

ІМУНОСЦИНТИГРАФІЯ: КЛІНІКО-МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ

О.В. Щербіна, В.О. Мурашко

*Національна медична академія післядипломної освіти
ім. П.Л.Шупика*

Резюме. Розглянуто основи сучасного методу радіонуклідної діагностики – імуносцинтиграфії. Описані: принцип методу, імунорадіофармацевтичні препарати, методика дослідження, оцінка результатів, розрізняльна здатність методу, клінічне застосування. Розглянуті перспективи імуносцинтиграфії пухлин.

Ключові слова: імуносцинтиграфія, пухлини, діагностика, моноклональні антитіла, імунорадіофармацевтичні препарати.

Вступ. В останні роки бурхливо розвивається імуносцинтиграфія – метод радіонуклідної діагностики, який базується на візуалізації пухлин та їх метастазів з використанням в якості радіофармпрепаратів (РФП) моноклональних антитіл, мічених радіонуклідами [1 – 3].

Моноклональними антитілами називаються антитіла, які виробляються одним клоном клітин, котрі походять з однієї материнської клітини. На відміну від поліклональних, моноклональні антитіла мають молекулярну ідентичність та моноспецифічність, тобто взаємодіють тільки з певною антигенною детермінантою. Моноклональні антитіла завдяки своїй унікальній специфічності дають більш високий коефіцієнт зв'язку радіоактивності з пухлиною, ніж з сусідніми тканинами. Це дає можливість візуалізувати пухлину за допомогою сцинтиграфії або однофотонної емісійної комп'ютерної томографії (ОФЕКТ).

Матеріали та методи дослідження. В роботі розглянуто основи сучасного методу радіонуклідної діагностики – імуносцинтиграфії. Описані: принцип методу, імунорадіофармацевтичні препарати, методика дослідження, оцінка результатів, розрізняльна здатність методу. Розглянуті перспективи імуносцинтиграфії пухлин.

Результати дослідження та їх обговорення. Мета методу імуносцинтиграфії – візуалізація злоякісних пухлин та їх метастазів,

диференціальна діагностика з доброякісними пухлинами та непухлинними процесами. Принцип методу полягає в візуалізації пухлин та їх метастазів завдяки специфічній взаємодії мічених радіонуклідами моноклональних антитіл або їх фрагментів з відповідними антигенами пухлинної клітини. Це дає змогу візуалізувати пухлину як осередок гіперфіксації імунорадіофармацевтичного препарату.

Моноклональні антитіла, що їх використовують для імунодетекції, належать до імуноглобулінів класу G. Вони містять 2 важких (H) та 2 легких (L) пептидних ланцюжки, які з'єднані між собою дисульфідними місточками. Внаслідок ферментативного розщеплення утворюються два F(ab) фрагменти (antigen – binding fragment – фрагмент, що зв'язується з антигеном) та Fc-фрагмент. F(ab)-фрагмент містить антигензв'язуючу ділянку молекули, Fc-фрагмент представляє собою залишкову частину молекули, його назва пов'язана зі здатністю до кристалізації. Молекула може розщеплюватись на 2 фрагменти: $F(ab')_2$ та Fc – фрагменти, де $F(ab')_2$ – фрагмент, що еквівалентний двом фрагментам Fab.

Для імуносцинтиграфії перевагу надають не цілим молекулам, а $F(ab')_2$ або Fab фрагментам. Ціла молекула метаболізується в печінці та ретикуло-ендотеліальній системі, тоді як Fab – фрагменти виводяться нирками. Оскільки Fab – фрагменти моновалентні, вони зв'язуються з антигенами слабше, ніж інтактний бівалентний імуноглобулін. У $F(ab')_2$ фрагментів зберігається авидність бівалентного імуноглобуліну за відсутності імуногенності Fc – фрагмента. В разі використання $F(ab')_2$ – фрагментів зв'язок радіоактивності в системі пухлина – фон вищий, ніж за використання цілих молекул. Цілі молекули імуноглобулінів можуть взаємодіяти з Fc – рецепторами клітин людини та призводити до хибнопозитивних результатів, чого не буває в разі застосування фрагментів. Крім того, фрагменти моноклональних антитіл глибше проникають у пухлину, ніж інтактні молекули.

На сьогодні розроблено різноманітні моноклональні антитіла проти всіх пухлиноспецифічних антигенів, які виявляються в сироватці крові методом радіоімунологічного аналізу та багатьох антигенів пухлин різних типів і локалізацій. Якщо раніше використовували головним чином мишачі моноклональні антитіла та їх фрагменти, то останнім часом перевагу надають людським.

Здатність міченого моноклонального антитіла виявляти пухлину залежить не тільки від розміру пухлини, її локалізації, розподілу імунорадіофармацевтичного препарату, але й від самого радіонукліда.

Основними критеріями для вибору методів мічення моноклональних антитіл є:

збереження імунологічної активності білка після мічення;

сприйнятливості молекули до окислення;

задовільна специфічна активність;

кінетика мічення та зв'язок між моноклональним антитілом та радіонуклідами, яка повинна бути стабільною *in vivo*.

У виборі радіонукліда враховують його фізичні характеристики (період напіврозпаду, енергія випромінювання), хімічні реакції, які потрібні для включення радіонукліду в молекулу моноклонального антитіла, а також променеве навантаження на організм пацієнта. Для мітки моноклональних антитіл найчастіше використовують радіонукліди йоду (^{131}I , ^{123}I), ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, та ін. [4, 5].

Основні методи радіойодування моноклональних антитіл – ізотопний обмін та електрофільне заміщення. Перший метод застосовують для з'єднань. Які містять в своїй структурі атом галоїда. Другий, найбільш поширений, використовують для всіх білкових молекул, що містять хоча б одне тирозинове ядро. Процес мічення відбувається в результаті електрофільного заміщення водню йодом в активованій ароматичній молекулі. Якщо не потребується високої специфічної активності, то електрофільне заміщення найпростіший і найнадійніший метод. Проте, для досягнення високої специфічності, необхідно застосовувати інші методи мічення. До них належить метод кон'югації, при проведенні якого радіоактивний йод попередньо включається в молекулу-носії, наприклад, солі діазонію, яка потім ковалентно «зшивається» з моноклональним антитілом. Проведення реакції кон'югації практично повністю виключає неспецифічну взаємодію мічених моноклональних антитіл з антигеном. Проте, при цьому повинне бути витримане оптимальне співвідношення реагентів, порушення якого призводить до втрати імунореактивності моноклональних антитіл.

Недолік моноклональних антитіл, мічених йодом – дегалогенізація молекул, що призводить до високого накопичення вільного йоду в щитовидній залозі та інших органах. Крім того, ^{131}I дає високе променеве

навантаження на організм, через що не можна вводити його у великій кількості. Внаслідок цього неможливо отримати високоякісні сцинтиграми і, особливо, зрізи під час проведення ОФЕКТ. До того, ж в разі використання йоду зменшується імунореактивність молекул моноклональних антитіл. Серед ізотопів йоду найоптимальнішим є ^{123}I , проте із-за високої вартості його застосування обмежене.

З огляду на це збільшився інтерес до мічення молекул моноклональних антитіл атомами металів (^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, та ін.). При технології мічення металами використовують біфункціональні хелати, молекули яких ковалентно зв'язуються з білками, причому зв'язок з металами достатньо міцний. Хелати – хімічні з'єднання, які містять хелатні групи (як правило, поліамінокарбоксільні групи) для зв'язування іонів металів, а також реакційно здатну функціональну групу, яка може реагувати з амінокислотним залишком моноклональних антитіл (ангідрид кислоти, бромацетильна група, іони діазонію та ін.). З хелатів найчастіше використовують ДТПА (діетилентриамінпентаоцтову кислоту). Процедура мічення проводять в дві стадії. На першій стадії проводять модифікацію самого халата (отримання ангідридів, амідів і т. д.). На другій стадії проходить взаємодія модифікованого хелата і моноклонального антитіла з утворенням ковалентного зв'язку. Продукт реакції очищають від домішок за допомогою колонкової хроматографії або іншим способом. Суть радіомічення нуклідами металів полягає в кон'югації халата зі специфічним районом моноклонального антитіла таким чином, що утворений комплекс моноклональне антитіло-хелат зберігає здатність зв'язувати антиген.

Незважаючи на те, що хелатування – простий і зручний метод радіомічення, йому властиві певні недоліки. По-перше, ряд хелатів зв'язуються з молекулами моноклональних антитіл недостатньо міцно. По-друге, якщо до моноклонального антитіла приєднується більше одного хелата, може виникнути зниження біологічної активності із-за перехресного з'єднання молекул антитіл.

Найбільша проблема в разі використання моноклональних антитіл, мічених індієм, – неспецифічна радіоактивність у печінці та нирках. Це робить їх непридатними для діагностики згаданих органів. У разі мічення антитіл технецієм спостерігається часткова втрата імунологічної активності.

З позитронвипромінюючих радіонуклідів для мічення моноклональних антитіл запропоновано ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{124}I . Позитронна емісійна томографія має високу чутливість за рахунок «електронної» колімації.

Одна з проблем, яка виникає в процесі синтезу мічених антитіл, – зниження імуноспецифічності останніх в процесі утворення РФП. Як один з варіантів виходу з цієї ситуації є створення комплексів «антитіло-радіонуклід» *in vivo*. При цьому спочатку внутрішньовенно вводять моноклональні антитіла, з'єднані з авідином або біотином. Після накопичення вказаного комплексу в пухлині хворому вводять радіоактивну мітку, яка, з'єднавшись з авідином або біотином, дозволяє візуалізувати пухлинну тканину, в якій накопичились моноклональні антитіла. Основною перевагою вказаного способу є зниження неспецифічного зв'язування антитіл в поєднанні з отриманням високого співвідношення радіоактивності «пухлина – фон».

У разі використання мічених людських моноклональних антитіл алергічні реакції спостерігаються рідко. Частіше це буває при застосуванні мишачих антитіл. Для оцінки реактивності організму пацієнта на імунорадіофармпрепарат рекомендується внутрішньошкірне введення 10 – 20 мкг антитіла за 48 годин до імуносцинтиграфії. За 1 год до ін'єкції антитіл внутрішньовенно вводять 100 мг преднізолону. Можна також застосовувати антигістамінні препарати.

При застосуванні моноклональних антитіл, мічених йодом, за 3 доби до ін'єкції та на протязі 7 діб після неї проводять блокаду щитоподібної залози (1 мл 5% розчину Люголя 3 рази на добу). Для отримання якісного зображення хворим вводять моноклональні антитіла, мічені ^{131}I (37 – 74 МБк), ^{111}In (185 МБк), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (555 – 1110 МБк).

Візуалізацію пухлин та метастазів проводять на гамма-камерах з клінічними комп'ютерами, однофотонних емісійних комп'ютерних томографах. Тривалість періоду між ін'єкцією препарату та початком візуалізації залежить від фармакодинаміки міченого моноклонального антитіла, від властивостей радіонукліда та від типу пухлини, яку візуалізують.

Обов'язковий компонент дослідження – обробка результатів на клінічному комп'ютері – включає в себе кількісну сцинтиграфію згідно з вибраними зонами інтересу: осередок ураження та симетрична неуражена тканина.

Під час ОФЕКТ проводять збір діагностичної інформації при програмно-керованому русі одного чи кількох детекторів томографа навколо поздовжньої осі тіла пацієнта по круговій, еліптичній чи контурно-адаптованій орбіті. Проекції зображення, одержані за повний оберт детекторної системи, обробляються комп'ютером і за спеціальними алгоритмами проводять реконструкцію аксіальних, коронарних, сагітальних та навкісних зрізів.

Результати імуносцинтиграфії вважаються позитивними, якщо чітко візуалізуються осередок гіперфіксації відповідно до локалізації пухлини. При цьому накопичення в пухлині стосовно здорової тканини становить не менше 140% (накопичення в пухлинах різних гістологічних типів та локалізацій варіює в межах 140 – 1000%). На серіях зрізів при проведенні ОФЕКТ чітко візуалізується пухлина.

При використанні для візуалізації пухлин сучасних гібридних апаратів для проведення променевої діагностики (поєднання рентгенівського комп'ютерного та однофотонного емісійного комп'ютерного томографа або рентгенівського комп'ютерного та позитронного емісійного томографа) на фоні анатомічних структур візуалізуються осередки накопичення радіофармпрепаратів відповідно до локалізації пухлин чи їх метастазів.

Розподіл міченого моноклонального антитіла залежить від васкуляризації пухлини, проникності її судин, неспецифічного зв'язування з тканинами, зв'язування з антигеном (він міститься не тільки в пухлині, але і в інших тканинах), доступності і щільності зв'язуючих сайтів антигену в пухлині. Встановлено пряму залежність між ступенем диференціювання злоякісних пухлин і чутливістю методу. Імунорадіофармацевтичний препарат міцніше зв'язується з живою високодиференційованою пухлинною тканиною, ніж з фокусами некрозу та фіброзу. Пухлина зв'язує невелику частину міченого моноклонального антитіла, більша частина його розпадається з вивільненням радіонукліда. Навіть за низького поглинання пухлиною мічених моноклональних антитіл співвідношення пухлина/неуражена тканина високе, якщо нормальні тканини не зв'язують РФП.

Для успішної візуалізації необхідне високе співвідношення пухлина/фон, особливо для імунодетекції глибокорозташованих пухлин. Висока концентрація в крові мічених моноклональних антитіл після їх введення призводить до низького співвідношення пухлина/фон і перешкоджає отриманню якісного зображення пухлини при проведенні сцинтиграфії. Для зниження концентрації циркулюючих в крові імунорадіофармацевтичних препаратів вводять другі антитіла. Виявлення пухлин можна покращити, використовуючи для імуносцинтиграфії моноклональні антитіла з високою специфічністю та афінністю. Для поліпшення якості зображення та підвищення розрізняльної здатності використовують субтракцію (математичне віднімання) фону пулу крові та інтерстиціальних рідин з використанням введеної в організм референтної субстанції, міченої радіонуклідом, що має іншу енергію випромінювання. Для високоспецифічних моноклональних антитіл, які забезпечують співвідношення пухлина/фон порядку 7:1, віднімання фону не обов'язкове.

Чутливість, специфічність, точність імунодетекції пухлин у багатьох випадках перевищує 90%. При використанні моноклональних антитіл, мічених ^{111}In та $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ці показники дещо нижчі внаслідок головним чином активного неспецифічного захоплення імунорадіофармацевтичних препаратів компонентами ретикуло-ендотеліальної системи. Проте, завдяки більш високому фотонному виходу, при застосуванні цих РФП розрізняльна здатність вища в порівнянні з дослідженнями з застосуванням моноклональних антитіл, мічених ^{131}I . Розрізняльна здатність імуносцинтиграфії – 0,4 – 0,5 см при детекції поверхневих пухлин та 1,5 – 2 см – при детекції глибокорозташованих пухлин. За низьких значень накопичення імунорадіофармацевтичного препарату планарна сцинтиграфія не візуалізує глибокорозташовані пухлини. В цьому разі ОФЕКТ дозволяє візуалізувати глибокорозташовані пухлини розміром 0,8 – 1 см.

Дослідження в галузі радіоімунолокалізації тривають. Вони спрямовані на вирішення наступних завдань:

підвищення чутливості імуносцинтиграфії;

отримання більш пухлиноспецифічних моноклональних антитіл, розробка оптимальних комбінацій радіонуклідів та моноклональних антитіл і найкращих методів з'єднання їх один з одним;

застосування панелі моноклональних антитіл до різних пухлинних маркерів, а також моноклональних антитіл до синтетичних та генно-інженерних антигенів;

кліренс органів та тканин від незв'язаного пухлиною імунорадіофармацевтичного препарату шляхом введення другого, направлено проти даного препарату атитіла;

застосування химерних антитіл, людських моноклональних антитіл та циклічне застосування різних видів антитіл для вирішення проблеми появи у пацієнтів антитіл до повторно введеного імунорадіофармацевтичного препарату;

зниження імуногенності імунорадіофармацевтичних препаратів без зміни імунореактивності моноклональних антитіл [6 – 8].

Висновки

Можна зробити висновок, що імуносцинтиграфія не повністю виправдала покладені на неї надії: повністю вирішити проблему ранньої діагностики злоякісних новоутворень. Існує багато проблем як на етапі виробництва моноклональних антитіл, так і на етапі їх клінічного застосування. До того ж, ці дослідження мають високу вартість, що не дає змоги широко застосовувати їх в клінічній практиці. Потрібні подальші дослідження в галузі імунодетекції пухлин, ефективна комбінація імуносцинтиграфії з іншими сучасними методами променевої діагностики, розробка алгоритмів діагностики.

Література

1. Променева діагностика /За ред. Г.Ю. Коваль. Т.1. – К.: Медицина України, 2009. – 832 с.
2. Променева діагностика /За ред. Г.Ю. Коваль. Т.2. – К.: Медицина України, 2009. – 682 с.
3. Радионуклидная диагностика /Под ред. Ю.Б. Лишманова, В.И. Чернова. – Томск: STT, 2004. – 394 с.
4. Сержанина В.А., Корсакова Л.Н., Миролубова О.Ю., Фадеев Н.П. Способы мечения моноклональных антител различными радионуклидами //Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 1995. – Т. 40, №4. – С. 67 – 72.
5. Ткачева Г.А. Моноклональные антитела как опухолетропные радиофармацевтические препараты для иммунолокализации

злокачественных новообразований // Медицинская радиология. – 1991. – Т. 36, №5. – С. 42 – 49.

6. Nuclear Oncology: diagnosis and therapy /Eds. I. Khalkhaly, J. Maublant, S. Goldsmith. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – 563 p.

7. Textbook of Nuclear Medicine /Ed. M. Wilson. – Philadelphia, New York: Lippincott Raven, 1998. – 631 p.

8. Clinical Nuclear Medicine /Eds. G. Cook, M. Maisey, K. Britton, V. Chengazy. – London: Hodder Arnold, 2006. – 915 p.

Summary. *In a lecture the bases of modern method of nuclear medicine are considered – immunoscintigraphy. Are described: principle of method, immunoradiopharmaceuticals, methods of research, estimation of results, clinical application. The perspective of immunoscintigraphy tumours are considered.*

Keywords: *immunoscintigraphy, tumours, diagnostics, monoclonal antibodies, immunoradiopharmaceutical tracers.*

Резюме. *Рассмотрены основы современного метода радионуклидной диагностики – иммуносцинтиграфии. Описаны: принцип метода, иммунорадиофармацевтические препараты, методика исследования, оценка результатов, разрешающая способность, клиническое применение. Рассмотрены перспективы иммуносцинтиграфии опухолей.*

Ключевые слова: *иммуносцинтиграфия, опухоли, диагностика, моноклональные антитела, иммунорадиофармацевтические препараты.*