

УДК 581.032

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Ф. Г. МИФТАХУТДИНОВА, А. В. АНИСИМОВ, Г. А. ВЕЛИКАНОВ

**ИССЛЕДОВАНИЕ САМОДИФФУЗИИ ВОДЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ СПИНОВОГО ЭХА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ИМПУЛЬСНОГО ГРАДИЕНТА МАГНИТНОГО ПОЛЯ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 4 III 1975)

Применение метода спинового эха я.м.р. для изучения состояния воды в тканях в последние годы позволило получить информацию о самодиффузии молекул воды в живой клетке (¹⁻⁵). Однако, за исключением работы (²), измерения коэффициента самодиффузии (к.с.д.) воды в тканях проводились методом спинового эха с использованием постоянного градиента магнитного поля. Поскольку в тканях установлено наличие ограниченной самодиффузии (^{1, 3}), более перспективным представляется использование импульсного градиента магнитного поля, что увеличивает возможность исследований закономерностей ограниченной диффузии, возможность выявления и раздельного измерения фракций с различным к.с.д. в исследуемой системе. Нами создана аппаратура импульсного градиента магнитного поля к установке спинового эха и проведены детальные исследования самодиффузии воды в тканях и в ряде других биологических объектов, направленные на выявление фракций с различным к.с.д. в изучаемых системах.

Резонансная частота установки 20 мгц. К.с.д. определялся из зависимости $\ln R$ от g^2 , где R — отношение амплитуд эха сигнала при включенных и выключенных градиентных импульсах, g — амплитуда градиентных импульсов. Измерения зависимости R от g проводились при варьировании значений g от 0 до 1700 гс/см, времени между градиентными импульсами Δ , определяющем «время наблюдения», от 2 мсек. до 15, 30 мсек. и длительности градиентных импульсов δ от 300 до 1000 мксек. При этом вариация Δ производилась путем изменения времени между 90 и 180° радиочастотными импульсами т. Характеристика детектора принималась во внимание. Объектом исследования служили листья гороха, бобов, зародыши зерновок пшеницы 6–10-часового набухания, печень и мозг мыши, дрожжевые клетки (прессованные пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, клетки хлореллы (*Chlorella pyrenoidosa*), осадок после центрифугирования в течение 5 мин. при 4000 об/мин). Температура образцов во время измерений $25 \pm 0,5^\circ$.

Предварительные исследования показали, что аппаратура и условия измерения позволяют с относительно большой точностью определить фракции с различными к.с.д. в модельных системах. Так, для системы, состоящей из разобщенных объемов глицерина и воды, достаточно хорошее разделение кривой зависимости $\ln R$ от g^2 на две экспоненты получено, когда на долю глицерина приходится до 10% от всего количества протонов системы. Зависимость $\ln R$ от g^2 для бутилового спирта является линейной во всем диапазоне значений градиента (рис. 1).

Результаты измерений зависимости R от g для некоторых из исследованных объектов приведены на рис. 2. Установлено, что для большей части объектов, за исключением листьев, зависимость $\ln R$ от g^2 , начиная с $\Delta > 6-8$ мсек., является с достаточно хорошим приближением суммой двух экспонент. Такой характер зависимости $\ln R$ от g^2 конкретно для

рассматриваемых систем может быть связан как с эффектом ограниченной диффузии (⁶), так и с наличием двух фракций протонов с различной подвижностью (рис. 1). С целью выяснения вклада эффекта ограниченной диффузии был проведен анализ зависимости $\ln R$ от $(\delta g)^2$ и (Δ^{-1}/δ) (рис. 3). Согласно (³), в случае ограниченной диффузии зависимость фактора $\ln R$ от $(\delta g)^2$ и (Δ^{-1}/δ) в координатах $(\delta g)^2(\Delta^{-1}/\delta)$ различна, что и установлено для всех исследованных нами объектов. Теоретический анализ рассматриваемых систем трудно выполнить, поскольку не известна

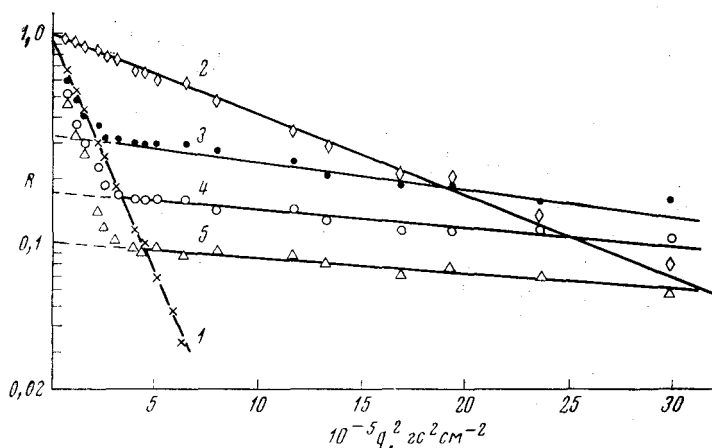


Рис. 1. Зависимость R от g^2 при фиксированном значении $\Delta=2 \cdot 10^{-3}$ сек. и δ . 1 — вода; 2 — бутиловый спирт; 3, 4, 5 — соответственно 35, 19, 10% глицерина, 1, 2 — $\delta=4 \cdot 10^{-4}$ сек.; 3, 4, 5 — $\delta=6 \cdot 10^{-4}$ сек.

функция распределения ограничений. Для простого случая самодиффузии между параллельными ограничивающими слоями выражение для фактора R дается (³) как

$$R = \frac{2[1 - \cos(\gamma \delta g a)]}{(\gamma \delta g a)^2} + 4(\gamma \delta g a)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(\frac{-n^2 \pi D \Delta}{a^2}\right) \frac{1 - (-1)^n \cos(\gamma \delta g a)}{[(\gamma \delta g a)^2 - (n\pi)^2]^2}$$

где γ — гиромагнитное отношение, D — коэффициент самодиффузии, a — расстояние между слоями. Характер зависимости $\ln R$ от g^2 и Δ при различных a , построенных по вышеприведенному выражению, позволяет объяснить экспериментальные кривые наличием в исследуемых системах спектра ограничений. Быстрый спад $\ln R$ при малых величинах g^2 обусловлен диффундирующими молекулами, мало испытывающими действие ограничений. Медленный спад обуславливается диффузией молекул, испытывающих ограничения в более полной мере. Это проявляется и в характере изменения долевого соотношения быстрой и медленной частей зависимости $\ln R$ от g^2 при вариации Δ . Как видно из рис. 2, увеличение Δ от 2 до 6—8 мсек. приводит к резкому уменьшению «доли» медленной части. Однако некоторое постепенное уменьшение доли медленной части при дальнейшем увеличении Δ до 10—15 мсек. (рис. 2) и исчезновение ее при $\Delta=20$ —25 мсек. трудно объяснить только эффектом ограниченной самодиффузии, даже с учетом определенной проницаемости мембран клетки как основных факторов, обуславливающих ограниченную диффузию. Эти данные, по-видимому, свидетельствуют о наличии в исследуемых объектах фракции воды с меньшей подвижностью и существенном вкладе этой фракции при $\Delta > 10$ мсек. в медленный спад зависимости $\ln R$ от g^2 . В этом случае, исходя из выбранного способа вариации Δ , постепенное уменьшение и исчезновение доли медленной части можно рассматривать как следствие уменьшения вклада фракции с меньшей подвижностью в

сигнал эха в результате более быстрого релаксационного затухания последней.

Таким образом, полученные данные и их рассмотрение позволяют говорить о наличии в исследуемых объектах двух фракций воды, различающихся по своей подвижности. Из экспериментальных данных определены долевое соотношение и к.с.д. воды этих двух фракций, хотя точное определение долевого соотношения и истинных значений к.с.д. несколько затруднено эффектом ограниченной самодиффузии.

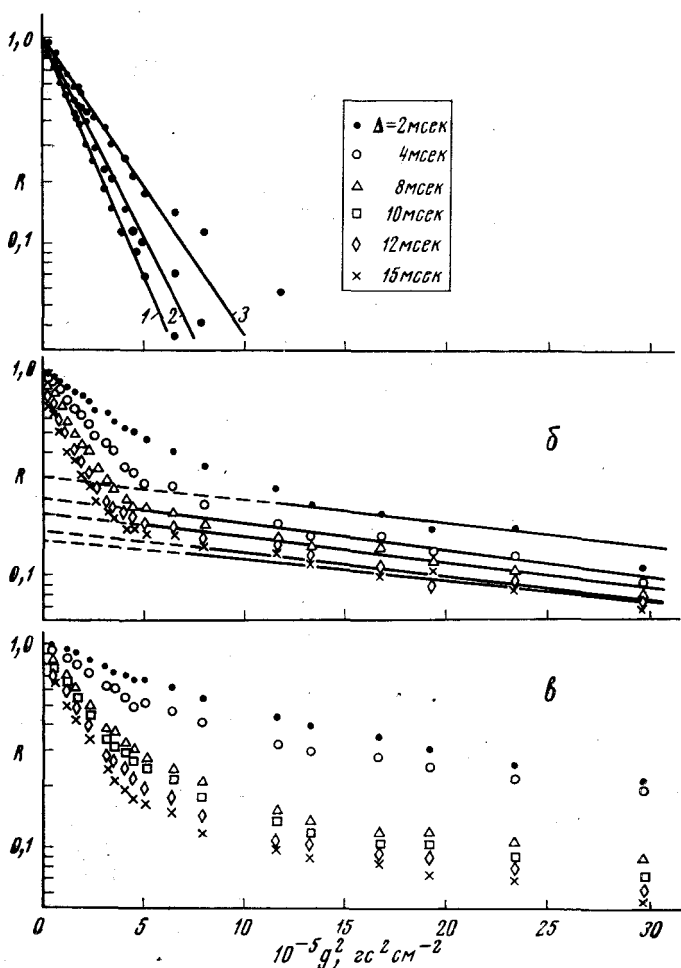


Рис. 2. Зависимость R от g^2 при фиксированном значении $\delta = 16 \cdot 10^{-8}$ сек. и Δ : а: 1 — вода, 2 — листья гороха, 3 — листья бобов; б — зародыши зерновок пшеницы; в — мозг

Доля фракции воды с большей подвижностью — не менее 85–90% от общего содержания воды. Сюда относится вода внеклеточного пространства и основная масса внутриклеточной воды. К.с.д. этой фракции, вычисленные по быстрому спаду зависимости $\ln R$ от g^2 при $\Delta = 2$ мсек. (рис. 2), для листьев бобов и гороха, зародышей зерновок пшеницы, печени и мозга мыши, дрожжей, хлореллы равны (10^{-5} см²/сек): 1,82; 1,59; 0,84; 0,66; 0,58; 0,60; 1,03 соответственно и в целом согласуются с имеющимися в литературе значениями к.с.д. воды для этих объектов (¹⁻³).

К.с.д. фракции воды с меньшей подвижностью для исследованных объектов, вычисленные по медленному спаду зависимости $\ln R$ от g^2 при $\Delta = 10-15$ мсек. (рис. 2), порядка $0,2-1,0 \cdot 10^{-6}$ см²/сек. Долевое отноше-

ние этой фракции не более 10–15%, что при общем содержании воды в рассматриваемых объектах 65–80% от сырого веса соответствует не более 0,2–0,6 г воды на 1 г сухого веса и, по-видимому, может быть отнесено к гидратной воде этих систем. В связи с этим, становится понятным и упомянутое выше отсутствие медленного спада зависимости $\ln R$ от g^2 для таких сильно оводненных тканей, как листья бобов и гороха (рис. 2). Для этих тканей с общим содержанием воды около 90% от

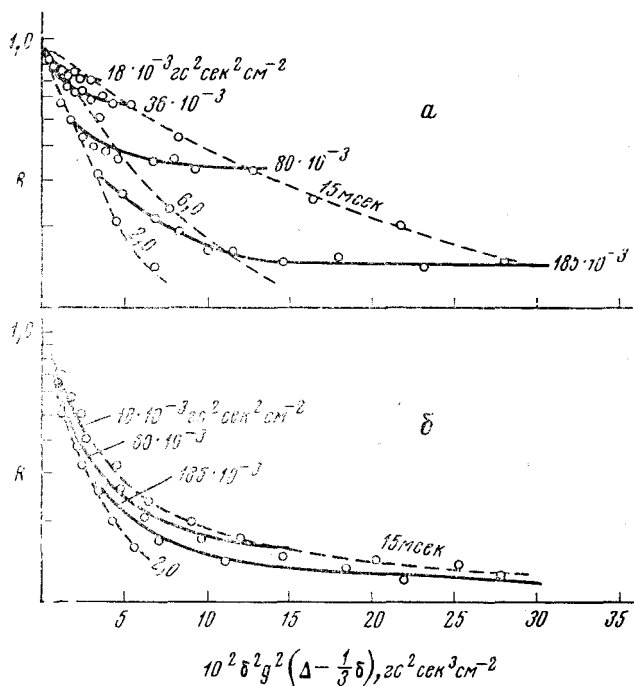


Рис. 3. Зависимость R от $\delta^2 g^2 (\Delta - 1/3 \delta)$: сплошные линии при фиксированном значении $(\delta^2 g^2)$ и пунктирные линии — при фиксированном значении Δ . а — дрожжи, б — зародыши зерновок пшеницы

сырого веса, значительная масса которой приходится на долю центральной вакуоли, относительное количество воды, в полной мере испытывающее действие ограничений, по-видимому, незначительно, а гидратная вода составляет не более 3–5% от общего содержания воды.

Следует отметить, что величина к.с.д. воды порядка $1 \cdot 10^{-6}$ см²/сек получена нами и для подсушенных образцов дрожжей с содержанием воды 0,25 г на 1 г сухого вещества. При этом для таких образцов обнаруживается только медленный спад зависимости $\ln R$ от g^2 , а быстрый спад при малых значениях g^2 появляется при более высоком содержании воды в образцах.

Итак, полученный материал показывает наличие двух фракций воды в исследованных объектах и возможность использования методики импульсного градиента магнитного поля для исследований состояния гидратной воды.

Казанский институт биологии
Казанского филиала Академии наук СССР

Поступило
28 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. А. Абецедарская, Ф. Г. Мифтахутдинова, В. Д. Федотов, Биофизика, т. 13, 630 (1968).
- ² Ф. Г. Мифтахутдинова, Н. А. Гусев, Физиол. раст., т. 15, 903 (1968).
- ³ J. E. Tanner, E. O. Stejskal, J. Chem. Phys., v. 49, 1768 (1968).
- ⁴ E. D. Finch, J. F. Harman, B. H. Muller, Arch. Biochem. and Biophys., v. 147, 299 (1971).
- ⁵ J. A. Watter, A. B. Hope, Austr. J. Biol. Sci., v. 24, 497 (1971).
- ⁶ B. D. Boss, E. O. Stejskal, J. Chem. Phys., v. 43, 1068 (1965).