

Enfektif hastalarda F-18 FDG ile lökosit işaretlemeye insülinin ve glukagonun bağlanma etkinliği üzerindeki etkisi

The effect of insulin and glucagon on leukocyte labeling with F-18 FDG in patients diagnosed with infection

Tarık Şengöz, Özlem Uluyol, Aziz Gültekin, Olga Yaylalı, Doğançün Yüksel

Gönderilme tarihi:28.07.2019

Kabul tarihi:22.08.2019

Özet

Amaç: Enfeksiyon tanısında F-18 FDG ile lökosit işaretleme yaparak PET/BT cihazında görüntüleme henüz rutin pratiğe girmemekle birlikte üzerinde bir süredir çalışılmaktadır. Ancak F-18 FDG ile lökositlerin bağlanma etkinliği düşük düzeyde kalmaktadır. Biz çalışmamızda, enfeksiyon ön tanılı hastalarda insülin ve glukagon kullanımının F-18 FDG ile lökosit işaretleme üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve yöntem: Enfeksiyon ön tanısı ile başvuran 7 gönüllü çalışmaya dahil edildi. Gönüllülerin açlık kan şekeri 80-120 mg/dl arasında idi. Gönüllülerden alınan 20 ml venöz kandan lökositler izole edildi. Oda ısısında inkübe edilen ve 2 mCi F-18 FDG ile işaretlenen 3 grup oluşturuldu. Grupların birine 10 IU kristalize insülin, ikincisine 0,1 mg glukagon ilave edildi. Son gruba ise herhangi bir şey eklenmedi. Her grup için elde edilen materyal santrifüj edilerek bağlı lökositlerin çökmesi sağlandı. Bağlı olan ve bağlı olmayan komponent aktiviteleri ayrı ayrı ölçülerek total aktivite elde edildi. Bağlı komponent aktivitesi total aktiviteye bölünerek bağlanma yüzdesi hesaplandı. Elde edilen veriler, SPSS 25.0 programıyla analiz edildi. $p < 0,05$ değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi.

Bulgular: F-18 FDG işaretli lökosit bağlanma yüzdeleri insülinli, glukagonlu ve hiç birşey eklenmeyen gruplarda sırasıyla %31,57 ($\pm 5,9$), %30 ($\pm 6,2$) ve %27,57 ($\pm 4,3$) olarak bulundu. Her 3 grubun bağlanma yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı ($p=0,418$).

Sonuç: F-18 FDG ile lökosit işaretleme, enfeksiyon tanısında kullanılması mümkün olan bir yöntem olup, invitro işaretleme esnasında insülin ve glukagon kullanımı bağlanma etkinliğini değiştirmemektedir.

Anahtar Kelimeler: F-18 FDG, insülin, glukagon, lökosit.

Şengöz T, Uluyol Ö, Gültekin A, Yaylalı O, Yüksel D. Enfektif hastalarda F-18 FDG ile lökosit işaretlemeye insülinin ve glukagonun bağlanma etkinliği üzerindeki etkisi. Pam Tıp Derg 2019;12:497-501.

Abstract

Purpose: Although F-18 FDG-labeled leukocyte imaging has not been routinely used in the diagnosis of infection, it has been studied for some time. However, F-18 FDG and leukocyte binding efficiency remains low. In this study, we aimed to determine the effect of insulin and glucagon on leukocyte labeling with F-18 FDG in patients with diagnosis of infection.

Materials and methods: Seven volunteers with a preliminary diagnosis of infection were included in the study. The fasting blood glucose of the volunteers was between 80-120 mg/dl. Leukocytes were isolated from 20 ml venous blood from volunteers. Three groups were formed which were incubated at room temperature and labeled with 2 mCi F-18-FDG. 10 IU crystallized insulin was added to one of the groups and 0.1 mg glucagon was added to the second. Nothing was added to the last group. Total activity was obtained by measuring the bound and non-bound component activities separately. The bound component activity was divided into total activity and the binding percentage was obtained. The data were analyzed with SPSS 25.0 program. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The percentages of F-18 FDG-labeled leukocytes were 31.57% ($\pm 5.9\%$), 30% ($\pm 6.2\%$) and 27.57% ($\pm 4.3\%$), respectively, in the groups with insulin, glucagon and nothing added. No statistically significant difference was found between the percentages of the 3 groups ($p=0.418$).

Conclusion: Leukocyte labeling with F-18 FDG is a method that can be used in the diagnosis of infection. The use of insulin and glucagon during in vitro labeling does not alter binding efficiency.

Tarık Şengöz, Dr. Öğretim Üyesi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: tsengoz@pau.edu.tr (orcid.org/0000-0003-2621-7585) (Sorumlu yazar)

Özlem Uluyol, Arş. Gör. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: ouluyol@pau.edu.tr (orcid.org/0000-0003-4140-619X)

Aziz Gültekin, Dr. Öğretim Üyesi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: agulteakin@pau.edu.tr (orcid.org/0000-0002-0311-8077)

Olga Yaylalı, Prof. Dr. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: oyaylali@pau.edu.tr (orcid.org/0000-0002-4920-865X)

Doğançün Yüksel, Prof. Dr. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: dyuksel@pau.edu.tr (orcid.org/0000-0003-0983-2834)

Key Words: F-18 FDG, insülin, glucagon, leukocyte labeling.

Şengöz T, Uluyol Ö, Gültekin A, Yaylalı O, Yüksel D. The effect of insulin and glucagon on leukocyte labeling with F-18 FDG in patients diagnosed with infection. Pam Med J 2019;12:497-501.

Giriş

Enfeksiyonun varlığını ve lokalizasyonunu belirlemek doğru tedavi seçimi için birincil öneme sahiptir. Nükleer tıp görüntüleme yöntemleri enfeksiyon/enflamasyon tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Teknesyum-99m (Tc-99m) ve Indium-111 (In-111) ile işaretli otolog lökositlerin görüntülenmesi 1976'dan beri günlük pratikte kullanılmaktadır [1]. F-18 florodeoksiglukoz (FDG) pozitron emisyon tomografi (PET) görüntüleme, neoplastik hücrelerdeki artmış glikolitik aktiviteye bağlı olarak kanser tanısı ve takibinde kullanılmaktadır.

Artmış hücresel glikolitik aktiviteye bağlı olarak enflamatuvar hücrelerde de (özellikle nötrofil ve aktive makrofajlar) F-18 FDG uptake görülebilmektedir [2]. Bu durum, F-18 FDG PET/BT'nin enfeksiyon/enflamasyon tanısında kullanılmasına izin vermektedir [3, 4]. Ancak, F-18 FDG uptake sadece enfeksiyon/enflamasyon odağında tutulmayacağından, F-18 FDG PET/BT nonspesifik bir tetkiktir. Enfeksiyon odağının PET-BT ile görüntülenebilmesi için daha spesifik bir ajana ihtiyaç vardır. Bu yüzden, otolog lökositlerin F-18 FDG ile işaretlenmesi fikri ortaya atılmıştır. Osman S ve Danpure HJ [5], F-18 FDG ile otolog lökositleri işaretlemek suretiyle bu alandaki ilk metodu geliştirmişlerdir. Bugüne dek, bu alanda sınırlı sayıda çalışma yapılmış olup, F-18 FDG-işaretli lökosit bağlanma etkinliği %25-97 arasında saptanmıştır [5-8]. Düşük bağlanma yüzdesi ve F-18 FDG'nin kısa yarı ömrü (110 dakika) F-18 FDG ile lökosit işaretleme işleminin temel dezavantajlarıdır. Ayrıca, işaretleme için standart bir yöntem henüz geliştirilememiştir. Tüm sınırlılıklarına rağmen, yüksek uzaysal rezolüsyon, kolay ulaşılabilirlik ve iyi görüntü kalitesi nedeniyle F-18 FDG diğer ajanlara göre üstün olarak görülmektedir.

FDG bir glukoz analogudur. Glukoz transporter reseptörleri (GLUT) glukozun hücre içine girişinde etkin bir rol oynar. Enfeksiyon varlığında, lökosit membranında artmış GLUT reseptör ekspresyonu (özellikle GLUT-1, GLUT-3) görülmektedir [9]. İnsülin, pankreas beta

hücrelerinden salınan bir hormondur. İnsülinin moleküler düzeyde etkisi, GLUT reseptörlerini aktive etmek ve glukozun hücre içine girişini arttırmaktır. Glukagon ise pankreas alfa hücrelerinden salınan ve insülin etkisinin tersine çalışan bir hormondur. Bu yüzden, biz insülinin, bir glukoz analogu olan FDG'nin hücre içine girişine pozitif etkisi olacağını düşündük. Ancak, literatürde glukagonun F-18 FDG ile lökosit işaretleme üzerinde etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Biz çalışmamızda, invitro F-18 FDG ile lökosit işaretleme etkinliği üzerinde insülinin ve glukagonun etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem

Hastalar

Enfeksiyon ön tanısı olan ve lökositozu bulunan 7 hasta çalışmaya alındı (4 erkek, 3 kadın; yaş aralığı 25-55). Hastaların bilinen bir kronik hastalığı yoktu (Diabet, hipertansiyon, vb.). İşlem günü hastaların hepsinin açlık kan şekeri 80-120 mg/dl aralığında ölçüldü. Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı almıştır. Tüm hastalara bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır.

F-18 FDG ile lökosit işaretleme

Çalışma, invitro şartlarda laminer flow içinde steril koşullarda çalışılarak gerçekleştirildi. Tüm işaretleme süreci aynı kişi tarafından yapıldı. Çalışmaya katılan gönüllülerin açlık kan şekeri düzeyleri glukometre ile ölçülerek, belirlenen değer 80-120 mg/dl olanlardan kan alındı. Antikoagülan olarak 3,5 cc Acit-Citrat-Dextrose (ACD) eklenen enjektörlere 20 ml venöz kan alındı. Bu ACD'li kan inkübasyon tüpüne boşaltılıp 5cc HESPAN ilave edildi ve 45-60 dakika inkübe edildi. Böylece kırmızı kan hücrelerinin çökmesi sağlandı. Üstte biriken plazma kısmı steril pipet yardımı ile ayrı bir tüpe alındı. Ayrılan lökosit zengin plazma santrifüje yerleştirildi. Santrifüj işlemi için, Electromac M415P model masaüstü santrifüj kullanıldı. Tüpe ayrılmış olan

lökosit ve trombosit zengin plazma 1380 devirde 10 dakika santrifüj edildi. İşlem sonrası ayrılan süpernatant steril pipetle çekilerek atıldı. Çökeltinin üzerine 4 cc serum fizyolojik (SF) eklenerek pipetle 8-10 defa em-bırak yapıp çökeltinin SF içine dağılması sağlandı ve 1480 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant pipetle ayrıldıktan sonra, dipte lökositlerden zengin pellet oluştu.

SF ile sulandırılan lökosit çözeltisi 2 ayrı tüpe bölündü. İlk tüpe 10 IU insülin (NovoRapid Flexpen-Novo Nordisk-Bagsvaerd, Denmark), ikinci tüpe 0.1 ml glukagon (Glucogen hypokit, Novo Nordisk-Bagsvaerd, Denmark) ilave edildi. Son tüpe herhangi bir şey eklenmedi. Sonrasında, her tüpe 2 mCi F-18 FDG ilave edilerek oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Her üç tüpteki materyal 1650 g devirde 5 dakika santrifüj edildi ve bağlı lökositler izole edildi. Böylece insülin ilavesi sonrası toplam inkübasyon süresi 40 dak. oldu. Santrifüj sonunda oluşan çökelti, F-18 FDG ile bağlı olan lökositler, süpernatant kısmı ise serbest komponent idi. Üstteki serbest komponent enjektör ile çekilerek bağlı komponentten ayrıldı. Bağlı ve serbest komponent aktivitesi, kuyu tipi dozimetre ile ayrı ayrı ölçüldü. Bulunan değerler total aktiviteye bölünerek bağlı ve serbest komponentlerin yüzdeleri hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software-Armonk, NY:IBM Corp.) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama (\pm standart sapma), ortanca (minimum ve maksimum değerler) olarak ifade edilmiştir. Bağımlı grupların karşılaştırmaları için Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Her üç grubu oluşturan hastaların (insülinli, glukagonlu ve hiçbir şey ilave edilmeyen) F-18 FDG-lökosit bağlanma yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

İnsülinli, glukagonlu ve hiçbirşey ilave edilmeyen grupların F-18 FDG-lökosit ortalama bağlanma yüzdesi değerleri sırasıyla %31,57 (\pm 5,9), %30 (\pm 6,2) ve %27,57 (\pm 4,3) olarak hesaplanmıştır. İnsülinli, glukagonlu ve hiçbir şey ilave edilmeyen gruplar arasında F-18 FDG-lökosit bağlanma yüzdeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0,418$) (Tablo 2).

Tartışma

F-18 FDG PET görüntüleme, çoğunlukla neoplastik hücrelerde artan glikolitik aktivite nedeniyle kanser tanısında kullanılmasına

Tablo 1. Her üç grubun F-18 FDG-lökosit bağlanma yüzdeleri.

Hastalar	Bağlanma yüzdeleri		
	İnsülinli (%)	Glukagonlu (%)	Hiçbirşey eklenmeyen (%)
1	26	21	32
2	28	30	34
3	29	30	28
4	29	24	22
5	43	31	23
6	36	40	28
7	30	34	26

Tablo 2. Her üç grubun bağlanma yüzdesi ortalama ve ortanca değerleri.

Grup	Ortalama (\pm SS) (%)	Ortanca (Min-Max) (%)	p değeri
İnsülinli (n=7)	31,57 (\pm 5,9)	29,00 (26-43)	
Glukagonlu (n=7)	30,00 (\pm 6,2)	30,00 (21-40)	
Hiçbirşey eklenmeyen (n=7)	27,57 (\pm 4,3)	28,00 (22-34)	0,418

*SS: Standart Sapma

rağmen, enfekte/enflame dokularda da artan metabolizma ve perfüzyon nedeniyle kullanılmaktadır [10, 11]. Çalışmalar, enfeksiyondan ve enflamasyondan sorumlu hücrelerin (özellikle nötrofiller ve monositler/makrofajlar) yüksek oranda F-18 FDG uptake'ine sahip olduğunu göstermiştir [11]. Bununla birlikte, F-18 FDG PET/BT görüntüleme, spesifik olmayan bir görüntüleme yöntemidir. Enfeksiyon görüntülemesinde, F-18 FDG'den daha spesifik PET radyofarmasötiklerinin geliştirilmesi için yoğun çaba sarf edilmektedir. Bu amaçla, lökositlerin PET ajanları ile işaretlenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, düşük bağlanma yüzdesi ve F-18 FDG'nin kısa yarı ömrü (110 dakika) yöntemin sınırlayıcı özellikleridir. F-18 FDG ile lökosit işaretleme için standardize edilmiş bir teknik yoktur, ancak bağlanma etkinliğini artırıcı yöntemler denenmektedir.

F-18 FDG ile in-vitro lökosit işaretleme işleminde üstesinden gelinmesi gereken birçok zorluk vardır. FDG bir glikoz analogu olduğundan, kan örneğindeki glikoz miktarının işaretlemeyi etkileyeceği düşünülmektedir. Osman S ve Danpure HJ [5], ortamdaki glikoz düzeyine göre F-18 FDG-lökosit bağlanma oranlarının çok farklı değerler (%2-%80) aldığını göstermişlerdir. Glukoz taşıyıcı reseptörlerinin (GLUT), FDG'nin hücreye girişinde etkili olduğu bilinmektedir. Lökositlerde artmış GLUT reseptörü ekspresyonu ve heksokinaz enzim aktivitesi gösterilmiştir [12]. İnsülinin hegzokinaz enzim aktivitesini değiştirdiği ve GLUT taşıyıcılarını moleküler seviyede (özellikle kas ve yağ hücrelerinde) aktive ederek sinyal geçitlerini etkilediği bilinmektedir. Bu bilgilere dayanarak, çalışmamızda insülinin F-18 FDG-lökosit işaretlemesinde bağlanma etkinliği üzerinde bir etkisi olabileceğini düşündük. Ancak, çalışmamızda insülinli ve insülinli gruplar arasında bağlanma etkinliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık (sırasıyla 31,57 ($\pm 5,9$) ve 27,57($\pm 4,3$)). Paik JY ve ark. F-18 FDG-işaretlemesinde insülin ilavesinin işlem üzerindeki etkisini çalışmışlardır. İnsülinin lenfositlerin işaretlenmesi üzerinde bir etkisi olmadığını ($p > 0,05$), monositlerin işaretlenmesinde bağlanma yüzdesini anlamlı şekilde arttırdığını bulmuşlardır ($p < 0,05$) [13]. Biz, rutin uygulamada F-18 FDG ile lökosit işaretlemenin yeri üzerinde çalıştığımızdan, lökositleri alt gruplara ayırmadık. Fostrom LA

ve arkadaşları [14], çalışmalarında, insülinin F-18 FDG-lökosit işaretleme etkinliği üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını bulmuşlardır. Onlar, 0.1 IU insülin kullanırken, biz çalışmamızda 10 IU insülin ilavesi yaptık. Daha yüksek düzeyde insülin kullanmamıza rağmen bulgularımız aynı idi. Moon SH ve ark. [15], F-18 FDG-lökosit işaretlemesinde granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) uyarımı eşliğinde insülin uygulamışlar. Ancak, bağlanma yüzdesini insülinli grupta %40,3 \pm 6, insülinli grupta ise %40,3 \pm 7,7 olarak saptamışlar ve iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bulgu saptamamışlardır. Bu bulgular, bizim bulgularımızla uyumludur.

Çalışmamızda, invitro işaretlemesinde insülin dışında glukagon da kullandık. Glukagonlu, insülinli ve hiçbir şey eklenmemiş gruplar arasında bağlanma etkinliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadık (sırasıyla %30,00 ($\pm 6,2$), %31,57 ($\pm 5,9$), %27,57 ($\pm 4,3$)) ($p = 0,418$). Literatürde, F-18 FDG-lökosit işaretleme üzerinde glukagonun etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamıştır.

Bir glukoz analogu olan F-18 FDG ile lökositlerin işaretlenmesi sürecinde invitro insülin ve glukagon uygulamasının işaretleme etkinliği üzerine etkisi olmadığı sonucuna vardık.

Çıkar İlişkisi: Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

1. Becker W, Meller J. The role of nuclear medicine in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* 2001;1:326-333. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00146-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00146-3)
2. Jamar F, Buscombe J, Chiti A, et al. EANM/SNMMI guideline for 18F-FDG use in inflammation and infection. *J Nucl Med* 2013;54:647-658. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.112524>
3. Sugawara Y, Gutowski TD, Fisher SJ, Brown RS, Wahl RL. Uptake of positron emission tomography tracers in experimental bacterial infections: A comparative biodistribution study of radiolabeled FDG, thymidine, L-methionine, 67Ga citrate and 125I-HSA. *Eur J Nucl Med* 1999;26:333-341.
4. Bleeker-Rovers CP, de Kleijn EM, Corstens FH, van der Meer JW, Oyen WJ. Clinical value of FDG PET in patients with fever of unknown origin and patients suspected of focal infection or inflammation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:29-37. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1338-3>

5. Osman S, Danpure HJ. The use of 2-[18F]Fluoro-2-deoxyD-glucose as a potential *In vitro* agent for labelling human granulocytes for clinical studies by positron emission tomography. *Int J Rad Appl Instrum B* 1992;19:183-190.
6. Bhattacharya A, Kochhar R, Sharma S, et al. PET/CT with ¹⁸F-FDG-labeled autologous leukocytes for the diagnosis of infected fluid collections in acute pancreatitis. *J Nucl Med* 2014;55:1267-1272. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.137232>
7. Bhargava KK, Gupta RK, Nichols KJ, Palestro CJ. *In vitro* human leukocyte labeling with (64) Cu: An intraindividual comparison with (111) In-oxine and (18) F-FDG. *Nucl Med Biol* 2009;36:545-549.
8. Forstrom LA, Dunn WL, Mullan BP, Hung JC, Lowe VJ, Thorson LM. Biodistribution and dosimetry of [18F] fluorodeoxyglucose labeled leukocytes in normal human subjects. *Nucl Med Commun* 2002;23:721-725. <https://doi.org/10.1097/00006231-200208000-00004>
9. Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, et al. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest* 2007;37:282-290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x>
10. Gotthardt M, Bleeker-Rovers CP, Boerman OC, Oyen WJ. Imaging of inflammation by PET, conventional scintigraphy, and other imaging techniques. *J Nucl Med Technol* 2013;41:157-169. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.076232>
11. Jamar F, Buscombe J, Chiti A, et al. EANM/SNMMI guideline for 18F-FDG use in inflammation and infection. *J Nucl Med* 2013;54:647-658. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.112524>
12. Williamson MK, Coombes N, Juszczak F, et al. Upregulation of glucose uptake and hexokinase activity of primary human CD4+ T cells in response to infection with HIV-1. *Viruses* 2018;10:114. <https://doi.org/10.3390/v10030114>
13. Paik JY, Lee KH, Byun SS, Choe YS, Kim BT. Use of insulin to improve [¹⁸F] fluorodeoxyglucose labelling and retention for *in vivo* positron emission tomography imaging of monocyte trafficking. *Nucl Med Commun* 2002;23:551-557. <https://doi.org/10.1097/00006231-200206000-00007>
14. Forstrom LA, Mullan BP, Hung JC, Lowe VJ, Thorson LM. 18-FDG labeling of human leukocytes. *Nucl Med Commun* 2000;21:691-694.
15. Moon SH, Lee HY, Eo JS, et al. Use of granulocyte colony-stimulating factor for fluorine-18-fluorodeoxyglucose labeling in human leukocytes. *Nucl Med Commun* 2011;32:186-191. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e328342dea1>