

# ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ РАДИОКОЛЛОИДНЫМ КОМПЛЕКСОМ «<sup>99m</sup>Tc-ТЕХНЕФИТ»

О.Ю. Килина<sup>1,2</sup>, доктор медицинских наук, В.Д. Завадовская<sup>1</sup>, доктор медицинских наук, профессор, М.А. Зоркальцев<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук, В.Д. Удодов<sup>1</sup>, М.А. Замышевская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск,

<sup>2</sup>Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, Абакан

E-mail: radiology@ssmu.ru

*В статье представлены результаты изучения механизмов накопления радиоколлоидного препарата в клетках белой крови. Исследование включало оценку влияния условий взятия крови (диаметр иглы) и условий инкубации (температурный и временной режимы) на жизнеспособность и функциональную активность лейкоцитов. Установлено, что изучаемый коллоидный комплекс «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» накапливается внутриклеточно, предположительно посредством фагоцитоза. Серия выполненных в условиях *in vitro* экспериментов выявила, что оптимальными условиями для сохранения жизнеспособности и функциональной активности клеток является инкубация при 37°C в течение 45–90 мин.*

**Ключевые слова:** коллоидные комплексы, миграция меченых лейкоцитов, воспалительный процесс

## THE STUDY OF FACTORS AFFECTING THE EFFICIENCY OF LABELING LEUKOCYTES WITH RADIOCOLLOID COMPLEX «<sup>99m</sup>Ts-TEKHNEFIT»

O. Yu. Kilina<sup>1,2</sup>, V. D. Zavadovskaya<sup>1</sup>, M. A. Zorkal'tsev<sup>1</sup>, V. D. Udodov<sup>1</sup>, M. A. Zamyshvskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian State Medical University, Tomsk,

<sup>2</sup>Khakassia State University named after Katanov N.F., Abakan

*In the paper there are presented results of the study of the mechanisms of accumulation of the radiocolloid preparation in white blood cells. The study included an assessment of the effect of conditions of blood sampling (the diameter of the needle) and incubation conditions (temperature and time regimes) on the viability and functional activity of leukocytes. The studied colloidal complex «Tekhnefit, <sup>99m</sup>Tc» was established to be accumulated intracellularly, presumably by means of phagocytosis. Series made in the *in vitro* experiments revealed that the incubation at 37°C for 45–90 minutes provides the most optimal conditions for preserving the viability and functional activity of cells*

**Key words:** colloidal complexes, the migration of labeled white blood cells, the inflammatory process

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой современной медицины является совершенствование методов ранней диагностики локальных воспалительных процессов, которые могут быть причиной инвалидизации и жизнеугрожающих осложнений. Один из путей решения данной проблемы – разработка технологий, объединяющих клеточные технологии и технологии ядерной медицины. Примером служит методика, уже признанная «золотым стандартом», – скintiграфия с аутологичными лейкоцитами, меченными <sup>99m</sup>Tc-ГМПАО (гексамителенпропиленаминоксим). Однако эта методика не лишена недостатков, например, ограничений в исследовании органов брюшной полости за счет выведения радиофармпрепарата (РФП) через желчевыведительные пути и кишечник. С учетом высокой потребности клинической

медицины в своевременной диагностике локальных воспалительных процессов поиск новых средств для мечения аутологичных лейкоцитов остается актуальной задачей.

Коллоидный комплекс «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» является отечественным реагентом для соединения с технецием-99m. Это – коллоидный раствор на основе лиофилизированной смеси фитина, двухлористого олова и фосфатов натрия разной степени замещения, размеры частиц которого составляют от 0,1 до 1 мкн. В основном этот РФП применяется при исследовании ретикулоэндотелиальной системы (статическая скintiграфия печени и селезенки, исследование костного мозга). В 2007 г. доказана возможность визуализации локального воспалительного процесса при выполнении скintiграфии с аутологичными лейкоцитами, меченными «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» [1]. Про-

демонстрирована высокая диагностическая эффективность сцинтиграфии с лейкоцитами, меченными указанным радиоколлоидным комплексом, в диагностике хронического остеомиелита и артритов различной этиологии [2, 3]. Механизмы аккумуляции РФП «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» в аутологических лейкоцитах остаются неизученными.

Целью исследования было оценить ключевые механизмы аккумуляции коллоидного комплекса, меченного <sup>99m</sup>Tc, в лейкоцитах, а также его влияние на функциональную активность и жизнеспособность лейкоцитов.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Все этапы работы осуществлялись в условиях *in vitro*. В качестве объекта исследования использовано 50 образцов венозной крови, которую брали у здоровых добровольцев в объеме 20–50 мл. Все участники исследования дали информированное согласие на участие в научном исследовании.

Степень аккумуляции РФП в различных клетках белой крови осуществляли, изучая эффективность мечения клеток (после их разделения в градиенте плотности) по формуле:

$$\text{Эффективность мечения, \%} = \frac{\text{Радиоактивность осадка}}{\text{Радиоактивность осадка} + \text{Радиоактивность супернатанта}}$$

Влияние условий инкубации и взятия крови (длительность инкубации, ее температура, диаметр иглы) на жизнеспособность лейкоцитов изучали путем сравнительной оценки жизнеспособности клеток при различных режимах инкубации и взятия крови. Жизнеспособность *in vitro* оценивали путем визуального контроля (отсутствие сгустков), с помощью микроскопии после окрашивания трипановым синим. Влияние контакта с коллоидным комплексом «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» определяли на основании сравнительного анализа жизнеспособности и функциональной активности лейкоцитов в коллоидном растворе и без него в одинаковых условиях.

Исследование функциональной активности лейкоцитов включало оценку фагоцитоза, активности В-лимфоцитов (определение концентрации иммуноглобулинов – Ig) и активности Т-лимфоцитов (оценка реакции бласттрансформации) иммунологическими методами.

Технология инкубации лейкоцитов с радиоколлоидным комплексом <sup>99m</sup>Tc-Технефит соответствовала авторскому способу [1]. Образец венозной крови (объемом 50 мл) оставляли в шприце для оседания эритроцитов на 45 мин с последующим отделением более тяжелой эритроцитной массы от плазмы и лейкоцитной взвеси. Полученную таким обра-

зом взвесь лейкоцитов в плазме центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин. После отделения лейкоцитов от плазмы к ним добавляют приготовленный заранее РФП <sup>99m</sup>Tc-Технефит. Препарат готов к употреблению после растворения реагента во флакон, с которым в асептических условиях добавляют 5 мл элюата из генератора; <sup>99m</sup>Tc-активность – 20 мКи (при необходимости предварительно разбавляют элюат изотоническим раствором хлорида натрия до требуемой активности). В качестве изменяемых условий инкубации анализировали влияние температуры и времени инкубации. После инкубации лейкоцитную взвесь вновь однократно центрифугируют для очищения от несвязавшегося с клетками крови РФП.

Числовые данные приведены в виде медианы (межквартильный размах). Для проверки статистических гипотез о достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, в случае сравнения 3 и более независимых групп – критерий Фридмана. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Статистический анализ данных осуществляли с помощью пакета Statistica 8.0.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения механизма аккумуляции исследуемого РФП в лейкоцитах (внутриклеточное накопление или встраивание в мембрану) проводили разрушение клеточных структур путем длительного центрифугирования (300 об; 20 мин). Разрушение клеточной структуры подтверждено при микроскопическом исследовании осадка (обнаружены клетки с разрушенной клеточной мембраной). Затем измеряли радиоактивность супернатанта и осадка; при этом было выявлено отсутствие радиоактивности осадка (ядра, клеточные мембраны, крупные органеллы). Таким образом, с высокой вероятностью можно утверждать, что данный препарат накапливается внутриклеточно и при разрушении целостности клеточной мембраны покидает клетку. Предположительный механизм поступления коллоидного препарата внутрь клетки – фагоцитоз. Полученные результаты согласуются с данными литературы о механизмах накопления в лейкоцитах коллоидных частиц меньших размеров – нанокolloидов [5–7]. Предположения о наиболее вероятном механизме накопления препарата путем фагоцитоза подтверждается также литературными данными, свидетельствующими о поглощении путем фагоцитоза преимущественно крупных коллоидных частиц, из которых в значительной степени состоит технефит [5]. Предполагаемый механизм аккумуляции технефита отличает его от наиболее часто используемого за рубежом препарата <sup>99m</sup>Tc-ГМПАО («Ceretes»), который, являясь липофильным комплексом, пенетрирует клеточную мембрану и, таким образом, занимает внутриклеточное положение [4].

Для оценки эффективности мечения лейкоцитов изучаемым РФП после проведения процедуры мечения клеток крови и последующего их центрифугирования осуществляли раздельную дозиметрию супернатанта и осадка. Средняя эффективность мечения лейкоцитов, полученная при оценке результатов исследований, составила 35% (от 31 до 38%).

Для оценки влияния условий взятия крови исследовали жизнеспособность лейкоцитов в зависимости от диаметра иглы. С этой целью у 50 добровольцев брали венозную кровь с использованием игл-бабочек разного диаметра: 16G, 17G, 18G, 19G и 21G (по 10 человек в каждой группе). После выделения лейкоцитов взвесь оценивали качественно (визуально на наличие сгустков), микроскопически (для выявления «теней» клеток – фрагментов разрушенных клеток) с помощью трипанового синего. Наибольшее количество поврежденных лейкоцитов наблюдалось, если кровь брали иглами G16 и G17, о чем свидетельствуют результаты всех тестов на жизнеспособность (табл. 1). Больше всего клеток с сохраненной жизнеспособностью наблюдалось при использовании игл диаметром G19 – 21. Однако технически для взятия крови более удобна игла G19; именно этот размер мы рекомендуем для выполнения методики мечения лейкоцитов.

На следующем этапе работы осуществлялась оценка влияния условий инкубации на жизнеспособность и функциональную активность лейкоцитов. Выполнена серия экспериментов на образцах крови, взятых иглой 19G. В качестве изменяемых условий инкубации анализировали влияние температуры (3 варианта: 25°C – комнатная; 37°C – термостат и 40°C – термостат и продолжительности инкубации 45 мин, 90 мин, 135 мин) в различных вариантах сочетаний перечисленных условий (всего 9 вариантов). Для исключения влияния коллоидного препарата на данном этапе эксперимента инкубация проводилась без добавления коллоида.

Исследование жизнеспособности лейкоцитов показало, что число жизнеспособных клеток от температурных условий инкубации зависит незначительно, но с увеличением времени инкубации до 135 мин оно существенно снижается (табл. 2). Наибольшее число жизнеспособных клеток сохраняется при температуре 37°C и продолжительности инкубации не более 90 мин.

Следующие 2 эксперимента были направлены на оценку функционального состояния лимфоцитов. Влияние на Т-лимфоциты оценивали с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Изменение функциональной активности В-лимфоцитов оценивали, определяя уровень Ig G в супернатанте после постановки РБТЛ. Отмечены некоторое увеличение функциональной активности как В-, так и Т-лимфоцитов при более высокой температуре инкубации и закономерный ее спад при длительной инкубации – 135 мин (табл. 3, 4).

Полученные результаты демонстрируют, что функциональная активность лейкоцитов не снижается в стандартных условиях инкубации (37°C) и повышается по сравнению с нормой при более высокой температуре. Таким образом, суммируя результаты оценки жизнеспособности и функциональной активности лейкоцитов, можно заключить, что оптимальными для инкубации лейкоцитов являются температура 37°C и время инкубации 45–90 мин. В плане сохранения жизнеспособности и функциональной активности возможна инкубация при комнатной температуре. Инкубация при температуре 40°C нецелесообразна, так как это приводит к увеличению числа нежизнеспособных клеток.

На следующем этапе исследования оценивали влияние контакта с коллоидным препаратом на жизнеспособность и функциональную активность лейкоцитов. Для этого в оптимальных условиях, опи-

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЗЯТИЯ КРОВИ (ДИАМЕТР ИГЛЫ) НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ**

| Диаметр иглы | Число проб |                                       |                                    | Неокрашенные лейкоциты, % |
|--------------|------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
|              | всего      | с определяемыми визуальными сгустками | с определяемыми фрагментами клеток |                           |
| G16          | 10         | 2                                     | 3                                  | 85 (82–87)                |
| G17          | 10         | 1                                     | 1                                  | 84 (81–88)                |
| G18          | 10         | 0                                     | 1                                  | 85 (81–91)                |
| G19          | 10         | 0                                     | 0                                  | 94 (85–97)                |
| G21          | 10         | 0                                     | 0                                  | 93 (84–96)                |

*Примечание.* В скобках – пределы колебаний.

Таблица 2

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ (МЕДИАНА, %)**

| Продолжительность, мин | Температура, °C |            |            | p     |
|------------------------|-----------------|------------|------------|-------|
|                        | 25              | 37         | 40         |       |
| 45                     | 93 (88–96)      | 97 (91–98) | 85 (80–89) | 0,048 |
| 90                     | 89 (84–93)      | 90 (86–95) | 81 (75–83) | 0,091 |
| 135                    | 87 (82–90)      | 86 (81–90) | 77 (70–80) | 0,047 |

*Примечание.* В скобках – межквартильный размах (здесь и в табл. 3).

Таблица 3

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ  
НА СИНТЕЗ Ig G (МЕДИАНА, г/л)

| Продолжительность,<br>мин | Температура, °С     |                     |                     | p     |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
|                           | 25                  | 37                  | 40                  |       |
| 45                        | 13,4<br>(11,7–13,9) | 15,4<br>(13,9–15,9) | 16,7<br>(15,1–17,0) | 0,053 |
| 90                        | 14,5<br>(12,8–14,7) | 15,7<br>(14,3–16,3) | 19,6<br>(17,3–20,1) | 0,049 |
| 135                       | 13,2<br>(11,8–13,7) | 14,9<br>(14,0–15,3) | 14,3<br>(13,9–14,7) | 0,23  |

Таблица 4

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ  
НА ЧИСЛО БЛАСТТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК, %

| Продолжительность,<br>мин | Температура, °С |            |            | p     |
|---------------------------|-----------------|------------|------------|-------|
|                           | 25              | 37         | 40         |       |
| 45                        | 65 (60–69)      | 74 (69–77) | 92 (90–97) | 0,047 |
| 90                        | 68 (61–72)      | 76 (72–78) | 86 (81–90) | 0,045 |
| 135                       | 71 (68–76)      | 78 (70–81) | 80 (76–85) | 0,056 |

Таблица 5

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ИНКУБАЦИИ ПРИ 37°С В ТЕЧЕНИЕ 45 МИН

| Показатель  | Инкубация<br>с коллоидным<br>комплексом (n=12) | Инкубация<br>без коллоидного<br>комплекса (n=15) | p     |
|---|--|--|-------|
| Число жизнеспособных<br>клеток при окрашивании<br>трипановым синим, % | 97 (91–99)                                     | 97 (91–98)                                       | 0,65  |
| Уровень Ig G, г/л   | 19,1 (17,5–19,4)                               | 15,4 (13,9–15,9)                                 | 0,041 |
| Число бласттранс-<br>формированных клеток, %                          | 92 (88–96)                                     | 74 (69–77)                                       | 0,042 |

санных выше, проводили инкубацию лейкоцитов с коллоидным препаратом. Всего таким образом было исследовано 15 образцов крови. При этом данные, полученные на предыдущем этапе, использовались для сравнения (табл. 5).

течение 45–90 мин. В указанных условиях происходит повышение показателей функциональной активности лейкоцитов. Доказано, что контакт коллоидного препарата не влияет на жизнеспособность лейкоцитов.

Нами установлено отсутствие статистически значимых различий в количестве жизнеспособных лейкоцитов при контакте с коллоидом, что свидетельствует об отсутствии влияния такого контакта на жизнеспособность лейкоцитов, подвергающихся процедуре мечення. В то же время контакт с коллоидным препаратом вызвал статистически значимое повышение показателей, характеризующих функциональную активность В- и Т-лимфоцитов.

Таким образом, контакт лейкоцитов с исследуемым коллоидным препаратом не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность и функциональную активность клеток. Выявленное повышение функциональной активности лимфоцитов может быть связано с их активацией при фагоцитировании коллоидных частиц.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что коллоидный препарат «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» аккумулируется внутриклеточно. На основании изучения условий взятия крови и инкубации выделенных лейкоцитов сформулированы требования, необходимые для эффективного мечення лейкоцитов коллоидным комплексом «<sup>99m</sup>Tc-Технефит»: кровь берут иглой диаметром не менее 19G, инкубация осуществляется при температуре 37°С в

## ЛИТЕРАТУРА

1. Завадовская В.Д., Килина О.Ю., Дамбаев Г.Ц., Куражов А.П., Зоркальцев М.А. Средство и способ диагностики гнойно-воспалительных процессов // Патент № 2290952 от 10 января 2007 г.
2. Завадовская В.Д., Килина О.Ю., Дамбаев Г.Ц., Куражов А.П. Радионуклидные методы исследования в диагностике хронического остеомиелита // Медицинская радиология и радиационная безопасность: Научный журнал. – 2007; 52 (3): 54–60.
3. Килина О.Ю. Радионуклидная диагностика воспалительных процессов опорно-двигательного аппарата // Автореф. дисс. на соискание уч. ст. д-ра мед. наук. – Томск, 2009. – 36 с.
4. De Vries E., Roca M., Jamar F. et al. Guidelines for the labelling of leucocytes with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. – 2010; 37: 842–8.
5. Kumar V. Radiolabeled white blood cells and direct targeting of micro-organisms for infection imaging // The Quarterly J. of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2005; 4: 325–38.
6. Ruparella P., Szczepura K., Summers Ch. et al. Quantification of neutrophil migration into the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. – 2011; 38: 911–9.
7. Skehan S., White J., Evans J. et al. Mechanism of accumulation of <sup>99m</sup>Tc-sulesomab in inflammation // J. of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine. – 2003; 44 (1): 11–8.