ساخت کیت MSA جهت سنتی گرافی از ریه در ایران

علی اصغر یراقچی و دکتر رضا نجفی

بخش تولید رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران

چکیده

کیت رادیوداورویی میکروسفر سرم آلبومین خون (MSA) بلحاظ اهمیتی که در تشخیص بیماریهای ریوی ازطریق سنتی گرافی دارد، یکی از چند کیت رادیوداورویی است که تاکنون در گروه رادیوایوتوپ مرکز تحقیقات هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران ساخته شده است، و جهت مصرف به بخش‌های پزشکی هسته‌ای کشور ارسال می‌شود. ساخت کیت میکروسفر درطی دو مرحله صورت می‌گیرد که شامل: ۱ـ ساخت ذرات کروی آلبومین با اندازه‌های استاندارد ۲ـ فرمولاسیون آن بعنوان یک کیت رادیوداورویی. این کیت در کوتاهترین زمان ممکن براحتی با رادیوایزوتوپ TC-99m نشاندارشده و می‌تواند ازطریق تزریق وریدی در زمان کمتر از ۱۵ دقیقه بیشتر از ۹۵٪ از ذرات میکروسفر، حدود ۰/۲ درصد از مجموع مویرگهای ریه را مسدود سازند. نیمه عمر بیولوژیکی ذرات میکروسفر در ریه حدود ۴ ساعت و تعداد و اندازه ذرات در کیت کنترل شده می‌باشد. این کیت بصورت استریل و آپیروژن در ویالهای تزریقی به‌فرم لیوفیلیزه عرضه می‌گردد.

مقدمه (۱)

ایدهٔ بکارگیری میکروسفرهای با قطر ۲ تا ۳ برابر مویرگها انگیزهٔ جالبی برای فیزیولوژیست‌ها بوده تا جریان گردش خون را مورد مطالعه قراردهند.

اولین بار اسپورها و بعد موم یا ذرات کوچک شیشه‌ای بکارگرفته شد، این ذرات ازطریق سرخرگ تزریق و ازطریق سیاهرگ بازپس گرفته می‌شدند و با عمل شمارش ذرات کلیرانس آنها را اندازه می‌گرفتند. برای اولین بار ایمینگر (Emmenegger) و همکارانش میکروسفرهای نشاندار شده با عناصر رادیواکتیو را مورد استفاده قراردادند. آنها میکروسفرهای موم را در یک راکتور هسته‌ای قرارداده و با بمباران آنها، سدیم موجود در موم را آکتیو می‌کردند.

بعدها،میکروسفرهای سرامیکی و همینطور رزینی نشاندارشده در اسکن ریه استفاده شد. اما مشکل اینجا بود که هیچکدام از این میکروسفرها قابلیت تجزیه بیولوژیکی تدریجی (Biodegradable) در خون را نداشتند. لذا این تحقیقات منجر به ساخت ماکروآگرایگیت (Macroaggregate) آلبومین نشاندارشده با I_{131} گردید و بعنوان یک رادیوداروی اسکن ریه معرفی گردید (۱۱). سپس ساخت میکروسفر آلبومین ازطریق توزیع محلول آلبومین در روغن با حرارت‌دادن مستقیم روش دیگری بود که ارائهٔ آن جایگاه کلینیکی ویژه‌ای پیدا نمود. ازجمله مواد رادیواکتیوی که برای نشاندارکردن میکروسفر سرم آلبومین خون استفاده می‌شد ^{113m}In (ایندیم) و ^{113}I (ید) و ^{203}pb (سرب)بود، اما با معرفی رادیوایزوتوپ تکنزیوم ۹۹m (^{99m}Tc) به‌لحاظ دلایلی چون نیمه عمر فیزیکی، انرژی تشعشعی و قدرت پیوند مناسب و همینطور قیمت مناسب آن، اهمیت ویژه‌ای جهت نشاندارکردن میکروسفر سرم آلبومین پیداکرد.

از زمان معرفی میکروسفرها در سال ۱۹۶۸ تاکنون میکروسفر سرم آلبومین خون باتوجه به مزیت‌های زیر کاربردهای مهمی را در امر تشخیص بیماریهای ریوی پیدانموده است.

۱) امکان کنترل کردن اندازه و تعداد میکروسفرها در یک دوز تزریقی.

۲) داشتن قابلیت بالا در نشاندارساختن با مواد رادیواکتیو.
۳) کاربرد کلینیکی مطمئن.
۴) دفع از مویرگهای ریوی توسط عمل تجزیهٔ تدریجی.

روش ساخت

ساخت کیت میکروسفر سرم آلبومین برای سنتی‌گرافی ریه از دو قسمت، شامل ساخت میکروسفر آلبومین و سپس فرمولاسیون کیت تشکیل می‌شود. ساخت میکروسفر آلبومین به دوطریق امکان‌پذیر است:

الف ـ روش روغنی
ب ـ روش ایروسول

الف) در روش روغنی فرآیند تهیه میکروسفر طی سه‌مرحله صورت می‌گیرد (۸، ۴، ۱)

۱) امولسیون یا سوسپانسیون قطرات آلبومین در روغن
۲) انعقاد یا جامدسازی قطرات مایع آلبومین به میکروسفرهای سفت
۳) جداسازی و سایزبندی ذرات پس از شستشوی روغن از سطح ذرات به‌کمک حلال‌های آلی. (شکل ۱)

ب) روش ایروسول (۹، ۱۰): این روش سریع بوده و با توزیع مناسبی از اندازه ذرات که قابل کنترل و محدودکردن است، اندازه‌های دلخواه بدست‌می‌آید. (شکل‌های ۴-۲)

به‌لحاظ مزایای زیر روش دوم (ایروسول) مورد استفاده قرارگرفت:

۱) امکان تهیه در محیط کاملاً استریل.
۲) اندازه‌های ذرات درهنگام تهیه تقریباً هموژن و کاملاً قابل کنترل است.
۳) زمان کوتاه برای تهیه محصول.
۴) مزاحمت روغن موجود نیست.

اساس آن برمبنای چرخش سریع یک روتور است که به‌کمک جریان هوای فشرده در داخل یک استاتور با سرعت ماگزیمم ۳۰۰۰ دور در ثانیه می‌چرخد. سطح فوقانی روتور تخت و بصورت یک فرفره مخروطی شکل در داخل استاتور قرارمی‌گیرد. این سیستم در داخل یک محفظه استیل، زنگ‌نزن به ابعاد ۱۲۰×۶۰×۶۰ سانتیمتر تعبیه شده است که از بالا با ریزش منظم قطره‌قطره محلول سرم آلبومین ۱۰٪ برروی سطح روتور درحال چرخش، به قطرات بسیار کوچکتری شکسته شده به اطراف می‌پاشد. این قطرات کوچک ضمن نزول به کف محفظه توسط یک لامپ ۱۵۰ واتی که در زیر دستگاه ایروسول تعبیه شده و محیط را گرم می‌سازد حلال خود را (آب) به روش تبخیری ازدست داده بصورت ذرات کروی جامد در کف محفظه انباشته می‌شوند. سرعت روتور، غلظت محلول سرم آلبومین، کشش سطحی محلول و قطر روتور فاکتورهایی هستند که در اندازهٔ قطر ذرات میکروسفر نقش مؤثر دارند. درپایان، ذرات میکروسفر از کف محفظه جمع‌آوری و برای مدت ۶ ساعت در آون ۱۳۰° درجهٔ سانتی‌گراد قرارداده می‌شوند. این عمل (denaturing) قابلیت حل شدن آنها را کاسته، وضعیت ذرات را در حالت جامد تثبیت می‌کند. زمان و مقدار حرارت فاکتورهای مهمی هستند که مقدار نیم عمر بیولوژیکی میکروسفرهای آلبومین را در ریه تعیین می‌کنند. به‌عبارت دیگر ذرات آلبومین تمایل به جذب آب و متورم شدن دارند. درصد تورم و بزرگ شدن اندازهٔ آنها با زمان و مقدار حرارت داده شده نسبت عکس دارد. (شکل ۵) (جدول ۱). یعنی هرچه مقدار تورم بیشتر سرعت تجزیه و دفع از ریه‌ها سریعتر و برعکس تورم کمتر زمان توقف در ریه را بالامی‌برد (۸، ۲، ۱).

روش تهیهٔ کیت میکروسفر: در فرمولاسیون کیت میکروسفر سرم آلبومین خون انسان علاوه بر فاکتورهای ذکرشده مثل اندازه، تعداد و میزان تورم ذرات، قابلیت نشاندارشدن آلبومین با ^{99m}Tc حائز اهمیت بسیار است. ^{99m}Tc به‌عنوان یک ماده رادیواکتیو با نیمه عمر فیزیکی ۶ ساعت و انرژی ۱۴۰Kev به فرم شیمیایی پرتکنتات سدیم

$Na^{99m}TcO4$ ازطریق ژنراتور مولیبدن ـ تکنسیم در شرایط استریل تهیه می‌شود. این ماده به فرم احیاشده می‌تواند با پروتئین آلبومین تشکیل پیوند دهد.

عوامل مؤثر در فرمولاسیون کیت میکروسفر عبارتند از: کلرور قلع دوآبه ($sncl_2, 2H_2O$)، بعنوان یک ماده احیاکننده نقش مؤثری را در عمل نشاندارشدن ذرات میکروسفر آلبومین با ^{99m}Tc بازی می‌کنند. نشاندن (Tagging) ملکول‌های کلرور قلع برروی ذرات میکروسفری و پایدارکردن آنها بستگی به PH محلول، حرارت و مقدار کلرور قلع دارد. ازآنجاکه ذرات میکروسفر چسبنده و در محلول‌های آبی بسادگی ازهم جدا نمی‌شوند، مقدار کمی توئین (۸۰ ۶) بعنوان یک ماده شیمیائی پراکننده (disperser) یا امولسیون‌کننده به آن اضافه می‌شود و به کمک حمام سونی‌فایر که ارتعاشات مافوق صوت تولید می‌کند ذرات را کاملاً از یکدیگر جدامی‌سازیم. با افزودن محلول کلرور قلع و تنظیم PH به میزان معین محلول سوسپانسیون میکروسفر را در حمام آب جوش مدتی حرارت می‌دهیم تا اتصال کلرور قلع کاملاً بر سطح ذرات آلبومین تثبیت شود. (جدول ۲ و ۳) (شکل ۶). پس از سردکردن محلول سوسپانسیون میکروسفر آن را توسط فیلتر میلی‌پور با محلول رقیقی از توئین شستشو داده ذرات میکروسفر جداشده را در حجم معینی از سالین مجدداً پراکنده کرده آن را بین ویالهای کیت توزیع می‌کینم. (جدول ۴). نتایج تجربی و تحقیقاتی که برروی فاکتورهای مؤثر در فرمولاسیون کیت انجام گردید مقدار بهینه عوامل را جهت حداکثر مقدار نشاندارشدن ذرات میکروسفر با تکنسیم ۹۹m نشان می‌دهد.

نتایج

در بررسی نتایج حاصل از فرمولاسیون و نهایتاً کیت میکروسفر فاکتورهای مهمی چون تعداد، دامنه و توزیع اندازه‌ها، میزان درصد تورم، نیمه عمر بیولوژیکی ذرات در ریه، سمیت، مقدار قلع و درصد نشاندارشدن میکروسفرها با تکنسیم ۹۹m واستریلیته، آپیروژن و غیره و از نظر کنترل کیفیت مطرح می‌شوند.

۱) کنترل و بررسی تعداد ذرات میکروسفر کیت: شمارش ذرات میکروسفر را به دوطریق مورد آزمایش قرارداده‌ایم:

الف) با استفاده از لام نئوبار (neubauar) که در آزمایشات شمارش گلبول‌های خون مورد استفاده قرارمی‌گیرد.

ب) روش عکسبرداری از ذرات در زیر میکروسکوپ.

در روش دوم علاوه بر تثبیت نتایج شمارش ذرات با نئوبار با اختلاف ۲٪± مقدار درصد تورم و توزیع اندازه ذرات میکروسفری نیز بدست می‌آید. (به شکل‌های ۳ و ۴ مراجعه شود).

با استفاده از رابطهٔ زیر تعداد کل ذرات با سایزهای مختلف در میدان دید میکروسکوپ بطور تقریب محاسبه می‌شود.

$$N = \frac{V}{\frac{a}{100} \times v_1 + v_2 + \ldots\ldots + \frac{n}{100} \times v_n}$$

حجم سرم آلبومین خالص	V=
تعداد کل ذرات حاصل از حجم V	N=
تعداد شمارش‌شده برای هر سایز	a,b,... n
حجم هر ذره با سایز بدست‌آمده	$V_I, V_2, \ldots V_n$
حجم هر ذره	$V= \frac{4}{3} X R^3$

۲) نتیجهٔ بررسی نیمه عمر بیولوژیکی میکروسفر در ریه وتوزیع بیولوژیکی آن در موش‌های آزمایشگاهی (۱، ۲، ۵، ۸): نتیجهٔ بدست‌آمده از تزریق کیت میکروسفر به ۳۹ موش جهت بررسی زمان توقف ذرات تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق، در جدول ۵ و شکل ۷ نمایش داده شده است.

۳) تعیین مقدار قلع: مقدار درصد نشاندارشدن میکروسفر آلبومین با ^{99m}Tc بستگی مستقیم به مقدار Sn^{2+} دارد. با استفاده از کاغذ کروماتوگرافی در حلال استون متانول می‌توان درصد پرتکنتات ($^{99m}TcO_4^-$) واکنش نداده که به بالای کاغذ رانده می‌شود و نیز درصد نشاندارشدن میکروسفرها را با ^{99m}Tc که در مبدأ باقی می‌ماند را بدست آورد. تعیین مقدار قلع در کیت تنها ازطریق اسپکتروفوتومتری میسر است. به‌نحوی که با استفاده از معرف‌های کمپلکس‌دهنده چون فسفومولیبدات و سیانومولیبدات می‌توان یک کمپلکس رنگی با قلع ساخت و میزان جذب آنها را درطول موج‌های ۷۲۰ و ۴۶۰ نانومتر اندازه گرفت.

۴) بررسی مقدار سمیت (۲، ۱): با تزریق مقادیر مختلفی از میکروسفر به دسته‌های ۱۴تایی موش‌های آزمایشگاهی، مقدار LD50 طبق جدول ۶ بدست آمد.

جدول (۶)- بررسی مقدار سمیت و تعیین LD50

درصد مرگ ومیر	مقدار دز mg/kg
۲۱	۶۵
۳۰	۶۷
۳۵	۶۹
۵۰	۷۱-۷۲

۵) پایداری کیت نشاندارشده: پس از نشاندارکردن کیت با ^{99m}Tc آن را به فاصله‌های یک ساعت به یکساعت به موش‌های آزمایشگاهی تزریق نموده و تشریح کردیم تا ۶ ساعت بعد از نشاندارکردن کیت تمام نتایج تشریح خوب و تا میزان (۹۷-۹۶)٪ جذب در ریه را نشان می‌دادند. همچنین مقدار اکتیویته را می‌توان تا میزان ۴۰ میلی‌کوری مورد استفاده قراردارد.

باتوجه به آزمایشات مختلف و گرفتن نتایج مؤثر، فرمولاسیون کیت میکروسفر را به شرح زیر ارائه می‌دهیم.

میکروسفر سرم آلبومین	۳ میلی‌گرم
کلروراستانودی هیدراته $SnCl_2, 2H_2O$	۰/۳ میلی‌گرم
PH	۵/۵-۶
توئین ۸۰	۰/۰۵ میلی‌گرم
میزان اکتیویته تکنسیم ـ ۹۹m	(۴۰-۵) میلی‌کوری
حجم نهایی	۵-۶ میلی‌لیتر
تعداد ذرات میکروسفر	۷۵۰۰۰۰-۸۵۰۰۰۰ ذره
محدوده اندازه قطر ذرات	۸-۲۵ میکرون
درصد تورم ذرات در آب	٪۳۰
زمان واکنش بعد از افزودن پرتکنتات	۱۵ دقیقه

بحث

^{99m}Tc-Sn-MSA بعنوان یک مادهٔ مؤثر جهت سنتی‌گرافی از ریه برای تشخیص بیماریهای ریوی مثل آمبولی ریه (embolism)، آمفیزم (emphysema)، برونشیت مزمن (chronic bronchitis)، کارسینوم (carcinoma) و ... مورد استفاده قرارمی‌گیرد.

از مشخصه‌های میکروسفر در یک کیت MSA اندازه و پایداری نسبی آنها می‌باشد که براساس نتایج مورفومتری (۱، ۲) محدوده اندازه ذرات را بین ۸ تا ۵۰ میکرون گزارش کرده‌اند. امروزه شرکت‌های تولیدکننده کیت‌های میکروسفر اندازه قطر ذرات را بین دو محدوده ۴۵-۲۰ و ۲۵-۸ میکرون دسته‌بندی کرده‌اند. پایداری نسبی میکروسفر سرم آلبومین بستگی به میزان درجه و زمان حرارت در هنگام ساخت دارد (۸). منظور از حرارت‌دادن میکروسفر آلبومین خارج ساختن آنها از ماهیت طبیعی خودشان (denaturing) می‌باشد تا قابلیت حل‌شدن آنها در خون کاهش یابد. بطوری که حل‌شدن (Metabolizing) و دفع سریع آنها از بستر مویرگی ریه باعث اختلال در اسکن ریه می‌گردد. از طرف دیگر تأخیر زیاد در تجزیه (biodegrading) ممکن

است بیمـــار را بـــه‌خطر بیـــاندازد. لذا حـــرارت‌دادن بـــه میکروسفرها می‌بایست طوری صورت پـذیرد کـه بـاعث بوجودآمدن نیمه عمر بیولوژیکی بمدت ۳ تا ۵ ساعت در ریه گردد. (۱)

در تعیین مقدار دز تجویزی به انسان ازطرفی می‌بایست تعداد میکروسفرها را طوری انتخاب نمود که بتوان اسکـن منـــاسب از ریـــه بـــدست آورد و از ســـوی دیگـر تـعداد میکروسفرها آنقدر زیاد نباشد که باعث انسداد بیش‌از حـد مویرگها و افزایش فشار خون ریوی گردد. راهنمـای FDA (Food and Drug Administration) تـــعداد ذرات را برای قطرهای ۱۰ تا ۵۰ میکرون در یک اسکن ریه تا تقریباً ۲۵۰۰۰۰ ذره مجاز دانسته است. که این البته به وزن بـدن درحد ۱۰$\mu g/kg$ بستگی پیدامی‌کند که در یک فرد بالغ ۷۰ کیلوگرمی کمتر از یک میلی‌گرم میکروسفر خواهد شد. این مقدار نزدیک به (۰/۳-۰/۱)٪ از مجموع مویرگهـا و بسـتر سرخرگی ریه را مسدود می‌سازد (۱۳، ۱۲، ۱) (جدول ۷).

از زمان استفـادهٔ کـلینیکی ایـن دارو تـاکـنون بیمـاران مختلفی را بطور آماری جهت پیداکردن عوارض جانبی مورد ارزیابی قرارداده‌اند. آنچه که بیشتر مورد تأیـید واقـع شـده است علائم واکنش بیمار بیشتر بستگی به بزرگی و تعداد ذرات دز تزریقی داشته است تا به عوامل دیگـر. بـا ایـنکه خواص آنتی ژنتیکی مهمی برای آلبومین غیرطبیعی شـده (Denatured Albumin) مشاهده نشده است ولی بـطور معدود شـوک آنـافیلاکسـی (Anaphylactoid reaction) نسـبت بـه مـیکروسفر سـرم آلبـومین گـزارش شـده است (۱، ۲، ۳).

تشکر و قدردانی

موفقیت ساخت این کیت، مدیون همکـاریهای صمیمانهٔ افراد گروه رادیوایزوتوپ بویژه همکـاران ارجمند خانم طیبه هادی‌زاده و خانم شهناز طلوعی بوده است که بـدینوسیله از یکـایک آنهـا تشکـر و قدردانی می‌شود. همچنین از سازمان انتقال خـون ایران به‌ویژه قسمت تولید فرآورده‌هـای خـونی کـه نیاز سرم آلبومین ما را جهت تهیه این کـیت تأمـین می‌نمایند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

جدول (۷)- انسداد تخمینی از رگهای ریوی که با ^{99m}TcMSA مسدود می‌شوند

Average lung dose (LSD)=0.2×10^6, particles

درصد رگهای مسدود شده $\times10^6$	%MSA	اندازه قطر رگها میکرون	تعداد تخمینی مویرگهای ریه	نوع رگ
۰/۰۶۴	۲۰	۸-۱۶	۲۸۰×۱۰^۹	کاپیلاری
۰/۲۵۶	۸۰	۴۰-۵۰	۳۰۰×۱۰^۹	پری کاپیلاری

جدول (۱)ـ مقدار درصد تورم میکروسفر در توئین ۰/۱٪ نسبت به زمان و دما

درصد تورم	زمان (ساعت)	درجهٔ حرارت C
۱۳ـ۱۷	۶	۱۶۰
۱۵ـ۲۰	۴	۱۶۰
۱۹ـ۲۲	۹	۱۳۰
۲۵ـ۳۰	۶	۱۳۰
۳۵ـ۴۲	۶	۱۲۰
۴۵ـ۵۰	۴	۱۲۰

جدول (۲)ـ بررس تأثیر غلظت کلروراستانو در ایجاد کمپلکس HSA-Sn-Tc99m

غلظت (میلی‌گرم) $Sncl_2$	۰/۱۲	۰/۱۶	۰/۱۸	۰/۲	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۴۲	۰/۵	۰/۵۸	۰/۶۶	۰/۷۷
$\frac{HSAM}{Sncl_2}$	۲۵	۱۸	۱۶	۱۵	۱۲	۹	۷	۶	۵/۲	۴/۵	۴
متوسط جذب در ریه (درصد)	۸۹	۹۳	۹۴	۹۶	۹۷	۹۷	۹۶	۹۳	۹۰	۸۹	۸۶

جدول (۳)ـ تأثیر زمان حرارت (incubation time) در فرمولاسیون کیت میکروسفر

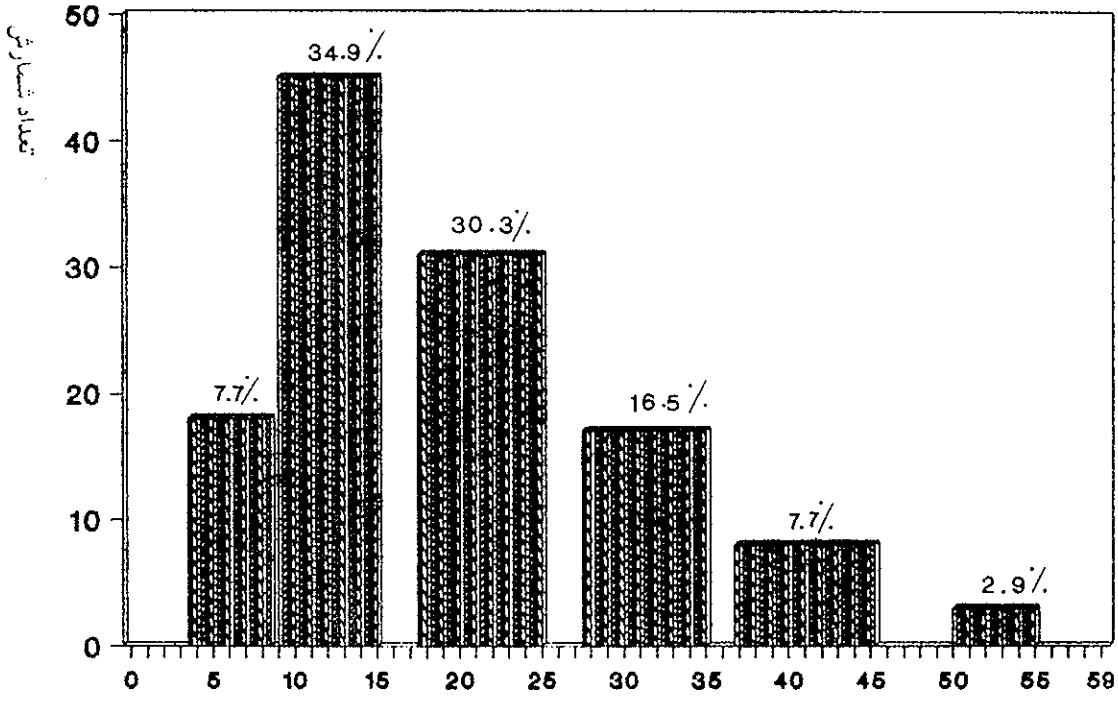
زمان (دقیقه)	درصد نشان‌دار شدن
۲	۶
۵	۹۵
۱۰	۹۷
۱۵	۹۵/۵
۲۰	۹۰

جدول (۴)- تأثیر غلظت توئین (Tween) در فرمولاسیون کیت میکروسفر

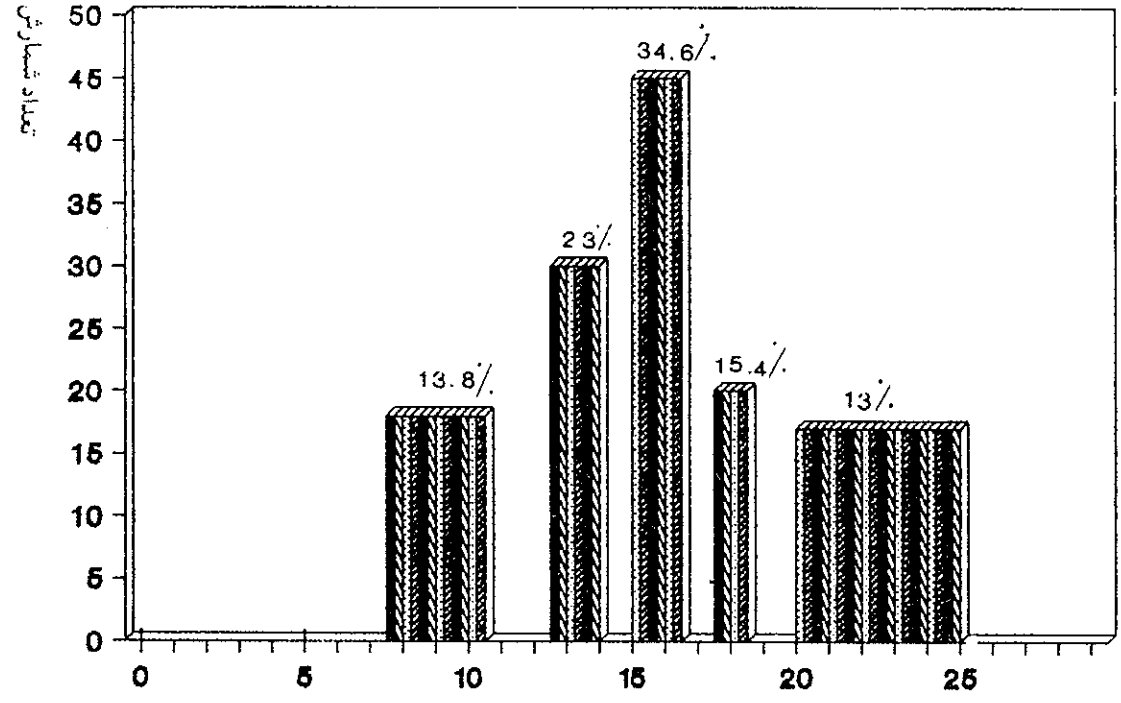
درصد ایجاد کمپلکس HAM-Sn-Tc99m	درصد مقدار توئین برای شستشو
۷۰	۰/۰
۹۵	۰/۰۵
۹۷	۰/۱
۹۳	۰/۲
۸۵	۰/۴

جدول (۵)- توزیع بیولوژیکی میکروسفر در بدن موشهای آزمایشگاهی نسبت به زمان

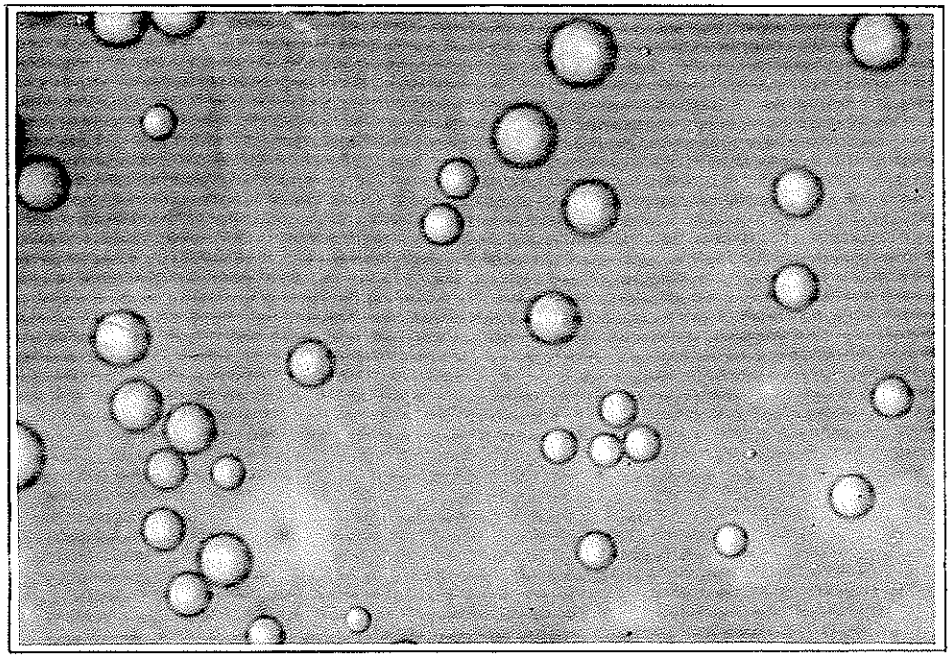
بقیهٔ بدن	طحال	روده	معده	کبد	ریه	خون	درصد میکروسفر در ارگان زمان تشریح بعداز تزریق
۲	۰/۱	۰/۵	۰/۴	۰/۹	۹۷	۰/۸	۱۵ دقیقه
۴/۶	۰/۱۲	۰/۹۵	۲/۱۷	۳/۹	۷۱/۳	۰/۹	۲ ساعت
۸/۳	۰/۱۵	۲/۵	۱/۹	۲/۱۷	۴۷/۹	۱/۱۶	۴ ساعت
۹/۲	۰/۲	۳	۱	۲/۵	۳۴/۸	۱/۷	۶ ساعت
۷/۱	۰/۱۳	۳/۴	۱	۳	۲۵	۱/۸	۸ ساعت



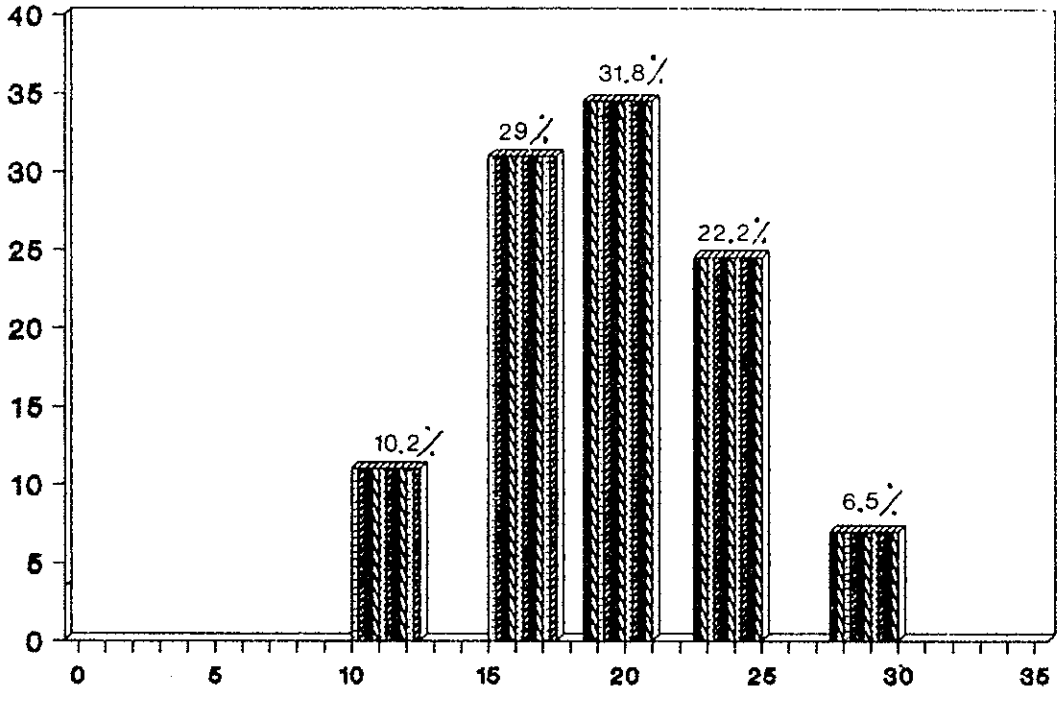
شکل (۱)ـ نمودار توزیع ذرات میکروسفر تهیه‌شده از روش روغنی برحسب اندازه قطر



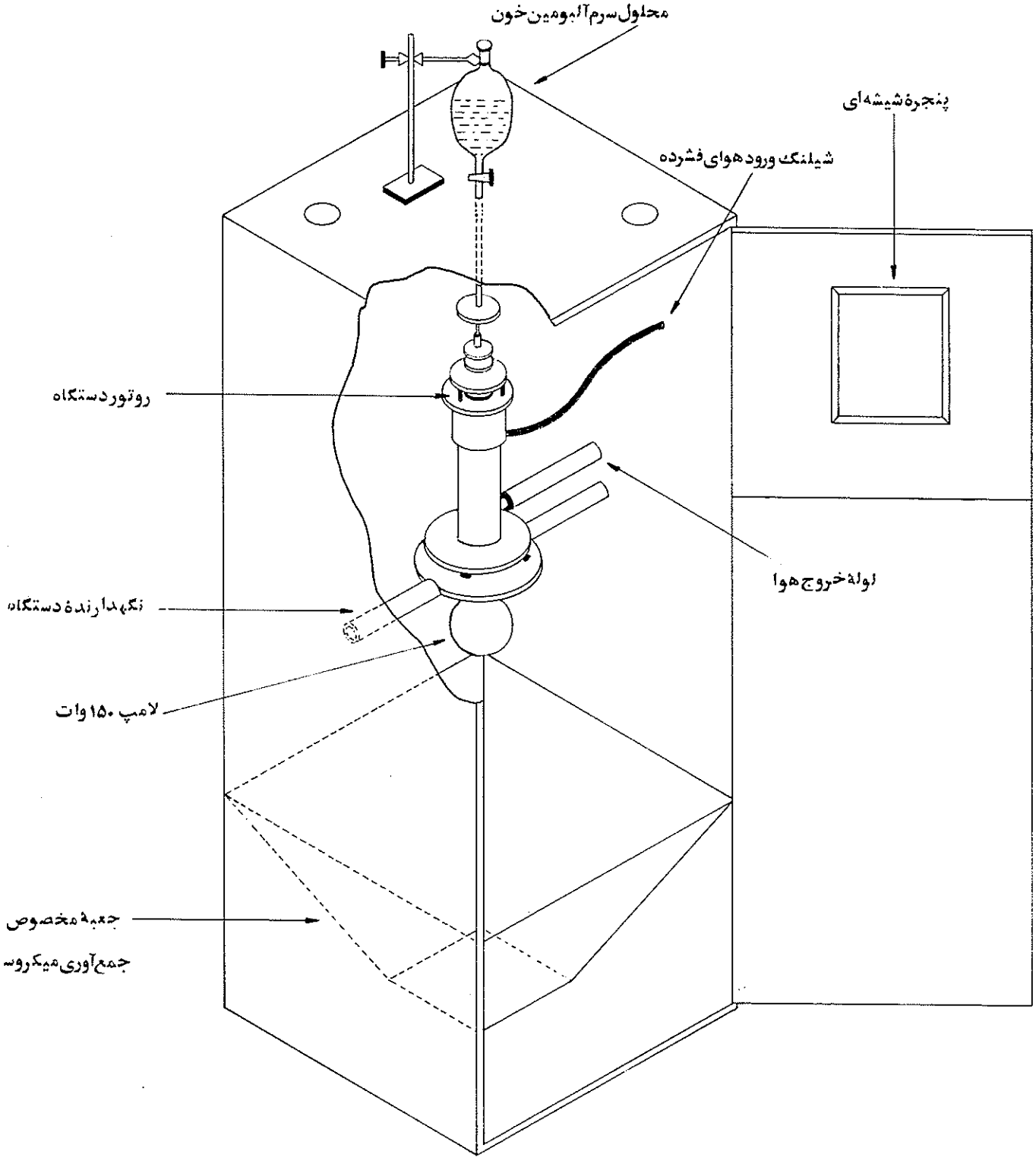
شکل (۲)ـ نمودار توزیع ذرات میکروسفر تهیه‌شده از روش ایروسول برحسب اندازه قطر



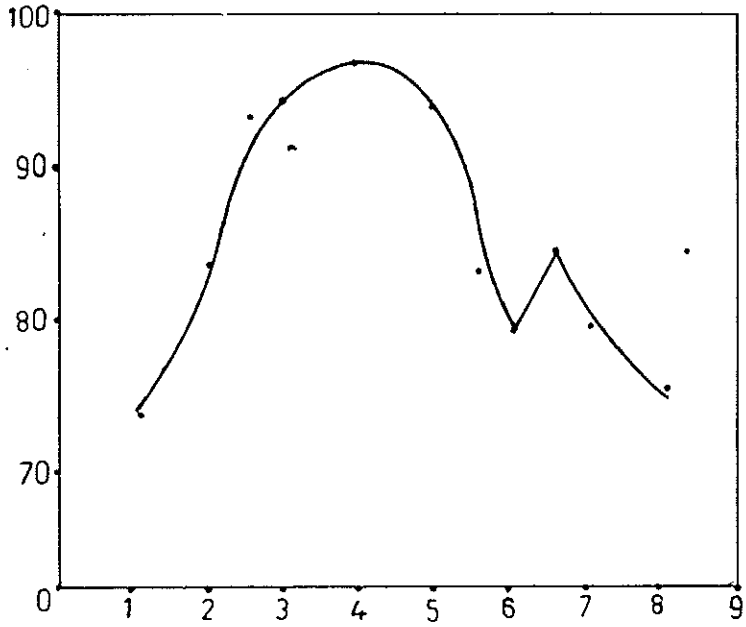
شکل (۳)- عکس میکروسکوپی از ذرات میکروسفر پراکنده‌شده در روغن



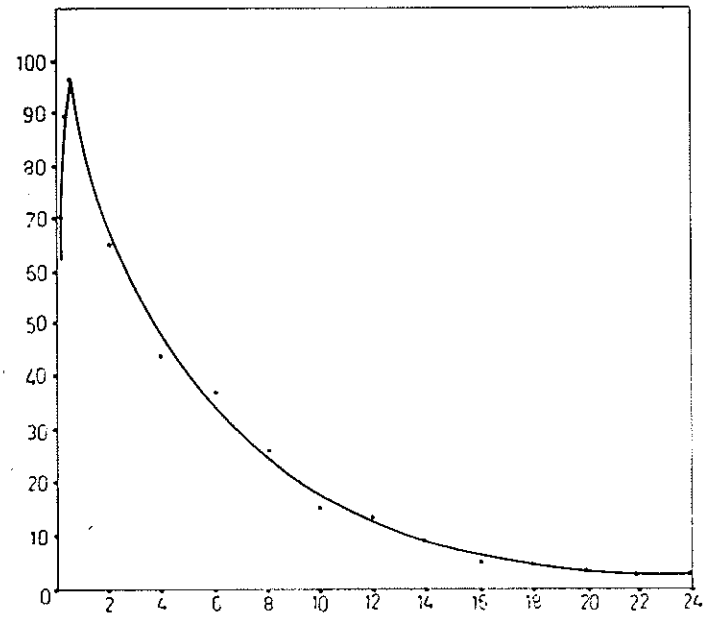
شکل (۵)- نمودار حداکثر مقدار تورم ذرات میکروسفر در سالین بعد از ۲ ساعت



شکل (۴)- دستگاه ایروسول مخصوص تهیهٔ میکروسفر سرم آلبومین خون



شکل (۶)ـ منحنی تأثیر PH در فرمولاسیون کیت



شکل (۷)ـ نمودار سرعت تجزیه (انحلال) میکروسفر در ریه‌ها نسبت به زمان
(با احتساب نیمه‌عمر فیزیکی ^{99m}Tc نسبت به زمان)

REFERENCES

1) Radiopharmaceuticals, Subramanian.

2) General Processes of Radiotracer localization. V.2, Leopold J. Anghileri.

3) ^{99m}Tc-human albumin microsphere (HAM) for lung imaging. J. Nucl. Med., 12: 127 (1971) Burdine j.A, et al.

4) Pasqualini R. et al. The perparation of albumin Microspheres. j. Biol. Nucl. Med. 13: 80(1969).

5) Monte Blau, et al. Radiation absorbed dose from albumin microspheres labeled with Technetium-99m. j. Nucl. Med; 23: 915(1982).

6) Rhodes B. A, et al. Lung Scanning with 99mTc-Microspheres. Radiol; 99: 613(1971).

7) Wagner, H.N. jr, Rhodes B.A, Saski. y, and Ryan j.p. Studies of the Circulation with Radioactive microspheres. Radiol; 4(6), 374, 1969.

8) Zolle, I., Rhodes, B.A., and Wanger, H.N. jr. preparation of radioactive human Serum albumin microspheres for studies of the circulation, Int. j. Appl. Rad. Isot., 21, 155, 1970.

9) Operating instructions for spinning disc aerosol generator, Research Engineers LTD., U.K.

10) Use of the Spinning Disk technique to produce Mono disperse microspheres of human serum albumin for lableling with Radioisotopes. Int. j. Appl. Rad isot 1974, vol. 25, 15-18.

11) Particulate Radiopharmaceuticals for plumonary Studies. Michale A. Davis. Radiopharmaceuticals 267-280, 1975.

12) ^{99m}Tc-Labelled albumin (Human) microspheres (15-30μm) Their preparation, properties and uses.

13) Effect of particle number on lung perfusion images; Howard J.Dworkin, Robert. F. Gutkowski, william porter, and Murray. j. Nucl. Med. 18: 260-262 (1977).