

Teknetium-99m Perteknetat Imunoglobulin G Manusia sebagai Agen Radiofarmaseutikal dalam Pengesanan Inflamasi

ROSNANI HASHIM, SHAHARUDDIN MOHD, ANG WOAN TZE, WAN HAMIRUL BAHRI WAN KAMAL & SHAHRIN ABDUL HAMID

ABSTRAK

Kajian ini dijalankan untuk menentukan potensi teknetium-99m perteknetat Imunoglobulin G Manusia ($^{99m}\text{Tc-HIgG}$) sebagai agen radiofarmaseutikal dalam pengesanan lokasi inflamasi. Antibodi HIgG terturun didapati seksual disimpan pada suhu optimum -70°C dan 0°C dan didapati rosak pada suhu penyimpanan $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Peratusan perolehan penglabelan HIgG dengan ^{99m}Tc adalah melebihi 95%. Biodistribusi $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ dikaji dengan menggunakan tikus Sprague-Dawley yang disuntik dengan turpentin secara intraotot untuk mengaruhkan inflamasi. Penentuan biodistribusi $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ dijalankan dengan kaedah imunosintigrafi (imbasan) serta kaedah bunuh dan kira. Imunosintigram yang diperolehi empat jam selepas suntikan dos menunjukkan imbasan biodistribusi $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ yang paling jelas pada otot terinflamasi. Hasil keputusan bunuh dan kira juga menunjukkan nisbah pengambilan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ otot terinflamasi adalah paling tinggi pada jangka masa empat jam selepas suntikan dos. Corak bagi pengumpulan ^{99m}Tc adalah berbeza berbanding dengan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$. Pengimejan sel inflamatori menggunakan radiofarmaseutikal $^{99m}\text{Tc-HIgG}$, berpotensi untuk digunakan dalam diagnosis infeksi/inflamasi, contohnya bagi pesakit kanser atau yang mempunyai sistem ketahanan imun yang lemah dan penilatan respon pesakit terhadap terapi penyakit inflamatori.

Kata kunci: Radiofarmaseutikal, Imunoglobulin G Manusia (HIgG), Teknetium-99m perteknetat (^{99m}Tc), inflamasi.

ABSTRACT

This study was carried out to determine the potential of technetium-99m pertechnetate Human Immunoglobulin G ($^{99m}\text{Tc-HIgG}$) as a radiopharmaceutical agent in the detection of inflammation site. Reduced HIgG antibody was found to be stable at the optimal storage temperatures of

70°C and 0°C and deteriorated at 2 - 8°C. The percentage of labeling of HlgG with ^{99m}Tc obtained was more than 95%. Biodistribution of ^{99m}Tc -HlgG was studied by using Sprague Dawley rats which were injected intramuscularly with turpentine to induce localized inflammation. The biodistribution of ^{99m}Tc -HlgG was determined by using immunosintigraphy (scanning) and kill and count method. Immunosintigram obtained after 4 hours post injection showed the clearest image of ^{99m}Tc -HlgG biodistribution in the inflamed muscle. The cut and count method also indicated that the uptake of ^{99m}Tc -HlgG by the inflamed muscle was highest after 4 hours post injection. The pattern of ^{99m}Tc localization was different from ^{99m}Tc -HlgG. Imaging of inflamed cells using radiopharmaceutical ^{99m}Tc -HlgG, possesses the potential to be used in the diagnosis of infection/inflammation such as in cancer or immunocompromised patients and in assessing patient's response to the therapy of inflammatory diseases.

Key words: Radiopharmaceutical, Human Immunoglobulin G (HlgG), Technetium-99m pertechnetate (^{99m}Tc), inflammation.

PENGENALAN

Inflamasi dalam tubuh boleh dikaitkan dengan jangkitan, kanser dan sebagainya. Pakar perubatan menentukan dan membuat diagnosis lokasi inflamasi berdasarkan tanda-tanda klinikal seperti kemerahan, pembengkakan, kepanasan, kesakitan atau kehilangan fungsi organ tertentu. Untuk inflamasi akut pada organ dalaman, ujian diagnostik seperti biopsi, pemeriksaan mikroskopi tisu dan eksudat inflamatori serta lain-lain penilaian makmal dilakukan untuk pengenalpastian. Cara pengimejan untuk lesi inflamatori dan jangkitan telah bermula sejak 1971 dengan penggunaan ^{67}Ga Sitrat (Lavender et al, 1971). Perubatan nuklear dengan menggunakan imbasan didapati berupaya memberi gambaran atau imbasan keseluruhan tubuh secara statik dan dinamik manakala teknik-teknik lain seperti *magnetic resonance imaging* (MRI), *computed tomography* (CT) hanya memberi maklumat secara statik (anatomi) tentang bahagian tubuh tertentu (Becker 1995). Kecanggihan teknologi nuklear untuk mengesan penyakit adalah disebabkan sinaran gamma radionuklid yang boleh dipancarkan kepada organ sasaran sambil mengurangkan dos pancaran kepada organ lain dalam badan pesakit.

Perteknetat merupakan analog Tc-99m yang paling stabil. ^{99m}Tc dalam bentuk terturun boleh bergabung dengan agen pengkompleksan untuk menjadi radiofarmaseutikal yang berguna. Radionuklid ^{99m}Tc mempunyai separuh hayat pendek (6 jam) dan ini mengurangkan jangkamasa pendedahan pesakit kepada ^{99m}Tc . Tenaga sinaran gamma yang dipancarkan

dari ^{99m}Tc sebanyak 140keV membolehkan imbasan gamma dipaparkan. Tambahan lagi imbasan ^{99m}Tc mempunyai resolusi yang lebih baik berbanding dengan bahan radiofarmaseutikal yang lain seperti Indium-111 (^{111}In) (Reynolds et al. 1990). ^{99m}Tc juga tidak memancarkan sinaran zarah beta tetapi hanya sinar gamma bertenaga tunggal. Ini dapat mengelakkan tenaga dipindahkan kepada tisu berdekatan.

Imunoglobulin G Manusia (HlgG) merupakan imunoglobulin yang utama dan menyumbang kepada 80% jumlah antibodi serum. HlgG lazimnya akan mengumpul pada lokasi inflamasi sama ada disebabkan oleh infeksi bakteria, kulat atau rangsangan bahan kimia (Fischman et al. 1989; Abrahams et al. 1990). Migrasi HlgG ke lokasi inflamasi merupakan suatu tindakbalas pertahanan perumah. HlgG membolehkan interaksi antara antibodi dengan antigen (Hansen et al. 1972).

Radionuklid HlgG berlabelkan ^{99m}Tc dipercayai boleh digunakan untuk tujuan imbasan inflamasi. Radiasi gamma yang dibebaskan oleh radiofarmaseutikal ini dapat dikesan dan diukur dengan kamera gamma (Kowalsky & Perry 1987). ^{99m}Tc bertindak sebagai penyurih (*tracer*) manakala HlgG bertindak sebagai pembawa. Radiofarmaseutikal yang berada dalam darah akan terkumpul dalam organ sasaran tertentu. Sekiranya terdapat keabnormalan, radiofarmaseutikal tidak dapat bergerak dengan sempurna dan lancar.

Kajian ini akan menentukan potensi penglabelan ^{99m}Tc terhadap HlgG yang dibangunkan untuk imbasan inflamasi. Penggunaan radiofarmaseutikal ^{99m}Tc -HlgG pada tikus terinflamasi akan memberi maklumat mengenai keupayaan kit tersebut digunakan sebagai agen diagnostik.

KAEDAH

PENYEDIAAN KIT IMUNOGLOBULIN G MANUSIA (HlgG)

HlgG terturun digunakan untuk pembentukan kit. Kerja pembentukan kit dilakukan dalam kabinet aliran udara laminar biobahaya kelas 2. Untuk 1 mg antibodi terturun dalam 0.1M phosphate buffered saline (PBS) dengan pH 7.4, 40 ul sediaan kit methylene diphosphate (MDP) ditambahkan. Kit MDP yang digunakan mengandungi 30 ug MDP (1.7×10^{-4} mmol) dan 1.44 ug SnCl_2 (0.076×10^{-4} mmol). Kit HlgG (1mg/vial) kemudiannya disimpan dalam suhu yang berlainan iaitu -70°C , 0°C dan $2 - 8^\circ\text{C}$ untuk ujian kestabilan pada jangkamasa 1 dan 1.5 bulan.

Seterusnya, larutan ^{99m}Tc dengan aktiviti tidak melebihi 50 mCi untuk 1 mg antibodi ditambahkan kepada kit dengan menggunakan picagari 1 ml. Kaedah 'instant thin layer chromatography' (ITLC) digunakan untuk kajian kestabilan dan penentuan suhu penyimpanan yang paling sesuai untuk

kit, Peratus penglabelan melebihi 95% dengan menggunakan pembilang gamma (*automated gamma counter compugama 1282 Wallac*) dianggap lulus ujian kawalan mutu radiokimia.

Pengiraan peratus penglabelan adalah berasaskan konsep masa retensi dimana kedua-dua puncak dari HlgG dan ^{99m}Tc seharusnya muncul pada masa yang sama. Masa retensi HlgG digunakan sebagai piawai perbandingan untuk mengetahui peratusan ^{99m}Tc yang terikat pada HlgG berbanding peratusan ^{99m}Tc yang bebas.

KAWALAN MUTU MIKROBIOLOGI

Ujian steriliti dilakukan mengikut kaedah penurasan membran. Pemerhatian untuk sebarang pertumbuhan dilakukan untuk jangkamasa 14 hari ke atas membran penuras yang dipotong dua. Satu bahagian diletakkan dalam bekas mengandungi thioglikolat dan sebahagian lagi dalam Tryptone Soya Broth (media II), dieramkan pada suhu $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

PENYEDIAAN TIKUS TERINFLAMASI

Tikus-tikus jantan jenis Sprague Dawley disuntik dengan 100 μl turpentin yang dituras dengan penuras 0.45 μm pada paha kiri untuk menghasilkan inflamasi. Tikus-tikus dibiarkan selama 2 hari bagi membolehkan inflamasi terbentuk.

PENENTUAN BIDISTRIBUSI ^{99m}Tc -HlgG PADA TIKUS TERINFLAMASI

Kaedah ini dijalankan dengan dua cara iaitu kaedah imunosintigrafi (imbasan) dan kaedah bunuh dan kira. Bagi kaedah imunosintigrafi, ^{99m}Tc -HlgG disuntik secara intraotot (I.M.) kepada 5 ekor tikus yang telah diberi anestesia. Pada masa yang sama Teknetium-99m pertechnetat bebas ($^{99m}\text{TcO}_2$) disuntik kepada 5 ekor tikus terinflamasi sebagai ujian kawalan. Imunosintigram dipaparkan dengan penggunaan kamera gamma pada 1 jam, 4 jam dan 24 jam selepas suntikan.

Untuk kaedah kedua, 5 ekor tikus yang telah disuntik dengan ^{99m}Tc -HlgG dibunuh setiap jangkamasa yang ditetapkan seperti di atas selepas suntikan diberikan. Darah dan organ-organ diasingkan dan dimasukkan kedalam tabung uji untuk ditimbang. Radioaktiviti di hitung dengan menggunakan pembilang gamma. Pengambilan dikira sebagai % dos yang disuntik untuk 1 g organ.

HASIL KAJIAN

Tiga parameter iaitu suhu penyimpanan kit, tempoh penyimpanan kit dan selang masa selepas penglabelan kit dengan ^{99m}Tc dikaji. Keputusan yang diperolehi mengikut suhu penyimpanan yang berlainan adalah seperti Jadual 1. Kit yang disimpan pada suhu 0°C selama sebulan menunjukkan peratus penglabelan yang terbaik. Antara tiga selang masa selepas penglabelan (10 min, 4 jam, 24 jam), perolehan peratusan yang tertinggi adalah 4 jam selepas penglabelan dengan ^{99m}Tc . Oleh itu, untuk kajian biodistribusi selanjutnya, kit yang disimpan pada suhu 0°C digunakan.

JADUAL 1. Peratus Penglabelan ^{99m}Tc -HlgG

a. Peratus penglabelan sejeurus selepas penyediaan kit

Kestabilan penglabelan	Purata \pm SD
10 minit	99.21 \pm 2.73
4 jam	98.29 \pm 3.32
24 jam	95.35 \pm 2.51

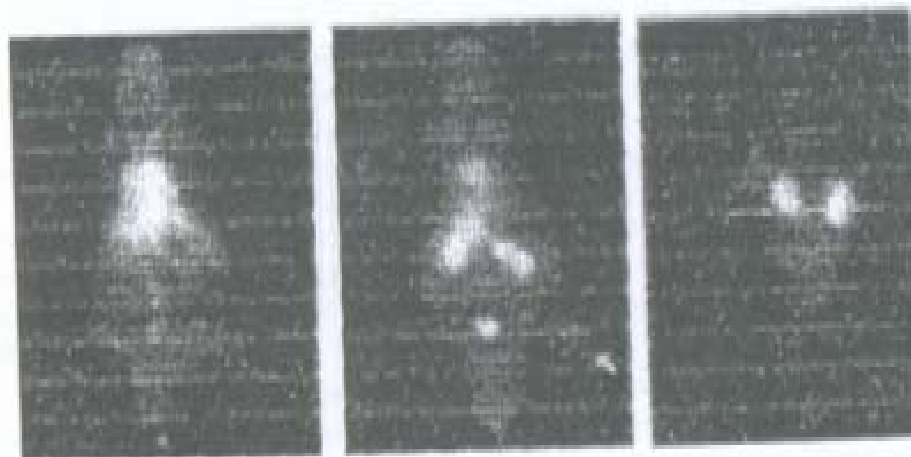
b. Peratus penglabelan sebulan selepas penyimpanan kit

Kestabilan penglabelan	Purata \pm SD	
	Suhu -70°C	Suhu 0°C
10 minit	97.05 \pm 4.36	98.45 \pm 3.71
4 jam	98.10 \pm 3.43	98.71 \pm 3.57
24 jam	96.57 \pm 2.52	96.68 \pm 4.21

c. Peratus penglabelan satu setengah bulan selepas penyimpanan kit

Kestabilan penglabelan	Purata \pm SD		
	Suhu -70°C	Suhu 0°C	Suhu $2-8^{\circ}\text{C}$
10 minit	82.57 \pm 2.18	97.5 \pm 3.89	0.25 \pm 0.05
4 jam	95.20 \pm 4.13	96.08 \pm 4.53	0.68 \pm 0.08
24jam	89.82 \pm 2.50	92.21 \pm 3.35	0.84 \pm 0.10

Keputusan unit kawalan mikrobiologi tidak menunjukkan pertumbuhan mikroba dalam sediaan kit. Ini membuktikan kit yang disediakan adalah steril. Immunosintigram yang diperolehi (Rajah 1) dengan penggunaan kamera gamma mempamerkan pengumpulan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ pada lokasi inflamasi iaitu pada paha kiri yang disuntik dengan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$, pada jarakmasa 0 jam, 4 jam dan 24 jam masing-masing. Imbasan-imbasan yang diperolehi jelas menunjukkan pengumpulan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ pada paha kiri yang terinflamasi berbanding dengan paha kanan yang normal. Rajah 2 menunjukkan biodistribusi $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Tc-99m bebas) sebagai ujian kawalan pada jangkamasa yang sama. Corak pengumpulannya adalah tertumpu pada bahagian gaster. Ini membuktikan bahawa $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ sesuai untuk digunakan sebagai agen penentu lokasi inflamasi.



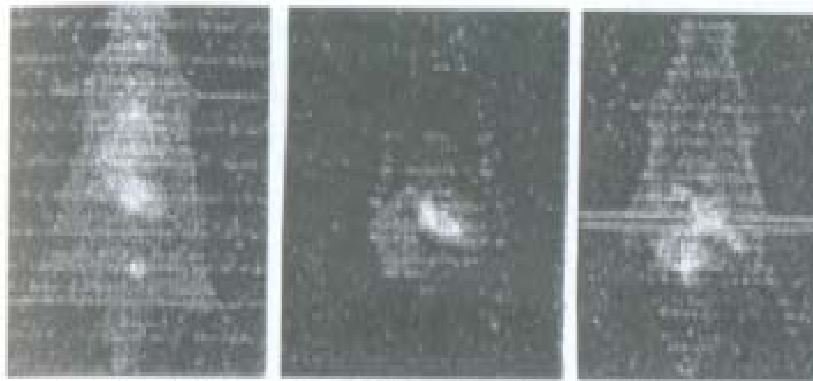
Sejurus selepas
suntikan

4 jam selepas
suntikan

24 jam selepas
suntikan

RAJAH 1. Imbasan sejurus selepas, 4 jam dan 24 jam selepas suntikan dos $^{99m}\text{Tc-HIgG}$. Terdapat pengumpulan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ pada paha kiri tapak terinflamasi 4 jam selepas suntikan (\blacktriangleright).

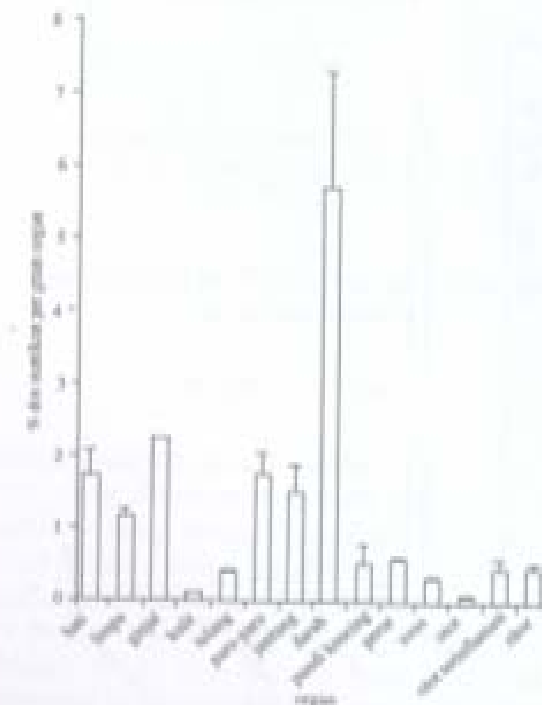
Penentuan biodistribusi $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ dan ^{99m}Tc pada tikus terinflamasi dilakukan dengan kaedah bunuh dan kira. Bagi setiap organ yang dikeluarkan dan dasingkan, radioaktiviti dihitung dengan menggunakan pembilang gamma. Pengambilan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ dikira sebagai peratusan (%) dos disuntik untuk 1 gm organ. Di samping itu, nisbah pengumpulan setiap tisu organ terhadap otot juga dikira. Keputusan biodistribusi $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ pada tikus terinflamasi pada selang masa 1, 4, dan 24 jam selepas suntikan adalah seperti Rajah 3. Perbandingan antara hasil perolehan biodistribusi $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ pada selang masa selepas suntikan menunjukkan peratusan dos suntikan per gram organ terinflamasi adalah tertinggi 4 jam selepas suntikan. Nisbah purata otot terinflamasi terhadap otot normal juga adalah tertinggi



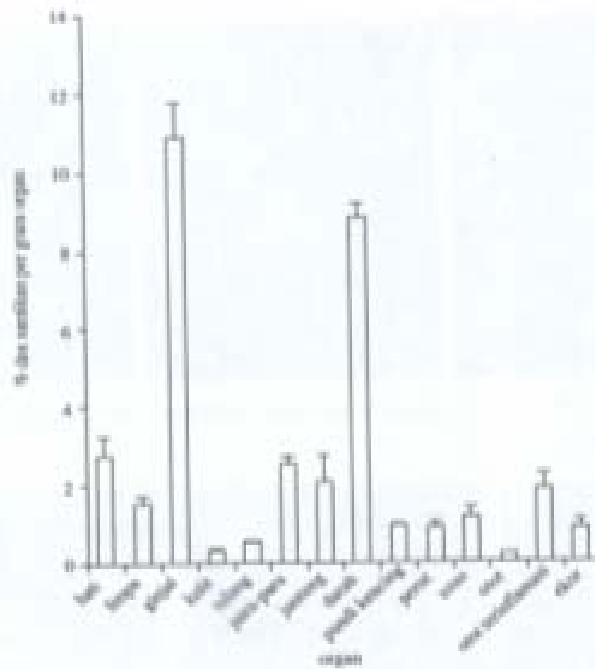
Sejurus selepas suntikan 4 jam selepas suntikan 24 jam selepas suntikan

RAJAH 2. Imbasan sejurus selepas, 4 jam dan 24 jam selepas suntikan dos $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (Tc-99m bebas). Tiada pengumpulan $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pada paha kiri tapak terinflamasi 4 jam selepas suntikan.

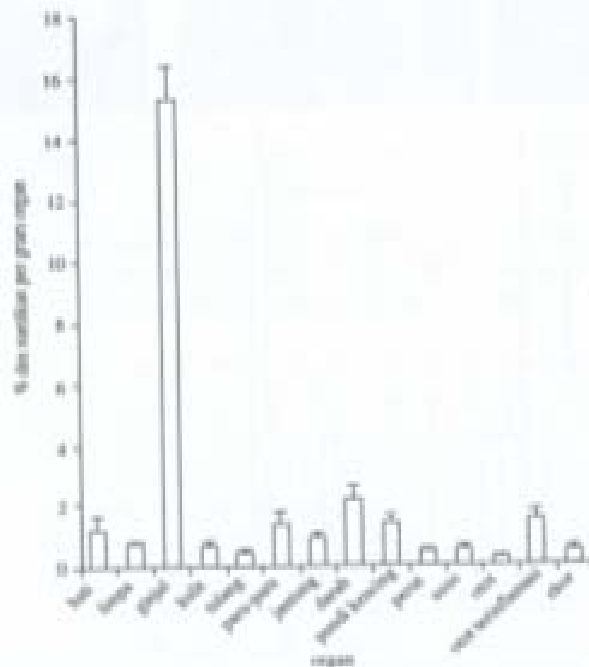
4 jam selepas suntikan. Nilai pengambilan ^{99m}Tc adalah rendah (0.49% dos suntikan per gram organ) berbanding dengan $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ (1.85%) pada jangkamasa 4 jam selepas suntikan. Keputusan corak biodistribusi



RAJAH 3a. Biodistribusi kit $^{99m}\text{Tc-HIgG}$ dalam tikus terinflamasi 1 jam selepas suntikan

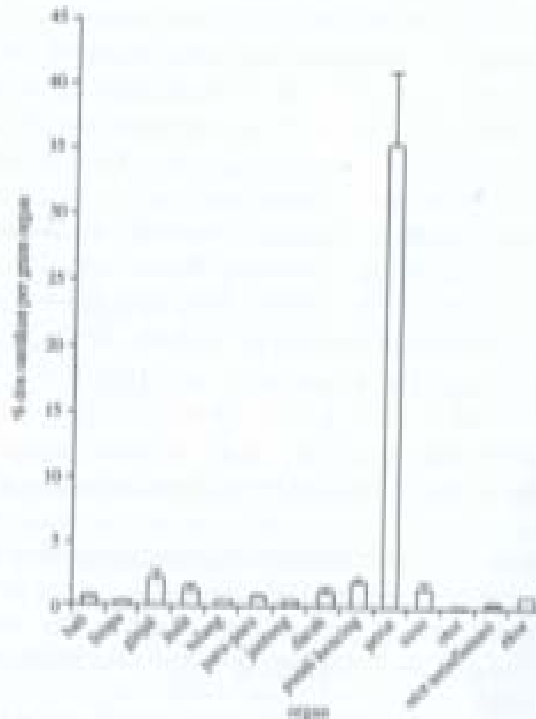


RAIJAH 3b. Biodistribusi kit ^{99m}Tc-HlgG dalam tikus terinflamasi 4 jam selepas suntikan



RAIJAH 3c. Biodistribusi kit ^{99m}Tc-HlgG dalam tikus terinflamasi 24 jam selepas suntikan

menunjukkan pengumpulan ^{99m}Tc -HIgG dalam darah dan organ-organ vital yang lain adalah tinggi 1jam selepas suntikan. Pengumpulan ^{99m}Tc -HIgG pada otot terinflamasi adalah sangat ketara berbanding dengan otot normal 4 jam selepas suntikan. Corak yang sama juga berlaku pada selang masa 24 jam. Corak biodistribusi untuk $^{99m}\text{TcO}_2$ adalah berbeza di mana pengumpulan pada gaster adalah jauh lebih ketara daripada organ-organ lain seperti yang ditunjuk dalam Rajah 4.



RAJAH 4. Biodistribusi kit ^{99m}Tc bebas dalam tikus terinflamasi 4 jam selepas suntikan.

PERBINCANGAN

Kaedah penglabelan yang digunakan dalam kajian ini adalah kaedah secara langsung seperti yang dibangunkan oleh Rhodes (1991). Kaedah ini mempunyai kelebihan yang menggalakkan khasnya dalam penyediaan kit radiofarmaseutikal di mana proses penglabelan antibodi dengan ^{99m}Tc hanya memerlukan satu langkah. Kaedah ini adalah berdasarkan prinsip penurunan ikatan disulfida dalam satu molekul antibodi HIgG untuk menghasilkan kumpulan sulhidril (-SH) endogenous yang bertindak sebagai tempat pengikat. Penglabelan secara tidak langsung memerlukan agen pengkelat eksogenous untuk mengikat secara kovalen dengan antibodi seperti yang diperkenalkan oleh Fritsberg et al. (1987).

Kajian ini penting untuk menentukan suhu yang paling optimum untuk penyimpanan kit. Keputusan kajian menunjukkan suhu penyimpanan 0°C merupakan suhu penyimpanan yang paling baik untuk tempoh sebulan. Penyimpanan kit pada suhu ini menunjukkan kestabilan yang lebih tinggi dari -70°C. Kit dalam bentuk cecair tidak sesuai disimpan pada suhu 2 - 8°C. Hasil penentuan peratusan penglabelan dengan kaedah TLC jelas menunjukkan peratusan penglabelan kian berkurangan dengan masa dari 10 minit sehingga 24 jam selepas penglabelan. Kestabilan ikatan antara ^{99m}Tc dengan HlgG adalah paling baik 4 jam selepas penglabelan. Ini boleh dijelaskan dari separuh hayat radioisotop iaitu selama 6 jam.

Bahan kimia turpentin dipilih untuk menghasilkan inflamasi tempatan sebab mudah dilakukan berbanding dengan penghasilan infeksi menggunakan *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli* yang memerlukan kemahiran pengendalian bakteria tersebut. Kaedah imunosintigram adalah untuk pengamatan secara kualitatif dan kaedah bunuh dan kira adalah penilaian secara kuantitatif. Pemerhatian imej menunjukkan selain dari tapak inflamasi, ^{99m}Tc -HlgG juga mengumpul pada ginjal dan hati. Ini mungkin disebabkan kehadiran reseptor Fc pada sel hepatic dan ginjal yang mungkin juga tapak metabolisme HlgG (Sands & Jones 1987). Pengumpulan ^{99m}Tc bebas pada gaster sememangnya sifat semulajadinya secara in-vivo. Perbandingan dari segi imbasan yang didapati jelas memaparkan pengambilan ^{99m}Tc -HlgG oleh tapak inflamasi adalah jauh lebih ketara dari ^{99m}Tc .

Dari segi radioaktiviti pula, imunosintigram yang didapati 4 jam selepas suntikan dos mempersempahkan imbasan yang paling jelas berbanding dengan imej yang didapati 24 jam selepas suntikan dos. Ini adalah kerana ^{99m}Tc mempunyai tempoh hayat sepanjang 6 jam. Maka radioaktivitinya terus mereput dengan masa.

Hasil keputusan kaedah bunuh dan kira menunjukkan peratusan dos suntikan per gram organ untuk otot terinflamasi adalah 0.480 sedangkan nilai untuk otot normal hanyalah 0.086. Biodistribusi ^{99m}Tc -HlgG 4 jam selepas suntikan menunjukkan nisbah tisu terhadap otot yang jauh lebih baik dan jelas berbanding dengan 1 jam suntikan iaitu 10.5:1.0 bagi otot terinflamasi berbanding dengan otot normal. Ini membuktikan bahawa penentuan lokasi inflamasi 4 jam selepas suntikan dos ^{99m}Tc -HlgG memberi keputusan yang terbaik. Masa yang agak lama (4 jam) diperlukan sebelum ^{99m}Tc -HlgG mengumpul di dalam tapak inflamasi kerana HlgG mempunyai molekul yang besar (150,000 kilodalton). Nisbah tisu terhadap otot berkurangan dengan masa mungkin disebabkan oleh pemisahan ^{99m}Tc dari HlgG, ekresi ^{99m}Tc -HlgG melalui ginjal dan aktiviti ^{99m}Tc kian mereput. Oyen et al. (1992) juga mendapati pengambilan ^{99m}Tc -HlgG kian berkurangan selepas jam ke 6. Pengumpulan ^{99m}Tc -HlgG pada organ-organ vital lain telah dilaporkan tidak dapat dielakkan (Wong et al. 1995).

KESIMPULAN

Kajian ini memberi maklumat penting dalam bidang perubatan nuklear memandangkan penentuan lokasi inflamasi dalam tubuh dapat dikesan dengan kaedah ini. Kaedah non-invasif ini merupakan satu kaedah yang praktikal dan mudah dijalani. Masalah utama penglabelan antibodi ialah perubahan atau modifikasi ke atas ciri fisiobiologinya. Hasil kajian memberi maklumat yang berguna dalam membangunkan sediaan kit HIgG dan menyumbang kepada maklumat suhu penyimpanan kit yang optimum di hospital pengguna. Oleh itu potensi untuk diagnosis tapak inflamasi amatlah menggalakkan.

RUJUKAN

- Abrahams, M. J., Juweid, M., Kate, C. I., Schwartz, D. A., Hauser, M. M., Gaul, P. E., Puccello, A. J., Rubin, R. H., Strauss H. W. & Fischman A. J. 1990. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazine nicotinamide derivate for imaging focal sites of infection in rats. *J. Nucl. Med.* 31: 2022-2028.
- Becker, W. 1995. The contribution of nuclear medicine to the patient with infection. *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 1195-1211.
- Fischman, A. J., Rubin, R. H., Khaw, B. A., Callahan, R. J., Wilkinson, R., Keech, F., Dragotakes, S., Kramer, P., LaMuraglia, G. M., Lind, S. & Strauss H. W. 1989. Detection of acute inflammation with In-111-labeled non-specific polyclonal IgG. *Semin. Nucl. Med.* 31: 1199-1205.
- Fritzberg, A. R. 1987. Advances in 99m Tc-labeling of antibodies. *Nuclearmedizin.* 26: 7-12.
- Hanson, P. M., Johnson, H. B. & Spiegelberg, H. L. 1972. Release of granular enzymes from human neutrophils stimulated by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. *J. Immunol.* 109: 1182-1187.
- Kowalsky, R. J. & Perry, J. R. 1987. *Radiopharmaceuticals in nuclear medicine practice.* Norwalk: Appleton & Lange.
- Lavender, J. P., Lhove, J. & Bakere, J. R. 1971. Gallium citrate scanning in neoplastic and inflammatory lesions. *Br. J. Radiol.* 44: 361-366.
- Oyen, W. J. G., Claessens, R. A. M. J., Van Der Meer, J. W. M. & Corstens, F. H. M. 1992. Biodistribution and kinetics of radiolabeled proteins in rats with focal infection. *J. Nucl. Med.* 33: 388-394.
- Reynolds, J. H., Graham, D. & Smith, S. W. 1990. Imaging inflammation with Tc-99m HMPAO-labeled leukocytes. *Clin. Radiol.* 42:195-198.
- Rhodes B. A. 1991. Direct labeling of proteins with ^{99m}Tc. *Nucl. Med. Biol.* 18(7): 667-676.
- Sands, H. & Jones, P. L. 1987. Methods for the study of the metabolism of radiolabeled monoclonal antibodies by liver and tumor. *J. Nucl. Med.* 28: 390-398.