

WSTĘPNE BADANIA PERFUZJI WODY PRZEZ BIONĄ KOMÓRKOWĄ ZA POMOCĄ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO

Z.FRIEBE, W.MEDYCKI*

Klinika Ginekologii IGiP Akademii Medycznej, Polna 33, 60-535 Poznań

*Instytut Fizyki Molekularnej PAN, Smoluchowskiego 17, 60-179 Poznań

Dyfuzyjna przepuszczalność (perfuzja) ściany erytrocytów przez molekuly wody jest bardzo wysoka i daje tzw. czas wymiany między komórką i plazmą rzędu 10 ms. Dotychczas czas wymiany został wyznaczony metodą magnetycznego rezonansu jądrowego tylko dla ludzkich komórek erytrocytów [1,2].

Jak wiadomo zawiesina ludzkich komórek w roztworze zawiera, z grubsza biorąc, dwie różne fazy. Pierwszą stanowią molekuly wody zawarte wewnątrz komórki, a drugą molekuly wody znajdujące się na zewnątrz komórki. Pomiar czasu relaksacji takiego układu faz nie daje praktycznie żadnej możliwości wyznaczenia parametrów dla poszczególnych faz. Aby rozróżnić obie fazy niezbędne jest, na przykład, znaczne skrócenie czasu relaksacji jednej z nich.

Prostą i bezpośrednią metodą takiego pomiaru zaproponowali Conlon i Outhred [1]. Dokonali tego przez dodanie do środowiska zewnętrznego komórek jonów Mn^{2+} , co zredukowało znacznie czas relaksacji wody znajdującej się na zewnątrz komórek. Podczas gdy czas relaksacji wody pozakomórkowej był odpowiednio skrócony, główny mechanizm relaksacji polegał na dyfuzji wody z wnętrza komórki na zewnątrz do środowiska zmienionego przez dodanie do niego paramagnetyka.

Metodę Conlona i Outhreda postanowiliśmy zastosować do badań zawiesiny komórek raka endometrium w dekstranie. Skrócenie czasu T_2 dekstranu otrzymano poprzez dodanie $FeCl_3$ - substancji nie przechodzącej przez błonę komórkową i będącej paramagnetykiem.

Dłuższy czas zaniku magnetyzacji jest ściśle związany z czasem wymiany wody. Wpływają na jego wartość także stężenie wody w komórce i ilość wody dyfundującej z zewnątrz do komórki w czasie wykonywania pomiaru. Efekt zaniku magnetyzacji wody wewnątrzkomórkowej można obliczyć stosując równanie:

$$1/T_{ae} = 1/T_{2b} - 1/T_{2i} \quad (1)$$

gdzie T_{ae} oznacza czas wymiany, T_{2b} - obserwowany dłuższy czas, T_{2i} - czas T_2 dla izolowanych komórek.

Schematycznie proces dyfuzji wody przez błonę komórkową mierzona metodą NMR przedstawić można przy pomocy tabeli, w której kolumny przedstawiają kolejno środowisko zewnętrzne komórek, ścianę komórkową i środowisko wewnętrzne komórek w trakcie wykonywania eksperymentu.

Tabela 1. Schemat dyfuzji wody przez błonę komórkową mierzona metodą NMR.

	środowisko zewnętrzne komórek	ściana komórkowa	środowisko wewnętrzne komórek
odwirowane komórki			T_{2i}
pomiar czasów relaksacji	"krótki" T_{2a}		"długi" T_{2b}
wyznaczanie czasu wymiany		T_e aktualny czas wymiany	T_{ae} wypadkowy czas wymiany



PL9801109

Dyfuzję wody przez ścianę komórkową można znaleźć przez rozwiązanie równania dyfuzji dla wody związanej z powierzchnią komórki:

$$\delta c / \delta t = D \delta^2 c / \delta x^2 - c / T_{2a} \quad (2)$$

gdzie x oznacza odległość od powierzchni komórki, c - stężenie wody, T_{2a} - obserwowany krótszy czas relaksacji a D - współczynnik dyfuzji. Zakładając, że T_{2a} jest dużo mniejsze od T_{ae} , możemy napisać:

$$D \delta^2 c / \delta x^2 = c / T_{2a} \quad (3)$$

Po rozwiązaniu równania różniczkowego i odpowiednich przekształceniach, możemy obliczyć stosunek ilości wody, przechodzącej z dekstranu do komórki, do ilości wody ją opuszczającej. Równanie to ma postać:

$$c_0 / c_1 = (V / A) (T_{2a} / D)^{1/2} / (T_{ae} r) \quad (4)$$

gdzie V oznacza objętość komórki, A - powierzchnia komórki. Obserwowany czas wymiany aktualnej opisać możemy zależnością:

$$T_e = T_{ae} + (V/A) (T_{2a} / D)^{1/2} / r \quad (5)$$

Po znalezieniu aktualnego czasu wymiany T_e możemy, podstawiając wartość do wzoru:

$$P = V / (A T_e), \quad (6)$$

obliczyć perfuzję (przechodzenie) P wody przez błonę komórkową.

W pierwszym etapie sprawdzano metodykę badań i dobierano rodzaj i stężenie składników próbek z zawiesiną komórek w celu uzyskania korzystnej relacji między składowymi zanikiem ech Carra-Purcella-Meibooma-Gill'a.

Badane komórki pobierano z wyskrobin z jamy macicy pacjentki. Następnie komórki poddawane były płukaniu w roztworze NaCl i zawieszane w płynie Parkera. Przygotowane izotoniczne roztwory $FeCl_3$ w dekstranie o różnych stężeniach dodawano do próbki z zawiesiną komórek. Otrzymane próbki dokładnie mieszano i w temperaturze $23^\circ C$ mierzono czas relaksacji spin-spin T_2 stosując metodę Carra-Purcella-Meibooma-Gill'a. Pomiary wykonano za pomocą spektroskopu Brukera pracującego przy częstotliwości 90 MHz. Przykładowo: dodanie paramagnetyka do dekstranu z zawiesiną komórek o stężeniu 25 mM Fe^{3+} spowodowało, że czas relaksacji T_{2a} dekstranu skrócił się z wartości 540 ms do wartości 1.2 ms.

Nie wyznaczono czasu aktualnej wymiany ze względu na brak danych dla odwirowanych komórek (T_{2i}).

Literatura

1. T.Conlon, R.Outhred, Biochim. Biophys. Acta, 288 (1972) 354
2. G.Bacic et al., Magn. Reson. Imaging, 7 (1989) 411