

## ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА НА КЛАСТЕРИЗАЦИЮ ВОДЫ В ЧАСТИЧНО ДЕГИДРАТИРОВАННОЙ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС С КАРЦИНОМОЙ ГЕРЕНА

В. В. Туров<sup>1</sup>  
И. М. Годор<sup>2</sup>  
Н. Ю. Лукьянова<sup>2</sup>  
Т. В. Крупская<sup>1</sup>  
А. П. Угнивенко<sup>1</sup>  
В. Ф. Чехун<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт химии поверхности  
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт экспериментальной патологии,  
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого  
НАН Украины, Киев

E-mail: v\_turov@ukr.net

Получено 16.12.2014

Целью работы было изучение изменения строения внутриклеточной воды в печени интактных крыс и с карциномой Герена. Методом низкотемпературной <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии исследовали состояние воды в лиофилизированной ткани печени крыс — интактной и с карциномой Герена на разных стадиях развития. Показано, что по мере развития опухоли растет вклад водных полиассоциатов, размер которых составляет 3–12 нм. Установлено, что в интактной ткани присутствуют 6 типов кластеров воды, способных растворять разное количество трифторуксусной кислоты. В печени с карциномой Герена кластеры сильноассоциированной воды более однородны, а их растворяющая способность по отношению к трифторуксусной кислоте и электронодонорным молекулам существенно ниже.

Полученные результаты важны для выяснения механизма действия воды на развитие опухолевых процессов.

**Ключевые слова:** карцинома Герена, кластеры воды, сильно- и слабоассоциированная вода.

Канцерогенез — сложный многоэтапный процесс, ведущий к глубокой реорганизации нормальных клеток организма. Одной из наиболее распространенных теорий возникновения опухолей является мутационная. В соответствии с ней опухоли являются генетическими заболеваниями, вследствие которых происходит повреждение генетического материала клетки (точечные мутации, хромосомные aberrации). При этом повреждаются специфические участки ДНК, что приводит к нарушению механизмов контроля пролиферации и дифференцировки клеток, в результате чего возникают опухоли [1–3].

В ходе развития опухоли в силу ее генетической нестабильности происходит частое изменение клеточного состава и смена стволовой линии. Рост массы опухоли имеет адаптивный характер, поскольку выживают только наиболее приспособленные клетки. Мембраны опухолевых клеток не способны реагировать на стимулы микроокружения, что приводит к нарушению морфоло-

гических характеристик ткани (клеточный и тканевой атипизм). Сформировавшийся опухолевый клон развивается путем наращивания темпов деления, уклонения от иммунного надзора организма, способствуя обеспечению интенсивного кровоснабжения растущей ткани. Это заключительная стадия канцерогенеза, которая называется опухолевой прогрессией. Ее биологический смысл заключается в окончательном преодолении препятствий на пути опухолевой экспансии. Она носит скачкообразный характер и зависит от появления новой стволовой линии опухолевых клеток. Прорастая в кровеносные и лимфатические сосуды, опухолевые клетки разносятся по всему организму и, оседая в капиллярах различных органов, формируют вторичные (метастатические) очаги опухолевого роста [1].

Для понимания процессов, происходящих в клетках при их трансформации в злокачественные [1–7], значительный интерес представляет сравнительное изучение стро-

ения внутриклеточной водной среды в нормальных и опухолевых клетках, которое до настоящего времени практически не проводилось. Подобные исследования могут быть выполнены с помощью метода низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии [8–11], который позволяет по величине химического сдвига определять степень ассоциированности внутриклеточной воды, а по ее способности к замерзанию — изменения внутренней энергии, обусловленные взаимодействием воды с растворенными в ней низкомолекулярными веществами и биополимерами.

На субмикронном уровне внутреннее строение клетки можно рассматривать как совокупность полостей, образованных оргanelлами и высокомолекулярными биополимерами, заполненных водными растворами органических соединений. При этом доля воды может достигать 85% от общей массы клетки. Вода относится к сильноассоциированным жидкостям. В соответствии с результатами многочисленных исследований, суммированных в монографиях [9–11], вода имеет кластерное строение, основу ее составляют кластеры сильноассоциированной воды, размером 1–3 нм, в которых упорядоченность молекул значительно выше, чем в промежутках между смежными кластерами. Химический сдвиг протонов жидкой воды ( $\delta_{\text{H}}$ ) меньше, чем для гексагонального льда (тетрагональная структура,  $\delta_{\text{H}} = 7$  м. д. — миллионных частей), и составляет около 5 м. д. (миллионных долей). В наноразмерном пространстве внутриклеточных полостей кластеризованность воды возрастает, причем ее упорядоченность может как увеличиваться, так и уменьшаться за счет стабилизации или частичного разрушения водородных связей активными поверхностными группами и молекулами растворенных в воде веществ. Для выявления влияния злокачественной трансформации на строение кластеров внутриклеточной воды может быть использовано свойство кластеризованной воды плохо растворять полярные органические вещества и сильные кислоты [11–13].

Целью работы было изучение изменения строения внутриклеточной воды в печени интактных крыс и животных с карциномой Герена на разных стадиях развития опухоли в воздушной и органической средах, в том числе и содержащих добавки трифторуксусной кислоты.

## Материалы и методы

**Материалы.** Ткань печени была получена от крыс линии Вистар (интактные крысы и животные с трансплантированной карциномой Герена, массой 180 г). Время после перевивания опухоли составляло от 1 до 12 сут. Для экспериментов брали по 5 г каждого образца печени, которую высушивали, используя метод лиофилизации. После высушивания содержание остаточной воды в образцах не превышало 5% массы. Фотографии образцов тканей до высушивания для контрольной опухоли и через 12 сут после перевивания, полученные на фазово-контрастном микроскопе (Primo Star, Zeiss, Германия, при увеличении  $\times 1\,000$  с использованием иммерсии), приведены на рис. 1. Образцы различаются размерами клеточных образований, более однородных для контрольного образца.

Перед ЯМР-исследованиями образцы растирали в фарфоровой ступке до получения гранул размером 0,1–0,5 мм, что обеспечивало, с одной стороны, слабое разрушение клеток, а с другой — равномерное размещение исследуемого материала в ампуле ЯМР-спектрометра. После этого к образцам добавляли определенное количество дистиллированной воды и уравнивали

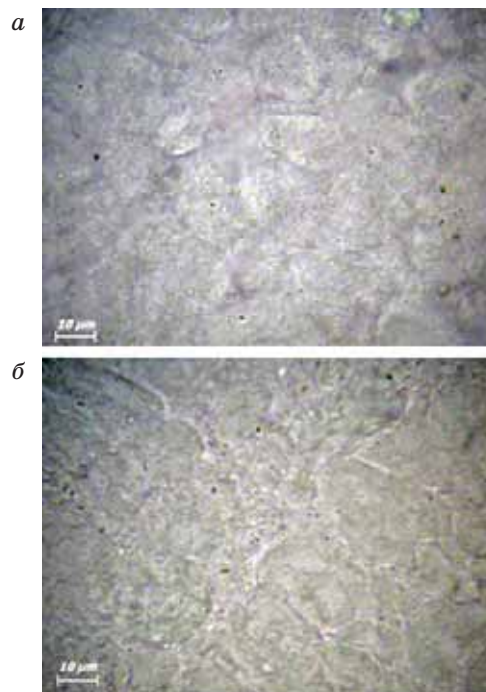


Рис. 1. Микрофотографии тканей печени крыс, интактных (а) и с перевитой карциномой Герена (б) 12 сут (увеличение  $\times 1\,000$  с использованием иммерсии)

при комнатной температуре в течение 1–2 ч. Максимальная гидратированность образцов составляла 330 мг воды на 1 г сухой ткани. Одни и те же образцы исследовали на воздухе с добавлением органических растворителей и трифторуксусной кислоты (ТФУК). Применение дейтерированных растворителей ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\text{DMCO-d6}$ ) было обусловлено стремлением максимально уменьшить сигналы протонов органических растворителей, интенсивность которых может значительно превышать интенсивность сигнала воды.

<sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian Mercury) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали 90°-зондирующий импульс, длительностью 3 мкс и шириной полосы 20 кГц. Температура в датчике регулировалась термодрифтацией Bruker VT-1000 с точностью  $\pm 1$  К. Интенсивность сигналов определяли путем измерения площади пиков с использованием процедуры разложения сигнала на его составляющие для гауссовской формы сигнала, оптимизации нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не ниже 5%, а для перекрывающихся сигналов —  $\pm 10\%$ . Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах измерения концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры 210 К. Методика ЯМР-измерений и определения термодинамических характеристик и радиуса кластеров межфазной воды подробно описана в [8–11].

Для установления геометрических размеров кластеров адсорбированной воды использовали уравнение Гиббса–Томсона, связывающее радиус сферического или цилиндрического водного кластера либо домена ( $R$ ) с величиной депрессии температуры замерзания [8, 11, 13]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_s T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

где  $T_m(R)$  — температура плавления льда, локализованного в порах радиуса  $R$ ,  $T_{m,\infty}$  — температура плавления объемного льда,  $\rho$  — плотность твердой фазы,  $\sigma_s$  — энергия взаимодействия твердого тела с жидкостью и  $\Delta H_f$  — объемная энтальпия плавления. Для практического использования уравнение (1) можно применять в виде  $\Delta T_m = (k/R)$ , в котором константа  $k$  для многих гетерогенных систем, содержащих воду, близка к 50 [13].

Если предположить, что влияние поверхности границы раздела фаз распространяется на несколько молекулярных слоев вглубь жидкой фазы, то процесс замерзания (оттаивания) межфазной воды, локализованной в твердой пористой матрице, происходит в соответствии с изменениями свободной энергии Гиббса, обусловленными влиянием поверхности. Оно тем меньше, чем дальше от поверхности изучаемый слой воды. При  $T = 273$  К замерзает вода, свойства которой не отличаются от объемных, а по мере снижения температуры (без учета эффекта переохлаждения) замерзают ближе расположенные к поверхности слои воды, причем для изменения свободной энергии межфазной воды справедливо соотношение:

$$\Delta G_{\text{ice}} = -0,036(273,15 - T), \quad (2)$$

где численный коэффициент представляет собой параметр, связанный с температурным коэффициентом изменения свободной энергии Гиббса для льда [14]. Определяя по величине интенсивности сигнала температурную зависимость концентрации незамерзающей воды  $C_{\text{uw}}(T)$  в соответствии с методикой, подробно описанной в [8–11], можно рассчитать количество сильно- и слабосвязанной воды, а также термодинамические характеристики этих слоев.

Межфазную энергию воды на границе с твердыми частицами или в ее водных растворах определяли как модуль суммарного понижения свободной энергии воды, обусловленного наличием границы раздела фаз [8–11] по формуле:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{\text{uw}}^{\text{max}}} \Delta G(C_{\text{uw}}) dC_{\text{uw}}, \quad (3)$$

где  $C_{\text{uw}}^{\text{max}}$  — общее количество незамерзающей воды при  $T = 273$  К.

Величина  $\gamma_s$  определяет суммарное понижение свободной энергии системы биологическая ткань–вода, обусловленное наличием границы раздела фаз. В частично дегидратированных клеточных объектах кроме воды, связанной с биополимерами, присутствует значительное количество растворимых в воде низкомолекулярных веществ (сахара, соли, органические кислоты), которые снижают температуру замерзания внутриклеточной воды. Поэтому величина  $\gamma_s$  содержит вклады от понижения свободной энергии воды, обусловленного ее адсорбционными взаимодействиями с биополимерами и гидратацией растворенных

веществ. Применять (1) к растворам можно, если предположить, что при их замораживании вода кристаллизуется в виде индивидуальных кристаллов гексагонального льда. В таком случае в процессе таяния величина  $R$  определяет радиус нанокластеров (кластеров, доменов) воды, которые служат средой для растворения в них низкомолекулярных веществ.

Целью работы было изучение изменения строения кластеров воды в процессе онкогенеза.

Для этого были отобраны семь лабораторных животных, которым перевели опухоль (карцинома Герена). Затем изучали ткань печени через 1, 3 дня и т. д. по сравнению с контрольными здоровыми животными. Поскольку в каждом опыте изучали только один образец ткани, подсчитать разброс результатов в рамках каждого опыта невозможно. Можно только определить погрешности в концентрациях незамерзающей воды, которая присутствовала в тканях при каждой температуре измерения (приведены в таблице).

В дальнейшем, когда будут проводиться работы по применению нашего подхода к диагностике ранних стадий канцерогенеза, появится возможность изучить разброс экспериментальных данных в рамках каждой серии опытов (с несколькими лабораторными животными с одинаковой стадией развития опухоли).

### Результаты и обсуждение

На рис. 2 приведены снятые при различных температурах спектры  $^1\text{H}$  ЯМР тканей печени крыс — интактной (рис. 2, *a–в*) и с карциномой Герена (рис. 2, *г–е*), содержащие 330 мг/г остаточной воды. При выбранном уровне гидратированности можно считать, что вся присутствующая в клеточном материале вода является связанной, т. е. входит в состав гидратных оболочек биополимерных структур. В воздушной среде вид спектров для интактной ткани и ткани опухоленосителя оказался подобным (рис. 2, *a, б*). Межфазная вода находится в виде кластеров сильноассоциированной воды, химический сдвиг которых при температуре 290 К составляет около 5 м. д., что близко к химическому сдвигу жидкой воды. С понижением температуры замерзание воды осуществляется при  $T < 260$  К, т. е. вся имеющаяся в тканях вода может быть квалифицирована как сильносвязанная [7–9]. По мере замерзания воды (при снижении температуры) ее

химический сдвиг увеличивается, что может быть обусловлено ростом упорядоченности (приближение ее структуры к структуре гексагонального льда) и увеличением вклада молекул воды, взаимодействующих с сильными электронодонорными группами молекул биоматериала.

При введении в клетки слабополярного вещества ( $\text{CDCl}_3$ ) вид спектров изменяется (рис. 2, *в–е*). В них наблюдаются сигнал сильноассоциированной воды ( $\delta_{\text{H}} = 5\text{--}5,5$  м. д.) и группа сигналов в спектральной области  $\delta_{\text{H}} = 0,9\text{--}3,5$  м. д., которые для контрольного образца ткани (рис. 2, *в*) регистрируются отдельно, а для печени крыс с карциномой Герена (рис. 2, *г–е*) — как один широкий сигнал. Вероятно, этот сигнал обусловлен фосфолипидами, жирными кислотами, слабоассоциированной водой и водой, образующей водородносвязанные комплексы с электронодонорными центрами поверхности биоматериала, но не участвующими в реакции быстрого молекулярного обмена с другими молекулами воды. Форма спектров слабо зависит от времени перевивания опухоли (рис. 2, *г–е*).

Хорошо разрешенный спектр сигналов фосфолипидов, входящих в состав клеточных структур печени может быть получен в условиях малого содержания воды. Учитывая, что исходная лиофилизированная ткань содержит около 50 мг/г остаточной воды, на рис. 3, *a* приведены спектры  $^1\text{H}$  ЯМР контрольного образца в среде  $\text{CDCl}_3$ , содержащей добавку дейтерированной ТФУК. В спектрах наблюдается несколько сигналов, относящихся к алифатическим группам, которые могут присутствовать как в фосфолипидах, так и в жирных кислотах, образующих печеночную ткань. С понижением температуры интенсивность сигналов несколько уменьшается за счет формирования молекулярных кристаллов.

На рис. 3, *г* показан график изменения интенсивности сигнала при  $\delta_{\text{H}} = 1,25$  м. д. (наиболее интенсивный сигнал). В доступном диапазоне изменения температуры его интенсивность изменяется не более чем на 20%. Сильноассоциированная вода благодаря быстрому протонному обмену с кислотными протонами наблюдается в виде сигнала с химическим сдвигом  $\delta_{\text{H}} = 10,5\text{--}11,5$  м. д. Ее интенсивность уменьшается с ростом температуры из-за вымерзания воды. При этом сигнал раствора  $\text{H}_2\text{O}$ -ТФУК смещается в область слабых магнитных полей.

На рис. 3, *б* приведен  $^{19}\text{F}$  спектр того же образца. В спектре наблюдаются два



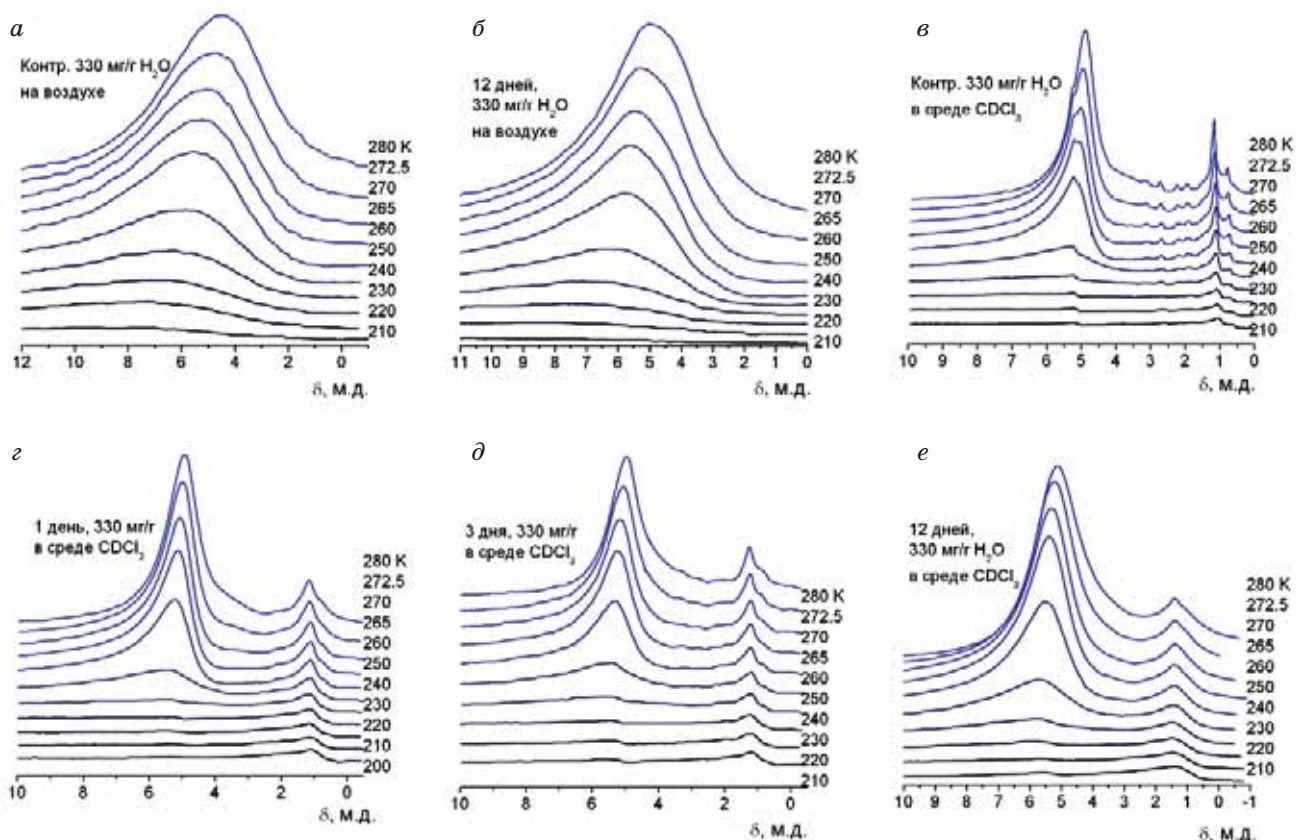


Рис. 2. Снятые при разных температурах спектры  $^1\text{H}$  ЯМР лиофилизированных тканей печени крыс: интактной (а, в) и с карциномой Герена при разных стадиях развития опухоли, на воздухе (а, б) и в среде  $\text{CDCl}_3$  (в-е)

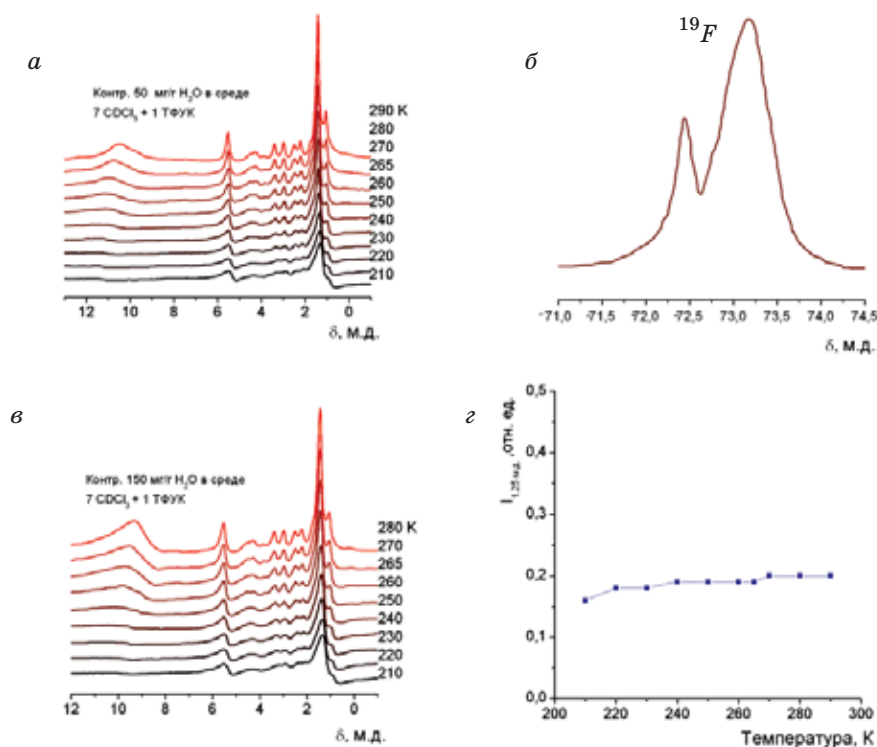


Рис. 3. Снятые при разной температуре спектры  $^1\text{H}$  ЯМР контрольного образца ткани печени крыс, содержащие: 50 мг/г (а) и 150 мг/г (в) воды в смеси  $\text{CDCl}_3/\text{ТФУК}$  и  $^{19}\text{F}$  спектр исходного образца ( $\text{CH}_2\text{O} = 50$  мг/г) при 293 К (б)

сигнала с химическими сдвигами  $\delta_F = 72,5$  и  $73,25$  м. д. Более интенсивный сигнал отвечает ТФУК в жидкой дисперсионной среде. Сигнал с меньшими значениями химического сдвига следует относить к сигналу ТФУК, которая вместе с хлороформом проникает в печеночную ткань. Добавление к образцу  $100$  мг/г воды практически не влияет на сигналы протонов в области  $\delta_H = 0,9$ – $5,5$  м. д. Слитый пик  $H_2O$ -ТФУК смещается в область сильных магнитных полей ( $\delta_H = 10$  м. д.), а его интенсивность увеличивается примерно втрое.

Зависимость от температуры концентрации незамерзающей воды в образцах печеночных тканей, контрольных и полученных на разных этапах развития опухоли (1–12 сут) в воздушной среде и в среде слабополярного органического растворителя — дейтерохлороформа, и изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды в координатах  $C_{uw}(T, \Delta G)$ , приведены на рис. 4, а. В таблице суммированы термодинамические характеристики межфазной воды, полученные в соответствии с методикой, описанной в [8–11]. При этом предполагалось, что слабосвязанной водой является та часть межфазной воды, для которой понижение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) не превышает  $-0,5$  кДж/моль.

В соответствии с этими данными в воздушной среде развитие опухолевого процесса сопровождается значительным уменьшением количества сильносвязанной воды, что приводит к уменьшению величины межфазной энергии от  $15,4$  до  $10,3$  кДж/моль. В среде хлороформа зависимость соотношения концентрации сильно- и слабо связанных форм воды менее однозначна. Хотя в образцах тканей, полученных через 1 и 12 сут развития опухолевого процесса, количество слабосвязанной воды становится значительно большим, чем для контрольного образца

( $192$  и  $205$  мг/г, соответственно), в образце, полученном через 3 дня развития опухолевого процесса,  $C_{uw}^w = 150$  мг/г.

Распределение по радиусам кластеров размерзающей воды в контрольном образце на воздухе (рис. 4) содержит хорошо разрешенный максимум при  $R = 20$  нм и широкое плато в области  $R = 6$ – $100$  нм. Через 12 сут после начала опухолевого процесса это плато становится выше, что связано с увеличением количества крупных доменов размерзающей воды. В среде хлороформа контрольный образец на распределении по радиусам кластеров (РРК) содержит два максимума, отвечающих  $R = 2$  и  $100$  нм. По сравнению с контрольным образцом в воздушной среде влияние больших доменов существенно повышается. Соответственно растет содержание слабосвязанной воды (таблица). Этот эффект проявляется в большинстве наноразмерных систем [11]. Он обусловлен проникновением молекул хлороформа (или другого слабополярного растворителя) в зазоры между кластерами (доменами) межфазной воды и твердой (биополимерной) поверхностью, что приводит к уменьшению связывания воды и укрупнению ее полиассоциатов.

Через 1 сут после начала развития опухоли форма кривой РРК изменяется незначительно, однако регистрируется относительный рост влияния больших доменов воды. Уже через три дня развития опухолевого процесса на кривой РРК фиксируется появление максимума при  $R = 4$  нм. После 12 сут развития опухоли этот максимум становится доминирующим, смещаясь в область  $R = 7$  нм.

Широкое распределение по размерам водных полиассоциатов в частично дегидратированных тканях печени дает основание предположить формирование кластеров воды с разными физико-химическими

Характеристики слоев межфазной воды в лиофилизированных тканях печени крыс, содержащих  $330$  мг/г остаточной воды на разных стадиях развития опухоли (карцинома Герена)

Образец/среда	$C_{uw}^s$ , мг/г	$C_{uw}^w$ , мг/г	$\Delta G^s$ , кДж/моль	$\gamma_s$ , Дж/г
Контроль/ $CDCl_3$	$200 \pm 20$	$130 \pm 13$	-2,5	$10,5 \pm 1,57$
1 день/ $CDCl_3$	$138 \pm 13,8$	$192 \pm 19$	-2,5	$8,6 \pm 1,29$
3 дня/ $CDCl_3$	$180 \pm 18$	$150 \pm 15$	-2,5	$11,5 \pm 1,73$
12 сут/ $CDCl_3$	$125 \pm 12,$	$205 \pm 20,5$	-2,5	$9,2 \pm 1,38$
Контроль/воздух	$210 \pm 21$	$120 \pm 12$	-2,5	$15,4 \pm 2,31$
12 сут/воздух	$150 \pm 15$	$180 \pm 18$	-2,5	$10,3 \pm 1,55$

Примечание. Здесь и далее на рисунках — результаты типичных экспериментов.

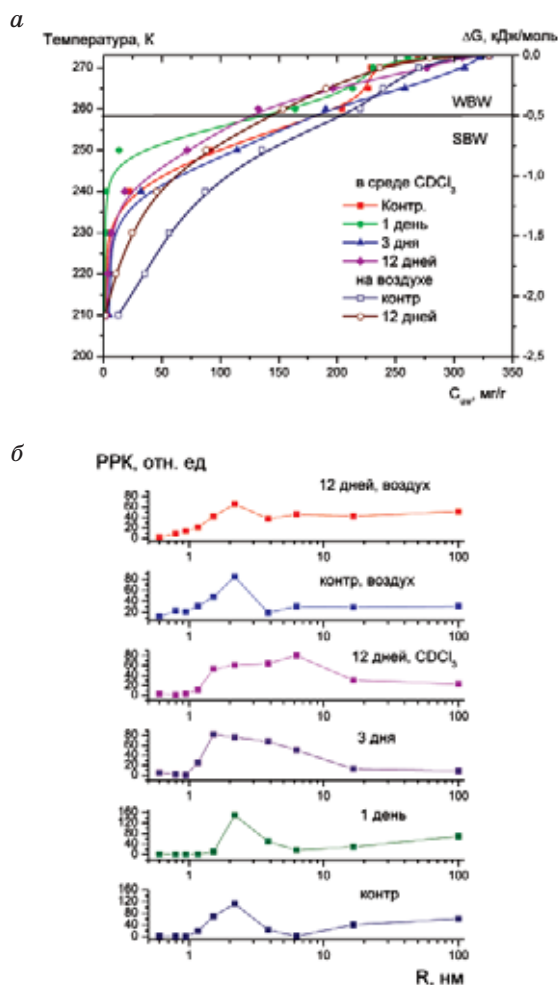


Рис. 4. Взаимосвязь концентрации незамерзающей воды в образцах тканей печени крыс на разных стадиях развития опухолевого процесса: с температурой и изменением свободной энергии Гиббса (а) и соответствующие распределения по радиусам кластеров (РРК) размерзающей воды (б)

свойствами. В частности, в предыдущих исследованиях [15–17] было показано, что наноразмерные кластеры межфазной воды плохо растворяют минеральные кислоты и полярные органические растворители. Поскольку ОН-протоны кислот характеризуются большой ( $\delta_H = 13$  м. д.) величиной химического сдвига, их добавление к дисперсионной среде может способствовать выявлению в спектрах  $^1H$  ЯМР кластеров воды с разной растворяющей способностью.

При высокой гидратированности образцов ( $C_{H_2O} = 330$  мг/г) добавление к дисперсионной среде ТФУК в случае интактной ткани приводит к значительному усложнению спектров. Сигнал сильноассоциированной воды трансформируется по крайней мере в шесть сигналов, химические сдвиги которых находятся в интервале  $\delta_H = 4$ –10,5 м. д.

Это свидетельствует об образовании системы кластеров, которые по-разному растворяют ТФУК. В частности, наименее интенсивный из сигналов SAW (сигнал 6, с химическим сдвигом  $\delta_H = 4$  м. д.; рис. 5, а) соответствует кластерам сильноассоциированной воды, которые не растворяют ТФУК, а упорядоченность сетки водородных связей в них несколько меньше, чем в жидкой воде. Сигнал 5 ( $\delta_H = 5$  м. д.) при  $T = 290$  К имеет спектральные параметры, совпадающие с параметрами воды в отсутствие ТФУК. Однако с понижением температуры и частичным замерзанием межфазной воды он разделяется на сигналы 4 и 5. При этом химический сдвиг сигнала 5 остается неизменным, а сигнал 4 с понижением температуры смещается в слабые поля, что свидетельствует об увеличении вклада растворенной ТФУК. Вероятно, это обусловлено вымерзанием воды в виде чистого льда и соответствующего увеличения концентрации кислоты в остаточной воде. Такая же закономерность прослеживается и для изменения химического сдвига сигналов 1–3 (рис. 5, а), однако концентрация ТФУК в кластерах воды, ответственных за эти сигналы, существенно выше. Можно считать, что основная часть ТФУК сосредоточена в кластерах, ответственных за сигналы 1 и 2. Для них максимальная величина химического сдвига (при 210 К) составляет  $\delta_H = 10,5$  и 9,5 м. д., соответственно, что приближается к величине химического сдвига чистой ТФУК ( $\delta_H = 11,5$  м. д.).

Для тканей с перевитой опухолью уже через 1 сут после перевивки соотношение интенсивности сигналов разных форм воды существенно изменяется (рис. 5, б). Эти изменения осуществляются вследствие уменьшения интенсивности сигналов 1 и 2 и соответственного роста 3–6. Через 3 сут после перевивания опухоли (рис. 5, в) в ткани доминирующим становится сигнал 5. Через 12 сут (рис. 5, г) при комнатной температуре в спектрах фиксируются только 2 сигнала сильноассоциированной воды с химическими сдвигами  $\delta_H = 4$  и 6,5 м. д. Первый из этих сигналов по своим характеристикам совпадает с сигналом 6 на рис. 5, а, а второй, вероятно, является усредненным сигналом для кластеров 1–5. При минимальной температуре ( $T = 210$  К) вид спектров для контрольной и опухолевых тканей становится подобным. Наиболее вероятно, что в печени крыс с опухолью формируются более однородные кластеры воды с усредненным значением растворимости в них ТФУК, которое в целом меньше, чем для здоровой ткани.



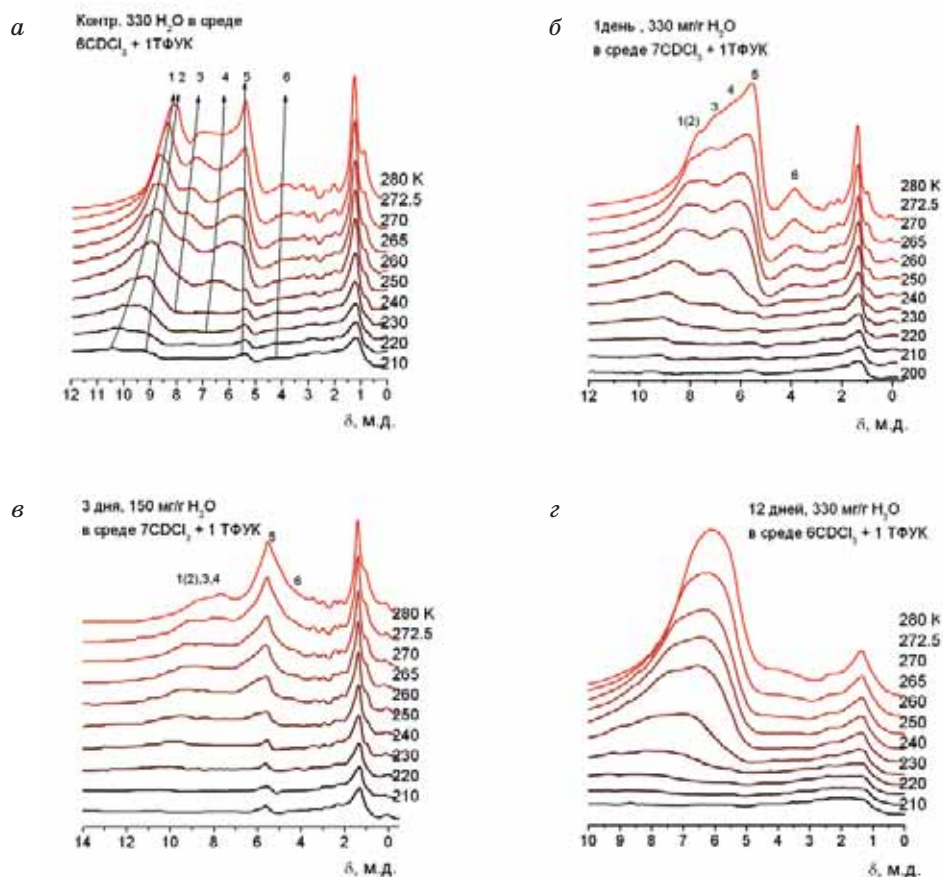


Рис. 5. Влияние времени развития опухолевого процесса на состояние воды в тканях печени крыс с перевитой карциномой Герена

Добавление к дисперсионной среде полярной компоненты ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) приводит к определенному перераспределению между интенсивностью сигналов 2–6 в интактной ткани (рис. 6). Заметно возрастает интенсивность сигнала 6, обусловленного кластерами с высокой концентрацией ТФУК. Их стабилизации способствует сольватирующее воздействие молекул ацетонитрила. Наблюдается также уменьшение интенсивности сигнала 2 за счет роста интенсивности сигналов 3–5. В то же время в печени крыс с опухолью эти изменения выражены значительно слабее. С ростом времени перевивания до 12 сут спектры сигнала SAW становятся подобными спектрам, полученным в среде хлороформа (рис. 2, е) без добавления ТФУК и ацетонитрила. Это свидетельствует о плохой растворимости в межфазной воде не только ТФУК, но и  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

Следует отметить, что в присутствии  $\text{CD}_3\text{CN}$ , как в интактной печени крыс (рис. 6, а), так и с карциномой Герена (рис. 6, б–г) наблюдается рост интенсивности сигнала протонов в спектральном диапазоне

$\delta_{\text{H}} = 1\text{--}3$  м. д., что свидетельствует о росте количества слабоассоциированных форм воды. Для интактной ткани это сигнал с химическим сдвигом  $\delta_{\text{H}} = 1$  м. ч. К сожалению, для печени крыс с опухолью (рис. 6, г) аналогичный сигнал WAW невозможно отделить от сигналов фосфолипидов, имеющих ту же величину химического сдвига.

С целью проверки предположения о слабой растворимости полярных веществ в межфазной воде печени животных с опухолью нами было изучено влияние на спектральные параметры SAW более сильного, чем ацетонитрил, электронодонорного растворителя — диметилсульфоксида (ДМСО). Результаты приведены на рис. 7.

Как следует из рисунка, основной сигнал сильноассоциированной воды имеет химический сдвиг в диапазоне  $\delta_{\text{H}} = 5\text{--}6.6$  м. д. Учитывая значительный избыток присутствующих в дисперсионной среде ТФУК и ДМСО, можно утверждать, что они почти не растворяются во внутриклеточной воде. Это свидетельствует о формировании в клетках компактных наноразмерных кластеров



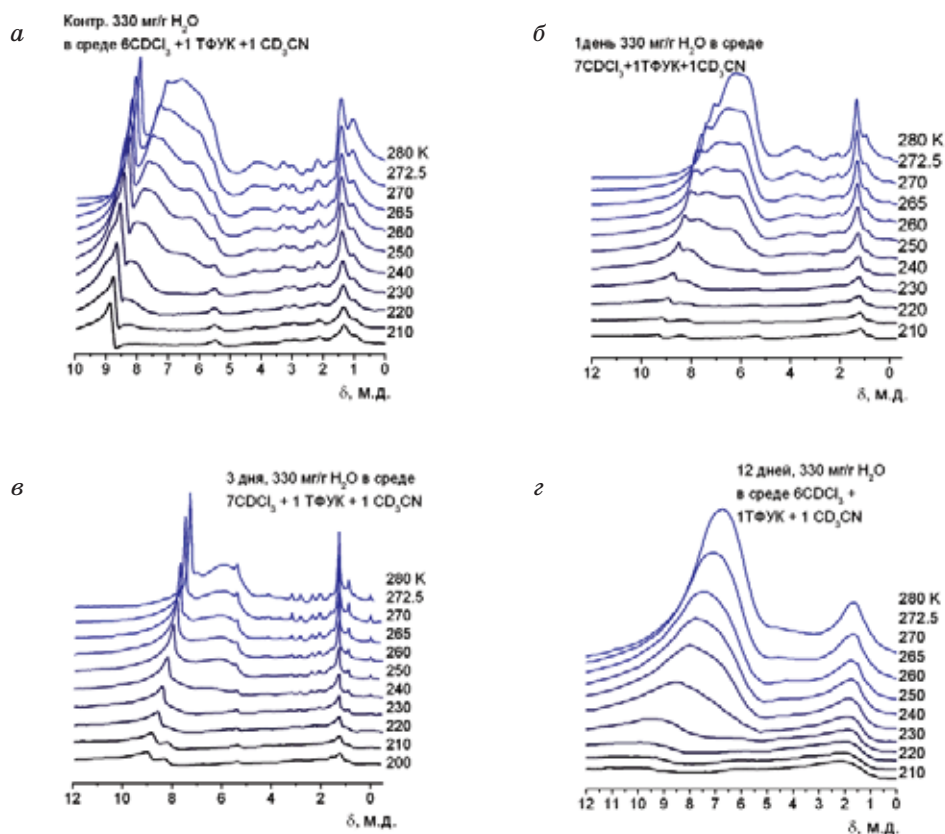


Рис. 6. Снятые при разных температурах спектры  $^1\text{H}$  ЯМР лиофилизированных тканей печени крыс: интактной (а) и с перевитой карциномой Герена (б-г, через 1, 3 и 12 сут, соответственно) в среде, содержащей хлороформ, ТФУК и ацетонитрил

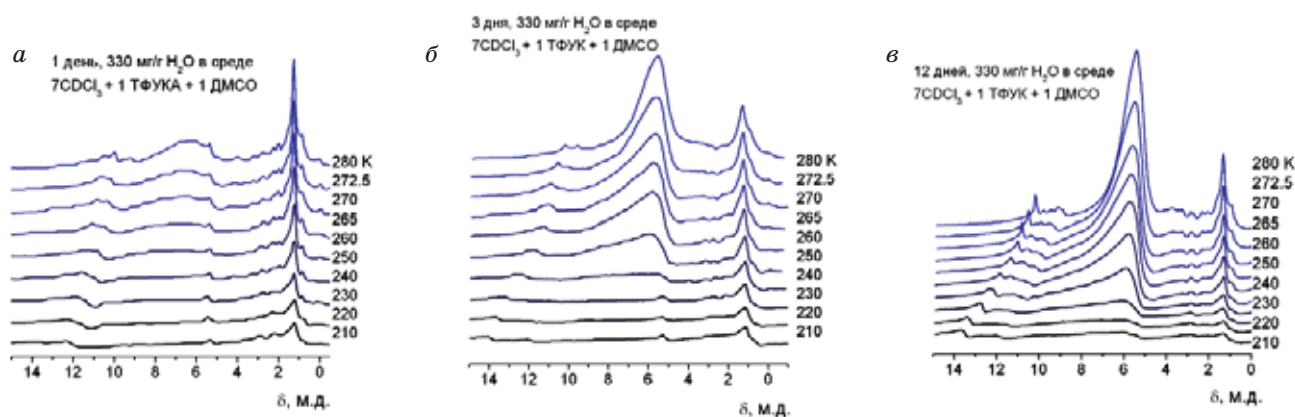


Рис. 7. Снятые при разной температуре спектры  $^1\text{H}$  ЯМР тканей печени крыс с карциномой Герена, содержащей 330 мг/г остаточной воды в среде хлороформа с добавками ТФУК и ДМСО

воды, растворение в которых кислоты и полярных органических веществ сопровождается значительным увеличением внутренней энергии и является энергетически невыгодным.

В спектрах на рис. 6 наблюдается также группа относительно слабых сигналов, химический сдвиг которых составляет

при комнатной температуре  $\delta_{\text{H}} = 9-11$  м. д. и увеличивается до 11–14 при  $T = 210$  К. Вероятно, они обусловлены водой, находящейся в кластерах, сформированных смесью воды, ДМСО и ТФУК и локализованных в разнородных участках тканей печени.

Таким образом, при сравнении спектральных характеристик сильноассоциированной воды в лиофилизированной ткани печени интактных крыс и с карциномой Герена наблюдаются значительные различия: опухолевый процесс приводит к существенному уменьшению количества сильносвязанной и соответствующему росту — слабосвязанной воды. Это обусловлено изменениями в распределениях по радиусам кластеров адсорбированной воды. С развитием опухолевого процесса вместо кластеров с  $R = 2$  нм, преобладающих в контрольном образце, в тканях появляется зна-

чительное количество кластеров (доменов) с  $R > 2-7$  нм. В интактной ткани присутствуют 6 типов кластеров воды, способных растворять разное количество ТФУК. В печени опухоленосителя кластеры SAW более однородны, а их растворяющая способность по отношению к ТФУК и электронодонорным молекулам существенно меньше. Можно предположить, что строение кластеров межфазной воды влияет не только на процессы растворения кислот и полярных веществ, но и на протекание многих биохимических реакций в клетках в процессе их жизнедеятельности.

### REFERENCES

1. Kogan A. H. Pathophysiology of tumors (introduction to the general theory of carcinogenesis). Moscow: MMA. 1991, 436 p.
2. Gancev Sh. K. Oncology: A Textbook for Medical Students. Moscow Ltd. "Medical Information Agency". 2006, 488 p.
3. Galickij V. A. Carcinogenesis and mechanisms of intracellular signaling. *Voprosy onkologii*. 2003, 49 (3), P. 278–293. (In Russian).
4. Ado A. D. Pathological Physiology. Moscow: Triada-H. 2000, 574 p.
5. Theriault B. L., Nachtiga M. W. Human ovarian cancer cell morphology, motility, and proliferation are differentially influenced by autocrine TGF $\beta$  superfamily signalling. *Cancer Letters*. 2011, V. 313, P. 108–121.
6. Deberardinis R. J., Cheng T., Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010, 29 (3), 313–324.
7. Icard P., Poulain L., Lincet H. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Rev. Article Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Rev. Cancer*. 2012, 1825 (1), 111–116.
8. Turov V. V., Chehun V. F., Barvinchenko V. N., Krupskaya T. V., Prylutskyy Yu. I., Scharff P., Ritter U. Low-temperature  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopic study of doxorubicin influence on the hydrated properties of nanosilica modified by DNA. *J. Mater Sci: Mater Med*. 2011, V. 22, P. 525–532.
9. Nanomaterials and nanocomposites in medicine, biology, ecology. Ed. A. P. Shpak, V. F. Chekhun, compilers Gorbik P. P., Turov V. V. Kyiv: Naukova dumka. 2011, 444 p. (In Russian).
10. Gun'ko V.M., Turov V.V., Gorbik P.P. Water on interfaces. Kyiv: Naukova dumka. 2009, 694 p. (In Russian).
11. Turov V. V., Gun'ko V. M. The clustered water and ways of its applications. Kyiv: Naukova dumka. 2011, 313 p. (In Russian).
12. Gun'ko V. M., Turov V. V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. New York: Taylor & Francis. 2013, 1006 p.
13. Petrov O. V., Furo I. NMR cryoporometry: Principles, application and potential. *Progr. NMR*. 2009, V. 54, P. 97–122.
14. Thermodynamic properties of individual substances. Ed. V. P. Glushko. Moskva: Nauka. 1978, 495 p. (In Russian).
15. 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 Surface A: Physicochem. Engin. Asp*. 2011, P. 48–55.
16. Gun'ko V. M., Turov V. V., Turov A. V. Hydrogen peroxide — water mixture bound to nanostructured silica. *Chem. Phys. Lett*. 2012, V. 531, P. 132–137.
17. Gun'ko V. M., Morozova L. P., Turova A. A. Hydrated phosphorus oxyacids alone and adsorbed on nanosilica. *J. Colloid. Interface Sci*. 2012, V. 368, P. 263–272.

**ВПЛИВ ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ  
НА КЛАСТЕРИЗАЦІЮ ВОДИ  
В ЧАСТКОВО ДЕГІДРАТОВАНИХ  
ТКАНИНАХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ  
З КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА**

*В. В. Туров<sup>1</sup>  
І. М. Тодор<sup>2</sup>  
Н. Ю. Лук'янова<sup>2</sup>  
Т. В. Крупська<sup>1</sup>  
А. П. Угнівенко<sup>1</sup>  
В. Ф. Чехун<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка  
НАН України, Київ

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького  
НАН України, Київ

*E-mail: v\_turov@ukr.net*

Метою роботи було вивчення зміни будови внутрішньоклітинної води в печінці інтактних щурів і з карциномою Герена. Методом низькотемпературної <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії досліджували стан води в ліофілізованій тканині печінки щурів — інтактній та враженій карциномою Герена на різних стадіях розвитку. Показано, що з розвитком пухлини зростає внесок водних поліасоціатів, розмір яких становить 3–12 нм. Встановлено, що в інтактній тканині присутні 6 типів кластерів води, які здатні розчиняти різну кількість трифтороцтової кислоти. У печінці з карциномою Герена кластери сильноасоційованої води є більш однорідними, а їх розчинювальна здатність стосовно трифтороцтової кислоти і електродонорних молекул істотно нижча.

Одержані результати є важливими для вивчення механізмів пухлинних процесів.

**Ключові слова:** карцинома Герена, кластери води, сильно- і слабоасоційована вода.

**TUMOR EFFECT ON WATER  
CLUSTERING OF IN PARTIALLY  
DEHYDRATED LIVER TISSUE  
OF RAT WITH GUERIN CARCINOMA**

*V. V. Turov<sup>1</sup>  
I. M. Todor<sup>2</sup>  
N. Yu. Lukyanova<sup>2</sup>  
T. V. Krupskaya<sup>1</sup>  
A. P. Ugnivenko<sup>1</sup>  
V. F. Chehun<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Chuyko Institute of Surface Chemistry of the  
National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

<sup>2</sup>Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology of the National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: v\_turov@ukr.net*

The aim was to study the changes in the structure of intracellular water in the intact rat liver and liver with Guerin carcinoma. The state of water in lyophilized liver tissue of rats — intact and affected by Guerin carcinoma at different stages of tumor development was studied by low-temperature <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. It is shown that in progress of tumor the contribution from the water clusters whose size is 3–12 nm is grows. It was established that in intact tissue present 6 types of water clusters capable of dissolving different amounts of trifluoroacetic acid. In the liver with Guerin carcinoma clusters of strongly associated water more uniform, and their dissolving power with respect to trifluoroacetic acid and the electron donor molecules significantly decreased.

These results are important for elucidating the mechanism of action of water on the development of neoplastic processes.

**Key words:** Guerin's carcinoma, water clusters, strongly and weakly associated water.