

## NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VI HẠT ALBUMIN GẮN ĐỒNG VỊ PHÓNG XẠ YTTRIUM-90

### Study On Radiolabeling Of Albumin Particles With Yttrium-90

*Nguyễn Thị Khánh Giang\*, Nguyễn Thị Ngọc\*,  
Nguyễn Thanh Bình\*, Nguyễn Thị Thu\**

#### SUMMARY

**Objective:** This report is intended to determine the optimum conditions of the radiolabeling of microaggregated albumin particles with Yttrium-90 radioisotope and the completion of the quality control procedures.

**Subjects and Methods:** The albumin microsphere kit was prepared in sodium phosphate buffer. The original solution includes 2 mg albumin particle and 0.5 mg stannous chloride dihydrate. The albumin particles size was ranged from 5 mm to 30 mm. The mixture was washed three times with phosphate buffer saline, pH 7.2 by centrifugation and suspended in 0.5 M sodium acetate buffer, pH 6. Yttrium-90 in 1.0 M acetic acid was collected from  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  generator. The labeling of the particles with  $^{90}\text{Y}$  (185 MBq) was performed at pH 5.5 in acetate buffer with agitating for 60 min at room temperature. The labeled albumin suspensions were centrifuged at 3000 rpm for 15 min. Labeling yields was calculated using centrifugation, filtration and compared with paper chromatography, which is developed in the Tris Acetic EDTA. In this system, the unbound of Y-90 migrates to an  $R_f$  of 0.9-1.0 and the radiolabeled albumin particles remains at the point of origin ( $R_f = 0$ ). The size of  $^{90}\text{Y}$ -albumin particles was compared with the albumin particles in the original solution to be sure that they didn't change during the labeling treatment

**Results:** The radiolabeling yields were more than 80% at pH 5,5, the labeled compound was dialysis in phosphate buffer. The radiochemical purity was 98%, the reaction time marked 60 minutes, at room temperature (about 24°C). The labeled compound was dialysis in phosphate buffer. The product has a radioactivity of more than 98%. The product has been tested and the quality requirements of radioactive drugs.

**Conclusion:** The subject has achieved the goal of producing conjugate  $^{90}\text{Y}$ -albumin and quality control, which is the ideal radioactive substance for the treatment of malignant cancer such as radiation therapy. In the future it is necessary to continue the study of high-activity radiolabeled albumin particles and study on laboratory cancer animals.

**Key words:**  $^{90}\text{Y}$ -albumin microspheres, radiopharmaceuticals, brachytherapy

\*Viện Nghiên cứu hạt nhân,  
Đà Lạt, Việt Nam

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư là một nhóm các bệnh liên quan đến việc phân chia tế bào một cách vô tổ chức. Hiện nay, thuốc đặc trị chưa có, 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 tìm ra thuốc điều trị ung thư đang là vấn đề cấp bách. Hiện nay, việc nghiên cứu các phân tử sinh học đánh dấu với đồng vị phóng xạ, đã mở đầu cho hướng điều trị ung thư mới, đó là xạ trị áp sát với ưu điểm tiêu diệt các tế bào bị ung thư và không gây ảnh hưởng tới các tế bào lành xung quanh, đây là hướng điều trị đang được áp dụng ngày càng nhiều, và hứa hẹn những hiệu quả điều trị rõ rệt.  $^{90}\text{Y}$  là đồng vị phóng xạ có quãng chạy trong tế bào dài nhất (11 mm tương ứng khoảng 600 tế bào), phát tia beta ( $\beta$ ) với năng lượng cao 2308 KeV, do đó  $^{90}\text{Y}$  là đồng vị phóng xạ có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư nổi trội hơn so với các đồng vị phóng xạ khác, đặc biệt là các khối u rắn. Hiện nay trên thế giới, các vi hạt albumin đã được điều chế và sử dụng trong y học, ví dụ như kit  $^{99\text{m}}\text{Tc-MAA}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc-nanocoll}$  dùng để chụp xạ hình chẩn đoán phổi, tủy xương và các nhiễm trùng,  $^{90}\text{Y}$ -albumin được nghiên cứu dùng trong xạ trị áp sát. Trong báo cáo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu các điều kiện tối ưu để đánh dấu vi hạt albumin với đồng vị phóng xạ  $^{90}\text{Y}$ , đồng thời kiểm tra chất lượng hợp chất đánh dấu đạt chất lượng sử dụng cho y học.

## II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên liệu, hóa chất

Các hóa chất đều là những hóa chất tinh khiết được sử dụng trong nghiên cứu về sinh học phân tử và đánh dấu phóng xạ.  $^{90}\text{Y}$  được tách từ nguồn  $^{90}\text{Sr}$  (Viện Nghiên cứu hạt nhân), đạt các tiêu chuẩn hoạt độ phóng xạ, độ sạch hạt nhân, độ sạch hóa phóng xạ. Vi hạt albumin được điều chế từ human serum albumin (HSA) tại Viện Nghiên cứu hạt nhân, dạng bột đông khô, kích thước 5  $\mu\text{m}$  - 30  $\mu\text{m}$ . Các loại hóa chất khác như  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , EDTA, Tris,  $\text{NaOH}$  2M,  $\text{HCl}$  2M, acid acetic,  $\text{NaCl}$ , acid ascorbic dùng để pha các loại đệm đều được mua từ hãng Sigma hoặc Merk.

**Phương pháp đánh dấu:** Phương pháp này được đưa ra bởi nhóm nghiên cứu Naoyuki Watanabe

và cộng sự (Nhật Bản). Dùng 5 mg albumin (kích thước 5  $\mu\text{m}$  đến 30  $\mu\text{m}$ ) ly tâm và rửa 3 lần trong đệm PBS pH 7,2, sau đó cho đệm acetat 0,1 M, pH 6 vào trong lần ly tâm sau cùng (thời gian ly tâm 5 phút, tốc độ 3000 rpm). Để đánh dấu với  $^{90}\text{Y}$ , cho 1,8 ml dung dịch albumin vào các chai đánh dấu, thêm vào đó 200  $\mu\text{l}$  (5 mCi) đồng vị phóng xạ  $^{90}\text{Y}$ , lắc trộn mạnh trên máy lắc trong thời gian 60 phút, nhiệt độ phòng. Sau khi xong phản ứng, phân tích kiểm tra hiệu suất đánh dấu.

Các phương pháp kiểm tra độ sạch hóa phóng xạ và tính ổn định của sản phẩm đánh dấu

**Phương pháp sắc ký lớp mỏng:** Giấy sắc ký ITLC (Instant Thin Layer Chromatography) kích thước 1 x 10 cm, chấm 5  $\mu\text{l}$  mẫu lên giấy ITLC tại vị trí cm thứ 2, mỗi mẫu chấm 2 băng, khi giấy khô, đặt băng giấy vào bình chứa sẵn hỗn hợp đệm TAE (0.04 M Tris acetat, 0.002 M ethylenediaminetetraacetic acid), đậy nắp kín, thời gian sắc ký là 3 phút, khi dung môi di chuyển đến centimet thứ 10, lấy băng giấy ra, để khô rồi cắt thành từng băng nhỏ, mỗi băng rộng 1 cm vuông góc với chiều di chuyển của dung môi. Đặt từng băng giấy này vào các ống nghiệm, đo đếm hoạt độ phóng xạ trên máy đo.

**Phương pháp sắc ký giấy:** Các bước thực hiện tương tự như phương pháp sắc ký lớp mỏng ITLC nhưng sử dụng loại giấy sắc ký Whatman No. 1 kích thước 1,5 x 17 cm. Thời gian sắc ký lâu hơn khoảng 60 phút, dung môi sắc ký là đệm TAE. Khi dung môi di chuyển đến centimet thứ 15, lấy băng giấy ra để khô rồi cắt thành từng băng nhỏ rộng 1 cm. Sau đó đo đếm hoạt độ phóng xạ trên máy đo.

**Kiểm tra tính ổn định sản phẩm theo thời gian:** Sản phẩm đánh dấu phóng xạ được bảo quản ở điều kiện 2 - 8°C, chứa chất bảo quản và không có chất bảo quản. Sau các khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày, mỗi ngày lấy sản phẩm ra, để về nhiệt độ phòng, phân tích độ sạch hoá phóng xạ và hiệu suất đánh dấu bằng phương pháp sắc ký.

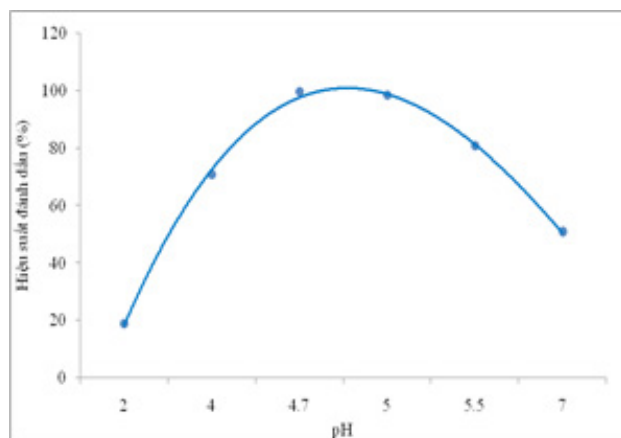
**Kiểm tra độ ổn định trong huyết thanh và trong NaCl 0,9%:** Chia sản phẩm ra các ống nghiệm. Ủ ở 37°C trong thời gian 6 ngày. Sau mỗi ngày lấy ra đo hoạt độ phóng xạ, tính tỉ lệ hoạt độ phần gán và phần tự do.

### III . KẾT QUẢ

#### 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng pH lên quá trình đánh dấu

<sup>90</sup>Y dùng để đánh dấu với albumin có nồng độ phóng xạ 16 mCi/ml. Quá trình đánh dấu <sup>90</sup>Y- albumin thực hiện với các pH khác nhau 2; 4; 4,7; 5; 5,5; 7 với thời gian phản ứng là 60 phút ở nhiệt độ phòng (22 - 25°C).

Hiệu suất đánh dấu của <sup>90</sup>Y-albumin được xác định bằng phương pháp sắc ký. Hiệu suất đánh dấu cao trong miền pH 4,7 - 6,0 (Hình 1). Điều này có thể giải



Hình 1. Ảnh hưởng pH lên quá trình đánh dấu

#### 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng thời gian phản ứng lên hiệu suất đánh dấu

Thời gian phản ứng cũng được khảo sát tại nhiệt độ phòng. Bảng 1 cho thấy thời gian cần thiết tối ưu để phản ứng đạt hiệu suất cao là khoảng 60 phút.

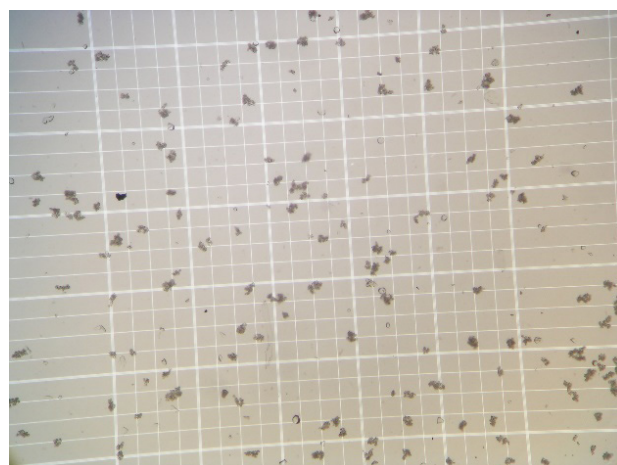
Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng thời gian phản ứng lên hiệu suất đánh dấu

Thời gian (phút)	1	15	30	60	90	120	150
Hiệu suất đánh dấu (%)	80,5	93,4	95,3	99,6	99,6	99,8	99,8

Thời gian ít hơn có thể không đủ cho phản ứng xảy ra hoàn toàn. Do vậy thí nghiệm tiến hành cho phản ứng đánh dấu hạt albumin là 60 phút.

#### 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ lên hiệu suất đánh dấu

thích khi pH lớn hơn 6,0 hiệu suất đánh dấu giảm, có thể do trong miền pH lớn hơn 6 hoặc kiềm, ngoài điểm đẳng điện của protein, các phân tử albumin dễ bị hòa tan. Trong miền pH nhỏ hơn 4,5 hiệu suất đánh dấu thấp hơn. Có thể là do trong môi trường càng acid các nhóm chức hoạt động trên phân tử albumin càng giảm. Trên bề mặt các hạt albumin, có các nhóm chức hoạt động như -OH, -SH, -NH, trong miền thích hợp (pH 4,7- 6,0) các nhóm này ở trạng thái hoạt động. Đệm acetat có vai trò duy trì pH cho quá trình đánh dấu xảy ra.



Hình 2. Hạt albumin

Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ lên hiệu suất đánh dấu

Nhiệt độ (°C)	Hiệu suất đánh dấu (%)	Ghi chú
24	99,6	Lắc trộn trên máy
50	99,5	Lắc trộn trên máy
70	99,3	Lắc trộn trên máy
90	99,7	Không lắc

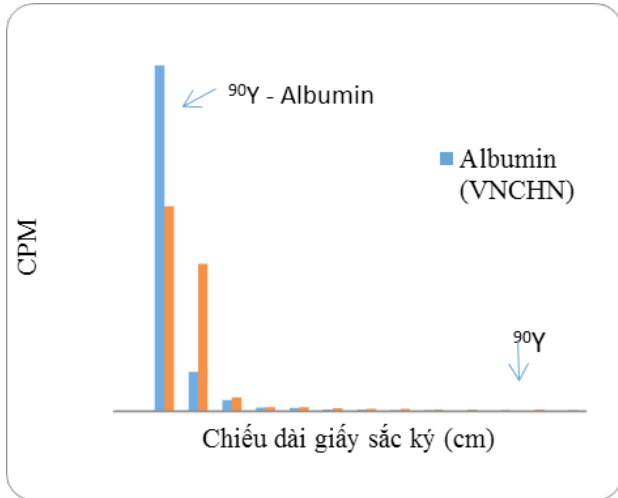
Nhiệt độ phòng hay nhiệt độ 90°C, phản ứng gắn <sup>90</sup>Y lên hạt đều cho kết quả hơn 99%. Do vậy chọn điều kiện phản ứng tại nhiệt độ phòng là thích hợp.

#### 3. Tinh chế sản phẩm và so sánh hiệu suất đánh dấu

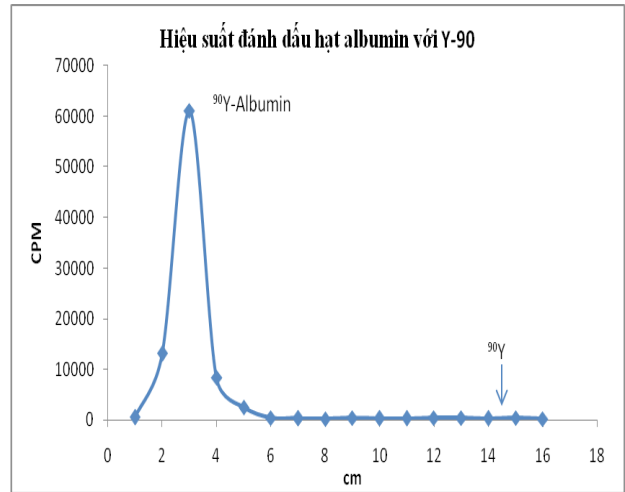
Hợp chất đánh dấu được thẩm tích để thu được sản phẩm tinh khiết. Cho dung dịch hạt đánh dấu vào

túi thẩm tích, cột chặt, nhúng vào đệm thẩm tích TAE (Tris acetic EDTA), khuấy liên tục, thay nước 3 lần, sau khi thẩm tích phức không bền được tách ra qua màng thẩm tích. Kết quả thu được sản phẩm  $^{90}\text{Y}$ -albumin còn

lại hơn 80%. Đây là sản phẩm tinh khiết được dùng để nghiên cứu ổn định. Quy trình đánh dấu và tinh chế được so sánh với kit MAASOL của hãng Health-Care (Hình 3 và 4).



Hình 3. So sánh đánh dấu hạt albumin VNCHN với kit MAASOL

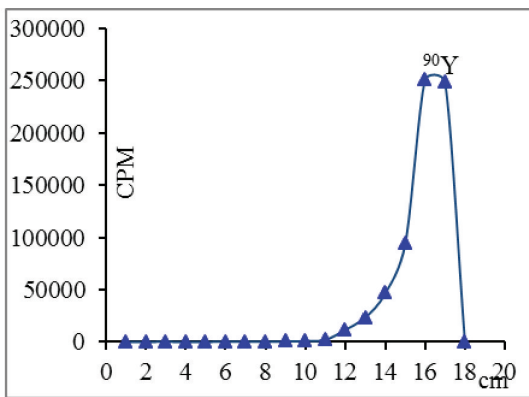


Hình 4. Kiểm tra hiệu suất đánh dấu của  $^{90}\text{Y}$ -albumin bằng phương pháp sắc ký giấy

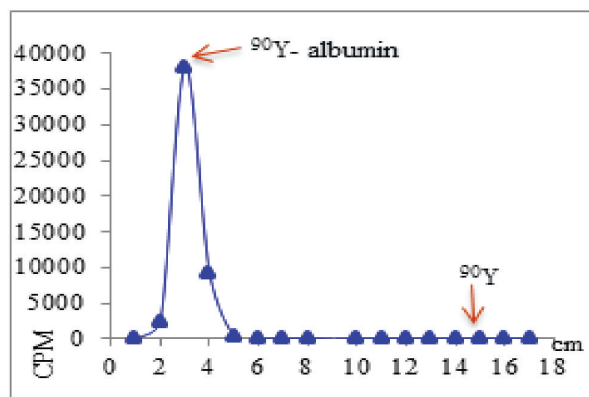
Đồ thị cho thấy quy trình gắn vi hạt albumin và vi hạt albumin kit MAASOL với  $^{90}\text{Y}$  là giống nhau, hiệu suất đánh dấu của  $^{90}\text{Y}$ -albumin đạt hơn 98%.

**4. Kết quả kiểm tra độ sạch hóa phóng xạ của sản phẩm:**

Sản phẩm đánh dấu luôn đạt độ sạch hóa phóng xạ hơn 98% (Hình 5, 6)



Hình 5. Độ sạch hóa phóng xạ  $^{90}\text{Y}$



Hình 6. Kiểm tra độ sạch hóa phóng xạ của  $^{90}\text{Y}$ -albumin bằng phương pháp sắc ký giấy

**5. Kết quả kiểm tra độ ổn định trong huyết thanh và ổn định theo thời gian**

Cả hai chất đánh dấu  $^{90}\text{Y}$ -albumin A và B đều cho thấy độ sạch hóa phóng xạ luôn lớn hơn 95% trong suốt thời gian ủ với huyết thanh người và ủ trong nước muối sinh lý tại nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong vòng 6 ngày. Thí nghiệm

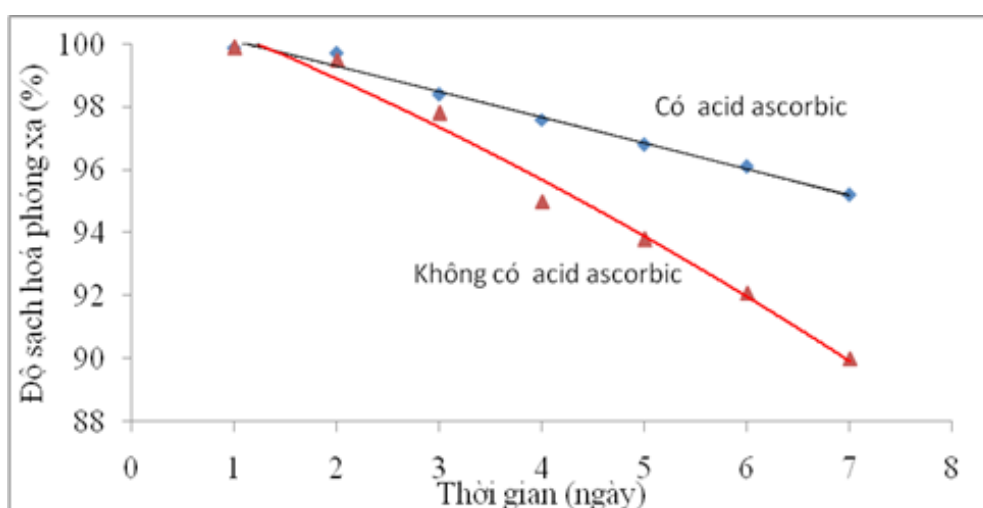
chứng tỏ rằng trong nghiên cứu invitro,  $^{90}\text{Y}$ -albumin không bị phân hủy, ổn định trong cả huyết thanh và trong nước muối sinh lý ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  vì vậy cho phép sản phẩm  $^{90}\text{Y}$ -albumin có thể ổn định trong nghiên cứu phân bố sinh học trên lâm sàng (Bảng 3).

**Bảng 3. Kết quả kiểm tra tính ổn định hợp chất đánh dấu  $^{90}\text{Y}$ -albumin trong huyết thanh người và trong NaCl 0,9%.**

Ngày	1	2	3	4	5	6
Ổn định trong huyết thanh (%)	99,8	99,0	98,5	97,8	96,6	95,8
Ổn định trong NaCl 0,9% (%)	99,8	99,3	98,9	98,2	97,8	96,5

Tính ổn định theo thời gian của sản phẩm được theo dõi theo thời gian bảo quản. Trong môi trường có thêm axit ascorbic, phức bền trong vòng 7 ngày. Trong

môi trường bảo quản không có acid ascorbic, phức không ổn định, sau 7 ngày, độ sạch hóa phóng xạ ít hơn 90% (Hình 7).



**Hình 7. Kiểm tra tính ổn định sản phẩm theo thời gian**

#### IV. KẾT LUẬN

Vi hạt albumin có thể đánh dấu với đồng vị phóng xạ  $^{90}\text{Y}$  trong các điều kiện tối ưu của phản ứng đánh dấu. Kết quả cho thấy phản ứng đánh dấu đạt hiệu suất cao 98 - 99% ở khoảng pH 5,5; thời gian phản ứng đánh dấu là 60 phút; nhiệt độ thích hợp cho phản ứng là nhiệt độ phòng. Sau đánh dấu, hợp chất đánh dấu

được thẩm tích và sản phẩm thu được có độ ổn định, độ sạch hoá phóng xạ cao hơn 98%. Hợp chất đánh dấu được kiểm tra chất lượng theo tiêu chuẩn dược chất phóng xạ. Sản phẩm đã được kiểm tra và đạt yêu cầu về độ ổn định trong huyết thanh người, Sản phẩm ổn định theo thời gian bảo quản là 7 ngày trong axit ascorbic, đạt các tiêu chuẩn của thuốc phóng xạ cho mục đích điều trị trong y học.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. IAEA-TECDOC-1340, “Manual for reactor produced radioisotopes”, IAEA, Vienna, 2003.
2. Gopal B. Saha, “Fundamentals of Nuclear Pharmacy”, Third Edition, Springer, 2000.
3. Phan Văn Duyệt, “Phóng xạ y học”, Nhà xuất bản y học - Hà Nội 1979.
4. Technical Series Number 470, “Therapeutic Radionuclide Generators:  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  and  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  Generators”, IAEA, Vienna, 2009.
5. Azu Wuike Owunwanne and Samy Sadek, “The Handbook of Radiopharmaceuticals”, Chapman & Hall Medical, London, Glasgow, Weinheim. New York, 1995.
6. Watanabe N, Oriuchi N, Endo K, Inoue T, Tanada S, Murata H and Sasaki Y, “Yttrium-90-labeled human macroaggregated albumin for internal radiotherapy: combined use with DTPA”, Nucl. Med. Biol.; 26:847-851, 1999.

**TÓM TẮT**

**Mục tiêu:** Báo cáo này nhằm xác định các điều kiện tối ưu hoàn thành quy trình đánh dấu các vi hạt albumin với đồng vị phóng xạ Yttrium - 90 và hoàn thành quy trình kiểm tra chất lượng sản phẩm.

**Phương pháp:** Kit albumin được điều chế trong đệm phosphat, kit gồm 2 mg hạt albumin và 0,5 mg chlorua thiếc. Kích thước hạt albumin trong miền 5 - 30 mm. Hạt được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm phosphate pH 7,2 và ly tâm, sau đó tạo huyền phù trong dung dịch đệm acetat 0,5M, pH 6,0. Yttrium - 90 trong acetic acid 1M thu được từ máy phát đồng vị  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ . Vi hạt được đánh dấu với Y-90, hoạt độ phóng xạ 185 MBq, pH 5,5, lắc trộn 60 phút, tại nhiệt độ phòng. Dung dịch dạng huyền phù được ly tâm 3000 rpm trong 15 phút. Hiệu suất đánh dấu được tính toán dựa trên các phương pháp ly tâm, lọc, so sánh với phương pháp sắc ký giấy, triển khai trong đệm Tris-Acetic-EDTA. Trong hệ đệm này  $^{90}\text{Y}$  tự do di chuyển lên tuyến trên dung môi ( $R_f = 0,9 - 1,0$ ), hạt albumin gắn phóng xạ nằm tại điểm gốc ( $R_f = 0$ )

**Kết quả:** Hiệu suất đánh dấu hơn 80% ở khoảng pH 5,5, thời gian phản ứng đánh dấu là 60 phút, nhiệt độ thích hợp cho phản ứng là nhiệt độ phòng (khoảng 24°C). Hợp chất đánh dấu được thâm tích trong đệm phosphat. Sản phẩm có độ sạch hóa phóng xạ hơn 98%. Sản phẩm đã được kiểm tra và đạt yêu cầu về chất lượng thuốc phóng xạ.

**Kết luận:** Đề tài đã đạt mục tiêu đề ra là điều chế hợp chất vi hạt albumin đánh dấu phóng xạ  $^{90}\text{Y}$  và kiểm tra chất lượng, đây là dược chất phóng xạ lý tưởng dùng cho điều trị ung thư ác tính như là phương pháp xạ trị áp sát. Trong tương lai cần thiết phải tiếp tục nghiên cứu các thí nghiệm điều chế hợp chất  $^{90}\text{Y}$ -albumin với hoạt độ cao và nghiên cứu trên động vật ung thư thí nghiệm.

---

Người liên hệ: Nguyễn Thị Khánh Giang, Viện NC hạt nhân, Đà Lạt, Email liên hệ: [khanhgiang55@yahoo.com](mailto:khanhgiang55@yahoo.com)

Ngày nhận bài: 10/07/2018 Ngày chấp nhận đăng: 20/07/2018