

**ДИФУЗИЯ ВОДИ ТА РІВЕНЬ  $\text{Na}^+$  У ПІДШКІРНІЙ КАРЦИНОМІ ПЕЧІНКИ ЩУРА**

**А. Бабський<sup>\*,\*\*</sup>, Ш. Джи<sup>\*</sup>, С. Беннетт<sup>\*</sup>, Г. МакЛеннан<sup>\*</sup>, Н. Банзал<sup>\*</sup>**

*\*Відділ радіології Індіанського університету, Індіанapolis  
950 West Walnut, R2 E124, Indianapolis, IN 46202, USA*

*\*\*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: ababsky@iupui.edu*

Проводили неінвазивний моніторинг об'єму підшкірної гепатоклітинної карциноми (ГКК) щура, коефіцієнта дифузії води (КДВ), загальнотканинного і внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  у цій пухлині, використовуючи метод  $^1\text{H}$ - і  $^{23}\text{Na}$ -ядерного магнітного резонансу. Час подвоєння об'єму пухлини становив 11,2 дня. КДВ у ГКК був у два рази нижчий порівняно зі суміжною тканиною скелетних м'язів. За три тижні росту пухлини КДВ зростав із 0,63 до  $0,79 \times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$ , тоді як у м'язах цей показник залишався незмінним. Збільшення об'єму ГКК та КДВ корелювало зі зростанням інтенсивності загальнотканинного та внутрішньоклітинного сигналів  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР на 21-й і 28-й дні після ін'єкції ракових клітин, відображаючи зростання зовнішньоклітинного середовища у пухлині та зміни внутрішньоклітинного іонного метаболізму.

*Ключові слова:* гепатоклітинна карцинома, ЯМР, натрій, дифузія води.

Розробка неінвазивного методу ранньої діагностики й оцінки ефективності хіміотерапії ракових пухлин є сьогодні актуальною проблемою онкології. Метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР) дає таку можливість, оскільки не лише допомагає оцінити зміни об'єму пухлини у хронічному експерименті, але й, на відміну від рентгенограм, дає змогу охарактеризувати також механізми злоякісних перетворень чи хіміотерапевтичних ефектів.

В останні 15 років набув поширення новий метод ЯМР для оцінки коефіцієнта дифузії води (КДВ) в експериментальних пухлинах за допомогою реєстрації дифузійно-градієнтних  $^1\text{H}$ -зображень (ДГЗ) *in vivo*, який використовують для оцінки ефективності хіміотерапії [2, 5, 7, 11, 16]. КДВ дозволяє оцінити дифузію води, яка відображає броунівський рух молекул. ЯМР викликає прецесію мільйонів молекул води, і цей процес продукує сигнал, який можна зареєструвати у вигляді зображень  $T_1$ -ЯМР. Різниця (контраст) між різними біологічними тканинами і змінами у самих тканинах вимірюється за втратою когеренції чи синхронізації протонів води. Якщо у зразку присутні молекули води, які можуть вільно дифундувати, релаксація сигналу ЯМР зазвичай триває довше. Це дає змогу виявити у біологічній тканині місця з новоутвореннями чи запаленнями, які будуть відрізнятися від здорової тканини [10].

Однак цей метод має деякі обмеження за моніторингу пухлин органів очеревини, зокрема печінки, оскільки рух органа, спричинений диханням, серцебиттям чи пульсацією великих судин, може впливати на значення КДВ. Не дивно, що переважна більшість доклінічних досліджень ефективності хіміотерапевтичних препаратів за лікування пухлин очеревини проведена на підшкірних (п/шк) моделях пухлин, КДВ яких не спотво-

рюється рухом [2, 5, 7, 11, 16]. Зазвичай п/шк ракові пухлини прищеплюють не задній лапці гризунів (миші або щурі) та фіксують у резонаторній котушці для ЯМР [1, 2].

Ядро  $^{23}\text{Na}$  є другим після протону за „чутливістю” до ЯМР у більшості біологічних тканин, що має спин-число 3/2 та резонансну частоту 106 МГц. Хоча  $^{23}\text{Na}$  суттєво поступається  $^1\text{H}$  величиною відносного магнітного моменту та нетто магнетизацією на одиницю ваги, технічні модифікації останніх років дають змогу реєструвати зображення  $^{23}\text{Na}$ - ЯМР загального тканинного  $\text{Na}^+$  і навіть внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  [4]. Для вимірювання першого з них зазвичай використовують метод одноквантових  $^{23}\text{Na}$ -переходів (ОК), який так само, як і метод  $^1\text{H}$ -ДГЗ, значною мірою відображає зміни об'єму зовнішньоклітинного середовища (ЗКС). Зміни рівня внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  у хронічних експериментах *in vivo* зручно відстежувати за допомогою методу потрійно-квантових  $^{23}\text{Na}$ -переходів із фільтрованими ОК- $^{23}\text{Na}$ -сигналами (ТКФ) [3].

Гепато-клітинна карцинома (ГКК) є найбільш поширеною формою раку печінки, особливо у країнах південно-східної Азії та Африки [13]. Цьому сприяють численні фактори ризику, серед них такі розповсюджені хвороби, як цироз печінки, гепатити, діабет, ожиріння, можливі метастази пухлин інших органів та ін. [12]. Прищеплена за допомогою ін'єкції ракових N1S1 клітин модель ГКК за гістологічними показами є близькою до людської пухлини [8]. Однак ріст ГКК та ефективність їх хіміотерапії ніколи не досліджували за допомогою  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР-методів.

У цій роботі провадили моніторинг росту п/шк ГКК за змінами її об'єму, коефіцієнта дифузії води (КДВ), загальнотканинного ( $\text{Na}_T^+$ ) та внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_V^+$ ).

Ракові клітини N1S1 вирощували у Iscove's/Dulbecco's модифікованому культуральному середовищі («Sigma», St. Louis, MO), що містило 10% бичачий сироватковий альбумін. ГКК прищеплювали щурам лінії Sprague – Dawley («Harlan», Indianapolis, IN) віком 10–11 тижнів і вагою 300–320 г. Суспензію N1S1 клітин ( $10^6$  клітин у 0,1 мл фосфатного буферу) вводили за допомогою шприца під шкіру на задній лапці щура. Через 7–14 днів ГКК виростала до об'єму 0,1–0,3  $\text{cm}^3$ .

*In vivo* експерименти ЯМР провадили на горизонтальній магнітній установці фірми «Varian» (St. Louis, MO) із постійним магнітним полем 9,4 Т та магнітним градієнтом 40 Г/см у трьох проєкціях. Використовували об'ємну котушку-резонатор (внутрішній діаметр 30 мм, висота 25 мм), налаштовану на ЯМР-частоту протонів (400 МГц) і натрію (106 МГц). При цьому використовували дифузійно-градієнтну послідовність радіочастотних імпульсів (РЧІ) [10]. Магнітне поле установки для ЯМР гомогенізували до отримання половини ширини  $^1\text{H}$ -спектрального сигналу не більше, ніж 130 Гц. Тварину фіксували на поверхні пластикової пластини в такий спосіб, щоб п/шк пухлина потрапила у котушку-резонатор, розташовану під пластиною [3]. Як порівняльний стандарт використовували пластикову циліндричну кювету (внутрішній об'єм 6,5 мм, довжина 28 мм), заповнену 50 мМ розчином NaCl, який слугував за зразок інтенсивності сигналів  $^1\text{H}$  та  $^{23}\text{Na}$ . Досліди ЯМР провадили на другий, третій і четвертий тиждень після ін'єкції клітин N1S1. Протягом експерименту ЯМР тварини були знерухомлені 1–1,5%-м ізофлуреном, що надходив через носову газову маску з анестезійного апарата («Vetland», Louisville, KY) зі швидкістю 1–2 л/год. Щура поміщали у горизонтальну трубу установки для ЯМР (діаметр 31 см), в яку постійно подавали тепле повітря для підтримання температури 26–28°C. При цьому ректальна температура тіла була  $34 \pm 2^\circ\text{C}$ . Температуру контролювали за допомогою волокнисто-оптичних датчиків («FISO Technologies Inc.», Quebec, Canada). Частоту дихання тварини протягом

експерименту відстежували за допомогою респірометра («SA Instruments», Stony Brook, NY), використовуючи чутливий датчик, який поміщали під тілом тварини.

Для отримання зображень  $^1\text{H}$ -ЯМР використовували наступні параметри: 1100-мс інтервал до повторного радіочастотного імпульсу (РЧІ), 21 мс інтервал між РЧІ та розсіюванням сигналу ЯМР, 256x128 експериментальних точок на полі спостереження розміром 60x60 мм, 0,5 мм товщина ЯМР-перетинів та 1,5 мм відстань між ними. КДВ у пухлинах визначали за допомогою багатопланових дифузійно-градієнтних імпульсів (ДГІ) за реєстрації зображень  $^1\text{H}$ -ЯМР. Два ДГІ тривалістю 7,5 мс та інтервалом між ними у 40 мс прикладали у трьох проекціях. Зображення  $^1\text{H}$ -ЯМР накопичували за таких величин  $b$ -фактора (у  $\text{с}/\text{мм}^2$ ): 0, 256, 945 та 1679. Усереднене значення КДВ у ГКК і суміжній тканині скелетних м'язів визначали, аналізуючи трипросторові зображення кожного вимірювання за рівнянням Стейскала-Таннера:

$$S = S_0 \times e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \times \text{КДВ}} = e^{-b \times \text{КДВ}}, \quad (1)$$

де  $S$  – сигнал із пульсуючим градієнтом (дифузійним контрастом);  $S_0$  – інтенсивність сигналу без дифузійного контрасту;  $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ ,  $\gamma$  – гіромагнітне співвідношення;  $G$  – сила градієнтного імпульсу;  $\delta$  – тривалість імпульсу;  $\Delta$  – час між двома імпульсами. Об'єм пухлини оцінювали на підставі зображень  $\text{T}_2$ - $^1\text{H}$ -ЯМР, які реєстрували за  $b=0$   $\text{с}/\text{мм}^2$ , враховуючи площу, товщину ЯМР-перетинів і відстань між ними.

Загальнотканний  $\text{Na}^+$  вимірювали за допомогою методу ОК- $^{23}\text{Na}$ -переходів. Трипросторові зображення  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР реєстрували, використовуючи магнітно-градієнтну (gradient-echo) послідовність зображень. При цьому для реєстрації загального тканинного  $\text{Na}^+$  використовували метод одиночних квантів, що передбачає такі параметри: 90–100 мкс  $90^\circ$  РЧІ, 50 мс ПІ, 10 мс ЕЧ та 64'32'8 експериментальних точок при 60'60'32 ПЯЗ. Загальний час реєстрації зображення  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР становив 14 хв.

Трипросторові зображення  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  реєстрували, використовуючи метод багатоквантових (у даному дослідженні – потрійно-квантових переходів) із фільтруванням сигналів ОК- $^{23}\text{Na}$ -ЯМР [4]. Цей метод передбачає об'єднання потрійно-квантових переходів із трипросторовою послідовністю магнітно-градієнтних зображень. Перша частина імпульсної послідовності ТКФ слугувала як стандартна магнітно-градієнтна послідовність, в той час як другий  $90^\circ$  імпульс викликав багатоквантову когеренцію. Останній  $90^\circ$  імпульс перетворював енергію невидимої багатоквантової когеренції у видиму когеренцію одиночних квантів. У зв'язку зі слабким сигналом ЯМР внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  усі технічні характеристики були підібрані таким чином, щоб максимально збільшити співвідношення інтенсивності сигналу  $^{23}\text{Na}$  до експериментальних шумів (signal-to-noise ratio). Технічні параметри методу ТКФ були такі: 90–100 мкс  $90^\circ$  РЧІ, інтервал 120 мс для ПІ, 10 мс ЕЧ та 64'32'8 експериментальних точок при 60'60'36 ПЯЗ. Загальний час реєстрації зображення  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР становив 55 хв.

Після останнього експерименту ЯМР пухлину відрізали разом зі шкірою і фіксували у 25%-му розчині формаліну. Гістологічні зрізи товщиною 5 мкм робили у тій самій трансаксональній площині, що й ЯМР-перетини, перпендикулярно до лапки тварини. Зрізи фарбували сумішшю гістаміну й еозину.

Дані дослідів ЯМР переносили у персональний комп'ютер і обробляли, використовуючи комп'ютерну програму Image Browser фірми «Varian» для аналізу ЯМР-зображень. Результати наведені у статті як середнє арифметичне експериментів у серії  $\pm$  стандартна похибка. Статистичний аналіз даних проводили за критерієм Стьюдента (ANOVA, Statistica/5,1). Статистично ймовірними вважали відмінності із  $P \leq 0,05$ .

Об'єм п/шк ГКК на другий тиждень після ін'єкції клітин становив  $1,7 \pm 0,2 \text{ см}^3$ . Загалом об'єм пухлин подвоювався у середньому за 11,2 дня і на четвертий тиждень збільшувався до  $4,0 \pm 1,3 \text{ см}^3$  (рис. 1). На рис. 2 наведено типові зразки  $^1\text{H}$ -ДГЗ п/шк ГКК на 28-й день росту за різних  $b$ -факторів, а також мапу КДВ, реконструйовану на підставі цих зображень. На мапі КДВ інтенсивність ЯМР-сигналу (яскравість) пропорційна інтенсивності дифузії води. Як видно, дифузія води загалом у пухлині є суттєво нижчою за скелетні м'язи, розташовані над пухлиною. Однак у центрі п/шк ГКК чітко виокремлюються зона підвищеного КДВ, яка, як показав гістологічний аналіз, збігається із регіоном спонтанних некротичних перетворень ракової тканини.

Типовий зразок змін на мапах КДВ за умов росту п/шк ГКК на 14-, 21- і 28-й день після ін'єкції клітин наведено на рис. 3 (верхній ряд). Як видно за інтенсивністю ЯМР-сигналу, з ростом п/шк пухлини КДВ виразно зростає, особливо за умов некротичних

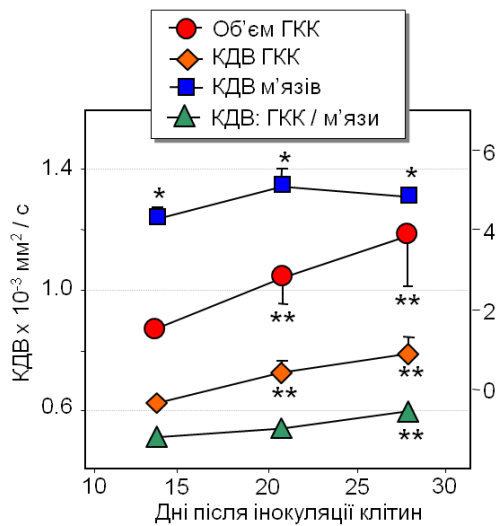
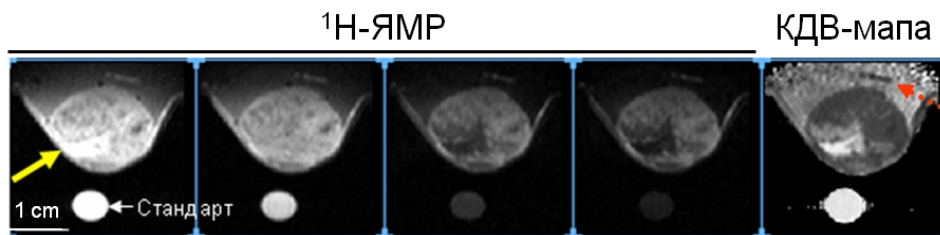


Рис. 1. Об'єм п/шк ГКК та коефіцієнт дифузії води у ній та у суміжній тканині скелетних м'язів ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). (Стандартна похибка деяких даних була нижчою за розмір символу). Імовірні зміни: \* –  $P < 0,05$  (vs. ГКК), \*\* –  $P < 0,05$  (vs. 14-й день).

перетворень, які виникають на третій тиждень росту і добре виявляються у правій нижній частині пухлини. На рис. 1 наведено також усереднені статистичні дані КДВ в усьому об'ємі п/шк ГКК та суміжної тканини скелетних м'язів. Як видно, на 14-й день після ін'єкції клітин  $\text{N1S1KДВ}$  у пухлині був майже удвічі менший порівняно зі скелетними м'язами: ( $y \times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$ )  $0,63 \pm 0,01$  і  $1,2 \pm 0,1$  ( $P < 0,0001$ ), відповідно. Через один і два тижні після цього КДВ у пухлині ймовірно збільшувався до ( $y \times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$ )  $0,72 \pm 0,04$  і  $0,79 \pm 0,06$  ( $P < 0,05$ ), відповідно порівняно з розмірами на 14-й день росту пухлини. У ті ж дні КДВ у м'язах залишався майже незмінним у межах  $1,2-1,3 \times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$ . Таким чином, протягом трьох тижнів моніторингу співвідношення КДВ у п/шк ГКК до прилеглої тканини зростало із  $0,51 \pm 0,02$  (14-й день) до  $0,59 \pm 0,03$  (28-й день) ( $P < 0,03$ ) (рис. 2). У



$b$ -фактор: 0                      256                      945                      1679

( $y \text{ с} / \text{мм}^2$ )

Рис. 2. Дифузійно-градієнтні  $^1\text{H}$ -ЯМР-зображення за різних значень  $b$ -фактора і КДВ-мапа п/шк ГКК щура на 28-й день після ін'єкції  $\text{N1S1}$ -клітин. ГКК позначено суцільною, а суміжна тканина скелетних м'язів – пунктирною стрілкою.

стандартному розчині 50 мМ NaCl, який поміщали у пробірку і розташовували поруч із пухлиною, КДВ був стабільний –  $2,3 \pm 0,01 \times 10^{-3}$  мм<sup>2</sup>/с.

На рис. 3 наведено також зміни загального тканинного (ОК) та внутрішньоклітинного Na<sup>+</sup> (ТКФ) за умов росту п/шк ГКК, які вимірювали методами ЯМР ОК- та ТКФ-<sup>23</sup>Na на 14-, 21- і 28-й день після ін'єкції клітин N1S1. Вже з типових зображень ЯМР (зліва на рисунку) можна бачити, що інтенсивність сигналів і ОК-, і ТКФ-<sup>23</sup>Na суттєво зростає за умов росту пухлини. Більше того, спостерігали певну кореляцію інтенсивності сигналів ОК-<sup>23</sup>Na та <sup>1</sup>H на мапі КДВ (верхній ряд зображень), оскільки обидва параметри, як зазначали раніше [1, 12, 13], залежать від розмірів ЗКС. Як бачимо, у правій нижній частині зображення пухлини на 21- і 28-й дні росту спостерігали виразно збільшений КДВ та інтенсивність ОК-<sup>23</sup>Na-ЯМР. Сигнал зі стандартної пробірки, розташованої під пухлиною, добре видно і на мапах КДВ, і на зображеннях ЯМР ОК-<sup>23</sup>Na. Його відсутність на зображеннях ТКФ-<sup>23</sup>Na-ЯМР свідчить про високу ефективність фільтрування сигналу ОК-<sup>23</sup>Na. Таким чином, сигнал ТКФ-<sup>23</sup>Na в основному відображав рівень Na<sup>+</sup> із внутрішньоклітинного середовища (ВКС). За статистичного опрацювання даних величини Na<sub>т</sub><sup>+</sup> та Na<sub>в</sub><sup>+</sup> сигналів ЯМР були прийняті за 100%. Бачимо, що Na<sub>т</sub><sup>+</sup> ймовірно зростав на 55% на 28-й день росту порівняно з рівнем, виявленим для цього показника на 14-й день (рис. 3). Зміни Na<sub>в</sub><sup>+</sup> були навіть більш вираженіми. Так, на 21-й та 28-й дні Na<sub>в</sub><sup>+</sup> ймовірно зростав на 75 і 83% (P<0,05), відповідно.

Зразки гістологічних зрізів п/шк ГКК відбирали після останнього експерименту ЯМР на четвертий тиждень після ін'єкції ракових клітин. На рис. 4 наведено характерні некротичні перетворення у пухлині. Можна легко відрізнити життєздатні ракові клітини (а) від клітин, охоплених запальними процесами (б) та некротичних клітин коагулятивного типу (в), коли значна частина пухлини заповнена некротичними „тінями” клітин без ядер. У некротич-

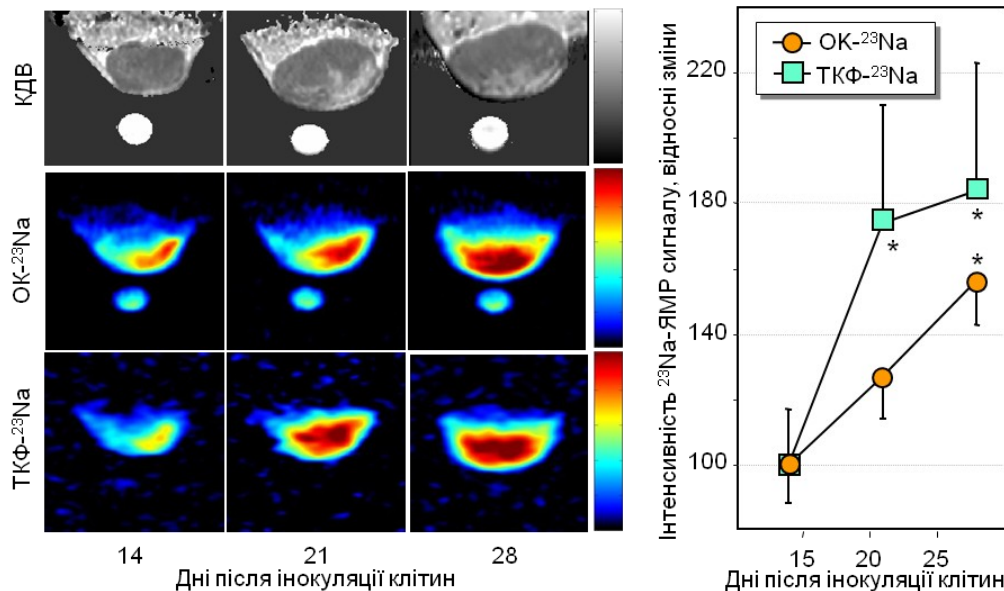


Рис. 3. Зміни КДВ та <sup>23</sup>Na-ЯМР-зображень загального тканинного (ОК) та внутрішньоклітинного Na<sup>+</sup>(ТКФ) п/шк ГКК пухлин на 14-, 21- і 28-й день після інюкації клітин. Пробірку, заповнену розчином 50 мМ NaCl, розміщували під пухлиною і використовували як стандарт. M±m, n=4. Імовірні зміни: \* – P<0,05 vs. 14-й день.

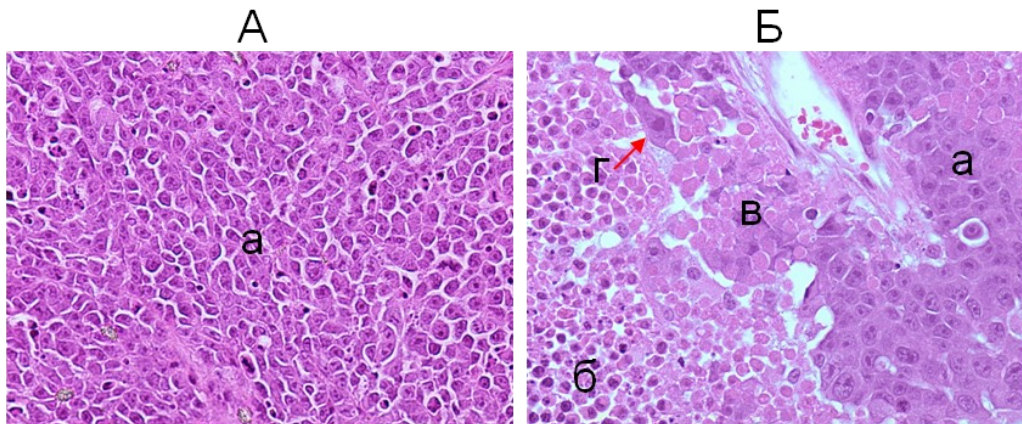


Рис. 4. Гістологічні зрізи п/шк ГКК у районі життєздатних ракових клітин (А) та на межі із зоною некрозу (Б). *a* – життєздатні ракові клітини, *б* – зона запалення, *в* – некротичні клітини, *г* – макрофаг у момент фагоцитозу. Збільшення: 400 $\times$ .

чних зонах можна також помітити процеси фагоцитозу некротичних клітин (*г*). На деяких гістологічних зрізах також видно, що некротичні зони часто заповнені сполучною тканиною (стромою), схожою на колаген. Розвиток запальних і некротичних процесів у ГКК є головною причиною збільшення ЗКС за умов росту пухлини.

Таким чином, наведені результати показали, що тваринна модель п/шк ГКК слугує зручним об'єктом для вивчення механізмів злоякісних перетворень. На сьогодні переважна більшість доклінічних вимірювань КДВ на тваринах за вивчення ефективності хіміотерапії очеревини проведена на підшкірних ракових моделях, щоб оминати ефект руху органів на КДВ [6, 14, 15]. За використання п/шк ГКК проблема впливу руху на значення КДВ у печінці та ГКК відсутня. Наші попередні дані показали, що абсолютні значення КДВ у пухлинах ГКК, розташованих під шкірою, були нижчими ( $P < 0,01$ ) порівняно із ГКК, розташованими безпосередньо у печінці, на 53, 37 і 24% на 14-й, 21-й і 28-й дні, відповідно [1]. Це може означати, що експериментальні прийоми (сповільнення дихання тварини, реєстрація  $^1\text{H}$ -ЯМР-сигналів тільки за апное та ін.) повністю не усувають вплив руху печінки, або те, що циркуляція крові у пухлині всередині печінки є вищою, ніж у п/шк пухлині.

Порівняння КДВ у п/шк ГКК та суміжній тканині скелетних м'язів показало, що у пухлині цей показник є удвічі нижчим. Таку відмінність можна пояснити хіба набагато інтенсивнішою циркуляцією крові у м'язах, бо інші структурні відмінності між цими тканинами (як-от ЗКС чи структурованість ВКС) швидше мали б сприяти вищому КДВ у пухлині ГКК. Проте не можна ігнорувати і той факт, що, на відміну від пухлини, м'язова тканина буде розташована на периферії ЯМР-резонатора, а відтак абсолютне значення КДВ у цій тканині потребує додаткового дослідження.

Зазвичай збільшення ракової пухлини супроводжується зменшенням щільності розташування клітин, збільшенням кількості некротичних і запальних зон, що має призводити до зростання ЗКС. Логічно було припустити, що КДВ за цих умов буде збільшуватись, що і було зареєстровано у наших експериментах із п/шк ГКК.

На відміну від вимірювання КДВ, реєстрація  $\text{Na}^+$  не залежить від руху печінки, оскільки  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР-сигнал реєструється довше, а ЯМР-зріз зображення зазвичай у декілька разів більший (грубший). Можливо, саме тому зміни сигналів ОК- і ТКФ- $^{23}\text{Na}$ -ЯМР



були подібними і у ГГК, розташованих у печінці, і у пухлинах під шкірою. Як наведено вище, рівень  $\text{Na}^+_т$  у ГГК в печінці ймовірно збільшувався у 2,5 разу через 28 днів після ін'єкції клітин. У той самий час цей показник не змінювався у суміжній тканині печінки, що у підсумку виявило ймовірне зростання співвідношення  $\text{Na}^+_т$  у пухлині до  $\text{Na}^+_т$  у печінці на 21-й та 28-й день після ін'єкції. Щепкін та ін. [17, 18] вважають, що зміни КДВ і  $\text{Na}^+_т$  у пухлинах повинні корелювати, оскільки обидва параметри залежать від об'єму ЗКС. Як зазначено вище, у наших експериментах зростання ЗКС спостерігали серед життєздатних ракових клітин, особливо в зонах запалення чи некрозу у пухлині. Попередній аналіз гістологічних препаратів показав, що у нашому випадку має місце кон'югативний тип некрозу, для якого характерне заповнення некротичних зон „гіннями” клітин, уламками мембран і макромолекулами. Як структура некротичних зон впливає на дифузію води, ще необхідно дослідити, але немає сумніву, що концентрація іонів у цих зонах повинна бути  $\sim 150$  мМ. Таким чином, інтенсифікація некротичних перетворень може бути однією із причин зростання сигналу ОК- $^{23}\text{Na}$ -ЯМР у пухлині.

Як показали наші  $^{23}\text{Na}$ -ТКФ дані, іншою причиною збільшення  $\text{Na}^+_т$  за умов росту ГГК може бути зростання  $\text{Na}^+_в$ . На 21-й та 28-й дні після ін'єкції клітин відносний рівень  $\text{Na}^+_в$  збільшувався у 2,1 та 2,8 разу, відповідно, тоді як у печінці він залишався стабільним. Причиною зростання  $\text{Na}^+_в$  у ракових пухлинах найчастіше називають недостатнє енергетичне забезпечення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпи і, відтак, зменшення натрієвого і калієвого градієнтів. Відомо, що за гіпоксійних умов ракової клітини енергетичні процеси зсунуті від окисного фосфорилування до гліколізу [9], що суттєво зменшує ефективність синтезу АТФ, а відтак і енергетичне забезпечення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-ази. Гіпоксійне нагромадження лактату, з іншого боку, призводить до нагромадження останнього у клітині і закислення внутрішньоклітинного середовища. Для підтримання гомеостазу  $\text{pH}_в$  у раковій клітині найактивнішим чином залучений  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмінник, який транспортує  $\text{H}^+$  назовні клітини в обмін на іони  $\text{Na}^+$ , що може бути додатковою причиною зростання  $\text{Na}^+_в$ . Отже, збільшення концентрації  $\text{Na}^+_в$  є суттєвим чинником, який сприяє зростанню  $\text{Na}^+_т$  за умов росту ГГК. Як зазначали вище, метод ЯМР ТКФ- $^{23}\text{Na}$  базується на відмінності релаксаційних процесів у насиченому макромолекулами ВКС та у переважно водному ЗКС. Інтенсифікація запальних і некротичних процесів коагулятивного типу сприяє накопиченню уламків клітин та протеїнових макромолекул у ЗКС пухлин. Тому не можна виключати також певне зростання сигналу ТКФ- $^{23}\text{Na}$ -ЯМР і з-поза меж клітин.

Таким чином, вищі показники дифузії води, а також загальнотканинного і внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  у ГГК, які реєстрували за допомогою методу ЯМР, можуть бути показником ранніх неоплазматичних перетворень у тканині печінки, пов'язаних зі змінами зовнішньоклітинного середовища та внутрішньоклітинного іонного метаболізму.

1. Бабський А., Джи Ш., Беннетт С. та ін. Моніторинг росту підшкірної карциноми за використання методу  $^{23}\text{Na}$ - і  $^1\text{H}$ -ядерного магнітного резонансу // Біофізичні механізми функціонування живих систем: Зб. тез. 16–18 жовтня 2008 р. Львів: Вид. центр Львів. ун-ту, 2008. С. 47–48.
2. Babsky A., Hekmatyar S., Zhang H. et al. Application of  $^{23}\text{Na}$  MRI to monitor chemotherapeutic response in RIF-1 tumors // Neoplasia. 2005. Vol. 7. P. 658–666.
3. Babsky A., Zhang H., Hekmatyar S. et al. Monitoring chemotherapeutic response in RIF-1 tumors by single-quantum and triple-quantum-filtered  $^{23}\text{Na}$  MRI,  $^1\text{H}$  diffusion-weighted MRI and PET Imaging // Magn. Reson. Imaging. 2007. Vol. 25. P. 739–747.

4. *Bansal N., Seshan V.* Three-dimensional triple quantum-filtered <sup>23</sup>Na imaging of rabbit kidney with weighted signal averaging // *J. Magn. Reson. Imaging.* 1995. Vol. 5. P. 761–767.
5. *Jennings D., Hatton B.N., Guo J.* et al. Early response of prostate carcinoma xenografts to docetaxel chemotherapy monitored with diffusion MRI // *Neoplasia.* 2002. Vol. 4. P. 255–262.
6. *Jordan B. F., Runquist M., Raghunand N.* et al. Dynamic contrast-enhanced and diffusion MRI show rapid and dramatic changes in tumor microenvironment in response to inhibition of HIF-1alpha using PX-478 // *Neoplasia.* 2005. Vol. 7. P. 475–485.
7. *Lemaire L., Howe F. A., Rodrigues L. M., Griffiths J. R.* Assessment of induced rat mammary tumour response to chemotherapy using the apparent diffusion coefficient of tissue water as determined by diffusion-weighted <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy *in vivo* // *MAGMA.* 1999. Vol. 8. P. 20–26.
8. *Lui W., Chi C., Hseih C.* Establishment of *in vivo* hepatoma models in rat and mouse from rodent hepatoma cell line // *Chin. Med. J. (Taipei).* 1995. Vol. 55. P. 353–360.
9. *Malo M. E., Fliegel L.* Physiological role and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. Vol. 84. P. 1081–1095.
10. *Mori S., Barker P.* Diffusion magnetic resonance imaging: Its principle and applications // *Anatomical Record.* 1999. Vol. 257. P. 102–109.
11. *Morse D. L., Galons J. P., Payne C. M.* et al. MRI-measured water mobility increases in response to chemotherapy via multiple cell-death mechanisms // *NMR Biomed.* 2007. Vol. 20. P. 602–614.
12. *Olsson R.* Hepatitis and cancer: genetic aspects // *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1996. Vol. 220. P. 115–120.
13. *Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.* Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 // *Int. J. Cancer.* 2001. Vol. 94. P. 153–156.
14. *Roth Y., Tichler T., Kostenich G.* et al. High-b-value diffusion-weighted MR imaging for pretreatment prediction and early monitoring of tumor response to therapy in mice // *Radiology.* 2004. Vol. 232. P. 685–692.
15. *Seierstad T., Folkvord S., Roe K.* et al. Early changes in apparent diffusion coefficient predict the quantitative antitumoral activity of capecitabine, oxaliplatin, and irradiation in HT29 xenografts in athymic nude mice // *Neoplasia.* 2007. Vol. 9. P. 392–400.
16. *Thoeny H. C., De Keyzer F., Vandecaveye V.* et al. Effect of vascular targeting agent in rat tumor model: dynamic contrast-enhanced versus diffusion-weighted MR imaging // *Radiology.* 2005. Vol. 237. P. 492–499.
17. *Schepkin V. D., Ross B. D., Chenevert T. L.* et al. Sodium magnetic resonance imaging of chemotherapeutic response in a rat glioma // *Magn. Reson. Med.* 2005. Vol. 53. P. 85–92.
18. *Schepkin V. D., Lee K. C., Kuszpit K.* et al. Proton and sodium MRI assessment of emerging tumor chemotherapeutic resistance // *NMR Biomed.* 2006. Vol. 19. P. 1035–1042.
19. *Zhao M., Pipe J.G., Bonnett J., Evelhoch J. L.* Early detection of treatment response by diffusion-weighted <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy in a murine tumour *in vivo* // *Br. J. Cancer.* 1996. Vol. 73. P. 61–64.



## WATER DIFFUSION AND SODIUM MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN GROWING SUBCUTANEOUS HEPATOCELLULAR CARCINOMA

A. Babsky<sup>\*\*\*</sup>, S. Ju<sup>\*</sup>, S. Bennett<sup>\*</sup>, G. McLennan<sup>\*</sup>, N. Bansal<sup>\*</sup>

*\*Department of Radiology, Indiana University, Indianapolis  
950 West Walnut, R2 E124, Indianapolis, IN 46202, USA*

*\*\*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: ababsky@iupui.edu*

The subcutaneous hepatocellular carcinoma (HCC) growth, apparent diffusion coefficient of water (ADC), total tissue ( $\text{Na}^+$ ) and intracellular  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+_i$ ) in the tumor were non-invasively monitored using  $^1\text{H}$  and  $^{23}\text{Na}$  magnetic resonance imaging (MRI). The tumor volume doubling time was 11.2 days. ADC in the tumor was two times higher than in the nearby muscle tissue. In growing tumors, ADC values was 0,63, 0,72, and  $0,79 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$  on days 14, 21, and 28 post-inoculation of N1S1 cells, respectively. The increase in tumor volume and ADC correlated with the increase in  $\text{Na}^+_t$  and  $\text{Na}^+_i$  on days 21 and 28 post-inoculation. These changes reflects most likely increase in extracellular space and metabolic transformations such as decrease in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and/or increase in  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchange.

*Key words:* hepatocellular carcinoma, MRI, water diffusion, sodium.

## ДИФФУЗИЯ ВОДЫ И УРОВЕНЬ $\text{Na}^+$ В ПОДКОЖНОЙ КАРЦИНОМЕ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

А. Бабський<sup>\*\*\*</sup>, Ш. Джи<sup>\*</sup>, С. Беннетт<sup>\*</sup>, Г. МакЛеннан<sup>\*</sup>, Н. Банзал<sup>\*</sup>

*\*Отдел радиологии Индианского университета, Индианаполис  
950 West Walnut, R2 E124, Indianapolis, IN 46202, USA*

*\*\*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: ababsky@iupui.edu*

Представлены результаты мониторинга объема подкожной гепатоклеточной карциномы (ГКК) крысы, коэффициента диффузии воды (КДВ), тканевого и внутриклеточного  $\text{Na}^+$  опухоли с использованием метода  $^1\text{H}$ - и  $^{23}\text{Na}$ -ядерно-магнитного резонанса. Время удвоения объема опухоли составляло 11,2 дня. КДВ в ГКК был ниже в два раза в сравнении с близлежащей тканью скелетных мышц. Через три недели роста опухоли её КДВ увеличивался в среднем с 0,63 до  $0,79 \times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$ , хотя в мышцах этот показатель не изменялся. Увеличение объема ГКК и уровня КДВ коррелировало с увеличением интенсивности тканевого и внутриклеточного сигналов  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР на 21-й и 28-й дни после инъекции раковых клеток, отображая увеличение внешnekлеточной среды опухоли и изменения ионного метаболизма.

*Ключевые слова:* гепатоклеточная карцинома, ЯМР, натрий, диффузия воды.

Стаття надійшла до редколегії 11.12.08

Прийнята до друку 19.12.08