

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕГО ГАЗОВОГО ДАВЛЕНИЯ НА МАГНИТНУЮ РЕЛАКСАЦИЮ ВОДЫ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

© 2016 г. А.В. Анисимов, М.А. Суслов

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН,
420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: anisimov@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 30.10.15 г.

Релаксационным методом спин-эхо-ЯМР на примере корней проростков кукурузы (*Zea mays* L.) показано, что при возмущении гидродинамической системы сегментов корня внешним давлением до 4 МПа изменения скорости магнитной релаксации воды обязаны кислородному парамагнитному допингу, обусловливающему в свою очередь изменения водной проницаемости плазмалеммы. Показано, что атмосферный кислород является заметным источником магнитной релаксации воды в растениях.

Ключевые слова: транспорт воды, газообмен, давление, кислород, времена релаксации, ядерный магнитный резонанс.

Решение проблемы транспорта воды в растениях связано с выяснением характера движущих сил [1–3], их сезонных переключений [4], механизмов регуляции транспорта воды [5,6], передачи сигнальной информации по растению [7], адаптация к стрессам через модификацию мембранной системы клеток [8,9]. Перспективным подходом к решению названных задач представляется регистрация и анализ реакции гидродинамической системы растения на возмущающее действие внешнего давления [10]. Подходящей средой для передачи давления являются газы и прежде всего воздух. Наземные виды высших растений в большинстве своем содержат развитые межклетники, заполненные воздухом, влияние которого на водный перенос в нормальных условиях скрыто, но может проявиться при изменениях внешнего давления. Наличие заметной газовой компоненты в тканях наземных растений и ее связь с водным обменом в литературе мало обсуждается, притом что явление газообмена растений представляет самостоятельную проблему. Использование внешнего давления как возмущающего воздействия на гидродинамическую систему клеток ткани акцентирует внимание к газовой компоненте. Изменение давления в изохорических условиях вызывает изменение растворимости газов (закон Генри) [11], а также температуры (закон Шарля) [12]. Задача о влиянии давления на гидросистему растения тесно связана с выбором неинвазивного метода исследования растительных образцов непосредственно под давлением. Адекватным методом исследования водопере-

носа в растениях является релаксационный и диффузионный методы спинового эха ЯМР [13]. Факт изменения под давлением растворимости газов воздуха в воде растительной ткани в условиях применения техники спин-эхо-ЯМР вызывает на повестку дня задачу анализа дополнительных источников магнитной релаксации воды. Как известно, изучение механизмов магнитной релаксации воды в биологических тканях представляет самостоятельную задачу с длительной предысторией, которой посвящено большое число исследований [14–16]. Ранние исследования связаны в основном с представлениями о влиянии на скорость магнитной релаксации процесса обмена между связанной и объемной водой ткани (fast-exchange-two-state model) [17,18], влияния контактов молекул воды с неводными компонентами клеток [19], влияния трансмембранного обмена на времена магнитной релаксации [20]. Впоследствии акцент применения ЯМР сместился на исследование трансклеточного переноса воды и их переключений [10,21]. Решение обратной задачи обмена релаксационным методом спин-эхо-ЯМР позволяет оценить коэффициент водопроницаемости плазмалеммы [22]. Для его применения необходимо регистрировать полный набор релаксационных параметров в условиях различия времен релаксации вне- и внутриклеточной воды. Для корректного применения релаксационного метода необходимо оценивать появление вкладов в магнитную релаксацию, связанных с использованием внешнего воздействия. Таким образом, наряду с фундаментальным значением



Рис. 1. Газовая система для создания статического давления, сопряженная с ЯМР-релаксометром.

исследования механизмов магнитной релаксации при использовании газового давления существует и методологический аспект задачи. Целью настоящей работы является исследование методом спин-эхо-ЯМР влияния давления воздуха на процессы магнитной релаксации воды в растительной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В схеме эксперимента предусматривалось создание в измерительной ампуле ЯМР-релаксометра отрицательного (вакуумная откачка) и положительного по отношению к атмосферному давлению газа (воздуха) непосредственно во время измерений времен магнитной протонной релаксации воды. Для создания положительного давления использовали газовую систему (рис. 1) [23]. Для получения отрицательного давления параллельно баллонам с газом через соответствующий электроклапан присоединяли вакуумную ресиверную камеру, в которой поддерживали вакуум до 10^{-3} атм.

При изохорическом подъеме давления со скоростью до 1 МПа/с зарегистрированное повышение температуры образца составляло около 2°C . Практически во всех экспериментах давление изменяли со скоростью не более 0,2–0,5 МПа/с, что приводило к подъему температуры лишь на $0,4\text{--}0,6^{\circ}\text{C}$. Термическое равновесие в образце после изменения давления устанавливалось за время около 2 мин. Для гарантированного установления термического равновесия на каждом значении давления образец

выдерживали до начала ЯМР-измерений не менее 5 мин.

Направление изменений интенсивности трансмембранного водообмена под давлением оценивали методом спин-эхо-ЯМР по факту укорочения/удлинения времен магнитной релаксации внутриклеточной воды. Количественно интенсивность трансмембранного переноса воды оценивали по величине скорости трансмембранного обмена водой, откуда в свою очередь вычисляли коэффициенты водопроницаемости мембранной системы клеток. Скорость трансмембранного обмена определяли путем решения обратной задачи обмена при полном наборе экспериментальных времен спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации для фракций внутриклеточной (a) и внеклеточной (b) воды и их долевых вкладов P_a и P_b соответственно [22]. Как известно, для медленных и промежуточных скоростей обмена ядер между двумя положениями, отличающимися временами релаксации, справедливы соотношения Циммермана–Бриттена [24]:

$$\frac{1}{T_a'} = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{1}{T_a} + \frac{1}{T_b} + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right) - \sqrt{\left(\frac{1}{T_b} - \frac{1}{T_a} + \frac{1}{\tau_b} - \frac{1}{\tau_a} \right)^2 + \frac{4}{\tau_a \tau_b}} \right\}, \quad (1)$$

$$\frac{1}{T'_b} = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{1}{T_a} + \frac{1}{T_b} + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right) + \sqrt{\left(\frac{1}{T_b} - \frac{1}{T_a} + \frac{1}{\tau_b} - \frac{1}{\tau_a} \right)^2 + \frac{4}{\tau_a \tau_b}} \right\}, \quad (2)$$

$$P'_b = \frac{1}{2} \frac{(P_b - P_a) \left(\frac{1}{T_a} - \frac{1}{T_b} \right) + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b}}{\sqrt{\left(\frac{1}{T_b} - \frac{1}{T_a} + \frac{1}{\tau_b} - \frac{1}{\tau_a} \right)^2 + \frac{4}{\tau_a \tau_b}}} \quad (3)$$

где $P'_a = 1 - P'_b$. Уравнения (1)–(3) справедливы как для спин-решеточной, так и для спин-спиновой релаксации, вместе с условиями нормировки $P'_a = 1 - P'_b$ и детального равновесия $P_d/\tau_a = P_b/\tau_b$, составляют систему из восьми уравнений с восемью неизвестными. Решение системы дает времена жизни обменивающихся ядер, соответственно τ_a , τ_b . Коэффициенты проницаемости P_d оцениваются из соотношения

$$P_d = \frac{V}{\tau_a S} = \frac{1}{\tau_a} \left(\frac{S}{V} \right)^{-1}, \text{ где } S \text{ и } V \text{ – площадь поверхности и объем клетки, аппроксимируемый за}$$

частую сферой. Коэффициенты проницаемости P_d относятся к плазмалемме, поскольку сопротивление тонопласта переносу воды мало [25]. Необходимое для применения релаксационного метода различие времен релаксации вне- и внутриклеточной воды создавалось с помощью парамагнитного допинга, путем внедрения во внеклеточное пространство парамагнитных ионов высокой релаксационной эффективности. В качестве парамагнитного допинга использовали не проникающий в клетки комплекс GdDTPA (соль диэтилентриаминпентауксусной кислоты, 0,025 М) – контрастирующий агент, применяемый в ЯМР-томографии. Измерения проводили на ЯМР-релаксомере при частоте протонного резонанса 19 МГц с использованием цифрового приемопередающего комплекса Spin-Track. Времена спин-спиновой и спин-решеточной магнитной релаксации измеряли с использованием импульсной последовательности «инверсия–восстановление» (180° – 90°), трехимпульсной последовательности стимулированного эха и последовательности Кара–Парселла–Мейбума–Джилла [26].

В качестве объектов со сравнительно высоким объемом газовой фазы (воздухоносным объемом межклетников) служили 4–7-дневные растения кукурузы (*Z. mays* L., сорта Кубань). Серийный образец для должного усреднения биологической вариации параметров корней го-

товили из 30 сегментов всасывающей зоны корней, уложенных вдоль оси ампулы высокого давления. Для сведения к минимуму шумового разброса данных во всех измерениях использовали не менее чем десятикратное накопление сигналов намагниченности с четырехшаговым фазовым циклированием радиочастотных импульсов и опорного радиочастотного напряжения на фазовый детектор. Все опыты проводили при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ не менее чем в трех биологических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Под вакуумом наблюдается снижение скорости релаксации. Сброс вакуума ведет к восстановлению релаксационных затуханий к норме. Положительное давление приводит к резкому ускорению релаксации, и сброс давления восстанавливает скорость затухания до положения, характерного при вакууме (рис. 2).

При фиксированном релаксационном интервале между вторым и третьим 90° р/ч импульсами, равным 700 мс, приведена зависимость амплитуды сигнала стимулированного эха от времени с шагом измерений в 10 с при подаче давления воздуха в 3 МПа и после сброса давления (рис. 3). При выбранном релаксационном интервале в 700 мс динамика изменения намагниченности обязана вакуолярной воде.

Регистрируется резкое, практически в три–четыре раза, релаксационное подавление сигнала за время порядка 90 с с последующим сравнительно медленным подавлением сигнала при фиксированном значении давления. При сбросе давления регистрируется возвращение уровня сигнала к контрольному значению (рис. 3).

На рис. 4 приведены релаксационные затухания поперечной намагниченности от воды корня с парамагнитным допингом (0,025 М GdDTPA), внедренным во внеклеточное пространство. Наблюдается двухкомпонентный спад поперечной намагниченности, где медленно спадающая компонента относится к внутриклеточной фракции воды с временем релаксации T_{2a} , быстро спадающая (начальный участок релаксационного спада) к внеклеточной воде с временем релаксации T_{2b} . Аналогично укорачиваются времена спин-решеточной релаксации T_1 .

Увеличение давления приводит к ускорению релаксации и, соответственно, уменьшению времени релаксации (рис. 5). Поскольку главными компонентами воздуха являются кислород (20%) и азот (79%), для выявления роли этих газов в укорочении времен релаксации в ряде

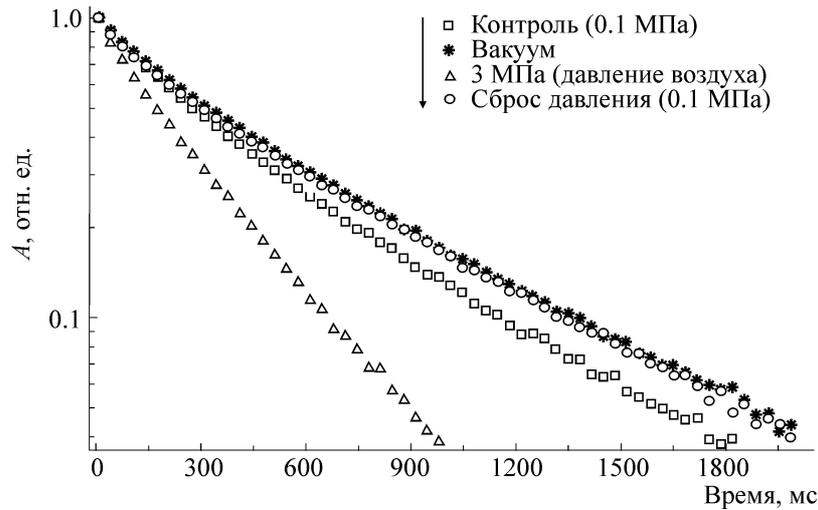


Рис. 2. Релаксационные затухания поперечной намагниченности для образца: квадраты – контроль (при атмосферном давлении), звездочки – после вакуумной откачки воздуха, треугольники – после сброса вакуума с последующей подачей положительного давления воздуха 3 МПа, кружки – после сброса давления до атмосферного.

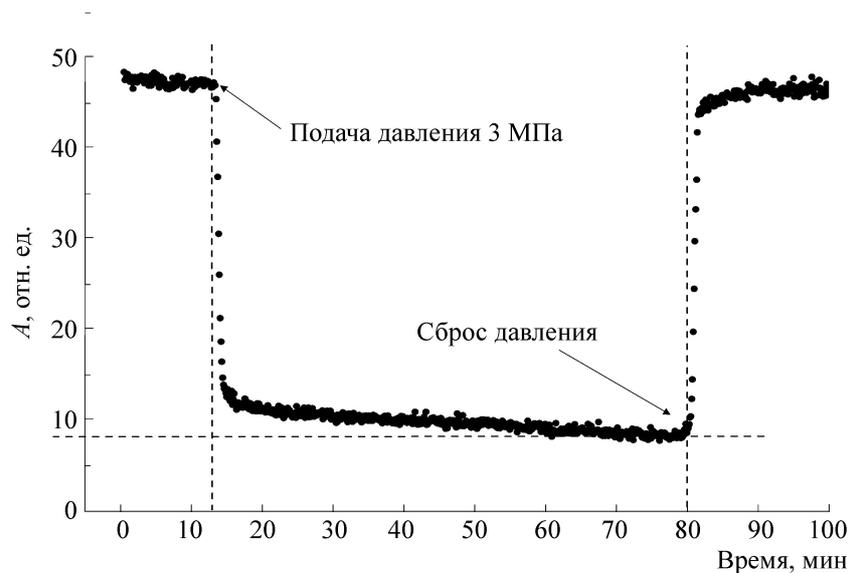


Рис. 3. Зависимость амплитуды сигнала спин-эхо образца от изменения внешнего давления в измерительной ампуле с течением времени.

экспериментов вместо давления воздуха подавалось давление чистого азота. Для этого предварительно проводили вакуумную инфльтрацию образца с целью удаления воздуха из пневмосистемы и межклеточных воздушных пространств корня.

После вакуумной откачки подача азота под давлением 3 МПа приводит к незначительному по сравнению с вариантом для воздуха (рис. 2) укорочению времен релаксации. Сброс давления азота приводит к восстановлению релак-

сационных затуханий до положения характерного для вакуума (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В сумме динамика релаксации для разных вариантов подачи/сброса давления характеризуется резким ускорением релаксации при положительном давлении воздуха, замедлением релаксации при вакуумной откачке, относительно малыми изменениями в релаксации при замене воздуха азотом. Иными словами, в случае

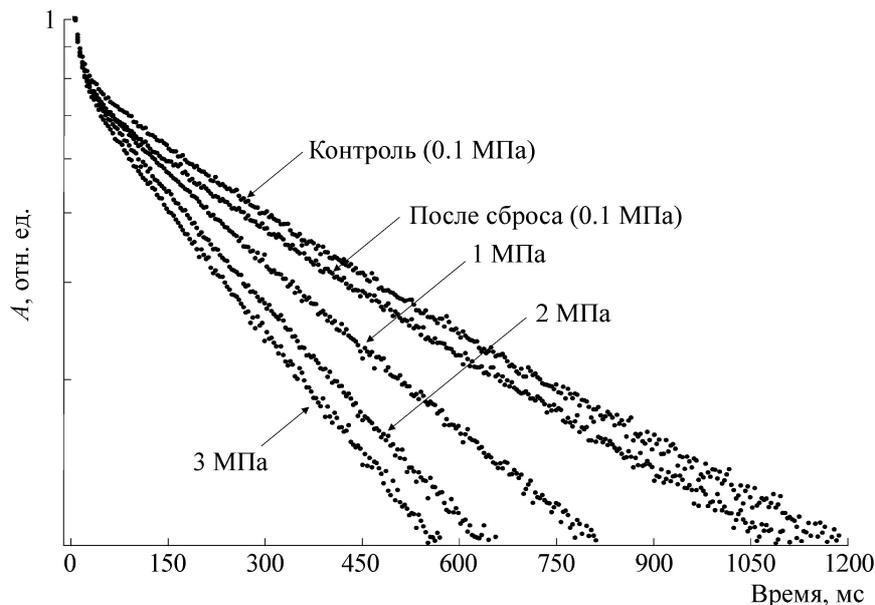


Рис. 4. Релаксационные затухания поперечной намагниченности от воды корня с парамагнитным допингом (0,025 М GdDTPA), внедренным во внеклеточное пространство, в контроле (при атмосферном давлении) и при пошаговом увеличении внешнего давления.

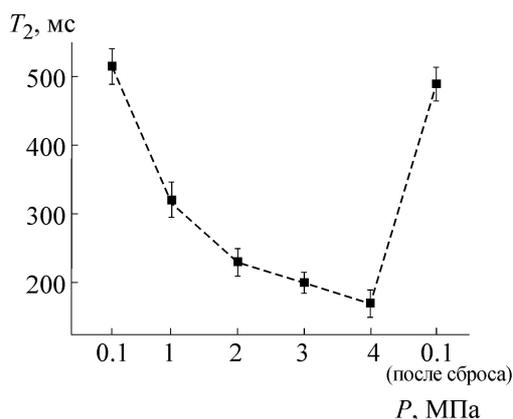


Рис. 5. Зависимость времени спин-спиновой релаксации T_{2a} вакуолярного компонента воды от величины приложенного давления воздуха и после сброса давления до атмосферного.

отсутствия в газовой среде кислорода магнитная релаксация воды не претерпевает значительного ускорения. Учитывая, что наземные растения обладают значительным газонасыщенным пространством межклетников, эффект укорочения времен релаксации под давлением и восстановление к контролю после снятия давления практически однозначно объясняется влиянием парамагнетизма кислорода воздуха. Известно, что кислород воздуха является парамагнитным и, следовательно, мощным источником релаксации [27]. Под давлением, согласно закону Генри, содержание его в ткани увели-

чивается, т.е. возникает эффект кислородного парамагнитного допинга. В итоге за первые 90 с первоначальное, резкое ускорение релаксации обязано проникновению кислорода в клетки (рис. 7).

Как правило, скорость релаксации линейно зависит от концентрации парамагнетика [28], тогда из рис. 7 следует, что при давлении 3 МПа концентрация кислорода в клетках за 40–45 с удваивается. Последующее за быстрым сравнительно медленное затухание сигнала эха (рис. 3) может быть связано с изменением проницаемости плазмалеммы. Зависимость водной проницаемости P_d мембранной системы клеток от давления, полученная решением обратной задачи обмена, приведенная на рис. 8, свидетельствует об увеличении коэффициента водопроницаемости плазмалеммы клеток кукурузы с ростом давления.

Среди причин изменения проницаемости плазмалеммы наиболее вероятными являются замедление процесса компонентного обновления мембран из-за торможения мембранного трафика и изменение в клетках уровня активных форм кислорода и, соответственно, уровня перекисного окисления липидов. В работе [8] методом электронной микроскопии показано, что при увеличении внешнего гидростатического давления до 4 МПа возникают существенные изменения в эндомембранной системе клеток корня. Появление перфораций в тонопласте связывается с торможением трафика мембранного

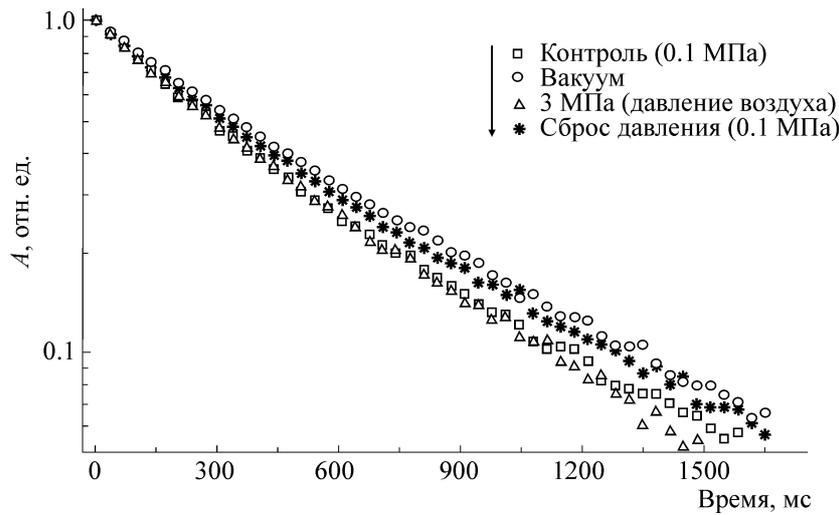


Рис. 6. Релаксационные затухания поперечной намагниченности воды для образца: квадраты – контроль (при атмосферном давлении), кружки – после вакуумной откачки воздуха, треугольники – после сброса вакуума и последующей замены воздуха чистым азотом по давлением 3 МПа, звездочки – после сброса давления азота.

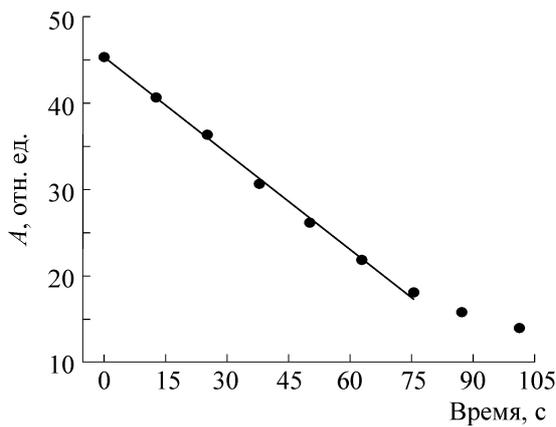


Рис. 7. Развернутая во времени зависимость релаксационного затухания амплитуды сигнала стимулированного эха с момента подачи давления воздуха 3 МПа.

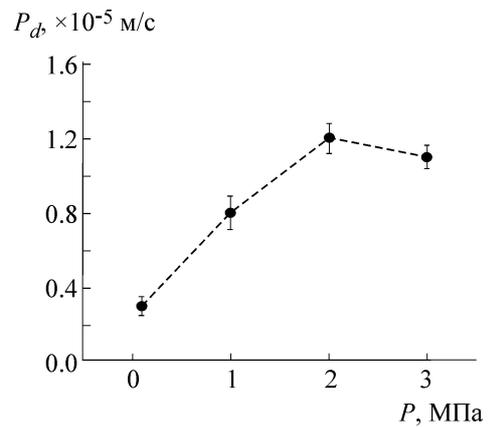


Рис. 8. Зависимость эффективного коэффициента водопроницаемости мембранной системы клеток корня кукурузы P_d от величины внешнего давления воздуха P .

материала в растущую вакуоль. Изменения под давлением в митохондриальном компартменте предполагают увеличение уровня активных форм кислорода. В свою очередь, рост уровня активных форм кислорода через интенсификацию перекисного окисления липидов может быть причиной увеличения проницаемости мембран [27,29]. С другой стороны, торможение мембранного трафика, вероятно, затрагивает не только тонопласт, но и процесс обновления плазмалеммы. В итоге плазмалемма претерпевает деструкционный процесс и частично теряет барьерно-регуляторные функции. Потери барьерной функции не летальны, поскольку после сброса внешнего давления растения восстанавливают скорость роста, первоначально ингиби-

рованную давлением [8]. Дополнительной причиной увеличения проницаемости может быть деструкция под давлением тонопласта. Однако по существующим представлениям вклад тонопласта в суммарную проницаемость «сэндвича» плазмалемма + тонопласт мал [25].

Следует отметить, что в исследованиях магнитной релаксации воды в растениях кислородная составляющая релаксации на фоне других механизмов осталась в тени. Как следует из рис. 9, изменения давления в диапазоне колебаний атмосферного приводят к изменениям времен релаксации до 10%, т.е. вполне значительны. В большинстве экспериментов величине атмосферного давления не уделяется должного внимания, и, по-видимому, этим может объяс-

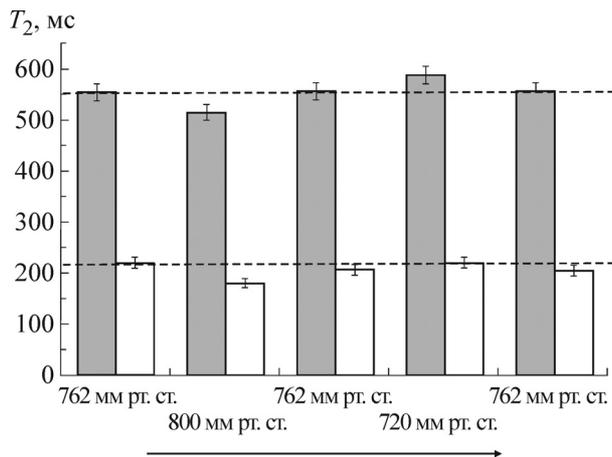


Рис. 9. Вариации времен спин-спиновой релаксации T_{2a} и T_{2b} для давлений, характерных диапазону колебаний атмосферного давления.

няться разброс экспериментальных значений времен релаксации.

ВЫВОДЫ

Положительное по отношению к атмосферному давлению воздуха приводит к увеличению скорости магнитной релаксации воды в растительной ткани, отрицательное давление – к снижению. Причина изменений времен релаксации связана с растворением под давлением дополнительного объема кислорода воздуха (кислородный допинг). Под давлением концентрация кислорода в клетках кукурузы линейно растет от времени до достижения равновесного состояния.

Кислородный допинг является причиной увеличения проницаемости плазмалеммы.

Увеличение проницаемости может быть связано с интенсификацией перекисного окисления липидов и деструктивными изменениями мембран при воздействии давлением. Кислород, растворенный при атмосферном давлении, является заметным источником релаксации воды в клетках растений. Колебания атмосферного давления, которые зачастую не учитываются при измерениях времен релаксации, могут быть одной из причин разброса экспериментальных релаксационных данных.

При интерпретации экспериментов, где рутинно используется известная процедура вакуумной инфильтрации, должен учитываться факт изменения равновесного содержания в клетках кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-04431).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Knoblauch and W. S. Peters, *Plant, Cell Environ.* **33** (2010).
2. N. M. Holbrook and M. A. Zwieniecki, *Phys. Today* **61** (2008).
3. M. Turgeon, *Plant Physiol.* **154** (2010).
4. А. А. Зялалов, *Физиолого-термодинамический аспект транспорта воды по растению* (Наука, М., 1984).
5. M. Borghetti, et al., *Funct. Ecol.* **7** (1993).
6. В. Н. Жолкевич, *Транспорт воды в растении и его эндогенная регуляция* (Наука, М., 2001).
7. В. П. Холодова и др., *Докл. РАН* **407**, 2 (2006).
8. Ф. А. Абдрахимов, М. А. Суслов и А. В. Анисимов, *Цитология* **55**, 6 (2013).
9. C. Hartmann, K. Mathmann, and A. Delgado, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **7** (2006).
10. А. В. Анисимов, М. А. Суслов и А. Ю. Алябьев, *Физиология растений* **61**, 4 (2014).
11. Э. А. Мелвин-Хьюз, *Физическая химия* (Изд-во иностранной литературы, М., 1962).
12. М. Фримантл, *Химия в действии* (Мир, М., 1998), ч. 1.
13. А. В. Анисимов, С. Раткович, *Транспорт воды в растениях. Исследование импульсным методом ЯМР* (Наука, М., 1992).
14. R. G. Ratcliffe, *Adv. Botan. Res.* **20** (1994).
15. B. M. Fung and T. W. McGaughy, *Biophys. J.* **28**, 293 (1979).
16. E. D. Finch and A. S. Schneider, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **406**, 1 (1975)
17. B. M. Fung, *Biochim. Biophys. Acta* **497**, 1 (1977).
18. K. R. Foster, H. A. Resing, and A. N. Garroway, *Science* **194**, 324 (1976).
19. K. R. Brownstein and C. E. Tarr, *Phys. Rev. A* **19** (1979).
20. А. В. Анисимов и др., *ДАН СССР* **271** (1983).
21. Van As, *J. Exp. Botany* **58** (2007).
22. Ю. И. Балла, Н. Г. Бакрадзе и Ю. Г. Шариманов, *Биофизика* **29** (1984).
23. А. В. Анисимов и др., *Датчики и системы* **7** (2012).
24. J. R. Zimmerman and W. E. Brittin, *J. Phys. Chem.* **61** (1957).
25. K. Kiyosawa and M. Tazawa, *J., Membr. Biol.* **37** (1977).
26. Т. Фаррар и Э. Беккер, *Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР* (Мир, М., 1973).
27. Е. П. Гуськов, *Генетика окислительного стресса* (Изд-во СКНЦ ВЦ ЮФУ, 2009).
28. А. А. Поппель, *Магнитно-релаксационный метод анализа неорганических веществ* (Химия, М., 1978).
29. G.A. Velikanov, et al., *Protoplasma* **252**, 5 (2015).

The Influence of External Gas Pressure on Water Magnetic Relaxation in Plant Cells

A.V. Anisimov and M.A. Suslov

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia,*

Using the spin-echo method for measuring nuclear relaxation times it was shown with maize seedlings (*Zea mays L.*) that during disturbance of the hydrodynamic system of root segments by external pressure up to 4MPa the changes in water magnetic relaxation velocity result from the oxygen paramagnetic doping which determines, in its turn, the changes in plasmalemma water permeability. The atmosphere oxygen is shown to be a marked source of water magnetic relaxation in plants.

Key words: transport of water, gas exchange, pressure, oxygen, relaxation time, nuclear magnetic resonance