

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG
MACROAGGREGATED ALBUMIN GẮN ĐỒNG VỊ PHÓNG XẠ ^{99m}Tc

Nguyễn Thị Thu¹, Nguyễn Thị Khánh Giang¹
Nguyễn Thị Ngọc¹, Đặng Hồ Hồng Quang¹

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Albumin huyết thanh người (HSA) được điều chế thành dạng hạt kết tụ albumin (Macroaggregated albumin - MAA) và được nghiên cứu gắn với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc . **Mục tiêu:** Trình bày kết quả điều chế ^{99m}Tc -MAA dùng trong chụp hình chẩn đoán ung thư phổi và tiền liều trong điều trị ung thư gan bằng ^{90}Y -microsphere. **Đối tượng và phương pháp:** MAA được điều chế bằng phương pháp kết tụ nhanh từ dung dịch HSA 0,3% và dung dịch NaCl 5% ở nhiệt độ 80 - 90°C, pH 6. Hạt được ly tâm, lọc và chọn kích thước. Các khảo sát gắn tối ưu được tiến hành như hàm lượng clorua thiếc, pH. ^{99m}Tc -MAA được kiểm tra độ tinh khiết hoá phóng xạ, độ ổn định. **Kết quả:** Mỗi kit MAA được điều chế chứa 30 mg MAA, kích thước hạt khoảng 20 - 50 μm , 0,5 mg chlorua thiếc (II), pH 5. Hiệu suất gắn ^{99m}Tc -MAA đạt > 95% và độ tinh khiết hóa phóng xạ > 98%. **Kết luận:** ^{99m}Tc -MAA là thuốc phóng xạ lý tưởng dùng trong chụp hình chẩn đoán phổi và các ung thư khác.

* *Từ khóa:* ^{99m}Tc -macroaggregated albumin; Thuốc phóng xạ; Xạ hình tưới máu phổi; Kiểm tra chất lượng.

STUDY ON THE PREPARATION AND QUALITY CONTROL OF
MACROAGGREGATED ALBUMIN LABELLED RADIOISOTOPE ^{99m}Tc

Summary

Introduction: Human serum albumin (HSA) is used in the preparation of macroaggregated albumin (MAA), which is studied on the optimized conditions labeling with ^{99m}Tc . **Objectives:** To present the results in the production of ^{99m}Tc -MAA used in lung perfusion scintigraphy and pre-dose in the liver treatment process using ^{90}Y -microspheres. **Subjects and methods:** The albumin macroaggregates were prepared from 0.3% HSA in 5% sodium chloride, pH 6,

¹Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt

Người phản hồi: Nguyễn Thị Thu (ngthithu2014@gmail.com)

Ngày nhận bài: 30/9/2022

Ngày được chấp nhận đăng: 12/10/2022

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v47i9.220>

by heating a mixture of instant precipitation under 80 - 90°C. The MAA was centrifuged filter and particle sizing. The labeling optimization was conducted, such as stannous chloride and pH. ^{99m}Tc -MAA was tested for radiolabeling yield, radiochemical purity, and stability. **Results:** The MAA formulation kit contained 30 mg MAA, 20 - 50 μm particle size, 0.5 mg stannous chloride, pH 5. The radiolabeling yields of ^{99m}Tc -MAA were more than 95% and radiochemical purity was > 98%. **Conclusion:** ^{99m}Tc -MAA is an ideal radiopharmaceutical in lung perfusion scintigraphy and other cancer.

* **Keywords:** *^{99m}Tc -macroaggregated albumin; Radiopharmaceuticals; Lung perfusion scintigraphy; Quality control.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, thuốc phóng xạ ^{99m}Tc -MAA đang được sử dụng rộng rãi tại các cơ sở y học hạt nhân nhằm chụp hình chẩn đoán phổi và chẩn đoán gan với liều thăm dò trước khi điều trị ung thư gan bằng hạt vi cầu ^{90}Y -microsphere [1, 2] dựa vào kỹ thuật y học hạt nhân, sử dụng thiết bị SPECT-CT [1]. Nghiên cứu hoàn thiện và phát triển sản phẩm ^{99m}Tc -MAA là cần thiết để chủ động và cung cấp trong nước, phục vụ nhu cầu của bệnh nhân. Trên thế giới, bệnh ung thư ngày càng gia tăng, ảnh hưởng lớn đến sự phát triển kinh tế - xã hội. Theo ước tính của GLOBOCAN (2020), có 19,3 triệu ca ung thư mắc mới được chẩn đoán. Các ung thư chiếm tần suất lớn là ung thư gan, phổi. Tại Việt Nam, trong tổng số 182.563 ca mắc mới có 26.262 ca ung thư phổi (14,4%). Tỷ lệ tử vong do ung thư phổi đứng thứ hai sau ung thư gan [3]. Ung thư phổi và gan là một nhóm

các bệnh đến hiện nay chưa có thuốc đặc trị. Mọi phương pháp phẫu trị, xạ trị liệu hay hóa trị liệu cũng chỉ giúp đáp ứng một phần trong điều trị. Do vậy, việc nghiên cứu chẩn đoán sớm và theo dõi điều trị là vấn đề quan trọng. Với năng lượng gamma 140 keV và chu kỳ bán rã 6 giờ, ^{99m}Tc được sử dụng cho các nghiên cứu chụp hình chẩn đoán và là đồng vị phóng xạ lý tưởng khi tạo phức hợp với các phân tử sinh học, đặc biệt thích hợp trong chẩn đoán ung thư. Các thuốc phóng xạ gắn với ^{99m}Tc được sử dụng với > 80% trong tổng số thuốc phóng xạ dùng trong y học hạt nhân [4, 5, 6]. Vi hạt albumin thường dùng gắn với đồng vị phóng xạ để chụp hình chẩn đoán như ^{99m}Tc -MAA, ^{99m}Tc -nanocoll hiện hình chẩn đoán phổi, tủy xương và các nhiễm trùng [1, 7]. Sau khi tiêm tĩnh mạch ^{99m}Tc -MAA, kích thước hạt của ^{99m}Tc -MAA là 10 - 80 μm , lớn hơn nhiều so với đường kính trung bình

(7 - 8 μm) của mao mạch nên gây ra nghẽn mao mạch. Cơ chế định vị của $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA trong mao mạch phổi được gọi là phong tỏa mao mạch. Để cải tiến kích thước vi hạt albumin dùng trong xạ hình phổi và thám thính gan tiền điều trị ung thư gan bằng hạt vi cầu ^{90}Y microsphere, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Trình bày kết quả nghiên cứu các điều kiện tối ưu để điều chế và gắn vi hạt albumin kích thước 20 - 50 μm với đồng vị phóng xạ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ và kiểm tra chất lượng hợp chất gắn, đạt chất lượng sử dụng trong y tế.*

ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, nguyên liệu, hóa chất nghiên cứu

Đồng vị phóng xạ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ chiết từ máy phát $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, dạng $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, nồng độ phóng xạ 150 - 200 mCi/mL do Viện Nghiên cứu Hạt nhân cung cấp. HSA dạng bột đông khô, CAS No. 70024-90-7 (Hãng Sigma-Aldrich). Các loại hóa chất khác như $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH 2 M, HCl 2 M, NaCl , acid ascorbic (Hãng Sigma hoặc Merck). Sắc ký bản mỏng (Silicagel 60 F254, Merck). Máy phóng xạ tự chụp Cyclone (Hãng PerkinElmer, B431200). Nghiên cứu thực hiện tại Trung Tâm Nghiên cứu

và Điều chế đồng vị phóng xạ, Viện Nghiên cứu Hạt nhân.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Phương pháp điều chế MAA*: Dựa trên phương pháp khuấy có cải biến của Hunt và CS [2]. Cân 0,9g HSA hòa tan trong 300 mL nước cất, chỉnh pH 4,6. Dung dịch được nhỏ giọt trong NaCl 5%, pH 6, chứa 1,0g gelatin, khuấy ở nhiệt độ 80 - 90°C, thời gian 30 phút. Hấp dung dịch ở nhiệt độ 107°C, 60 phút. Ly tâm và rửa hạt trong dung dịch NaCl 0,9%, thu được 30 mL. Lọc qua phin lọc để loại bỏ hạt < 20 μm và > 50 μm . Đo kích thước và tính số lượng hạt dùng buồng đếm hồng cầu. Chia ra các chai, mỗi chai 1,0 mL (chứa 30 mg albumin), bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

- Phương pháp gắn MAA với đồng vị phóng xạ $^{99\text{m}}\text{Tc}$: MAA được gắn với $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bằng phương pháp trực tiếp, dùng thiếc (II) clorua làm chất khử, khử cầu disulfide (S-S) trên phân tử MAA về dạng sulfhidryl (SH), để dễ dàng tạo phức với $^{99\text{m}}\text{Tc}$ trong môi trường đệm phosphat. Để tối ưu hoá quy trình, các nghiên cứu khảo sát được tiến hành như sau:

- Khảo sát hàm lượng clorua thiếc: Cho vào các chai chứa 30 mg MAA, hoạt độ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ là 5 mCi, pH 7, thời gian gắn 15 phút, hàm lượng clorua thiếc

thay đổi từ 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 và 2,0 mg. Hỗn hợp phản ứng được phân tích bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC).

- Khảo sát pH: Cố định 0,5 mg thiếc clorua. Thay đổi pH ở các chai gắn là 3, 4, 5, 6, 7 và 8. Phản ứng gắn trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

- Điều chế ^{99m}Tc -MAA: Để điều chế kit gắn với ^{99m}Tc , cho vào 30 mL dung dịch chứa 0,9 mg albumin như trên một lượng 15 mg/10 mL $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 12 mL đệm phosphat (1,38 mg/12 mL $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Thêm nước cất để thể tích là 45 mL, pH cuối là 5,0. Chia ra các chai, mỗi chai 1,5 mL (chứa 30 mg albumin), bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C hoặc đông khô.

* Phương pháp kiểm chuẩn chất lượng:

- Độ tinh khiết hóa phóng xạ: Chấm 5 μl ^{99m}Tc -MAA lên 3 băng sắc ký lớp mỏng, triển khai trong dung môi acetone, thời gian 15 phút. Mẫu đối chứng là $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. Các băng sắc ký được chụp trên máy phóng xạ tự chụp Cyclone, tính độ tinh khiết hóa phóng xạ dùng phần mềm OptiQuant 5.0.

- Độ bền ^{99m}Tc -MAA theo thời gian: Mẫu ^{99m}Tc -MAA sau khi gắn được bảo quản trong các loại dung dịch đệm như phosphat 0,5 M, pH 7,4 hoặc nước muối sinh lý có thêm acid ascorbic. Sau các khoảng thời gian 1, 3, 6, 12 và 24 giờ, ^{99m}Tc -MAA được phân tích

bằng TLC, triển khai trong dung môi acetone.

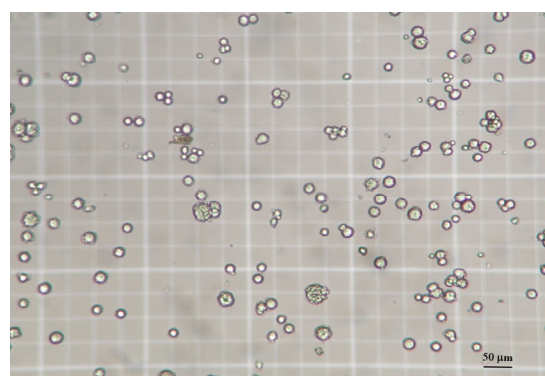
- Thử vô khuẩn và nội độc tố vi khuẩn ^{99m}Tc -MAA: Các chỉ tiêu sinh học của ^{99m}Tc -MAA như thử vô khuẩn theo phương pháp nuôi cấy trực tiếp, theo SOP-BC-001 và thử nội độc tố vi khuẩn theo phương pháp đo nội độc tố vi khuẩn LAL test dùng thiết bị PTS-100, Theo SOP-TĐPP-001.

* Xử lý số liệu: Bằng phần mềm Prism 8.4.3 và tính độ tinh khiết hóa phóng xạ bằng phần mềm OptiQuant 5,0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả điều chế MAA

Hạt kết tụ được điều chế có kích thước 10 - 30 μm , số lượng trung bình 4 - 5 triệu hạt trong mỗi chai, đếm trên buồng đếm hồng cầu (Hình 1).



Hình 1: Hạt albumin, chụp trên kính hiển vi Nikon eclipse 80i (Nhật Bản), độ phóng đại x 400.

2. Kết quả khảo sát điều kiện gắn phóng xạ

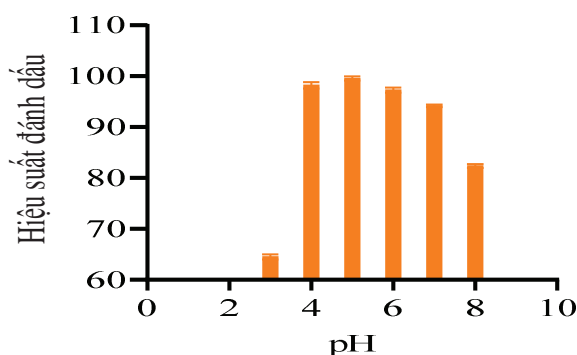
* *Kết quả khảo sát hàm lượng clorua thiếc: Lượng clorua thiếc tối ưu được chọn từ kết quả bảng 1:*

Bảng 1: Kết quả khảo sát ảnh hưởng hàm lượng clorua thiếc lên hiệu suất gắn (n = 3, $\bar{X} \pm SD$).

SnCl ₂ (mg)	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	1,50	2,00
Hiệu suất gắn (%)	74,25 ± 0,41	89,17 ± 0,32	93,43 ± 0,33	96,26 ± 0,11	98,19 ± 0,22	99,24 ± 0,41	99,35 ± 0,32

Với clorua thiếc $\geq 0,5$ mg trong mỗi chai, hiệu suất gắn của MAA với ^{99m}Tc đạt > 96%. Hiệu suất gắn không đạt > 95% khi hàm lượng clorua thiếc < 0,5 mg, vì vậy không được chọn. Chất khử clorua thiếc có vai trò khử ^{99m}Tc⁷⁺ về ^{99m}Tc⁴⁺ trong môi trường acid để sẵn sàng gắn.

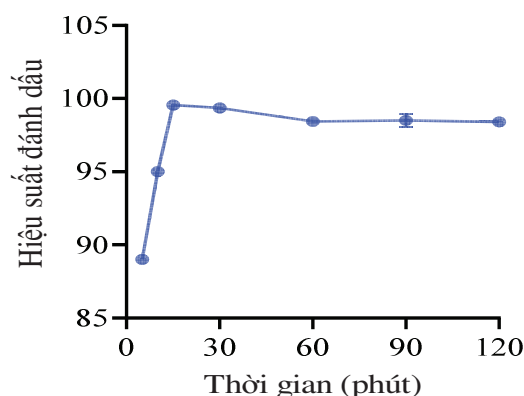
* *Kết quả khảo sát pH:* Quá trình gắn MAA với ^{99m}Tc đạt hiệu suất > 98% trong miền pH từ 4 - 5 (Hình 2). Trong miền này khả năng ổn định của các gốc -RS rõ ràng hơn nên phân tử dễ gắn.



Hình 2: Kết quả khảo sát ảnh hưởng pH lên hiệu suất gắn (n = 3, $\pm SD$).

Khi pH trong miền kiềm, hiệu suất gắn giảm, pH ổn định của albumin là trong miền acid, nên chọn pH gắn tối ưu là 5. Trên hình 2 cho thấy hiệu suất gắn của ^{99m}Tc-MAA cao trong miền pH 4 - 5. Điều này có thể giải thích khi pH > 6, có thể do ngoài điểm đẳng điện của protein, các phân tử albumin dễ bị hòa tan nên hiệu suất gắn giảm. Trong miền pH < 4, hiệu suất gắn thấp hơn, có thể do trong môi trường càng acid, các nhóm chức hoạt động trên phân tử albumin càng giảm. Trên bề mặt các hạt albumin luôn tồn tại các nhóm chức hoạt động như -OH, -SH, -NH.

* *Kết quả khảo sát thời gian phản ứng lên hiệu suất gắn:* Thời gian phản ứng cũng được khảo sát tại nhiệt độ phòng (Hình 3).

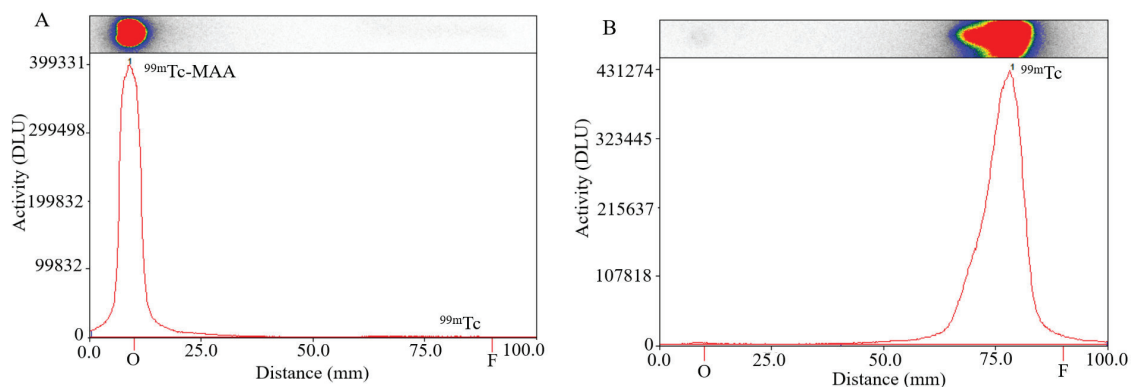


Hình 3: Kết quả khảo sát ảnh hưởng thời gian phản ứng lên hiệu suất gắn (n = 3, $\bar{X} \pm SD$).

Kết quả cho thấy thời gian cần thiết tối ưu để phản ứng đạt hiệu suất cao là khoảng 15 - 60 phút. Thời gian ít hơn có thể không đủ cho phản ứng xảy ra hoàn toàn. Do vậy, thí nghiệm tiến hành phản ứng gắn hạt albumin với thời gian 15 phút.

3. Kết quả kiểm tra chất lượng

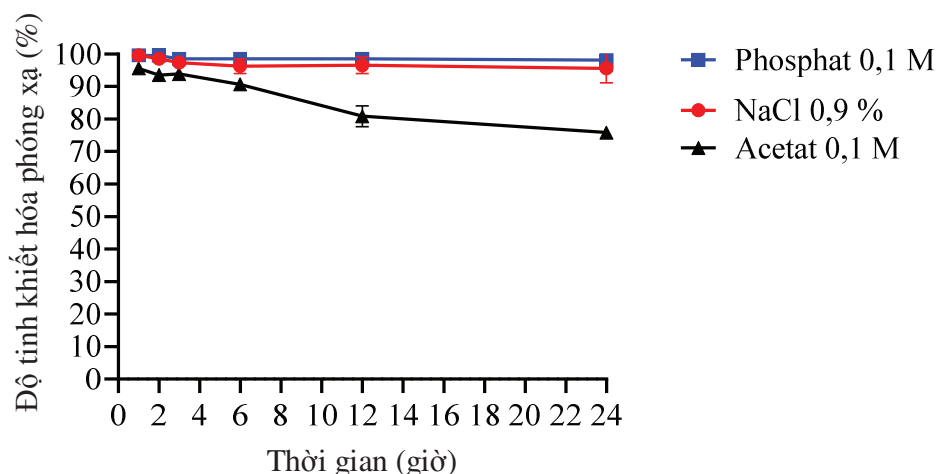
* *Kiểm tra độ tinh khiết hóa phóng xạ của $^{99m}\text{Tc-MAA}$:* Bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và tính toán cho thấy phức $^{99m}\text{Tc-MAA}$ nằm ở góc $R_f = 0,1$, còn ^{99m}Tc tự do sẽ đi về ngọn trên băng sắc ký, $R_f = 0,9$ (Hình 4).



Hình 4: A. Độ tinh khiết hóa phóng xạ của $^{99m}\text{Tc-MAA}$, TLC, đo trên thiết bị phóng xạ tự chụp.

B. Độ tinh khiết hóa phóng xạ của ^{99m}Tc , TLC, đo trên thiết bị phóng xạ tự chụp.
Độ tinh khiết hóa phóng xạ của $^{99m}\text{Tc-MAA}$ đạt > 98%.

* *Kiểm tra độ bền của $^{99m}\text{Tc-MAA}$: Kết quả phân tích cho thấy $^{99m}\text{Tc-MAA}$ ổn định trong đệm phosphat hoặc NaCl 0,9%, tất cả các mẫu đều thêm acid ascorbic 0,05 mg/mL (Hình 5).*



Hình 5: Theo dõi độ ổn định $^{99m}\text{Tc-MAA}$ theo thời gian ($n = 3, \bar{X} \pm \text{SD}$), $p < 0,05$.

Phức $^{99m}\text{Tc-MAA}$ bền trong môi trường thêm chất chống thủy phân như acid ascorbic. Kết quả cho thấy sản phẩm $^{99m}\text{Tc-MAA}$ ổn định trong 24 giờ sau khi gắn phóng xạ.

* *Thử vô khuẩn và nội độc tố vi khuẩn $^{99m}\text{Tc-MAA}$: Dung dịch $^{99m}\text{Tc-MAA}$ đạt yêu cầu thử vô khuẩn. Kết quả thử nội độc tố vi khuẩn là $3,2 \pm 0,81$ EU/mL ($n = 3, \bar{X} \pm \text{SD}$).*

BÀN LUẬN

Việc điều chế $^{99m}\text{Tc-MAA}$ để cung cấp sử dụng lâm sàng là cần thiết vì nhu cầu sử dụng cao. Nghiên cứu gắn MAA với đồng vị phóng xạ Tc-99m đã được tiến hành nhằm khảo sát các điều kiện tối ưu để hoàn thiện quy trình gắn. Các kết quả trong nghiên cứu cho thấy, hiệu suất gắn đạt $> 95 \%$ với hàm lượng thiếc 0,5 mg/chai kít, pH từ 4 - 5, thời gian từ 15 - 60 phút, chứng tỏ

quá trình tạo phức của đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc với MAA dễ dàng xảy ra. Phức $^{99m}\text{Tc-MAA}$ gắn với hiệu suất cao trong miền pH acid do khả năng ổn định của các gốc -SH. Thời gian gắn cho thấy phân tử albumin cũng như các phân tử sinh học khác như các loại kháng thể có thời gian phản ứng từ 5 - 15 phút [4, 5]. Sau khi gắn, sản phẩm ổn định trong đệm phosphat chứa thêm acid ascorbic. Sau 24 giờ, độ tinh khiết

hoá phóng xạ vẫn đạt > 98% (Hình 5). Việc lựa chọn chất khử dùng trong nghiên cứu gắn là ion thiếc dựa trên nhiều nghiên cứu trước đây, liên kết disulphite (S-S) sẽ được khử thành nhóm thiol (-SH) và dễ dàng gắn với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc , các thuốc phóng xạ gắn với ^{99m}Tc đã thương mại và sử dụng an toàn trên lâm sàng [4, 5]. Tương tự, so sánh với nghiên cứu của Hunte và CS, khi điều chế MAA đều tạo ra sản phẩm có kích thước 10 - 80 μm , độ tinh khiết hóa phóng xạ cao và bền trong nước nuôi sinh lý cũng như đệm phosphat đến 6 giờ sau khi gắn. Cũng cần lưu ý về kích thước hạt, dùng các phễu lọc milipore theo kích thước mong muốn như nghiên cứu của Jensen và CS để loại bỏ các vi hạt nhỏ hơn [1, 7]. Nghiên cứu này cần tiến hành thêm về phân bố, đào thải và các đánh giá tiền lâm sàng để trong tương lai có thể ứng dụng chẩn trị ^{99m}Tc -MAA/ ^{90}Y -MAA trên ung thư gan và các ung thư đặc biệt khác.

KẾT LUẬN

Hạt kết tụ MAA được điều chế và gắn với đồng vị phóng xạ ^{99m}Tc trong các điều kiện tối ưu của phản ứng. Kết quả điều chế ^{99m}Tc -MAA với hiệu suất cao 98 - 99% ở pH 5, thời gian phản ứng gắn 15 phút tại nhiệt độ phòng. Hợp chất gắn ^{99m}Tc -MAA có độ ổn

định, độ tinh khiết hoá phóng xạ đạt > 98%. Sản phẩm đã được kiểm tra và đạt yêu cầu về độ ổn định theo thời gian trong đệm phosphat cũng như trong nước muối sinh lý có thêm acid ascorbic. ^{99m}Tc -MAA đạt các tiêu chuẩn của thuốc phóng xạ sử dụng trong y học. Cần nghiên cứu sâu hơn để điều chế vi hạt ^{90}Y -MAA với kích thước tương tự dùng trong điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Svend Borup Jensen, Lotte Studsgaard Meyer, Nikolaj Schandorph Nielsen, Soren Steen Nielsen (2022). Issues with the European Pharmacopoeia Quality Control Method for ^{99m}Tc -Labelled macroaggregated albumin. *Molecules*; 2022: 27, 3997. doi: 10.3390/molecules27133997.
2. Monia E. Hamami, Thorsten D. Poeppel, Stephan Müller, Till Heusner, Andreas Bockisch, Philipp Hilgard, Gerald Antoch (2009). SPECT/CT with ^{99m}Tc -MAA in radioembolization with ^{90}Y microspheres in patients with hepatocellular cancer. *J Nucl Med*; 50(5): 688-692. doi:10.2967/jnumed.108.058347.
3. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., et al. (2021). Global cancer statistics 2021: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*; 68(6): 394-424.

4. Muhammad U.A., Muhammad R.A., Aqeela S., Sajid M. (2016). A review on evaluation of technetium-99m labeled radiopharmaceuticals. *J Rad and Nucl Chem*; 310(2).

5. David M.G., Robert M.S., Jacques B., Jean F.C. (2007). Radioactive antibodies: Selective targeting and treatment of cancer and other diseases. *Appl Rad*; 6(4): 10-29.

6. IAEA (2008). Technetium-99m radiopharmaceuticals: Manufacture of kits, technical reports series. ISSN 0074-1914; No. 466.

7. A.P. Hunt, M. Frier, R.A. Johnson, S. Berezenko, A.C. Perkins (2006). Preparation of Tc-99m-macroaggregated albumin from recombinant human albumin for lung perfusion imaging. *Eur J of Pharm and Biopharm*; 62(1): 26-31.