

П. А. Гуревич, А. В. Аболенская, Н. Р. Антипин,
М. А. Богородская

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МАРКИРОВКИ ЭРИТРОЦИТОВ ^{99m}Tc *IN VITRO*

Ключевые слова: маркировка эритроцитов, радиофармацевтические препараты, ^{99m}Tc .

Исследован процесс маркировки эритроцитов ^{99m}Tc *in vitro* с использованием хлорида олова (II) и гипохлорита натрия. Определены оптимальные концентрации используемых реагентов и времена инкубации. Достигнута эффективность маркировки 95 %, которая снижается в течение суток до 87 %. Впервые была предложена методика приготовления рабочего раствора хлорида олова путем растворения соли в 6%-ном растворе лимонной кислоты

Keywords: erythrocytes labeling, radiopharmaceutical, ^{99m}Tc .

The erythrocytes ^{99m}Tc labeling *in vitro* process with stannous chloride (II) and sodium hypochlorite using was studied. Optimal concentrations of the using reagents and the incubation periods were determined. Labeling efficiency of 95 % which decreases within a day to 87 % was reached. The preparation technique of stannous chloride work solution by means of salt dissolution in 6 % citric acid solution was suggested.

Обозначение и аббревиатуры

КТ – (рентгеновская) компьютерная томография;
МРТ – магнитно-резонансная томография;
РХЧ – радиохимическая чистота;
ТСХ – тонкослойная хроматография;
РФП – радиофармацевтический препарат;
ДТПА – диэтилентриаминпентауксусная кислота.

Введение

В настоящее время, наряду с распространенными способами диагностики, такими как компьютерная (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ), все чаще применяются радионуклидные методы. При данных исследованиях радионуклид в соответствующей химической форме вводится пациенту, а распределение радиоактивности в теле определяется наружным детектором излучения [1, 2]. В РФП диагностического назначения радионуклид является информационным носителем, излучение которого, проникающее за пределы организма, регистрируется внешними датчиками. К таким препаратам относятся и меченые изотопом кровяные тельца – эритроциты.

Меченые эритроциты используются в качестве диагностического РФП при поиске скрытых желудочно-кишечных кровотечений, визуализации селезенки, определении жизнеспособности миокарда, обнаружении гемангиом различной локализации [3-5].

На сегодняшний день существует 3 основных способа маркировки эритроцитов радиоактивными изотопами: *in vivo*, *in vitro* и комбинированный метод *in vivo/in vitro*.

Методика *in vivo* [6] позволяет проводить маркировку эритроцитов непосредственно в организме пациента. Для этого за 30-40 мин до введения пертехнетата технеция, пациенту вводят раствор хлорида олова (II). Так как не существует РФП, в состав которого входит только хлорид олова, то обычно выбирается препарат с самым большим его содержанием, чаще всего комплекс с пирофосфатом или ДТПА. После попадания в кровь, ионы олова проникают через клеточную мембрану внутрь эритроцитов и (после введения раствора пертехнетата)

участвуют в восстановлении технеция. Недостаток данной методики заключается в том, что не все ионы олова проникают через мембрану эритроцитов, и оставшаяся в плазме крови часть олова преждевременно восстанавливает пертехнетат. Восстановленный вне эритроцитов технеций может образовывать связи с комплексообразователями (пирофосфат, ДТПА) и с различными компонентами крови. В конечном итоге может измениться биораспределение препарата, что приводит к ошибочным результатам исследования.

Методики *in vitro* лишены такого недостатка. Не проникшее через мембрану эритроцита олово удаляется либо центрифугированием, либо окислением [7]. В качестве окислителя используется раствор гипохлорита натрия. Стоит отметить, что наличие стадий центрифугирования и особенно удаления супернатанта, повышает риск загрязнения биоматериала и нарушения его стерильности.

Метод *in vivo/in vitro* сочетает обе вышеперечисленные методики. Инкубация олова с эритроцитами происходит внутри организма. Затем, перед добавлением пертехнетата отбирается проба крови (около 20 мл), очищается от свободного, находящегося в плазме олова, и дальнейшая маркировка происходит *in vitro*.

На сегодняшний день в России нет препарата, позволяющего производить маркировку эритроцитов ^{99m}Tc с эффективностью выше 90 %. Существующая методика *in vivo* с пирофосфатом натрия позволяет добиться эффективности маркировки не выше 70-75 %.

Целью работы являлась разработка нового клинически удобного метода введения радиоактивной метки в аутоиммунные эритроциты человека *in vitro* для применения в диагностике различных заболеваний, в том числе отработки методики выявления и дифференциации различных форм эндометриоза, а так же разработка композиции для создания лиофилизированного набора к генератору Tc-^{99m} .

1. Экспериментальная часть

1.1. Приборы

2. Генератор $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ тип КСУ-3

3. Дозкалибратор «РИС-А1», (НТЦ «Амплитуда»)
4. Mini-Scan radio-TLC Strip Scanner (Bioscan)
5. Центрифуга медицинская СМ-6м (ELMI LTD Латвия)

1.2 Основные реактивы

1. Хлорид олова (II), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2. Гипохлорит натрия, NaOCl , водный раствор, 3,25 %
3. Лимонная кислота

1.3 Материалы

Хроматографические пластины, Art 5553 (MERCK)

1.4. Методика проведения маркировки

Для приготовления раствора хлорида олова использовали 6%-ный водный раствор лимонной кислоты. Данный выбор обусловлен тем, что лимонная кислота одновременно используется для защиты олова от гидролиза и является антикоагулянтном. Для приготовления раствора хлорида олова в мерную колбу вместимостью 100 мл вносили 0,03 г двухводного хлорида олова (II) и растворяли в 75 мл 6%-ного раствора лимонной кислоты. Для нейтрализации кислоты до pH 5,5-6 использовали 0,5 моль/л раствор карбоната натрия.

Рабочий раствор гипохлорита натрия приготавливали из более концентрированного раствора 3,25 % разбавлением изотоническим раствором хлорида натрия.

Для маркировки эритроцитов в стерильную пробирку вместимостью 20 мл через стерилизационный фильтр 0,22 мкм вносили раствор хлорида олова и 5-6 мл свежей цельной крови пациента. Тщательно перемешивали и инкубировали в течение 15 мин. Затем через стерилизационный фильтр вносили необходимое количество гипохлорита натрия в виде водного раствора, тщательно перемешивали и оставляли на 5 мин. Через 5 мин вносили 20-25 мКи пертехнетата натрия.



Рис. 1 - Схема маркировки эритроцитов

Общее время маркировки составляет около 40 мин, что сопоставимо со временем маркировки аналогичными методиками *in vivo* и *in vitro*. Для оценки эффективности маркировки 1 мл меченой крови помещали в центрифужную пробирку и центрифугировали (150 g) в течение 15 мин. Затем измеряли активности плазмы, эритроцитов и вычисляли эффективность метки по формуле:

$$A = \frac{A_{\text{эритроцитов}}}{A_{\text{плазмы}} + A_{\text{эритроцитов}}}$$

где $A_{\text{плазмы}}$ – активность плазмы, $A_{\text{эритроцитов}}$ – активность пробирки с эритроцитами.

Результаты и обсуждение

Предварительно определили оптимальное для восстановления пертехнетата количество хлорида олова. Для этого была исследована зависимость РХЧ от количества хлорида олова в пробе. В данном эксперименте стадия окисления хлорида олова была опущена.

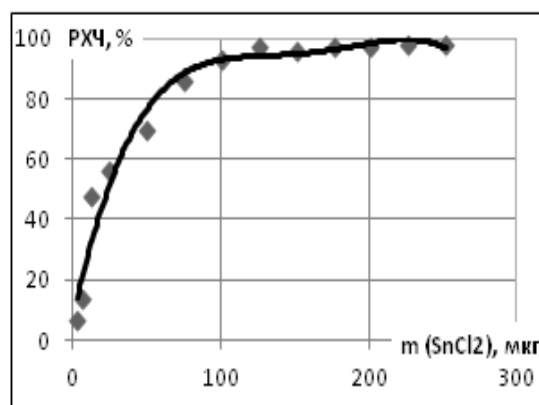


Рис. 2 - Зависимость РХЧ от количества SnCl_2

Для определения концентрации гипохлорита натрия, необходимой для окисления внеклеточного олова, использовались растворы с количеством хлорида олова в пробе 126 мкг и 151 мкг. Количество гипохлорита натрия варьировалось от 0,12 мг до 1,08 мг с шагом 0,12 мг. В результате избыток гипохлорита натрия варьировался от 2,4 до 21 раза для количества олова 126 мкг, и от 2,28 до 20 раз для количества 151 мкг. Результаты представлены в таблице 1 и на рисунке 3.

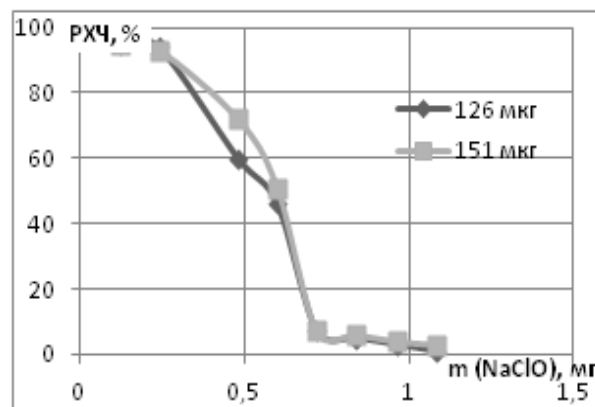


Рис. 3 - Зависимость РХЧ от количества гипохлорита натрия

Из зависимости, представленной на рис. 3, следует, что для окисления олова необходимо более 0,72 мг гипохлорита натрия. Такой вывод можно сделать основываясь на том, что при полном окислении олова РХЧ препарата снижается до нуля, в связи с тем, что Tc-99m не восстанавливается.

Таблица 1 - Определение необходимой концентрации гипохлорита натрия

№	m(SnCl ₂), мкг (мкмоль)	m(NaClO, мг	v(NaClO) мкмоль	РХЧ
1	126 (0,663)	0,12	1,62	98
2		0,24	3,24	95
3		0,48	6,48	72
4		0,6	8,1	46
5		0,72	9,7	7
6		0,84	11,3	5
7		0,96	12,9	3
8		1,08	14,6	1
9	151,2 (0,795)	0,12	1,62	95
10		0,24	3,24	91
11		0,48	6,48	60
12		0,6	8,1	40
13		0,72	9,7	7
14		0,84	11,3	6
15		0,96	12,9	4
16		1,08	14,6	3

Так как РХЧ резко уменьшается с увеличением количества гипохлорита от 0,6 мг до 0,72 мг, то было бы целесообразно тщательно исследовать зависимость в данном интервале. Так как водные растворы гипохлорита натрия разлагаются под воздействием света, то было решено оставить минимальное количество гипохлорита натрия 0,72 мкг. Зависимость РХЧ от количества гипохлорита натрия приблизительно одинакова для обеих проб (126 мкг и 151 мкг SnCl₂). Поэтому для дальнейших экспериментов было решено оставить количество олова в пробе 126 мкг.

Для изучения процесса маркировки мечению подвергались как цельная кровь, так и очищенные эритроциты. Мечение проводилось при двух различных температурах. Температура 37°C использовалась для изучения процесса при температуре внутренней среды организма. Данные представлены на рис. 4,5.

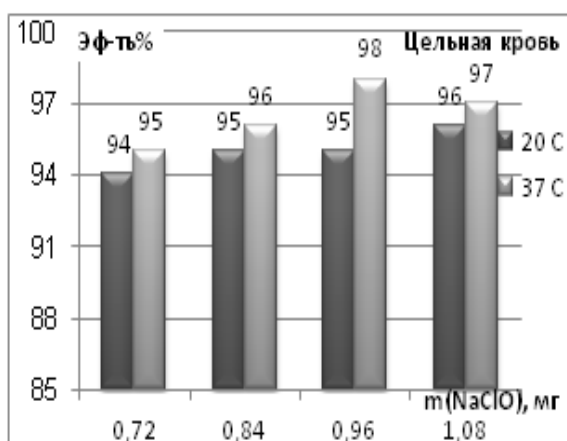


Рис. 4 - Зависимость эффективности маркировки цельной крови от количества NaClO

Из представленной зависимости можно сделать вывод, что с повышением температуры эффективность маркировки увеличивается 1-2 %. С ростом концентрации гипохлорита натрия эффективность также увеличивается на 2-3 %.

При маркировке очищенных эритроцитов (рисунок 4) средняя эффективность маркировки составила 96 %, зависимость от температуры аналогична зависимости для цельной крови.

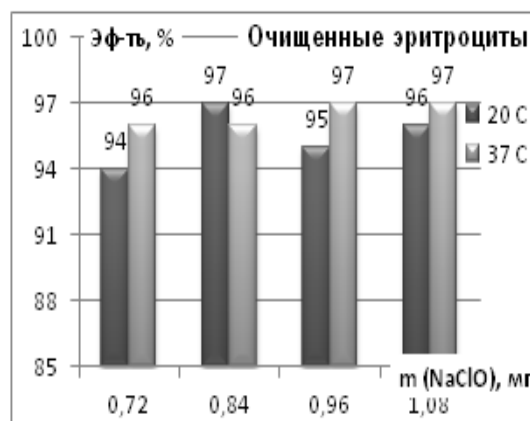


Рис. 5 - Зависимость эффективности маркировки очищенных эритроцитов от количества NaClO

Эффективность маркировки во всех 4 экспериментах была более 95 %, что вполне достаточно для проведения качественных радионуклидных исследований. Для достижения более высокой эффективности приходилось либо проводить маркировку при повышенной температуре, либо маркировать очищенные эритроциты, что увеличивает риск загрязнения биоматериала. В конечном итоге было решено проводить маркировку цельной крови при комнатной температуре, так как увеличение маркировки на 1-2 % не сопоставимо с существующим риском загрязнения крови при инкубации или очистке.

Для оптимизации разработанной методики проводилось изучение эффективности маркировки в зависимости от количества от объема маркируемой крови, от используемой активности, от времени выдерживания с оловом и пертехнетатом.

В итоге времени инкубации крови с различными растворами составили:

- 15 мин – время инкубации с раствором SnCl₂;
- 5 мин – время инкубации с раствором NaClO;
- 15 мин – время инкубации с раствором NaTcO₄.

Общее время, необходимое для проведения эксперимента составляет 40 мин.

Радиоактивная метка в эритроцитах должна сохраняться определенное время, а именно – 6 ч. В течение этого времени проводятся исследования, и в случае необходимости отсроченные исследования. В течение 6 ч эффективность маркировки должна сохраняться на уровне 90 %, чтобы исключить влияние на сцинтиграфическую картину высвободившихся из эритроцитов соединений технеция.

Для оценки устойчивости маркировки, меченную кровь оставляли при температуре 37°C на 1 сут. Для оценки эффективности маркировки кровь отбирали на анализ каждый час в течении 6 ч и за-

тем через 10, 15, 20 и 24 ч. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Устойчивость маркировки в течение суток

Время, ч	РХЧ, %	Эффективность маркировки, %
1	98	96
2	98	95
3	97	95
4	97	95
5	97	94
6	96	94
10	96	93
15	97	91
20	96	90
24	95	87

На протяжении первых 6 ч РХЧ сохраняется на уровне 96-98 %, а эффективность маркировки 94 % и более. В дальнейшем в течение суток РХЧ уменьшается до 95 %, а эффективность маркировки снижается до 87 %.

По результатам работы можно сделать следующие выводы: разработана методика маркировки аутоиммунных эритроцитов человека радиоактивным изотопом Tc-99m с эффективностью более 90 % и РХЧ более 95 %, с устойчивостью метки в течение всего периода полураспада технеция-99m (6 ч). Из чего следует, что данная методика позволяет проводить отсроченные радионуклидные исследования без повторного введения РФП, что снижает дозовую нагрузку на пациента; используемый в работе метод маркировки с окислением свободного

олова существенно снижает риск загрязнения биоматериала, что позволяет проводить процедуру меченія непосредственно в клинике с применением доступного оборудования; применение 4 % лимонной кислоты в качестве комплексообразователя для защиты олова от гидролиза, позволяет отказаться от антикоагулянта, следовательно, после забора крови можно сразу приступить в процедуре маркировки, минуя стадию смешивания биоматериала с антикоагулянтном, что также снижает риск загрязнения и сложность выполнения процедуры.

Литература

1. Гуревич П.А., Билялова Г.А., Богородская М.А. Вестник Казанского технологического университета, 15, 17, 21-25 (2012).
2. Гуревич П.А., Билялова Г.А., Богородская М.А., 16, 1, 22-25 (2013)
3. Ryan P, Styles CB, Chmiel R. Dis Colon Rectum 1992;35:219-22
4. Ennio Polito, MD; Luca Burrioni, MD; Patrizia Pichierri, MD; Antonio Loffredo, MD; Angelo G. Vattimo, MD. Arch Ophthalmol. 1, 123, Dec 2005
5. James R. Corbett, MD, Chair, a Olakunle O. Akinboboye, MD, BS, MPH, MBA, Stephen L. Bacharach, PhD, Jeffrey S. Borer, MD, Elias H. Botvinick, MD, E. Gordon De Puey, MD, Edward P. Ficaro, PhD, Christopher L. Hansen, MD, Milena J. Henzlova, MD, and Serge Van Kriekinge, PhD. Journal of Nuclear Cardiology (2005)
6. S. C. Srivastava, P. Richards, Y. Yonekura, et al. , J. Nucl. Med. 23, 91 (1982)
7. Jae-Kwang Ryu, Kyung-Rae Dong, Woo-Young Jung, Sang-Ki Shin, Shee-Man Cho, Hee-Joung Kim, Chang-Lae Lee, Woon-Kwan Chung, Chang-Bok Kim b, Youn-Sang Ji, Chong-Hwan Choe. Annals of Nuclear Energy 37, 529-533 (2010)

© П. А. Гуревич – д.х.н., профессор каф. органической химии КНИТУ, petr_gurevich@mail.ru; А. В. Аболенская – аспирант каф. ХВЭ и РЭ РХТУ им. Д.И. Менделеева; Н. Р. Антипин – асп. той же кафедры; М. А. Богородская – к.х.н., доц. той же кафедры.