

Hücre işaretleme, genel anlamda tüm kandan ilgili hücrelerin izole edilip radyonüklidlerle işaretlenmesi anlamına gelmektedir. Bu konuyla ilgili çalışmalar, 1976 yılında, Mc Afee ve Thakur'un, Indium-111 (In-111)'e bağlı lipofilik kompleksleri lökosit ve trombositlere inkorpore etmeyi başarmalarıyla yeni bir boyut kazanmıştır (1). Böylece daha önceden beta yayılımı olan Phosphor-32 (P-32) ve Tritium timidin (H-3 timidin) gibi radyonüklidlerle veya zayıf bir gamma yayılımı yapan Chromium-51 (Cr-51) ile incelenmeye çalışılan in vivo distribüsyon çalışmaları daha iyi anlaşılabilir ve klinik uygulamaları başlamıştır. Hücre işaretlemede kullanılan çeşitli radyonüklidler mevcuttur. Ancak bu radyonüklidlerin hiçbiri hücrelere spesifik olmadığından genel olarak nonselektif ajanlar olarak isimlendirilmektedir.

In-111 ve Technetium-99m (Tc-99m) lipofilik komplekslerinden önce, Gallium-67 (Ga-67) in vivo ve in vitro lökosit işaretlemede kullanılmıştır (2). Bugün in vivo işaretlemede halen kullanılmakla birlikte, in vitro işaretleme etkinliğinin çok düşük olması nedeniyle terkedilmiştir (3). Bunun dışında Cr-51 de in vitro eritrosit ve lökosit işaretlemede kullanılmış, ancak in vitro olarak lökosit işaretlemede, Ga-67'deki gibi işaretleme etkinliğinin son derece düşük olması nedeniyle terkedilmiştir. Bugün ise daha çok in vitro eritrosit işaretleme tekniğinde kullanılmaktadır.

Hücre İşaretlemede Kullanılan Ajanlar ve Etki Mekanizmaları

Tc-99m perteknetat: Tc-99m, perteknetat (Tc^{99m}O₄²⁻) formunda +7 değerlikli olup haliyle eritrosit membranından geçebilmektedir. Ancak bu geçiş çift taraflı olup Tc perteknetat iyonları aynı zamanda hücre dışına da çıkabilmektedirler. Ortamda kalay klorür (SnCl₂) varlığında +7 değerlikli Tc, +4 değere indirgenir (4). indirgenmiş olan Tc, globinin beta zincirine bağlanarak eritrosit membranından çıkması önlenmiş olur (4).

Cr-51 (Sodyum kromat): Cr-51, Sodyum kromat formunda +6 değerlikli olup kolaylıkla eritrosit membranından girmekte ve +3 değerlikli şekilde indirgenip eritrositlerde globinin polipeptid zincirine (5), trombositlerde adenin nükleotidlerine bağlanmaktadır (6).

In-111 ve Tc-99m lipofilik kompleksleri: Lipofilik komplekslere bağlı radyonüklidler, bu kompleksler aracılığı ile hücre membranından pasif difüzyonla geçerek kolaylıkla hücre içine girebilmektedir. Daha sonra lipofilik kompleksler hücreyi terk ederken radyonüklid hücre içerisinde kalmaktadır (7,8).

Lökosit işaretlemede kullanılan ajanlar Nonselektif ve Selektif olmak üzere iki grupta incelenebilir. Tablo-1'de selektif ve nonselektif ajanlar gösterilmiştir.

I. Nonselektif Ajanlar

Nonselektif ajanlar, radyoaktif metal ve bu metale işaretli lipofilik komplekslerden oluşmuşlardır. Nonselektif ajanların hepsi yüksüz ve "liposoluble"dır. Bu özelliklerine bağlı olarak hücre membranından pasif difüzyonla geçebilmektedirler (7).

1986 yılında lipofilik bir komponent olan ve Tc-99m ile işaretlenebilmesi mümkün olan "Hexamethylpropyleneamineoxime" (HfvlPAO)'in bulunmasına kadar (9), bu konuyla ilgili çalışmalar In-111 ile sürdürülmüştür. In-111'e bağlı lipofilik komplekslerden ilk kullanılanı "8-hydroxyquinoline" (oxine) olmuştur (10). Bu ajanla yapılan lökosit işaretlemedeki en büyük sorun işaretleme ortamının plazma dışında bir ortam olmasıdır. Çünkü plazma ortamında In-111, lipofilik kompleks yerine plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Lökositlerin plazma dışı bir ortamda işaretlemleri ise, hücrelerin metabolik aktivasyonlarına ve hasar görmelerine neden olur (11). Bu nedenle, plazma ortamında işaretleme mümkün kılan In-111 lipofilik kompleksi olan "tropolonate" geliştirilmiştir (12). Bunun dışındaki In-111 lipofilik kompleksleri Tablo-1'de görülmektedir.

* Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp ABD, ANTALYA

Tablo 1. Lökosit işaretlemede kullanılan ajanlar

Nonselektif	Selektif
In-111 oxIn	Tc-99m kalay kolloid
In-111 tropolonate	Antigranülosit MoAb
In-111 acetylacetonate	Kemotaktik peptid
In-111 merc	
Tc-99mHMPAO	

Tc-99m HMPAO'nun kimyasal yapısı In111 lipofilik komplekslerine benzemektedir, yüksüz ve "liposoluble"dir. Ancak Tc-99m daha kolay elde edilebilir bir radyonüklid olması ve görüntü kalitesinin yüksek olması nedeniyle In-111'e tercih edilen bir ajandır (13).

II. Selekti! Ajanlar

1) **Kolloidal partiküller:** Kolloidal partiküller, primer olarak monositler ve granülositler tarafından fagosite edilebilmektedirler. Ancak bunun yanında trombosit, eritrosit ve lenfosit membranlarına da yapışabildiklerinden kısmen selektif ajan olarak kullanılabilirler. Lökosit işaretlemede kullanılacak kolloidlerin, invitro işaretlemede kullanılması gerekmektedir. Çünkü, invivo koşullarda bu ajanlar retiküloendotelial sistem (RES) tarafından temizlenmektedir. Kolloidlerin nötrofiller tarafından fagosite edilebilmeleri için, 0.25-3 um. çapında olması gerekir (14). 0.1 um altındaki kolloidler primer olarak makrofajlar tarafından, daha düşük oranda da nötrofiller tarafından fagosite edilirler. Bu amaçla sulfur kolloid ve kalay kolloid ile yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Peters ve arkadaşları bu yöntemle yaptıkları çalışmada 7 hastanın 6'sında enfeksiyon odağını görüntüleyememişlerdir (15). Mock ve English ise bu yöntemin diğer nonselektif ajanlara bir üstünlüğü olmadığını ve hücrelerin metabolik aktivasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (16).

2) **Kemotaktik peptid:** Bu grupta en sık kullanılan ajan "N-formyl-methionil-leucyl-phenylalanine" (FfvlLP)'dir. Ancak bu ajanlar da granülosit aktivasyonuna neden olduklarından rutinde kullanılmamaktadır (17).

3) **Monoklonal Antigranülosit Antikor:** Lökosit işaretlemede monoklonal antikor (MoAb)'ların kullanımıyla, vakit alıcı ve özel teknik donanımlar gerektiren hücre separasyon işlemine gerek kalmamaktadır. Bu amaçla geliştirilmiş In-111 ve 1-123 ile işaretlenebilen monoklonal antikorlar mevcuttur (18). BW 250/183 ise, Tc-99m ile işaretlenebilen IgG, tipinde bir immunoglobulin olup, fare granülosit membranındaki NCA-95 parçasına karşı oluşturulmuştur (19). BW 250/183 IV enjeksiyonunda, dolaşımdaki granülositlerin %90-95'ine bağlanabilmekte invivo stabilitesi Tc99m HMPAO'dan daha uzun süreli olmaması "İnflamatuvar Barsak Hastalıklarının" ayırıcı tanısında avantaj oluşturmaktadır. Ay-

rica, MoAb'lerin, granülosit fonksiyonlarını hiçbir şekilde etkilemediği ve herhangi bir sitotoksik etkilerinin de olmadığı bildirilmiştir (20).

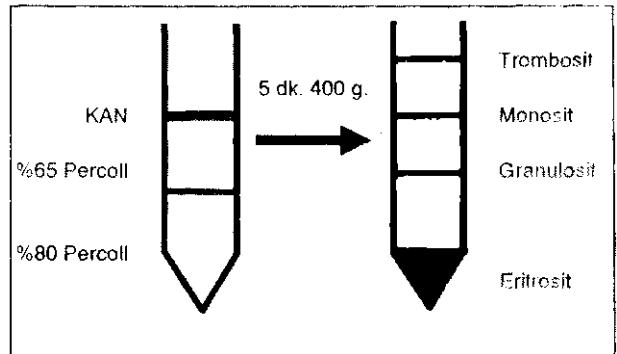
Hücre Separasyonu

Nonselektif ajanların herhangi biri tüm kana eklenecek olursa eritrosit sayısının fazlalığı nedeniyle büyük kısmı eritrositlere bağlanacaktır. Bu yüzden ilgili hücrelerin öncelikle tüm kandan izole edilmeleri gerekmektedir. Enfeksiyon görüntülemesinde ideal olan pür granülositlerin izolasyonudur. Konvansiyonel santrifüj yöntemleriyle pür granülosit izolasyonu mümkün olmamaktadır. Mikst lökositlerin ayırımı daha kolay ve daha az vakit alıcı olduğundan, rutinde genellikle mikst lökositlerin izolasyonu yapılmaktadır. Pür granülositlerin separasyonu ise, dansite gradient ortamı olan "Percoll" ile mümkün olmaktadır. Bu amaçla, Percoll solüsyonu, %65 ve %80'lik olmak üzere iki farklı konsantrasyonda hazırlanır ve üst kısma tüm kan koyularak 400 g'de 5 dk santrifüje edilir (21). Şekil 1'de görüldüğü gibi, ilgili hücre grubu izole edilerek direkt hücre işaretleme yapılabilmektedir. Bununla birlikte bu yöntem zaman alıcı olması ve tecrübe gerektirmesi nedeniyle rutinde kullanılmamaktadır.

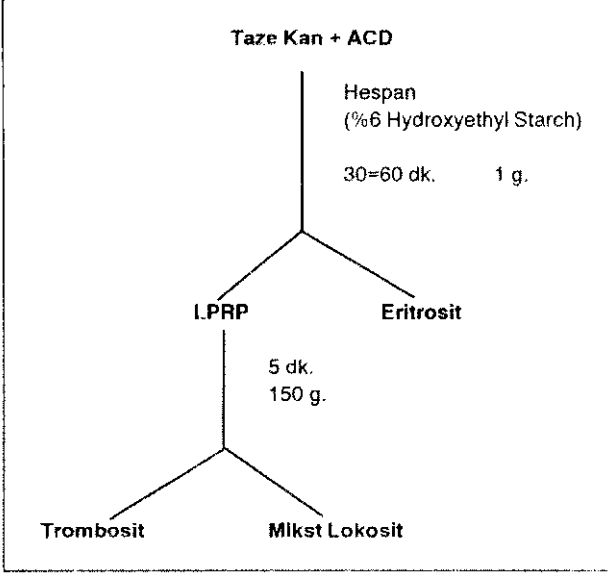
Genel olarak hücre işaretleme ve separasyonunda kullanılan tekniklerin şu özellikleri olması gerekir (22).

- 1) Yüksek işaretleme etkinliği
- 2) Kullanılan radyonüklidin amaca ve tekniğe uygun olması
- 3) Hücre canlılığının korunması
- 4) Hücre fonksiyonlarının korunması
- 5) Toksik etkisinin olmaması
- 6) Steril koşullarda uygulanması

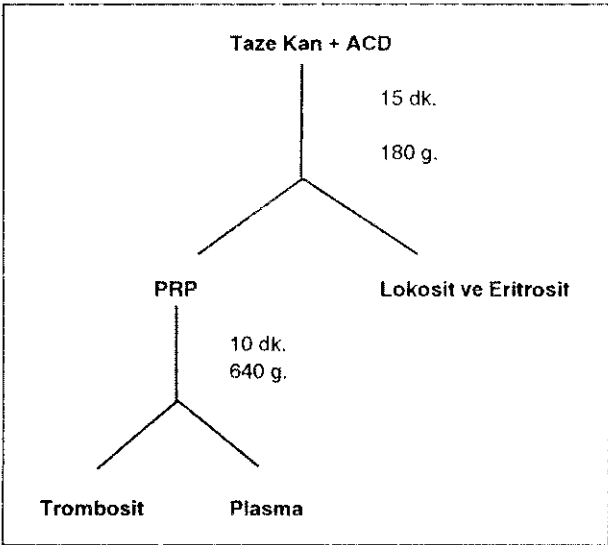
Konvansiyonel santrifügasyonla, lökositlerin separasyonu Şekil 2'de görülmektedir. Asit Sitrat Dekstroz (ACD) ile antikoagüle edilmiş taze kan, %6 Hespan (Hydroxyethyl starch) eklendikten sonra 30-60 dk 1g 'de bekletilir. Bu süre sonunda elde edilen Lökosit ve Trombosit'ten Zengin Plasma (LPRP) 5 dk 150 g'de santrifüje edildikten sonra dipte mikst lökositler elde edilir (23).



Şekil 1. Percoll solüsyonu ile granülosit separasyonu.



Şekil 2. Mikst lökosit separasyonu.



Şekil 3. Trombosit separasyonu

Trombosit separasyonunda, "ACD" ile antikoagüle edilmiş taze kan, 15 dk 180 g'de santrifüje edilir, yüzeyde kalan "Trombositten Zengin Plasma" (PRP) tekrar 10 dk 640 g'de santrifüje edildikten sonra dipte trombositler elde edilir (24). (Şekil 3).

Hücre separasyon işlemi sırasında hücre canlılığı olumsuz yönde etkilenebilir. Özellikle santrifüj ve hücrelerin bir ortamdan başka bir ortama alınması, hücre canlılığına zarar verebilmektedir. Bu açıdan hücre canlılığının işaretlemeye önce kontrol edilmesi gereklidir, invitro lökosit canlılığının kontrolünde en sık kullanılan ajan "Trypan Blue"dur (11).

T Klin Tıp Bilimleri 1992, 12

Hücre İşaretleme

Tüm kandan ilgili hücrelerin separe edilmesinden sonra radyonüklidlerle bağlanması, hücre işaretleme safhasını oluşturur. Bu işlemin kalite kontrolünde kullanılan metod işaretleme etkinliğinin hesaplanmasıdır. İşaretleme etkinliği, hücrelere bağlanan radyoaktifitenin, total radyoaktifiteye oranıdır. Bu etkinliği etkileyen invitro faktörler aşağıda sıralanmıştır.

1) Lipofilik Ajan Konsantrasyonu ve İşaretleme Ortamı: In-111'e bağlı ligandlarda, genelde üç molekül ligand bir In-111 atomunu bağlama yeteneğindedir. Etkin bir işaretlemeye kullanılan ligand konsantrasyonu önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalar ligand konsantrasyonunun, In-111 konsantrasyonundan 10^2 - 10^5 kere daha fazla olması gerektiğini göstermiştir. Bunun yanısıra işaretleme ortamı da işaretleme etkinliğinde önemli rol oynar (11,25). Tablo 2'de In-111 ile lökosit işaretlemesinde, işaretleme ortamı ve lipofilik ajan konsantrasyonunun işaretleme etkinliğine etkileri görülmektedir, In-111 kompleksleri ile plazma ortamında yapılan işaretleme özellikle In'un plazma proteinlerine olan afinitesi nedeniyle işaretleme etkinliği diğer ortamlara göre düşük olmaktadır.

Diğer taraftan Tc-99m HMPAO ile plazma ortamında optimal işaretleme etkinliği elde edilebilmektedir (21). Danpure ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada HMPAO konsantrasyonu 20ug/ml'ye kadar artırıldığında işaretlemeye etkinliğinin arttığı ancak daha sonraki konsantrasyonlarda değişmediği saptanmıştır (21).

2) Ortam pH'sı: Gerek In111, gerekse Tc99m HMPAO çalışmalarında, optimal ortam pH'sının 7-7.4 arasında olması gerektiği gösterilmiştir (26,27).

3) Kullanılan Antikoagülan: Primer olarak seçilecek antikoagülan ajan ACD'dir. ACD dışındaki antikoagülan ajanlardan Heparin'in işaretleme etkinliğini düşürdüğü gösterilmiştir (28). Biz de yaptığımız çalışmada, ACD ile elde edilen işaretleme etkinliğinin heparinle elde edilenlerden daha yüksek olduğunu gözledik (29).

4) Ortamdaki Hücre Konsantrasyonu: Ortamdaki ilgili hücre konsantrasyonu arttıkça gerek In111 gerekse Tc99m kompleksleri ile yapılan çalışmalarda işaretleme etkinliğinin arttığı görülmüştür (21).

5) Enkübasyon Zamanı ve Isısı: In111 kompleksleri için 5-10 dk, Tc99m HMPAO için ise 15 dk oda ısısında enkübasyon, optimal işaretleme etkinliğini sağlamaktadır (21).

Nonselektif ajanlarla yapılan mikst lökosit işaretlemeye total aktivitenin hücrelere dağılım yüzdesinin bilinmesi gereklidir.

Bu konuyla ilgili olarak lökosit işaretlemesinde elde edilen sonuçlar Tablo 3'de gösterilmiştir. Optimal koşullarda yapılan Tc99m HMPAO mikst lökosit işaret-

Tablo 2. In-111 lipofilik kompleksleri ile lökosit işaretlemeye ortamının işaretleme etkinliğine etkisi

In-111 kompleksi	ACD-Plazma Ortamı		Hepes-Salin Ortamı	
	*L.K (mol/lit)	**İ.E(%)	LK (mol/lit)	İ.E (%)
Tropolonate	4x10 ¹⁴	54	4x10 ⁵	80
Mere	1x10 ¹⁴	36	4x10 ¹⁴	87
Acetylacetonate	1.85x10 ¹²	8	1.85x10 ¹²	85
Oxine	4x10 ¹⁵	9	4x10 ¹⁵	67

* L.K: Ligant konsantrasyonu

" İ.E: işaretleme etkinliği

Tablo 3. Nonselektif ajanlarla lökosit işaretlemeye ortamının hücrelere dağılım yüzdesi

Ajan	işaretleme Ortamı	Radyoaktivite yüzdesi			
		*T	*MN	*G	*E
In-111 tropolonate	Plazma	5	13	79	3
In-111 acetylacetonate	Hepes-Salin	**33		37	30
Tc-99m HMPA	Plazma	3	17	77	3

* T: Trombosit, MN: Mononükleer hücre, G: Granülosit, E: Eritrosit

** Trombosit ve mononükleer hücre grubundaki aktivite yüzdesi

leme tekniğinde aktivitenin %77'si granülositlerde tutulmaktadır (21).

Bu güne kadar yapılmış olan çalışmalar, invitro hücre işaretleme tekniğinin klinik uygulamalardaki yararlılığını sensitivitesinin yüksek olması ve noninvaziv bir test olması nedeniyle ortaya koymuştur (30,31). Ancak

bu yöntemin zaman alıcı olması ve özel teknik donanımlar gerektirmesi de dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu nedenle, Tc 99m ile işaretlenebilen "Antigranülosit ve Antitrombosit Monoklonal Antikorlar invitro hücre işaretlemeye alternatif olarak gelişen umut verici tekniklerdir.

KAYNAKLAR

- McAfee JG and Thaur ML. Survey of radioactive agents for invitro labelling of phagocytic leucocytes. II Particles. J Nucl Med 1976;17:488-92.
- Staab EV, McCartney WH. Role of gallium in inflammatory disease. Semin Nucl med 1978; 8:219-34.
- Burleson RL, Holman BL. Scintigraphic demonstration of abscess with radioactive gallium labelled leucocytes. Surg Gynecol Obstet 1975; 141:379-82.
- Eckleman W, Richards P, Hauser W, Atkins H. Technetiumlabeled red blood cells. J Nucl Med 1979; 20:22-4.
- Gray SJ, Sterling K. The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. J Clin Invest 1980; 29:218-30.
- Pearson HA. The binding of Cr-51 to hemoglobin 1. Invitro studies. Blood 1963; 35:727-39.
- Thakur ML, Segal AW, Louis L, Welch MJ, Hopkins J, Peters TJ. Indium-111 labeled cellular blood components mechanism of labeling and intracellular location in human neutrophils. J Nucl Med 1977; 18:1021-5.
- Hudson EM, Ramsey RB, Evatt BL. Subcellular localisation of indium-111 in indium-111 labeled platelets. J Labor clin med 1981;97:577-82.
- Peters AM, Danpure HJ, Osman S, Hawker RJ, Henderson BL, Hodgson HJ, Kelly JD, Neirinckx RD, Lavender JP. Preliminary clinical experince with Tc-99m HMPAO for labelling leucocytes and imaging inflammation. Lancet 1986; ii: 945-9.
- McAfee JG, Thakur ML. Survey of radioactive agents for invitro labelling phagocytic leucocytes. I Soluble agents J Nucl Med 17:480-7.
- Haslett C, Guthrie LA, Kopanlak MM, Johnston RB, Henson PM. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. Am J Pathol 1985; 119:101-10.
- Peters AM, Saveryntuttu SH, Reavy HJ, Danpure HJ, Osman S, Lavender JP. Imaging inflammation with In-111 tropolonate labelled leucocytes. J Nucl Med 1983; 24:39-44.
- McAfee JG, Subramanian G, Gagne G, Scheinader RF, Zapf Longo C. Tc-99m HMPAO for leucocyte labelling-experimental comparison with In-111 oxine in dogs. J Nucl Med 1987; 13:353-7.
- Roberts J, Quastel JH. Particle uptake by polymorphonuclear leucocytes and Ehrlich ascites-carcinoma cells. Biochem J 1963; 89:150-60.

15. Peters AM, Lavender JP, Danpure HJ, Osman S, Saverymattu SH. Tc-99m autologous phagocyte labelling: a new imaging technique for inflammatory bowel. *Br Med J* 1986; 293:450-1.
16. Mock BH, English D. Leucocytes labelling with Tc-99m tin colloids. *J Nucl Med* 1987; 28:1471-8.
17. McAfee JG, Subramaian G, Gagne G. Present trends and future trends in leucocyte labelling. In: Thakur ML. Radiolabelled cellular blood elements. Pathophysiology, techniques and scintigraphic applications. New York: Plenum Press, 1985:265-84.
18. Saccavini JC, Bohy J, Bruneau J. Radiolabeling of monoclonal antibodies. *Nucl Bed Biol* 1986; 13:191-4.
19. Bosslet K, Lüben G, Schwarz A. Immunohistochemical localization an molecular charecteristics of three monoclonal antibody-defined epitopes detectable on carcinoembryonic antigen (CEA). *Int J Cancer* 1985; 36:75-84.
20. Lind P, Langsteger W, Kôltringer H, Diami HP, Passl R, Eberi O. Immunoscintigraphy of inflammatory process with a Tc-99m labelled monoclonal antigranulocyte antibody Mab BW 250/183. *J Nucl Med* 1990;31:417-23.
21. Danpure HJ, Osman S, Carrol MJ. The development of a clinical protocol for the radiolabelling of mixed leucocytes with Tc-99m hexamethylpropyleneamineoxime. *Nuc Med Commun* 1988; 9:465-7.
22. McAfee JG, Subramanian G, Gagne G. Technique of leucocyte harvesting and labelling: Problems and perspectives. *Sem Nucl Med* 1984; 14:83-106.
23. Hardeman MR, Fueger GF. Comparative evaluation of separation and labelling methods of migratory blood cells, 1984:369-92.
24. Comin JM, Roca M, Grino M, Paradell C, Caralps C. In-111 oxine autologous labeled platelets in the diagnosis of kidney graft rejection. *Clin Nucl Med* 1983; 8:7-10.
25. Scheffel U, Tsan MF, McIntyre PA. Labelling of human platelets with (In-111) 8-hydroxiquinolone. *J Nucl Med* 1978; 20:524-31.
26. Thakur ML, Barry M. Preparation and evaluation of a new indium-111 agent for efficient labelling of human platelets in plasma. *J Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 1982; 19:1410-2.
27. Dewanjee MK, Rao SA, Didisheim P. In-111 tropolone, a new high affinity platelet label: preparation and evaluation of labelling parameters. *J Nucl Med* 1981; 22:981-7.
28. Danpure HJ, Osman S. The importance of radiolabelling human granulocytes with In-111 tropolonate or In-111 2-mercaptopyridine-N-oxide in plasma containing acidcitrate-dextrose. *B J Rad* 1986; 59:907-10.
29. Güngör F, Karayalçın B, Comin JM, Roca M. İşaretli lökosit sintigrafisinde hücre separasyonuna iki farklı antikoagülan ajanın etkisi. *Ulusal Nükleer Tıp Kongre Kitabı*, 1991:29.
30. Becker W, Fischbach W, Weppler M, Mosl B, Jacoby G, Börner W. Radiolabeled granulocytes in inflammatory bowel disease: diagnostic possibilities and clinical indications. *Nucl Med Commun* 1988; 9:693-701.
31. Roddie ME, Peters AM, Osman S, Danpure HJ, Lavender JP, Neirinckx RD. Osteomyelitis. *Nuc Med Commun* 1988; 9:713-8.