

# Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie

Katarzyna Zawada

Zakład Chemii Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Adres do korespondencji: dr Katarzyna Zawada, Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, tel./faks: 0 22 572 09 50, e-mail: kzawada@farm.amwaw.edu

**EPR spectroscopy in pharmacy and medicine** · Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is an accurate and objective method of recording paramagnetic centers, such as free radicals or cations of transition elements. This technique is used to investigate the mechanism of drug action, drug release, the impact of radiation sterilization on drug and drug delivery systems, as well as to determine the redox status (oxidation stress measurements) and free radical mechanism of metabolic processes. The promising application of EPR spectroscopy is EPR imaging, enabling monitoring of free radical reactions in vivo.

**Keywords:** Electron Spin Resonance Spectroscopy, Electron Paramagnetic Resonance, EPR imaging.

© Farm Pol, 2009, 65(3): 224-228

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR – *Electron Paramagnetic Resonance*), nazywana również spektroskopią elektronowego spinowego rezonansu, opiera się na zjawisku odkrytym w 1944 roku przez J.K. Zawojkiego, pracującego na Uniwersytecie w Kazaniu. Zaobserwował on, że próbka zawierająca niesparowane elektrony po umieszczeniu w stałym polu magnetycznym pochłania promieniowanie elektromagnetyczne o określonej częstotliwości. W przypadku pola magnetycznego o indukcji ok. 0,35 T, które jest stosowane w większości komercyjnych spektrometrów EPR, częstotliwość rezonansowa wynosi około 9,5 GHz (pasmo X),

**Tabela.** Zastosowania spektroskopii EPR o różnych zakresach

Pasmo	Częstość	Zastosowania
L	1-2 GHz	Duże próbki z wodą, małe zwierzęta
S	2-4 GHz	Próbki biologiczne, uwodnione
X	9 – 10 GHz	Różne (roztwory, proszki)
K	24 GHz	Metale przejściowe, kompleksy
Q	34 GHz	Wysoka czułość, małe próbki
W	94 GHz	Kompleksy wysokospinowe metali przejściowych
G	180 GHz	Najwyższa czułość i bardzo małe próbki

a zatem należy do zakresu promieniowania mikrofalowego. Zestawienie zakresów częstości rezonansowych wraz z typowymi zastosowaniami przedstawia **tabela**. Wyższe częstości rezonansowe (do 700 GHz) wymagają specjalnie zaprojektowanych układów pomiarowych [1].

Próbką może być układ zawierający rodniki organiczne, cząsteczki posiadające nieparzystą liczbę elektronów, np. tlenek i dwutlenek azotu, jony metali przejściowych, układy elektron-dziura itp.

W zewnętrznym polu magnetycznym spiny niesparowanych elektronów przyjmują orientację równoległą lub antyrównoległą do kierunku tego pola. Powoduje to rozszczepienia poziomów energetycznych pod wpływem pola magnetycznego (efekt Zeemana). Między poziomami istnieje różnica energii. Jeśli zadziała się na taką próbkę promieniowaniem o częstotliwości pasującej do powstałej różnicy energii, nastąpi jego pochłonięcie, a tym samym zjawisko rezonansu. W większości spektrometrów EPR stosuje się stałą częstotliwość promieniowania i zmienne pole magnetyczne, a detekcja rezonansu odbywa się metodą fali ciągłej (CW, ang. *continuous wave*). Obecnie wśród spektrometrów pracujących w paśmie X metodą CW dostępne są spektrometry o małych rozmiarach, tzw. *bench-top*, umożliwiające szybkie i łatwe pomiary EPR.

Spektrometry CW EPR rejestrują widmo substancji paramagnetycznej w postaci krzywej absorpcji, a jest ono zwykle wyświetlane w postaci pierwszej pochodnej krzywej absorpcji (**rycina**) ze względu na zwiększoną w ten sposób rozdzielczość i stosunek sygnału do szumu. Podwójne całkowanie pozwala obliczyć pole powierzchni sygnału, które jest wprost proporcjonalne do stężenia centrów paramagnetycznych. Identyfikacja rodników odbywa się na podstawie współczynnika rozszczepienia spektroskopowego (g), określającego siłę oddziaływania z zewnętrznym polem magnetycznym. Dla swobodnego elektronu i większości rodników organicznych przyjmuje on wartość około 2,00, dla jonów metali przejściowych zwykle mieści się w zakresie 2–6.

Struktura sygnałów EPR często jest multipletowa, świadczy to o dodatkowym rozszczepieniu poziomów energii. Przyczyną jest oddziaływanie niesparowanych elektronów z sąsiadującymi jądrami paramagnetycznymi, zwane sprzężeniem spinowo – spinowym, które prowadzi do powstania struktury nadsubtelnej sygnałów. Struktura ta jest kolejnym elementem umożliwiającym identyfikację rodnika, szczególnie przy bardzo zbliżonych wartościach czynnika  $g$ .

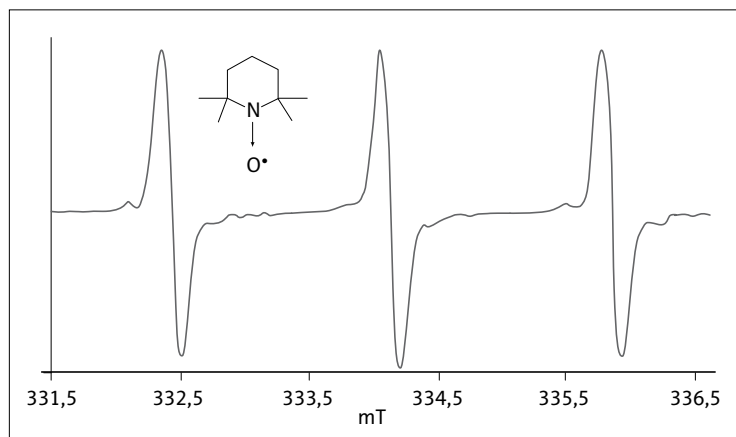
Dostępne są również impulsowe spektrometry EPR, z wykorzystaniem transformacji Fouriera, gdzie pomiar polega na aplikacji silnego, krótkiego impulsu promieniowania mikrofalowego przy stałym polu magnetycznym, a następnie rejestracji zależności częstotliwości mikrofalowej od czasu. Widmo rejestrowane jest i wyświetlane w postaci krzywej absorpcji. Techniki impulsowe pozwalają na badanie wybranych grup spinów o zbliżonych właściwościach. Jedną z najczęściej stosowanych technik impulsowych jest ESEEM (*Electron Spin Echo Envelope Modulation*; modulacja powłoki elektronowego echa spinowego), pozwalająca z dużą dokładnością określić odległość między spinem elektronowym a pobliskimi spinami jądrowymi [2].

Ważną techniką pomiarową wykorzystującą zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego jest ENDOR (*Electron Nuclear Double Resonance*; podwójny rezonans elektronowo-jądrowy) – łączący wysoką rozdzielczość i specyficzność NMR (jądrowego rezonansu magnetycznego) z czułością EPR. Technika ta polega na obserwacji sygnału EPR przy naświetlaniu próbki, umieszczonej w polu magnetycznym, promieniowaniem z zakresu częstotliwości radiowych, co powoduje zachodzenie przejść NMR [3]. Pozwala to na uzyskanie wielu informacji dotyczących struktury i dynamiki układu. Technika ENDOR stosowana jest w wersji zarówno fali ciągłej, jak i impulsowej.

### Zastosowania spektroskopii EPR

#### Badanie mechanizmu działania leków

Zastosowanie spektroskopii EPR do badania próbek biologicznych, takich jak krew, pozwala na badanie mechanizmu działania leków i potencjalnych leków. Przykładem może być tu badanie efektów działania Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) [4], silnego inhibitora reduktazy rybonukleotydowej (RR), u pacjentów z opornymi na leczenie guzami litymi. W widmie krwinek jednójądrazystych krwi obwodowej (PBMCS), pobranych od pacjentów leczonych tym lekiem, zidentyfikowano sygnały pochodzące od kompleksu Fe-transferyna oraz prawdopodobnie od hemu i niskospinowego żelaza lub miedzi (II). Obecne są również reaktywne formy tlenu (RFT), o czym świadczy pojawienie



**Rycina.** Widmo wodnego roztworu rodnika nitroksylowego (TEMPOL), zarejestrowane na spektrometrze EPR na pasmo X.

się sygnałów przy  $g = 2$ . Najprawdopodobniej chelatowanie przez Triapine żelaza i miedzi jest fundamentalne dla jego działania, niezależnie od tego czy mechanizmem jest inhibicja RR czy tworzenie RFT, uszkadzających transferynę lub jej receptor. Uzyskano bezpośrednie dowody *in vivo* zwiększenia ilości Fe-transferyny w komórkach PMBC u pacjentów przyjmujących Triapine. Dodatkowo, możliwym źródłem zwiększonej intensywności sygnału hemu jest cytochrom C, uwalniany z mitochondriów, co jest oznaką apoptozy.

Pokrewnym zastosowaniem jest badanie toksyczności leków. Tu przykładem może być badanie wpływu jonów metali obecnych w organizmie ( $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ ) na liczbę rodników powstających w kompleksach biopolimeru DOPA–melaniny z wybranymi antybiotykami z grupy aminoglikozydów [5, 6]. Tworzenie kompleksu z antybiotykiem zwiększa intensywność sygnału pochodzącego od rodników melaniny, przy czym najślabszy efekt zaobserwowano dla najmniej toksycznej netylmycyny. Może to świadczyć o rodnikowym mechanizmie toksyczności tej grupy leków. Obecność jonów diamagnetycznych zwiększała, natomiast zmniejszała ilość rodników paramagnetycznych w kompleksie melanina-netylmycyna, przy czym efekt był silniejszy w przypadku wcześniejszego utworzenia kompleksu jon metalu-melanina.

#### Badanie rodnikowych produktów sterylizacji radiacyjnej

Sterylizacja radiacyjna jest alternatywnym do sterylizacji termicznej sposobem utrzymywania wymaganej czystości i jakości preparatów farmaceutycznych. Istotne jest zatem

W zewnętrznym polu magnetycznym spiny niesparowanych elektronów przyjmują orientację równoległą lub antyrównoległą do kierunku tego pola. Powoduje to rozszczepienia poziomów energetycznych pod wpływem pola magnetycznego (efekt Zemana). Między poziomami istnieje różnica energii. Jeśli zadziała się na taką próbkę promieniowaniem o częstotliwości pasującej do powstałej różnicy energii, nastąpi jego pochłonięcie, a tym samym zjawisko rezonansu.

Ważną techniką pomiarową wykorzystującą zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego jest ENDOR (*Electron Nuclear Double Resonance*; podwójny rezonans elektronowo-jądrowy) – łączący wysoką rozdzielczość i specyficzność NMR (jądrowego rezonansu magnetycznego) z czułością EPR.

zbadanie jej wpływu zarówno na substancję czynną, jak i substancje pomocnicze preparatu.

Sterylizacja radiacyjna leku może wpływać na strukturę substancji czynnej, co z kolei może mieć wpływ na jej aktywność biologiczną. Spektroskopia EPR pozwala na określenie liczby i rodzaju rodników, szczególnie tych trwałych, powstałych w takiej sytuacji. Przykładem może być badanie dwóch leków przeciwwymiotnych [7] lub serii dziewięciu antagonistów z grupy pochodnych 1,4-dihydropirydyny [8]. Metodę tę można również

zastosować do badania suplementów diety poddanych sterylizacji [9].

Wpływ sterylizacji radiacyjnej na substancje pomocnicze w postaci leku można zaobserwować na przykład w przypadku jednych z najbardziej efektywnych nośników leku, pozwalających na jego kontrolowane uwalnianie, mikrosfer z termoplastycznych alifatycznych polimerów, takich jak PLA (kwas polimlekowy), PGA (kwas poliglikolowy) i ich kopolimery. Ze względu na ich wrażliwość na temperaturę, konieczną w produktach farmaceutycznych sterylizację przeprowadza się na drodze radiacyjnej (promieniowanie  $\beta$  lub  $\gamma$ ), co może prowadzić do degradacji tych polimerów i powstawania w nich rodników. Do identyfikacji

tych rodników, a także do ich analizy ilościowej, można zastosować spektroskopię EPR, np. w połączeniu z techniką ENDOR (*Electron Nuclear Double Resonance*), ułatwiającą znacznie identyfikację centrów paramagnetycznych [10]. Ich ilość i rodzaj zależy od składu polimeru oraz od stopnia jego przetworzenia. W przypadku nieprzetworzonych polimerów

widmo EPR nie zależy od rodzaju promieniowania, ale w przypadku mikrosfer obserwowana jest wyraźnie większa liczba rodników przy sterylizacji promieniowaniem  $\gamma$  niż promieniowaniem  $\beta$ .

Ze sterylizacją promieniowaniem elektromagnetycznym wiąże się konieczność kontroli stosowanych dawek. Przydatną metodą jest dozymetria EPR, przede wszystkim dozymetria oparta na pomiarze widma rodnika alaninowego (kwartet pochodzący od grupy metylowej aminokwasu alaniny), ale również dozymetria w ciele stałym. Wadą tej metody jest jednak problem z kalibracją – jest ona ważna tylko dla konkretnego spektrometru i dozymetru. Podjęto próbę opracowania niezależnego sposobu kalibracji przez skorelowanie absorpcji EPR i dawki dozymetrycznej z absorpcją UV roztworu sacharozy [11], gdy równolegle wykonywane są pomiary badanej próbki i sacharozy.

### Kontrolowane uwalnianie leku

Do badania kontrolowanego uwalniania leku stosuje się sondy spinowe, najczęściej rodniki nitroksylowe, których widmo zależy od mikrolepkości i mikropolarności otoczenia, jak również od lokalnego pH. Sondy takie można zastosować np. w badaniu uwalniania leku z tabletek powlekanych. Przykładem może być analiza uwalniania chlorowodoru propranololu i teofiliny z tabletek o przedłużonym uwalnianiu, powlekanych mieszaniną rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego w wodzie polimeru o różnych proporcjach składników i różnej grubości [12]. Wykazano, że mimo opóźnienia uwalniania leku penetracja wody do wnętrza tabletki występuje natychmiast, powodując rozpuszczenie hydrofilowych składników w ciągu kilku minut, niezależnie od grubości i składu powłoki. Uwalnianie leku zaczyna się po nasyceniu tabletki wodą i zależy od rozpuszczalności leku oraz parametrów powłoki. Inną formą leku o przedłużonym uwalnianiu są termowrażliwe hydrożele, przechodzące z zolu w żel w warunkach fizjologicznego pH i temperatury, takie jak chitozan i jego mieszaniny np. z glicerolo-2-fosforanem ( $\beta$ -GP) [13]. W ich przypadku ważne jest określenie warunków zarówno wewnątrz jak i w najbliższym otoczeniu takiego hydrożelu, na co pozwala zastosowanie sond spinowych czułych na pH i mikrolepkość. Natomiast do zbadania kinetyki uwalniania leku oraz „sztywności” jego związania w strukturze hydrożelu można zastosować znakowanie spinowe substancji czynnej [13], czyli modyfikację struktury przez np. dołączenie grupy nitroksylowej w miejscu nieodpowiadającym za aktywność biologiczną cząsteczki. Warto dodać, że tego rodzaju układy są potencjalnie cennym materiałem do zastosowania w medycynie estetycznej.

Możliwym wykorzystaniem sond spinowych jest również badanie form postaci leku *in vivo*, np. na modelach zwierzęcych. Przykładem mogą być tworzone *in situ* implanty polimerowe, badane intensywnie w ostatnich latach jako alternatywny do doustnego, stosunkowo mało inwazyjny sposób podawania leku. Interesujący jest mechanizm ich tworzenia i działania, a dokładniej zgodność mechanizmu formowania się implantu *in vivo* i *in vitro* [14]. Zastosowanie rodnika nitroksylowego jako sondy spinowej pozwoliło zbadać kinetykę wymiany rozpuszczalnika organicznego i wody oraz osadzania się polimeru w tkance, a także uzyskać informacje co do mikropolarności i mikrolepkości w otoczeniu implantu formowanego *in vivo*.

Jako sondy spinowe mogą zostać również wykorzystane związki metali paramagnetycznych, takich jak lit. Przykładem może być badanie *in vivo* (na modelu szczura) kinetyki transportu oraz czasu działania substancji czynnej podanej w postaci maści do nosa o różnych właściwościach z wykorzystaniem oksymetrii EPR [15].

Zastosowanie spektroskopii EPR do badania próbek biologicznych, takich jak krew, pozwala na badanie mechanizmu działania leków i potencjalnych leków.

### Oksymetria EPR

Oksymetria EPR wykorzystuje zależność szerokości sygnału od ciśnienia cząstkowego tlenu w tkance. Spektroskopia EPR okazała się czułą metodą pomiarów oksymetrycznych, wciąż jednak nie ma szerokodostępnych sond do tej techniki [16]. Trwają zatem poszukiwania nowych materiałów; jednym z przykładów są tu zmodyfikowane porfiryny i metaloporfiryny [17].

### Badanie statusu redoks w organizmie

Określenie statusu redoks w organach lub tkankach organizmu jest istotne, aby zrozumieć mechanizm patogenny chorób o pochodzeniu wolnorodnikowym. Jest to kolejny przykład zastosowania sond spinowych do badań *in vivo* [18]. Na przykład intensywność sygnału EPR rodnika nitroksylogowego, podanego doustnie, zanika w czasie zgodnie z farmakokinetyką i statusem redoks [19]. Należy jednak pamiętać o uwzględnieniu rozmiaru badanego obszaru, a więc o prawidłowej lokalizacji i objętości miejsca pomiaru [20].

### Procesy metaboliczne o mechanizmie rodnikowym

Kolejnym kierunkiem zastosowania spektroskopii EPR w badaniach medycznych jest rejestracja krótkożyjących rodników powstających w procesach metabolicznych. Wykorzystuje się tu pułapki spinowe, czyli związki niebędące paramagnetykami, natomiast łatwo i wydajnie tworzące z rodnikami trwałe formy rodnikowe, tj. addukty spinowe (o czasie życia rzędu minut czy godzin). Jako przykład można podać badanie mechanizmu powstawania stresu oksydacyjnego pod wpływem alkoholu [21] czy badanie kinetyki reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z glutationem [22], ale również wykrywanie i identyfikacja rodników powstających w skórze pod wpływem promieniowania UV [23]. Pułapki spinowe należy dobierać zależnie od rozpuszczalnika, rodzaju powstającego rodnika, innych substancji obecnych w układzie.

Jednym z najważniejszych możliwych zastosowań spektroskopii EPR jest ilościowe oznaczanie *in vivo* tlenku azotu (II) (NO), rodnika o dużym znaczeniu fizjologicznym. Pomiaru te są trudne ze względu na krótki czas życia i niskie stężenie NO w tkankach. Najczęściej stosowanym podejściem jest w związku z tym zastosowanie pułapek spinowych lub sond spinowych. Są to związki należące do jednej z kilku grup. Pierwszą zaproponowaną były związki nitronylowe [24]. Obecnie stosuje się przede wszystkim kompleksy żelaza (II), wśród nich również te występujące naturalnie w organizmie (i ich pochodne), jak hemoglobina [25].

### Badanie struktury enzymów z centrum paramagnetycznym

Spektroskopia EPR, szczególnie spektroskopia impulsowa, jest cennym źródłem informacji

o najbliższym otoczeniu paramagnetycznych centrów enzymów. Przykładem może być zawierająca molibden (V) jedna z odmian ludzkiej oksydazy siarczynowej, wykazująca znaczną zależność struktury od pH otoczenia [26]. Zastosowanie spektroskopii EPR wysokich częstości pozwala na badania wysokospinowych kompleksów metali przejściowych, w których efekt rozszczepienia w polu zerowym sprawia, że przy najczęściej stosowanym pasmie X i niższych częstościach mikrofalowych zachowują się one jak związki diamagnetyczne [27]. Dotyczy to również kompleksów o znaczeniu biologicznym, jak niektóre kompleksy żelaza (II).

### Obrazowanie EPR

Obrazowanie EPR (EPRI, *Electron Paramagnetic Resonance Imaging*) opiera się na podobnej zasadzie, jak powszechnie znane obrazowanie metodą jądrowego rezonansu magnetycznego MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), różnica polega na wykorzystanym rodzaju rezonansu magnetycznego (elektronowy czy jądrowy), a także na metodzie detekcji – fali ciągłej (EPR) lub impulsowej z transformacją Fouriera (NMR). Od klasycznego pomiaru widma dla całej objętości próbki obrazowanie różni się wprowadzeniem dodatkowego czynnika – gradientu pola magnetycznego, czyli liniowej zmiany natężenia pola magnetycznego względem współrzędnej położenia. Sygnały pochodzące od rodników położonych w różnych miejscach układu są przesunięte względem siebie, przy czym różnica ich potożeń jest proporcjonalna do odległości między nimi i wielkości gradientu pola magnetycznego. Aby uzyskać dwuwymiarowy obraz, aplikuje się gradient pola pod różnym kątem względem próbki w płaszczyźnie, natomiast w celu uzyskania obrazu trójwymiarowego dodatkowo rejestruje się widma przy gradiencie przykładanym względem próbki pod różnym kątem w przestrzeni.

Ze względu na niewielką ilość występujących naturalnie w organizmie centrów paramagnetycznych stosuje się sondy spinowe, podobnie jak w przypadku badań całej objętości próbki. Stosowane w obrazowaniu sondy spinowe mają zwykle czas półtrwania w żywym organizmie rzędu kilku minut. Opracowywane są metody pozwalające skrócić czas akwizycji, takie jak zastosowanie jednolitego rozkładu rzutów w przeciwieństwie do zwykle stosowanego, prostszego obliczeniowo, niejednorodnego rozkładu [28]. Wadą obrazowania EPR jest niska

Sterylizacja radiacyjna leku może wpływać na strukturę substancji czynnej, co z kolei może mieć wpływ na jej aktywność biologiczną. Spektroskopia EPR pozwala na określenie liczby i rodzaju rodników, szczególnie tych trwałych, powstałych w takiej sytuacji.

Do badania kontrolowanego uwalniania leku stosuje się sondy spinowe, najczęściej rodniki nitroksylogowe, których widmo zależy od mikrolepkości i mikropolarności otoczenia, jak również od lokalnego pH. Sondy takie można zastosować np. w badaniu uwalniania leku z tabletek powlekanych.

Kolejnym kierunkiem zastosowania spektroskopii EPR w badaniach medycznych jest rejestracja krótkożyjących rodników powstających w procesach metabolicznych. Wykorzystuje się tu pułapki spinowe, czyli związki niebędące paramagnetykami, natomiast łatwo i wydajnie tworzące z rodnikami trwałe formy rodnikowe, tj. addukty spinowe.

rozdzielczość przestrzenna metody, np. w porównaniu z obrazowaniem T1 MRI, związana z dużą szerokością linii widmowej i występowaniem sprzężenia nadsubtelnego [29]. Jednak jej zastosowanie pozwala na monitorowanie reakcji rodnikowych w żywych organizmach, np. w tkankach o intensywnym metabolizmie (wątroba), co otwiera nowe możliwości badawcze. Obecnie takie prace prowadzi się na zwierzętach doświadczalnych.

### Podsumowanie

Spektroskopia EPR jest techniką umożliwiającą uzyskanie cennych informacji dotyczących różnorodnych układów paramagnetycznych, tj. z niesparowanym elektronem, będących obiektem zainteresowania farmacji i medycyny. Dzięki swej specyficzności pozwala na badania wolnych rodników w różnych materiałach: lekach, tkankach, płynach ustrojowych. Jej możliwości zwiększa zastosowanie sond spinowych. Wprowadzenie łatwych w obsłudze, niewielkich spektrometrów EPR może zwiększyć dostępność tej techniki w laboratoriach biochemicznych.

Przyjęto: 2008.12.09 · Zaakceptowano: 2009.01.25

### Piśmiennictwo

1. Krebs C., Galonić Fujimori D., Walsh C.T. i wsp.: Non-Heme Fe(IV)–Oxo Intermediates Acc. Chem. Res., 2007, 40 (7), 484–492.
2. Schweiger A., Jeschke G.: Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance. Wyd. 1. Oxford: Oxford University Press, 2001, s. 578, ISBN 0 19 850634 1.
3. Murphy D.M., Farley R.D. Principles and applications of ENDOR spectroscopy for structure determination in solution and disordered matrices. Chem. Soc. Rev., 2006, 35, 249 – 268.
4. Kolesar J.M., Schelman W.R., Geiger P.G. i wsp.: Electron paramagnetic resonance study of peripheral blood mononuclear cells from patients with refractory solid tumors treated with Triapine®. J. Inorg. Biochem. 2008, 102, 693–698.
5. Pilawa B., Buszman E., Wrzeźniok D. i wsp.: Application of EPR Spectroscopy to Examination of Gentamicin and Kanamycin Binding to DOPA-melanin. Appl. Magn. Reson. 2002, 23, 181–192.
6. Buszman E., Pilawa B., Zdybel M. i wsp.: EPR examination of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> effect on free radicals in DOPA–melanin–netilmicin complexes. Chem. Phys. Lett. 2005, 403, 22–28.
7. Damian G. EPR investigation of  $\gamma$ -irradiated anti-emetic drugs. Talanta 2003, 60, 923–927.
8. Naskrent M., Mielcarek J. The effect of ionizing radiation of 1,4-dihydropyridine derivatives in the solid state. Spectrochim. Acta A 2007, 67, 251–255.
9. Petrişor D., Damian G., Simon S. Gamma-irradiated ExtraVit M nutritive supplement studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. Radiat. Phys. Chem. 2008, 77, 463–466.
10. Bushell J.A., Claybourn M., Williams H.E. i wsp.: An EPR and ENDOR study of  $\gamma$ - and  $\beta$ -radiation sterilization in poly (lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. J. Control. Rel. 2005, 110, 49–57.
11. Yordanov N.D., Karakirova Y.: EPR of gamma irradiated solid sucrose and UV spectra of its solution. An attempt for calibration of solid state/EPR dosimetry. Radiat. Meas. 2007, 42, 347–351.
12. Strübing S., Metz H., Mäder K. Mechanistic analysis of drug release from tablets with membrane controlled drug delivery. Eur J Pharm Biopharm. 2007, 66, 113–119.
13. Kempe S., Metz H., Bastrop M. i wsp.: Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. Eur J Pharm Biopharm. 2008, 68, 26–33.
14. Kempe S., Metz H., Mäder K.: Do in situ forming PLG/NMP implants behave similar in vitro and in vivo? A non-invasive and quantitative EPR investigation on the mechanisms of the implant formation process. J. Control. Rel. 2008, 130, 220–225.
15. Petelin M., Pavlica Z., Bizimoska S. i wsp.: In vivo study of different ointments for drug delivery into oral mucosa by EPR oximetry. Int. J. Pharm. 2004, 270, 83–91.
16. Bernard G., Karsten M.: Accurate and sensitive measurements of pO<sub>2</sub> in vivo using low frequency EPR spectroscopy: how to confer biocompatibility to the oxygen sensors. Free Radic. Biol. Med. 2000, 29 (11), 1078–1084.
17. Lan M., Zhao H., Yuan H. i wsp.: Absorption and EPR spectra of some porphyrins and metalloporphyrins. Dyes Pigm 2007, 74, 357–362.
18. Yamada K., Kuppusamy P., English S. i wsp.: Feasibility and assessment of non-invasive in vivo redox status using electron paramagnetic resonance imaging. Acta Radiol. 2002, 43, 433–440.
19. Matsumoto K., Krishna M.C., Mitchell J.B.: Novel pharmacokinetic measurement using electron paramagnetic resonance spectroscopy and simulation of in vivo decay of various nitroxyl spin probes in mouse blood. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004, 310, 1076–1083.
20. Ui I., Okajo A., Endo K. i wsp.: Importance of volume limitation for tissue redox status measurements using nitroxyl contrast agents: A comparison of X-band EPR bile flow monitoring (BFM) method and 300 MHz in vivo EPR measurement. J. Magn. Res. 2006, 181, 107–112.
21. Reinke L.A. Spin trapping evidence for alcohol-associated oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 2002, 32 (10), 953–957.
22. Jones M., Lawrence A., Wardman P., Burkitt M.J. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. Biochem. Soc. Trans. 2003, 31 (6), 1337–1339.
23. Herrling T., Fuchs J., Rehberg J. i wsp.: UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. Free Radic. Biol. Med. 2003, 35 (1), 59–67.
24. Joseph J., Kalyanaram B., Hyde J.S.: Trapping of nitric oxide by nitronyl nitroxides: an electron spin resonance investigation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993, 192 (2), 926–934.
25. Kleschyov A.L., Wenzel P., Munzel T.: Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. J. Chromatogr. B 2007, 851, 12–20.
26. Raitsimring A.M., Astashkin A.V., Feng C. i wsp.: Studies of the Mo(V) center of the Y343F mutant of human sulfite oxidase by variable frequency pulsed EPR spectroscopy. Inorg. Chim. Acta 2008, 361, 941–946.
27. Krzystek J., Ozarowski A., Telsler J.: Multi-frequency, high-field EPR as a powerful tool to accurately determine zero-field splitting in high-spin transition metal coordination complexes. Coord. Chem. Rev. 2006, 250, 2308–2324.
28. Sato-Akaba H., Fujii H., Hirata H.: Development and testing of a CW-EPR apparatus for imaging of short-lifetime nitroxyl radicals in mouse head. J. Magn. Res. 2008, 193, 191–198.
29. Matsumoto K-i., Narazaki M., Ikehira H. i wsp.: Comparisons of EPR imaging and T1-weighted MRI for efficient imaging of nitroxyl contrast agents. J. Magn. Res. 2007, 187, 155–162.