwości 60 MHz.



Rysunek 7.3. Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji w wodzie jonów miedzi Cu^{2+}

Wracając do samych wartości czasów relaksacji, okazuje się, iż w większym zakresie stężeń lepiej jest przedstawić powyższy wykres w skali logarytmicznej (Rys. 7.4) [85].



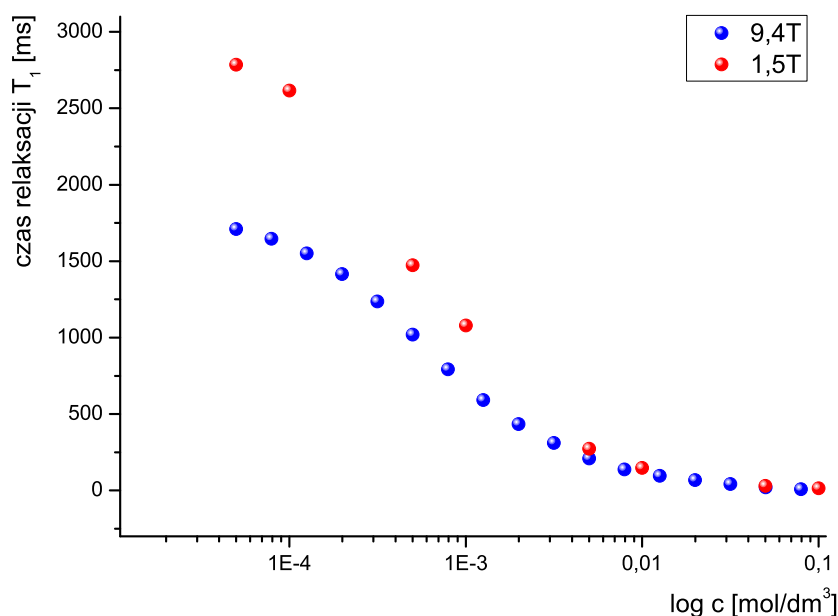
Rysunek 7.4. Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów miedzi Cu^{2+} w wodzie przedstawiona w skali logarytmicznej

I tak na rysunku 7.4 można wyróżnić trzy obszary charakterystyczne:

- dla małego stężenia jonów miedzi (do wartości stężenia $5 \cdot 10^{-5}$ M), wpływ jonów na procesy relaksacji poprzez oddziaływanie paramagnetyczne jest niezauważalny (*plateau*). Swobodne molekuly wody są wtedy w liczebnej przewadze i dipolowe oddziaływanie pomiędzy protonami wody jest dominujące,
- dla wysokich stężeń (od wartości 0,01 M w górę), relaksacja protonów wody jest zdominowana przez oddziaływanie z jonami paramagnetycznymi (Rozdz. 3). Czasy relaksacji są znów niezależne od stężenia jonów paramagnetycznych, gdyż choć jonów przybywa, nie ma już dalszych protonów wody, które mogłyby z nimi oddziaływać,

- pomiędzy wysoką a niską koncentracją jonów, w zakresie stężenia od $5 \cdot 10^{-5}$ M do 0,01 M, jest stan pośredni, w którym nie dominuje żaden z opisanych efektów i obserwowany jest stopniowy spadek wartości czasu relaksacji.

Analogiczne pomiary, jak te przedstawione na rysunku 7.4, które wykonano przy częstotliwości rezonansu protonowego 60 MHz, dla roztworów wodnych CuSO_4 przeprowadzono, korzystając z tomografu o częstotliwości 400 MHz. Na rysunku 7.5 przedstawiono porównanie pomiarów T_1 dla obu częstotliwości. Z rysunku 7.5 widać, że wartości czasu relaksacji T_1 w obecności jonów pa-

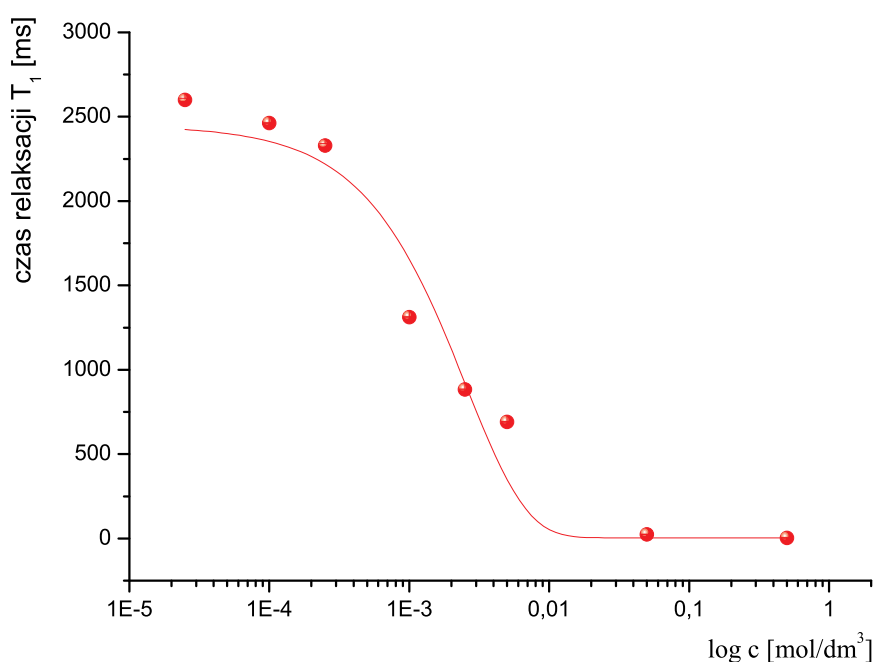


Rysunek 7.5. Porównanie zależności czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów miedzi Cu^{2+} w wodzie uzyskanych przy dwóch częstotliwościach pomiarowych 60 MHz i 400 MHz

ramagnetycznych zależą od częstotliwości rezonansu, co nazywamy zależnością dyspersyjną. Czas T_1 dla małych stężeń Cu jest krótszy w polu 9,4 T, podczas gdy dla dużych stężeń jonów oba czasy są takie same. W niskich polach

obserwowane skrócenie czasu T_1 jest wyraźniejsze i stąd przewaga spektroskopów z niskim polem do przeprowadzania tych badań.

Celem sprawdzenia, czy oddziaływania paramagnetyczne ulegają zmianie w obecności białek, jak to jest w osoczu krwi, zmierzono czas relaksacji T_1 dla osocza krwi króliczej, dodając do niego wodne roztwory soli miedzi CuSO_4 (Rys. 7.6). Dla zakresu, w którym niskie stężenie jonów paramagne-

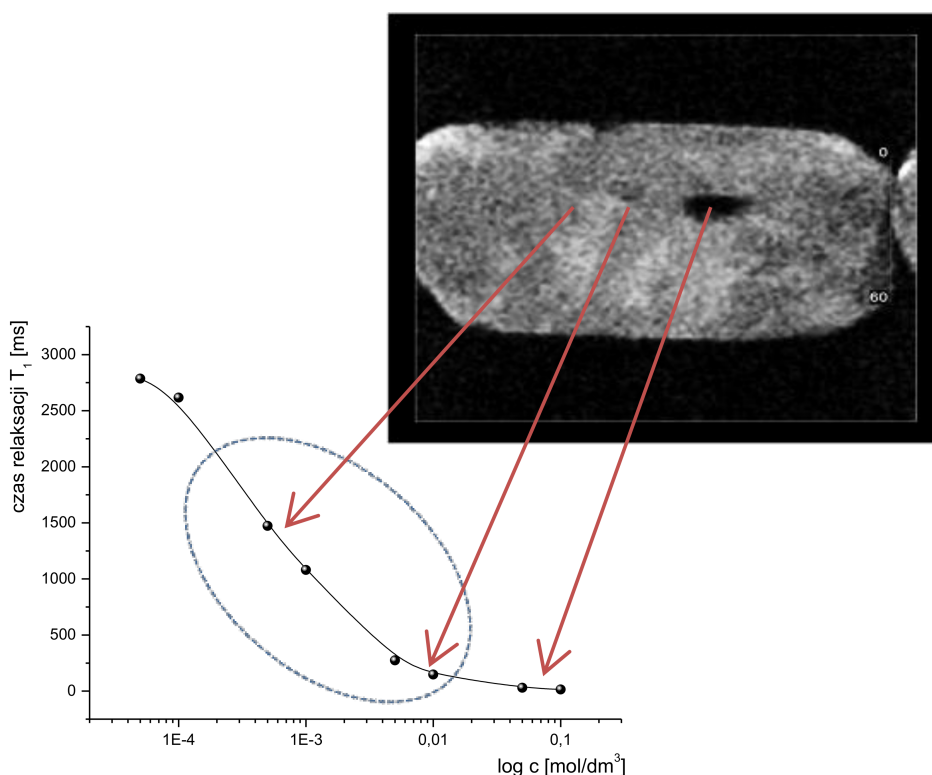


Rysunek 7.6. Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji dla jonów miedzi CuSO_4 w osoczu króliczym w skali logarytmicznej

tycznych nie ma wpływu na relaksację, obserwujemy skrócenie czasów relaksacji T_1 pochodzące od stężenia białka (wzór 4.1). Sam przebieg zależności czasu relaksacji od stężenia jonów w osoczu jest jednak bardzo podobny do obserwowanej zależności dla roztworów wodnych (Rys. 7.4).

Skrócenie czasów relaksacji, spowodowane obecnością jonów paramagnetycznych, wpływa również na obrazy MRI. Miejscowo zwiększona koncentracja jonów paramagnetycznych w niektórych narządach, powstająca w wyniku

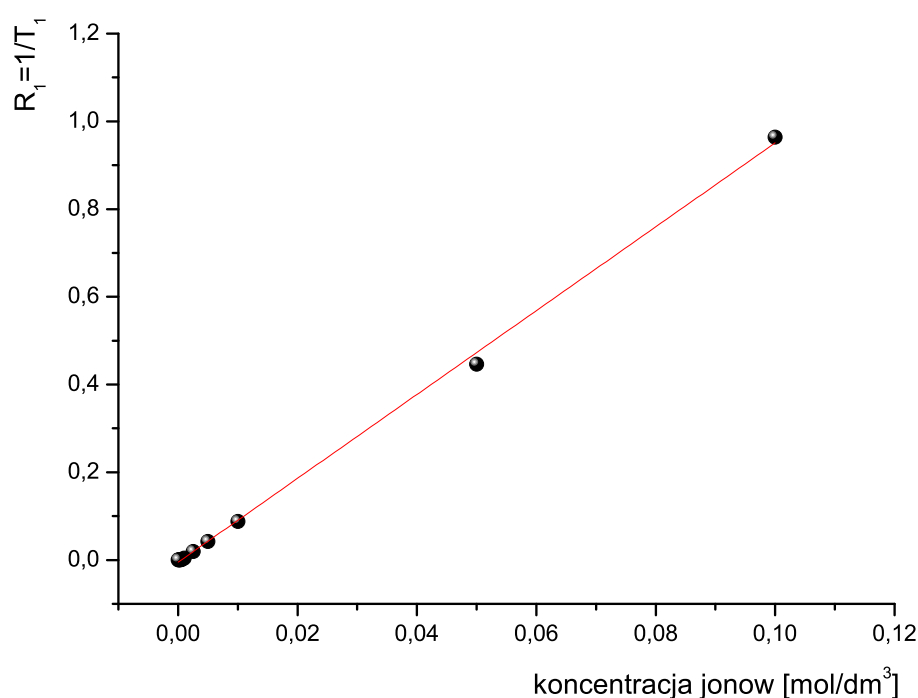
różnych schorzeń (m.in. choroby Wilsona, Parkinsona, Alzheimer), może być przyczyną powstawania artefaktów na obrazach MRI, a to z kolei często prowadzić może do błędnej ich interpretacji [66]. Na rysunku 7.7 widać wyraźnie czarny obszar w obrazowanej tkance mięsnej, do której wcześniej za pomocą iniekcji wprowadzono roztwory jonów miedzi CuSO_4 o różnych koncentracjach. Strzałki schematycznie pokazują zakres koncentracji jonów Cu^{2+} odpowiedzialny za zaciemnienie obrazu w badanej tkance mięsnej spowodowane mocnym osłabieniem sygnału, a nawet jego brakiem. To zaciemnienie obrazu w dalszej części pracy będziemy nazywać „czarną dziurą”.



Rysunek 7.7. Schemat zależności czasu relaksacji T_1 od koncentracji wstrzykniętych roztworów jonów miedzi Cu^{2+} z oceną zaciemnienia obrazu MRI

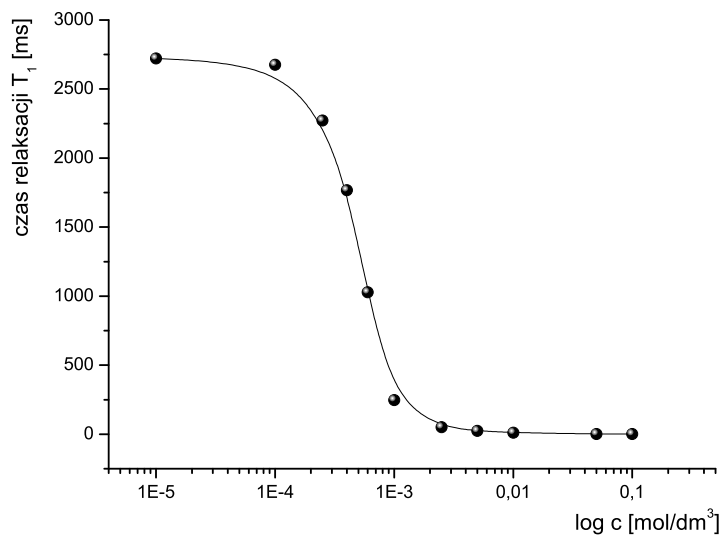
7.2.2 Wodne roztwory jonów żelaza

Kolejnym badanym jonem paramagnetycznym obecnym w osoczu było żelazo Fe^{2+} . Tak jak w przypadku jonów miedzi, zależność pomiędzy szybkością relaksacji a koncentracją jonów paramagnetycznych Fe^{2+} jest liniowa. Przedstawia to rysunek 7.8. Natomiast na rysunku 7.9, podobnie jak dla jonów

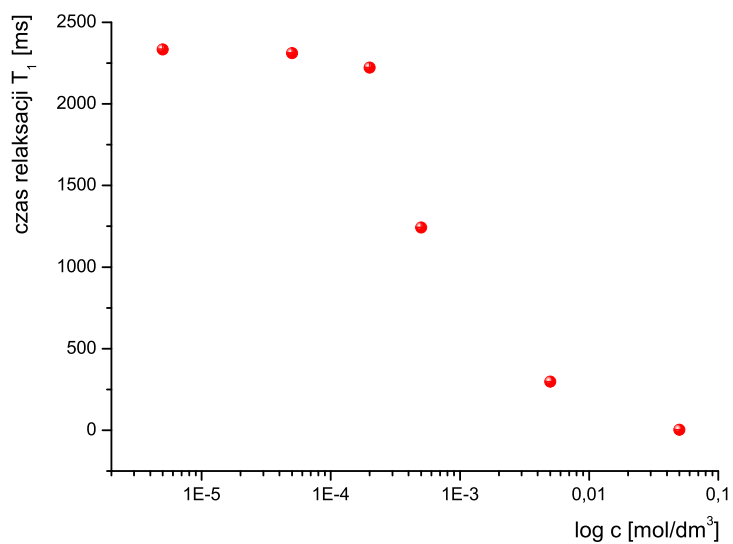


Rysunek 7.8. Szybkość relaksacji R_1 od koncentracji jonów żelaza Fe^{2+} w roztworze wodnym FeCl_2

miedzi, przedstawiono przebieg tej zależności od koncentracji jonów żelaza w roztworach wodnych w skali logarytmicznej. Jest on podobny do otrzymanego dla jonów miedzi, z tym że okres przejściowy dla Fe rozciąga się od koncentracji 10^{-4} M do 0,0025 M, co świadczy o ich silniejszym wpływie na procesy relaksacji. Wykonano także pomiary dla osocza krwi króliczej z dodatkiem roztworów FeCl_2 i otrzymano podobne zależności (Rys. 7.10).

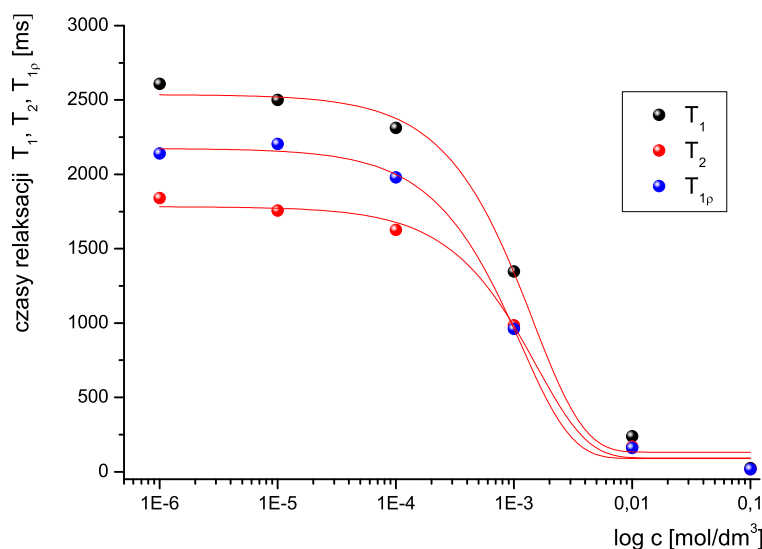


Rysunek 7.9. Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów żelaza w roztworze wodnym FeCl_2 w skali logarytmicznej

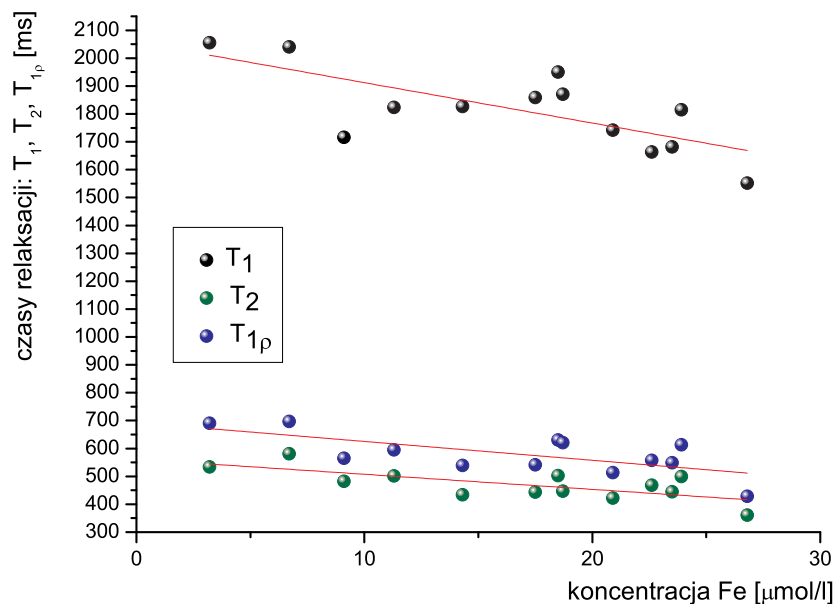


Rysunek 7.10. Zależność czasów relaksacji T_1 od koncentracji dodanych jonów żelaza Fe^{2+} w osoczu krwi króliczej

Następny wykres (Rys. 7.11) przedstawia zależność czasów relaksacji (T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$) od koncentracji dla wodnego roztworu jonów żelaza FeCl_2 . Widać z niego, że obecność jonów żelaza Fe^{2+} ma wpływ nie tylko na czas relaksacji T_1 , ale także na czasy T_2 i $T_{1\rho}$, a charakter tych zmian jest dla wszystkich czasów relaksacji bardzo podobny. Kolejne pomiary przeprowadzono, aby przekonać się, czy naturalnie występujące w osoczu jony żelaza wpływają na czasy relaksacji. Rysunek 7.12 pokazuje zależność czasów relaksacji od koncentracji żelaza, zmierzonego metodami spektrofotometrycznymi jako zawartego w naturalnych próbkach osocza krwi ludzkiej. Jak widać, czasy relaksacji (T_1 , T_2 i $T_{1\rho}$) wykazują liniową zależność od koncentracji jonów Fe naturalnie występujących w osoczu krwi w granicach stężeń od 2 do 27 $\mu\text{mol/litr}$, przy czym dla tych samych próbek T_1 jest bardziej „wrażliwe” niż T_2 i $T_{1\rho}$. Zależność ta jest słaba, jednak zauważalna (w porównaniu z jonami Cu).



Rysunek 7.11. Zależność czasów relaksacji T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$ od koncentracji jonów żelaza Fe^{2+} w wodzie

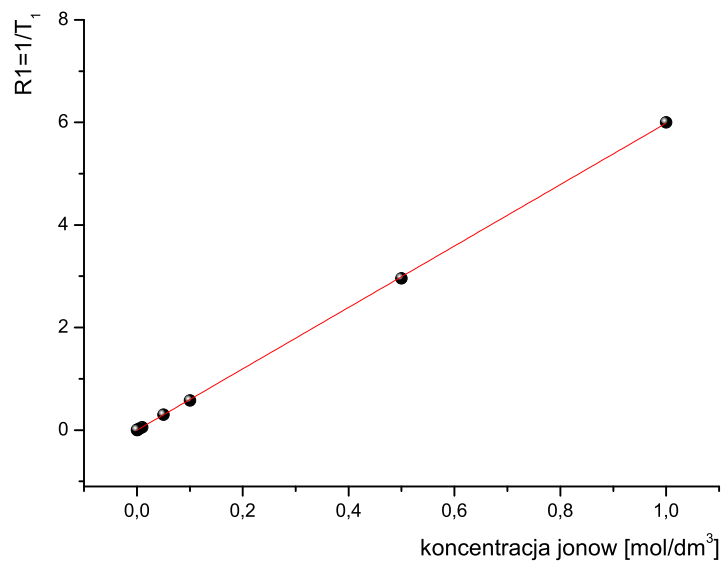


Rysunek 7.12. Wartości czasów relaksacji T_1 , T_2 i $T_{1\rho}$ zmierzonych dla różnych próbek osocza ludzkiego, w zależności od koncentracji żelaza (oszacowanego spektrofotometrycznie)

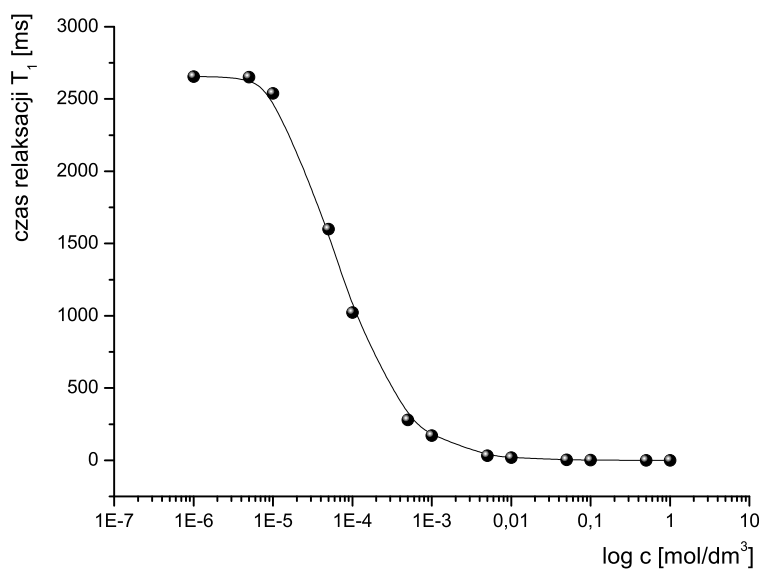
7.2.3 Wodne roztwory jonów manganu

Pomiary zależności czasów relaksacji wykonano także dla wodnych roztworów jonów manganu Mn^{2+} . Liniową zależność przedstawia rysunek 7.13. Wynik przebiegu zmian czasów relaksacji T_1 przedstawiony jest na rysunku 7.14 z koncentracją w skali logarytmicznej.

Zgodnie z oczekiwaniami zależności te są podobne do zależności dla Cu^{2+} i Fe^{2+} . Obszar przejściowy rozciąga się w przedziale koncentracji od $5 \cdot 10^{-6}$ M do 0,005 M (Tab. 7.2).



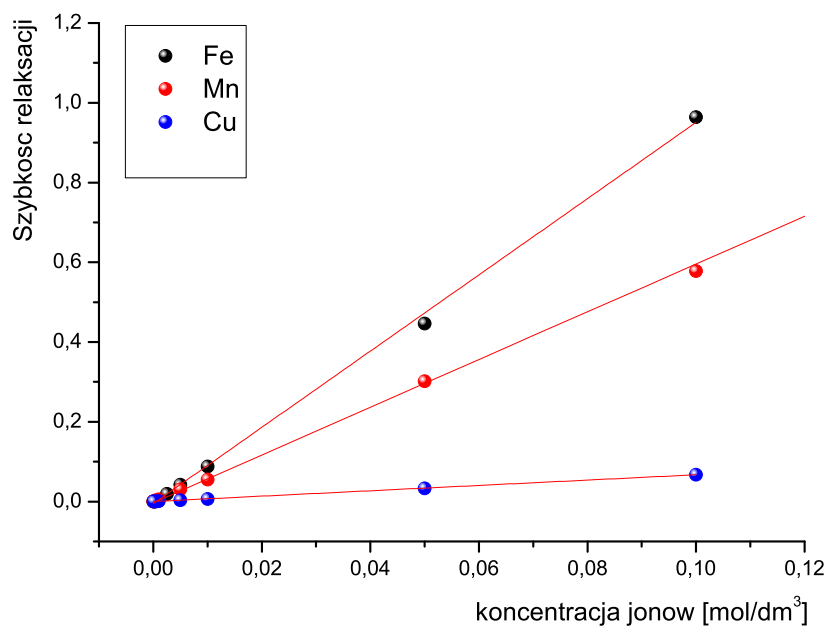
Rysunek 7.13. Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji w wodzie dla jonów manganu w roztworze MnCl_2



Rysunek 7.14. Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów manganu MnCl_2 rozpuszczonych w wodzie, przedstawiona w skali logarytmicznej

Jony	Konf. elektr.	Podatność magnet.	Zakres przejściowy [M]	Nachylenie lini
Cu^{2+}	$3d^9$	1,9	$5 \cdot 10^{-5} - 0,01$	$0,67 \pm 0,1$
Fe^{2+}	$3d^6$	5,4	$10^{-4} - 0,0025$	$9,56 \pm 0,1$
Mn^{2+}	$3d^5$	5,6	$5 \cdot 10^{-6} - 0,005$	$5,9 \pm 0,1$

Tabela 7.2. Zakres zmian szybkości relaksacji w funkcji koncentracji oraz nachylenia prostej dla poszczególnych jonów paramagnetycznych w zestawieniu z danymi literaturowymi (konfiguracją elektronową i podatnością magnetyczną)



Rysunek 7.15. Porównanie zależności szybkości relaksacji R_1 od koncentracji dla jonów miedzi, żelaza i manganu rozpuszczonych w wodzie

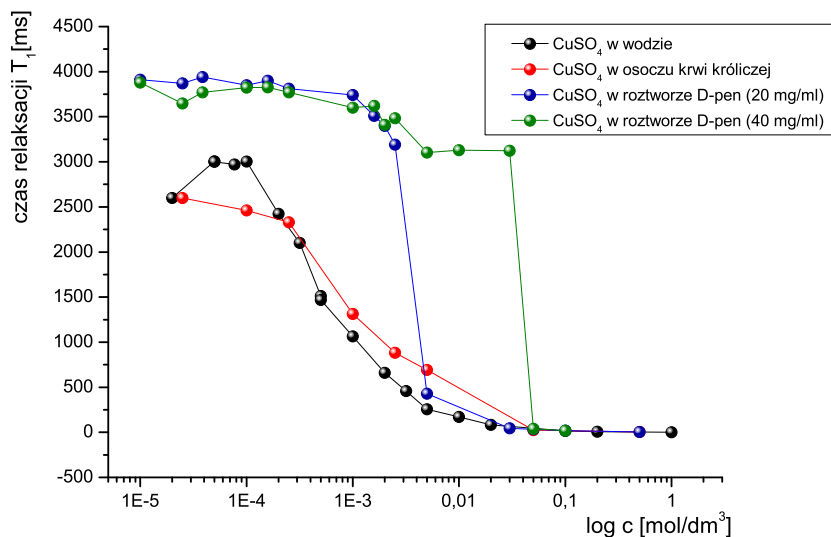
Podsumowując przeprowadzone pomiary, można sporządzić „ranking” badanych trzech jonów: Fe, Cu i Mn. W tabeli 7.2 zestawiono różne parametry charakteryzujące badane jony paramagnetyczne. Rysunek 7.15 przedstawia zestaw liniowych zależności przebadanych jonów, których kąt nachylenia prostej świadczy o sile wpływu substancji paramagnetycznych na procesy relaksacji.

7.3 Relaksacja w obecności środków chelatujących

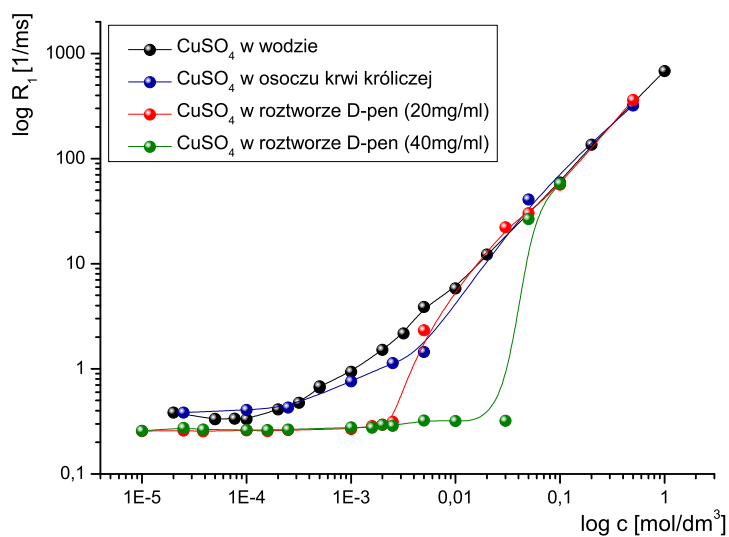
Silny wpływ jonów paramagnetycznych na przyspieszenie procesów relaksacji może być kontrolowany i częściowo zatrzymywany poprzez kompleksowanie ich środkami chelatującymi (rozdział 6). W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano jako środki chelatujące: D-penicylaminę, zawartą w leku Cuprenil stosowanym w terapii choroby Wilsona, a także nowatorsko użytą przez nas ryboflawinę, powszechnie znaną jako witamina B₂.

7.3.1 D-penicylamina

Aby zbadać wpływ D-penicylaminy (D-pen) na relaksację, wykonano ponownie pomiary T_1 roztworów CuSO₄ w wodzie, a także w osoczu krwi króliczej w obecności D-pen. Na poniższych wykresach pokazane zostaną efekty kompleksowania przez ten chelat jonów paramagnetycznych rozpuszczanych w wodzie i po dodaniu D-pen o dwu koncentracjach: 20 mg/ml i 40 mg/ml. Rysunki 7.16 i 7.17 przedstawiają zależności T_1 i R_1 od koncentracji jonów Cu²⁺ po dodaniu D-pen do roztworu. Widać, że dodanie D-pen znacząco wpływa na czasy relaksacji, czego wynikiem jest przesunięcie obszaru przejściowego w kierunku wyższych stężeń. Efekt ten jest jeszcze bardziej widoczny wraz z podwyższeniem stężenia chelatu w próbce. Obserwowane zmiany lepiej uwidaczniają się na wykresie szybkości relaksacji 7.17.



Rysunek 7.16. Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów Cu^{2+} w roztworach wodnych, w osoczu krwi króliczej oraz po dodaniu D-pen

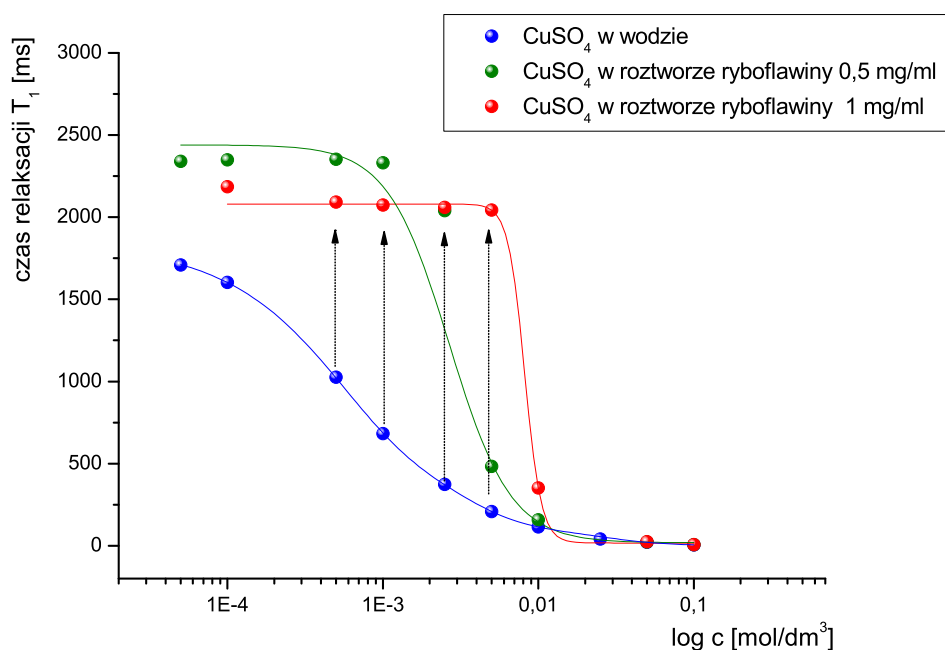


Rysunek 7.17. Szybkości relaksacji R_1 w funkcji koncentracji jonów miedzi Cu^{2+} po dodaniu D-pen, zmierzone dla roztworów wodnych i osocza krwi króliczej

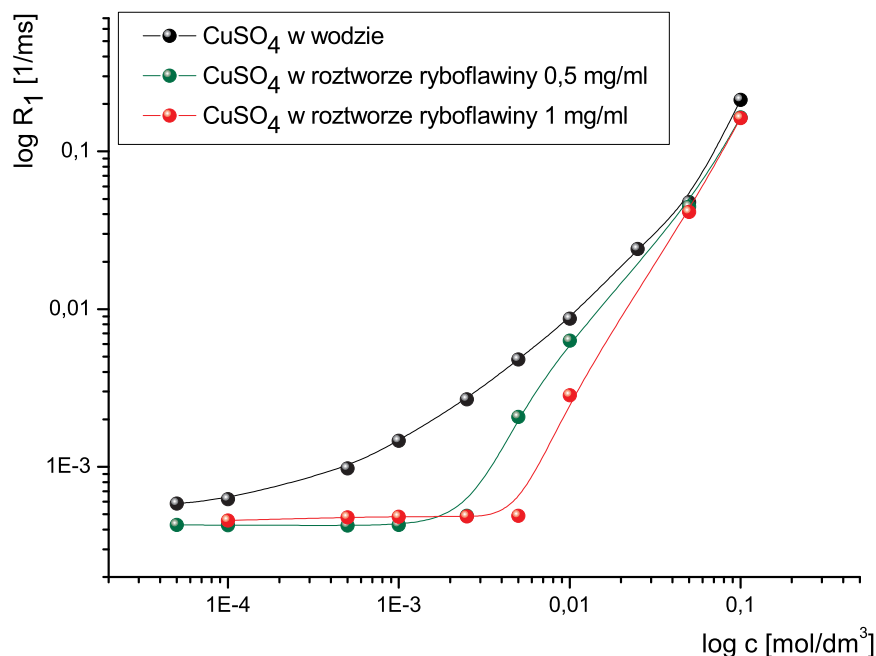
7.3.2 Ryboflawina

W kolejnym etapie wykonano pomiary relaksacyjne dla roztworów ryboflawiny. Były to pomiary innowacyjne, gdyż właściwości chelatujące tej substancji nie są jeszcze poznane do końca. Na rysunkach 7.18 i 7.19 wyraźnie widać, że obecność ryboflawiny wpływa na przebieg zależności czasów relaksacji w roztworach miedzi. Istotną zmianą jest przesunięcie się obszaru przejściowego w stronę wyższych stężeń, podobnie jak w przypadku D-pen. Efekt ten jest jeszcze bardziej widoczny, gdy dodawana ryboflawina ma większe stężenie.

Różnica T_1 obserwowana na początku skali dla próbek z dodatkiem ryboflawiny spowodowana jest obecnością molekuł samej ryboflawiny, która również skraca T_1 jej roztworów wodnych.



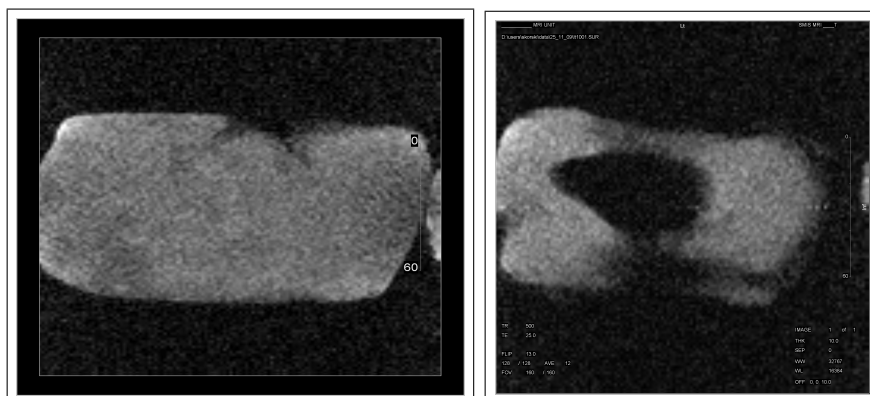
Rysunek 7.18. Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów Cu^{2+} w wodzie w zestawieniu z zależnością po dodaniu roztworu ryboflawiny w stężeniu 0,5 mg/ml oraz 1 mg/ml (spektrometr 400 MHz); strzałki schematycznie pokazują wydłużenie czasu T_1 w obecności chelatu



Rysunek 7.19. Zależności szybkości relaksacji R_1 od koncentracji jonów Cu^{2+} w wodzie i po dodaniu wodnego roztworu ryboflawiny

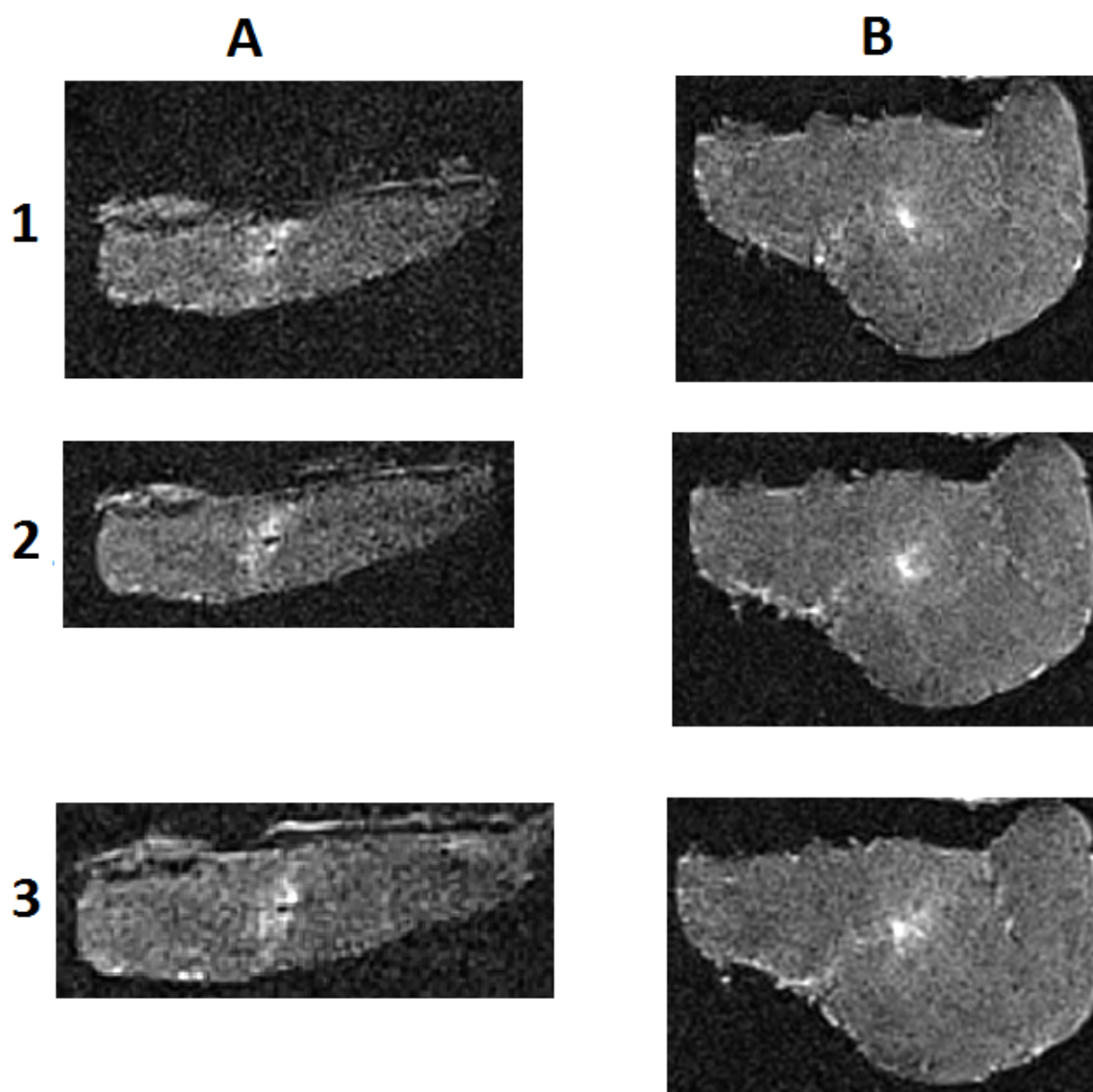
Przesunięcie się obszaru przejściowego w stronę wyższych stężeń po dodaniu ryboflawiny obserwowano również na wykonanych obrazach MRI. W celu obserwacji i potwierdzenia tego efektu sporządzono fantom w postaci tkanki mięsnej (łopatka wieprzowa) i dokonano jego obrazowania. Pierwotnie, aby sprawdzić efekt, dokonano obrazowania na niskopolewym tomografie MR. Przykład tkanki mięsnej (o rozmiarach 5x10x3 cm) nastrzykniętej centralnie roztworem CuSO_4 o bardzo dużej koncentracji (1 mol/l), przedstawia rysunek 7.20. Podobne eksperymenty z użyciem tkanki mięsnej przedstawione zostały w pracy [86]. Widać wyraźnie czarny obszar, w którym nie obserwujemy sygnału.

Kolejne eksperymenty przeprowadzone były na wysokopolewych tomografach MR. Sporządzono fantom, który składał się z sześciu podobnych do siebie kawałków mięsa podzielonych na dwie części (a,b) (Rys.7.21). Część (a)



Rysunek 7.20. Porównanie obrazu tkanki mięsnej z tkanką z nastrzykniętym punktowo roztworem CuSO_4 o stężeniu 1 mol/l

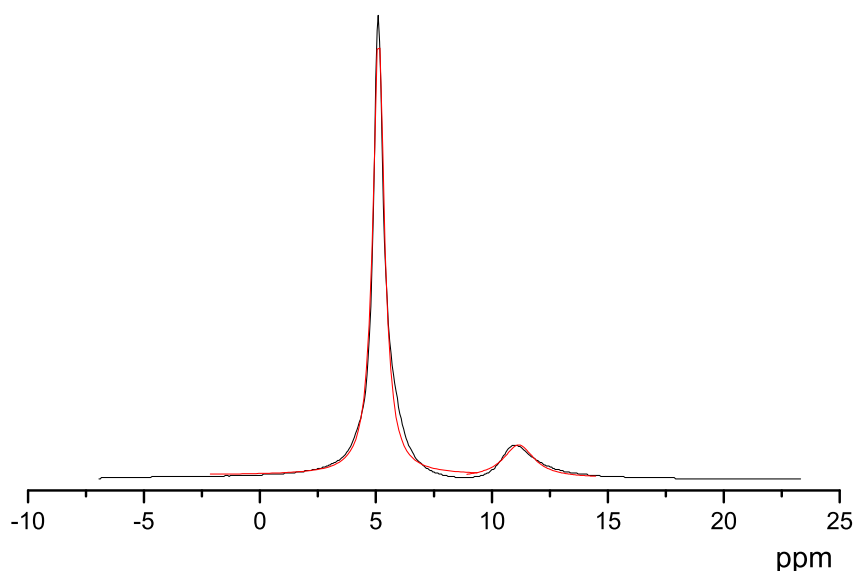
została nastrzyknięta roztworami jonów miedzi w trzech różnych koncentracjach, reprezentatywnych dla wyróżnionych obszarów charakterystycznych w badaniach wcześniejszych (Rys.7.18). Część (b) natomiast została nastrzyknięta roztworami jonów miedzi o takich samych koncentracjach, lecz z dodatkiem ryboflawiny. Na rysunku 7.22 pokazane zostały obrazy MRI fantomu tkanki mięsnej. Interesujące nas obszary zaznaczone zostały kolorem czerwonym. Te dwa wskazane kawałki mięsa o stężeniu wstrzykniętych jonów, dla którego występuje efekt przesunięcia obszaru przejściowego i podwyższenie czasu relaksacji, które jest już wystarczające do otrzymania sygnału, zostały pokazane na trzech przekrojach poprzecznych na rysunku 7.23. Seria obrazów A przedstawia kawałek mięsa nastrzyknięty roztworem wodnym CuSO_4 , natomiast seria B to kawałek mięsa nastrzyknięty tą samą koncentracją jonów miedzi, ale w roztworze ryboflawiny. Wyraźnie widać na obrazach A „czarną dziurę” spowodowaną zwiększoną koncentracją jonów miedzi, zaś w serii B w centralnym miejscu obrazu w trzech przekrojach poprzecznych widać tylko białą otoczkę spowodowaną podniesieniem sygnału w wyniku wstrzyknięcia roztworu, ale nie ma już „czarnych dziur”, co potwierdza efekt kompleksowania jonów miedzi przez ryboflawinę.



Rysunek 7.23. Porównanie obrazów tkanek mięsnych po iniekcji roztworów jonów miedzi Cu^{2+} i ryboflawiny

7.4 Relaksacja w roztworach nadtlenu wodoru

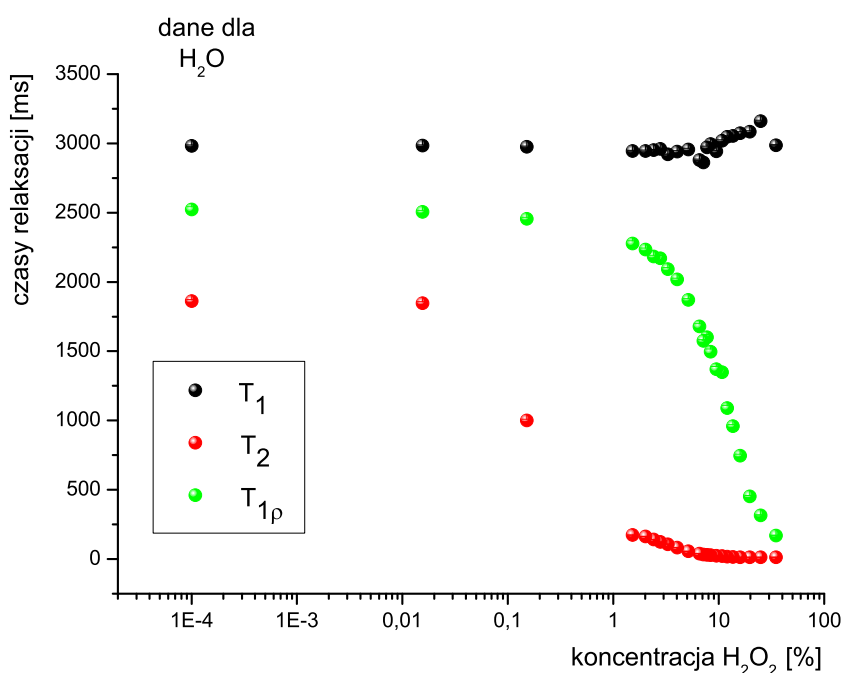
Badania roztworów $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ rozpoczęliśmy od uzyskania widma NMR wysokiej zdolności rozdzielczej o częstotliwości 400 MHz roztworu nadtlenu wodoru (Rys. 7.24). Na widmie widoczne są dwie linie: linia protonów wody, a także



Rysunek 7.24. Widmo ^1H 35% (wagowo) wodnego roztworu nadtlenu wodoru uzyskane na spektrometrze Bruker 400 MHz w temperaturze pokojowej

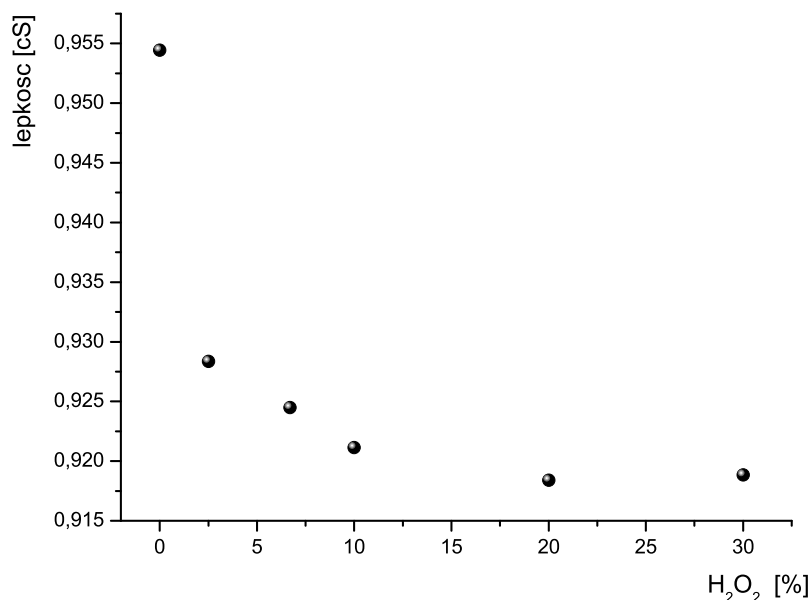
linia protonów nadtlenu wodoru. Do otrzymanych linii dopasowano krzywe Lorentza. Z otrzymanych parametrów dopasowania można było wyliczyć pole pod krzywą, które jest proporcjonalne do ilości protonów w H_2O_2 i H_2O . Stosunek tych pól powinien wynosić 1:3, co odpowiada 35% wagowo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$. Zaś z pomiarów wynika, że stosunek pól wynosi 1:5 [87]. Następnym krokiem

były pomiary relaksacyjne protonów nadtlenu wodoru w zależności od koncentracji w wodzie, którego obecność ma wpływ na jej procesy relaksacji [88]. Takie zależności dla czasów relaksacji T_1 , T_2 i $T_{1\rho}$ przedstawiono na rysunku 7.25. Ze względu na słabą rozdzielczość spektrometru 60 MHz, pomiary relaksacyjne odnosiły się tylko do linii wody (Rys. 7.24). W przypadku pomiarów



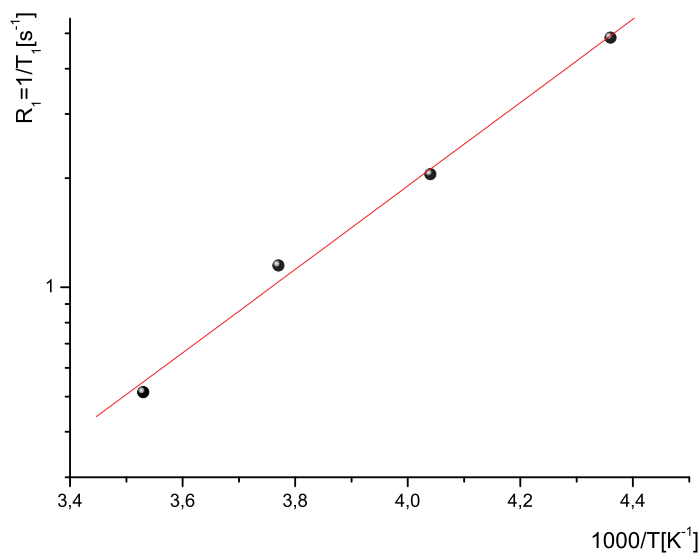
Rysunek 7.25. Zależność czasów relaksacji T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$ od koncentracji H_2O_2 w roztworze wodnym w temperaturze 25°C

czasów T_2 i $T_{1\rho}$, obecność nadtlenu wodoru, powyżej koncentracji wagowej 1%, gwałtownie skraca czasy relaksacji, podczas gdy czas T_1 pozostaje bez zmiany, a nawet odrobinę wzrasta od koncentracji ok. 10%. Przebieg tych zależności dla czasów T_2 i $T_{1\rho}$, jest podobny do zależności czasów relaksacji w obecności jonów paramagnetycznych (np. w roztworach wodnych jonów Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) [67]. Ponieważ sama woda utleniona nie jest paramagnetyczna, wpływ na relaksację T_1 mógłby być spowodowany zmianą lepkości wody po dodaniu H_2O_2 [89]. Zależność tę przedstawia rysunek 7.26.

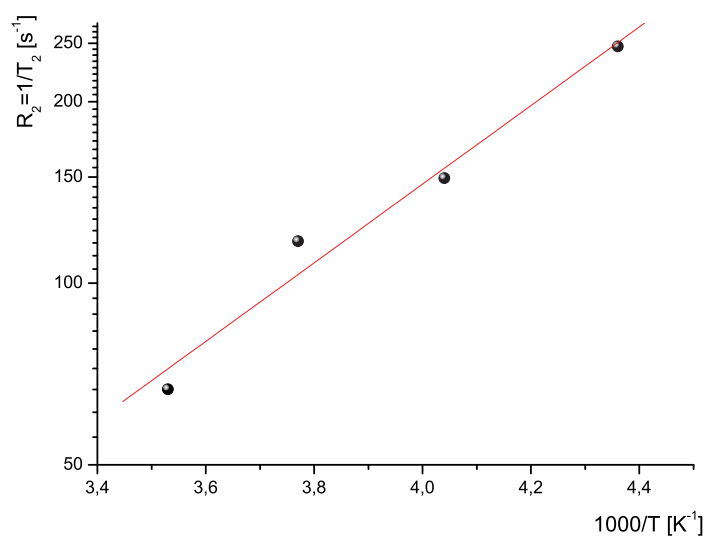


Rysunek 7.26. Zależność współczynnika lepkości roztworu H₂O/H₂O₂ od koncentracji H₂O₂

Na zachowanie się czasu relaksacji T_1 w roztworach wodnych nadtlenu wodoru wpływa również wymiana chemiczna protonów pomiędzy protonami nadtlenu wodoru i wody. Przyjmuje się, że to właśnie czas wymiany zmienia charakter zależności T_1 . Wartość czasu wymiany determinuje wartość T_1 , gdyż jest od niego krótszy i nie pozwala protonom wody, zanim się wymienia, wyrelaksować poprzez oddziaływanie dipolowe. Z kolei ten czas wymiany względem czasów relaksacji T_2 i $T_{1\rho}$ jest wystarczająco długi, żeby nie mieć wpływu na obserwowane zależności relaksacji od stężenia H₂O₂. Zatem w zależności od relacji pomiędzy czasem wymiany i czasami relaksacji, mierzone wartości czasów relaksacji zależą albo od czasu korelacji, albo od czasu wymiany (Równ. 4.4). Zależności temperaturowe dla R_1 i R_2 wykonane na spektrometrze pracującym przy częstotliwości 60 MHz w 35% roztworze nadtlenu wodoru pokazano na rysunkach 7.27 i 7.28.



Rysunek 7.27. Zależność szybkości relaksacji R_1 od odwrotności temperatury dla 35% roztworu nadtlenku wodoru w wodzie



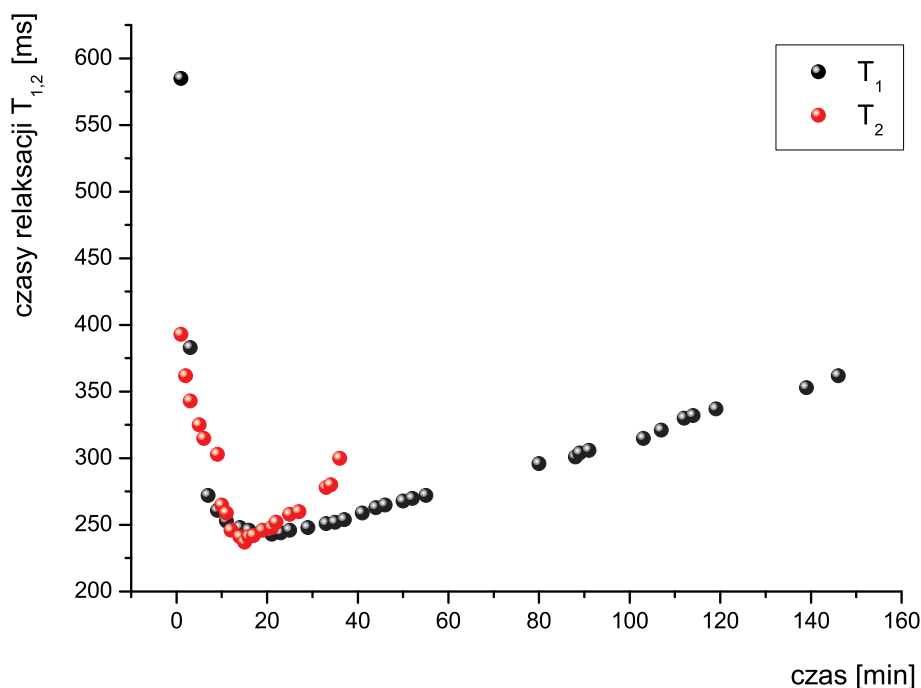
Rysunek 7.28. Zależność szybkości relaksacji R_2 od odwrotności temperatury dla 35% roztworu nadtlenku wodoru w wodzie

Wyliczone z dopasowania prostej energii aktywacji wynoszą $E(T_1)=20$ kJ/mol i $E(T_2)=12$ kJ/mol. Różnice pomiędzy tymi energiami aktywacji wskazują na fakt, że oba te procesy relaksacji (T_1 i T_2) są zdominowane przez różne parametry dynamiki molekularnej, odpowiednio czas korelacji albo czas wymiany. Jest to dowodem, że interpretacja zachowania się czasu T_1 oparta na założeniu dominującego czasu wymiany, zaś dla T_2 czasu korelacji τ_c jest poprawna.

7.5 Relaksacja w osoczu po dodaniu nadtlenu wodoru

H_2O_2 należy do aktywnych form tlenu, które inicjują procesy utleniania, przenosząc elektrony z substancji utlenianej do czynnika utleniania. Kiedy dodamy H_2O_2 do osocza, w którym naturalnie występują jony Fe i Cu, zachodzi dobrze znana reakcja Fentona (Równ. 5.1), w wyniku której powstają wolne rodniki. Pojawienie się wolnych rodników wpływa na czasy relaksacji i zmienia ich wartość. Jak pokazały nasze eksperymenty, po dodaniu H_2O_2 w proporcji 1:10 do osocza następuje proces utleniania, a obserwowane zmiany nie są natychmiastowe. Manifestuje się to ciekawym przebiegiem czasowym czasów relaksacji, mierzonych automatycznie (Rys. 7.29). Nazywamy to ewolucją czasową T_1 i T_2 .

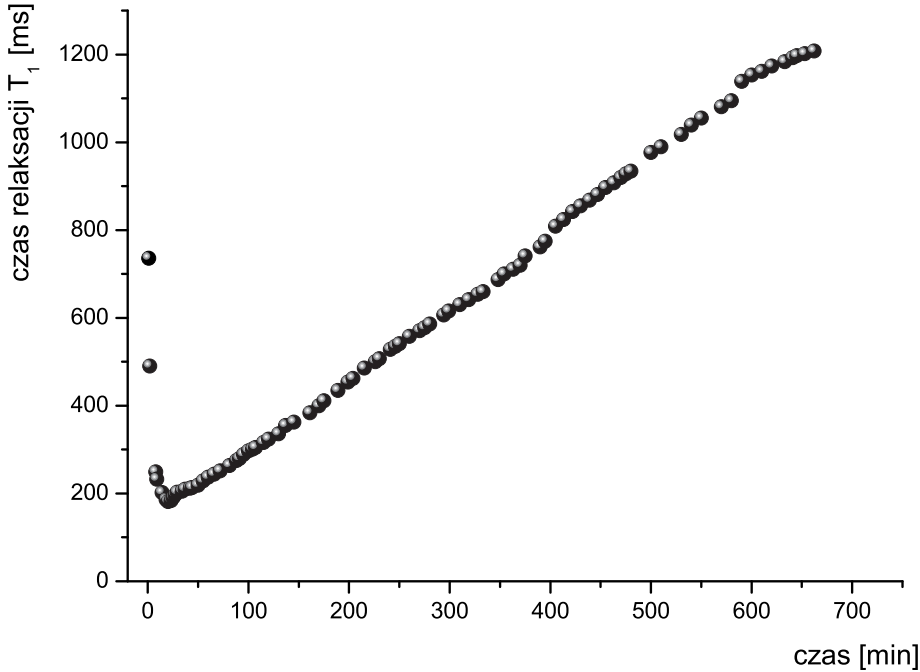
W momencie dodania wody utlenionej do wcześniej zmierzonych próbek osocza ludzkiego i dobrym wymieszaniu, zaraz na początku, następuje gwałtowne skrócenie czasów relaksacji zarówno T_1 , jak i T_2 , aż do osiągnięcia pewnego minimum, po którym zaczynają one powoli i systematycznie odrastać (Rys. 7.29). Gwałtowny spadek czasów relaksacji spowodowany jest intensywną produkcją rodników hydroksylowych, których paramagnetyczne właściwości skracają czasy relaksacji poprzez oddziaływanie spin elektronowy-jądro, zgodnie z zależnością 4.3. To charakterystyczne zachowanie się czasów relaksacji poprzez odrost ich wartości spowodowane jest, jak się przypuszcza, obronną reakcją osocza na obecność wolnych rodników (antyoksydacja).



Rysunek 7.29. Ewolucja czasowa T_1 i T_2 , dla surowicy ludzkiej po dodaniu nadtlenku wodoru o stężeniu 3% w stosunku 1:10

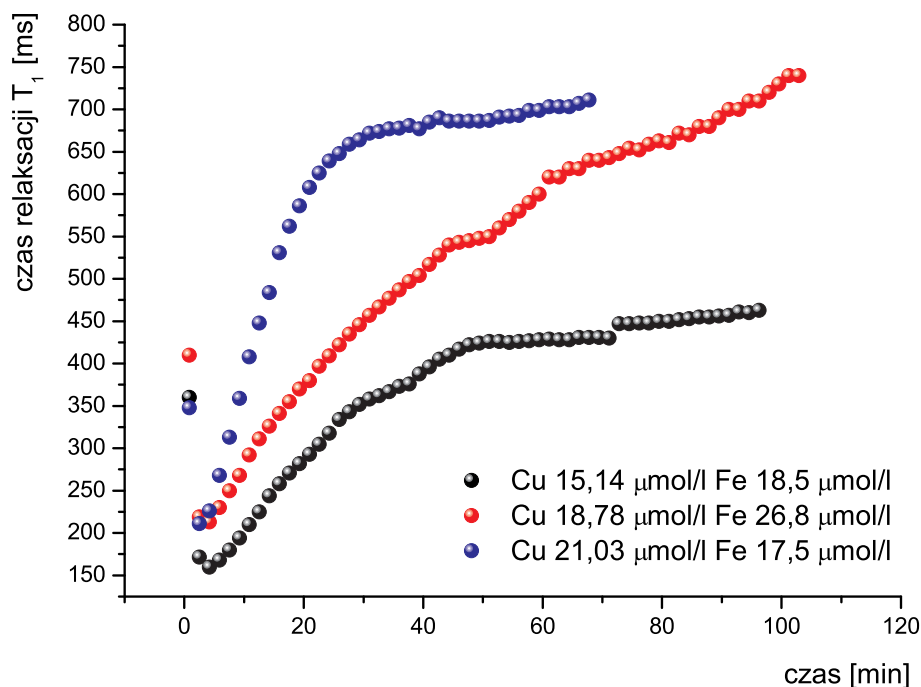
Zjawisko odrastania zaobserwowano zarówno dla osocza krwi ludzkiej, jak i króliczej, a dynamika obserwowanego procesu zależy od ilości nadtlenku wodoru dodanego do osocza krwi (Rysunki 7.29, 7.30, 7.31). Czas osiągnięcia minimum zależy od ilości dodanego nadtlenku wodoru, a także od zawartości jonów żelaza w badanej próbce i nie przekracza 5 minut. Rysunek 7.31 pokazuje ewolucje czasów relaksacji T_1 otrzymane dla osocza krwi ludzkiej o różnej zawartości Fe i Cu, oszacowanych metodą spektrofotometryczną. Z wykresu widać, że im mniej Cu, tym bardziej płaski obserwujemy odrost.

Dane przedstawione na rysunku 7.31 zostały otrzymane przez automatyczny proces pomiarowy polegający na tym, że pomiar następnego T_1 włączał się natychmiast po zakończeniu pomiaru poprzedniego. Składał się on z 6 (lub 11) sekwencji impulsów: $\pi - t - \pi/2 - FID$ z końcowym odczytem $M(t)$,



Rysunek 7.30. Ewolucja czasowa T_1 , zmierzona dla osocza ludzkiego, po dodaniu nadtlenu wodoru o stężeniu 30%

dopasowaniem eksponenty $M(t) = M_0(1 - 2e^{-t/T_1})$ i odczytem T_1 . Czas repetycji tych sekwencji wynosił $5T_1$ każdej z badanych próbek, stąd całkowity czas trwania takiego pomiaru wynosił co najmniej 1,5 minuty. Ze względu na to, że czas relaksacji, po dodaniu H_2O_2 do badanej próbki i dokładnym wymieszaniu, zaczyna szybko się zmieniać, widać, że dość długi czas pomiaru może powodować zwiększenie błędu pomiarowego T_1 . Oczywiście im szybsze zmiany T_1 , tym ta niedokładność jest większa, zaś w obszarach, gdzie ewolucja czasowa T_1 staje się bardziej płaska, pomiar T_1 będzie dokładniejszy. Aby ją oszacować, odczytujemy różnice czasów relaksacji między kolejnymi pomiarami w obszarze najszybszych zmian. Z rysunku 7.30 widzimy, że są one rzędu 3-5%. Aparaturowa dokładność pojedynczego pomiaru T_1 (w warunkach gdy T_1 jest stabilny w czasie) wynosi 2-3%. Zatem można przyjąć,

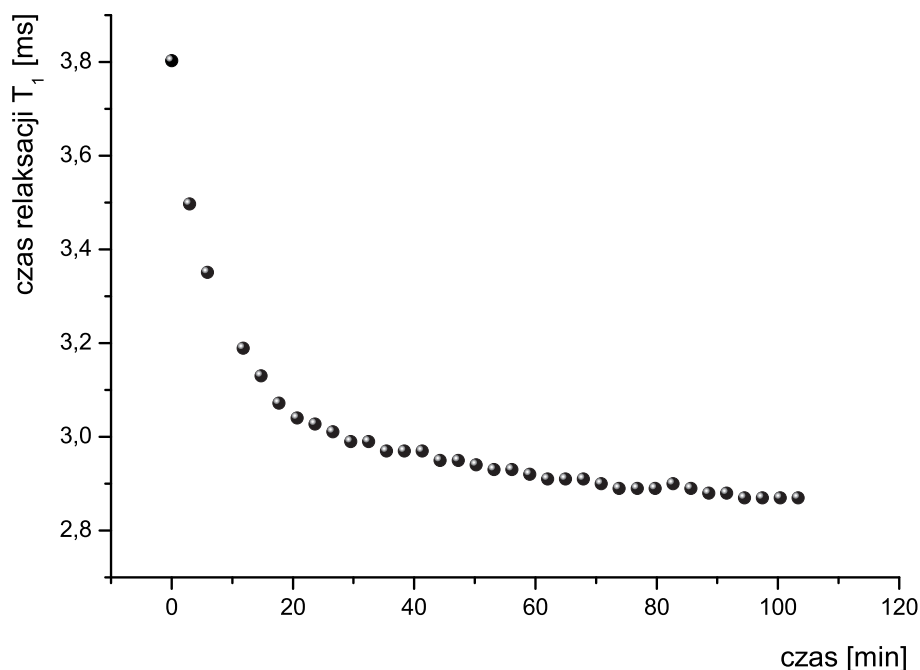


Rysunek 7.31. Ewolucja czasowa T_1 , dla trzech próbek osocza ludzkiego z różnymi, oszacowanymi fotometrycznie koncentracjami Cu i Fe, po dodaniu nadtlenku wodoru o stężeniu 3% w stosunku 1:10

że pomiar ewolucji czasowej T_1 (uśrednionego w pojedynczym pomiarze) nie zostanie znacząco zniekształcony w wyniku tych niedokładności.

Aby lepiej zrozumieć obserwowane zjawisko odrostu, wykonane zostały dodatkowe eksperymenty. Pierwszy eksperyment dotyczył wodnego roztworu FeSO_4 , do którego dodano nadtlenku wodoru o koncentracji 3% w stosunku wagowym 1:10 (Rys. 7.32). Nie wykonano pomiarów dla Cu, bowiem nie obserwowano systematycznej zależności T_1 osocza od koncentracji Cu.

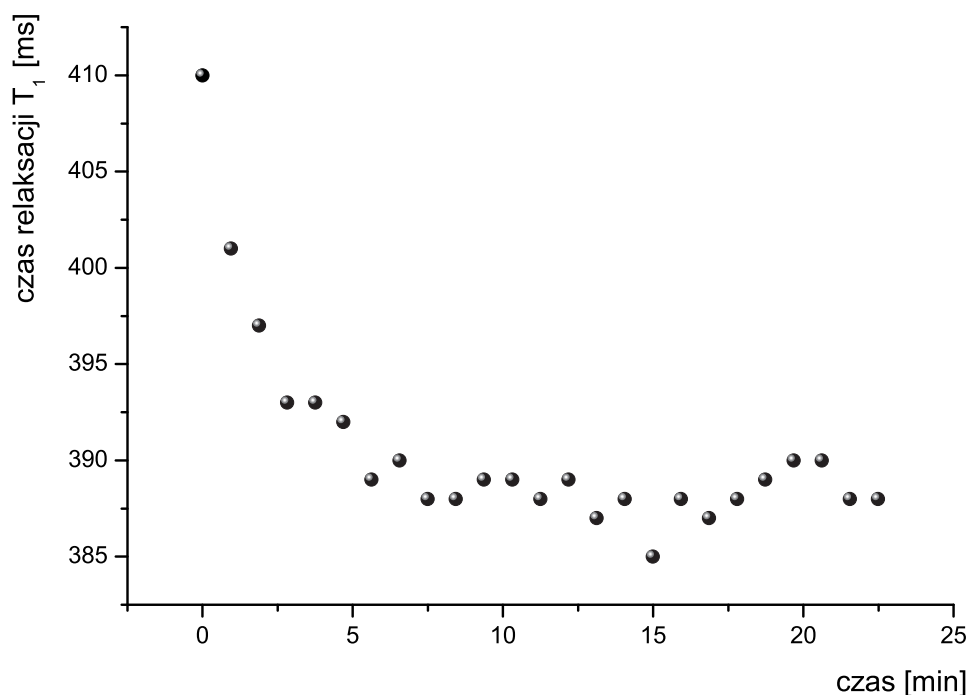
W roztworze tym, po zainicjowaniu reakcji Fentona, mierzony czas relaksacji T_1 ulegał gwałtownemu skróceniu i po pewnym czasie ustabilizował się na krótkim czasie relaksacji. Odrost czasu relaksacji nie był obserwowany. Zatem wolne rodniki pozostały w roztworze.



Rysunek 7.32. Ewolucja czasowa T_1 po dodaniu nadtlenu wodoru (3%) obserwowana w wodnym roztworze FeSO_4 (0,1 M)

Następnym eksperymentem było dodanie nadtlenu wodoru do roztworu białka albuminy krwi bydlęcej BSA (7%). Jak widać z rysunku 7.33, po dodaniu nadtlenu wodoru nastąpiło gwałtowne skrócenie czasów relaksacji, po którym nastąpiła jego stabilizacja. Lecz i w tym roztworze odrost nie był obserwowany.

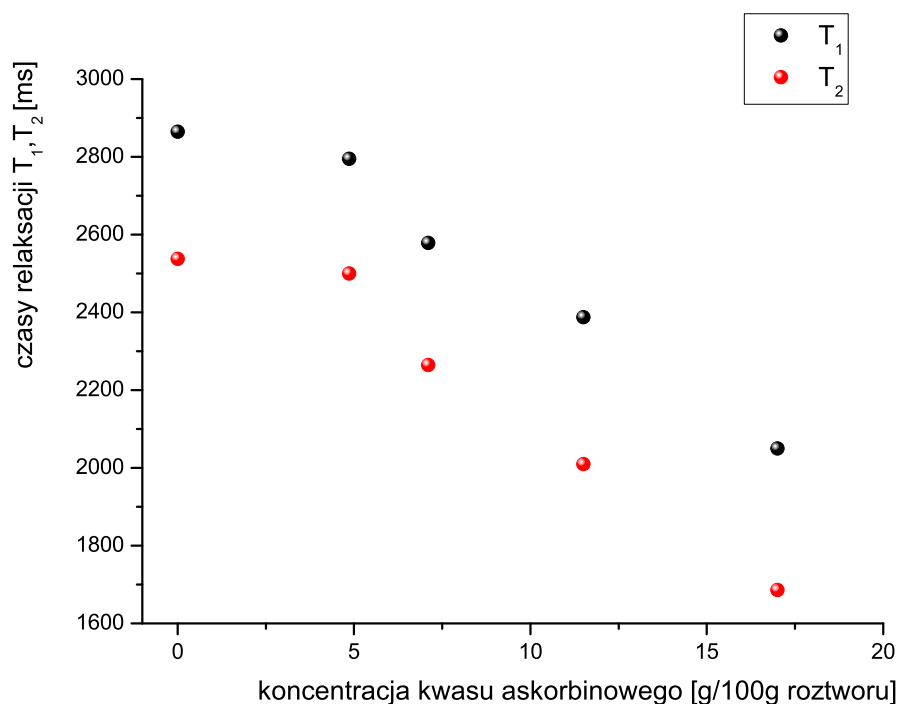
Otrzymane wyniki pokazują, że dwa ważne w relaksacji składniki osocza, jakimi są białka i jony paramagnetyczne, w osobnych roztworach nie powodują obserwowanych odrostów czasów relaksacji. Odrosty te ponownie były obserwowane w układach białek z dodatkiem antyoksydantów po wymieszaniu z nadtlenkiem wodoru. Stąd hipoteza, że w osoczu krwi są obecne antyoksydanty redukujące ilość powstałych wolnych rodników, a ich skutkiem działania są obserwowane odrosty czasów relaksacji [komunikat konf. 2014].



Rysunek 7.33. Ewolucja czasowa T_1 po dodadniu nadtlenu wodoru (3%) w stosunku 1:10 obserwowana w wodnym roztworze białka (7% BSA)

7.6 Relaksacja po dodaniu antyoksydantów

Aby potwierdzić hipotezę „antyoksydantów”, w celu wzmocnienia efektu obronnego na obecność wolnych rodników występującego w osoczu krwi, do badanych próbek dodano osobno antyutleniaczy. Była to tylko witamina C i glutation, gdyż inne antyoksydanty nie rozpuszczały się w wodzie, a to komplikowało ich dodanie do roztworu. Następnie inicjowano, jak wcześniej, procesy utleniania za pomocą dodawania H_2O_2 . W osobnych eksperymentach w pierwszej kolejności zbadano wpływ dodanych antyoksydantów (wit. C) na czasy relaksacji w czystej wodzie, gdyż ich obecność może także zmieniać ich wartości (Rys. 7.34). Można przyjąć, że użyte w doświadczeniu stężenia witaminy C zmieniały relaksację protonów wody niewiele i stabilnie. W granicach



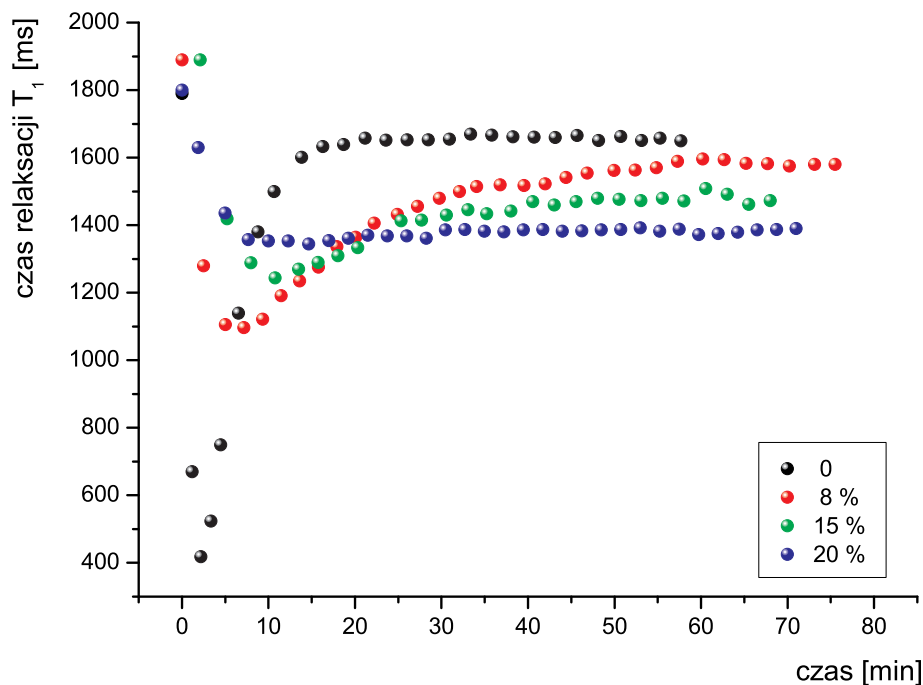
Rysunek 7.34. Zależności czasów relaksacji T_1 i T_2 od koncentracji kwasu askorbinowego (wit. C) w wodzie

koncentracji od 0 do 17% wagowo, czas relaksacji wodnego roztworu wit. C zmienia o 25% liniowo, zaś dla T_2 o 33,5%.

Wyniki eksperymentów z antyoksydantami pokazane są na rysunkach 7.35 i 7.36. Po dodaniu antyoksydantów i nadtlenu wodoru do osocza ludzkiego w proporcji 8:1:1, zarówno witamina C, jak i glutation, zmniejszają głębokość minimum osiąganego w trakcie trwania reakcji Fentona oraz zmieniają krzywą odrostu.

Obecność podwyższonej koncentracji antyoksydantów wpływa także na dynamikę przebiegu zmian czasów relaksacji. Wraz ze wzrostem stężenia dodanych antyoksydantów, można zaobserwować zmiany: głębokości osiągniętego minimum, dynamiki odrostu, a także wartości czasu relaksacji w *plateau*.

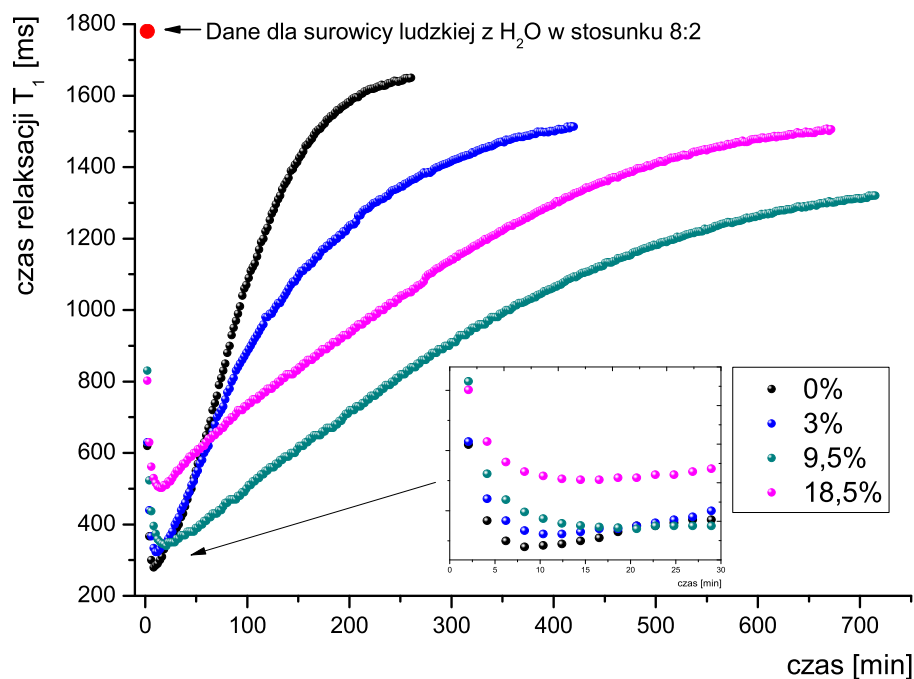
Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają naszą hipotezę istnienia dodatkowych mechanizmów antyoksydacyjnych w osoczu krwi [90].



Rysunek 7.35. Ewolucja czasowa T_1 po dodaniu nadtlenu wodoru (15%) obserwowana w surowicy ludzkiej z dodanymi różnymi stężeniami witaminy C

Na rysunku 7.37 widać próbki tego samego osocza krwi ludzkiej z dodanym nadtlaniem wodoru i różną koncentracją glutationu po 48 godzinach od zainicjowania procesu. Różniące się klarownością roztworu poszczególne próbki świadczą o odmiennym przebiegu reakcji zachodzących w tym układzie biologicznym.

Dokonano także prób dopasowania krzywych odrostu do różnych funkcji, jednakże z braku modelu żadna z nich nie dała sensownych parametrów do interpretacji. W tabelach 7.3 i 7.4 zamieszczono wartości minimalnych i ustabilizowanych czasów T_1 dla układów z dodanymi antyoksydantami: witaminą C i glutationem.



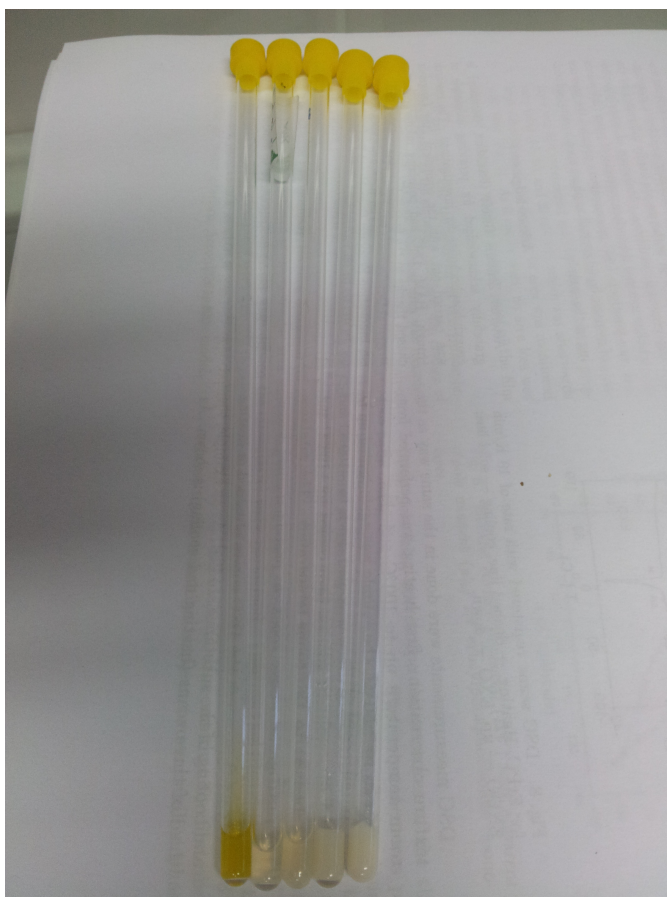
Rysunek 7.36. Ewolucja czasowa T_1 po dodaniu nadtlenu wodoru (15%) obserwowana w surowicy ludzkiej z dodanymi różnymi stężeniami glutationu; strzałką zaznaczono region powiększenia wykresu w celu lepszego zobrazowania występującego efektu

Stężenie witaminy C	Wartość minimalna T_1 [ms]	Ustabilizowane T_1 [ms]
0	418	1600
8	1097	1500
15	1244	1400
20	1344	1350

Tabela 7.3. Zależność minimalnego czasu relaksacji T_1 i jego wartości ustabilizowanej, w przebiegu relaksacji od koncentracji witaminy C w roztworze z wodą utlenioną (Rys. 7.35)

Stężenie glutationu	Wartość minimalna T_1 [ms]	Ustabilizowane T_1 [ms]
0	200	1650
3	323	1500
9,5	340	1500
18,5	503	1350

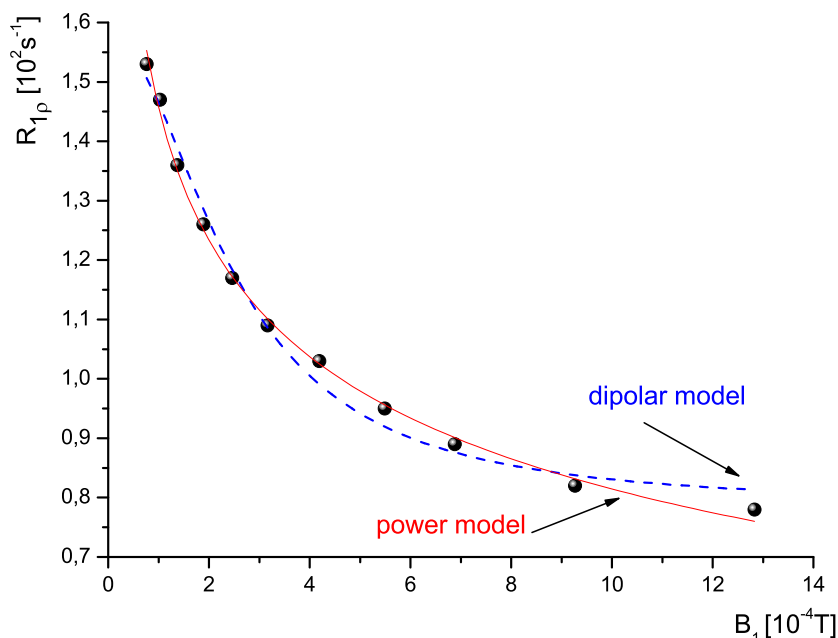
Tabela 7.4. Zależność minimalnego czasu relaksacji T_1 i jego wartości ustabilizowanej, w przebiegu relaksacji od koncentracji glutationu w roztworze z wodą utlenioną (Rys. 7.36)



Rysunek 7.37. Zmiany zachodzące w wyglądzie klarowności surowicy ludzkiej z nadtlaniem wodoru w zależności od dodanej koncentracji glutationu

7.7 Relaksacja w układzie wirującym

Jedną z ostatnio coraz częściej stosowanych dodatkowych metod relaksacyjnych są badania dyspersyjne, w szczególności wykonywanie pomiarów czasów relaksacji $T_{1\rho}$ w wirującym układzie współrzędnych dla różnych pól $\vec{B}_1$. Opis metody oraz eksperymentów został przedstawiony wcześniej w rozdz. 3 i 6. Otrzymuje się wtedy tzw. profile dyspersji (Rys. 7.38). W układach biologicznych profile dyspersji można opisać teoretycznie przy użyciu dwóch modeli w oparciu o oddziaływanie dipolowe pomiędzy protonami lub modelem „POWER” używanym w badaniach polimerów, w którym określiliśmy niektóre parametry dynamiczne wody przyłączonej do proteiny [35]. Rysunek 7.38 ilustruje przykład takiego dopasowania profili dyspersji $R_{1\rho}(B_1)$ dla próbki roztworu albuminy jaja kurzego (EWA).



Rysunek 7.38. Profile dyspersji dla albuminy białka kurzego EWA dopasowane do dwóch modeli teoretycznych

Jak widać, dwa dopasowania wynikające z ww. modeli mieszczą się w granicy błędu pomiarowego. Wyliczone tym sposobem czasy korelacji dla różnych białek zawiera tablica 7.5, zaś dla roztworów EWA o różnych koncentracjach, tabela 7.6.

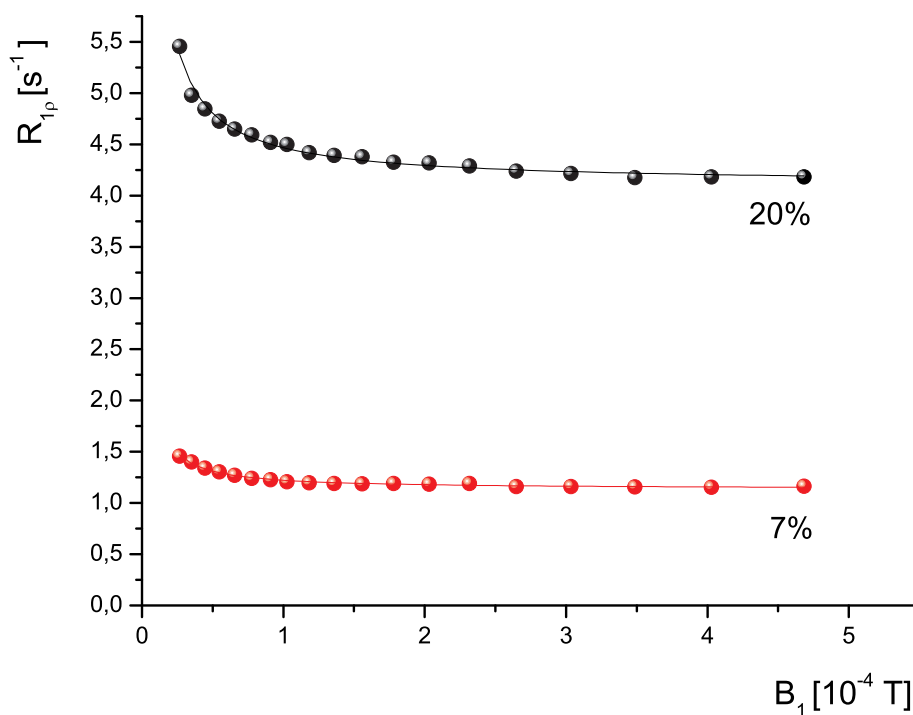
Próbka	T_1 [ms]	Czas korelacji $\tau[10^{-5}\text{s}]$
lizozym	191	1,8
albumina królicza	148	2,4
BSA (proszek)	160	0,42
BSA (roztwór)	201	0,42
EWA (proszek)	161	0,37
EWA (roztwór)	360	0,44

Tabela 7.5. Parametry otrzymane z dopasowania dipolowego profili dyspersji $T_{1\rho}$ dla różnych białek

Koncentracja EWA [% wagowo]	T_1 [ms]	Czas korelacji $\tau[10^{-5}\text{s}]$
4,0	2210	9,2
6,1	2040	6,7
8,1	1820	6,5
10,1	1650	4,9
12,8	1530	7,3
17,3	1200	5,7
24,5	776	7,0
suchy proszek	335	2,9

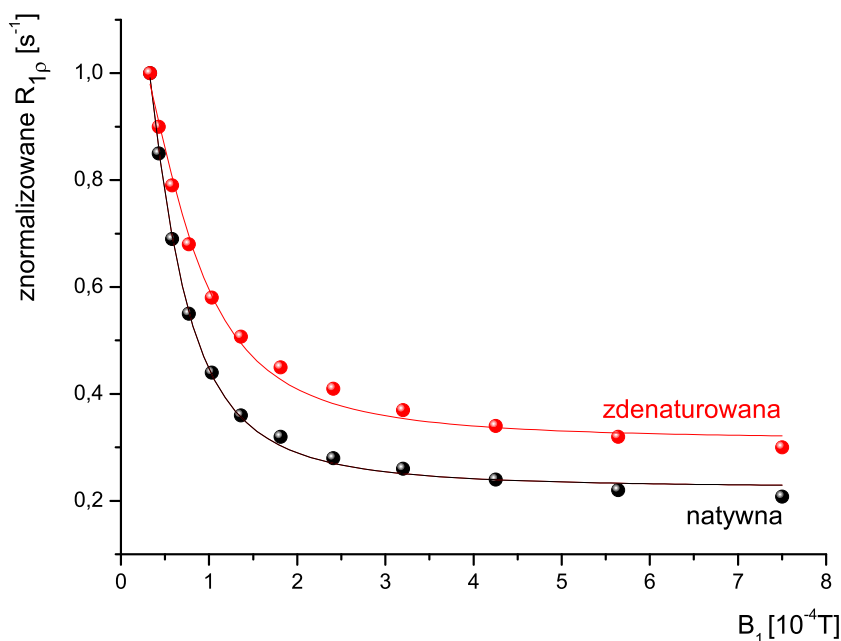
Tabela 7.6. Parametry otrzymane z dopasowania dipolowego dla różnych koncentracji (EWA)

Przydatność metody dyspersyjnej pokazana zostanie na kilku przykładach. Pierwszym z nich jest porównanie profili dyspersji dla dwóch roztworów (7% i 20%) albuminy wołowej BSA (Rys. 7.39). Oba profile dają bardzo podobne parametry dopasowania, co może oznaczać, że nie ma zależności czasu korelacji od ilości wody w roztworze. Koncentracje obu roztworów zostały bowiem dobrane tak, aby były albo powyżej, albo poniżej „koncentracji krytycznej” (7%) ocenionej z załamania liniowej zależności czasów relaksacji od koncentracji białka w roztworze (Rys. 4.1 i Tab. 7.1).



Rysunek 7.39. Profile dyspersji $T_{1\rho}$ dla dwóch próbek BSA o koncentracji 7% i 20% wraz z dopasowaniem modelu dipolowego

Na rysunku 7.40 pokazano profile dyspersji przed i po termicznej denaturacji białka dla roztworów albuminy wołowej (BSA). Proces denaturacji niszczy strukturę białka i zmienia zawartość wody związanej na powierzchni



Rysunek 7.40. Porównanie profili dyspersji dla roztworu 13,5% BSA przed i po denaturacji termicznej. Dopasowanie modelu dipolowego. Wartości $T_{1\rho}$ zostały znormalizowane poprzez założenie, że maksymalna wartość $T_1=1$

białka. Objawia się to zmianą charakteru profilu dyspersji, jak również skróceniem czasów relaksacji T_1 i korelacji [35].

Wcześniej na rysunku 3.10 przedstawiono profile dyspersji otrzymane dla 35% roztworu wodnego H_2O_2 . Na podstawie tych danych, zgodnie z modelem oddziaływania dipolowego, oszacowano czas korelacji τ (Rozdz. 3). Otrzymane wartości tego czasu mogą być nie tylko czasem korelacji, ale również czasem wymiany protonów H_2O_2 z protonami wody [34].

Jak już pokazano wyżej, z profili dyspersji można otrzymać wartości parametrów dynamiki molekularnej badanych układów biologicznych, które mogą zostać porównane z otrzymanymi innymi metodami NMR. Dlatego badania dyspersyjne $T_{1\rho}$ rozszerzają naszą wiedzę o strukturze molekularnej badanego układu.

Inną, coraz częściej stosowaną, metodą jest badanie zależności otrzymanych wartości T_2 w zależności od czasu pomiędzy impulsami π w ciągu ech CPMG (Rozdz. 6). Metoda ta nazwana jest dyspersją T_2 CPMG [36].

Rozdział 8

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań, przedstawionych wyników, a także ich dyskusji, można wysnuć następujące wnioski podkreślające oryginalne elementy pracy, są to:

- Rozwinięty opis teoretyczny relaksacji w obecności jonów paramagnetycznych pozwala na poprawne zastosowanie metod relaksacji w badanych układach biologicznych.
- Ryboflawina, która jest znana jako witamina B₂, może również działać jako środek chelatujący na jony miedzi, których nadmiar występuje w osoczu krwi (m.in. u chorych na chorobę Wilsona). Z pomiarów T_1 wynika, że wartość stężenia jonów, która powoduje efekt skracania czasu relaksacji, jest równocześnie graniczną wartością stężenia fizjologicznego u zdrowego człowieka [49]. Obecność ryboflawiny przesuwa (podobnie jak D-pen) zakres wpływu jonów Cu na T_1 ku niższym stężeniom, co świadczy o ich kompleksowaniu. Są one w tej formie mniej szkodliwe niż wolne jony paramagnetyczne Cu, powodujące powstawanie złogów nieusuńniętej miedzi z organizmu. Podobny wniosek odnosi się także do jonów manganu.
- Procesy utleniania, które w eksperymentach inicjowane były poprzez dodawanie do osocza krwi wody utlenionej, mogą być monitorowane

poprzez obserwację, zdefiniowanej w pracy po raz pierwszy, ewolucji czasowej T_1 i T_2 . Pokazuje ona wstępne szybkie skrócenie tych czasów i po osiągnięciu minimum, odrost ku wartościom początkowym. Taki przebieg zmian T_1 daje się wytłumaczyć jako działanie czynników antyoksydacyjnych obecnych w osoczu. Przeprowadzone dodatkowe eksperymenty pokazują, że tylko w osoczu obserwowany jest wyżej opisany przebieg ewolucji czasów T_1 i T_2 z odrostem. Oba wnioski potwierdzają, że zastosowanie metod relaksacyjnych NMR do badania procesów zachodzących w układach biologicznych jest jak najbardziej użyteczne.

W pracy pokazano, że przy konkretnych, dobrze postawionych pytaniach dotyczących struktury i dynamiki molekularnej próbek biologicznych, metody relaksacyjne NMR dostarczają cennych informacji. Informacje te pozwalają na lepsze zrozumienie zachodzących procesów, a dalej mogą być wykorzystane w diagnostyce medycznej opartej na obrazowaniu tomograficznym MR oraz do planowania terapii farmakologicznej niektórych schorzeń. Dodatkowo pomiary relaksacyjne znajdują szczególne zastosowanie w badaniach mózgu, gdyż, jak się okazało, spektroskopia lokalizacyjna *in vivo* nie odnosi sukcesów w diagnostyce chorób takich, jak: MS, Parkinsona, Alzheimera itp., podczas gdy analizy obrazów opartych na pomiarach czasów T_2 znacznie lepiej ilustrują zmiany charakterystyczne dla tych groźnych chorób [41]. Dlatego metodę użytą w tej pracy należy traktować jako wartościową.

Dodatek A

Spis komunikatów, wystąpień ustnych i publikacji

A.1 ESMRMB Meetings

- 6-8 października 2011– Lipsk, Niemcy - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology.

Prezentowany plakat: „Riboflavin (vitamin B2) may be used as a potential chelate in Wilson disease: Magnetic resonance relaxation study”.

Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine-Magma-Springer- Vol 24/ Suppl 1/October 2011-DOI:10.1007/s10333-011-0268-5 (271-543) ISSN 0968-5243 ISSN,

- 4-6 października 2012– Lizbona, Portugalia - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology.

Prezentacja multimedialna (e-poster): „Blood serum demonstrates antioxidant mechanism: a Magnetic Resonance Relaxation Study”.

Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine-Magma-Springer- Vol 25/ Suppl 1/October 2012-DOI:10.1007/s10334-012-0325-8 (339-628) ISSN 0968-5243,

- 3-5 października 2013– Tuluza, Francja - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology.

Prezentacja multimedialna (e-poster): „The potential applications of dispersion profiles method in NMR imaging”.

Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine-Magma-Springer- Vol 26/ Suppl 1/October 2013-DOI:10.1007/s10334-013-0385-4 (405-521) ISSN 0968-5243.

A.2 Ampere NMR Schools

Prezentowane plakaty i wystąpienia ustne:

- „NMR relaxation in solutions of hydrogen peroxide and paramagnetic ions”, Wierzba, 2008,
- „NMR relaxation measurements in the study of oxidative processes in blood serum”, Zakopane, 2009,
- „ $T_{1\rho}$ dispersion profile in presence of paramagnetic ions”, Wierzba, 2010,
- „Study of oxidative processes in blood serum using relaxation measurements”, prezentacja ustna, Wierzba, 2010,
- „NMR relaxation in the rotating frame as a tool to investigations of molecular dynamics of proteins”, Zakopane, 2011,
- „Riboflavin (vitamin B2) may be used as a potential chelate in Wilson disease: Magnetic resonance relaxation study”, prezentacja ustna, Zakopane, 2011.

A.3 Seminaria grudniowe Instytutu Fizyki Jądowej w Krakowie

Prezentowane plakaty:

- „Badania relaksacyjne roztworów nadtlenu wodoru”, grudzień 2007,
- „Fenton reaction kinetics in blood serum investigated by NMR relaxation method”, grudzień 2008,
- „NMR relaxation measurements in the hydrogen peroxide solutions”, grudzień 2008,
- „Wpływ obecności jonów miedzi na relaksacje surowicy krwi”, grudzień 2009,
- „Monitoring of chelation processes using NMR relaxation method”, grudzień 2010,
- „Investigation of paper samples using $T_{1\rho}$ dispersion profiles”, grudzień 2010.

A.4 Inne

- „Water molecule contribution to proton magnetic relaxation in rotating frame in proteins” - Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism, Kraków, 2011,
- „Antioxidative properties of blood serum: Magnetic Resonance Relaxation” Approach-VI Kraków-Winnipeg Conference on Advanced Bioimaging Technologies, wrzesień 2011,
- „Diagnostic aspects of NMR relaxation measurements” - International Conference on Medical Physics and Engineering - Physics and Engineering for Health and Wellness of Society, wystąpienie ustne, Poznań, 2011,

- „The potential applications of dispersion profiles method in NMR imaging” - Physics and Engineering for Health and Wellness of Society, Poznań.

A.5 Publikacje

- „Badanie procesów utleniania osocza krwi metodami relaksacyjnymi (NMR Investigation of oxidative processes of blood serum using NMR relaxation methods)” Lech W. Skórski, Bogdan Solnica, Barbara Blicharska Praca oryginalna: Diagnostyka laboratoryjna - Journal of Laboratory Diagnostics, (47):85-89, 2011 - ISSN 0867 – 4043,
- „Molecular dynamics in biological systems observed by NMR relaxation in rotating Frame” – Lech W. Skórski, Dorota Wierzuchowska, Barbara Blicharska, Acta Physica Polonica A – (121):434-438, 2012 - ISSN 0587-4246

A.5.1 Publikacje w trakcie przygotowania

- „Kinetics of oxidation processes in protein solutions observed by NMR relaxation measurements”- Dorota Wierzuchowska, Alex MacKay, Lech Skórski, Barbara Blicharska,
- „Oxidation processes in blood serum, observed by NMR relaxation method”- Lech W. Skórski, Hartwig Peemoeller, Barbara Blicharska,
- „Chemical exchange processes in hydrogen peroxide solution observed by NMR methods” – Lech W. Skórski, Hartwig Peemoeller, Jan Kobierski, Barbara Blicharska,
- „ $T_{1\rho}$ dispersion in presence of paramagnetic ions ”- Lech W Skórski, Barbara Blicharska,

- „Riboflavin (vitamin B2) may be used as a potential chelate in Wilson disease: Magnetic resonance relaxation study” - Lech W. Skórski, Alex MacKay Barbara Blicharska,
- Dwie publikacje wynikające ze współpracy z Collegium Medicum UJ:
 - Badanie spektroskopowe płodów,
 - Badania dzieci z syndromem „FAS-Fetal Alcohol Syndrom”.

Dodatek B

Staze i praktyki

B.1 ISMRM

Uczestnictwo w ISMRM meetings and exhibitions:

- 17th Annual Meeting and Exhibition in Honolulu 2009,
- 18th Annual Meeting and Exhibition in Stockholm 2010 - „Clinical Needs and Technological Solutions”,
- 19th Annual Meeting and Exhibition in Montreal 2011 - „Clinical Needs and Research Promises”,
- 20th Annual Meeting and Exhibition in Melbourne 2012 - „Adapting MR in Changing World”,
- 21th Annual Meeting and Exhibition in Salt Lake City 2013 - „Discovery, Innovation and Application-Advancing MR for Improved Health”.

B.2 Staze

- Zakład Diagnostyki Obrazowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. 13-miesięczny naukowy staż w ramach którego zaznajomillem się z technikami obrazowania: -badanie spektroskopowe MR,

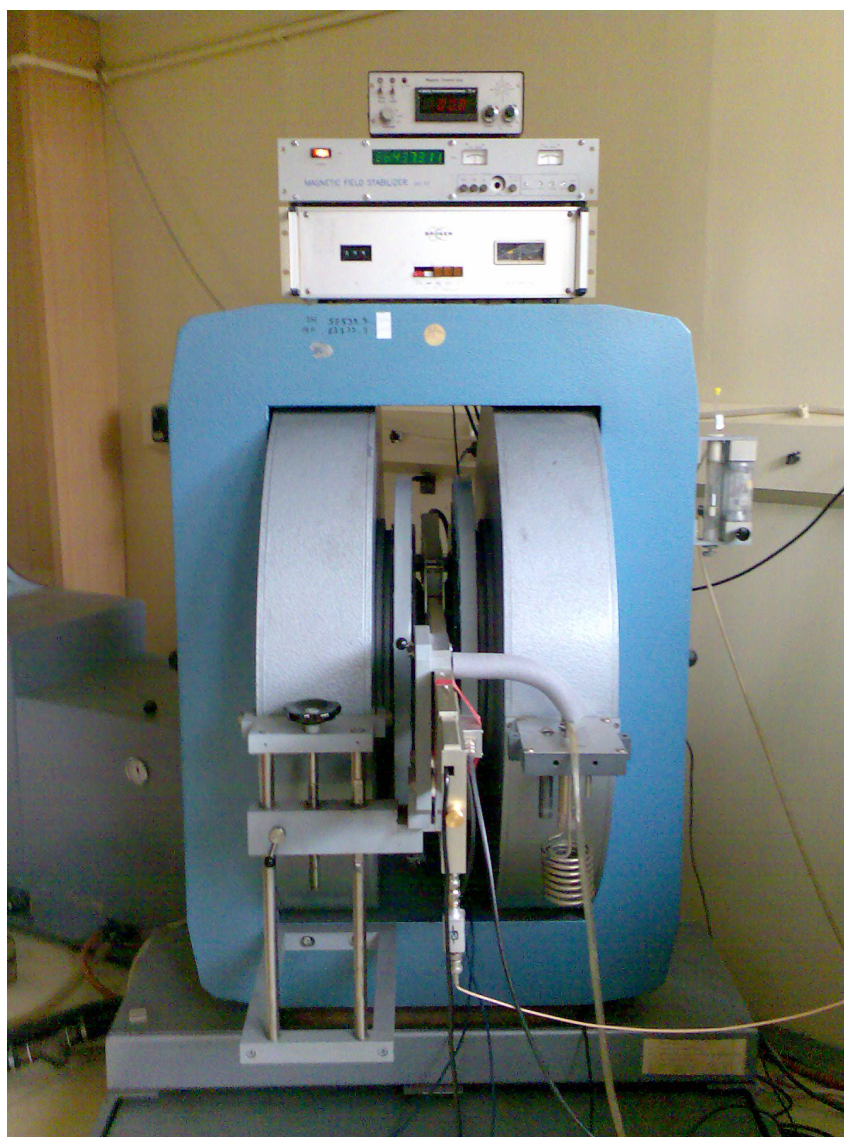
- badanie czynnościowe MR (fMRI), -badanie dyfuzyjne i perfuzja MR,
- uczestnictwo w badaniach klinicznych i 2 projektach naukowych, -
- analiza wyników (obrazowanie MR, fMRI, spektroskopia, DTI), - badania kliniczne i naukowe,
- Biomedizinische NMR Forschung GmbH AM Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie 37070 Göttingen, Niemcy, 4- tygodniowy staż naukowo-badawczy, w ramach którego uczestniczyłem w badaniach naukowych i klinicznych :
 - badaniach na dwóch systemach zwierzęcych 2,35 T i 9,4 T (MR imaging, spectroscopy, DTI),
 - badaniach funkcjonalnych mózgu na systemie ludzkim 3,0 T (fMRI).

Dodatek C

Aparatura badawcza

W trakcie studiów doktoranckich i na potrzeby niniejszej pracy miałem okazję pracować na następujących systemach rezonansu magnetycznego:

- spektrometr 1,41 T o częstotliwości 60 MHz dla protonów. Źródłem pola magnetycznego był elektromagnes. Na tym urządzeniu wykonano większość pomiarów, w IFUJ (Rys. C.1),
- spektrometr Bruker BioSpec 9,4 T częstotliwości 400 MHz dla protonów. Źródłem pola magnetycznego był magnes nadprzewodzący, w Max Planck (Rys. C.2),
- skaner MR 3T Siemens. Źródłem pola był magnes nadprzewodzący, w Max Planck (Rys. C.3),
- skaner 1,5 T General Electric. Źródłem pola był magnes nadprzewodzący, w Collegium Medicum UJ (Rys. C.4),
- skaner 0,2 T. Źródłem pola był magnes stały, w IF UJ.



Rysunek C.1. Spektrometr Bruker 60 MHz w IFUJ w Krakowie



Rysunek C.2. Spektrometr Bruker 9,4 T w Instytucie Maxa Plancka w Getyndze



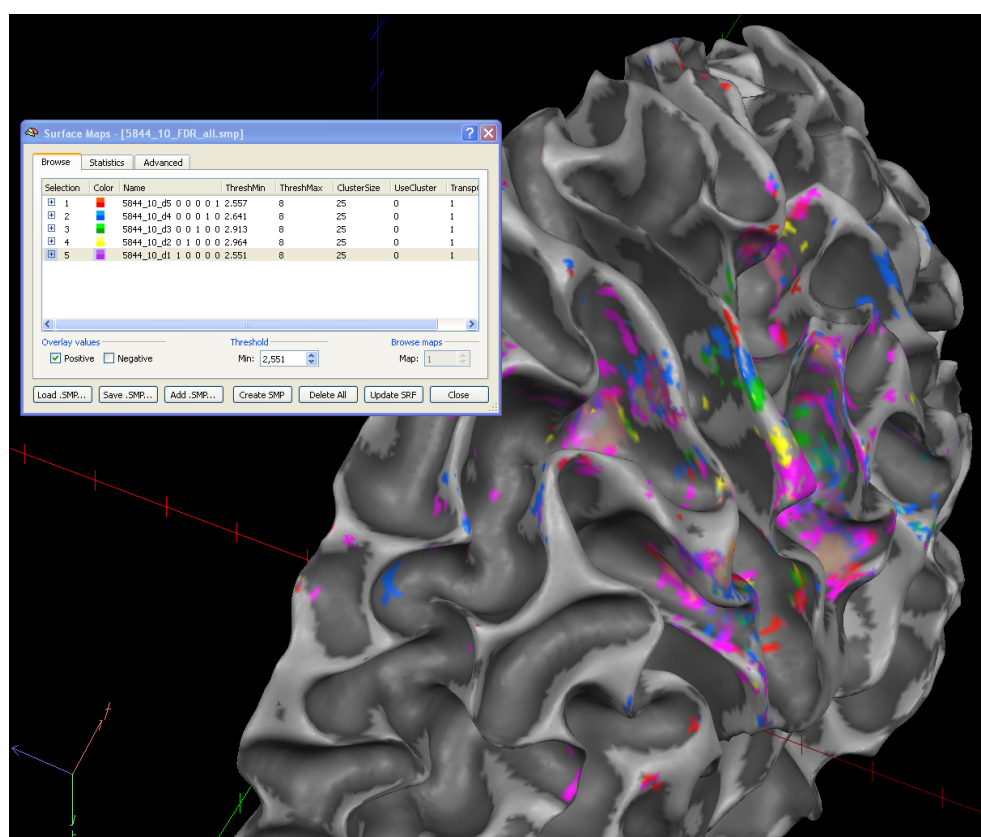
Rysunek C.3. Tomograf MR 3 T w Instytucie Maxa Plancka w Getyndze



Rysunek C.4. Tomograf MR 1,5 T w Collegium Medicum UJ (w czasie stażu)

Dodatek D

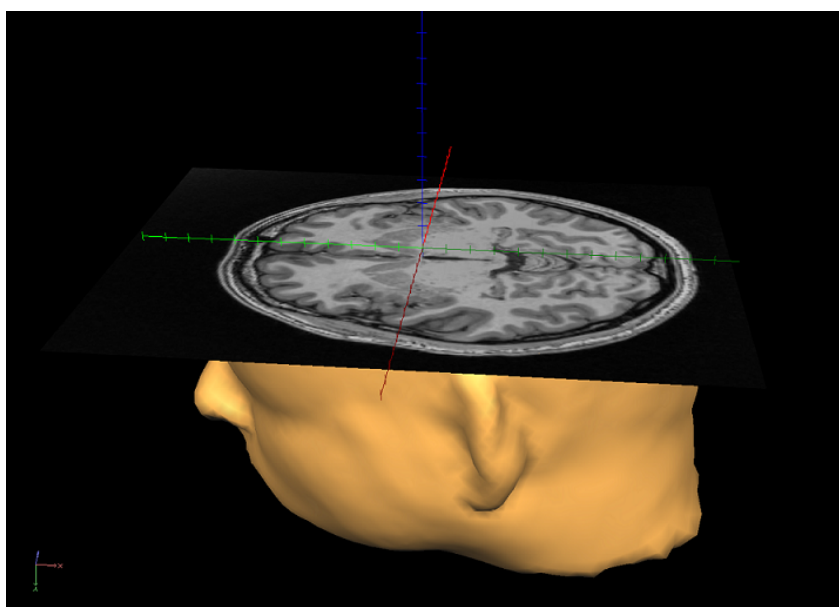
Ciekawostki



Rysunek D.1. Rezonans czynnościowy fMRI dotyku palców mojej ręki prawej. Obraz otrzymany na skanerze 3 T firmy Siemens



Rysunek D.2. Rekonstrukcja obrazu mojej głowy - 3d. Obraz otrzymany na skanerze 3 T firmy Siemens



Rysunek D.3. Rekonstrukcja obrazu mojej głowy - 3d. Obraz otrzymany na skanerze 3 T firmy Siemens

Spis tablic

3.1	Wyliczone z symulacji całki (Rys. 3.5) wartości teoretyczne dla $\tau_c = 1; 1,5; 5,2; 7,2$ ps i częstości rezonansu protonowego 60 MHz	27
7.1	Wartości stężeń granicznych dla poszczególnych białek	69
7.2	Zakres zmian szybkości relaksacji w funkcji koncentracji oraz nachylenia prostej dla poszczególnych jonów paramagnetycznych w zestawieniu z danymi literaturowymi (konfiguracją elektronową i podatnością magnetyczną)	80
7.3	Zależność minimalnego czasu relaksacji T_1 i jego wartości ustabilizowanej, w przebiegu relaksacji od koncentracji witaminy C w roztworze z wodą utlenioną (Rys. 7.35)	100
7.4	Zależność minimalnego czasu relaksacji T_1 i jego wartości ustabilizowanej, w przebiegu relaksacji od koncentracji glutationu w roztworze z wodą utlenioną (Rys. 7.36)	101
7.5	Parametry otrzymane z dopasowania dipolowego profili dyspersji $T_{1\rho}$ dla różnych białek	103
7.6	Parametry otrzymane z dopasowania dipolowego dla różnych koncentracji (EWA)	103

Spis rysunków

3.1	Orientacja wektora $\vec{r}_{jk}$ w układzie laboratoryjnym	16
3.2	Symulacje zależności szybkości relaksacji R_1 , R_2 i $R_{1\rho}$ od czasów korelacji τ dla różnych $\omega_0 = \gamma B_0$ oraz $\omega_1 = \gamma B_1$	19
3.3	Schemat jonu Cu o średnicy 2a otoczonego molekułami wody o średnicy a, d to odległość najmniejszego zbliżenia proton-jon	23
3.4	Wynik symulacji całki 3.45	25
3.5	Wynik symulacji całki pomnożony przez p	25
3.6	Wynik symulacji całki w funkcji p	26
3.7	Wynik symulacji całki pomnożony przez p , w funkcji p	26
3.8	Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji jonów CuSO_4 w wodzie, dla częstości rezonansu protonowego 60 MHz	27
3.9	Symulacja profili dyspersji dla różnych wartości τ	30
3.10	Profil dyspersji $T_{1\rho}$ otrzymany dla 35% roztworu wodnego nadtlenku wodoru w temperaturze 25° C	31
4.1	Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji albuminy jaja kurzego	35
4.2	Schematyczny rysunek oddziaływań dipolowych wpływających na procesy relaksacji w roztworach makromolekuł biologicznych [39]	36
4.3	Rodzaje oddziaływań protonów w roztworze makromolekuł . . .	37

4.4	Obrazowanie fiolek z różną koncentracją jonów paramagnetycznych i ich wpływ na czas relaksacji T_1 [46]	40
4.5	Przykładowe obrazy diagnostyczne, po zastosowaniu środków kontrastowych w celu uwidocznienia zmian (powiększone fragmenty) [39]	40
5.1	Charakterystyczne objawy choroby Wilsona a) „miś” panda na obrazie MR w mózgu [67], b) pierścień Kaysera-Fleischera	49
5.2	Drobina ceruloplazminy [77]	52
6.1	Schemat sekwencji pomiarowej T_1 IR	59
6.2	Schemat sekwencji pomiarowej T_2 CPMG	60
6.3	Schemat sekwencji pomiarowej $T_{1\rho}$	61
6.4	Fotografia serii próbek o średnicy 2 mm z różnymi koncentracjami jonów Cu, przed włożeniem do fantomu	65
6.5	Przykładowy wynik pomiaru relaksacji, otrzymywany z zaciemnienia obrazu tomograficznego MR	66
7.1	Zależność szybkości relaksacji od stężenia wodnego roztworu osocza krwi króliczej w temperaturze pokojowej	68
7.2	Histogram wartości szybkości relaksacji R_1 w próbkach osocza ludzkiego, zdrowych wolontariuszy i pacjentów szpitala uniwersyteckiego Collegium Medicum w Krakowie [83]	69
7.3	Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji w wodzie jonów miedzi Cu^{2+}	70
7.4	Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów miedzi Cu^{2+} w wodzie przedstawiona w skali logarytmicznej	71
7.5	Porównanie zależności czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów miedzi Cu^{2+} w wodzie uzyskanych przy dwóch częstościach pomiarowych 60 MHz i 400 MHz	72

7.6	Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji dla jonów miedzi CuSO_4 w osoczu króliczym w skali logarytmicznej	73
7.7	Schemat zależności czasu relaksacji T_1 od koncentracji wstrzykniętych roztworów jonów miedzi Cu^{2+} z oceną zaciemnienia obrazu MRI	74
7.8	Szybkość relaksacji R_1 od koncentracji jonów żelaza Fe^{2+} w roztworze wodnym FeCl_2	75
7.9	Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów żelaza w roztworze wodnym FeCl_2 w skali logarytmicznej	76
7.10	Zależność czasów relaksacji T_1 od koncentracji dodanych jonów żelaza Fe^{2+} w osoczu krwi króliczej	76
7.11	Zależność czasów relaksacji T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$ od koncentracji jonów żelaza Fe^{2+} w wodzie	77
7.12	Wartości czasów relaksacji T_1 , T_2 i $T_{1\rho}$ zmierzonych dla różnych próbek osocza ludzkiego, w zależności od koncentracji żelaza (oszacowanego spektrofotometrycznie)	78
7.13	Zależność szybkości relaksacji R_1 od koncentracji w wodzie dla jonów manganu w roztworze MnCl_2	79
7.14	Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów manganu MnCl_2 rozpuszczonych w wodzie, przedstawiona w skali logarytmicznej	79
7.15	Porównanie zależności szybkości relaksacji R_1 od koncentracji dla jonów miedzi, żelaza i manganu rozpuszczonych w wodzie	80
7.16	Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów Cu^{2+} w roztworach wodnych, w osoczu krwi króliczej oraz po dodaniu D-pen	82
7.17	Szybkości relaksacji R_1 w funkcji koncentracji jonów miedzi Cu^{2+} po dodaniu D-pen, zmierzone dla roztworów wodnych i osocza krwi króliczej	82

7.18	Zależność czasu relaksacji T_1 od koncentracji jonów Cu^{2+} w wodzie w zestawieniu z zależnością po dodaniu roztworu ryboflawiny w stężeniu 0,5 mg/ml oraz 1 mg/ml (spektrometr 400 MHz); strzałki schematycznie pokazują wydłużenie czasu T_1 w obecności chelatu	83
7.19	Zależności szybkości relaksacji R_1 od koncentracji jonów Cu^{2+} w wodzie i po dodaniu wodnego roztworu ryboflawiny	84
7.20	Porównanie obrazu tkanki mięsnej z tkanką z nastrzykniętym punktowo roztworem CuSO_4 o stężeniu 1 mol/l	85
7.21	Fotografia fantomu z tkanką mięsną nastrzykniętą roztworami wodnymi jonów Cu^{2+} o różnych koncentracjach oraz roztworami ryboflawiny	86
7.22	Obrazy tomograficzne MR tkanek mięsnych przedstawionych na rysunku 7.21	86
7.23	Porównanie obrazów tkanek mięsnych po iniekcji roztworów jonów miedzi Cu^{2+} i ryboflawiny	87
7.24	Widmo ^1H 35% (wagowo) wodnego roztworu nadtlenku wodoru uzyskane na spektrometrze Bruker 400 MHz w temperaturze pokojowej	88
7.25	Zależność czasów relaksacji T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$ od koncentracji H_2O_2 w roztworze wodnym w temperaturze 25°C	89
7.26	Zależność współczynnika lepkości roztworu $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ od koncentracji H_2O_2	90
7.27	Zależność szybkości relaksacji R_1 od odwrotności temperatury dla 35% roztworu nadtlenku wodoru w wodzie	91
7.28	Zależność szybkości relaksacji R_2 od odwrotności temperatury dla 35% roztworu nadtlenku wodoru w wodzie	91
7.29	Ewolucja czasowa T_1 i T_2 , dla surowicy ludzkiej po dodaniu nadtlenku wodoru o stężeniu 3% w stosunku 1:10	93

7.30	Ewolucja czasowa T_1 , zmierzona dla osocza ludzkiego, po dodaniu nadtlenu wodoru o stężeniu 30%	94
7.31	Ewolucja czasowa T_1 , dla trzech próbek osocza ludzkiego z różnymi, oszacowanymi fotometrycznie koncentracjami Cu i Fe, po dodaniu nadtlenu wodoru o stężeniu 3% w stosunku 1:10 . . .	95
7.32	Ewolucja czasowa T_1 po dodaniu nadtlenu wodoru (3%) obserwowana w wodnym roztworze FeSO_4 (0,1 M)	96
7.33	Ewolucja czasowa T_1 po dodadniu nadtlenu wodoru (3%) w stosunku 1:10 obserwowana w wodnym roztworze białka (7% BSA) . . .	97
7.34	Zależności czasów relaksacji T_1 i T_2 od koncentracji kwasu askorbinowego (wit. C) w wodzie	98
7.35	Ewolucja czasowa T_1 po dodaniu nadtlenu wodoru (15%) obserwowana w surowicy ludzkiej z dodanymi różnymi stężeniami witaminy C	99
7.36	Ewolucja czasowa T_1 po dodaniu nadtlenu wodoru (15%) obserwowana w surowicy ludzkiej z dodanymi różnymi stężeniami glutationu; strzałką zaznaczono region powiększenia wykresu w celu lepszego zobrazowania występującego efektu	100
7.37	Zmiany zachodzące w wygładzie klarowności surowicy ludzkiej z nadtlaniem wodoru w zależności od dodanej koncentracji glutationu	101
7.38	Profile dyspersji dla albuminy biała kurzego EWA dopasowane do dwóch modeli teoretycznych	102
7.39	Profile dyspersji $T_{1\rho}$ dla dwóch próbek BSA o koncentracji 7% i 20% wraz z dopasowaniem modelu dipolowego	104
7.40	Porównanie profili dyspersji dla roztworu 13,5% BSA przed i po denaturacji termicznej. Dopasowanie modelu dipolowego. Wartości $T_{1\rho}$ zostały znormalizowane poprzez założenie, że maksymalna wartość $T_1=1$	105

C.1	Spektrometr Bruker 60 MHz w IFUJ w Krakowie	118
C.2	Spektrometr Bruker 9,4 T w Instytucie Maxa Plancka w Getyndze	119
C.3	Tomograf MR 3 T w Instytucie Maxa Plancka w Getyndze . . .	120
C.4	Tomograf MR 1,5 T w Collegium Medicum UJ (w czasie stażu) .	120
D.1	Rezonans czynnościowy fMRI dotyku palców mojej ręki prawej. Obraz otrzymany na skanerze 3 T firmy Siemens	121
D.2	Rekonstrukcja obrazu mojej głowy - 3d. Obraz otrzymany na ska- nerze 3 T firmy Siemens	122
D.3	Rekonstrukcja obrazu mojej głowy - 3d. Obraz otrzymany na ska- nerze 3 T firmy Siemens	122

Bibliografia

- [1] O. Daszkiewicz, J. Hennel, T. Szczepkowski B. Lubaś. Proton Magnetic Relaxation and Protein Hydration. *Nature*, 200:1006–1007, 1963.
- [2] R. Damadian. *NMR in Medicine*. NMR Basic Principles and Progress. Springer-Verlag, Berlin, 1981.
- [3] B. Blicharska, A. Bijak, M. Witek. Magnetyczny rezonans jądrowy fluoru ^{19}F i jego zastosowania medyczne. *Diagnostyka Laboratoryjna*, 43:139–154, 2007.
- [4] N. Smirnoff. Tansley review No.52. The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125:27–58, 1993.
- [5] C.E. Thomas, L.A. Morehouse, S.D. Aust. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 260:3275–3280, 1985.
- [6] L.J. Berliner, V. Khramtsov, T.L. Clanton, H. Fujii. NMR and MRI spin trapping: Using NMR to learn about free radical reactions. *Current Topics in Biophysics*, 1(26):21–27, 2002.
- [7] H. Harańczyk. *On Water In Extremely Dry Biological Systems*. Wydawnictwo UJ, Kraków, 361 2003.
- [8] K. Lee. Relaxation. In *Physics for physicist*, Montreal, 2011. International Society for Magnetic Resonance in Medicine.

-
- [9] *Wielka Encyklopedia Powszechna*. PWN, Warszawa, 1965.
- [10] A.P. Rinck. Magnetic Resonance in Medicine. *ABW-Wissenschaftsverlag*, 5, 2003. The Basic Textbook of the European Magnetic Resonance Forum.
- [11] R.J. Abraham, J. Fisher, P. Loftus. *Introduction to NMR spectroscopy*. Oxford University, 1961.
- [12] J. Hennel. *Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego*. IFJ, Kraków, 1997.
- [13] A.Z. Hryniewicz, E. Rokita. *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 1999. Rozdział 4.
- [14] H. Zhang. Mechanisms of spin relaxation at the atomic molecular level. In *MR Physics for Physicist*, Stockholm, 2010. International Society for Magnetic Resonance in Medicine.
- [15] F. Xu, T.Y. Liu, Y.R. Huang. Theoretical description and numerical computation of the relaxation of multi-spin system in the presence of an RF field. *Acta Physica Sinica*, 55:3054–3059, 2006.
- [16] R. Kubo. Stochastic Liouville Equations. *Journal of Mathematical Physics*, 4:174–183, 1963.
- [17] J.S. Blicharski. *Efekty Interferencyjne w Magnetycznym Rezonansie Jądrowym*. Raport IFJ, Kraków, 1972.
- [18] Bruker. *Almanac*. 2011.
- [19] B. Blicharska. *Nuclear Magnetic Relaxation of Methyl Group in Liquids*. IFJ w Krakowie, Kraków, 1986. Raport 1341/PL.
- [20] D. Kruk, A. Milewska. ^1H nuclear magnetic relaxation dispersion as a source of information on electron spin relaxation. *Current Topics in Biophysics*, suppl A:33:125–128, 2010.

- [21] J. Kowalewski. *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments, and Applications*, chapter 7. Taylor and Francis, New York, London.
- [22] J.W. Hennel. *O procesie magnetycznej relaksacji protonów w niektórych cieczach*. Raport IFJ, Kraków, 1966.
- [23] J.S. Blicharski, D. Kruk. NMR Relaxation Spectroscopy. *Applied Magnetic Resonance*, 17:367–374, 1999.
- [24] B. Blicharska. *Magnetyczna Relaksacja Jądrowa grupy metylowej i wody w roztworach*. Rozprawy Habilitacyjne. Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 245 1992.
- [25] J.S. Blicharski. Nuclear magnetic relaxation in rotating frame. *Acta Physica Polonica*, A:223–236, 1972.
- [26] A. Rachocki, J. Tritt-Goc. How we can interpret the T_1 dispersion of MC, HPMC and HPC Polymers above glass temperature. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, (30):192–197, 2006.
- [27] J. Tritt-Goc, N. Piślewski. Magnetic resonance imaging study of the swelling kinetics of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) in water. *Journal of controlled release*, 80:79–86, 2002.
- [28] B. Blicharska, Z. Florkowski, J. Hennel, G. Held, F. Noack. Investigation of Protein Hydration by Proton Spin Relaxation Time Measurements. *Biochimica Biophysica Acta*, 207:381–389, 1970.
- [29] J. Kowalewski, D. Kruk, G. Parigi. NMR relaxation in solution of paramagnetic complexes: recent theoretical progress for $S \geq 1$. *Advances in Inorganic Chemistry*, 57:41–104, 2005.
- [30] T. Nilsson. Nuclear Spin Relaxation in Paramagnetic Complexes in Solution. *Department of Physical, Inorganic and Structural Chemistry Stockholm University*, 2000. Doctoral Dissertation.
- [31] J.S. Blicharski. Oddziaływanie jonów paramagnetycznych na procesy relaksacji NMR. Komunikat prywatny, 2013.

- [32] H. Haken, H.C. Wolf. *Atomy i kwanty-Wprowadzenie do współczesnej spektroskopii atomowej*. PWN, Warszawa, 2002.
- [33] J. Stankowski, W. Hilczer. *Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych*. PWN, Warszawa, 2005.
- [34] B. Blicharska, H. Peemoeller, M. Witek. Hydration water dynamics in biopolymers from NMR relaxation in the rotating frame. *J.Magn Reson*, 207:287–293, 2010.
- [35] L. Skórski, D. Wierzuchowska, B. Blicharska. Molecular dynamics in biological systems observed by NMR relaxation in rotating frame. *Acta Physica A*, 121:434–438, 2012.
- [36] D. Wierzuchowska, B. Blicharska. Molecular Dynamics of Proteins Investigated by NMR relaxation Methods. *Acta Physica Polonica A*, 125:907–910, 2014.
- [37] R. Damadian. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. *Science*, 171:1151–1153, 1971.
- [38] J.P. Hawranek, L. Sobczyk. *Zjawiska relaksacji molekularnej*. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 1999. Praca zbiorowa.
- [39] C.C. Quarles. Tissue Microstructure and Molecular Factors that Govern MRI Contrast. In *MR Physics for Physicist*, Honolulu, 2009. International Society for Magnetic Resonance in Medicine.
- [40] A. Yilmaz, F. Ulak, M. Batur. Proton T_1 and T_2 relaxivities of serum proteins. *Magnetic Resonance Imaging*, 22:683–688, 2004.
- [41] A. MacKay, C. Laule, I. Vavasour, T. Bjarnason, S. Kolind, B. Mader. Insights into brain microstructure from the T-2 distribution. *Magnetic Resonance Imaging*, 24:515–525, 2006.
- [42] K. Whittall, A. MacKay. Quantitative interpretation of NMR relaxation data. *Journal of Magnetic Resonance*, 84:134–152, 1989.

- [43] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi. *Solution NMR of paramagnetic molecules - applications to metallobiomolecules and models*, volume 2. Elsevier, 2001.
- [44] M. Witek, H. Peemoeller, J. Szymońska B. Blicharska. Investigation of starch hydration by 2D time domain NMR. *Acta Physica Polonica A*, 109:359–364, 2006.
- [45] H. Peemoeller, A.R. Sharp. NMR study of cellulose-water systems: water proton spin-lattice relaxation in the rotating reference. *Polymer*, 26:859–864, 1985.
- [46] P.M. Jakob. Physical Mechanisms of Contrast Agents. In *MR Physics for Physicist*, Honolulu, 2009. International Society for Magnetic Resonance in Medicine.
- [47] B.R. Persson, L. Malmgren, L.G. Salford. Paramagnetic Ions Affect Relaxation Rate Dispersion of Blood: Implications for Magnetic Resonance Relaxation Dispersion Imaging. *Journal of Bioengineering Biomedical Sciences*, 2:1–8, 2012.
- [48] R.B. Lauffer. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chemical Review*, 87:901–927, 1987.
- [49] S. Baharath, M. Hsu, D. Kaur. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 64:1037–1048, 2002.
- [50] W. Droge. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82:47–95, 2002.
- [51] M. Valko, D. Leibfritz, J. Monocol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39:44–84, 2007.
- [52] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160:1–40, 2006.

- [53] P. Foley, P. Riederer. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *Brain Research Reviews*, 247:82–94, 2000.
- [54] J. Fiedor, K. Burda. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, 6:466–468, 2014.
- [55] K. Burda. *Paradoks tlenowy*. IBM. Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków, Wykład 8 II rok. Biofizyka.
- [56] M.T. Carri, A. Ferri, M. Cozzolino, L. Calabrese, G. Rotilio. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Research Bulletin*, 61:365–374, 2003.
- [57] D.S. Cassarino, J.P. Bennett. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, 29:1–25, 1999.
- [58] G. Bartosz. *Druga Twarz Tłenu*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- [59] B. Halliwell, J. Gutteridge. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J*, 219:1–14, 1984.
- [60] J.P. Kehrer. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149:43–50, 2000.
- [61] I. Nieumywakin. *Woda utleniona na straży zdrowia*. Hartigrama, Warszawa, 2008.
- [62] S.C. White, M.J. Pharoah. *Radiologia stomatologiczna*. Wyd. Czelej, Lublin, 2002.
- [63] http://www.histologia.cm-uj.krakow.pl/AGH/Lectures/3_krew_miesn.pdf.
- [64] T. Cichocki, J. Litwin. *Kompendium histologii*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2002.
- [65] L. Stryer. *Biochemia*. PWN, Warszawa, 1997.

- [66] J. Chwiej. *Promieniowanie synchrotronowe w badaniach składu pierwiastkowego oraz związków organicznych w komórkach nerwowych dla wybranych schorzeń neurodegeneracyjnych*. PhD thesis, Akademia Górniczo-Hutnicza, 2009.
- [67] M. Witek, B. Blicharska, A. MacKay. Estimation of free copper ion concentrations in blood serum using T_1 relaxation rates. *J. Magn Reson*, 194:41–45, 2008.
- [68] E. Akpınar, O. Akhan. Liver imaging findings of Wilson’s disease. *European Journal of Radiology*, 61:25–32, 2007.
- [69] O. Akhan, E. Akpınar, M. Karcaaltincaba, M. Haliloglu, D. Akata, A.D. Karaosmanoglu, M. Omen. Imaging findings of liver involvement of Wilson’s disease. *European Journal of Radiology*, 69:147–155, 2009.
- [70] D.S. Liebeskind, S. Wong, R.H. Hamilton. Faces of the giant panda and her cub: MRI correlates of Wilson’s disease. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 74:682, 2003.
- [71] P.J. Thompson, S. Shoham, J.R. Connor. Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Research Bulletin*, 2(55):155–164, 2001.
- [72] A.L. Bush. Metals and neuroscience. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:184–191, 2000.
- [73] R. Murray, D.K. Granner, V.W. Rodwell. *Biochemia Harpera*. PZWL, Warszawa, 2008.
- [74] A. Takeda. Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*, 41:79–87, 2003.
- [75] R.M. de Bie, R.M Gladstone, A.P Strafella, J.H. Ko, A.E. Lang. Manganese-induced Parkinsonism associated with methcathione (Ephedrone) abuse. *Arch. Neurol*, 64:886–889, 2007.
- [76] J.R. Sorenson. Copper chelates as possible active forms of the antiarthritic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 19:135–148, 1976.

- [77] <http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1KCW>.
- [78] S. Ball. *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*. Oficyna Wydawnicza Medyk, Warszawa, 2001.
- [79] S. Bharath, M. Hsu, D. Kaur, S. Rajagoplan, J.K. Andersen. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 64:1037–1048, 2002.
- [80] J.S. Bains, C.A Shaw. Neurodegenerative disorders in humans the role of glutathione in oxidative stress mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25:335–358, 1997.
- [81] A. Samii, J.G. Nutt, B.R. Ransom. Parkinson's disease. *Lancet*, 363:1783–1793, 2004.
- [82] K.H. Hausser, H.R. Kalbitzer, and G. Ślósarek. *NMR w biologii i medycynie: badania strukturalne, tomografia, spektroskopia in vivo*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Adama Mickiewicza, 1993.
- [83] M. Witek. *Badanie magnetycznej relaksacji jądrowej w amorficznych układach biologicznych*. PhD thesis, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 2006.
- [84] A.R. Lim, C.S. Kim, S.H. Choh. Effect of Paramagnetic Ions in Aqueous Solution for Precision Measurement of Proton Gyromagnetic Ratio. *Bulletin of Magnetic Resonance*, pages 240–245, 1992.
- [85] H. Grasalen, I. Svare. Proton relaxation in water and ethanol solutions of copper acetate. *Chemical Physics Letters*, 3:452–454, 1969.
- [86] U. Duwuri, R. Reddy, S.D. Patel, J.H. Kaufman, J.B. Kneeland, J.S. Leigh. $T_{1\rho}$ relaxation in articular cartilage: effects of enzymatic degradation. *Magnetic Resonance in Medicine*, pages 863–867, 1997.
- [87] A.T. Bell. Quantitative analysis of hydrogen peroxide by ^1H NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 381:1289–1293, 2005.

-
- [88] L. Biljbasich, B. Blumich, S. Stapf. Reaction monitoring of hydrogen peroxide decomposition by NMR relaxometry. *Chemical Engineering Science*, 4(65):1394–1399, 2010.
- [89] L. Skórski, B. Blicharska, B. Solnica. Badanie procesów utleniania osocza krwi metodami relaksacyjnymi NMR. *Diagnostyka Laboratoryjna*, 47(1):85–89, 2011.
- [90] J. Fiedor, A. Sulikowska, A. Orzechowska, L. Fiedor, K. Burda. Antioxidant effects of carotenoids in a model pigment-protein complex. *Acta Biochimica Polonica*, 59:61–64, 2012.