

Príprava a značenie hydroxyapatitov s ^{223}Ra a $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Eva Málková¹, Petra Mičolová¹, Martin Vlk¹, Ján Kozempel¹, Jan Bárta¹, Mariia Rabyk²

¹České Vysoké Učení Technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra jaderné chemie, Břehová 7, 115 19 Praha 1, Česká republika

²Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, Česká republika; malkoev1@fffi.cvut.cz

Abstrakt

Preparation and Labelling Hydroxyapatite with ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

The aim of this study was the preparation, studies and investigation of novel nanoparticles suitable for targeted delivery of ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Preliminary experiments were focused on the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles (HANPs) and their affinity to ^{223}Ra and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, $T_{1/2} = 6.0$ h) is the most commonly used medical radionuclide for diagnostic procedures. Radium-223 is the first α -emitting radionuclide approved for targeted radionuclide therapy. The physical half-life of ^{223}Ra of 11.4 days is providing sufficient time for the synthesis, distribution and administration of the radiopharmaceutical to patients. HANPs labelling yields with ^{223}Ra were 95 - 100 % and with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ were 93 - 94 % depending on the reaction conditions. HANPs were studied on FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy), XRPD (X-Ray Powder Diffraction), DLS (Dynamic Light Scattering), and the sizes of nanoparticles were studied at temperatures 80, 120 and 200 °C.

KLúčové slová: Hydroxyapatite; Nanoparticles; ^{223}Ra ; $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Úvod a formulácia cieľa

Nutnosť vývoja nových diagnostických a terapeutických metód v nukleárnej medicíne vyžaduje neustály vývoj a výskum nových materiálov. V posledných rokoch vzrastá incidencia nádorových ochorení a s tým rastie aj rozvoj cielenej terapie pomocou rôznych druhov žiaričov [1].

Rádionuklidy emitujúce alfa žiarenie majú veľký potenciál pri liečbach lokalizovaných chorôb kvôli ich vysokému LET (Linear energy transfer) a prenikaniu tohto žiarenia len do blízkych vrstiev tkanív, rádovo len do vzdialeností niekoľkých priemerov nádorových buniek. Samotné α častice sú monoenergetické jadrá hélia s vysokou energiou a vysokým LET. Rádionuklidy emitujúce alfa žiarenie sú prevažne ťažné prvky so $Z \geq 82$. Existuje približne 100 takýchto rádionuklidov [2]. Potenciálne vhodnými alfa žiaričmi na liečbu kostných tumorov sú rádioizotopy ^{224}Ra s polčasom rozpadu 3,66 dňa a ^{223}Ra s polčasom 11,4 dňa [3].

Hydroxyapatit (HA) je biologickým materiálom nachádzajúcim sa v kostiach a zuboch. Kosti sa skladajú prevažne z plných vlákien kolagénu a nanočastíc kryštalického HA. Túto skutočnosť dokazuje i porovnanie vzoriek kostí meraných metódou FT-IR [4] so vzorkami HA pripravených *in vitro* [5]. Vďaka kompatibilite s kostným tkanivom sú HA využívané v mnohých biomedicínskych aplikáciách a kostných implantátoch [6].

Hydroxyapatity sú materiálom schváleným Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (Food and Drug Administration, FDA) [7]. Vysoká afinita ku kostiam je dôvodom štúdie *HA* ako potenciálne možných kandidátov na nosičov rádionuklidov využívaných v rádioterapii eventuálne v rádio diagnostike [8].

Materiál a metódy

Príprava *HA* prebiehala podľa reakčnej schémy [I.]. Do roztoku 0,8M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ bol pridaný 25 % vodný roztok amoniaku, a po kvapkách 1,2M roztok $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Po dobu reakcie bolo pH udržiavané na hodnote 11. Reakčná zmes bola miešaná 1 hodinu. Vzniknutá zrazenina bola premytá 3x destilovanou vodou a sušená na vákuovej linke.



Ďalej bola študovaná závislosť veľkosti častíc na spôsobe prípravy *HA*, a to pri rôznych reakčných teplotách a pri rôznom zriedení reakčných látok. Hydroxyapatity boli pripravované pri reakčných teplotách 80, 120 a 200 °C [9, 10]. Na prípravu *HA* pri teplote 80 °C bola použitá sklenená banka, pri teplote 120 °C bol použitý reaktor ACE GLASS® a pri teplote 200 °C bol použitý nerezový autokláv. Hydroxyapatity boli pripravované podľa reakčnej schémy [I] pri tejto teplote po dobu 4 hodín.

Vzorky *HA* boli analyzované metódou dynamického rozptylu svetla (DLS; Dynamic Light Scattering). Bola stanovovaná veľkosť častíc v roztoku (v destilovanej vode) a zeta potenciál. Vzorky boli analyzované pri konštantnej teplote 25 °C. Pred meraním boli všetky vzorky homogenizované. Meranie prebiehalo pod uhlom 173° na prístroji Nano-ZS, model ZEN3600 (Malvern, UK) zetasizer pre meranie dynamického rozptylu svetla s 0,4mW He-Ne laserom pracujúcim na vlnovej dĺžke 633 nm. Meranie veľkosti častíc prebiehalo v klasických plastových kyvetách, meranie zeta potenciálu v kyvete určenej na meranie elektrokinetického potenciálu. Namerané hodnoty boli spracovávané programom DTS(Nano).

Značenie *HA* s ^{223}Ra bolo vykonávané dvomi spôsobmi, na povrchu alebo v celom objeme. Značenie *HA* v celom objeme prebiehalo spolu zrážaním eluátu $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$ s roztokmi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Povrchové značenie prebiehalo tak, že k *HA* bol pridaný eluát $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$. Rádium-223 bolo eluované z $^{227}\text{Ac} / ^{227}\text{Th} / ^{223}\text{Ra}$ generátoru pripraveného sorpciou roztoku ^{227}Ac na kolónku meniča iónov Dowex-1. Elúcia prebiehala pomocou roztoku 80 % MeOH / 0,7 M HNO₃. Eluát bol odparený na rotačnej vákuovej

odparke a $^{223}\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$ bol rozpustený v 300 μl destilovanej vody a 25 % vodným roztokom NH_3 bolo pH upravené na hodnotu 11.

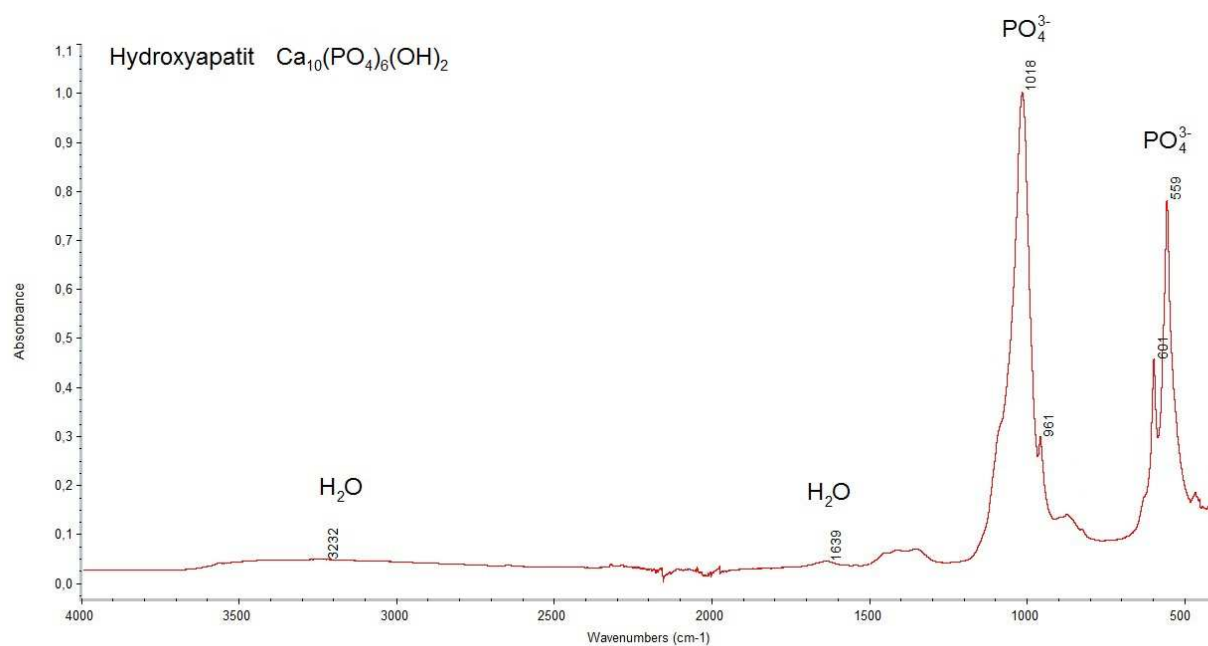
Značenie *HA* s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ prebiehalo rovnako ako značenie s ^{223}Ra . Technécium bolo eluované 0,9% roztokom NaCl z $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátoru (GE Healthcare). Získaný technecistan v podobe $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ bol redukovaný $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Pri značení vzoriek v objeme bol na úpravu pH použitý 10% NaOH .

Vzorky *HA* boli analyzované na FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) spektrometri a Röntgenovou práškovou difrakciou (XRPD). Vzorky značené ^{223}Ra boli merané v studňovom scintilačnom detektore (CRC-55tW CAPINTEC) a γ -spektrometriou s mnohokanálovým analyzátorom (mnohokanálová vyrovnávací pamäť Ortec 919 Spectrum Master s riadiacim programom Maestro) s koaxiálnym polovodičovým detektorom z vysoko čistého germánia HPGe (Princeton Gamma Technologies), so zabudovaným predzosilňovačom, zdrojom vysokého napätia (Canberra 3106D), spektroskopickým zosilňovačom (Ortec 672) a zdrojom napätia Canberra 2100). Vzorky značené $^{99\text{m}}\text{Tc}$ boli merané v ionizačnej komore (CRC-55tW CAPINTEC).

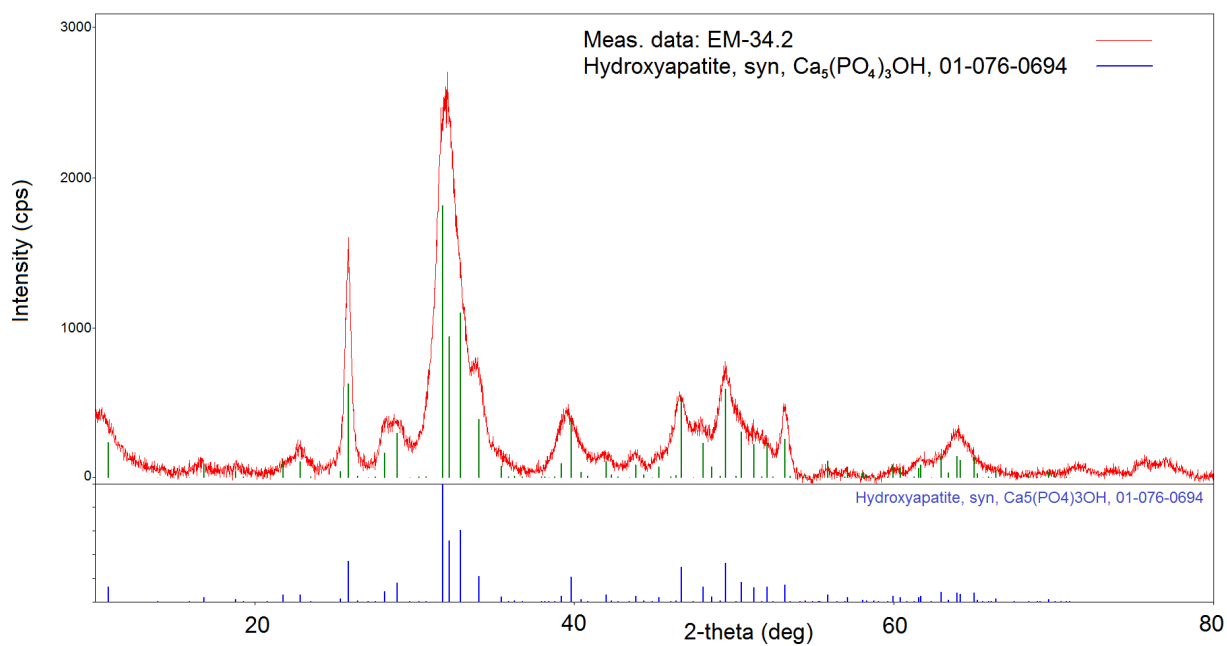
Výsledky a diskusia

Výsledky meraní *HA* metódou FT-IR a XRPD potvrdili identitu hydroxyapatitu (viď Obr. 1 a Obr. 2). V FT-IR spektre *HA* sú viditeľné pásy, ktoré podľa literatúry [5] odpovedajú valenčným a deformačným vibráciám OH v oblasti 3232 a 1639 cm^{-1} , pás 1018 cm^{-1} odpovedá valenčným vibráciám PO_4^{3-} a deformačným vibráciám PO_4^{3-} odpovedajú pásy 601 a 559 cm^{-1} . Z meraní XRPD ďalej vyplýva, že *HA* má kryštalickú hexagonálnu štruktúru. Štruktúrne údaje odpovedajú literatúre [6].

Z metódy XRPD bola ďalej vypočítaná veľkosť častíc pri danej teplote reakcie, ktorá je uvedená v Tab. 1. S rastúcou reakčnou teplotou rastie stredná veľkosť častíc. Veľkosť častíc v roztoku (v destilovanej vode) a zeta potenciál boli stanovované u vzoriek pripravovaných z 0x, 2x, 5x, 100x, 200x a 1000x riedených zásobných reakčných roztokov. Priemerná veľkosť častíc v roztoku je 2 μm , pretože častice v roztoku agregujú. Indikuje to nízky záporný potenciál zeta (viď Tab. 2).



Obr. 1: FT-IR spektrum hydroxyapatitu



Obr. 2: XRPD difraktogram hydroxyapatitu porovnaný s hydroxyapatitom z databáz

Tab. 1: Závislosť strednej veľkosti častíc na reakčnej teplote vyhodnocované na XRPD

Teplota [°C]	80	120	200
Stredná veľkosť častíc [nm]	11	25	60

Tab. 2: Namerané hodnoty veľkosti (priemer) častíc v roztoku a zeta potenciálov jednotlivých vzoriek HA

Vzorka	Prostredie	Riedenie	Veľkosť častíc [nm]	Zeta potenciál [mV]
1	destilovaná voda	0x	994	-14,3
2	destilovaná voda	2x	3 075	-2,2
3	destilovaná voda	5x	1 821	-7,8
4	destilovaná voda	100x	1 784	-0,7
5	destilovaná voda	200x	2 129	-0,3
6	destilovaná voda	1000x	3 350	-0,6

Tab. 3: Aktivity jednotlivých spracovaní hydroxyapatitu značeného ^{223}Ra

Značenie	Vzorka	Typ značenia	Vstupná aktivita [cps]	Aktivita zrazeniny [cps]	Výtťažok značenia [%]
^{223}Ra	7	v objeme	17 024	16 782	100
	8	v objeme	17 525	17 010	98
	9	v objeme	17 571	17 243	99
	10	na povrchu	10 659	10 468	98
	11	na povrchu	10 660	10 430	98
	12	na povrchu	3 213	3 056	95

Tab. 4: Aktivity jednotlivých spracovaní hydroxyapatitu značeného $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Značenie	Vzorka	Typ značenia	Vstupná aktivita [MBq]	Aktivita zrazeniny [MBq]	Výtťažok značenia [%]
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	13	v objeme	139	82	93
	14	v objeme	149	89	93
	15	v objeme	151	91	94
	16	na povrchu	155	92	93
	17	na povrchu	143	86	94
	18	na povrchu	162	98	94

Vzorky značené ^{223}Ra v objeme i na povrchu majú vyššie výtťažky značenia. Výtťažky vzoriek značených v objeme majú výtťažky v priemere 99 % a na povrchu okolo 97 %.

Výtťažky značení $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v objeme sa pohybujú okolo 93 % a u vzoriek značených na povrchu okolo 94 %.

Záver

Zrážaním bol pripravený hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ktorý bol analyzovaný metódou FT-IR, XRPD a DLS. Priemerná veľkosť častíc HA v destilovanej vode je 2 μm . Tento systém je nestabilný a častice značne agregujú. Priemerná hodnota zeta potenciálu je - 4 mV. Závislosť strednej veľkosti častíc HA na reakčnej teplote bolo študované pri teplotách 80, 120 a 200 °C. Stredná veľkosť častíc s rastúcou teplotou rastie. Ďalej boli pripravené vzorky HA s ^{223}Ra a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ značené v objeme a na povrchu. Z experimentov bolo zistené, že vzorky značené ^{223}Ra majú vyššie výťažky značenia ako vzorky značené s $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Výťažky značenia u HA značených v objeme ^{223}Ra sú v priemere 99 % a 97 % na povrchu. Výťažky značenia $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na povrchu i v objeme sú v priemere 94 %.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantmi Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy Českej republiky (LK21310), Technologickou agentúrou Českej republiky (TA03010027) a Českým vysokým učením technickým v Prahe (SGS15/094/OHK4/1T/14).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Boll R. A., Malkemus D., Mirzadeh S. (2005) Appl. Radiat. Isotopes 62, p. 667
- [2] McDevit M. R., Sgouros G., Finn R. D., et. al. (1998) Eur. J. Nucl. Med. 25 (9), p. 1641
- [3] Henriksen G., Breistøl K., Bruland Ø. S., et. al. (2002) Cancer Res. 62, p. 3120
- [4] Lloret P. Á., Rodríguez-Navarro A. B., Romanek Ch., et. al. (2006) Macla 6, p. 45
- [5] Rehman I., Bonfield W. (1997) J. Mater. Sci. – Mater. M. 8, p. 1
- [6] Park J. (2008) Bioceramics. Springer, Verlag New York, USA, p. 177
- [7] Food and Drug Administration [Citované: 7. marec 2015]
< <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm080224.htm>>
- [8] Kozempel J., Vlk M., Málková E., et. al. (2015) J. Radioanal. Nucl. Ch. 304 (1), p. 443
- [9] Ong H. T., Loo J. S. C., Boey F. Y. C., et. al (2008) J. Nanopart. Res. 10, p. 141
- [10] Patel N., Gibson I. R., Ke S., et. al. (2001) J. Mater. Sci. – Mater. M. 12, p. 181