تهیه کیت ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG جهت تعیین نقاط عفونی و التهابی در بدن انسان

دکتر محمدحسین بابائی، محمد شفیعی، پیام بهرادکیا، دکتر رضا نجفی

بخش رادیوایزوتوپ، مرکز تحقیقات هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران

چکیده

تصویربرداری ازنقاط عفونی و التهابی به روش سینتی گرافی یک روش قدرتمند تشخیصی درمعالجه بیماران مبتلا به بیماریهای عفونی و التهابی می باشد. یکی از عوامل مورد استفاده در این باره، ایمونوگلوبولین G انسانی (hIgG) نشاندار شده با تکنسیم-99m است.استفاده از هیدرازینو نیکوتینیک (HYNIC) جهت نشاندارسازی پروتئین ها و پپتیدها با تکنسیم-99m روشی مناسب می باشد، زیرا کمپلکسی پایداربا اکتیویته ویژه بالا ایجاد می نماید. در این مقاله روش تهیه کیت استریل و آپیروژن 99mTc-HYNIC-hIgG ارائه شده است تهیه این کیت بصورت دو مرحله‌ی است، که در مرحله اول ۷٤۰ MBq پرتکنتات به کیت شماره ۱ که محتوی کلرورقلع و تریسین است اضافه می شود پس از ۵ دقیقه محتویات آن به کیت شماره ۲ که محتوی HYNIC-hIgG است منتقل می گردد. که درصد نشاندارسازی پس از ۱ ساعت به بیش از ۹۰ درصد می رسد. کمپلکس بدست آمده در محیط، محلول سیستئین و سرم پایدار می باشد.

واژه‌های کلیدی: *ایمونوگلوبولین G انسانی (hIgG)، هیدرازینونیکوتینیک (HYNIC) شلاتور، عفونت، التهاب*

مقدمه

تعیین نقاط حاد، تحت حاد و مزمن عفونی و التهابی یکی از مسائل مهم در مطالعات بالینی می باشد زیرا این امر ممکن است دلایل مهمی برای معالجه بیماران مبتلا به بیماری عفونی و التهابی باشد. توصیف وتشخیص دقیق نقاط التهابی برای ارائه اختصاصی ترین روش درمان توسط پزشکان از اهمیت بالائی برخورداراست. اگر تاریخچه بالینی ومعاینات فیزیکی مشکوک باشند پزشک میتواند از چندین روش تشخیصی یکی را انتخاب نموده تا محل، وسعت و شدت بیماریها را تعیین نماید. اختراعات رادیولوژی بسیار حساس مثل MRI وSCT قادرند محل نسبی ناهنجاریهای کوچک را تشخیص دهند. با این وجود این روشهای رادیولوژیک ازتغییرات شکل بافت جهت ارائه تصویر استفاده می کنند. لذا این روشها درمراحل اولیه عفونت صحت کمتری دارند و قادر نیستند بین پروسه های فعال از تغییرات آناتومیکی بواسطه عفونت بهبود یافته یا بعد از جراحی (اسکاربافتی) تشخیص قایل شوند(۱). درپزشکی هسته ای یک ترکیب نشاندارشده (رادیودارو) عمدتا بصورت وریدی تزریق میشود و توزیع رادیواکتیو درتمام بدن با استفاده از یک دوربین گاما مشخص می گردد. رادیوداروهای مورد استفاده درتصویربرداری ازنقاط عفونی و التهابی درچنین نقاطی بدلیل تغییرات شرایط فیزیولوژی موضعی تجمع می یابند. بنابراین تصویربرداری سینتی گرافی به تغییرات شکل بافت بستگی ندارد بلکه براساس پروسه های فیزیکی وشیمیائی بافتها انجام می شود. لذا تکنیکهای سینتی گرافی می توانند نقاط عفونی رادرمراحل اولیه آنها تشخیص دهند، درست زمانی که هنوز تغییرات شکل بافتی ظاهر نشده اند، بعلاوه تصویربرداری باروش سینتی گرافی یک روش عالی غیرتهاجمی برای بررسی تمام بدن میباشد که می توان وسعت عفونت یا التهاب را در تمام بدن مشخص کند(۱).

اغلب نقاط عفونی و التهابی را میتوان بدرستی با لکوسیتهای نشاندارشده خود فرد مشاهده کرد، در واقع

این روش بعنوان روش استاندارد طلائی (gold standard) جهت تعیین نقاط عفونی و التهابی شناخته شده است. لکوسیت های فرد را می توان بصورت ex vivo با تکنسیم-99m یا ایندیم-111 نشاندارنمود. بر این اساس، در بخش رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته ای سازمان انرژی اتمی کیت HMPAO جهت نشاندارسازی لکوسیت ها با تکنسیم-99m فرموله و به مراکز پزشکی هسته ای ارائه شده است. اما تهیه این رادیودارو دشوار بوده و مستعد آلودگیهای خونی میباشد. لذا در این بخش بر آن شدیم تا کیتی ساده و قابل کاربرد جهت این منظور ارائه نمائیم. ^{99m}Tc-hIgG بدلیل تجمع مناسب در نقاط عفونی، نداشتن عوارض جانبی، قیمت پائین و تهیه آسان، رادیودارویی مناسب برای این منظور تشخیص داده شد(۲،۳).

یک روش جدید برای نشان دار کردن پروتئین ها و پپتیدها با تکنسیم-99m استفاده از ٦-هیدرازینوپیریدین-۳-کربوکسیلیک اسید (HYNIC) است. با آزمایشاتی که تاکنون صورت گرفته ، مشخص شده است که کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-Protein پایدار بوده و دارای اکتیویته ویژه بالائی است(٤).

در این آزمایش، از ایمونوگلوبولین G انسانی، کیتی سرد با قابلیت نشاندارشدن با تکنسیم-99m با استفاده از مشتق هیدرازین نیکوتین آمید تهیه شده است.

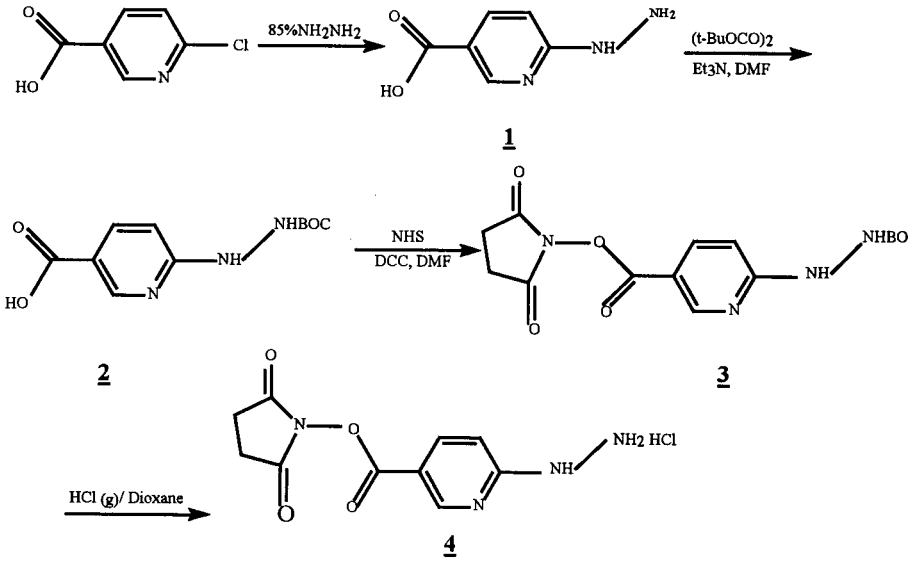
مواد و روش‌ها

الف- تهیه HYNIC-hIgG :

ابتدا سوکسینیمیدیل ٦-هیدرازینوپیریدین ۳-کربوکسیلات هیدروکلراید سنتز گردید(۱). مراحل تهیه این ترکیب در شکل ۱ خلاصه گردیده است(٤).

ب- تهیه کیت HYNIC-hIgG :

محلولی از IgG (I.V.-Globulin S, Green Cross Plasma Derivatves Corp., Korea)در فسفات بافر ۰/۱ مولار با pH = 7.8 با غلظت 5mg/ml تهیه گردید. به آن ٤ برابر نسبت مولی از محلول تازه تهیه شده SHNH (٤) در دی‌متیل‌فرمامید (30mM in DMF) بصورت قطره قطره اضافه شد. مخلوط فوق در حالیکه از نور محافظت شده بود، بمدت ٥ ساعت در درجه حرارت اتاق هم زده شد. سپس سانتریفوژ شده (10000g, 5 min) تا رسوبات گرفته شوند. محلول حاصل در مقابل یک محلول 10mM سیترات بافر با pH =5.2 در ٤ درجه سانتیگراد دیالیز گردید (٥ بار تعویض محلول بافر در مدت ٢٤ ساعت). محلول فوق از یک فیلتر ۰/۲ µm عبور داده شد و غلظت آن بروش لوری(٥) اندازه گیری گردید. محلول حاصله با بافر 100mM NaCl, 20mM Citrate, 1%Mannitol, pH5.2 تا غلظت 1 mg/ml رقیق شده و پس از استریل کردن با فیلتر استات سلولز 0.22µm در حجمهای یک میلی لیتری تقسیم شده و لیوفیلیزه شدند(٤).



شکل ۱- مراحل تهیه سوکسینیمیدیل ۶- هیدرازینوپیریدین ۳- کربوکسیلات هیدروکلراید (SHNH)

جهت تعیین تعداد گروههای هیدرازینو بر روی هر ملکول IgG از ترکیب پارا نیترو بنزآلدئید استفاده شد که این ماده قادر است گروههای هیدرازینو را به هیدرازون مربوطه تبدیل نماید، که این ماده آخری دارای جذب نوری در ۳۸۵ نانومتر می باشد(extinction coeffient = 2.53 * 10^4 $l.mol^{-1}cm^{-1}$).

ج- تهیه کیت کلرورقلع - تریسین :

۸۰ میکرولیتر از محلول کلرورقلع (غلظت 50 mg/ml در محلول 0.1N HCl که بمدت ۲ ساعت با گاز نیتروژن دگاز شده است)به ۵۰ میلی لیتر از محلول 20mM تریسین pH=7.1 (که بمدت یک ساعت با گاز نیتروژن دگاز شده است)اضافه شد. محلول فوق از یک فیلتر نیترات سلولز 0.22 µm عبور داده شده سپس در حجمهای ۰/٤ میلی لیتری تقسیم شده و لیوفیلیزه شدند(٦).

د- تهیه کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG :

به کیت کلرورقلع - تریسین اکتیویته ای معادل 20 - 40 mCi/1ml اضافه شد و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس کمپلکس حاصله ^{99m}Tc(tricine)$_2$ به کیت HYNIC-hIgG اضافه شده و بمدت ٦۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید.

ه- آزمایشات کنترل کیفی :

۱- بازده نشاندارسازی کیت کلرورقلع - تریسین: درصد خلوص رادیوشیمیائی ^{99m}Tc(tricine)$_2$ با استفاده از روش TLC تعیین می شود. از کاغذ واتمن شماره ۳ بعنوان فاز ثابت و محلول سالین و استن بعنوان فاز متحرک استفاده شد که در سیستم سالین R_f (^{99m}Tc-tricine, ^{99m}TcO$_2$)=0 و R_f (^{99m}TcO$_4^-$)=1 می‌باشد و در سیستم استن R_f(^{99m}TcO$_2$)=0 و R_f(^{99m}TcO$_4^-$, ^{99m}Tc-tricine)=1 می‌باشد.

۲- بازده نشاندارسازی کیت HYNIC-hIgG : درصد خلوص رادیوشیمیائی ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG با استفاده از روش TLC و ستون سفادکس G25 تعیین می‌شود. از کاغذ واتمن شماره ۳ بعنوان فاز ثابت و محلول سالین بعنوان فاز متحرک استفاده شد که در سیستم سالین R_f (^{99m}TcO$_2$, ^{99m}Tc-HYNIC-IgG) = 0 و R_f (^{99m}TcO$_4^-$)=1 می‌باشد. برای تعیین درصد ^{99m}TcO$_2$ مقدار ۵۰ µCi از کمپلکس را برروی ستون سفادکس G25 به ابعاد ۱۰ × ۲ cm قرار داده شد. سپس ستون با ۳ برابر حجم با فسفات بافر سالین شستشو داده شد.آنگاه اکتیویته باقی مانده برروی ستون اندازه گیری گردید که نشان دهنده اکتیویته ^{99m}TcO$_2$ است.

۳- پایداری کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG در دمای محیط : پس از تشکیل کمپلکس، در ساعات مختلف تا ۲٤ ساعت، پایداری کمپلکس با روش TLC اندازه گیری گردید.

٤- پایداری کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG در سرم تازه : ۱۰-۱ µg از آنتی بادی نشاندارشده معادل ۱۰۰-۱۰ µCi به یک میلی لیتر سرم انسانی تازه تهیه شده اضافه و در ۳۷ °C همراه با تکان دادن ملایم به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد. در زمان های مختلف میزان پایداری توسط Sephadex G50 و ITLC محاسبه گردید.

۵- پایداری کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG در محلول سیستئین : در محلولی از آنتی بادی نشاندارشده، غلظتی از محلول سیستئین ریخته شد، بطوریکه نسبت مولی سیستئین به آنتی بادی ۰/۵ و ۵۰۰ گردید. بعد از یک ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ °C، پایداری کمپلکس نشاندارشده با روش ITLC بررسی شد.

٦- بررسی توزیع حیاتی کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG در invivo : برای اندازه گیری میزان تجمع آنتی بادی نشاندارشده در بافت های مختلف در موش سوری، مقدار ۱۰۰ µl آنتی بادی نشاندارشده که معادل ۳۰-۱۰ µg پروتئین و ٤MBq اکتیویته است، از طریق ورید دمی به سه گروه سه تائی موش سوری تزریق شد.۱، ٤ و ۲٤ ساعت پس از تزریق، موشها در اتر کشته شده و اعضاء مورد نظر شامل خون، کبد، طحال، مثانه ،کلیه ،معده ،روده ها ،قلب ،مغز استخوان،استخوان ،عضله ،ریه ،تیروئید ،پوست و مغز جدا شده ،بعد از توزین ،مقدار اکتیویته موجود در آ نها توسط شمارنده گاما شمارش گردید. آنگاه متوسط درصد دوز جذب شده در هر گرم بافت (%ID/g tissue) همراه با انحراف استاندارد محاسبه شد.

یافته‌ها

۱- بازده نشاندارسازی کیت کلرورقلع - تریسین: کمپلکس ^{99m}Tc(tricine)$_2$ پس از ۵ دقیقه به بیش از ۹۵٪ می‌رسد و مقدار ^{99m}TcO$_2$ کلوئیدی کمتر از ۲٪

است.

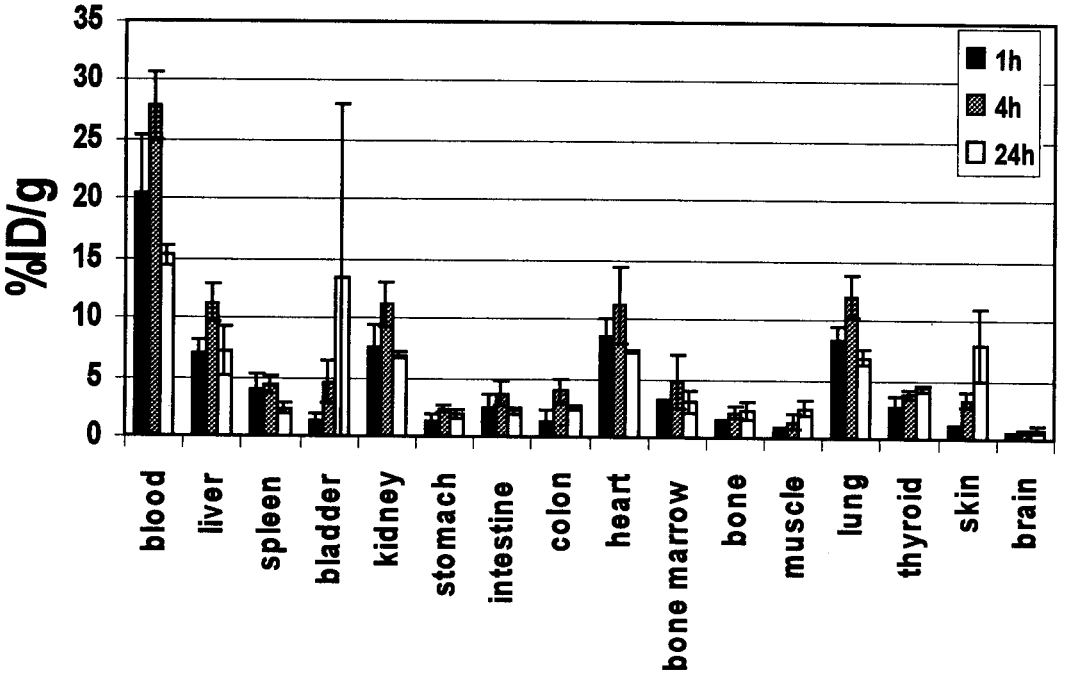
۲- بازده نشاندارسازی کیت HYNIC-hIgG : کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG پس از یکساعت به بیش از ۹۰٪ می رسد.

۳- پایداری کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG : این کمپلکس در محیط، سرم و محلول سیستئین کاملا پایدار است که این پایداری حتی تا ۲٤ ساعت حفظ می شود.

٤- بررسی توزیع حیاتی کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG در in vivo نتایج این آزمایش در جدول ۱ و شکل ۱ آمده است.

جدول ۱. بررسی توزیع حیاتی کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG در موش های سوری طبیعی در ساعت‌های مختلف (۱، ۴ و ۲۴ ساعت) پس از تزریق داخل وریدی (مقدار اکتیویته موجود در هر بافت بصورت درصد دوز تزریق شده در هر گرم بافت (%ID/g) همراه با انحراف استاندارد (n=۳) بیان شده است).

ردیف	بافت	ID/g ± SD after % 1hr.	ID/g ± SD after % 4 hrs.	ID/g ± SD % after 24 hrs.
۱	خون	۲۰/۴±۴/۹	۲۷/۸±۲/۸	۱۵/۳± ۰/۸
۲	کبد	۶/۷±۱/۷	۱۱/۲±۱/۶	۷/۲±۲/۱
۳	طحال	۳/۹±۱/۴	۴/۴±۰/۸	۲/۳±۰/۵
۴	مثانه	۱/۴±۰/۵	۴/۶±۱/۸	۱/۴±۰/۵
۵	کلیه	۷/۷±۱/۹	۱۱/۱±۱/۹	۶/۹±۰/۳
۶	معده	۱/۴±۰/۶	۲/۳±۰/۳	۱/۷±۰/۴
۷	روده بزرگ	۱/۴±۰/۸	۳/۹±۱	۲/۵±۰/۱
۸	روده کوچک	۲/۵±۱	۳/۶±۱	۲/۲±۰/۲
۹	قلب	۸/۵±۱/۶	۱۱/۲±۳/۳	۷/۳±۰/۱
۱۰	مغز استخوان	۳/۰±۰/۲	۴/۷±۲/۲	۳/۱±۰/۹
۱۱	استخوان	۱/۲±۰/۳	۲/۲±۰/۵	۲/۲±۰/۷
۱۲	عضله	۰/۸±۰/۱	۱/۴±۰/۷	۲/۵±۰/۶
۱۳	ریه	۸/۳±۱/۲	۱۲/۰±۱/۸	۶/۹±۰/۷
۱۴	تیرویید	۲/۶±۱	۳/۸±۰/۴	۴/۳±۰/۳
۱۵	پوست	۱/۰±۰/۱	۳/۳±۰/۷	۸/۰±۳
۱۶	مغز	۰/۴±۰/۱	۰/۶±۰/۱	۰/۸±۰/۳



شکل ۱. نمودار توزیع حیاتی کمپلکس ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG در موش های سوری طبیعی در ساعت های مختلف (۱، ۴ و ۲۴ ساعت) پس از تزریق داخل وریدی (مقدار اکتیویته موجود در هر بافت بصورت درصد دوز تزریق شده در هر گرم بافت (%ID/g) همراه با انحراف استاندارد (n=۳) بیان شده است).

بحث و نتیجه‌گیری

روش های مختلفی برای نشاندار کردن پروتئین ها بصورت اعم و آنتی بادی ها بطور اخص پیشنهاد شده است. از جمله روش مستقیم که در آن ^{99m}Tc بصورت مستقیم به اتم های الکترون دهنده پروتئین اتصال می یابد و یا از روش دیگری که در آن رادیوایزوتوپ با شلاتور سنتزی که به پروتئین کانژوگه شده است (ترکیبات شلاتور دو عاملی) ایجاد پیوند می کند(۷).

گرچه روش مستقیم در مطالعات مربوط به نشاندار کردن سرم آلبومین انسانی (HSA) و خون خیلی متداول بوده ولی در مطالعات مربوط به آنتی بادی ها به علت ناپایداری ترکیب ایجاد شده کمتر مورد نظر می باشد . در این روش پل دی سولفیدی در ساختمان مولکول آنتی بادی با استفاده از ترکیب ۲-مرکاپتواتانول (2-mercaptoethanol) احیاء می‌شود. آنتی بادی احیاء شده پس از تهیه برای استفاده در شرایط مناسب نگهداری می گردد. در این روش از آنجا که تمایل اتم های الکترون دهنده در پروتئین به ^{99m}Tc از درجات متفاوتی برخوردار بوده ، این منجر به ناپایداری کمپلکس تکنسیم - آنتی بادی با گذشت زمان خواهد شد . علاوه بر این در بعضی از روش ها که در آن پرتکنتات احیاء می گردد، مقادیر قابل توجهی از آنتی بادی نشاندار شده بصورت کلوئیدی بوجود می آید و این باعث تجمع عوامل نشاندار در سیستم رتیکولو آندوتلیال (reticuloendothelial) می‌شود.

بعضی از مشکلات ذاتی که در روش های مستقیم ،شلاتور دو عاملی و دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید(DTPA) وجود دارند درمطالعات قبلی بخوبی مورد بررسی قرار گرفته اند . این مطالعات شامل مقایسه توزیع بیولوژیکی بین آنتی بادی نشاندار شده با این روش ها و آنتی بادی - کونژوگه نشاندار شده با ^{111}In می باشد(۸).

۱ ساعت پس از تزریق، کونژوگه آنتی بادی -

DTPA نشاندار شده با ^{99m}Tc و ^{111}In از نظر توزیع بیولوژیک مشابهت بسیار خوبی از خود نشان می دهند ولی در روش نشان گذاری بصورت مستقیم ، مقدار زیادی از اکتیویته در کبد و طحال متمرکز می شود . ۲۰ ساعت پس از تزریق اختلاف بین توزیع بیولوژیکی کونژوگه آنتی بادی ـ DPTA نشان دار شده با ^{111}In و ^{99m}Tc ، به میزان قابل ملاحظه ای افزایش می یابد . این نتایج نشان می دهد که پایداری (in vivo) کونژوگه آنتی بادی ـ DPTA نشان دار شده با ^{99m}Tc به مراتب بیشتر از نشان گذاری به روش مستقیم بوده ولی کمتر از پایداری کونژوگه آنتی بادی ـDTPA نشاندار شده با ^{111}In می باشد. در آزمایشات اخیر و در این مقاله نشان داده شده که کیت هیدرازینونیکوتین آمید ـhIgG نشاندار شده با ^{99m}Tc دارای پایداری(in vitro) بسیار بالایی در سرم می باشد . مشابهت قابل توجه توزیع بیولوژیکی ^{99m}Tc-IgG و ^{111}In-IgG نشان می دهد که این دو رادیودارو از لحاظ پایداری (invivo)بسیار نزدیک بهم می باشند . علاوه بر این مشاهده اینکه دفع این رادیودارو از خون در مقایسه با ^{111}In-IgG کندتر بوده ، نشانگر این است که ساختمان پروتئینی آنتی بادی در روش نشانگذاری با HYNIC بخوبی حفظ گردیده و پایدار می باشد.

بر اساس نتایج حاصله از توزیع بیولوژیکی در محاسبات MIRDOSE می توان با تزریق حدوداً ۲۰mCi از رادیوداروی ^{99m}Tc-IgG را بدون آنکه اثرات تشعشعی سوئی بیش از ۲ rad را نسبت به هر اندام داشته باشد انجام داد. با توجه به خواص فیزیکی ^{111}In, ^{99m}Tc، فلاکس(flux) فوتونی ^{99m}Tc دربافت ،۱۸ ساعت پس از تزریق می بایست ۳ برابر ^{111}In باشد در صورتیکه مقدار ^{99m}Tc تزریق شده ۱۰ برابر مقدار ^{111}Inباشد. علاوه بر این بعلت ویژگی های ذاتی در ^{99m}Tc و همچنین فلاکس فوتونی بالا در مراحل ابتدائی (۱۰/۳۳ mCi و ٦ ساعت پس از تزریق ۲۰ mCi ^{99m}Tc-IgG و در مقایسه با ۱/۸۸ mCi برای ۲mCi، ۲ ساعت پس از تزریق ^{111}In-IgG ، این رادیودارو را میتوان جایگزین بسیار خوبی برای تصویربرداری از بافت های التهابی که در آنها مقدار پروتئین افزایش یافته محسوب نمود.

لازم به توضیح است که آزمایشات انجام شده توسط گروه ما و مقایسه این نتایج در تهیه رادیوداروی^{99m}Tc-HYNIC-hIgG به روش یک کیتی($^{99m}Tc+SnCl_2+$ Tricine+HYNIC-hIgG) در یک ویال و روش دو کیتی kit No.1 ($^{99m}Tc+SnCl_2$+Tricine) در یک ویال و(kit No.2(HYNIC-hIgGدر ویال دیگر نشان می دهد که نتایج قبل از اعمال خلاء خشک (لیوفیلیزه) شبیه به هم بوده و درصد نشان‌گذاری برای هر دو ویال بالا می‌باشد ولی پس از اعمال خلاء خشک ، در روش یک کیتی درصد نشان گذاری کاهش ولی در مورد روش ۲ کیتی همچنان درصد بالای نشان گذاری به قوت خود باقی است .

در خاتمه نتایج این آزمایشات مؤید این موضوع است که کیت ^{99m}Tc-HYNIC-hIgG مشابه خوبی برای ^{111}In-IgG در تعیین نقاط عفونی می باشد . این رادیودارو بعلت نداشتن عوارض جانبی ، قیمت پائین و روش تهیه آسان رادیوداروی مناسب برای این منظور می باشد .

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می دانند از زحمات و همکاری آقایان محمد مزیدی، حسن میرفلاح و حسین حمزه و خانمها محمودخان و ذوقی در بخش رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته ای سازمان انرژی اتمی ایران تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1) Datz FL, Morton KA New radiopharmaceuticals for detecting infection. Invest Radiol 1993; 28:356-365.

2) Oyen WJG, Boerman OC, Storm G et al. Detecting infection and imflammation with technetium-99m-labeled Stealth® liposomes J Nucl Med 1996; 37:1392-1397.

3) Thakur JL , Marcus CS, Henneman P et al.

Imaging inflammatory diseases with neutrophil-specific technetium –99m labeled monoclonal anti-SSEA-1. J Nucl Med 1996; 37: 1789-1795.

4) Abrams MJ, Juweid M, Tenkate CI, Schwartz DA, Technetium –99m human plycolonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotiamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. J Nucl Med 1990; 31: 2022-2028.

5) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ, Protein measurement with the folinphenol reagent. J. Biol.Chem. 1951;193, 265-272.

6) Prepartion of HYNIC labeled annexim V, United States Patent: 6,197,278 Page 1.

7) Mather SJ, Ellison D, Reduction – mediated technetium –99m labeling of monoclonal antibodies. J Nucl Med. 1990; 31, 692-697.

8) Childs RL, Hnatowich DJ. Optimum condition for labeling of DTPA –coupled antibodies with technetium-99m. J Nucl Med 1985; 26:293-299.