



Radyonüklid İşaretli Kan Hücreleri

Radionuclide Labeled Blood Cells

© Türkan Ertay

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Kan hücreleri radyonüklid ile işaretlenerek çeşitli endikasyonlar için kullanılmaktadır. Nükleer tıpta en yaygın kullanılan radyonüklid işaretli hücreler lökositler ve eritrositlerdir. Bununla birlikte bazı endikasyonlar için platelet işaretleme çalışmaları da sürmektedir. İşaretli otolog lökositler ile sintigrafi enfeksiyon bölgelerini tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Vücuttaki lökositler gibi radyonüklid işaretli lökositlerin de enfeksiyon odağında toplanmasıyla gerçekleştirilen enfeksiyon görüntüleme, Nükleer Tıp tarihinde önemli bir adımdır. Lökosit işaretlemenin kandan izolasyon ve işaretleme aşamaları zaman alıcı ve işlem gerektiren riskli bir süreç olmasından dolayı araştırmacılar *in vivo* olarak lökositleri bağlayan spesifik ajanlar geliştirmeye çalışmaktadır. İndiyum oksin (In-111) ve Teknesyum-99m hekza metil propilen amin oksin (Tc-99m HMPAO) işaretli lökosit sintigrafisi 1970'lerde geliştirildiği halde hala altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir. Radyonüklid işaretli trombosit görüntüleme pıhtı tespiti için, pulmoner emboli, derin ven trombozu ve serebral venöz sinüs trombozu gibi klinik uygulamalara sahiptir. Trombosit işaretleme için birçok radyonüklid tanımlanmış olsa da Tc-99m HMPAO ve In-111 oksin lipofilik radyofarmasötikleri kullanımı yaygındır. Trombosit işaretlemede lökosit işaretlemede olduğu gibi tam kandan trombositlerin ayrılması esasına dayanır, prosedürler literatürde tanımlanmıştır.

Onlarca yıldır tanı radyofarmasötikleri olarak önemli bir rol oynamakta olan radyo işaretli kırmızı kan hücreleri, Cr-51, P-32, In-111, Tc-99m, mIn-113, mIn-114, Ga-66, Ga-67, Ga-68, Fe-52, Fe-55, Co-55, Cu-64, F-18-FDG gibi çeşitli radyonüklidlerle işaretlenmiş ve değişik klinik çalışmalar için kullanılmaktadır. Kullanım amacına göre radyonüklid seçimi enerjisi yarı ömrü, yaydığı radyasyon tipi göz önünde bulundurulur. İşaretli eritrositler için başlıca kullanım alanları; toplam kırmızı kan hücresi hacminin ölçülmesi, kırmızı kan hücresi hayatta kalma süresinin ölçümü, kırmızı kan hücresi yıkım bölgelerinin belirlenmesi, gated kardiyak görüntüleme

Abstract

Blood cells are labeled with radionuclide and used for various indications. The most commonly used radionuclide labeled cells in nuclear medicine are leukocytes and erythrocytes. However, for some indications, platelet marking studies continue. Scintigraphy with labeled autologous leukocytes is a widely used method to detect sites of infection. Infection imaging performed by accumulation of radionuclide-labeled leukocytes at the infection focus, like leukocytes in the body, is an important step in the history of nuclear medicine. Since the isolation and labeling steps of leukocyte labeling from blood is a time-consuming and risky process that requires processing, researchers are trying to develop specific agents that bind leukocytes *in vivo*. Although indium-111 oxine (In-111 oxine) and Technetium-99m hexa methyl propylene amine oxime (Tc-99m HMPAO) labeled leukocyte scintigraphy was developed in the 1970s, it is still considered the gold standard method. Radionuclide-labeled platelet imaging has clinical applications for clot detection, such as pulmonary embolism, deep vein thrombosis, and cerebral venous sinus thrombosis. Although many radionuclides have been described for platelet labeling, the use of lipophilic radiopharmaceuticals Tc-99m HMPAO and In-111 oxine is common. Platelet marking is based on the separation of platelets from whole blood, as in leukocyte marking, procedures have been described in the literature.

Radiolabeled red blood cells, which have been playing an important role as diagnostic radiopharmaceuticals for decades, have been labeled with various radionuclides such as Cr-51, P-32, In-111, Tc-99m, mIn-113, mIn-114, Ga-66, Ga-67, Ga-68, Fe-52, Fe-55, Co-55, Cu-64, F-18-FDG, and used for clinical studies. According to the purpose of use, radionuclide selection, energy half-life, type of radiation emitted are taken into consideration. The main uses for labeled erythrocytes are measurement of total red blood cell volume, measurement of red blood cell survival time, determination of sites of red blood cell destruction, blood pool imaging studies including

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Türkan Ertay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

E-posta: turkan.ertay@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-4206-6836

©Telif Hakkı 2023 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

ve gastrointestinal kanama dahil olmak üzere kan havuzu görüntüleme çalışmaları, hasarlı kırmızı kan hücreleri ile seçici dalak görüntüleme çalışmalarıdır. Kırmızı kan hücrelerini işaretlemek için *in vivo*, *in vitro* ve iki metodun kombinasyonu şeklinde değiştirilmiş *in vivo* yöntem kullanılır. Hücrelerin işaretlenmeden sonra da vücuttaki doğal davranışlarını göstermesi beklenir. İşaretleme sırasındaki koşullar kullanılan maddeler ve miktarları, işlemi yapan personelin eğitimi gibi durumlar işaretleme verimini etkiler. Hücre işaretleme çalışmaları güvenli çevre koşulları, hasta ve personel güvenliği önlemlerini de içerir.

Anahtar Kelimeler: Radyoişaretli, kan hücreleri, trombosit, lökosit, eritrosit

gated cardiac imaging and gastrointestinal bleeding, selective spleen with damaged red blood cells imaging studies. *In vivo*, *in vitro* and a modified *in vivo* method which is a combination of the two methods are used to label red blood cells. Cells are expected to show their natural behavior in the body after marking. Conditions during the marking, the substances used and their quantities, and the training of the personnel who perform the process affect the marking efficiency. Cell labeling studies include safe environmental conditions, patient and personnel safety precautions.

Keywords: Radiolabeled, blood cell, platelet, leukocyte, erythrocyte

Giriş

Radyonüklid işaretli kan hücreleri tanınal Nükleer Tıp alanında önemli bir yere sahiptir. Kan hücrelerinin radyonüklidlerle işaretlenerek tıp alanında kullanılması uzun yıllar öncesine dayanmaktadır. Nobel Ödüllü Macar bilim adamı George de Hevesy 1942'de Fosfor-32 (P-32) işaretli eritrositlerin hastalarda kan hacminin belirlenmesi için kullandığı çalışmasıyla 1943 Nobel Ödülü kazanmıştır. Daha sonra farklı radyonüklidler kullanılarak çalışmalar geliştirilerek günümüze kadar gelmiştir (1,2,3).

Radyonüklidle işaretlenerek en yaygın kullanılan hücreler lökositler ve eritrositlerdir. Bununla birlikte trombosit görüntüleme, pulmoner emboli, derin ven trombozu ve serebral venöz sinüs trombozunda gibi endikasyonlar için platelet işaretleme çalışmaları da sürmektedir. Onlarca yıldır tanı radyofarmasötikleri olarak önemli bir rol oynamakta olan radyoişaretli kırmızı kan hücreleri, Krom-51 (Cr-51), P-32, [İndiyum -111 (In-111)], Teknesyum-99m (Tc-99m), mIn-113, mIn-114, (Ga-66), (Ga-67), Galyum-68 (Ga-68), (Fe-52), (Fe-55), (Co-55), Bakır-64 (Cu-64), Flor-18-FDG (F-18-FDG) gibi çeşitli radyonüklidlerle işaretlenmekte ve değişik klinik çalışmalar için kullanılmaktadır (4,5,6).

İşaretli otolog lökositler ile sintigrafi, enfeksiyon bölgelerini tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. İlk kez 1970'lerin ortalarında, Thakur ve McAfee yağda çözünen molekül In-111 oksin ile nötrofilleri işaretlemiştir. In-111 oksine lökosit sintigrafisi için, seçici olmayan bir işaretleme maddesi olarak tanıtılmasına rağmen In-111 oksine işaretli lökosit enfeksiyon/enflamasyon sintigrafisi alanında başarıyla kullanılmış ve insanda enfeksiyon/enflamasyon tanısında işaretli hücrelerin kullanılmasına öncülük etmiştir (7). Vücuttaki lökositler gibi radyonüklid işaretli lökositlerin

de enfeksiyon odağında toplanmasıyla gerçekleştirilen enfeksiyon görüntüleme, Nükleer Tıp tarihinde önemli bir adımdır. Lökosit işaretleme kandan izolasyon ve işaretleme aşamaları zaman alıcı ve işlem gerektiren riskli bir süreç olmasından dolayı araştırmacılar *in vivo* olarak lökositleri bağlayan spesifik ajanlar geliştirmeye çalışmaktadır. In-111 ve Tc-99m işaretli lökosit sintigrafisi 1970'lerde geliştirildiği halde hala altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir (8).

Trombositlerin radyofarmasötiklerle işaretlenmesi için tam kandan ayrılması literatürde tarif edilmiştir. In-111 oksin platelet işaretleme için kullanılan lipofilik radyofarmasötiklerden biridir, bu amaçla kullanılan diğer bir radyofarmasötik, trombositlere ve beyaz kan hücrelerine girdikten sonra hidrofilik hale gelen ve böylece Tc'yi hücreler içinde tutan lipofilik bir bileşik olan Tc-99m heksametil propilamin oksimidir (HMPAO). Trombositlerin radyonüklidle bağlanması için diğer kan hücrelerinden ve ayrıca plazma proteinlerinden ayrılması gerekir. Radyofarmasötüğün plazma proteinlerine bağlanması, kırmızı kan hücreleri ve lökositler tarafından alınması, trombositlere bağlanma etkinliğini azalttığı gösterilmiştir (9).

Hücrelerin işaretlenmeden sonra da vücuttaki doğal davranışlarını göstermesi beklenir. İşaretleme sırasındaki koşullar kullanılan maddeler ve miktarları, işlemi yapan personelin eğitimi gibi durumlar işaretleme verimini etkiler.

Radyonüklidlerle Lökositlerin İşaretlenme Mekanizması

İndiyum (In), üç mol 8-hidroksikinolin (oksin) ile yüksüz bir psödo-oktahedral N_3O_3 kompleksi oluşturur.

Kompleks, nötr ve yağda çözünür olduğu için özgül olmayan bir kan hücresi işaretleme maddesidir, bu da hücre zarı içinden nüfuz etmesini sağlar. Hücre içinde, In laktoferrin gibi sitoplazmik bileşenlere sıkıca bağlanır. Serbest kalan 8-hidroksikolinolün hücreyi terk eder. Hücreleri In-111 oksin ile işaretleme mekanizmasının In 8-hidroksikolinolinden daha güçlü bir şekilde indiyuma bağlanan hücre altı bileşenler arasında bir değişim reaksiyonu olduğu düşünülmektedir. Yıllar geçtikçe Tc-99m'nin uygun fiziksel özellikleri, bulunabilirliği, maliyeti ve daha düşük radyasyon yükü ile karşılaştırıldığında büyük ölçüde işaretleme ajanı olarak Tc-99m-HMPAO In-111 oksinin yerini almıştır.

Bununla birlikte In-111 oksin işaretli lökosit özgül klinik endikasyonlar için hala kullanımdadır. Bu endikasyonlar; enflamatuvar bağırsak hastalığı, karın içi enfeksiyon, apendiküler iskeletin osteomyeliti, diyabetik ayak, enfekte eklem ve damar protezi, akciğer enfeksiyonları, nörolojik enfeksiyonlar, nedeni bilinmeyen ateş, ameliyat sonrası apseler, endokardittir. Tc-99m-HMPAO işaretli lökosit yüksek bağırsak atılımı olması nedeniyle özellikle abdomendeki enflamatuvar bölgelerin tespiti için In-111 oksin işaretli lökosit daha uygundur. Tc-99m-HMPAO kit preparatları, 1988'den beri ticari olarak temin edilebilmektedir. Hegza metil propilamin oksim (HMPAO) kiti (hem D hem de L izomerlerini içerir) jeneratörden yeni sağlanmış (tercihen elüsyondan sonra 30 dakika içinde) bir Tc-99m-perteknetat eluatı ile oluşturulan lipofilik bir komplekstir.

Sadece lipofilik Tc-99m-HMPAO kompleksi serbestçe lökositin hücre zarını geçer ve daha sonra hücrenin içinde hapsolür. Lipofilik kompleks zamanla sulu çözeltide serbest Tc-99m-perteknetat ve bir hidrofilik Tc-99m-HMPAO haline dönüşür. Bu nedenle lökosit işaretlemesi için sadece taze hazırlanmış Tc-99m-HMPAO kullanılmalıdır.

Tc-99m-HMPAO'nun hücre içinde tutulmasından sorumlu olan iki mekanizma öne sürülmüştür; lipofilik Tc-99m-HMPAO kompleksi glutatyon gibi indirgeyici ajanlarla hidrofilik bir komplekse dönüştürülür ve Tc-99m-HMPAO'nun hücre içinde dağılmayan proteinlere ve hücre organellerine bağlanmasıyla Tc-99m hücre içinde hapsolür. Enjeksiyondan sonra Tc-99m-HMPAO'nun işaretli lökositin ayrılması sonucu hastada gastrointestinal ve idrar yolları radyoaktivite birikimi gibi istenmeyen etkilere neden olur.

Tc-99m-HMPAO işaretli lökosit sintigrafisi için yaygın endikasyonlar; herhangi bir gizli enfeksiyonu ve enfeksiyon lokalizasyon bölgesini tespit etmek ve sürecin boyutunu

belirlemek, apendiküler iskeletin osteomyeliti, enfekte eklem ve damar protezi, diyabetik ayak, nedeni bilinmeyen ateş, ameliyat sonrası apseler, akciğer enfeksiyonları, endokardit, enflamatuvar bağırsak hastalığı, nörolojik enfeksiyonlar için kullanılır. In-111 oksin işaretli lökosit sintigrafisinde, radyofarmasötüğün işaretli hücrelerden daha düşük salınımı nedeniyle gastrointestinal ve idrar yolu aktivitesi daha düşüktür. Bu nedenle enflamatuvar bağırsak hastalığı ve böbrek enfeksiyonları görüntülenmesi için daha uygundur.

Lökosit İşaretleme Sırasında Alınacak Önlemler

İşaretleme prosedürü sırasında hastadan alınan kan ve kan bileşenleri potansiyel olarak patojenlerle enfekte olabileceği dikkate alınması gerekir. İşaretleme yapan operatörün bulaşma riskini önlemek için çalışırken özel dikkat göstermesi gereklidir. Radyonüklid işaretli lökositin hastaya yeniden enjekte edilmesi gerektiğinden işaretleme prosedürü için ciddi aseptik koşullar gereklidir. Sadece steril reaktifler ve tek kullanımlık plastik gereçler kullanılmalı ve steril eldiven, bone ve maske takılmalıdır. Lökositin işaretleme yerel düzenlemelere göre, bir laminer hava akımlı kabinde veya hücre izolatöründe gerçekleştirilir. Olası çapraz kontaminasyonu önlemek için birden fazla hasta lökositinin eşzamanlı olarak işaretleme tavsiye edilmez. Farklı hastalardan alınan lökositin işaretleme, farklı kapalı cihazlar olmadıkça, fiziksel olarak ayrı yerlerde yapılmalıdır.

Her zaman hastanın kanının doğru tanımlanması için güvenceli bir prosedür olmalıdır. Hastanın kan bileşenleriyle temas halinde olan tüm şırıngalar, tüpler ve herhangi bir malzeme, hastanın adı, barkodu ve/veya renk kodu ile açık bir şekilde işaretleme yapılmalıdır. Lökositin Tc-99m-HMPAO ile işaretleme sırasında, lökositlerin hasar görmemesine dikkat edilmelidir, çünkü hasarlanma, radyoaktivitenin hücrelerden sızmasına, işaretli lökositlerin vasküler endotele (özellikle akciğerlerin mikrodamarlarına) yapışmasına ve hareketlilik kaybına neden olur.

İşaretleme hücrelerdeki radyofarmasötüğün bozulmasını ve işaretli hücrelere radyasyon hasarını önlemek için, radyonüklid işaretli lökosit mümkün olan en kısa sürede işaretlemeden en geç 1 saat sonra hastaya geri enjekte edilmelidir.

İşaretleme Lökositlerinin Kalite Kontrolleri

Kalite kontrol için çeşitli yöntemler tarif edilmiştir, ancak bu testlerin çoğu zaman alıcı olduğundan,

bunlardan sadece birkaçı klinik rutinde düzenli olarak kullanılmaktadır. Rutin klinik kullanım için, nihai ürünün görsel muayenesi ve işaretleme etkinliğinin belirlenmesi genellikle yeterli kabul edilir.

Topaklanmanın mikroskopik incelemesi, tripan mavisi canlılık testi ve hastaya uygulandıktan sonrası için sterilite testi, istendiğinde ek kalite kontrolleri olarak kullanılabilir. Erken görüntüde akciğer tutulumu ve karaciğer-dalak aktivite oranı, kalite kontrolü *in vivo* indekslerde en sık kullanılanlardır.

Görsel İnceleme: Prosedürün sonunda işaretli hücreler hastaya uygulanmak üzere enjektöre alınmadan önce, kümelenme dikkatli bir şekilde incelenmelidir. Agregasyon durumunda, numune hafifçe çalkalanarak veya pipetlenerek çözülmelidir. Kümeler çözülmezse, preparasyon enjeksiyon için verilmemelidir.

İşaretleme Etkinliği: Her üretimde santrifüjlemeden sonra işaretleme solüsyonunun süpernatantındaki (çözünür Tc-99m bileşikleri) ve pelletteki (hücreye bağlı Tc-99m) radyoaktivite miktarı ölçülerek işaretleme etkinliği belirlenmelidir. İşaretleme etkinliği, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir:

$\% \text{ İşaretleme Etkinliği} = \frac{\text{Pelletteki radyoaktivite}}{\text{Pelletteki radyoaktivite} + \text{süpernatanttaki aktivite}} \times 100$

İşaretleme etkinliği %40 ile %80 arasında olması beklenir. İşaretleme etkinliği <%40 ise, mikroskopik inceleme ve hücre canlılığı için tripan mavisi dışlama testi gibi daha ileri kalite kontrolleri yapılmalıdır.

Sterilite: Uygulama sonrası sterilite için testler en son Avrupa Farmakopesi'nde açıklanan yöntemlere göre yapılmalıdır. Bu test tercihen bir mikrobiyolog tarafından yapılır, prosedürün doğrulanması için ve yeni personel ve yeni reaktifler dahil olmak üzere teknikte herhangi bir değişiklik yapılması durumunda sterilite testleri yapılmalıdır. Sterilite testleri geçmezse, süreç yeniden valide edilmelidir (10).

Tripan Mavisi Dışlama Testi, Topaklanma ve Hücre Sayımı: 25µL işaretli lökosit hücre süspansiyonuna 25µL su içinde %0,4 tripan mavisi solüsyonu eklenir, bir hemositometreye karışımdan bir damla damlatılır ve mikroskop altında sayım işlemi yapılır. Hücre sayısı ve işaretleme işlemi sırasında hasar görmüş mavi lekeli hücrelerin yüzdesi sayılır. Kontrol olarak, aynı prosedürü işaretlememiş lökositler kullanılarak tekrarlanır. Mavi lekeli hücreler ölü hücreler >%4 içeren bir ürün enjeksiyon için hastaya verilmemeli ve yöntemin validasyonu için yeni testler yapılmalıdır.

Hücre Alt Kümelerinin Sayımı Testi: Test, kırmızı kan hücresi ve trombosit kontaminasyonlarının kabul

edilebilir bir aralıkta olduğunu doğrulamak için ayırma ve işaretleme prosedürü sırasında mevcut olan farklı hücre alt kümelerinin sayımının yapılmasından oluşur. Hematoloji için rutin bir sitoflorimetrede veya bir hemasitometre slaydı kullanarak ve optik mikroskop altında hücreler sayılır. Son hücre süspansiyonda kabul edilebilirlik sınırları eritrosit/lökosit oranı <3 ve trombosit/lökosit oranı <1 olmalıdır.

Tc-99m Hücreden Kaçışının Ölçümü: İşaretlemeden sonra HMPAO, glutasyon gibi ajanlarla indirgenerek hücrelerin içinde esas olarak hidrofilik bir komplekse dönüştürülür ve böylece hücre zarından serbest geçişi engellenir. Hasarlı lökositler, bozulmamış hücrelerden daha fazla ve daha hızlı radyoaktivite salabilir. Tc-99m'nin hücreden çıkışı, işaretleme olmuş lökositlerden üç parça hazırlanarak ve 37 °C'de inkübe edilerek ölçülebilir. Bir saat sonra ve isteğe bağlı olarak 4 saat ve 24 saat sonra, 150 g'de 10 dakika santrifüjlenir ve pellet ve süpernatandaki radyoaktivite ayrı ayrı sayılır. Bir saatte <%10 (yani radyokimyasal saflık >%90) salınım kabul edilebilir (11).

İn Vivo Akciğer Tutulumu: İşaretli lökositlerin erken, geçici akciğer tutulumu normal olabilir. Bununla birlikte, enjeksiyondan 30 dakika sonra alınan akciğer görüntüleri, akciğer aktivitesinin neredeyse tamamen temizlendiğini göstermelidir. Otuz dakika veya sonrasında akciğerlerdeki radyoaktivite odak noktaları, enjeksiyon örneğinde radyoaktif olarak işaretleme olmuş hücre kümelerinin varlığını gösterir. Otuz dakikada yoğun olan ve geç görüntülerde devam eden yaygın akciğer aktivitesi, özellikle bilinen herhangi bir akciğer hastalığı olmayan hastalarda işaretleme prosedürünün bir sonucu olarak hücre hasarının bir göstergesidir.

Yaygın veya fokal akciğer aktivitesi ve/veya işaretli lökositin gecikmiş atılımı bazı hastalık süreçleri ile ilişkili olabileceği akılda tutulmalıdır. Akciğer geçişi kalitatif bir testtir. Şüphe durumunda, karaciğer-dalak oranının kantitatif bir testi gerçekleştirilebilir.

İn Vivo Karaciğer-Dalak Oranı: Normalde, herhangi bir zamanda, dalak aktivitesi karaciğer aktivitesinden daha yüksek olmalıdır. Dalak aktivitesi ile aynı veya daha yüksek bir karaciğer aktivitesi, hücre hasarını gösterir, tarama taniya yardımcı olmayabilir ve görüntü yorumlamaya özel dikkat gösterilmelidir.

Prosedür ve Personel Doğrulaması: Prosedür ve personel doğrulaması, her yeni operatör için klinik çalışmalara başlatmadan önce en az üç kez yapılmalı ve düzenli aralıklarla ve yöntem veya reaktiflerde herhangi bir önemli değişiklik yapıldığında da tekrarlanmalıdır.

İşaretleme etkinliği kontrolü (>%50), sterilite testi (negatif), pirojenite (yok), hücrelerin yaşayabilirliğini (>%98), hücre alt kümesi geri kazanım testini (nihai hücre süspansiyonunda eritrosit/lökosit oranı <3) içermelidir ve işaretlemeden sonraki ilk saat içinde Tc-99m'nin *in vitro* hücreden çıkışının ölçümü (<%10) olmalıdır (12,13).

Eritrositlerin İşaretlenmesi

İşaretli kırmızı kan hücreleri tanı amaçlı radyofarmasötikler olarak uzun yıllardır Nükleer Tıp uygulamalarında önemli rol oynamaktadır. Kırmızı kan hücrelerini işaretlemek için birkaç yöntem kullanılır. *In vivo*, *in vitro* ve iki metodun kombinasyonu şeklinde değiştirilmiş *in vivo* yöntem (yarı *in vivo*) olarak yapılabilir (7,14,15,16). Radyoişaretleme tekniği ve radyonüklid seçimi klinik araştırmanın türüne göre belirlenir. Kullanılan radyonüklidler Cr-51, P-32, Tc-99m, In-111, mIn-113'tür. Tanı amaçlı radyonüklid görüntüleme için radyonüklid uygun gama (γ) ışını yaymalı, yarı ömrü klinik araştırma süresi için uygun olmalı, hücrenin *in vivo* fonksiyonunu ve biyokimyasal özelliklerini değiştirmemeli, radyonüklid çalışma süresince hücreye sıkıca bağlı kalmalıdır (14).

Radyoaktif işaretli kırmızı kan hücrelerinin kullanımı beş ana alanı içerir; toplam kırmızı kan hücresi hacminin ölçülmesi, kırmızı kan hücresi hayatta kalma süresinin ölçümü, kırmızı kan hücresi yıkım bölgelerinin belirlenmesi, gated kardiyak görüntüleme ve gastrointestinal kanama dahil olmak üzere kan havuzu görüntüleme çalışmaları ve hasarlı kırmızı kan hücreleri ile seçici dalak görüntülemesidir. Endikasyona göre kırmızı kan hücrelerinin ve radyonüklidin fiziksel özellikleri, *in vivo* kararlılığı ve işaretleme kolaylığı yapılacak çalışmaya göre farklı önem taşımaktadır. Örneğin; kırmızı kan hücresi hayatta kalma süresinin belirlenmesi, nispeten uzun fiziksel yarı ömre sahip bir radyonüklid gerektirirken (Cr-51, P-32), kardiyak kan havuzu görüntüleme çalışmaları genellikle 1 saat içinde tamamlanır ve kısa yarı ömürlü bir radyonüklid (Tc-99m) gerektirir.

Eritrosit İşaretleme Yöntemleri

Eritrositlerin işaretlenmesinde radyonüklidlerin kullanımı, Nobel Ödüllü George de Hevesy'nin 1942'de hastalarda kan hacminin belirlenmesi için P-32 işaretli eritrositlerin kullanımını tanıttığı çalışmasına kadar uzanır. Bu yöntemde, P-32'nin kırmızı kan hücreleri ile *in vitro* inkübasyonu, eritrosit heksozlarının ve triozların P-32'ye bağlanmasına izin verir.

Sodyum kromat formundaki altı değerli Cr-51'in kırmızı kan hücreleri için uygun bir işaret sağladığı

gösterildiğinden Cr-51, P-32 tekniğinin yerini almıştır ve halen kullanılan bir işaretleme yöntemidir. Bununla birlikte, Cr-51'in 320 elektron volt (keV) γ ışınının abondansının nispeten düşük olması (%9), *in vivo* görüntüleme prosedürleri için uygun değildir, Cr-51 işaretli kırmızı kan hücreleri, kan örneklerinin sayılmasını içeren toplam eritrosit hacminin ölçülmesi ve eritrosit yaşam süresinin ölçülmesi çalışmaları için kullanılmaya devam etmektedir.

Demir-55 ve Demir-59 radyoizotopları, kırmızı kan hücrelerini incelemek için yaygın olarak kullanılmıştır (17). Cıva-197 veya Cıva-203 işaretli bromo cıva hidroksipropan oda sıcaklığında tam kanla inkübe edildiğinde %90-98'i hızla kırmızı kan hücrelerine bağlanır. Hücrelere yeterli konsantrasyonda radyoaktif olmayan cıva hidroksipropan eklendiğinde, hücreler dalak tarafından seçici olarak dolaşımdan çıkarılacak şekilde yer değiştirir. Bu şekilde hasar gören işaretli kırmızı kan hücreleri, seçici dalak taraması için kullanılmıştır. Cıva radyofarmasötikleri artık kullanılmasa da, ısıyla hasarlanmış Tc-99m işaretli kırmızı kan hücreleri selektif dalak görüntüleme için kullanılmaktadır. Rubidyum-81 (Rb-81), uygun bir kırmızı kan hücresi işaretleme radyonüklidi olarak tanımlandı. Rb-81'in ana avantajı, kısa fiziksel yarı ömrü (4,7 saat) ve uygun γ ışını enerjisidir. Ayrıca dalakta kırmızı hücre alımının kantitatif tahmini için yararlı olduğu bildirilmiştir. Karbon-11 işaretli karbon monoksit enjeksiyonundan sonra dalaktaki kırmızı hücre kütlelerinin ölçülmesi için bir yöntem tarif edilmiştir. Kısa fiziksel yarı ömrü nedeniyle (20 dakika), büyük miktarlarda radyonüklid uygulanabilir ve dalak, kırmızı kan hücrelerine zarar vermeden görüntülenebilir. Bu kısa yarı ömürlü radyonüklidin kullanımı için yakınlarda bir siklotronda üretim yapılmalıdır. Pozitron emisyon tomografi (PET) uygulamalarındaki artış, bu yeni tekniğe olan ilgiyi artırabilir (18,19,20).

In-111 yağda çözünen komplekslerinin bulunması, bu radyonüklidin trombositleri ve beyaz kan hücrelerini işaretlemek için kullanılmasının yolunu açmıştır. 2,8 günlük fiziksel yarı ömür ve 174 ve 247 keV'lik uygun γ emisyonları, birkaç gün süren fizyolojik süreçlerin izlenmesi için idealdir. In-111 işaretli kırmızı kan hücreleri, gastrointestinal kanamanın saptanması ve kırmızı kan hücresi sekestrasyon ve hayatta kalma çalışmaları için önerilmiştir. Ga-67 ve Ga-68'in yağda çözünen komplekslerinin, PET'te kırmızı kan hücrelerinin kullanımı gibi özel uygulamalar için daha yaygın yöntemlere alternatif olarak da rapor edilmiştir (21,22,23).

Tc-99m İşaretli Eritrositler

Görüntüleme tekniklerine uygun fiziksel özelliklere ve kırmızı kan hücrelerinin etkin bir şekilde işaretlenmesine izin verecek kimyasal özelliklere sahip bir Tc-99m radyonüklidinin mevcudiyeti, işaretlenmiş kırmızı kan hücrelerinin bir teşhis maddesi olarak kullanılabilirliğini büyük ölçüde artırmıştır. Tc-99m işaretli kırmızı kan hücrelerinin nükleer kardiyolojide bir kan havuzu görüntüleme ajanı olarak kullanımı iyice yaygınlaşmıştır. Bu ajanın klinik etkinliği, öncelikle vücudun kan havuzunda dağılabilmesi ve bu bölme yi yavaş bir hızla terk edebilmesine dayanmaktadır. γ sintilasyon kamerası ile birlikte bu prosedür, bölgesel miyokardiyal duvar hareketi ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu gibi dinamik süreçler hakkında tanısal bilgiler verebilir. Perteknetat iyonu olarak Tc-99m, kırmızı kan hücrelerine sağlam bir şekilde bağlanmaz ve mide, bağırsak ve tiroid bezi gibi organlarda birikerek ekstrasvasküler sıvı bölmesine yayılır. Bu nedenle, Tc-99m'nin hücrelere sıkıca ve kantitatif olarak bağlanması ve bu işaretlemenin *in vivo* olarak gözlem süresi boyunca devam etmesi önemlidir. 1971'de Teknesyum için indirgeyici madde olarak kalay klorür kullanan bir işaretleme yöntemi tanıtıldı ve işaretleme verimliliği %50 ile %60 olarak bildirildi.

Eritrositlerin Tc-99m ile İşaretlenmesinde Genel Adımlar

Mevcut işaretleme yöntemlerinin ayrıntılarına girmeden önce, tüm yöntemlerde ortak oldukları için Teknesyum ile kırmızı kan hücrelerinin işaretlenmesinde yer alan genel adımların tartışılması faydalı olacaktır. İlgili üç genel adım vardır: 1. Eritrositlerin kalay iyonu ile muamelesi, 2. Hücre dışı aşırı kalay iyonunun uzaklaştırılması, 3. Perteknetat ilavesi.

1. Kalay İyonu ile Kırmızı Kan Hücrelerinin Muamelesi: Tc-99m perteknetat (+7) oksidasyon düzeyinde eritrosit zarını geçmesine rağmen, yalnızca daha düşük bir oksidasyon durumuna indirgenmiş Teknesyum hemoglobine sıkıca bağlanır. Teknesyumun indirgenmesi için en yaygın olarak Kalay (Sn) iyonları kullanılır ve kalay klorür (kalaylı bir pirofosfat kompleksi olarak) Sn iyonlarının diğer şelatları da kullanılabilir (örneğin; pentetat, medronat, vb.). *In vivo* ve modifiye *in vivo* yöntemlerde, Sn iyonu ile muamele aşaması Sn pirofosfatın doğrudan intravenöz uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Sn iyonu klorür, florür veya sitrat dahil olmak üzere çeşitli anyonlarla ve glukohptonat, metilen difosfonat veya pirofosfat gibi diğer ligand molekülleri ile bağlı olabilir. İşaretleme verimliliğini

en çok etkileyen Sn iyonunun kimyasal formu değil Sn iyonunun miktarıdır.

Tc-99m kırmızı kan hücreleri işaretlemesi için gereken kalay iyonu miktarı *in vivo* veya değiştirilmiş *in vivo* teknik kullanıldığında 20 mikrogram Sn^{+2}/kg vücut ağırlığı kullanır. *In vitro* radyo işaretleme yöntemi kullanıldığında, çok daha az sayıda kalay iyonu kullanılır. Şu anda mevcut *in vitro* kitler, yaklaşık olarak minimum 25 mikrogram kalay iyonu içerir.

2. Hücre Dışı Kalay İyonlarının Uzaklaştırılması: Serumda Sn iyonunun varlığı, Tc-99m perteknetatın kırmızı kan hücresine girmeden önce istenmeyen şekilde indirgenmesine sebep olabilir. Tc-99m'nin sadece oksitlenmiş formu eritrosit zarı tarafından taşınabilir. Kalaylı pirofosfat enjeksiyonu ile Tc-99m perteknetat uygulaması (*in vivo* yöntem) veya Sn iyonu ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin Tc-99m perteknetat ile inkübasyonu (modifiye edilmiş *in vivo* yöntemde) arasındaki optimal süre 20-30 dakikadır.

Orijinal *in vitro* işaretleme yönteminde, hücre dışı Sn iyonları santrifüjleme ile alınır; bu, Sn ile işlenmiş hücreleri serumdaki hücre dışı Sn iyonundan fiziksel olarak ayıran bir adımdır. Bu *in vitro* işaretlemenin bir modifikasyonu ticari olarak temin edilebilir (Ultra-Tag, Mallinckrodt Medical, Inc.) ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ürün, hücre dışı Sn iyonlarını oksitlemek için hücreye nüfuz etmeyen oksitleyici ajan sodyum hipoklorit kullanır, böylece Tc-99m perteknetatın istenmeyen hücre dışı indirgenmesini önler. Hücre içi Sn iyonları, sodyum hipoklorit ilavesinden etkilenmez, çünkü bu madde kırmızı hücre zarına nüfuz etmez. Santrifüj gerektirmeyen bu kimyasal oksidasyon yöntemi, kırmızı hücrelerin ayrılmasını gerektirmez ve tam kanda gerçekleştirilebilir. Santrifüjlemenin ortadan kaldırılması, radyo işaretleme sırasında oluşabilecek hücre hasarının derecesini azaltmanın yanı sıra zamandan ve emekten de tasarruf sağlar.

3. Tc-99m'nin Eritrositlere İlavesi: Sn iyonları ile ön işleme tabi tutulmuş eritrositlere Tc-99m perteknetatın *in vivo* veya *in vitro* eklenmesiyle gerçekleştirilebilir.

In vivo yöntemde, işaretleme iki ardışık intravenöz enjeksiyonla gerçekleştirilir. Radyoaktif olmayan kalaylı pirofosfatın ilk enjeksiyonunu 20-30 dakika sonra Tc-99m perteknetat içeren ikinci bir enjeksiyon takip eder. *In vivo* yöntem kullanılarak ortalama işaretleme verimliliği için rapor edilen sonuçlar %71-96 arasında geniş ölçüde değişmektedir.

Klinik karşılaştırmalar, *in vitro* yöntemin üstün bir ürünle sonuçlandığını göstermiştir. Tc-99m kırmızı

kan hücrelerinin biyolojik davranışını optimize etme girişiminde, mevcut *in vivo* işaretleme tekniklerinin modifikasyonları geliştirilmiştir. Değiştirilmiş *in vivo* işaretleme yönteminde Tc-99m perteknetatın eritrositlere *in vivo* dahil edilme serbest Tc-99m'nin hücre dışı bölümlere dağılması, tiroid ve mide gibi organlarda lokalize olması nedeniyle standart bir *in vivo* teknik, Tc-99m perteknetatı diğer vücut bölümlerinden izole edecek şekilde modifiye edilmiştir. Reaksiyonun tamamlanması için yeterli süre verilirse, mevcut toplam Tc-99m'nin yaklaşık %90'ı enjeksiyon anında kırmızı kan hücrelerine sıkıca bağlanacaktır. Bu, artmış intravasküler retansiyon ve iyileştirilmiş görüntü kalitesi ile sonuçlanır.

Herhangi bir Sn iyonu kaynağı bu prosedür için uygun olabilse de, flakon başına 1 mg Sn klorür dihidrat eş değerini içeren ürünler en verimli ve uygun olanlardır. Çoklu hasta dozları için yeterli miktarda Sn iyonu içeren ürünler daha ekonomik görünebilir. Bununla birlikte flakonun kullanılmayan kısmında Sn iyonunun oksidasyon olasılığı sonraki hasta kanlarının kötü işaretlenmesine neden olabilir. Bu nedenle, bu yöntemde Sn iyonunun tek dozluk preparatları kullanılmalıdır. Damar içi havuzda hücre dışı Sn iyonu ve pirofosfatın dağılması ve temizlenmesi için yeterli süre bırakılması önemlidir. Değiştirilmiş *in vivo* yöntem için 15 ila 20 dakika optimum görünmektedir.

Kanın antikoagülasyonu, infüzyon setindeki heparin içeren solüsyonla yıkanması ile yapılır. Perteknetat kaynağı, 24 saat önceden sağılmış bir jeneratör ürünü olmalıdır. Bu durum, işaretleme verimliliğini düşüren eluatta bulunabilen Tc-99 miktarını sınırlar. Bu yöntem için standart inkübasyon süresi, oda sıcaklığında 10 dakikadır. Bu yöntem, standart *in vivo* yöntemden biraz daha uzun işaretleme süresi gerektirse de, Tc-99m'nin artan intravasküler tutulması, görüntüleme süresinin kısalmasıyla sonuçlanır ve bu nedenle, prosedür için gerekli olan toplam süre, standart *in vivo* işaretleme yöntemine göre uzatılmaz.

Eritrosit İşaretlemede İlaç Etkileşimi

Kan havuzu görüntülemesi için Tc-99m kırmızı kan hücreleriyle ilaç etkileşimi iki genel kategoride sınıflandırılabilir: Doğrudan farmakolojik etkiyle kardiyak işlevi değiştiren ve denge kan havuzunun yorumlanmasını etkileyen maddeler ve Tc-99m ile kırmızı kan hücrelerini radyoışaretlemeyi inhibe eden veya azaltan maddeler.

Kardiyak fonksiyonda bir değişikliğe neden olan ajanlar şunları içerir: Propranolol gibi beta (β) adrenerejik blokerler, verapamil dahil kalsiyum kanal blokerleri ve

nitratlar, özellikle nitrogliserin. Bu ilaçları alan hastalarda yapılan araştırmalar, koroner arter hastalığının varlığını tespit edemeyebilir veya ciddiyetini doğru bir şekilde yansıtamayabilir.

Etkileşen bu ilaçların hastalardan egzersiz ventrikülografisinden önce kesilmesi önerilmiştir. β bloker ilaçlar için ilacın kesilmesi ile Nükleer Tıp çalışması arasında 48 saat, kalsiyum kanal blokerleri için 48-72 saat, nitratlar için 12 saat önerilmiştir. Doksorubisin, anormal kalp fonksiyonunun teşhisini engelleyebilecek doza bağlı bir kardiyomiyopatiye neden olur. Bununla birlikte, doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteyi izlemek için sıklıkla radyonüklid ventrikülogram yapılır.

Eritrositlerin Tc-99m ile zayıf radyoışaretlenmesi veya Tc-99m'nin işaretli kırmızı kan hücresinden erken ayrışması, eş zamanlı ilaç tedavisinin neden olduğu görüntü kalitesini olumsuz etkileyebilir. Kırmızı kan hücresi işaretleme tekniklerinde kullanılan antikoagülanın sonuçları etkilediği gösterilmiştir.

Kalaylı pirofosfat ve Tc-99m perteknetat, heparin içeren bir venöz kateter yoluyla enjekte edildiğinde, azalan işaretleme ve Tc-99m'nin idrarla atılımının arttığı bildirilmiştir. Kalay iyonu varlığında Tc-99m'nin heparin ile kompleks oluşturacağı ve görüntü kalitesinin düşmesine neden olabileceği bilinmektedir. Hastalarda ve normal gönüllülerde modifiye *in vivo* yöntemde hem heparin hem de asit sitrat dekstrozu (ACD) solüsyonu antikoagülan olarak kullanılmıştır. Bazı gruplar, ACD ile minimal renal mesane aktivitesi ile daha yüksek işaretleme etkinliği ve gelişmiş görüntü kalitesi bildirir. Diğerleri işaretleme etkinliğinin antikoagülan olarak ACD veya heparin seçiminden bağımsız olduğunu göstermiştir.

Son zamanlarda tam kan transfüzyonlarının dolaşımdaki serbest hemoglobin düzeylerinde artışa neden olduğundan eritrositlerin Tc-99m ile işaretlenmesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu mekanizma, transfüzyonların biyolojik dağılımları değiştirmesiyle ilgili bir faktör olabilir. Ayrıca, bazı araştırmacılar, anti kırmızı kan hücresi antikorlarında bir artış bildirmektedir.

İlaçlara ek olarak, kırmızı kan hücrelerinin Tc-99m ile radyoaktif olarak işaretlenmesinde yer alan çeşitli bileşenleri enjekte etmek için kullanılan cihazlar işaretlemeyi olumsuz etkileyebilir. İntravenöz kateterler ve infüzyon setleri Sn iyonlarının bağlanmasına neden olarak uygulanan Sn miktarını optimumun altındaki seviyelere indirebilir, ayrıca Tc-99m aynı venöz yol aracılığıyla uygulanırsa Tc-99m boruya bağlanacaktır.

Kırmızı kan hücrelerinin *in vitro* işaretlenmesi için ticari olarak temin edilebilen kitlerin daha yaygın kullanımıyla birlikte, raporlar, hücre işaretlemesine müdahalenin azaldığını göstermektedir. Optimum koşullar işaretleme reaksiyonunun sağlamlığını artırmış ve fizyolojik ve patofizyolojik faktörleri en aza indirmiştir.

Tc-99m'nin Eritrositleri İşaretleme Mekanizmaları

Tc-99m ile işaretlenmiş kırmızı kan hücrelerinde, radyoaktivitenin çoğunluğunun hemoglobin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Daha ileri araştırmalar, aktivitenin %87'sinin molekülün globin kısmıyla ve %10'unun heme ile bağlandığını göstermiştir. Bu nedenle, düşük değerlik durumundaki Tc-99m'nin (+4), büyük olasılıkla koordine kovalent bağ oluşumu ile β zincirinde bulunan globine en yüksek özgül aktivite ile geri dönüşümsüz olarak bağlandığı sonucuna varılmıştır.

Çeşitli çalışmalar, perteknetatın kırmızı kan hücresine bağlanması sürecinin esasen perteknetatın hücre içine pasif difüzyonla girmesi sonucu gerçekleştiğini göstermiştir. Perteknetat iyonunun kırmızı kan hücresi zarı boyunca bant-3 anyon taşıma sistemi tarafından taşındığı gösterilmiştir. Bu sistem, klorür ve bikarbonatın transmembran konsantrasyonlarının korunmasından sorumludur. Bir indirgeyici maddenin yokluğunda hücre içinde perteknetatı indirgeyecek bir mekanizma olmadığından, perteknetat hücre dışına kolayca taşınır. Tc-99m'nin hemoglobine bağlanması perteknetatın hücre içi indirgenmesinin rolü ile gerçekleşir.

İşaretleme Verimliliğini Etkileyen Faktörler

Tc-99m perteknetatın önceden kalaylanmış kırmızı kan hücrelerine girmesinin sıcaklıktan, hematokrit değeri, uygulanan Sn iyonunun dozu ve plazmanın varlığından önemli ölçüde etkilendiği gösterilmiştir. Sıcaklık; reaksiyon karışımının sıcaklığı ile işaretleme hızı ve kapsamı arasında doğrudan bir ilişki vardır. Sıcaklık verileri, değiştirilmiş *in vivo* yöntemde şırıngaların inkübasyon süresi boyunca yavaşça soğumasına izin vermek yerine 37 °C'de tutulması durumunda daha yüksek işaretleme ve daha kısa inkübasyon sürelerinin elde edilebileceğini göstermektedir. Şırınga sıcaklığının 35 dakika boyunca 49-50 °C'ye yükseltilmesinin, seçici dalak görüntülemesi yapabilmek için kırmızı kan hücrelerine yeterince zarar verdiği gösterilmiştir. Hematokrit; tam kan hematokriti, kırmızı kan hücresi işaretlemesinin hızı ve kapsamı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, bu bireylerin, Tc-99m aktivitesinin ekstrasvasküler

konsantrasyonunda ortaya çıkan artışla birlikte azalan işaretleme etkinliği göstermesi beklenir. Kalay iyon dozu; kalay iyonunun optimum miktarları, birkaç durumda kırmızı kan hücrelerinin yetersiz radyoışaretlenmesiyle sonuçlanan seviyelere düşürülebilir. Salinle sulandırılmış ve *in vivo* işaretleme için hemen kullanılmayan pirofosfat şişelerindeki Sn iyonunun oksidasyonuna neden olur. Sn⁺²'nin katetere bağlanmasıyla sonuçlanan kana yetersiz Sn⁺² verilmesi, *in vivo* veya modifiye edilmiş *in vivo* yöntemler için bir periferik venöz kateter veya tüp yoluyla kalaylı solüsyon enjeksiyonu ve *in vitro* yöntem sırasında erken sodyum hipoklorit eklenmesi, böylece Sn⁺²'nin kırmızı kan hücrelerine girmeden oksitlenmesine neden olur.

Güvenlik Hususları

Rutin olarak hastadan alınan kanın önemli manipülasyonlardan dakikalar veya saatler sonra hastaya yeniden enjekte edilmesi prosedürü hem ürünü işlemleyen operatör hem de ürünü alan hasta için önemli riskler oluşturur.

Kan havuzu görüntüleme ile ilişkili riskler, kırmızı kan hücrelerinin Tc-99m ile işaretlenmesi için seçilen yöntemde de bağlıdır. Otolog kan ürünlerinin güvenli bir şekilde nasıl kullanılacağını tanımlamak için Nükleer Tıp klinikleri ve radyofarmasi tarafından yazılı politikalar ve prosedürler oluşturulmalıdır. Tüm bileşenlerin hasta tanımlama bilgileriyle yeterli şekilde işaretlenmesi ve işaretli hücrelerin hastadan kanı alan aynı kişi tarafından geri enjekte edilmesi gerekliliği en temel unsurlardır. Hem otolog kırmızı hücreler hem de beyaz hücreler kullanıldığında, yaşamı tehdit eden kanla bulaşan hastalıkların Nükleer Tıp personeline bulaştığı bildirilmiştir. Bu ciddi sorunun ortadan kaldırılması amacıyla yeterli koruma önlemlerinin alınmasını sağlamak tüm Nükleer Tıp ve nükleer farmasi personelinin sorumluluğundadır.

Hücre İşaretlemede Dikkat Edilecek Hususlar

Hücre işaretleme laboratuvarları, laboratuvar çalışması ve çevre koşulları açısından güvenli işlemleri içerir. Hastadan alınan kan hücrelerinin işlemde sonra hastaya geri verilmesi hasta, çevre ve işlemi yapan kişi güvenliği açısından laboratuvar koşullarında düzenleme gerektirir. Biyolojik güvenlik uygulamaları, kalite kontrol sistemleri, kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin radyoışaretlenmesi ve klinik kullanımı kılavuz şeklinde belirtilir. İki B düzeyinde laboratuvar en az iki çalışan gerektirir. İşlem yapacak kişiler aseptik hücre işlemleri,

otolog hücrelerin radyoışaretlenmesi, steril çözeltilerin transferi, biyolojik maddelerin kullanımı, biyozararlı maddelerden kişinin korunması, işlemler konusunda ve santrifüj, mikroskop ve hemositometre kullanımıyla ilgili ve sonraki hastayı çapraz enfeksiyondan korumak için ekipmanın ve kullanımda olan yerlerin kapsamlı temizlik prosedürleri konusunda eğitilmiş olması gerekir. Partikül sayısını azaltmak ve çevreyi mikrobiyolojik kirlenmeden korumak için Laminer Hava Akışı (*Laminar Air Flow*) Class II kabini gereklidir. İşlemcinin güvenliği için santrifüj zırhlamış olmalıdır, kan bileşenlerinin dağılmasını önlemek için santrifüj buketleri kapaklı olmalıdır. Santrifüj buketleri %2 glutaraldehit ya da %1 sodyum hipoklorit ile düzenli dezenfekte edilmelidir. Hipokloritten sonra hipoklorit kristallerinden arındırmak için steril su ile yıkanmalıdır. Kabin iç yüzeyleri malzemeler ve donanım her hasta işleminden önce ve sonra geniş spektrumlu antimikrobiyal dezenfektanlarla temizlenmelidir. Yer döşemeleri benzer şekilde temizlenmelidir. Kan ürünleri ile çalışacak kişi Hepatit B'ye karşı aşılanmış olmalıdır. Eldivenle çalışılmalı, işlemden sonra eldiven çıkarıldıktan sonra eller %5 klorhegzidin glukonat ile dezenfekte edilmelidir.

Bir kerede tek bir hasta kanı çalışılmalıdır. Hastaya geri enjeksiyondan önce pıhtı ve topak kontrol edilmelidir. Hücre canlılık testi ve hücre sayısı kontrolü yapılmalıdır. Hastanın kendi kanı olduğu doğrulanıp emin olduktan sonra enjekte edilmelidir. İşaretleme ile birlikte hastanın kayıtları tutulmalıdır. Kullanılmış şırıngalar, iğneler, kanüller ve diğer kesiciler delinmeye dayanıklı kap içinde muhafaza edilmeli ve eğer radyoaktif ise bekletilerek hastanede uygun şekilde atılmalıdır. Temizlik personeli kirliliklerden ve potansiyel tehlikelerden haberdar olmalı ve uygun önlemler alınmalıdır (14,24).

Trombosit İşaretleme

İnsanda trombosit çalışmaları için başarılı bir şekilde kullanılan ilk radyonüklid, kromik klorür ve daha sonra sodyum kromat olarak tanıtılan Cr-51 idi. Cr-51 platelet kinetiğini ölçmek için uzun yıllar kullanıldı. Thakur ve ark. (25) 1976'da İndiyum-111 oksin'i (In-111-oksın) ile işaretlemeyle sadece trombosit kinetiği izlemesinin değil, aynı zamanda anormal trombosit birikim bölgelerinin görüntülenmesinin de mümkün olması avantajı ortaya çıktı. O zamandan sonra In-111-oksın ve diğer komplekslerin (tropolon, asetilaseton, MPO, oksinsülfat) işaretleme için kullanımı büyük ilgi gördü. Plateletlerin işaretleme prosedürleri ve gereklilikler literatürde belirtilmiştir (26,27).

Daha sonra Tc-99m'nin fiziksel özelliklerinden dolayı Tc-99m-HMPAO platelet işaretleme ve görüntüleme çalışmaları için birçok hastalık grubunda kullanılmıştır. Trombosit görüntülemenin özel uygulamaları, pıhtılaşma etiyolojileri olan patolojilerle ilişkili altta yatan vaskülit ve transplant reddi dahil olmak üzere psödötümör serebrinin ayırıcı bir etiyolojisi olarak serebral venöz sinüs trombozunun tespiti için kullanılır.

Trombositlerin ekstraksiyonu, gelişmiş sıralı santrifüjleme, plazma ekstraksiyonu ve süspansiyon gerektirir (28).

Hücre işaretleme yöntemlerindeki güvenlik prosedürleri platelet işaretlemede de yer almaktadır.

Şırıngalar ve tüpler dahil olmak üzere tüm malzeme ve aletlerin sterilliği, İyi Laboratuvar Uygulamaları (*Good Laboratory Practice*) ilkelerine göre kapalı ambalajlarda olmalıdır.

İşaretlemeden sonra ve prosedürün her adımında görünür agregasyonlar, pıhtılar ve fibrin kümeleri açısından incelenmeli, tespit edilirse, süspansiyon hafifçe döndürülerek çözülmelidir. Pıhtı çözüldükten sonra ürün, lökosit işaretleme yönergelerine göre yeniden enjeksiyon için kullanılır. Trombositler ve süpernatant bir doz kalibratöründe sayılarak lökosit işaretleme prosedüründeki aynı yöntem işaretleme etkinliği hesaplanır. İşaretleme etkinliği= (trombosit peleti aktivitesi)/(trombosit peleti+süpernatant aktivitesi) oranı olarak hesaplanır.

Trombositlerin canlılığı, plak üzerindeki yayma ile mikroskop kullanılarak eozin boya dışlama testi ile belirlenir (29,30).

Canlılık yüzdesini hesaplamak için: Canlılık (%) = Canlı hücreler/toplam hücreler (canlı ve ölü hücreler) × 100

Sterilite ve pirojenite testleri, mikrobiyolojik sterilite testleri bakteriler için 30-35 °C'de ve mantarlar için 20-25 °C'de 14 gün boyunca soybean digest ve tiyoglikolat ortamında yapılır. Pirojenite testi *Limulus Amebosit Lizat* (*Limulus Amebosit Lysate*) kiti ve 37 °C'de bir saat inkübe edilir (9,31).

İnsan serumunda *in vitro* stabilite çalışması için işaretleme trombositler normal salin içinde tekrar süspansiyon edilerek ve 37 °C'de bir saat su banyosunda inkübe edildi. Başlangıçtan 1, 2, 4 ve 24 saat sonra on dakika 150 g'de santrifüjlenerek farklı tüplerdeki işaretleme verim oranları hesaplanır ve başlangıçtaki ile karşılaştırılarak zamana karşı değişim izlenir. Trombositlerden 60 dakikalık Tc-99m elüsyonu yaklaşık %8'dir ve en az 240 dakika stabil olduğu gösterilmiştir.

Trombositlerden yüksek elüsyon oranı, renal atılımına ve dolayısıyla önemli oranda böbrek ve mesane aktivitesine yol açar, bağırsak atılımı da sıklıkla gösterilebilir. Taze trombotik lezyonlar genellikle işaretli trombositlerin enjeksiyonundan 4 saat sonra ve bazı hastalarda trombositlerin enjeksiyonundan 1 saat sonra saptanabilir. Tc-99m-HMPAO, trombotik lezyonların görüntülenmesi için kullanılabilir ancak Tc-99m'nin kısa fiziksel yarı ömrü nedeniyle trombosit hayatta kalma çalışmaları için uygun değildir (32,33).

Sonuç

Radyonüklid işaretli kan hücreleri tanısal Nükleer Tıp alanında önemli bir yere sahiptir. Farklı radyonüklidler ve ajanlar kullanılarak çalışmalar geliştirilmeye devam etmektedir. *In vivo* olarak hücreleri bağlayacak birçok ajan ile denemeler yapılmış olsa da bunlar tam kandan hücrelerin izolasyonu ile hücrelerin işaretlenmesinin yerini alamamıştır. Radyonüklidle işaretlenerek en yaygın kullanılan hücreler lökositler ve eritrositlerdir. Bununla birlikte işaretli trombosit görüntüleme, pulmoner emboli, derin ven trombozu ve serebral venöz sinüs trombozunda klinik uygulamalara sahiptir. Tanısal alanda hücreleri işaretlemek için kullanılan birçok radyonüklid olmakla birlikte klinikte kullanım özelliklerine göre yarı ömrü yaydığı ışın türü ve enerjisi önem kazanmaktadır. İşaretli kan hücreleri klinik uygulamalarda önemli bir yere sahip olmasıyla birlikte hücre işaretleme için özel laboratuvar koşulları, teknik donanımlar ve hücre işaretleme konusunda özel eğitilmiş personel gereklidir. Tüm işlemler personeli hastayı ve çevreyi korumak için güvenli çevre koşullarında gerçekleştirilmelidir. Otolog kan ürünlerinin tanısal görüntüleme ajanları olarak kullanılmasında ilgili risklere ve teknik zorluklara rağmen, tanısal avantajlarından dolayı bunlar kliniklerimizde yer almaya devam etmektedir.

Kaynaklar

- Berson SA, Yalow RS. The use of K42 or P32 labeled erythrocytes and I131 tagged human serum albumin in simultaneous blood volume determinations. *J Clin Invest* 1952;31:572-580.
- Klement AW Jr, Ayer DE, McIntyre DR. Simultaneous use of I131-albumin and Cr51-labelled red cells in blood volume studies in the goat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;87:81-85.
- Bolt RJ, Gurney CW. The simultaneous use of chromium labeled erythrocytes and I131 tagged human serum albumin in blood volume determinations. *Med Bull (Ann Arbor)* 1956;22:319-328.
- Rodriguez-Porcel M. In vivo imaging and monitoring of transplanted stem cells: clinical applications. *Curr Cardiol Rep* 2010;12:51-58.
- Wolfs E, Verfaillie CM, Van Laere K, Deroose CM. Radiolabeling strategies for radionuclide imaging of stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 2015;11:254-574.
- Souron JB, Petiet A, Decup F, et al. Pulp cell tracking by radionuclide imaging for dental tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2014;20:188-197.
- Callahan RJ, Bruce AD: Radiolabeling formed elements of blood: methods and mechanisms. In: *Nuclear Medicine*. Henkin RE, Boles MA, Dillehay GL, et al. (Editors) Mosby, St. Louis, MO.
- Ertay T. Infection-Inflammation: SPECT Radiopharmaceuticals for Molecular Imaging. *NTS* 2016;2:63-70.
- Parvizi M, Farzanefer S, Khalaj A, et al. 99mTechnetium-HMPAO-labeled platelet scan in practice: Preparation, quality control, and biodistribution studies. *Braz J Pharm* 2022;1-11.
- European Medicines Agency Science Medicines Health. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/ich-q-4-b-annex-8-annex-6-note-evaluationrecommendation-pharmacopoeial-texts-use-ich-regions_en.pdf.
- Datz FL. Indium-111-labeled leukocytes for the detection of infection: current status. *Semin Nucl Med* 1994;24:92-109.
- de Vries EF, Roca M, Jamar F, Israel O, Signore A. Guidelines for the labelling of leucocytes with (99m)Tc-HMPAO. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:842-848.
- Roca M, de Vries EF, Jamar F, Israel O, Signore A. Guidelines for the labelling of leucocytes with (111)In-oxine. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:835-841.
- Sampson CB, Textbook of Radiopharmacy. Theory and Practice. 3rd ed. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers; 1999. sayfa. 83-104.
- Kowalsky RJ, Perry J.R. Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice, Volume 12. California: Appleton & Lange; 1987. sayfa. 218-400.
- Callahan RJ. Radiolabeled Red Blood Cells: Method and Mechanisms, The University of New Mexico Health Sciences Center College of Pharmacy, 2009; Volume; 12, Lesson 1.
- O'Connell ME, Hows J, Lewis SM. The combined use of iron 52 and its contaminant iron 55 in studies of the bone marrow. *Br J Radiol* 1977;50:419-422.
- Herance JR, Gispert JD, Abad S, et al. Erythrocytes labeled with [(18)F]SFB as an alternative to radioactive CO for quantification of blood volume with PET. *Contrast Media Mol Imaging* 2013;8:375-381.
- Gheysens O, Akurathi V, Chekol R, et al. Preclinical evaluation of carbon-11 and fluorine-18 sulfonamide derivatives for in vivo radiolabeling of erythrocytes. *EJNMMI Res* 2013;3:4.

20. Kearfott KJ. Absorbed dose estimates for positron emission tomography (PET): C15O, 11CO, and CO15O. *J Nucl Med* 1982;23:1031-1037.
21. Werner A, Freesmeyer M, Drescher R. High-Resolution Splenic Imaging: [68Ga]Ga-Oxine Red Blood Cell PET/CT for Differentiation of Splenosis Mimicking Malignant Lymphoma. *Tomography* 2022;8:2915-2918.
22. Freesmeyer M, Gröber S, Greiser J, Seifert P, Günhe F, Drescher R. PET/CT with [68Ga]gallium-oxine-labeled heat-denatured red blood cells for detection of dystopic splenic tissue, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2021;480:644-646.
23. Ertay T, Ünak P. Kan ve Kök Hücrelerin Radyonüklid ile İşaretlenmesi. In: *Uygulamalı Temel Radyofarmasi*. Ünak P, Altun GD, Teksöz S, ve ark. Nobel Tıp Kitabevi; 2017. sayfa. 131-158.
24. Operational Guidance on Hospital Radiopharmacy, A Safe and Effective Approach, IAEA Vienna, 2008.
25. Thakur ML, Welch MJ, Joist JH, Coleman RE. Indium-LLL labeled platelets: studies on preparation and evaluation of in vitro and in vivo functions. *Thromb Res* 1976;9:345-357.
26. Mladeimov E, Granegger S, Hann S, Sinzinger H. Platelet Labeling for Determination of Lifespan. *Turk J Haematol* 2002;19:275-281.
27. AuBuchon JP. Platelet radiolabeling procedure *The Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative* John Wiley & Sons, Ltd 2006; 46, 43S-73S.
28. Becker W, Borst U, Krahe T, Börner W. Tc-99m-HMPAO labelled human platelets: in vitro and in vivo results. *Eur J Nucl Med* 1989;15:296-301.
29. Bruchhausen F, Walter U, Handbook of Experimental Pharmacology. In: *Platelets and Their Factors*. Springer Science & Business Media 2012;126:101-116.
30. de Vries EF, Roca M, Jamar F, Israel O, Signore A. Guidelines for the labelling of leucocytes with (99m)Tc-HMPAO. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:842-848.
31. Tafakhori A, Parvizi M, Farzanefer S, et al Abbasi M. Clinical use of 99mTc-HMPAO-labeled platelets in cerebral sinus thrombosis imaging. *Acta Neurol Belg* 2019;119:549-553.
32. Becker W, Börner W, Borst U. 99Tcm hexamethylpropyleneamineoxime (HMPAO) as a platelet label: evaluation of labelling parameters and first in vivo results. *Nucl Med Commun* 1988;9:831-842.
33. Chevalme YM, Kopp S, Korde A, et al. International Atomic Energy Agency and World Health Organization guideline on good manufacturing practices for radiopharmaceutical products. WHO Technical Report Series 2020; 1025.