

ВОДОПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ПАРАМАГНИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

А.В. Анисимов, И.Ф. Ионенко, М.А. Суслов

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия, anisimov@kibb.knc.ru

Аннотация. Показано, что парамагнитные комплексы гадолиния GdDTPA и GdCl₃, используемые в спин-эхо ЯМР экспериментах на растительных тканях для релаксационного подавления сигнала намагниченности от внеклеточной воды могут быть блокаторами межклеточного переноса воды.

Ключевые слова: водопроницаемость корней, парамагнитные ионы, ЯМР, релаксация, диффузия

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1025-1028

Развитие промышленности привело к появлению и концентрированию в среде обитания ксенобиотиков, содержащих парамагнитные элементы. На фоне широко известных парамагнетиков, таких, как медь, марганец, кислород и другие, менее «на слуху» находятся лантаноиды, относящиеся к редкоземельным элементам, и в их числе гадолиний. Редкоземельные парамагнетики заслуживают специального внимания, поскольку из-за рассеянности в земной коре «природа не позаботилась» о защите биологических объектов от их влияния и это первый мотив к исследованию. С другой стороны, парамагнитные ионы марганца (Mn²⁺) и гадолиния (Gd³⁺), благодаря способности даже в небольшой концентрации резко ускорять процесс магнитной релаксации воды активно используются в магниторезонансной томографии (МРТ) для контрастирования МРТ-изображений [Carr et al., 1984]. В физиологии растений эти парамагнетики используются в спин-эхо ЯМР экспериментах для релаксационного подавления нежелательного сигнала намагниченности от внеклеточной воды [Анисимов и др., 2004]. Очевидно, что наряду с функцией подавления сигнала намагниченности, парамагнетики могут быть физиологически активными соединениями, что мотивирует постановку задачи на изучение их влияния на плазматическую мембрану клеток, как первую мишень воздействия.

В настоящей работе градиентным методом спин-эхо ЯМР на примере корней проростков кукурузы исследуется влияние ионов Gd³⁺, Mn²⁺ и комплекса GdDTPA (gadolinium-diethylene triamine pentaacetic acid) на межклеточный перенос воды.

В качестве растительных объектов использовались сегменты всасывающей зоны корней 5-7 дневных проростков кукурузы (*Zea mays*), выращенных на растворе CaCl₂ (2,5×10⁻⁴ М) при 23 °С, 16 часовом фотопериоде и освещении 15 Вт /м². В качестве парамагнетиков использовались растворы солей GdCl₃, MnCl₂ и комплекс GdDTPA. Последний из-за большого размера молекул априори не проникает через нативную плазмалемму в клетки и менее подвержен диссоциации. Как известно, с величиной коэффициента водопроницаемости мембран связана величина коэффициента диффузии и значения скорости магнитной релаксации молекул воды. Названные величины измерялись единым релаксационно-диффузионным комплексом спин-эхо техники ЯМР. Релаксационный метод основан на чувствительности времен магнитной релаксации воды в клетках к скорости трансмембранного водообмена, зависящей, в свою очередь, от уровня мембранной проницаемости. Скорость трансмембранного обмена может быть определена путём решения обратной задачи обмена на полном наборе экспериментально измеренных времен спин-решеточной и спин-спиновой

релаксации и долевых вкладов фракций внутри- и внеклеточной воды, соответственно. Диффузионный метод оценки проницаемости основан на зависимости трансляционного диффузионного пробега молекул воды за некоторый экспериментально обусловленный интервал времени диффузии – t_d от уровня проницаемости межклеточных барьеров. Детальный анализ диффузии в биологических объектах осложняется необходимостью учета суммы факторов макроскопической надклеточной и внутриклеточной неоднородности объектов. В сравнительных экспериментах зачастую достаточно качественно сравнивать релаксационные (РЗ) и диффузионные затухания (ДЗ) сигналов эха для контрольного и опытного образцов, и именно этот подход использован в данной работе. В релаксационных экспериментах регистрировалось релаксационное затухание (РЗ) спинового эха в импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Джилла (КПМД), обремененное спин-спиновой релаксацией [Meiboom, Gill, 1958]. В диффузионных экспериментах регистрировалось диффузионное затухание сигналов стимулированного эха в трехимпульсной р\ч последовательности (90° - 90° - 90°), с импульсным градиентом магнитного поля [Tanner, 1970]. Измерялась относительная амплитуда сигналов эха (фактор $R = A(g, t_d)/A(g=0, t_d)$ в зависимости от амплитуды g и длительности δ импульсов градиента магнитного поля, при вариации времени диффузии t_d как параметра [Tanner, Stejskal, 1968].

Величина среднего эффективного коэффициента диффузии D_{eff} определялась из соотношения: $R = \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_{eff}]$, согласно условию, приведенному в [Valiullin, Skirda 2001], т.е. по начальному участку зависимости R от $(\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d)$, где γ -гиромагнитное отношение для протонов

Для обеспечения высокого отношения сигнал\шум и достижения должного усреднения биологической вариации образец составлялся из 30 сегментов корней из всасывающей зоны.

Результаты исследования. На рис. 1 величина фактора $R(g^2)$ приведена в зависимости от обобщенной координаты $b = \gamma^2 \delta^2 g^2 t_d$, для сегментов корня в норме и под влиянием GdDTPA и GdCl₃. Для контроля характерна не экспоненциальная зависимость $R(b)$, которая становится близкой к экспоненциальной под влиянием парамагнетиков.

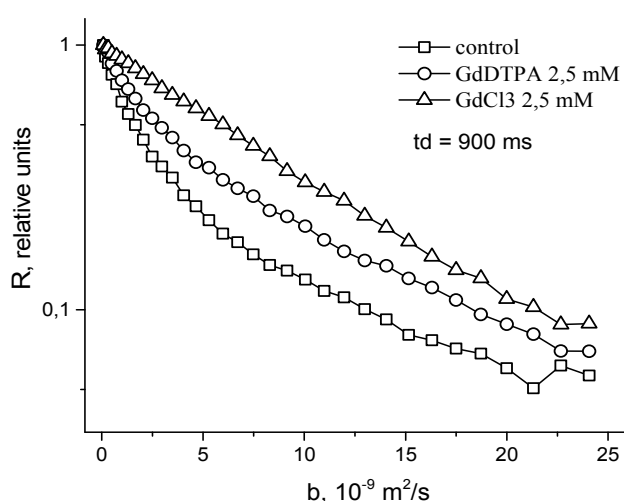


Рис. 1. Диффузионные затухания сигналов эха для воды сегментов корней кукурузы после обработки их растворами парамагнетиков.

Поскольку парамагнетик во внеклеточном пространстве релаксационным образом подавляет сигнал эха от внеклеточного компонента воды, остающиеся наблюдаемые

сигналы ДЗ характеризуют воду симпласта. Уменьшение крутизны ДЗ для $GdCl_3$ по сравнению с $GdDTPA$ свидетельствует о том, что $GdCl_3$ является более эффективным блокатором межклеточного переноса воды по симпласту, чем $GdDTPA$.

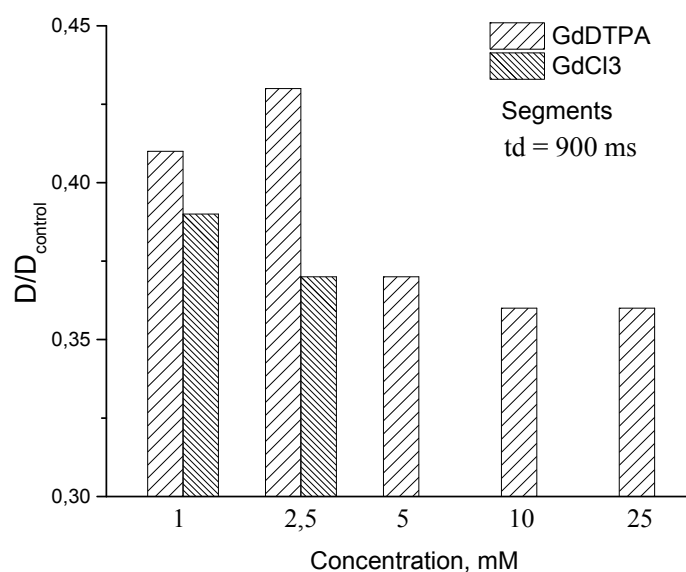


Рис. 2. Зависимость относительного коэффициента диффузии воды в сегментах корней от концентрации растворов парамагнетиков в среде инкубации.

Концентрационные зависимости демонстрируют монотонное снижение относительного коэффициента диффузии воды (опыт\контроль) с ростом концентрации парамагнетика (рис. 2).

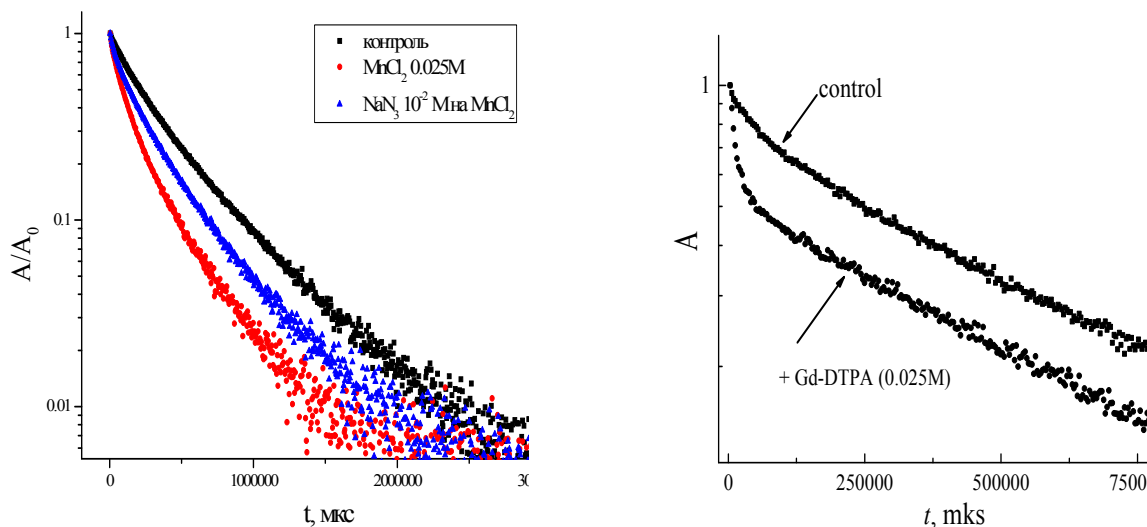


Рис. 3. Релаксационные затухания сигналов эха для воды сегментов корней кукурузы после обработки их растворами парамагнетиков: а – $MnCl_2$, NaN_3 ($10^{-2}M$) на фоне $MnCl_2$; б – $GdDTPA$.

При близкой релаксационной эффективности ионов марганца и гадолиния ускорение релаксационного затухания РЗ для варианта $MnCl_2$ (0,025 M) значительно превосходит таковое для $GdDTPA$ (рис. 3). Этот факт объясняется проникновением

марганца в клетки и, соответственно, ускорением релаксации внутриклеточной воды. Тем не менее, даже при вакуумной инфльтрации сегментов корней в 0.025М растворе MnCl_2 в течение 20 мин, что способствует активному проникновению марганца в клетки, время релаксации внутриклеточной воды продолжает контролироваться трансмембранным обменом. В пользу этого заключения говорит уменьшение скорости релаксационного затухания намагниченности при приложении к образцу сегментов на фоне марганца блокатора переноса – азид натрия (NaN_3 , 10^{-2} М). Реакция на азид натрия свидетельствует о сохранении в варианте с MnCl_2 динамического диапазона регуляции переноса. В целом, и релаксационные и диффузионные данные свидетельствуют о том, что ионы гадолиния, в том числе в комплексе GdDTPA, являются блокаторами переноса воды, как через плазмалемму, так и по симпласту, причем GdCl_3 является более эффективным блокатором. Уровень блокировки монотонно увеличивается с ростом концентрации. Полной блокировки, по крайней мере, до концентрации 25 мМ не происходит, сохраняется динамический диапазон регуляции к дальнейшему снижению переноса воды. Ионы марганца по сравнению с гадолинием не проявляют заметной блокировки переноса воды, но проигрывают гадолинию по пункту проникновения в клетки. По совокупности свойств соль GdCl_3 вполне конкурирует с комплексом GdDTPA, который априори не проникает в клетки, благодаря «прицепу DTPA», но GdCl_3 является значительно более доступным и дешевым реагентом.

Литература

Анисимов А.В., Ионенко И.Ф., Романов А.В. Метод спин-эхо ЯМР в исследованиях трансляционной диффузии воды селективно по апопласту, цитоплазматическому и вакуолярному симпласту растений // Биофизика. – 2004. – Т. 49. – С. 891–896.

Carr D.H., Brown J., Bydder G.M. et al. Gadolinium-DTPA as a contrast agent in MPI: Initial clinical experience in 20 patients // Am. J. Radiol. – 1984. – V.143. – P. 215–224.

Meiboom S., Gill V. Spin-echo method for measuring nuclear magnetic relaxation times // Rev. Sci. Instrum. – 1958. – V. 29, No. 8. – P. 688–691.

Tanner J.E. Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies // J. Chem. Phys. – 1970. – V. 2. – P. 2523–2526.

Tanner J.E., Stejskal E.O. Restricted self-diffusion of protons in colloidal systems by the pulsed-gradient spin-echo method // J. Chem. Phys. – 1968. – V.19. – P. 1768–1777.

Valiullin R., Skirda V.D. Time dependent self-diffusion coefficient of molecules in porous media // J. Chem. Phys. – 2001. – V. 114. – P. 452–458.

WATER PERMEABILITY OF PLANT CELL MEMBRANES UNDER THE EFFECT OF PARAMAGNETIC COMPLEXES

A.V. Anisimov, I.F. Ionenko, M.A. Suslov

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Center of the Russian Academy of sciences, Kazan, Russia, anisimov@kibb.knc.ru

Abstract. It is shown that paramagnetic gadolinium complexes GdDTPA, GdCl_3 used in NMR spin-echo measurements of plant tissues for inhibition of intercellular water magnetization signal can perform as intercellular water transfer blockers.

Keywords: root water permeability, paramagnetic ions, NMR, relaxation, diffusion