تعیین شرایط بهینه نشان گذاری پلاکت ها با کمپلکس های Tc-99m و In-111

دکتر رضا نجفی، زهرا قطبی، طیبه هادیزاد

بخش رادیوایزوتوپوپ، سازمان انرژی اتمی ایران، تهران

چکیده

در این بررسی کمپلس‌های In-113m-Oxine (sulphate)، In-113m-Tropolone و Tc-99m-GHA تهیه گردید. شرایط فرمولاسیون جهت به دست آوردن نتایج مطلوب مورد مطالعه قرار گرفت. پلاکت هااز خون تام جداسازی، تخلیص و در محیط مناسب معلق گردیده و توسط کمپلکس‌های مذکور و Tc-99m-HMPAO نشاندار شدند. تاثیر PH، دما و زمان انکوباسیون، فعالیت و حجم رادیونوکلئید، غلظت و حجم "حامل یون" (در ترکیبات In-113m)، غلظت لیگاند و Sn (در ترکیبات Tc-99m) و حجم خون آزمایش شد. شرایط بهینه برای نشان‌گذاری به دست آمد، به طوری که توانستیم پلاکت ها را در محیط خارج از بدن، با حداکثر بازدهی و حداقل آسیب، نشاندار سازیم.

مقدمه

ترکیبات نشاندار شده با رادیونوکلئید برای ردیابی مسیر واکنش‌ها و نیز تعیین محل و اثر فرآیندهای فیزیولوژیک در سیستم های زیستی ارزشمند هستند. تقریباً متعاقب همه رخدادهای غیر طبیعی در بدن، تظاهرات خونی و درگیری در سلول های خونی محیطی مشاهده می شود. زمانی که آسیب عروقی بوجود می آید، پلاکت ها، با قابلیت ویژه خود، به کلاژن زیر آندوتلیوم چسبیده و برای بندآوردن خون، عمل می کنند (۱) و به همین دلیل در صورت ترکیب با یک ردیاب پرتوزا می توانند بافتهایی را که دچار انفارکتوس، ترومبوز، آمبولی، آتروسکلروز و غیره شده اند، مشخص نمایند (۲).

رادیونوکلئیدهای In-111 و Tc-99m به دلیل تابش گامای خالص، انرژی و نیمه عمر فیزیکی مناسب، فراوانی بسیار بالای فوتون، و قابلیت تشکیل کمپلکس های لیپوفیل بالیگاندهای مختلف، برای نشاندار کردن پلاکت ها مطلوب به نظر می رسند (۲).

بدلیل وجود پیچیدگی در ساختمان پلاکت ها و حساسیت آنها، نشاندار کردن باید به گونه ای انجام گیرد تا باعث بهم چسبیدن پلاکت ها (aggregation) نگشته و غلظت مواد به کار رفته برای این سلولها سمی نباشد. در اینجا تاثیر عوامل مختلف برای نشان گذاری پلاکت ها در خارج از بدن (in vitro) به طور تجربی مورد بررسی قرار گرفته و شرایط بهینه در محیط های مختلف تعیین گردیده است.

روش کار

جداسازی پلاکت ها از خون تام

در این بررسی پلاکت ها با روش سانتریفوژ که شامل دو مرحله بود به شرح زیر جداسازی شدند.

الف- تهیه پلاسمای غنی شده با پلاکت یا Platelet rich plasma (PRP). مقداری از خون تام با محلول ACD، با نسبت ۱:۶ مخلوط و با دور ۱۸۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس، PRP حاصل با پیپت پاستور از فاز گلبولهای سفید و قرمز جدا شد.

ب- تهیه توده پلاکتی یا Platelt pellet (PP). PRP حاصل از مرحله الف به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰g سانتریفوژ گردید تا توده پلاکتی به دست آید.

نشاندارکردن پلاکت ها با In-113m-Oxine (Sulphate) در محیط Modified tyrode's solution (MTS)

ابتدا توده پلاکتی حاصل از ۲۰ میلی لیتر خون تام به روشی که قبلاً ذکر شد، به دست آمد. برای حصول اطمینان از عدم حضور پلاسما در محیط، پلاکت ها و دیواره لوله سانتریفوژ، سه بار و هر بار با ۲ میلی لیتر محلول MTS رقیق شسته شده و با حرکت ملایم دست، پلاکت ها در یک میلی لیتر MTS معلق شدند. کمپلکس In-113m-Oxine نیز هم زمان به ترتیب زیر تهیه شد (۳).

ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر محلول تازه دوشیده شده از $In\text{-}113mCl_3$ (با اکتیویته ۱/۲ تا ۱/۸ میلی کوری) به یک ویال منتقل و PH آن با استفاده از بافر استات به ۵/۳ تا ۵/۵ رسانده شد. دویست وپنجاه میکرولیتر محلول اکسین سولفات با غلظت ۲۸/. میلی گرم در میلی لیتر به آن افزوده شد و سپس ۱ تا ۲ دقیقه به آرامی به هم زده شد تا کمپلکس تشکیل گردد. دو میلی لیترMTS به کمپلکس فوق اضافه گردید. کل این محلول با پلاکت معلق، مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷° C قرار گرفت و در طول این مدت چند بار به هم زده شد تا عمل نشاندار شدن کامل گردد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، پلاکت معلق با دور ۱۰۰۰g، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۳۷° C سانتریفوژ شد. با جدا کردن مایع رویی از توده پلاکتی نشاندار شده و شمارش میزان اکتیویته موجود در هر یک از دو نمونه، درصد پلاکت نشاندار شده محاسبه گردید.

غلظت اکسین سولفات، حجم ایندیم-113m-کلرید، مقدار اکتیویته، زمان انکوباسیون و حجم خون تام مورد بررسی قرار گرفت.

نشاندارکردن پلاکت ها با In-113m-Oxine (Sulphate) در محیط ACD-Saline

ابتدا PH مربوط به PRP (حاصل از ۲۰ میلی متر خون تام) با استفاده از ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر ACD، در ۶/۲ تا ۶/۷ تنظیم شد. پس از سانتریفوژ (به مدت ده دقیقه و دور ۱۰۰۰g)، توده پلاکتی جدا گشته و با حرکت آرام دست در یک میلی لیتر سالین معلق گردید. به طور همزمان، ۷۰۰ میکرولیتر محلول تازه $In\text{-}113mCl_3$ (۱/۴-۰/۸ میلی کوری) به یک ویال منتقل شده و به کمک بافر استات، PH آن به حدود ۵/۳ رسانده شد. پانصد میکرولیتر محلول اکسین سولفات با غلظت ۰/۱۴ میلی گرم بر میلی لیتر به ویال افزوده شد تا کمپلکس مورد نظر تشکیل گردد. کمپلکس حاصل با پلاکت معلق، مخلوط و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷° C قرار داده شد تا عمل نشان گذاری کامل گردد. راندمان کار به روشی که قبلاً بدان اشاره شد تعیین گردید.

تأثیر غلظت و حجم اکسین سولفات به کار برده شده، حجم ایندیم-113m-کلرید، زمان انکوباسیون، PH بافر استات مصرف شده و حجم سالین معلق کننده پلاکت ها مورد بررسی قرار گرفت.

نشاندار کردن پلاکت ها با In-113m-Tropolone در محیط ACD-Saline

پس از حل کردن ۱۰ میلی گرم پودر تروپولون در مقداری سالین و رساندن PH به ۷/۴ توسط هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال، حجم نهایی به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد.

به ۲۰ میکرولیتر محلول ذخیره تروپولون در سالین، ۵۰ میکرولیتر محلول $In\text{-}113mCl_3$ با اکتیویته ۵۰ تا ۷۰ میکروکوری افزوده شد. این محلول یک تا دو دقیقه به هم زده شده و به کمک محلول هیدرکسیدسدیم ۰/۱ نرمال، PH آن به ۶/۵ رسید. پنج میلی لیتر محلول ACD با ۳۰ میلی لیتر سالین مخلوط و با افزودن محلول هیدروکسیدسدیم ۱ نرمال، PH دقیقاً به ۶/۵ رسانده شد.

برای تهیه پلاکت های معلق در ACD-Saline، ابتدا به کمک محلول ACD، PH مربوط به PRP حاصل از ۲۰ میلی لیتر خون، به ۶/۲ تا ۶/۷ رسانده شد و سپس با کمک سانتریفوژ، توده پلاکتی جدا گشته و به آرامی در ۰/۵ میلی لیتر محلول ذخیره ACD-Saline معلق گردید. از طرفی ۳ میلی لیتر از محلول ذخیره ACD-Saline در دمای ۳۷° C به کمپلکس ایندیم-113m-تروپولون افزوده گردید و محلول حاصل با پلاکت معلق مخلوط گشته و به مدت ۳۰ دقیقه در

دمای °۳۷C قرار داده شد تا عمل نشاندار شدن صورت گیرد. غلظت تروپولون با توجه به محلول های به کاربرده شده در نهایت، ۵/۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود. راندمان نشان گذاری نیز تعیین گردید(۴ و۵).

تأثیر غلظت تروپولون، دما، زمان و PH محیط انکوباسیون و همچنین غلظت یون سیترات بر راندمان عمل نشان گذاری بررسی شد.

نشاندار کردن پلاکت ها با Tc-99m-Sn-GHA در محیط ACD-Saline

کیت گلوکوهپتونیت، با حل کردن ۵۲/۹۶ میلی گرم نمک سدیم گلوکوهپتونیت و ۲۶/۱۳ میلی گرم نمک کلسیم آن در مقداری آب و افزودن مقداری لازم از محلول کلریدقلع II تهیه شد. این کیت با PH حدود ۵/۷ و حجم نهایی یک میلی لیتر لیوفلیز گردید. توده پلاکتی حاصل از ۲۰ میلی لیتر خون، در ۴ میلی لیتر محلول ACD-Saline (با PH=۵) معلق شده و با دور ۸۰۰g به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شد. پلاکت های حاصل در ۰/۵ میلی لیتر سالین معلق شدند.

پس از حل‌کردن کیت تهیه شده در ۶ میلی لیتر سالین، ۰/۷۵ میلی لیتر از آن به پلاکت معلق افزوده گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °۳۷ C قرار داده شد. پلاکت ها به کمک سانتریفوژ، با دور ۸۰۰g و به مدت ۷ دقیقه جداسازی شده و پس از شستشو با ACD-Saline برای مراحل بعدی آماده شدند. توده پلاکتی حاصل از مرحله قبلی در ۰/۵ میلی لیتر سالین معلق شد و سپس ۰/۵ میلی لیتر محلول پرتکنتات سدیم با اکتیویته ۲/۵ میلی کوری به آن اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °۳۷ C قرار داده شد تا عمل نشان گذاری صورت گیرد. در پایان، راندمان کار به روش قبلی تعیین گردید (۶).

مقدار قلع و گلوکوهپتونیت، PH کیت، حجم خون، PH محیط و زمان انکوباسیون در هر دو مرحله، درجه حرارت لازم و میزان اکتیویته پرتکنتات در عمل نشان گذاری پلاکت ها بررسی شد.

نشاندارکردن پلاکت ها با Tc-99m-HMPAO

پنج میلی لیتر (حدود ۱۵ میلی کوری) پرتکنتات سدیم به کیت لیوفلیزه Cerelec™ (Amersham UK) که محتوی ۰/۵ میلی گرم HMPAO، ۷/۶ میکروگرم $SnCl_2, 2H_2O$ و ۴/۵ میلی گرم NaCl بود، اضافه گردید. بعد از به هم زدن به مدت ۱۰ ثانیه، کمپلکس Tc-99m-HMPAO تشکیل شد (۷). از طرفی با افزودن محلول ACD (PH=5), PH مربوط به PRP (حاصل از ۲۰ میلی لیتر خون) به ۶/۵ رسانده شد و پس از سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه، توده پلاکتی حاصل گشت. ACD-Platelet poor plasma (PPP) به دست آمده با دور ۱۶۰۰g، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا ACD-Cell free plasma (CFP) حاصل شود. توده پلاکتی حاصل در ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول جدید معلق گردید و ۰/۴ میلی‌لیتر از کمپلکس Tc-99m-HMPAPO به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. با افزودن ۳ میلی‌لیتر سالین، عمل نشاندار شدن متوقف گردید. سلولهای نشاندار شده توسط سانتریفوژ جداگشته و راندمان کار محاسبه شد.

تاثیر PH محیط انکوباسیون، میزان اکتیویته، حجم خون (تعداد پلاکت ها)، غلظت پلاسما در محیط انکوباسیون، زمان و دمای انکوباسیون بر راندمان نشان گذاری پلاکت ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

جدول شماره ۱ نشان می دهد که اکسین سولفات در غلظت‌های کمتر از ۰/۲۸، پلاکت ها را به خوبی نشاندار نکرده و در غلظت های بیش از این مقدار نیز به علت سمی بودن، موجب مرگ پلاکت ها و در نتیجه کاهش در صد نشان گذاری شده است. زمانی که محیط نشان گذاری پلاکت ها از MTS به سالین تغییر داده شد، غلظت اکسین سولفات لازم نیز به نصف کاهش یافت (جدول ۲).

مناسب ترین مقدار اکتیویته $In\text{-}113mCl_3$ برای نشاندار کردن پلاکت ها با In-113m-Oxine (Sulphate) در محیط MTS برابر ۱/۵ میلی کوری بود (شکل ۱).

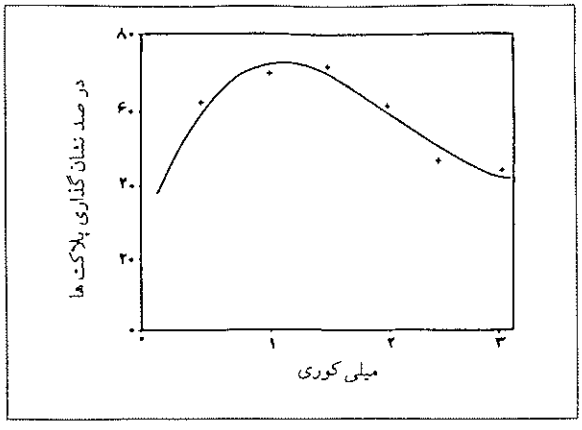
بررسی تاثیر غلظت تروپولون بر عمل نشان گذاری پلاکت ها با کمپلکس In-113m-tropolone در محیط ACD-Saline نشان داد که مناسب‌ترین غلظت برای نشاندار کردن پلاکت ها ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر است (شکل ۲).

عامل مهم دیگر تاثیر PH محلول ذخیره ACD-Saline بود که مناسب ترین مقدار آن بین ۶/۵ تا ۷ تعیین شد (شکل ۳).

برای نشاندار کردن پلاکت ها با کمپلکس Tc-99m-Sn-GHA مقدار گلوکوهپتونیت مصرف شده عامل مهمی بود (جدول ۳). نتایج حاصله نشان داد که در صورت عدم حضور گلوکوهپتونیت، پلاکت ها کمتر نشاندار می شوند. با استفاده از گلوکوهپتونیت، افزایش چشم گیری در راندمان نشان گذاری پلاکت ها ملاحظه گردید. عامل مهم دیگر مقدار اکتیوتیه پرتکنتات سدیم بود.

پلاکت ها با استفاده از ۲/۵ تا ۱۰ میلی کوری پرتکنتات سدیم و با راندمان بالایی نشاندار شدند (شکل ۴) و هیچ گونه آسیبی هم به آنها وارد نشد.

مناسبترین حجم کمپلکس Tc-99m-HMPAO برای نشان گذاری پلاکت ها ۰/۵ میلی لیتر بود (شکل ۵) و در این حالت بهترین محدوده PH برای محیط انکوباسیون ۵/۵ تا ۶/۵ تعیین شد (جدول ۴).



شکل ۱ - تاثیر مقدار اکتیویته In-113mCl3 بر مقدار نشان گذاری پلاکت ها با In-113m-Oxine (Sulphate) در محیط MTS.

جدول ۱ - تاثیر غلظت اکسین سولفات بر راندمان نشان گذاری پلاکت ها با کمپلکس In-113-oxine (Sulphate) در محیط MTS.

غلظت اکسین سولفات(mg/μl)	۰	۰/۰۱۷۵	۰/۰۳۵	۰/۰۷	۰/۱۴	۰/۲۸	۰/۵۶
راندمان نشان گذاری (٪)	۱۴/۰۳	۳۹/۱۹	۵۸/۷۲	۶۷/۹۷	۶۹/۶۲	۷۳/۰۲	۵۹/۷۱
دفعات تکرار	۳	۳	۶	۵	۸	۱۵	۳

جدول ۲ - تاثیر غلظت اکسین سولفات بر راندمان نشان گذاری پلاکت ها با کمپلکس In-113m-oxine(Sulphate) در محیط سالین.

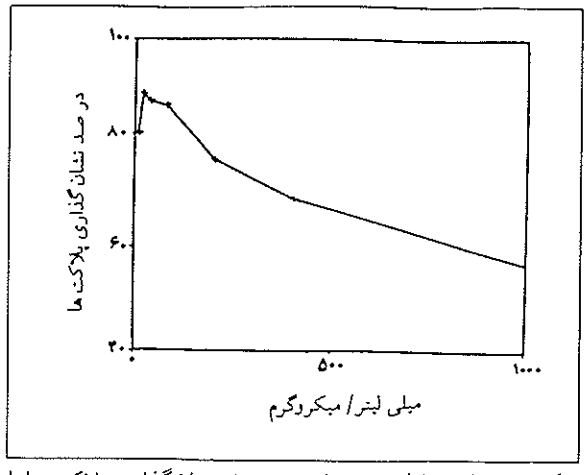
غلظت اکسین سولفات(mg/ml)	۰	۰/۰۰۸۷۵	۰/۰۱۷۵	۰/۰۳۵	۰/۰۷	۰/۱۴	۰/۲۸	۰/۷
راندمان نشان گذاری(٪)	۲۰/۳۰	۵۳/۴۵	۶۴/۹۷	۷۲/۲۸	۷۴/۱۶	۷۶/۷۴	۶۲/۶۹	۴۴/۲۹
دفعات تکرار	۳	۳	۳	۴	۴	۲۱	۳	۴

جدول ۳ - تاثیر راندمان گلوکوهپتونیت بر مقدار نشان گذاری پلاکت ها با Tc-99m-Sn-GHA.

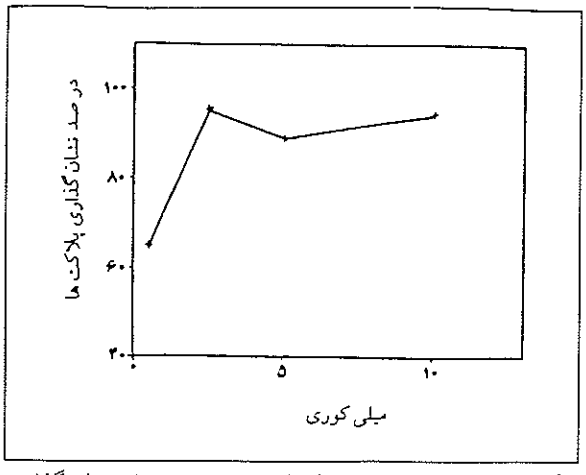
مقدار گلوکوهپتونیت سدیم(μg)	۰	۱۲	۲۴	۴۸
راندمان نشان گذاری (٪)	۴۹/۰۰	۹۱/۳۰	۹۴/۰۳	۹۴/۸۰
دفعات تکرار	۳	۴	۴	۱۹

جدول ۴ - تاثیر PH محیط انکوباسیون بر راندمان نشان گذاری پلاکت ها با کمپلکس Tc-99m-HMPAO.

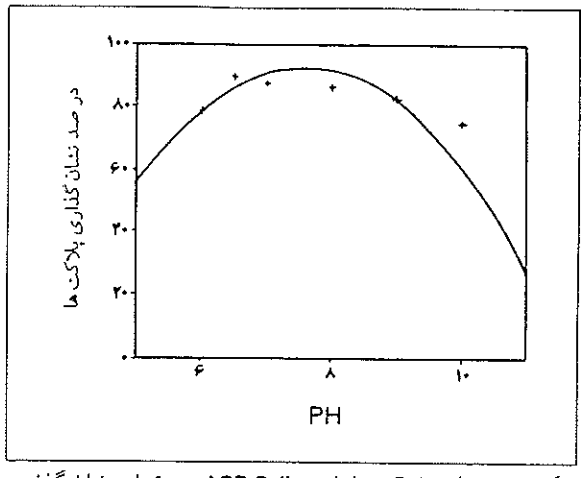
(PH) محیط انکوباسیون	۵/۵	۶/۵	۷/۵	۹
راندمان نشان گذاری (٪)	۷۷/۷۲	۷۷/۶۵	۴۵/۲۵	۲۱/۱
دفعات تکرار	۳	۱۰	۳	۳



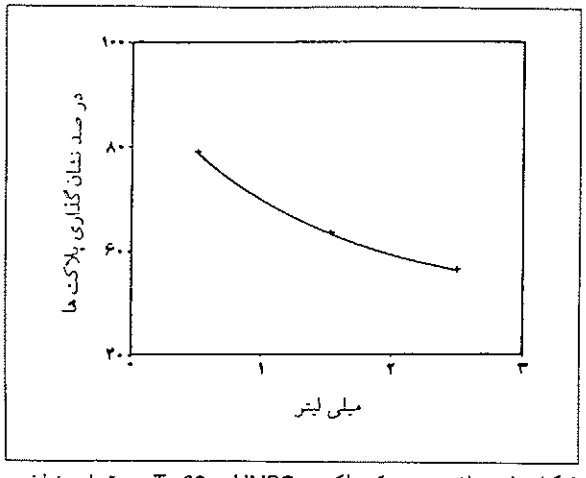
شکل ۲ - تاثیر غلظت تروپولون بر مقدار نشان گذاری پلاکت ها با In-113 Tropolone.



شکل ۴ - تاثیر اکتیویته پرتکنتات سدیم بر مقدار نشان گذاری پلاکت ها با Tc-99m Sn-GHA.



شکل ۳ - تاثیر PH محلول ACD-Saline بر مقدار نشان گذاری پلاکت ها با In-113-Tropolone.



شکل ۵ - تاثیر حجم کمپلکس Tc-99m HMPO بر مقدار نشان گذاری پلاکت ها.

بحث

امروزه اهمیت نشان گذاری پلاکت ها برای تشخیص انواع ترومبوز، نارسایی عروقی، تعیین کنتیک پلاکت ها و دیگر استفاده های بالینی موجب شده تا رادیوداروهای مختلفی مورد بررسی قرار گیرند. خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب Tc-99m و In-111 و همچنین قابلیت تشکیل کمپلکس های متنوع توسط این دو رادیونوکلئید با لیگاندهای گوناگون، کاربرد روزافزون آنها را در زمینه های مختلف پزشکی هسته‌ای، فراهم آورده است. به همین منظور چهار ترکیب از میان کمپلکس هایی که برای نشاندار کردن پلاکت ها مورد استفاده قرار گرفته اند، جهت مطالعه در این بررسی انتخاب شدند. همچنین جهت دست یابی به شرایط بهینه در نشان گذاری، تاثیر عوامل گوناگون مورد توجه قرار گرفت.

از جمله عوامل مشترک در نشان گذاری، غلظت "حامل‌یون" (Ionophore) در موقع به کارگیری کمپلکس های In-113m است. این ترکیب چربی‌دوست با رخنه در پروتئین های غشایی، با کاتیون های خاصی، کمپلکس به وجود می آورد و عبور آن ها را از غشا تسهیل می کند (۸). "حامل‌یون های" مناسب برای In^{+3}-113m،

اکسین سولفات و تروپولون می باشند که کمپلکس حاصل با عبور از غشاء پلاکت ها تفکیک شده و پس از تعویض لیگاند، یون In^{+3}-113m از عامل کی لیت کننده جدا شده و به لیگاندهای موجود در اجزاء درون سلولی متصل می شود (۹) و به این ترتیب رادیونوکلئید در سلول، تثبیت شده و آنرا نشاندار می کند. بررسی غلظت "حامل یون" در این مطالعه نشانگر وجود یک قله (peak) در منحنی غلظت است. وجود "حامل یون" مازاد موجب آزاد شدن In-113m از پلاکت های نشاندار می شود. از آنجا که یون In^{+3}-113m بین مکان های پیوندی درون پلاکت ها و "حامل یون" محیط، در حال تعادل است (۱۰) افزایش غلظت "حامل یون" ممکن است موجب کنده شدن ایندیم از مکان های درون سلول و پیوند آن با "حامل یون" موجود در محیط شود.

وقتی میزان اکتیویته $In\text{-}113mCl_3$ از حد معینی بیشتر می شود، مقدار نشان گذاری کاهش می یابد، که می تواند مربوط به اشباع بودن محیط واکنش از In^{+3}-113m باشد.

نشان گذاری پلاکت ها مستلزم وجود زمانی معین برای انکوباسیون پلاکت ها با رادیودارو است تا آمیزش (incorporation) بین آن دو انجام شود. اصولاً هر قدر زمان برای عمل نشان گذاری کوتاه تر باشد، امکان زنده ماندن پلاکت ها بیشتر می شود. تعداد پلاکت های لازم در آمیزش پلاکت و رادیودارو، عامل مهمی در افزایش مقدار نشان گذاری است. در این بررسی به دلیل دشواری شمارش، به جای تعداد پلاکت ها، حجم خون مصرفی تغییر داده شد. افزایش مقدار نشان گذاری پلاکت ها با تعداد پلاکت ها رابطه مستقیم دارد. در صورت امکان و به هنگام ضرورت می توان حجم خون مصرفی را تا حد معینی افزایش داد ولی نه به حدی که آسیبی متوجه بیمار شود.

مناسب ترین PH محیط انکوباسیون در حدود ۶/۵ (PH بحرانی پلاکت ها) است. این مقدار در مورد رادیوداروهای مختلف ثابت نیست، به طوری که محیط انکوباسیون Tc-99m-HMPAO نسبت به PH قلیایی، بسیار حساس بوده و موجب به هم چسبیدن پلاکت ها و کاهش مقدار نشان گذاری می شود. نشان گذاری پلاکت ها با Tc-99m-HMPAO در محیط پلاسما بازدهی مناسبی دارد. پلاسما در غلظت های بالا، زمانی که محیط انکوباسیون از پلاسما به مخلوط پلاسما-ACD تغییر می یابد، باعث کاهش تراوائی غشاء پلاکت ها و مقدار نشان گذاری می شود.

(در این بررسی بعلت عدم دسترسی به In-111 از جنراتور Sn-113-In-113m با خواص شیمیائی مشابه، استفاده شد.)

منابع

1. Knight LC: Thrombus-localizing radiopharmaceuticals. In "radiopharmaceuticals: progress and clinical perspectives", Fritzberg AR, Vol. 2, CRC press Inc, 1986, ch.2.

2. Thakur ML. Indium-111 labeled platedlets: studies on preparation and evaluation of in vitro and in vivo functions. Throm Res 9: 345-357,1976.

3. Hill-Zobel RL. Effects of chelates and incubation media on platelet labeling with indiun-111. J Nucl Med 28: 223-228; 1987.

4. Dewanjee MK. Indium-111-tropolone: a new high-affinity platelet label: preparation and evaluation of labeling parameters. J Nucl Med, 22: 981-987; 1981.

5. Dewanjee MK. In-111-tropolone, a new tacer for platelet labeling. Radiology 145: 149-153; 1982.

6. Portillo MC. Radiolabeling of human platelets using for radiopharmaceuticals with Tc-99m. DGEN-MN-92-3; 1991.

7. Becker W. Tc-99m-HMPAO labeled human platelets: In vitro and in vivo results. Eur J Nucl Med 15: 296-301; 1989.

8. Choli HO. Mechanism of ionophoric transport of In-111 cations through a lipid bilayer membrane. J Nucl Med 28: 91-96; 1987.

9. Hwang KJ. Modes of interaction of (In^{3+})-8-hydroxyquinoline with membrane bilayer. J Nucl Med 19: 1162-1170; 1978.

10. Scheffel U. Labeling of human platelets with [In-111]-8-Hydroxyquinoline. J Nucl Med 20: 524-531; 1979.