

МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ ВОДЫ В РАСТЕНИЯХ: МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЯМР-ДИФФУЗОМЕТРИИ МЕТОДОМ МОНТЕ КАРЛО

Сибгатуллин Т.А., Воробьев В.Н.

E-mail: Sibgatullin@mail.knc.ru

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН¹

Аннотация. В настоящей работе представлено моделирование методом Монте Карло результатов ЯМР эксперимента по исследованию диффузии воды в бесконечно протяженной системе растительных клеток. Рассматривается влияние релаксации намагниченности на экспериментально определяемое значение проницаемости клеточных мембран.

Введение

Межклеточный транспорт воды в растениях в значительной степени определяет функционирование растения. Мембраны клеток являются одним из основных инструментов его регулирования и определяют приспособляемость растений к изменениям водного режима. В результате представляет интерес возможность исследовать на целых растениях изменение проницаемости мембран клеток в ответ на внешние воздействия. Методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР) зарекомендовали себя в исследовании биологических объектов благодаря тому, что являются неразрушающими методами [1].

Исследование диффузионной подвижности жидкостей в пористых (био-)системах позволяет определять размер ограничений (клеток, пор) и связанность пространства (проницаемость, извилистость) [2]. В случае растительных клеток экспериментально наблюдаемый коэффициент самодиффузии (КСД) воды является усредненным значением по всем компартментам клетки (вакуоль, цитоплазма, межклеточное пространство).

При использовании метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля для измерения значений КСД следует учитывать, что за время диффузии (время наблюдения) намагниченность спиновой системы уменьшается за счет релаксационных процессов (спин-решеточной (T_1) или спин-спиновой (T_2) релаксации, в зависимости от выбора импульсной последовательности измерений) [3]. Компартменты растительной клетки различаются по временам релаксации воды [4]. В результате вклад каждого компартмента в экспериментально наблюдаемый средний КСД меняется со временем, что приводит к искажению определяемых экспериментально значений проницаемости мембран и размера клетки.

Моделирование ЯМР экспериментов по измерению диффузии воды в биосистемах широко используется для понимания и интерпретации реальных данных [5]. Однако модели, учитывающие релаксацию намагниченности, на данный момент ограничены рассмотрением внутриклеточного обмена [6, 7].

Теория

В результате Броуновского движения среднее смещение молекул в изотропной среде всегда равно нулю. При этом среднеквадратичное смещение отлично от нуля и определяется уравнением Эйнштейна

$$R^2(t) = 2mD_0t, \quad (1)$$

где m – размерность пространства, D_0 – КСД жидкости.

В случае замкнутых пор или непроницаемых мембран, когда молекулы не могут покинуть заданную область пространства размерами R , согласно уравнению (1), экспериментально наблюдаемый КСД выражается

$$D(t) = \frac{R^2}{2t}. \quad (2)$$

В случае полупроницаемых преград экспериментально определяемый КСД, уменьшаясь, стремится к некоторому значению D_∞ . В случае системы плоскопараллельных мембран (пластин) это значение связано с КСД жидкости D_0 , диффузионной проницаемостью мембран P_d и расстоянием между мембранами d через уравнение Крика [8]

$$\frac{1}{D_\infty} = \frac{1}{D_0} + \frac{1}{P_d \cdot d}. \quad (3)$$

Через параметры D_0 , D_∞ и R зависимость КСД от времени в общем случае можно описать уравнением [9, 10]

$$D(t) = \frac{R^2}{2t} \frac{(D_0 - D_\infty)}{\frac{R^2}{2t} + D_0} + D_\infty, \quad (4)$$

где в случае плоскопараллельных пластин $d = \sqrt{6}R$.

¹ Аннотация на английском языке Автором не представлена.

Метод

В качестве объекта моделирования выбраны клетки междуузлий водоросли *Elodea canadensis* (Рис. 1). Основную долю клетки занимает вакуоль, окруженная мембраной – тонопластом. Для упрощения, межклеточное пространство не рассматривалось, и считалось, что цитоплазмы двух соседних клеток разделены одной общей мембраной – плазмалеммой. Размеры клетки составляют: $a_1 = 500$ мкм, $a_2 = 490$ мкм, $b_1 = 50$ мкм, $b_2 = 40$ мкм.

Рассматривалась двухмерная модель случайных прыжков. На каждом временном шаге координата молекулы воды изменялась в одном из четырех случайно заданных направлений (x , $-x$, y , $-y$) на длину прыжка l .

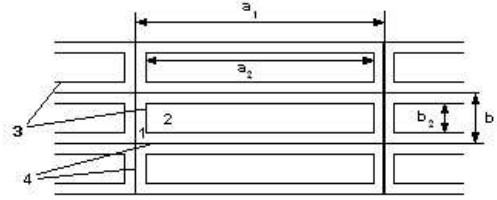


Рис.1. Модель упаковки клеток *Elodea canadensis*. Цифрами обозначены: 1 – цитоплазма клетки, 2 – вакуоль клетки, 3 – мембрана тонопласт, 4 – мембрана плазмалемма.

Для диффузии между непроницаемыми параллельно-плоскими пластинами соотношение расстояния между пластинами и длины прыжка должно быть не менее, чем 5:1, чтобы результаты моделирования согласовывались с аналитическим решением [11]. С учетом этого требования была выбрана длительности временного шага $\tau = 1 \cdot 10^{-4}$ с. КСД воды в вакуоли $D = 2.5 \cdot 10^{-9}$ м²/с, что соответствует КСД чистой воды при комнатной температуре. КСД воды в цитоплазме $D = 0.9 \cdot 10^{-9}$ м²/с, меньше, чем в вакуоли [10, 12]. Длина элементарного прыжка составила соответственно в вакуоли $l = 1$ мкм, в цитоплазме $l = 0.6$ мкм.

Для определенности считалось, что за время наблюдения намагниченность затухает за счет спин-спиновой (T_2) релаксации, что соответствует измерению диффузии импульсной последовательностью Хана. В соответствии с экспериментальными данными [13] выбраны времена спин-спиновой релаксации: в вакуоли – $T_2^{\text{вак.}} = 1$ с, в цитоплазме – $T_2^{\text{цит.}} = 0.2$ с.

Для моделирования прохождения молекул воды через мембраны клетки задавалась некоторая вероятность пересечь мембрану в случае, если при очередном прыжке молекула должна пересечь эту мембраны. Таким образом, если при очередном прыжке молекула сталкивается с мембраной клетки, то случайным образом генерируется число в интервале от 0 до 1. Если вероятность пересечь эту мембрану больше, чем сгенерированное число, тогда молекуле разрешается осуществить прыжок в заданном направлении, если меньше – координата молекулы не изменяется.

В каждый момент времени концентрация молекул в каждом компартменте клетки должна оставаться постоянной. Исходя из этого требования, число молекул, проходящих через мембрану в прямом направлении, должно быть равно числу молекул, проходящих через мембрану в обратном направлении. Тогда для тонопласта (мембраны, разделяющей вакуоль и цитоплазму) условие равновесия концентрации запишется

$$N_{\rightarrow} = N_{\leftarrow}. \quad (5)$$

В очередной момент времени возможность осуществить прыжок через мембрану есть только у молекул, находящихся на расстоянии, не превышающем длину прыжка. Тогда уравнение (5) запишется, как

$$lP_{\rightarrow}C\alpha = lP_{\leftarrow}C\alpha, \quad (6)$$

где α – вероятность того, что прыжок направлен в сторону мембраны. В нашем случае $\alpha = 0.25$, т.к. из четырех возможных направлений прыжка только одно – в сторону мембраны. Учитывая равенство концентраций в начальный момент времени уравнение (6) преобразуется в

$$lP_{\rightarrow} = lP_{\leftarrow}. \quad (7)$$

Экспериментально определяемое значение диффузионной проницаемости отражает объем воды V , проходящий через единицу поверхности за единицу времени

$$P_d = \frac{V}{S} \frac{1}{t}. \quad (8)$$

Оно связано с вероятностью пересечь мембрану через уравнение

$$P_d = \frac{lP_{\rightarrow}}{\tau} \alpha = \frac{lP_{\rightarrow}}{\tau} \alpha. \quad (9)$$

В начальный момент времени намагниченность каждой моделируемой частицы приравнивалась 1. Далее считалось, что намагниченность m_i каждой i -ой моделируемой частицы ведет себя, как намагниченность группы молекул со временем релаксации, характерным для компартамента клетки, в котором она находится в данный момент. На каждом n -ом шаге времени намагниченность частицы меняется по закону

$$m_i^n = m_i^{n-1} \exp \left(-\frac{\tau}{T_2} \right). \quad (10)$$

Наблюдаемое с учетом релаксации намагниченности значение КСД рассчитывалось в соответствии с уравнением Эйнштейна по формуле

$$D_{app}(t) = \frac{\sum_i m_i(t) (\Delta X_i)^2}{2t \sum_i m_i(t)}. \quad (11)$$

Рассчитанное таким образом значение соответствует так называемому среднему КСД, определяемому в ЯМР - диффузометрии по начальному наклону зависимости амплитуды сигнала от прикладываемого градиента магнитного поля (т.е. в пределе малых значений градиента) [3].

Результаты

На первом этапе была проанализирована зависимость наблюдаемого значения КСД от времени в случае клетки с непроницаемыми мембранами $P = 0$ (случай полностью ограниченной диффузии).

Наблюдаемое значение КСД в поперечном направлении при времени $t > 0.5$ с описывается уравнением (2) с параметром $R = \text{const}$ (Рис. 2). По результатам аппроксимации получены значения размера ограничений. При отсутствии релаксации определяемый размер ограничений d составляет 37 мкм. При наличии релаксации получено значение $d = 40$ мкм. В обоих случаях значение d меньше, чем ширина клетки b_1 . При отсутствии релаксации значение d приближенно представляет собой средневзвешенное ширины слоя цитоплазмы ($b_1 - b_2$) и ширины вакуоли b_2 . При наличии релаксации намагниченность в цитоплазме уменьшается значительно быстрее, чем в вакуоли. При $t > 0.5$ с ее вклад в суммарную намагниченность и, следовательно, в средний КСД становится пренебрежимо мал. В результате, определяемое значение d соответствует ширине вакуоли b_2 .

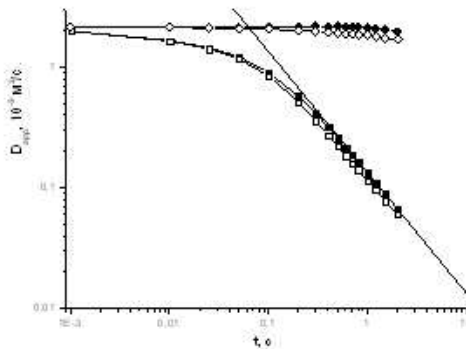


Рис.2. Зависимость среднего КСД от времени в продольном (ромбы) и поперечном (квадраты) направлении при наличии релаксации (закрытый символ) и без релаксации (открытый символ).

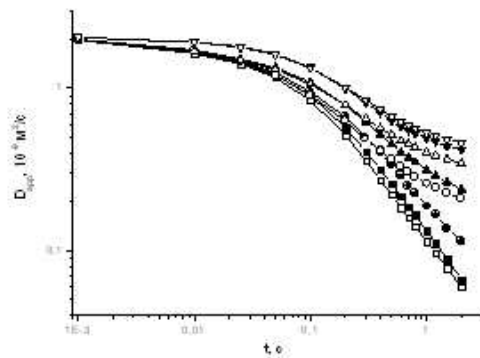


Рис.3. Зависимость среднего КСД от времени в поперечном направлении при наличии релаксации (закрытый символ) и без релаксации (открытый символ). Символы соответствуют различным вариантам значений проницаемости тонопласта (P_d^i) и плазмалеммы (P_d^e): квадраты – $P_d^i = P_d^e = 0$; круги – $P_d^i = P_d^e = 10$ мкм/с; треугольники вверх – $P_d^i = 10$ мкм/с, $P_d^e = 40$ мкм/с; треугольники вниз – $P_d^i = 10$ мкм/с, $P_d^e = 1000$ мкм/с.

В случае диффузии в продольном направлении клетки молекулы за время наблюдения ($t = 2$ с) не успевают почувствовать ограничений, т.к. их среднеквадратичное смещение составляет порядка 70 мкм, что значительно меньше длины клетки a_1 . В результате КСД практически не меняется в диапазоне исследованных времен (Рис. 2).

Если мембраны клетки обладают некоторой проницаемостью, тогда у молекул воды появляется возможность переходить из одной клетки в другую. При этом, чтобы попасть из одной вакуоли в соседнюю вода должна пересечь тонопласт, плазмалемму и слой цитоплазмы, характеризующийся коротким временем релаксации. Тогда суммарную проницаемость можно оценить, как

$$P_d = (P_d^i)^{-1} + 2(P_d^e)^{-1} \quad (12)$$

На Рис. 3 приведены зависимости КСД от времени в поперечном направлении при различных значениях проницаемости мембран. По результатам аппроксимации кривых уравнением (4) были получены кажущиеся значения диффузионной проницаемости P_d и размера клеток d (Табл. 1).

Таблица 1: Значения размера ограничений и диффузионной проницаемости по результатам аппроксимации зависимости значения КСД в поперечном направлении от времени уравнением (4).

Входные параметры модели			Результаты аппроксимации			
			с учетом релаксации		без учета релаксации	
$P_d^{\text{тон.}}$, мкм/с	$P_d^{\text{пл.}}$, мкм/с	$*P_d^{\text{сум.}}$, мкм/с	** $P_d^{\text{сум.}}$, мкм/с	d , мкм	** $P_d^{\text{сум.}}$, мкм/с	d , мкм
0	0	0	0	40	0	37
10	10	3.33	0.4	48.3	3.5	41.6
10	40	6.67	2.7	51.6	6.7	46.3
10	1000	9.80	5.9	56.7	7.3	56.0

* - по уравнению (12); ** - по уравнению (3).

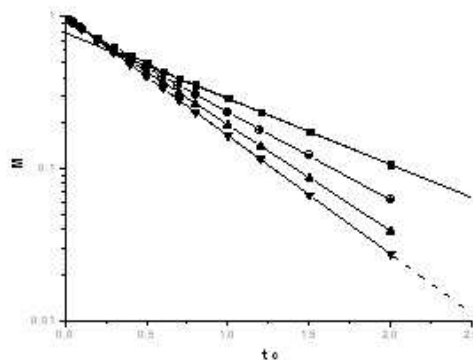


Рис.4. Затухание суммарной намагниченности со временем за счет релаксационных процессов. Обозначения символов как на Рис. 3. Прямая линия соответствует функции $0.784\exp(-t/1.0)$, пунктир – функции $\exp(-t/0.555)$.

В случае проницаемых мембран при $t > 0.5$ с в присутствии релаксации КСД всегда больше, чем без релаксации (Рис. 3), тогда как в случае непроницаемых мембран наблюдается обратная картина (Рис. 2). В результате значение D_∞ и, следовательно, рассчитанная по уравнению (3) суммарная проницаемость при наличии релаксации меньше, чем без нее (Табл. 1). В случае низкой проницаемости при $P_d = P_a = 10$ мкм/с в эксперименте без релаксации определяемое значение P_d совпадает с входным параметром, а при наличии релаксации – на порядок меньше заданного. При увеличении проницаемости тонопласта ускоряется обмен намагниченностью между вакуолью и цитоплазмой приводящий при $P_d = 1000$ мкм/с к моноэкспоненциальному затуханию суммарной намагниченности, характерному для режима быстрого обмена (Рис. 4). При этом различие между экспериментальным и заданным значениями проницаемости уменьшается и составляет 40%.

Заключение

ЯМР-диффузометрия является незаменимым для биологических объектов неразрушающим методом определения размера клеток и проницаемости мембран клетки. Однако различие компарментов клетки по времени релаксации намагниченности может приводить к существенному искажению определяемых параметров. Главным образом это касается проницаемости мембран. В данной работе показано, что степень отличия экспериментального значения от реального зависит от скорости внутриклеточного обмена воды между компартаментами клетки. При медленном обмене наблюдается наибольшее различие т.к. вода, проходящая через слой цитоплазмы, практически полностью теряет намагниченность и не регистрируется методом ЯМР. При быстром обмене все внутриклеточное пространство можно описать средним временем релаксации, тогда затухание намагниченности оказывает минимальное влияние на результат эксперимента.

Дальнейшие исследования должны быть связаны с определением рамок применимости метода ЯМР-диффузометрии в исследовании проницаемости мембран клетки и поиском подходов, позволяющих учесть вклад релаксации.

Литература

1. А.В. Анисимов, С. Раткович, *Транспорт воды в растениях: исследование импульсным методом ЯМР*, “Наука”, Москва (1992).
2. R.R. Valiullin, V.D. Skirda, R. Kimmich, S. Stapf, *Molecular exchange processes in partially filled porous glass as seen with NMR diffusometry*, Phys. Rev. E, **55**, 2664 (1997).
3. А.И. Маклаков, В.Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин, *Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров*, Казань: изд. Казанского университета, (1987).
4. J.E.M. Snaar, H. Van As, *Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by 1H NMR relaxation measurements*, Biophys. J., **63**, 1654 (1992).
5. D.G. Regan, P.W. Kuchel, *Mean residence time of molecules diffusing in a cell bounded by a semi-permeable membrane: Monte Carlo simulations and an expression relating membrane transition probability to permeability*, Eur. Biophys. J., **29**, 221 (2000).

6. E.G. Novikov, D. van Dusschoten, H. Van As, *Modeling of self-diffusion and relaxation time NMR in multi-compartment system*, J. Magn. Reson., **135**, 522 (1998).
7. L. van der Weerd, S.M. Melnikov, F.J. Vergeldt, E.G. Novikov, H. Van As, *Modeling of self-diffusion and relaxation time NMR in multicompartement systems with cylindrical geometry*, J. Magn. Reson., **156**, 213 (2002).
8. F. Crick, *Diffusion in embriogenesis*, Nature, **225**, 420 (1970).
9. R.R. Valiullin, V.D. Skirda, *Time dependent self-diffusion coefficient of molecules in porous media*, J. Chem. Phys., **114**, 452 (2001).
10. Т.А. Сибгатуллин, А.В. Анисимов, П.А. де Ягер, Ф.Й. Фергелдт, Е. Геркема, Х. Ван Ас, *Анализ диффузионного и релаксационного поведения воды в клетках мякоти яблока*, Биофизика, **52**, 268 (2007).
11. M.C. Piton, A.J. Lennon, B.E. Chapmen, P.W. Kuchel, *Diffusion of solvent in swollen latex particles*, J. Colloid Interface Sci., **166**, 437 (1994).
12. D. van Dusschoten, P.A. de Jager, H. Van As, *Extracting diffusion constants from echo-time-dependent PFG NMR data using relaxation-time information*, J. Magn. Reson. A, **116**, 22 (1995).
13. V.N. Vorob'ev, A.V. Anisimov, N.R. Dautova, *Contribution of the actomyosin motor to the temperature-dependent translational diffusion of water by cytoplasmic streaming in Elodea canadensis cells*, Protoplasma, **224**, 195 (2004).