

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

دکتر محمدحسین بابائی، محمد شفیع، پیام بهراد کیا، دکتر رضا نجفی

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

چکیده

تصویربرداری از نقاط عفونی و التهابی به روش سیتی 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 کمپلکس پایدار با اکتیویته ویژه بالا ایجاد می نماید. در این مقاله روش تهیه کیت استریل و آپروژن ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG ارائه شده است تهیه این کیت بصورت دو مرحله‌ای است، که در مرحله اول 740 MBq پرتکتات به کیت شماره ۱ که محتوی کلرورفلن 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 سیستین 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 و تشخیص دقیق نقاط التهابی برای ارائه اختصاصی ترین روش درمان توسط پزشکان از اهمیت بالایی برخوردار است. اگر تاریخچه بالینی و معاینات 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 و SCT قادرند محل نسبی ناهنجاریهای کوچک را تشخیص دهند. با این وجود این روشهای رادیولوژیک از تغییرات شکل بافت جهت ارائه تصویر استفاده می کنند. لذا این روشها در مراحل 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) عمدتاً بصورت وریدی تزریق میشود و توزیع رادیواکتیو در تمام بدن با استفاده از یک دوربین گاما مشخص می گردد. رادیوداروهای مورد استفاده در تصویربرداری از نقاط عفونی و التهابی درچنین نقاطی بدلیل تغییرات شرایط فیزیولوژی موضعی تجمع می یابند. بنابراین تصویربرداری سیتی گرافی به تغییرات شکل بافت بستگی ندارد بلکه براساس پروسه های فیزیکی و شیمیائی بافتها انجام می شود. لذا تکنیکهای سیتی گرافی می توانند نقاط عفونی رادرمراحل اولیه آنها تشخیص دهند، درست زمانی که هنوز تغییرات شکل بافتی ظاهر نشده اند، بعلاوه تصویربرداری باروش سیتی 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

مواد و روش‌ها

الف- تهیه HYNIC-hIgG :

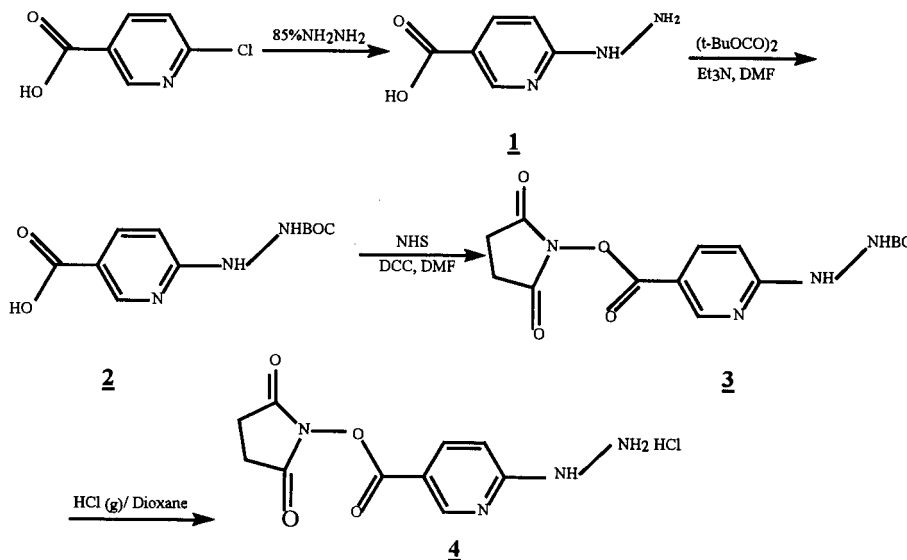
ابتدا سوکسینیمیدیل ۶-هیدرازینوپیریدین ۳- کربوکسیلات هیدروکلراید سنتز گردید (۱). مراحل تهیه این ترکیب در شکل ۱ خلاصه گردیده است (۴).

ب- تهیه کیت HYNIC-hIgG :

محلولی از IgG (I.V.-Globulin S, Green Cross) در فسفات بافر ۱/۰ مولار با pH = 7.8 با غلظت ۵mg/ml تهیه گردید. به آن ۴ برابر نسبت مولی از محلول تازه تهیه شده SHNH (۴) در دی‌متیل‌فرمامید (30mM in DMF) بصورت قطره قطره اضافه شد. مخلوط فوق در حالیکه از نور محافظت شده بود، بمدت ۵ 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 ۴ درجه سانتیگراد دیالیز گردید (۵ بار تعویض محلول بافر در مدت ۲۴ ساعت). محلول فوق از یک فیلتر ۰/۲ μm عبور داده شد و غلظت آن بروش لوری (۵) اندازه گیری گردید. محلول حاصله با بافر 100mM NaCl, 20mM Citrate, 1% Mannitol, pH 5.2 تا غلظت 1 mg/ml رقیق شده و پس از استریل کردن با فیلتر استات سلولز 0.22 μm در حجمهای یک میلی لیتری تقسیم شده و لیوفیلیزه شدند (۴).

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 نشاندار نمود. 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 ۶- 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 (۴). در این آزمایش، از ایمونوگلوبولین G انسانی، کیتی سرد با قابلیت نشاندار شدن با تکنسیم-99m با استفاده از مشتق هیدرازین نیکوتین آمید تهیه شده است.



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

شستشو داده شد. آنگاه اکتیویته باقی مانده بر روی ستون اندازه گیری گردید که نشان دهنده اکتیویته $^{99m}\text{TcO}_2$ است.

۳- پایداری کمپلکس ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG در دمای محیط: پس از تشکیل کمپلکس، در ساعات مختلف تا ۲۴ ساعت، پایداری کمپلکس با روش TLC اندازه گیری گردید.

۴- پایداری کمپلکس ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG در سرم تازه: $10-1 \mu\text{g}$ از آنتی بادی نشاندار شده معادل $100-10 \mu\text{Ci}$ به یک میلی لیتر سرم انسانی تازه تهیه شده اضافه و در 37°C همراه با تکان دادن ملایم به مدت ۲۴ 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 سیستین: در محلولی از آنتی بادی نشاندار شده، غلظتی از محلول سیستین ریخته شد، بطوریکه نسبت مولی سیستین به آنتی بادی $0/5$ و 500 گردید. بعد از یک ساعت انکوبه کردن در دمای 37°C ، پایداری کمپلکس نشاندار شده با روش ITLC بررسی شد.

۶- بررسی توزیع حیاتی کمپلکس ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG در *invivo*: برای اندازه گیری میزان تجمع آنتی بادی نشاندار شده در بافت های مختلف در موش سوری، مقدار $100 \mu\text{l}$ آنتی بادی نشاندار شده که معادل $30-10 \mu\text{g}$ پروتئین و 4MBq اکتیویته است، از طریق ورید دمی به سه گروه سه تائی موش سوری تزریق شد. (۱، ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق، موشها در اتر کشته شده و اعضا 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 آنها 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 کلوروقل - تریسین: کمپلکس $^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2$ پس از ۵ دقیقه به بیش از ۹۵٪ می‌رسد و مقدار $^{99m}\text{TcO}_2$ کلونیدی کمتر از ۲٪

جهت تعیین تعداد گروههای هیدرازینو بر روی هر ملکول IgG از ترکیب پارا نیترو بنزالدئید استفاده شد که این ماده قادر است گروههای هیدرازینو را به هیدرازون مربوطه تبدیل نماید، که این ماده آخری دارای جذب نوری در 380 نانومتر می باشد (extinction coefficient = $2.53 \times 10^4 \text{ l.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

ج- تهیه کیت کلوروقل - تریسین:

۸۰ میکرولیتر از محلول کلوروقل (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 نترات سلولز $0.22 \mu\text{m}$ عبور داده شده سپس در حجمهای $0/4$ میلی لیتری تقسیم شده و لیوفیلیزه شدند (۶).

د- تهیه کمپلکس ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG:

به کیت کلوروقل - تریسین اکتیویته ای معادل 20 40 mCi/1ml - اضافه شد و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس کمپلکس حاصله $^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2$ به کیت HYNIC-hIgG اضافه شده و بمدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید.

ه- آزمایشات کنترل کیفی:

۱- بازده نشاندارسازی کیت کلوروقل - تریسین: درصد خلوص رادیوشیمیائی $^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2$ 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 $R_f(^{99m}\text{TcO}_2) = 1$ و $R_f(^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2) = 0$ می باشد و در سیستم استن $R_f(^{99m}\text{TcO}_2) = 0$ و $R_f(^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2) = 1$ می باشد.

۲- بازده نشاندارسازی کیت HYNIC-hIgG: درصد خلوص رادیوشیمیائی ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG با استفاده از روش TLC و ستون سفادکس G25 تعیین می شود. از کاغذ واتمن شماره ۳ بعنوان فاز ثابت و محلول سالین بعنوان فاز متحرک استفاده شد که در سیستم سالین $R_f(^{99m}\text{TcO}_2, ^{99m}\text{Tc-HYNIC-IgG}) = 0$ و $R_f(^{99m}\text{TcO}_4, ^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2) = 1$ می باشد. برای تعیین درصد $^{99m}\text{TcO}_2$ مقدار $50 \mu\text{Ci}$ از کمپلکس را بر روی ستون سفادکس G25 به ابعاد 10×2 cm قرار داده شد. سپس ستون با ۳ برابر حجم با فسفات بافر سالین

است. پایدار است که این پایداری حتی تا ۲۴ ساعت حفظ

می شود.

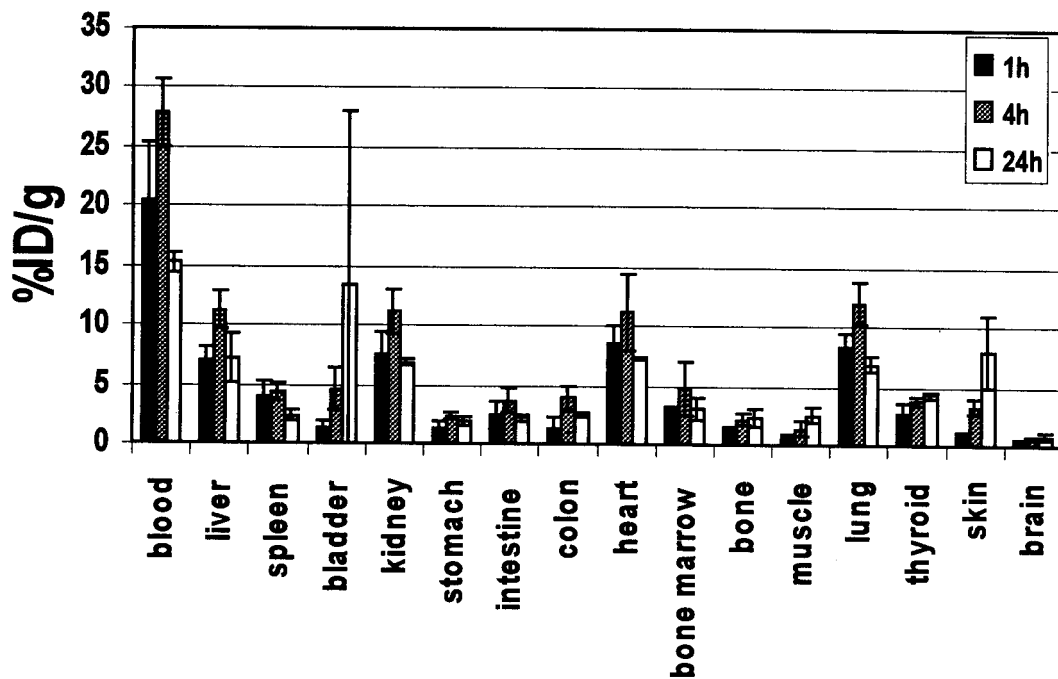
۲- بازده نشاندارسازی کیت HYNIC-hIgG : کمپلکس ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG پس از یکساعت به بیش از ۹۰٪ می رسد.

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

۳- پایداری کمپلکس ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG : این کمپلکس در محیط، سرم و محلول سیستین کاملا

جدول ۱. بررسی توزیع میاتی 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).

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	معدده	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	تیروئید	۲/۶±۱	۳/۸±۰/۴	۴/۳±۰/۳
۱۵	پوست	۱/۰±۰/۱	۳/۳±۰/۷	۸/۰±۰/۳
۱۶	مغز	۰/۴±۰/۱	۰/۶±۰/۱	۰/۸±۰/۳



شکل ۱. نمودار توزیع میاتی 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).

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 پرتکتات احیاء می گردد، مقادیر قابل توجهی از آنتی بادی نشاندار شده بصورت کلونیدی بوجود می آید و این باعث تجمع عوامل نشاندار در سیستم رتیکیولو آندوتلیال (reticuloendothelial) می شود.

بعضی از مشکلات ذاتی که در روش های مستقیم، شلاتور دو عاملی و دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید (DTPA) وجود دارند در مطالعات 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 -

بحث و نتیجه گیری

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 کائوژوگه 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 می شود. آنتی بادی احیاء شده پس از تهیه برای استفاده در شرایط مناسب نگهداری می گردد. در این روش از

(۲۰ mCi) و ۱۰/۳۳ و ۶ ساعت پس از تزریق (۲۰ mCi) ^{99m}Tc -IgG و در مقایسه با ۱/۸۸ mCi برای ^{99m}Tc ، 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 ($^{99m}\text{Tc} + \text{SnCl}_2 + \text{Tricine} + \text{HYNIC-hIgG}$) در یک ویال و روش دو کیتی kit No.1 ($^{99m}\text{Tc} + \text{SnCl}_2 + \text{Tricine}$) در یک ویال و kit No.2 (HYNIC-hIgG) در ویال دیگر نشان می دهد که نتایج قبل از اعمال حلال خشک (لیوفیلیزه) شبیه به هم بوده و درصد نشان گذاری برای هر دو ویال بالا می باشد ولی پس از اعمال حلال 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 رادیودارویی 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 رادیویازوتوپ مرکز تحقیقات هسته ای سازمان انرژی اتمی ایران تشکر و قدردانی نمایند.

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 - DTPA 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 - DTPA نشان دار شده با ^{99m}Tc به مراتب بیشتر از نشان گذاری به روش مستقیم بوده ولی کمتر از پایداری کونژوگه آنتی بادی - DTPA نشاندار شده با ^{111}In می باشد. در آزمایشات اخیر و در این مقاله نشان داده شده که کیت هیدرازینونیکوتین امید ^{99m}Tc -hIgG 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 (in vivo) 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 نشان گذاری با HYNIC بخوبی حفظ گردیده و پایدار می باشد.

بر اساس نتایج حاصله از توزیع بیولوژیکی در محاسبات MIRDOSE می توان با تزریق حدوداً ۲۰ mCi 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 ^{99m}Tc ، ^{111}In ، فلاکس (flux) فوتونی ^{99m}Tc دریافت ۱۸، ساعت پس از تزریق می بایست ۳ برابر ^{111}In باشد در صورتیکه مقدار ^{99m}Tc تزریق شده ۱۰ برابر مقدار ^{111}In باشد. علاوه بر این بعلت ویژگی های ذاتی در ^{99m}Tc و همچنین فلاکس فوتونی بالا در مراحل ابتدایی

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 inflammation 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 polyclonal 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) Preparation of HYNIC labeled annexin 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.