

MAGNETSKE REZONANCIJE U BIOMEDICINSKIM ISTRAŽIVANJIMA *

M. Šentjerc

Institut Jožef Stefan, Univerza E. Kardelja, Ljubljana

Primljeno 10. XI. 1988.

Prikazana je primjena metoda magnetskih rezonancija – elektronske magnetske rezonancije (EPR) i nuklearne magnetske rezonancije (NMR) u biomedicinskim istraživanjima. Opisani su primjeri istraživanja u kojima se metoda EPR koristi za određivanje mikrogeografije aktivnog centra enzima acetilkolinesteraze i mjerenje konformacijskih promjena pod utjecajem kolinergičnih supstancija, za proučavanje promjena u fluidnosti staničnih membrana pod utjecajem neurotoksina, za određivanje transporta kokarcinogena, forbolestera kroz stanične membrane, te transporta molekula kroz tkiva s pomoću gradijenta magnetskog polja. Opisani primjeri istraživanja metodom NMR odnose se na njenu primjenu za proučavanje metaboličkih osobina skeletnih mišića, karakterizaciju tumora mozga *in vitro* i moguću dijagnozu tumora i raznih drugih patoloških stanja *in vivo*.

Magnetske rezonancije su spektroskopske metode kojima promatramo određene strukturne promjene i metaboličke procese u biološkim sistemima na molekularnom nivou. One obuhvaćaju dva različita tipa metoda: to su nuklearna magnetska rezonancija (NMR) i elektronska paramagnetska (odnosno elektronska spinska) rezonancija (EPR ili ESR). S pomoću NMR gledamo atomske jezgre, koje imaju magnetski moment: u biološkim sustavima to su najčešće ^1H , ^{13}C , ^{31}P . S pomoću EPR gledamo paramagnetske centre u tvari, to znači centre kod kojih je cjelokupan magnetski moment elektrona različit od 0. To su ioni prijelaznih elemenata (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , ...), koji se u biološkim sistemima pojavljuju kao kofaktori enzima, ili slobodni radikali, koji se pojavljuju kao intermedijati u biokemijskim reakcijama. Umjesto paramagnetskih centara, koji već postoje u biosistemima, često se u sistem koji ispituje ugrađuju molekule sa slobodnim radikalom – spinski označivači. Centri s

* Predavanje održano na sastanku u Zagrebu 9. i 10. XI. 1988. u povodu 40. obljetnice Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu.

magnetskim momentom služe kao neke vrste sonda preko koje pratimo metaboličke procese u biosistemima i promjene u tim procesima u patološkim uvjetima ili pod utjecajem bioaktivnih supstancija.

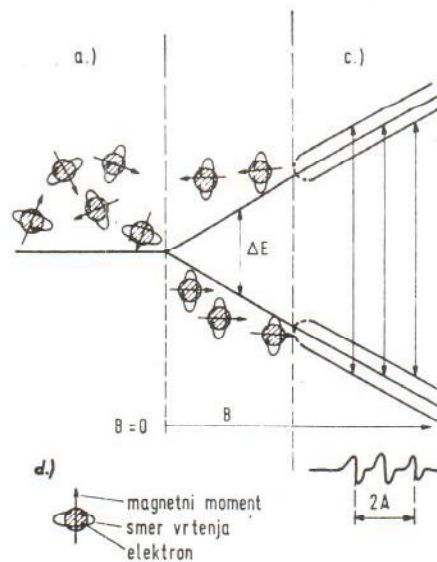
Osnovni princip magnetskih rezonancija je isti za EPR i NMR (1); razlika je u jačini i smjeru magnetskih interakcija, što uzrokuje i bitne razlike u eksperimentalnim tehnikama jedne i druge metode. U vanjskom magnetskom polju B_0 dolazi do interakcije magnetskog momenta elektrona, odnosno jezgre s tim poljem. Tu interakciju možemo opisati Hamiltonovim operatorom. Za elektron je:

$$H_s = -\mu B = g\beta B_0 S_z$$

gdje je g tenzor g za paramagnetski centar, β je magneton Bohra ($\beta = 9,27 \times 10^{-24} \text{ Am}^2$) a S_z je projekcija spina S paramagnetskog centra u smjeru magnetskog polja B_0 i zauzima vrijednosti od $-S$ do $+S$. Paramagnetski centri međusobno se razlikuju po vrijednostima g i S . Za slobodan elektron $g = 2,0023$, za slobodne radikale je oko 2,0, a za druge paramagnetske komplekse može imati različite vrijednosti od 1 do 6.

Slično je za Hamiltonov operator jezgre koji opisuje interakciju magnetskog momenta jezgre s vanjskim magnetskim poljem:

$$H_n = -g_n \beta_n B_0 I_z$$



Slika 1. Kidanje energetskih nivoa nitroksidnog radikala sa spinom elektrona $S = 1/2$ i spinom jezgre dušika $I = 1$ u magnetskom polju. b) zbog interakcije magnetskog momenta elektrona s magnetskim poljem, na nivoe sa $m_s = 1/2$ i $-1/2$, c) zbog interakcije magnetskog momenta elektrona s magnetskim momentom jezgre dušika, na nivoe sa $m_I = 1, 0$ i -1 (biperfini rascjep).

gdje je g_n tenzor g jezgre, β_n je nuklearni magneton ($\beta_n = 5,05 \times 10^{-27} \text{ Am}^2$, a I_z je projekcija spina jezgre (I) u smjeru vanjskog magnetskog polja B_0 i ima vrijednosti od $-I$ do $+I$. Jezgre se razlikuju po vrijednostima g_n i I . Za proton $g_n = 5,58$, za ^{13}C $g_n = 1,4$ a za ^{31}P $g_n = 2,26$. S obzirom na različite vrijednosti S_z odnosno I_z , elektroni, odnosno jezgre u vanjskom magnetskom polju dobivaju različitu energiju, što ima za posljedicu da se osnovni energetska nivo elektrona i jezgri dijeli na više nivoa (slika 1).

Kada tvar u magnetskom polju ozračujemo elektromagnetskim valovima energije, koja je jednaka razlici između energetskih nivoa elektrona, odnosno jezgri, ΔE , to jest kad je ispunjen rezonantni uvjet: $\Delta E = h\nu = g\beta B_0$ prelaze elektroni, odnosno jezgre, iz jednog energetskog nivoa u drugi, a pritom se apsorbira energija elektromagnetskih valova. To zamjećujemo pojavom apsorpcijskih linija na spektru (slika 1). Spektrometri obično rade kod konstantne frekvencije a mijenja se gustoća magnetskog polja. Kod gustoće magnetskog polja reda veličine 3T rezonantni uvjet za elektrone je ispunjen pri frekvenciji elektromagnetskih valova u mikrovalnom području (reda veličine 10 GHz), a za jezgre u području radiofrekvencija (reda veličine 10 MHz), što je posljedica tisuću puta manje vrijednosti β_n za jezgre u usporedbi sa β za elektrone. Odatle proistječe i bitna razlika između EPR i NMR, koja utječe kako na samu konstrukciju EPR i NMR spektrometara tako i na informacije, koje dobivamo jednom ili drugom metodom i na osjetljivost metode. S EPR možemo detektirati koncentracije paramagnetskih centara reda veličine 10^{-7} mol/L a metoda NMR je tisuću puta manje osjetljiva.

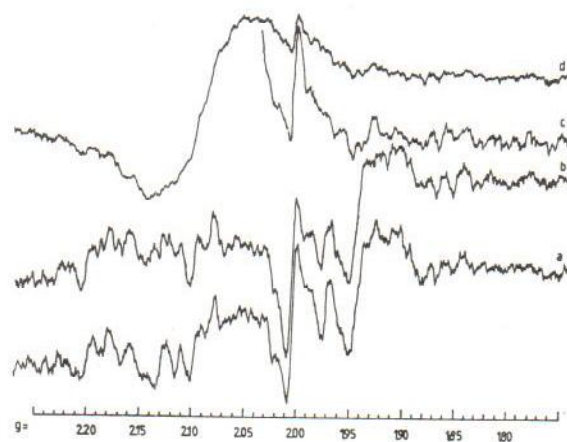
ELEKTRONSKA PARAMAGNETSKA REZONANCIJA U BIOMEDICINSKIM ISTRAŽIVANJIMA

Paramagnetski centri koji su nativni u biološkim sistemima

To su obično ioni prijelaznih elemenata, koji se pojavljuju kao kofaktori enzima ili slobodni radikali, koji nastaju kao intermedijati u biokemijskim reakcijama. Svakom paramagnetskom centru odgovara karakteristična vrijednost tenzora g , koju možemo izračunati iz položaja apsorpcijskih linija na spektru EPR, s pomoću rezonantnog uvjeta. Promjene u valentnom stanju paramagnetskog centra ili određene promjene u aktivnosti enzima, koje mogu biti posljedica patoloških procesa, možemo detektirati kao promjenu u intenzitetu apsorpcijskih linija na spektru EPR (2).

Kao primjer je na slici 2. spektar EPR izoliranih mitohondrija u reduciranom i oksidiranom stanju. Na spektru vidimo niz linija, koje odgovaraju različitim paramagnetskim kompleksima. Najtipičnija je linija kod $g = 2,004$, koja odgovara slobodnim radikalima ubikinona i semikinonskim radikalima flavina, i linija kod $g = 1,95$ koja odgovara kompleksu željeza sa sumporom i pojavljuje se samo kada je kompleks u reduciranom stanju. To se vidi i iz usporedbe spektara b (oksidirano stanje) i c (reducirano stanje) na slici 2. (3).

Tipičan primjer istraživanja iz tog područja je karakterizacija malignih tkiva s EPR (2, 4). Ustanovilo se da je u mnogim kanceroznim tkivima koncentracija slobodnih radikala manja nego u normalnim tkivima, što se tumačilo manjim brojem mitohondrija ili smanjenom aktivnošću mitohondrija u malignim tkivima (2). Isto tako

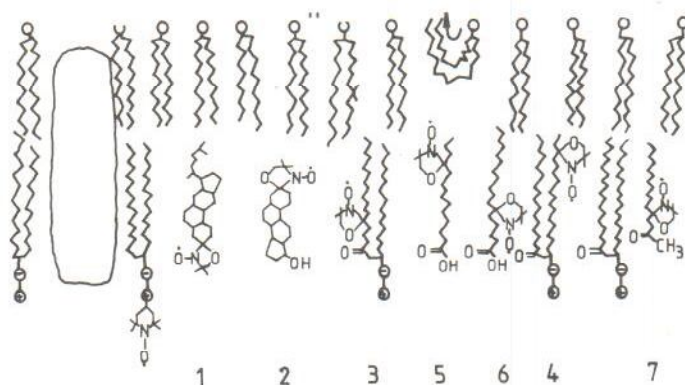


Slika 2. EPR spektar mitohondrija izoliranih prema Sauberovu postupku (25). Uvjeti mjerenja: Temperatura mjerenja $T = -160^\circ\text{C}$, jakost mikrovalova = 50 mW, modulacija 0,5 mT, pojačanje 10^4 (osim za spektar d). a) netretirani mitohondriji; b) nakon dodatka natrijevog sukcinata (reduciran); c) nakon dodatka $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (oksidiran); d) isto kao c), ali pri pojačanju 4×10^3 .

se pokazalo da je u malignim tkivima veća koncentracija kompleksa željeza sa sumporom u reduciranom stanju, što ide na račun metabolizma u anaerobnim uvjetima, koji je tipičan za određene vrste tumora (4). U nekim tumorima pojavljuje se apsorpcijska linija, koja odgovara kompleksu željeza s nitroksidom (5). Spomenute promjene daju određene podatke o metabolizmu malignih tumora, ali nisu dovoljno specifične da bi mogle poslužiti kao kriterij za karakterizaciju malignog procesa (2, 5).

Spinski označivači

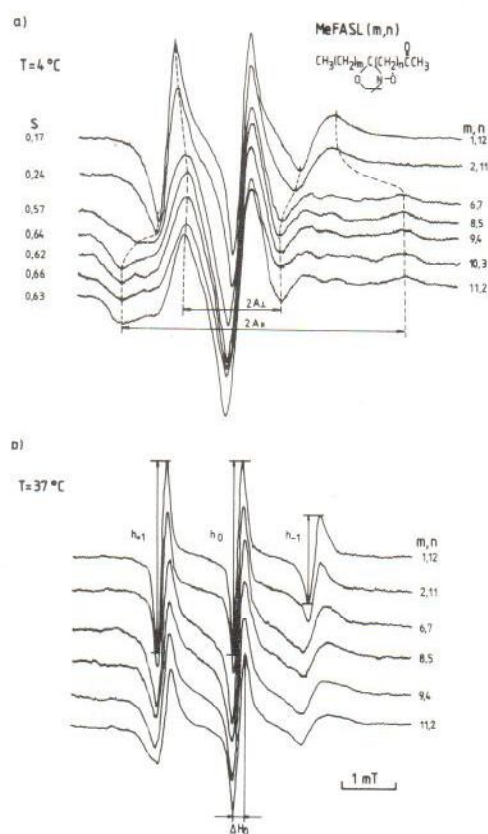
Spinski označivači su paramagnetske molekule, koje ugrađujemo u sistem koji ispituje i služe kao neka vrsta sonde preko koje dobivamo podatke o okolini tih označivača (6). To su obično nitroksidni radikali u sastavu piperidinskog, pirolinskog ili doksilnog prstena; njih vežemo na različite molekule, koje biramo s obzirom na problem koji ispituje. Nekoliko spinskih označivača, koje upotrebljavamo kod ispitivanja membrana prikazano je na slici 3; to su derivati masnih kiselina, kolesterola ili fosfolipida s nitroksidnom skupinom na različitim mjestima u alkilnom lancu. Karakteristika nitroksidnih radikala je da slobodan elektron sa spinom $S = 1/2$, interagira s magnetskim momentom jezgre dušika sa spinom $I = 1$. Zbog toga dolazi do dodatnog kidanja svakog energetskog nivoa elektrona na tri, sa $m_1 = 1, 0$ i -1 (slika 1) (hiperfina rascjep). Umjesto jedne dobivamo tri apsorpcijske linije. Interakcija



Slika 3. Model membrane sa strukturnim formulama različitih membranskih spinskih označivača: 1 i 2 derivati kolestana, 3 i 4 derivati fosfolipida s nitroksidnom grupom na različitim mjestima u alkilnom lancu, 5 i 6 palmitinska i stearinska kiselina s nitroksidnom grupom na različitim mjestima u alkilnom lancu HFASL(9,4) i HFASL(4,12), 7 metilni ester palmitinske kiseline MeFASL(2,11) i 8 fosfolipid s piperidinskim prstenom na vrhu polarne glave.

magnetskog momenta elektrona s vanjskim magnetskim poljem i s jezgrom je anizotropna. To ima za posljedicu da oblik spektra EPR ovisi o orijentaciji paramagnetskih centara s obzirom na magnetsko polje a isto tako i o dinamici molekula (slika 4). Na slici 4. su spektri EPR za spinski označeni metilni ester palmitinske kiseline s doksilnom skupinom na različitim mjestima u alkilnom lancu MeFASL(m, n) (slika 3) u membrani liposoma kod 4 °C i 37 °C. Za vrlo brzu rotaciju nitroksida, koju karakterizira korelacijsko vrijeme reda veličine od 10^{-9} do 10^{-11} s (u vodenim otopinama ili kod viših temperatura), anizotropija nestaje i dobivamo u spektru tri oštre apsorpcijske linije (slika 4b), a kod sporije rotacije nitroksida, u viskoznim sredinama, i kod djelomično orijentiranih uzoraka, kao što su membrane, spektar je superpozicija spektara, koji pripadaju različitim orijentacijama nitroksida s obzirom na magnetsko polje (slika 4a). U sredini membrana uređenost lipida je malena a u blizini polarne glave fosfolipida uređenost je veća, što se vidi i iz usporedbe spektara MeFASL(1,12) i MeFASL(11,2) na slici 4. Velika osjetljivost oblika spektara EPR nitroksidnih radikala na uređenost i dinamiku molekula u njihovoj okolini jedna je od osnovnih osobina, koju koristimo kod EPR istraživanja, jer iz promjene oblika spektara možemo zaključivati o promjenama koje se događaju u okolini nitroksida pod utjecajem različitih vanjskih faktora.

Druga osobina nitroksida koju koristimo u proučavanju biosistema je mogućnost njihove redukcije u hidroksilamine, koji nisu paramagnetni, pa ih zato ne vidimo s EPR (7). To ima za posljedicu da u suspenziji stanica ili u tkivima intenzitet EPR spektra s vremenom pada. Kinetika redukcije ovisi o aktivnosti oksi-redoksi enzima u stanici, o koncentraciji različitih reducenata kao što su askorbat ili glutation i o koncentraciji kisika. U prisutnosti kisika redukcija je sporija nego u anaerobnim uvjetima (8). To sve



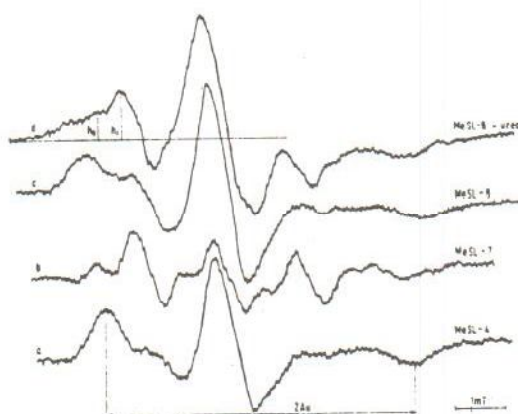
Slika 4. Spektri EPR za metilni ester palmitinske kiseline s nitroksidnom grupom na različitim mjestima u alkilnom lancu MeFASL(m,n) u membranama liposoma iz jajnog lecitina. a) kod 4 ° C i b) kod 37 ° C

su parametri koji se mijenjaju u različitim uvjetima i patološkim stanjima, što možemo detektirati iz kinetike opadanja intenziteta spektra EPR (7, 9).

Nekoliko primjera tih istraživanja opisano je u ovom radu.

1. Određivanje mikrogeografije aktivnog centra enzima acetilkolinesteraze i mjerenje konformacijskih promjena pod utjecajem kolinergičnih supstancija. U tu svrhu sintetizirali smo seriju spinskih označivača, fluorofosfata, s lancima različite dužine između fosfora i piperidinskog prstena s nitroksidnim radikalom (slika 5). Dokazali smo da se ti fluorofosfati selektivno vežu na serin u aktivnom centru acetilkolinesteraze (10). Iz oblika spektara EPR (slika 5a) zaključili smo da je rotacija nitroksidne grupe vrlo spora, vjerojatno zbog steričkih zapreka okolnih grupa. Iz toga zaključujemo da je aktivno mjesto u džepu, na površini enzima. Mijenjanjem razmaka (1) između fluora i

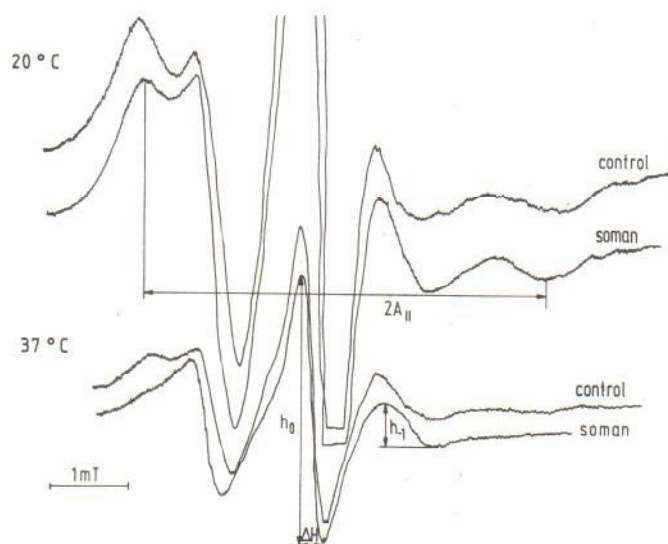
	MeSL-1	MeSL-3	MeSL-4	MeSL-5	MeSL-6	MeSL-7	MeSL-8	MeSL-10	MeSL-11
l (nm)	0.84	1.08	1.10	1.24	1.44	1.58	1.64	1.84	2.0
l_1 (nm)	0.20	0.44	0.52	0.68	0.80	0.90	1.00	1.20	1.40



Slika 5. Strukturna formula fluorofosfata MeSL-n s različitom dužinom lanca između fluora i piperidinskog prstena i spektri EPR tih označivača, selektivno vezanih na aktivno mjesto membranske acetilkolinesteraze električkog organa skata *Torpedo marmorata* kod sobne temperature.

nitroksidne grupe, dolazimo do određene dimenzije, kod koje nitroksidna grupa izlazi iz džepa. Tu se steričke zapreke smanjuju i EPR spektar dobiva oblik koji pokazuje bržu rotaciju piperidinskog prstena (MeSL-7) (slika 5b). Kod dužeg lanca (MeSL-8) spektar opet pokazuje vrlo sporu dinamiku, što tumačimo vezanjem nitroksidne grupe na određena mjesta izvan aktivnog centra (slika 5c). Međutim, nakon denaturacije enzima urejom dinamika nitroksida se povećava (slika 5d). Iz usporedbe spektara spinskih označivača MeSL-n, s lancem različite dužine l , odredili smo da razmak između serina u aktivnom centru i površine enzima nije veći od 0,9 nm, što je dužina lanca u izduženoj konformaciji (11). Na sličan način odredili smo da je od aktivnog serina preko anionskog centra do jedne stijenke džepa 0,7–0,9 nm (11), a do druge stijenke 0,3 nm (12).

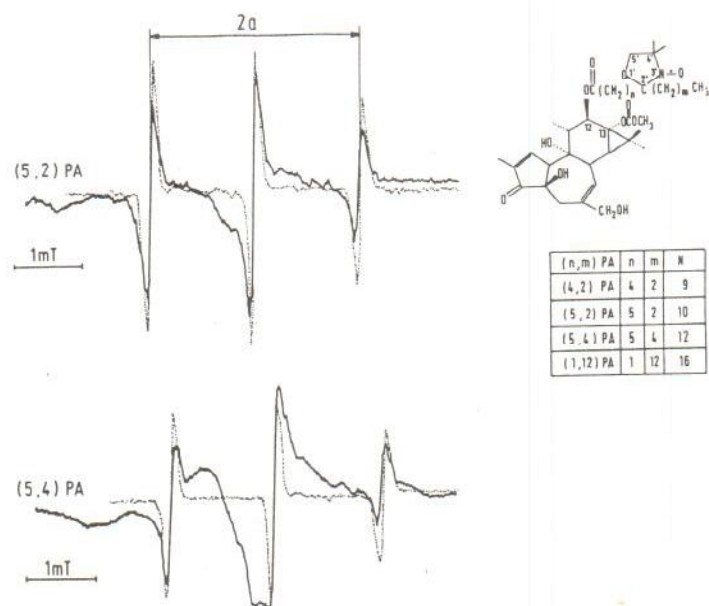
Ako se zbog djelovanja različitih kolinergičkih supstancija promijeni konformacija aktivnog centra enzima, to se može odraziti na obliku spektara EPR. Na taj smo način utvrdili da pod utjecajem feniltrimetilamonija, koji se vežu na kolinoreceptor, dolazi do promjene spektra EPR fluorofosfata, koji je vezan na aktivno mjesto acetilkolinesteraze



Slika 6. EPR spektar membranskog spinskog označivača MeFASL(10,3) (strukturna formula je na sl. 2) u membrani bazalnih ganglija u prisutnosti 10^{-5} mol/L somana i bez dodatka somana kod $T = 20$ i 37 °C.

(13). Parametar hiperfinog rascjepa $2A_{II}$ (slika 5a), koji ovisi o brzini rotacije nitroksidne grupe u džepu aktivnog centra, smanjio se za 0,2 mT. Iz toga smo zaključili da su receptor i esteraza u alosteričkoj ovisnosti.

2. Promjene u fluidnosti membrana pod utjecajem neurotoksina. Na slici 6. je EPR spektar membranskog spinskog označivača MeFASL(10,3) (strukturna formula je na slici 2) u membrani bazalnih ganglija u prisutnosti 10^{-5} mol/L somana i bez somana. Iz usporedbe se vidi razlika u obliku spektara, što je posljedica djelovanja somana na membrane. Iz spektara možemo odrediti maksimalan hiperfini rascjep $2A_{II}$, koji odražava urednost fosfolipidnih lanaca u membrani, a kod viših temperatura, gdje je brža dinamika, možemo odrediti korelacijsko vrijeme τ_c , koje odražava dinamiku fosfolipidnih lanaca. Rezultati sa somanom pokazuju da se $2A_{II}$ pod utjecajem somana smanjuje od 5,38 na 5,07 mT kod 20 °C, a korelacijsko vrijeme kod 37 °C od 3,27 ns na 2,59 ns (14). Ovaj rezultat pokazuje da soman ne utječe samo specifično kao inhibitor acetilkolinesteraze, nego djeluje i nespecifično na membrane, i tamo uzrokuje stanovite poremećaje, koji mogu biti štetni za organizam.



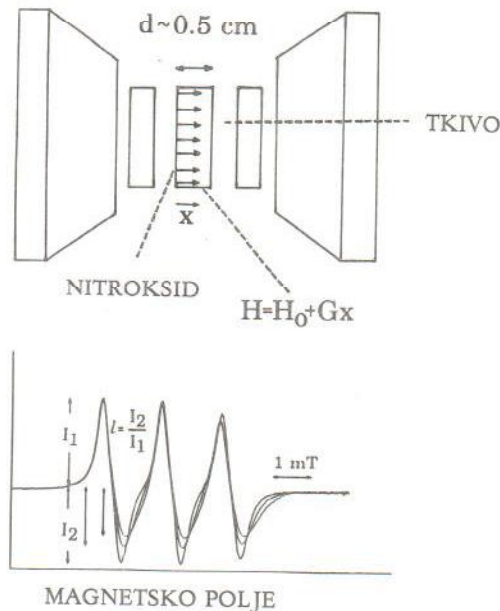
Slika 7. EPR spektri forbolestera (5,2)PA i (5,4)PA u membranama govedih eritrocita (puna crta) i u PBS puferu (prekinuta crta) kod sobne temperature i odgovarajuća strukturna formula spinski označenih derivata forbolestera.

3. Transport kokarcinogena, forbolestera, kroz stanične membrane. Za razliku od prethodna dva slučaja, gdje su bili spinski označivači markeri preko kojih smo gledali promjene u njihovoj okolini, kod ovih istraživanja spinski je označena bioaktivna supstancija koju ispituujemo. U ovom slučaju to je kokarcinogena supstancija, forbol. Strukturna formula forbola i spinski označenih derivata PA(m, n) prikazana je na slici 7. Cilj ovih istraživanja je ustanoviti kakva je interakcija tih supstancija s membranama, kakav je njihov transport u unutrašnjost stanice do jezgre, gdje uzrokuje promjene, i kako te osobine ovise o dužini alkilnog lanca na forbolnom skeletu. Na slici 7. su EPR spektri za dva derivata forbola s alkilnim lancem različitih dužina PA(m,n) u suspenziji govedih eritrocita. Spektri su superpozicija spektara s većom dinamikom koji pripadaju PA(m, n) molekulama u puferu i spektara koji pripadaju molekulama PA(m, n) u membrani eritrocita i pokazuju sporiju dinamiku nitroksida. Vidimo da se s dužinom lanca membranski dio povećava. Spektralnom titracijom, to jest oduzimanjem puferskog dijela spektra od cjelokupnog može se izračunati koeficijent raspodjele PA(m, n) između membrane i pufera a upotrebom reducenta, askorbata, koji vrlo sporo ulazi o stanicu eritrocita, može se iz kinetike redukcije nitroksidnog radikala izračunati i koeficijent permeabilnosti membrane eritrocita za PA(m, n) (15). Rezultati pokazuju da se s dužinom lanca koeficijent raspodjele povećava a permeabilnost smanjuje.

4. Upotreba gradijenta magnetskog polja za proučavanje transporta molekula kroz tkivo. To je novija metoda, koja omogućava promatranje prostorne raspodjele paramagnetskih centara po uzorku. U tu svrhu u pravcu vanjskog magnetskog polja, B_0 , dodaje se gradijent magnetskog polja GB. Rezonantni uvjet je u tom slučaju:

$$h\nu = g\beta(B_0 + GB)$$

Budući da je GB različit u raznim dijelovima uzorka, do rezonancije ne dolazi istodobno u cijelom uzorku, nego u različitim dijelovima uzorka kod različitih jačina vanjskog magnetskog polja B_0 , u ovisnosti o gradijentu dodatnog magnetskog polja GB i razmaku (slika 8). To se odražava na obliku spektara EPR. Apsorpcijske linije postaju asimetrične i što dublje prodre paramagnetski ion u tkivo, veća je asimetrija apsorpcijskih linija. Na taj način možemo dobiti sliku prostorne raspodjele paramagnetskih iona po uzorku i ako promatramo oblik spektra EPR u ovisnosti o vremenu nakon dodavanja paramagnetskog kompleksa, možemo izračunati koeficijent difuzije paramagnetskog centra u tkivo. Na taj se način utvrdilo da je difuzija neutralnih nitroksida u tkivo 3–5 puta brža nego kod nitroksida s pozitivnim nabojem (16). Ako upotrijebimo gradijent magnetskog polja i u drugoj dimenziji, dobiva se dvodimenzionalna slika raspodjele paramagnetskih centara po uzorku (EPR tomografija) (17).

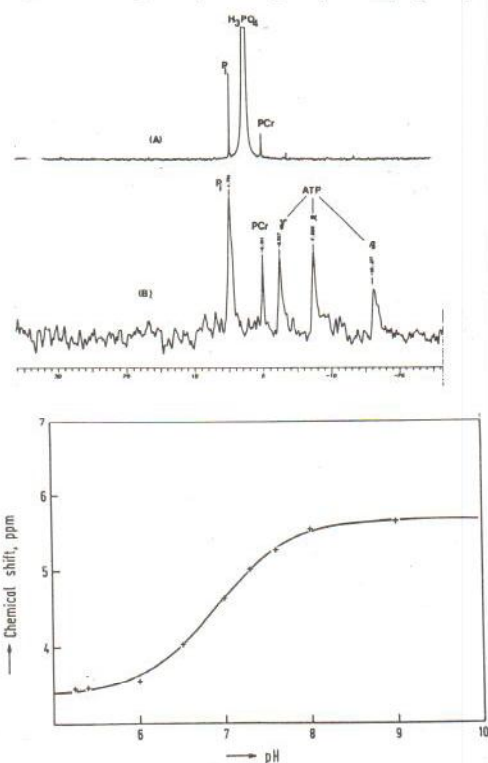


Slika 8. Shematski prikaz utjecaja gradijenta magnetskog polja na spektar EPR spinskog označivača u uzorku tkiva, u ovisnosti o debljini sloja u kojem je spinski označivač. Parametar $l = I_2/I_1$ je u direktnoj vezi s transportom spinskog označivača u tkivo.

UPOTREBA NMR U MEDICINSKIM ISTRAŽIVANJIMA

Upotreba ^{31}P NMR za proučavanje metaboličkih osobina skeletnih mišića.

Pored protona i ^{13}C NMR, ^{31}P je jezgra, koja se najviše upotrebljava u medicinskim istraživanjima. S pomoću te jezgre mogu se kvantitativno i nedestruktivno promatrati različite promjene u metaboličkim procesima, kod kojih sudjeluju ATP, kreatinfosfat i drugi kompleksi s fosforom. Koristi se efekt da svaki kompleks s fosforom ima karakterističnu liniju u NMR spektru, koja je određena kemijskim pomakom, koji se računa u ppm (partes per million), s obzirom na određeni standard (npr. H_3PO_4) (slika 9a) (18). Na slici 9b je spektar fosfora 31 u vlaknu skeletnog mišića. Različiti kompleksi fosfora identificirani su s obzirom na spektar testne intracelularne otopine (slika 9a). Eksperimenti pokazuju da se s promjenom pH položaj apsorpcijske linije anorganskog



Slika 9. ^{31}P NMR spektar: A. Testne otopine: modelna intracelularna otopina: 140 mmol/L KCl, 5 mmol/L kreatinfosfata, 5 mmol/L bepes ili triss pufera i 0,5 mmol/L EDTA. Za referentni signal upotrijebljen je 80% H_3PO_4 zatvoren u staklenoj kapilari i potopljen u testnu otopinu. B. Suspenzija stanica skeletnih mišićnih vlakana odraslih štakora, koji su stajali tri sata u Earlovom mediju bez glukoze na temperaturi 21°C . C. Kemijski pomak anorganskog fosfata kao funkcija pH kod fizioloških uvjeta ionske jačine kod 21°C s obzirom na rezonanciju kreatinfosfata.

fosfata P_i mijenja. Iz kemijskog pomaka P_i prema kreatinfosfatu, koji nije osjetljiv na pH, može se odrediti pH u uzorku (19). Ovisnost kemijskih pomaka o pH prikazana je na slici 9. Na osnovi toga moguće je s pomoću ^{31}P rezonancije određivati promjene pH u tkivu kod intenzivnog rada mišića itd. Modernim NMR spektrometrom takva mjerenja su moguća i u *in vivo* uvjetima.

Upotreba 1H NMR za karakterizaciju tumora mozga u *in vitro* uvjetima

Jedan od osnovnih parametara u NMR spektroskopiji je spin mrežno relaksacijsko vrijeme T_1 . To je vrijeme u kojem se sistem, koji je zbog rezonancije prešao u više energetske stanje, vraća u osnovno stanje. Ono ovisi o interakciji jezgri s okolinom. Što je jača interakcija, kraće je relaksacijsko vrijeme. U tkivima obično mjerimo T_1 protona. Ono ovisi o koncentraciji vode u tkivu, o interakciji molekula vode s drugim molekulama i ionima, o koncentraciji paramagnetskih centara u tkivu itd. (20). Pokazalo se da je u mnogim malignim tumorima T_1 duži nego u normalnih tkiva (20). Da bismo ustanovili da li su te razlike specifične i da li bismo pomoću T_1 mogli razlikovati različite vrste tumora, napravili smo sistematsku analizu T_1 vrijednosti na tkivima, koja smo dobili poslije kirurškog zahvata iz tumora mozga (21, 23), štitnjače (5, 22), kože i limfnih čvorova (5, 23). Budući da je jedan od osnovnih parametara o kojima ovisi T_1

Tablica 1.

Prosječne vrijednosti T_1 i koncentracija vode (u % na gram suhe težine) za histološki različite tumore mozga.

Histološki tip	Broj pacijenata	T_1 (ms)	r (% na suhu težinu)
astrocitomi stupanj III i IV	20	1010 ± 20	570 ± 50
ependimomi stupanj II	4	880 ± 20	460 ± 20
astrocitomi stupanj II i I	11	830 ± 20	530 ± 50
oligodendrogliomi stupanj II	7	780 ± 30	500 ± 30
meningeomi stupanj I	18	770 ± 20	470 ± 20
neurofibromi stupanj I	7	740 ± 30	390 ± 100
kraniofaringeomi stupanj I	2	550 ± 20	
moždano tkivo štakora siva supstancija	10	660 ± 30	330 ± 10
moždano tkivo štakora bijela supstancija	10	560 ± 40	280 ± 5

± standardna greška

Mjerenja su bila napravljena na IJS-2-72 NMR spektrometru kod frekvencije elektromagnetskih valova 32 MHz

koncentracija vode u tkivu, na tumorima mozga mjerili smo i taj parametar. Prosječne vrijednosti T_1 za različite vrste tumora mozga i odgovarajuće koncentracije vode na gram suhe težine navedene su na tablici 1. Iz tablice 1. vidimo da je T_1 kod astrocitoma IV signifikantno veći od T_1 ostalih tumora i da se vrijednosti T_1 smanjuju u ovisnosti o stupnju malignosti (21). Isto tako pokazalo se da u tumorima mozga postoji linearna ovisnost između T_1 i koncentracije vode, što nije slučaj za normalna tkiva i benigne tumore. Ako uzmemo vrijednost $T_1 = 900$ ms kao granicu iznad koje karakteriziramo tkivo kao maligno i istodobno izmjerimo koncentraciju vode na gram suhog tkiva veću od 500, onda je vjerojatnost za pravilnu karakterizaciju tumora 83% (21). Slične rezultate dobili smo i za ostale tumore koje smo ispitivali (22, 23). Vjerojatnost pravilne karakterizacije tumora s T_1 je usporediva s histološkom karakterizacijom na smrznutim presjecima, koja se upotrebljava za intraoperativnu dijagnostiku. Budući da je karakterizacija tumora mjerenjem T_1 brza (oko 5 min), ne traži velike uzorke (oko $3 \times 3 \times 3$ mm³) i ne ovisi o iskustvu istraživača, mogla bi poslužiti za intraoperativnu karakterizaciju tumora (20, 22).

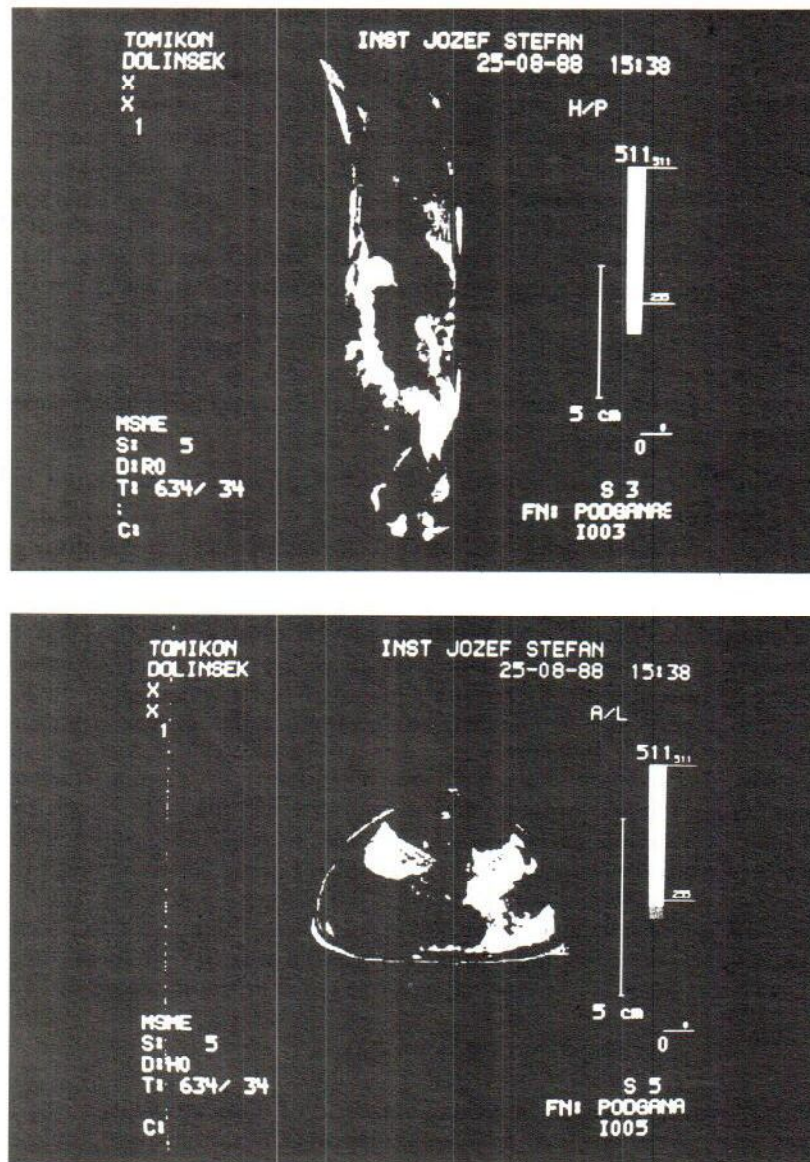
Mogućnosti upotrebe NMR tomografije u in vivo uvjetima za dijagnostiku tumora i drugih patoloških stanja

Očekuje se da bi se vjerojatnost za pravilnu karakterizaciju tumora bitno povećala mjerenjem T_1 u *in vivo* uvjetima, gdje bi se istodobno promatralo normalno i tumorsko tkivo na istom pacijentu. Usto bi se iz slike tumora mogli dobiti neki podaci o invazivnosti tumora. Ova i slična razmišljanja potakla su istraživače da razviju metodu NMR tomografije *in vivo* koja daje anatomske opis većine mekih tkiva i organa s boljom rezolucijom od tomografije s X-zrakama. Prednost NMR tomografije je i u tome što nema štetnog utjecaja kao tomografija s X-zrakama i druge dijagnostičke metode, s radioaktivnim izotopima. Informacije koje daje u mnogim su slučajevima usporedive, a u nekim slučajevima čak i bolje od onih koje dobivamo drugim dijagnostičkim metodama. Osim tumora, ovom metodom možemo identificirati i druga patološka stanja, kao što su ishemija, promjene u mozgu koje su posljedica multiple skleroze, u slikama srca i krvnih žila aterosklerotičke lezije itd. (24). Zato NMR tomografi postaju u svijetu sastavni dio svake moderne klinike.

Na slici 10. je NMR tomogram štakora, uzdužni i poprečni prerez, koji je snimljen sistemom za NMR tomografiju u Institutu Jožef Štefan, sa supravodljivim magnetom (2,35 T), čiji otvor dopušta mjerenja na uzorcima s maksimalnim omjerom 14 cm.

ZAKLJUČAK

Ovim primjerima istaknuto je nekoliko različitih načina primjene EPR i NMR u biomedicinskim istraživanjima, koji pokazuju veliku raznolikost problema koje možemo proučavati magnetskim rezonancijama. Metode mogu poslužiti ne samo za bazična istraživanja na molekularnom nivou, gdje možemo proučavati mehanizme djelovanja različitih lijekova, interakciju bioaktivnih supstancija s membranama i transport tih supstancija u stanice i tkiva, nego i u dijagnostici, za karakterizaciju različitih patoloških procesa u tkivima.



Slika 10. NMR tomogram Wistar albino štakora in vivo, snimljen na sistemu za NMR tomografiju u Institutu Jožef Stefan sa supraprovodljivim magnetom (2,35 T) s maksimalnim dijametrom uzorka. Za vrijeme snimanja štakor je bio uspavan intraperitonealnom injekcijom od 60 mg/kg fenobarbitana i 2 mg/kg diazepamama.

LITERATURA

1. Carrington A, McLacklan AD. Introduction to magnetic resonance with application to chemistry and chemical physics. New York: Harper & Row 1967.
2. Swartz HM. Cells and tissues. U: Swartz HM, Bolton JR, Borg DC, ur. Biological application of electron spin resonance. New York: Wiley-Interscience 1972.
3. Šentjerc M. EPR encimov dihalne verige. Farmac Vestn 1981;32:271–80.
4. Šentjerc M, Schara M, Lukič F. ESR of malignant human tissue. Die Naturwissensch 1970;57:459–60.
5. Šentjerc M, Schara M, Auersperg M, Goloub R, Lamovec J. Magnetic resonance in the diagnosis of cancer. Radiol Jugosl 1974;4:319–27.
6. Berliner LJ. Spin labelling: theory and application. New York: Academic press 1974.
7. Schara M, Šentjerc M, Cotič L, Pečar S, Palčič B, Monti-Bragadin C. Spin label study of normal and Ki-MSV transformed rat kidney cell membranes. Studia Biophys 1977;62:141–50.
8. Swartz HM, Šentjerc M, Morse PD II. Cellular metabolism of nitroxides: Effect on rate of reduction of cell/nitroxide ratio, oxygen concentration and permeability of nitroxides. Biochim Biophys Acta 1986;888:82–90.
9. Šentjerc M, Schara M, Auersperg M. Influence of vinblastine containing chemotherapy on tumor tissue membrane fluidity. Arch Geschwustforsch 1988;58:35–42.
10. Šentjerc M, Štalc A, Župančič AO, Schara M. An ESR study of the influence of some physico-chemical factors on the conformation of a postsynaptic acetylcholinesterase. Biochem Biophys Acta 1976;429:421–8.
11. Štalc A, Šentjerc M, Pečar S, Schara M, Župančič AO. Distance between active serine and enzyme surface of the membrane acetylcholinesterase. Period biol 1982;84:91–5.
12. Pečar S, Schara M, Šentjerc M, Štalc A, Župančič AO. The effect of aliphatic chain length of various spin label molecules bound to membrane acetylcholinesterase on the ESR spectra. Studia Biophys 1979;77:33–42.
13. Šentjerc M, Štalc A, Župančič AO. An ESR study of the postsynaptic membrane acetylcholinesterase of *Torpedo marmorata* electric organ. Moll Cell Biochem 1976;13:137–9.
14. Štalc A, Šentjerc M, Klinar B. The influence of soman on the membrane fluidity of rat superior cervical ganglion. Pharmacol Toxicol 1988;63.
15. Pečar S, Šentjerc M, Schara M, Nemec M, Sorg B, Hecker E. Spin labeled phorbol esters and their interaction with cellular membranes. Carcinogenesis 1982;7:541–53.
16. Demšar F, Swartz HM, Schara M. Use of field gradient EPR to measure diffusion in tissues. Mag Res Med Biol 1988;1:17–24.
17. Bačić G, Demšar F, Zolnai Z, Swartz HM. Contrast enhancement in EPR imaging: role of oxygen. Mag Res Med Biol 1988;1:55–65.
18. Gadian DG. Nuclear magnetic resonance and its application to living systems. Oxford: Clarendon Press 1982.
19. Blinc A, Kidrič J, Labajnar G, Zorec R. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance (NMR) study of adult skeletal muscle fibers prepared in cell suspension. Eighth Regional Meeting of Biochemists, Biophysicists and Biotechnologists. Graz 1987.
20. Damadian R, Zaner K, Hor D, Di Maio T, Minkoff L, Goldsmith M. Nuclear magnetic resonance as a new tool in cancer research: Human tumors by NMR. Ann N Y Acad Sci 1973;222:1048–76.
21. Jezernik M, Šentjerc M, Schara M. Proton magnetic resonance characterization of brain tumors. Acta Neurochirurg 1983;67:1–9.

22. Schara M, Šentjurc M, Auersperg M, Goloub R. Characterization of malignant thyroid gland tissue by magnetic resonance methods. Br J Cancer 1974;29:483–6.
23. Šentjurc M, Schara M, Goloub R, Auersperg M, Jezernik M. Characterization of malignant tissue by NMR. Studia Biophys 1979;77:97–8.
24. Budinger F, Lauterbur PC. Nuclear magnetic resonance technology for medical studies. Science 1984;226:288–98.
25. Sauber C. Free radical measurements in isolated rat liver mitochondria. Farmac Vestn 1981;32:239–46.

Summary

MAGNETIC RESONANCES IN BIOMEDICAL RESEARCH

Magnetic resonances are spectroscopic methods by which some structural changes and metabolic processes in biological systems can be followed on the molecular level. There are two main types of magnetic resonance methods: nuclear magnetic resonance (NMR) and electron paramagnetic (spin) resonance (EPR or ESR). By NMR are followed the atomic nuclei with the magnetic moment; in biological systems these are usually ^1H , ^{13}C , ^{31}P . By EPR are followed paramagnetic centres in biological systems; these are ions of the transition metal group (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}), which appear as cofactors of the enzymes, or free radicals, which are intermediates in biochemical reactions. Instead of paramagnetic centres, which are native in biological systems, very often the molecules with a free radical are incorporated into the system – spin labels or spin probes. Centres with the magnetic moment serve as markers conveying the information about the metabolic processes in biological systems and about the changes in these processes in pathological conditions or under the influence of biologically active substances.

In this work several typical applications of EPR and NMR in biomedical research are described showing a great variety of issues where magnetic resonances can be used.

EPR experiments: Study of the microgeography of acetylcholinesterase active centre and the conformational changes of this centre under the influence of cholinergic substances. Changes in cell membrane fluidity under the influence of neurotoxins. Transport of cocarcinogens, forbolesters, through the cell membrane. Application of magnetic field gradient to the investigation of transport through the tissues.

NMR experiments: Application of ^1H -NMR to characterization of brain tumours *in vitro* and possible application of NMR tomography *in vivo* to diagnosis of tumours and other pathological conditions. Application of ^{31}P -NMR for investigation of metabolic properties of skeletal muscles.

Jožef Štefan Institute, Ljubljana