

В. В. Туров, І. М. Тодор, Н. Ю. Лук'янова, Т. В. Крупська,
А. П. Угнівенко, академік НАН України В. Ф. Чехун

Вплив трифтороцтової кислоти на кластеризацію води в частково дегідратованій тканині печінки щурів з карциномою Герена

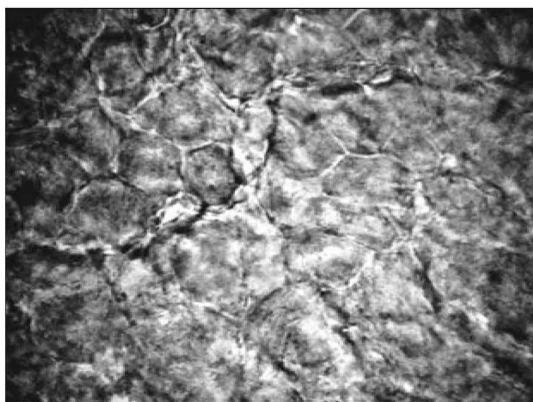
Методом низькотемпературної ^1H ЯМР спектроскопії досліджувався стан води в ліофілізованій тканині печінки щурів — інтактній та враженій карциномою Герена. Встановлено, що в інтактній тканині присутні шість типів кластерів води, які здатні розчиняти різну кількість трифтороцтової кислоти. У печінці пухлиноносія кластери SAW є більш однорідними, а їх розчинююча здатність щодо ТФОК та електронодонорних молекул істотно менша.

Відомо, що зв'язування води з макромолекулами призводить до зміни їх конфігурації, ефективних розмірів і властивостей. Тому будь-яке варіювання білок-білкових, білок-ліпідних, ліпід-ліпідних зв'язків впливає на структуру гідратної компоненти біологічних систем, що спричиняє істотну модифікацію їх функціонального стану. Особливого змісту і значення набувають ці явища при патологічних процесах, зокрема канцерогенезі та прогресії пухлинної хвороби [1–6]. Ці дослідження можуть бути виконані за допомогою методу низькотемпературної ^1H ЯМР спектроскопії [7–10], який дозволяє за величиною хімічного зсуву визначати ступінь асоційованості внутрішньоклітинної води, а за її здатністю до замерзання — зміни внутрішньої енергії, що зумовлено взаємодією води з розчиненими в ній низькомолекулярними речовинами та біополімерами.

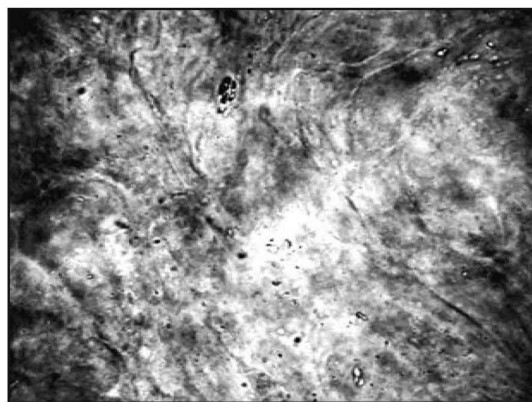
У відповідності до результатів багаточисельних досліджень, підсумованих в монографіях [9–11], вода має кластерну будову, основу останньої складають кластери сильноасоційованої води розміром 1–3 нм, в яких упорядкованість молекул значно вища, ніж у проміжках між суміжними кластерами. Хімічний зсув протонів рідкої води (δ_{H}) менший, ніж для гексагонального льоду (тетрагональна структура, $\delta_{\text{H}} = 7$ м. ч.) і становить близько 5 м. ч. Для виявлення впливу злоякісної трансформації на будову кластерів внутрішньоклітинної води може бути використана властивість кластеризованої води погано розчиняти полярні органічні речовини та сильні кислоти [11–13].

Мета роботи — вивчення зміни структури внутрішньоклітинної води в печінці інтактних щурів та тварин з карциномою Герена: в повітряному та органічному середовищах, що містять добавки трифтороцтової кислоти.

Методи дослідження. Тканина печінки була отримана від щурів лінії Вістар (інтактні щури і тварини з трансплантованою карциномою Герена вагою 180 г). Час після перещеплення пухлини 12 діб. Для експериментів брали по 5 г кожного зразка печінки, яку висушували, використовуючи метод ліофілізації. Після висушування вміст залишкової води не перевищував в обох зразках 5% маси. Фотографії зразків тканини (до висушування), що отримані на фазово-контрастному мікроскопі (Primo Star, Carl Zeiss, Німеччина), представлено на рис. 1. Зразки розрізняються розмірами клітинних утворень: більш однорідними для контрольного зразка.



a



б

Рис. 1. Мікрофотографії тканин печінки щурів:

a — інтактних, *б* — з перещепленою карциномою Герена 12 дб (Зб. 1000 з використанням імерсії)

Перед ЯМР-дослідженнями зразки розтирали в фарфоровій ступці до отримання гранул розміром 0,1–1,0 мм, що забезпечувало, з одного боку, слабке руйнування клітин, а з другого — рівномірне розміщення дослідного матеріалу в ампулі ЯМР-спектрометра. Після цього до зразків додавали певну кількість дистильованої води і врівноважували при кімнатній температурі 1–2 год. Максимальна гідратованість зразків становила 330 мг води на 1 г сухої тканини. Одні й ті самі зразки досліджувались на повітрі та з додатками органічних розчинників та трифтороцтової кислоти (ТФОК). Застосування дейтерованих розчинників (CDCl_3 , CD_3CN , DMSO-d_6) було зумовлене прагненням максимально нейтралізувати сигнали протонів органічних розчинників, інтенсивність яких може значно перевищувати інтенсивність сигналу води.

Сpektри ЯМР знімали на ЯМР-спектрометрі Varian Mercury 400 з робочою частотою 400 МГц. Температуру регулювали з точністю ± 1 К, використовуючи термоприставку Bruker VT-1000. Інтенсивність сигналів визначали з точністю $\pm 10\%$. Для запобігання переохолодження суспензій спектри ^1H ЯМР незамерзаючої води записували при нагріванні суспензій, попередньо охолоджених до температури 210 К.

Результати та їх обговорення. Рис. 2 ілюструє зняті при різних температурах спектри ^1H ЯМР тканини печінки: інтактних (див. *a*, *в*) та з карциномою Герена щурів (див. *б*, *г*), що містили 330 мг/г залишкової води. При вибраному рівні гідратованості можна було вважати, що вся присутня в клітинному матеріалі вода є зв'язаною, тобто входить до складу гідратних оболонок біополімерних структур. У повітряному середовищі вид спектрів тканини печінки інтактних щурів та печінки пухлиноносіїв виявився подібним (див. *a*, *б*). Міжфазна вода знаходиться у вигляді кластерів сильноасоційованої води, хімічний зсув яких при температурі 290 К становить близько 5 м.ч., що близько до хімічного зсуву рідкої води. Із зниженням температури замерзання води зсув здійснюється при $T < 260$ К, тобто вся наявна в тканині вода може бути кваліфікована як сильнозв'язана [9–11]. У міру замерзання води (при зниженні температури) її хімічний зсув збільшується, що може бути обумовлено зростанням упорядкованості води (наближення її структури до структури гексагонального льоду) та збільшенням впливу молекул води, що взаємодіють з сильними електронодонорними групами молекул біоматеріалу.

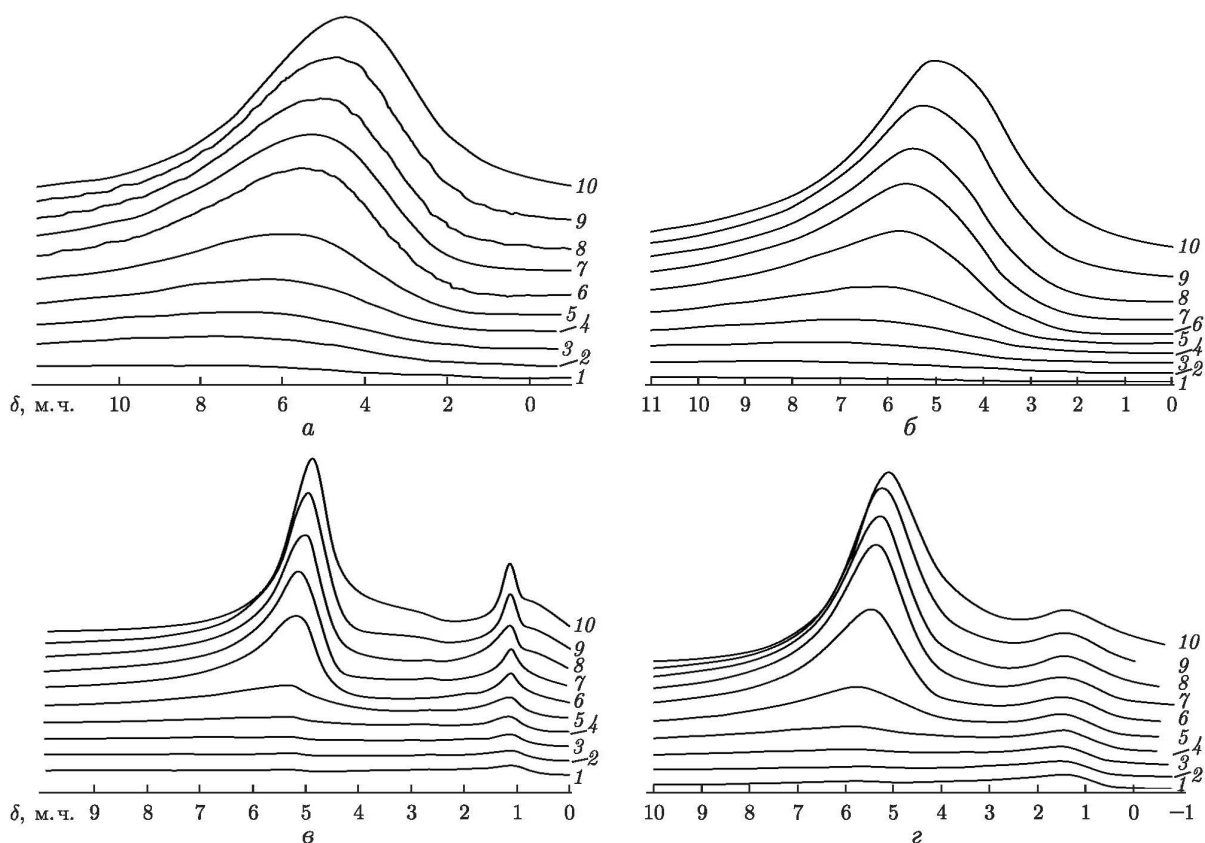


Рис. 2. ^1H ЯМР-спектри печінки щурів інтактної та з карциною Герена знято при різних температурах: на повітрі: а — інтактна; б — пухлиноносія; в середовищі CDCl_3 : в — інтактна; г — пухлиноносія. Тут і на рис. 3 і 4: температура спектрів, К: 1 — 210, 2 — 220, 3 — 230, 4 — 240, 5 — 250, 6 — 260, 7 — 265, 8 — 270, 9 — 280, 10 — 290

При введенні в клітини слабополярної речовини (CDCl_3) вигляд спектрів змінюється (див. в, г на рис. 2). У них спостерігається сигнал сильноасоційованої води ($\delta_{\text{H}} = 5,0\text{--}5,5$ м.ч.) та група сигналів у спектральній області ($\delta_{\text{H}} = 0,9\text{--}3,5$ м.ч.), які для зразка інтактної тканини (див. в) реєструються окремо, а для печінки щурів з карциною Герена (див. г) — як один широкий сигнал. Імовірно, в цій спектральній області спостерігаються сигнали фосфоліпідів, жирних кислот, слабоасоційованої води та води, зв'язаної з електронодонорними центрами поверхні біоматеріалу.

Додавання до дисперсійного середовища ТФОК у випадку інтактної тканини призводить до значного ускладнення вигляду спектрів. Сигнал сильноасоційованої води трансформується принаймні в шість сигналів, хімічний зсув яких знаходиться в інтервалі 4,0–10,5 м.ч. Це свідчить про утворення системи кластерів, що по-різному розчиняють ТФОК. Зокрема, найменш інтенсивний з сигналів SAW (сигнал 1 на рис. 3, а, $\delta_{\text{H}} = 4$ м.ч.) відповідає кластерам сильноасоційованої води, що не розчиняє ТФОК, а впорядкованість сітки водневих зв'язків менша, ніж у рідкої води. Сигнал 2 ($\delta_{\text{H}} = 5$ м.ч.) має спектральні параметри, які при 290 К збігаються з параметрами води у відсутності ТФОК. Однак зі зниженням температури і частковим замерзанням міжфазної води він розділяється на сигнали 2 й 3. При цьому хімічний зсув сигналу 2 залишається незмінним, а сигнал 3 зі зниженням температури зміщується в слабкі поля, що свідчить про збільшення вкладу в такий воді розчиненої

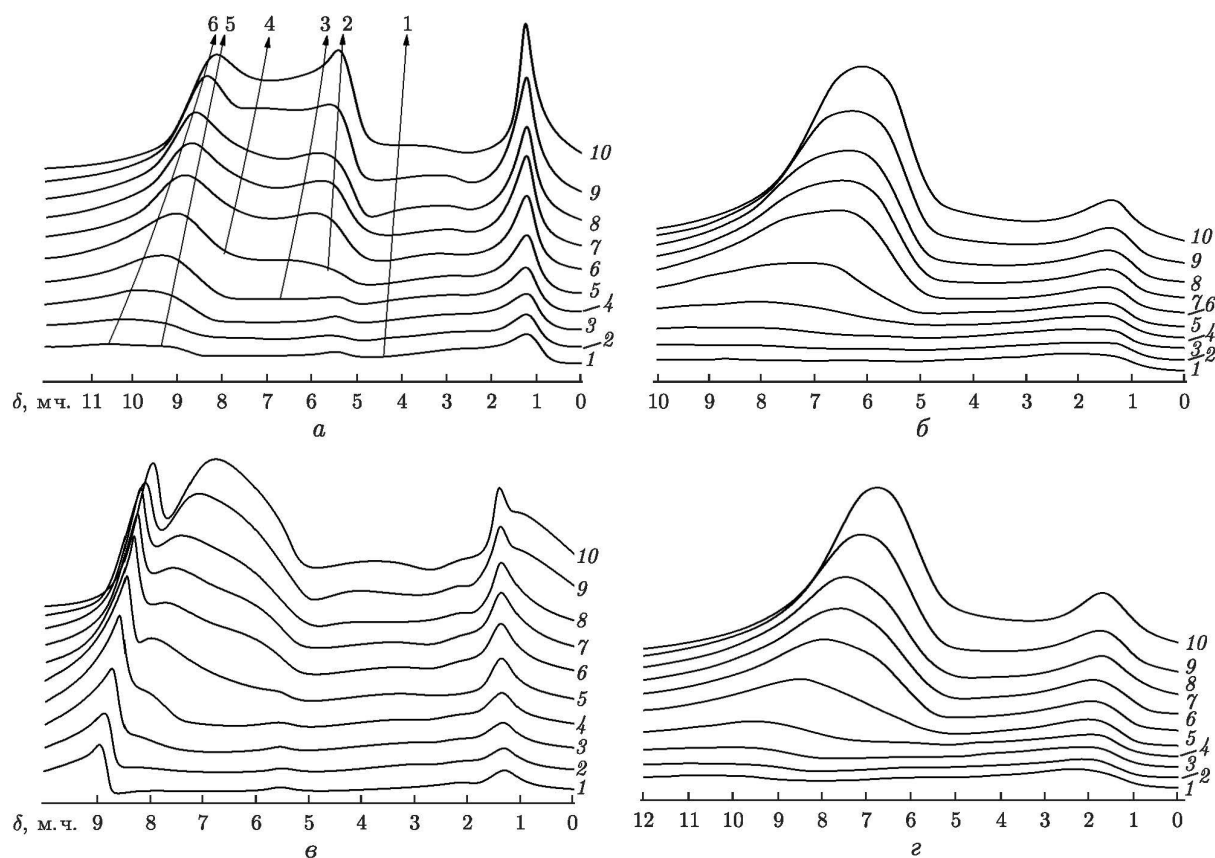


Рис. 3. ^1H ЯМР-спектри знято при різних температурах у присутності трифтороцтової кислоти печінки щурів інтактної (а, в) та з карциномою Герена (б, г)

ТФОК. Імовірно це обумовлено вимерзанням води у вигляді чистого льоду і відповідного збільшення концентрації кислоти в залишковій воді. Така ж закономірність спостерігається і для зміни хімічного зсуву сигналів 4–6 (див. а на рис. 3), проте концентрація ТФОК у кластерах води, відповідальних за ці сигнали, є значно більшою.

На відміну від описаних закономірностей кластероутворення води в тканині печінки інтактних щурів за наявності ТФОК, у печінці щурів з карциномою Герена вид спектрів при тій самій кількості (330 мг/г) залишкової води істотно інший (див. б на рис. 3). При кімнатній температурі в спектрах фіксується лише два сигнали сильноасоційованої води: з хімічними зсувами $\delta_{\text{H}} = 4$ м.ч. та $\delta_{\text{H}} = 6,5$ м.ч. Перший з цих сигналів за своїми характеристиками збігається з сигналом 1 на рис. 3, а, а другий, — імовірно, є усередненим сигналом (2–6) для кластерів. При найбільш низькій температурі (210 К) вигляд спектрів для обох типів тканин стає близьким. Найбільш імовірно, що у печінці щурів з пухлиною утворюються більш однорідні кластери води з усередненим значенням розчинності в них ТФОК.

Додавання до дисперсійного середовища полярної компоненти (CD_3CN) призводить до певного перерозподілу між інтенсивностями сигналів (2–6) в інтактній тканині (див. в рис. 3). Суттєво зростає інтенсивність сигналу 6, обумовленого кластерами зі значною концентрацією ТФОК. Їх стабілізації сприяє сольватуюча дія молекул ацетонітрилу. Спостерігається також зменшення інтенсивності сигналу 2 за рахунок зростання інтенсивності

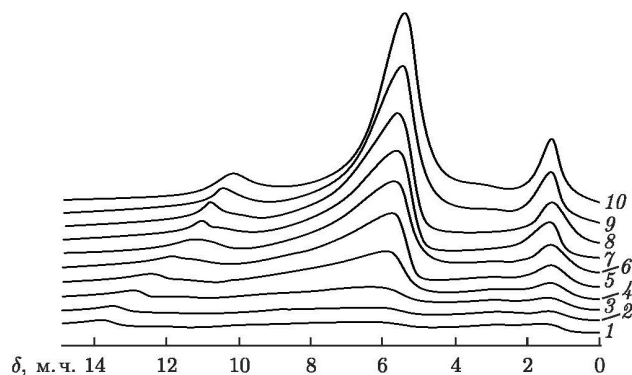


Рис. 4. ^1H ЯМР-спектри тканини печінки щурів з карциномою Герена, що містила 330 мг/г залишкової води в середовищі хлороформу з додатками ТФОК та ДМСО знято при різних температурах

сигналів 3–5. У той самий час у печінці щурів з пухлиною цих змін не відбувається і спектри сигналу SAW залишаються подібними до спектрів у середовищі хлороформу (див. 2 на рис. 2) без додавання ТФОК та ацетонітрилу. Це свідчить про погану розчинність у міжфазній воді не тільки ТФОК, а й CD_3CN .

Відзначимо, що в присутності CD_3CN як в інтактній (див. 6 на рис. 3), так і у печінці щурів з карциномою Герена (див. 2) спостерігається зростання інтенсивності сигналу протонів у спектральному діапазоні $\delta_{\text{H}} = 1\text{--}3$ м. ч. Це свідчить про зростання кількості слабоасоційованих форм води. Для інтактної тканини (див. 6) це є сигналом при $\delta_{\text{H}} = 1$ м. ч. На жаль, для печінки щурів з пухлиною (див. 2) аналогічний сигнал SAW неможливо відокремити від сигналів фосфоліпідів, що мають ту саму величину хімічного зсуву.

З метою перевірки припущення про слабку розчинність полярних речовин у міжфазній воді печінки тварин з пухлиною нами було вивчено вплив на спектральні параметри SAW більш сильного електронодонорного розчинника — диметилсульфоксиду (ДМСО). Результати наведено на рис. 4.

Як випливає з даних рисунку, основний сигнал сильноасоційованої води має хімічний зсув δ_{H} в діапазоні від 5,0 до 6,6 м. ч. Звертаючи увагу на значний надлишок присутніх у дисперсійному середовищі ТФОК і ДМСО, можна стверджувати, що вони майже не розчиняються у внутрішньоклітинній воді. Це свідчить про формування в клітинах компактних нанорозмірних кластерів води, розчинення в яких кислоти та полярних органічних речовин супроводжується значним збільшення внутрішньої енергії, що є енергетично не вигідним.

У спектрах на рис. 4 спостерігається кілька відносно слабких сигналів з $\delta_{\text{H}} = 9\text{--}11$ м. ч. при кімнатній температурі, які збільшуються до $\delta_{\text{H}} = 11\text{--}14$ м. ч. при 210 К. Сигнали, обумовлені водою, що знаходиться в клітинах печінки, імовірно не зазнали значного впливу карциноми Герена.

Таким чином, на даному етапі досліджень застосування методу ^1H ЯМР-спектроскопії з пошаровим виморожуванням рідкої фази дозволяє визначити характеристики різних типів зв'язаної води та величину міжфазної енергії, яка опосередковано характеризує стан шарів води, зв'язаних з внутрішньою та зовнішньою поверхнею плазматичних мембран клітин.

При порівнянні спектральних характеристик сильноасоційованої води в печінці інтактних щурів та в печінці тварин з карциномою Герена спостерігаються значні відмінності.

В інтактній тканині присутні шість типів кластерів води, що здатні розчиняти різну кількість трифтороцтової кислоти. У печінці пухлиноносія кластери SAW є більш однорідними, а їх розчинювальна здатність відносно ТФОК та електронодонорних молекул істотно менша. Додавання до дисперсійного середовища полярної компоненти (CD_3CN) спричинює певний перерозподіл між інтенсивностями сигналів різних форм внутрішньоклітинної води в інтактній тканині. Імовірно, що будова кластерів міжфазної води впливає не тільки на процеси розчинення кислот і полярних речовин, а й на перебіг багатьох біохімічних реакцій в клітинах у процесі їх життєдіяльності.

1. Чехун В. Ф., Михайленко В. М., Триндяк В. П. та ін. Оцінка вмісту структурованої води методом ЯМР-спектроскопії в плазматичних мембранах клітин карциноми Герена вихідних та з фенотипом резистентності до доксорубіцину: Матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнародною участю "Молекулярні основи і клінічні проблеми резистентності до лікарських засобів" (Київ, 2-3 лист. 2006 р.) // Онкологія. – 2006. – Спец. вып. – С. 64.
2. Чехун В. Ф., Михайленко В. М., Чехун С. В., Чалий О. В. Аналіз особливостей структурованої води у плазматичних мембранах карциноми Герена з різною чутливістю до цис-дихлордіаміноплатини // Доп. НАН України. – 2008. – № 2. – С. 178–185.
3. Патологическая физиология / Под ред. А. Д. Адо, В. И. Пыцкого, Г. В. Порядина, Ю. А. Владимиров. – Москва: Триада-Х, 2000. – 574 с.
4. Theriault B. L., Nachtiga M. W. Human ovarian cancer cell morphology, motility, and proliferation are differentially influenced by autocrine $\text{TGF}\beta$ superfamily signalling // Cancer Lett. – 2011. – **313**. – P. 108–121.
5. Deberardinis R. J., Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer // Oncogene. – 2010. – **29**, No 3. – P. 313–324.
6. Icard P., Poulain L., Lincet H. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells // Rev. Art. Biochim. Biophys. Acta (BBA). Rev. Cancer. – 2012. – **1825**, Issue 1. – P. 111–116.
7. Turov V. V., Chahun V. F., Barvinchenko V. N. et al. Low-temperature ^1H -NMR spectroscopic study of doxorubicin influence on the hydrated properties of nanosilica modified by DNA // J. Mater Sci, Mater Med. – 2011. – **22**. – P. 525–532.
8. Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии, экологии / Под ред. А. П. Шпака, В. Ф. Чехуна, сост. П. П. Горбик, В. В. Туров. – Киев: Наук. думка, 2011. – 444 с.
9. Гунько В. М., Туров В. В., Горбик П. П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наук. думка, 2009. – 694 с.
10. Туров В. В., Гунько В. М. Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев: Наук. думка, 2011. – 313 с.
11. Gun'ko V. M., Turov V. V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. – New York: Taylor & Francis, 2013. – 1006 p.
12. Turov V. V., Gun'ko V. M., Turova A. A. et al. Interfacial behavior of concentrated HCl solution and water clustered at a surface of nanosilica in weakly polar solvents media // Colloids and Surface A: Physicochem. and Eng. Asp. – 2011. – P. 48–55.
13. Термодинамические свойства индивидуальных веществ: В 4 т. Т. 1 / Под ред. В. П. Глушко. – Москва: Наука, 1978. – 495 с.

Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка
НАН України, Київ
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 16.07.2013

В. В. Туров, И. Н. Тодор, Н. Ю. Лукьянова, Т. В. Крупская,
А. П. Угнивенко, академик НАН Украины В. Ф. Чехун

**Влияние трифторуксусной кислоты на кластеризацию воды
в частично дегидратированной ткани печени крыс с карциномой
Герена**

Методом низкотемпературной ^1H ЯМР спектроскопии исследовалось состояние воды в лиофилизированной ткани печени крыс — интактной и пораженной карциномой Герена. Установлено, что в интактной ткани присутствуют шесть типов кластеров воды, способных растворять разное количество трифторуксусной кислоты. В печени опухоленосителя кластеры SAW являются более однородными, а их растворяющая способность по отношению к ТФУК и электронодонорным молекулам существенно меньше.

V. V. Turov, I. N. Todor, N. Yu. Lukianova, T. V. Krupskaya,
A. P. Ugnivenko, Academician of the NAS of Ukraine V. F. Chekhun

**Effect of trifluoroacetic acid on the water clustering in partially
dehydrated rat liver with Guerin carcinoma**

The state of water in lyophilized liver tissue of rats, intact and impressed by Guerin carcinoma is investigated by the method of low-temperature ^1H NMR spectroscopy. It was found that six types of water clusters that can dissolve different amounts of trifluoroacetic acid are present in intact tissue. In the liver tumor, clusters SAW are more homogeneous, and their solvent abilities are significantly smaller with respect to TFA and electron-donor molecules.