

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАРАМАГНИТНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И МЕТОДА СПИН-ЭХО ЯМР ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСПОРТА ВОДЫ В КОРНЯХ ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЙ.

Суслов М.А.<sup>1</sup>, Егоров Д.В.<sup>1</sup>, Даминова А.Г.<sup>1</sup>, Анисимов А.В.<sup>1</sup>, Самигуллин Д.В.<sup>1</sup>, Мустафина А.Р.<sup>2</sup>, Бочкова О.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН  
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, РФ

<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН  
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: makscom87@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0620

**Аннотация.** В работе представлены результаты использования метода спин-эхо ЯМР с применением нового типа МРТ-флуоресцентных контрастных агентов для исследования характеристик транспорта воды в тканях корней растений. Двойное контрастирование обеспечено включением как флуоресцентных, так и парамагнитных компонентов в силикатные наночастицы. Цель использования данного методического подхода заключается в демонстрации возможности исследования интенсивности транспорта воды в корнях селективно по симпластному (из клетки в клетку через плазмодесмы) и апопластному (внеклеточному) путям водного переноса. Флуоресцентные свойства наночастиц позволили исследовать скорость их проникновения и характер распределения в тканях корня кукурузы. Было показано, что частицы относительно быстро проникают и распределяются по апопласту корня, но при этом не проникают внутрь клеток, по крайней мере, в течение 1,5-2 часов, что являлось необходимым условием для проведения ЯМР экспериментов. В работе использовали два вида наночастиц с парамагнитным ядром на основе марганца и оксида железа. Было показано, что водные растворы наночастиц обладают показателями релаксивности приемлемыми для разделения внеклеточной и внутриклеточной воды в тканях корня по временам магнитной релаксации после часовой инкубации корней растений в растворах наночастиц. Контроль скорости проникновения наночастиц в апопласт корня с помощью конфокальной микроскопии был использован для демонстрации возможностей для качественной оценки интенсивности апопластного транспорта воды в корне. Таким образом, по сравнению с хорошо известными и использованными нами ранее видами МРТ-контрастантов на основе гадолиния, марганца и др., очевидным преимуществом использования парамагнитных флуоресцентных наночастиц в исследовании транспорта воды в растительных тканях, является возможность их визуализации в тканях, а также отсутствие токсического действия на растения, что также было показано в данной работе.

**Ключевые слова:** транспорт воды в растениях, ядерный магнитный резонанс, спин-спиновая релаксации, парамагнитные флуоресцентные наночастицы, апопласт, симпласт.

Проблема транспорта воды в растениях продолжает занимать внимание многих исследователей, и прежде всего потому, что транспорт воды в наибольшей степени определяет рост и продуктивность растений [1]. Внутри данной проблемы важную часть занимает функционирование корневой системы. Композитная модель транспорта воды в корнях растений, впервые предложенная Э. Штейдлом [2] и предполагающая существование трёх параллельных путей транспорта воды в корне (апопластного, симпластного и трансмембранного), не перестаёт быть актуальной и по сегодняшний день. Однако появление новых экспериментальных данных о функционировании корневой системы растений привело к необходимости усовершенствования классической модели транспорта воды [3]. Модель дополнялась новыми водопроводящими, регуляторными и барьерными элементами с учётом гидравлической архитектуры корня. В рамках модифицированной модели акцентированное внимание уделено роли аквапоринов в трансмембранном переносе воды [4], исследованию гидроструктурирования [5], гидротропизма [6], роли апопластных барьеров [7,8], а также заострили внимание на необходимости количественной оценки общих принципов гидравлики воды, начиная с уровня клеток корня. Следующий шаг в усовершенствовании композитной модели транспорта воды предложен в виде модели МЕСНА (Model of Explicit Cross-section Hydraulic Anatomy) [9]. МЕСНА представляет собой гидравлическую модель, которая рассчитывает поток воды через клеточные стенки, мембраны и плазмодесмы каждой отдельной клетки по всему поперечному срезу корня. Интересно, что данная модель предсказывает высокую чувствительность суммарной гидравлической проводимости корня к апертуре плазмодесм. Однако значения гидравлической проводимости плазмодесм и клеточных стенок в наименьшей степени подкреплены экспериментальными данными по сравнению со значениями параметров водного переноса через мембраны клеток. Связано это, в первую очередь, с методическими и техническими сложностями для количественной оценки вышеприведённых параметров.

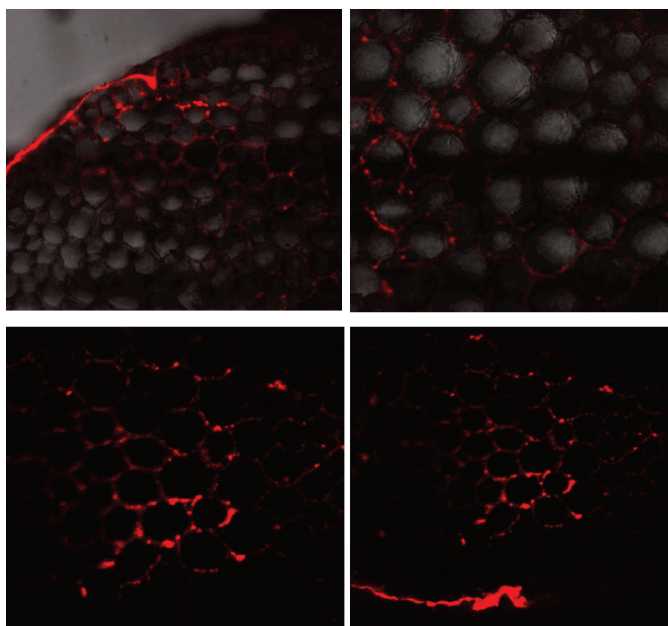
В работе Анисимова и Гусева [10] для исследования переноса воды селективно по симпласту в равновесных условиях без применения внешних движущих сил впервые было предложено использовать метод спинового эха ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (градиентный ЯМР) в сочетании с парамагнитным допингом.



**Рисунок 1.** Климатические камеры роста растений с контролем температуры, относительной влажности воздуха и концентрации углекислого газа. Камеры имеют возможность сопряжения с ЯМР оборудованием и газовой системой для непрерывного исследования параметров водного переноса при одновременном воздействии на растения стрессовых факторов

Суть подхода построена на предварительной селекции симпластного переноса из суммарного межклеточного с помощью парамагнитных ионов, с последующим измерением эффективного коэффициента трансляционной диффузии градиентным ЯМР. Одна из ценностей этого подхода в том, что и селекция, и контроль симпластного переноса проводятся одновременно в рамках единого метода. Для реализации этого подхода до измерения диффузии во внеклеточное пространство ткани корня подается парамагнитный комплекс (парамагнитный допинг) – парамагнитные ионы высокой релаксационной эффективности, которые не проникают в клетки и, соответственно, в плазмодесмы. Парамагнитные ионы ускоряют процесс магнитной релаксации воды, и тем самым исключают в регистрируемом диффузионном затухании эха вклад от воды межклеточного пространства. Иными словами, при входе/выходе из клетки в межклетники, молекулы воды с точки зрения наблюдения ЯМР сигнала становятся «невидимыми». В тоже время перенос по симпласту, куда парамагнетик не проходит, остается наблюдаемым и к сигналу, симпластной воды может применяться вся методика ЯМР контроля трансляционной диффузии. Основными парамагнитными комплексами, которые мы использовали ранее для неинвазивной оценки симпластного и апопластного транспорта воды в корнях растений, были комплексы на основе гадолиния (GdDTPA) и марганца (MnDCTA) [11]. Оба комплекса показали вполне адекватные результаты с точки зрения их применимости в качестве парамагнитного допинга и контрастирования сигналов от внеклеточной и внутриклеточной воды в тканях корня. Однако до сих пор открытым остаётся вопрос о качестве распределения этих контрастантов по внеклеточному пространству, от которого зависит качество селективной оценки водного переноса по симпластной системе корня. В этой связи была поставлена задача использовать сходные по своему функционалу парамагнитные комплексы, распределение которых в тканях корня растений дополнительно можно было бы визуально отслеживать. Такие комплексы были синтезированы и предоставлены коллегами из института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН. Комплексы представляют собой наночастицы довольно сложной структуры с парамагнитным ядром на основе марганца или оксида железа, покрытые флуоресцентной оболочкой из рутения и внешней силиконовой оболочкой. Наночастицы имеют средний диаметр 30 нм. Более подробно характеристики наночастиц описаны в работах [12,13]. Таким образом, цель данной работы состояла в тестировании парамагнитных флуоресцентных наночастиц в качестве парамагнитного допинга для селективной оценки водного переноса по симпластной системе через плазмодесмы. Однако, как будет показано далее, при определённых условиях наночастицы могут быть использованы для качественной оценки интенсивности апопластного транспорта воды в корнях растений, что делает возможным более комплексное исследование процессов транспорта воды в корнях растений с использованием наночастиц. Все эксперименты с наночастицами проводили на 5-7-дневных растениях кукурузы, выращенных в климатических камерах с контролем температуры, влажности, освещённости и концентрации углекислого газа (рис. 1).

На первом этапе был исследован характер проникновения и распределения наночастиц в тканях корня кукурузы. С использованием метода конфокальной микроскопии нами было показано, что наночастицы довольно быстро проникают в апопласт корня, но при этом не проникают внутрь клеток (рис. 2). За 1,5 часа инкубирования в водных растворах наночастиц они успевают проникнуть во внеклеточное пространство вглубь практически всей паренхимы корня. Относительно высокая скорость проникновения наночастиц с одной стороны связана с

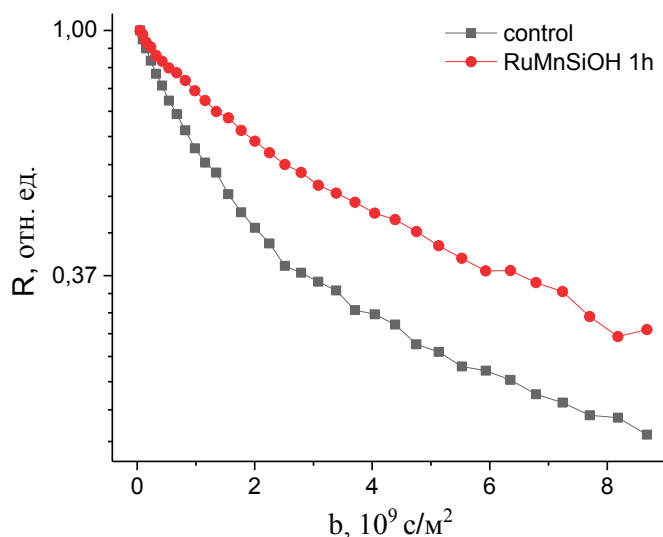


**Рисунок 2.** Поперечные срезы корней кукурузы из зоны всасывания после 1,5-часового инкубирования корней интактных растений в водном растворе наночастиц  $\text{RuFe}_3\text{O}_4\text{SiNH}_2$  с концентрацией 3 г/л. Флуоресценция наночастиц показана красным цветом

их малыми размерами, а с другой стороны с движущей силой транспирации, так как растения инкубировали в интактном состоянии без изменения условий выращивания.

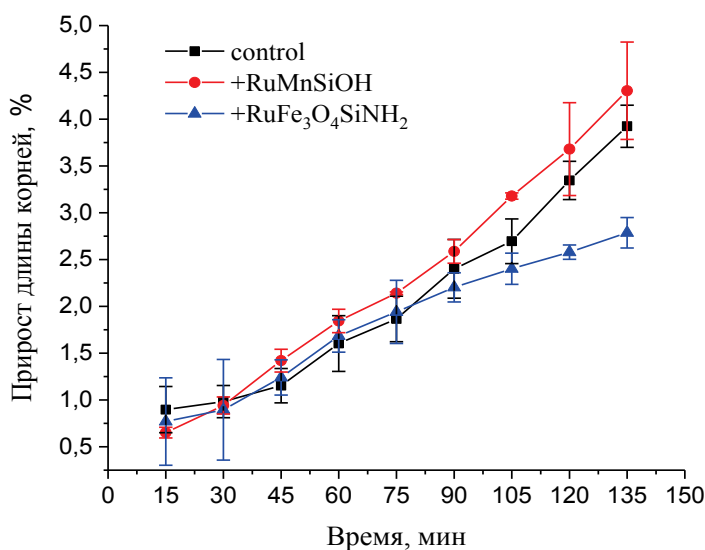
Таким образом, быстрое и достаточно равномерное распределение наночастиц во внеклеточном пространстве корня и не проникновение их в клетки, по крайней мере, в течение 1,5-2 часов инкубирования, делает эти частицы пригодными для использования в качестве парамагнитного допинга в рамках исследования симпластного транспорта воды. Далее встаёт вопрос о качестве контрастирования внеклеточного и внутриклеточного континуумов по временам магнитной релаксации, которое зависит, в частности, от параметров релаксивности растворов с наночастицами при достижении конечной концентрации в тканях корня. На этом этапе для сравнительного анализа действия парамагнитного допинга мы провели ЯМР эксперименты с наночастицами аналогичные предыдущим с использованием вышеуказанных МРТ-контрастантов на основе гадолиния и марганца. На рисунке 3 приведены диффузионные затухания сигналов намагниченности от образца корня кукурузы в контроле и после часового инкубирования корней в растворах с наночастицами на основе марганца с концентрацией 12 г/л. Как видно из рисунка, диффузионное затухание для контрольного образца (без наночастиц) имеет отчётливый двухкомпонентный характер, при этом диффузионное затухание для образца с внедрёнными во внеклеточное пространство наночастицами имеет преимущественно однокомпонентный вид. В данном случае, исчезновение начальной, быстроспадающей компоненты, которую зачастую соотносят с внеклеточным или апопластным компартментом тканей корня, связано с подавлением ЯМР сигнала от внеклеточной воды вследствие её взаимодействия с парамагнитными наночастицами. Таким образом, даже качественное сравнение диффузионных затуханий свидетельствует об эффективности действия парамагнитных наночастиц на основе оксида железа внедрённых в апопласт корня. Стоит отметить, что в аналогичном эксперименте с наночастицами на основе оксида железа эффект их парамагнитного действия был выражен в меньшей степени, несмотря на то, что по данным конфокальной микроскопии частицы отчётливо проникали и распределялись по внеклеточному пространству (данные не приведены). Скорее всего, это связано с более низкой концентрацией раствора, которая составляла 3 г/л. Стоит отметить, что данная концентрация была максимальной из доступных.

Возможно, что для достижения подходящего эффекта действия наночастиц на основе оксида железа требуется больше времени инкубирования корней в растворе с наночастицами или увеличение их концентрации. Однако, как показали результаты измерения скорости роста корней растений, как параметра, являющегося индикатором физиологического состояния растений, при данной концентрации (3г/л) через 1,5 часа инкубирования происходит замедление роста корней (рис. 4). При этом, в случае с частицами на основе марганца в концентрации 12 г/л, что в 4 раза больше, ингибирование роста не наблюдается даже через 2,5 часа инкубирования. С одной стороны, ингибирование роста могло быть связано с токсическим действием частиц на основе оксида железа, с другой стороны ингибирование роста могло быть вызвано механическим закупориванием апопласта корня, вследствие которого происходило снижение поступления воды, необходимой для нормального роста корня.



**Рисунок 3.** Диффузионные затухания намагниченности воды в корнях растений кукурузы в контроле (без наночастиц) и после часового инкубирования корней интактных растений кукурузы в растворе с наночастицами на основе марганца с концентрацией 12 г/л. Диффузионные затухания представляют зависимость амплитуды сигнала спин-эха ( $R$ ) от величины градиента магнитного поля. Параметр  $b$  является комплексным. Диффузионные затухания получены при максимально возможном значении времени диффузии 700 мс

Таким образом, по совокупности полученных результатов можно заключить, что парамагнитные флуоресцентные наночастицы могут быть достаточно эффективно использованы в качестве парамагнитного допинга в ЯМР исследованиях транспорта воды в корнях растений, с возможностью исследования интенсивности водного переноса селективно по симпластной системе корня. К очевидным преимуществам использования данных комплексов наночастиц можно отнести возможность контроля их проникновения в ткани корня растений методом конфокальной микроскопии, а также и методом ЯМР по скорости снижения сигнала намагниченности от образца. Более того, это преимущество, а также тот факт, что частицы не проникают внутрь клеток, можно использовать для качественной оценки интенсивности апопластного переноса воды в корнях при действии на растения различных абиотических факторов, например, водного дефицита, изменения влажности воздуха, освещённости и т.д. В целом, это даёт возможность для более комплексного исследования процессов транспорта воды в растениях. Из двух типов использованных в работе парамагнитных флуоресцентных наночастиц, наиболее приемлемыми по скорости проникновения в ткани корня, подавления ЯМР сигнала от внеклеточной



**Рисунок 4.** Прирост длины корней интактных растений кукурузы в ходе инкубирования корней в обычном питательном растворе (control), водном растворе наночастиц на основе оксида железа ( $\text{RuFe}_3\text{O}_4\text{SiNH}_2$  в концентрации 3 г/л) и в водном растворе наночастиц на основе марганца ( $\text{RuMnSiOH}$  в концентрации 12 г/л)

воды, а также отсутствие влияние на рост растений, являются частицы на основе марганца. К недостаткам использования подобных комплексов наночастиц, возможно, следует отнести более трудоёмкий процесс их синтеза.

*Работа поддержана грантом № 22-74-10087 Российского научного фонда (<https://rscf.ru/en/project/22-74-10087/>). Часть работы выполнена с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.*

**Список литературы / References:**

1. Kramer P.J. *Water relations of plants*. New-York: Academic Press, 1983, 489 p.
2. Steudle E. Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant Soil.*, 2000, vol. 226, pp. 45-56.
3. Kim Y.X., Ranathunge K., Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. Composite transport model and water and solute transport across plant roots: an update. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, no. 193, doi: 10.3389/fpls.2018.00193.
4. Maurel C., Boursiac Y., Luu D.T., Santoni V., Shahzad Z., Verdoucq L. Aquaporins in plants. *Physiol. Rev.*, 2015, vol. 95, pp. 1321-1358.
5. Bao Y., Aggarwal P., Robbins N.E., Sturrock C.J., Thompson M.C., Tan H.Q., Tham C., Duan L., Rodriguez P.L., Vernoux T. Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2014, vol. 111, pp. 9319-9324.
6. Dietrich D., Pang L., Kobayashi A., Fozard J.A., Boudolf V., Bhosale R., Antoni R., Nguyen T., Hiratsuka S., Fuji N. Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nat. Plants*, 2017, vol. 3, p. 17057.
7. Barberon M., Vermeer J.E.M., De Bellis D., Wang P., Naseer S., Andersen T.G., Humbel B.M., Nawrath C., Takano J., Salt D.E., Geldner N. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell*, 2016, vol. 164, pp. 447-459.
8. Doblaz V.G., Smakowska-Luzan E., Fujita S., Alassimone J., Barberon M., Madalinski M., Belkhadir Y., Geldner N. Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science*, 2017, vol. 355, pp. 280-284.
9. Couvreur V., Faget M., Lobet G., Javaux M., Chaumont F., Draye X. Going with the Flow: Multiscale Insights into the Composite Nature of Water Transport in Roots. *Plant. Physiol.*, 2018, vol. 178, pp. 1689-1703.
10. Anisimov A.V., Evarestov A.S., Ionenko I.F., Gusev N.A. Pulsed NMR method for estimation of intercellular water transport on symplasm. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1983, vol. 271, 1246-1249.
11. Anisimov A.V., Suslov M.A. Estimating the MRI contrasting agents effect on water permeability of plant cell membranes using the  $^1\text{H}$  NMR gradient technique. *Applied Magnetic Resonance*, 2021, vol. 52, no. 3, pp. 235-246, doi: 10.1007/s00723-021-01313-6.
12. Fedorenko S., Stepanov A., Sibgatullina G., Samigullin D., Mukhitov A., Petrov K., Mendes R., Rummeli M., Giebler L., Weise B. Fluorescent Magnetic Nanoparticles for Modulating the Level of Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in Motoneurons. *Nanoscale*, 2019, vol. 11, pp. 16103-16113.
13. Fedorenko S., Stepanov A., Bochkova O., Kholin K., Nizameev I., Voloshina A., Tyapkina O., Samigullin D., Kleshnina S., Akhmadeev B., Romashchenko A., Zavjalov E., Amirov R., Mustafina A. Specific nanoarchitecture of silica nanoparticles codoped with the oppositely charged  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ru}^{2+}$  complexes for dual paramagnetic-luminescent contrasting effects. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2023, vol. 49, p. 102665.

**USING OF PARAMAGNETIC FLUORESCENT NANOPARTICLES AND SPIN-ECHO NMR FOR A COMPREHENSIVE STUDY OF WATER TRANSPORT IN THE ROOTS OF INTACT PLANTS****Suslov M.A.<sup>1</sup>, Egorov Ju.V.<sup>1</sup>, Daminova A.G.<sup>1</sup>, Anisimov A.V.<sup>1</sup>, Samigullin D.V.<sup>1</sup>, Mustafina A.R.<sup>2</sup>, Bochkova O.D.<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center RAS  
*Lobachevskogo str., 2/31, Kazan, Russia*<sup>2</sup> Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Federal Research Center Kazan Scientific Center RAS  
*Lobachevsky str., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru*

Received 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0620

**Abstract.** The paper presents the results of using the NMR spin-echo method with a new type of MRI contrast agents in the form of fluorescent paramagnetic nanoparticles to study the characteristics of water transport in plant root tissues. Double contrasting is provided by the inclusion of both fluorescent and paramagnetic components in silicate nanoparticles. The purpose of using this methodological approach was to selectively assess the intensity of water transport in plant roots selectively by the symplast (from cell to cell via plasmodesmata) and apoplastic (extracellular) pathways of water transport. The fluorescent properties of nanoparticles made it possible to study the rate of their penetration and the nature of their distribution in root tissues. It was shown that the particles penetrate relatively quickly and are distributed over the root apoplast, but do not penetrate into the cells, at least for 1.5-2 hours, which was a necessary condition for the NMR experiments. We used two types of nanoparticles with a paramagnetic core based on manganese and iron oxide. It was shown that aqueous solutions of nanoparticles have relaxivity parameters acceptable for separating extracellular and intracellular water in root tissues according to magnetic relaxation times after one hour of incubation of plant roots in solutions. This made it possible to “turn off” the signal from extracellular water and then, using the gradient NMR technique, to study water transport selectively by the root symplast. The control of the rate of penetration of nanoparticles into the root apoplast using confocal microscopy was used to demonstrate the possibilities for a qualitative assessment of the intensity of apoplastic water transport in the root under the action of various types of stress, for example, water deficiency, change of light intensity and air humidity. Thus, compared with well-known types of MRI contrast agents based on gadolinium, manganese, etc., the obvious advantage of using paramagnetic fluorescent nanoparticles in the study of water transport in plant tissues is the possibility of their visualization in tissues, as well as the absence of toxic effects on plants, which was shown in this work.

**Key words:** *water transport in plants, nuclear magnetic resonance, spin-spin relaxation time, paramagnetic fluorescent nanoparticles, apoplast, symplast.*