



تهیه و کنترل کیفی ترکیبات بلئومایسین نشاندار شده با رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷ برای مطالعه تومورهای سرطانی

امیرضا جلیلیان^{*}، پژمان روشن‌فرزاد، جمشید معافیان، محمدرضا انصاف، مهشید ثابت
پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج - ایران

چکیده: رادیوداروی [^{۵۵}Co] - بلئومایسین برای مطالعه تومورهای سرطانی کاربرد گسترده‌ای یافته است. با توجه به نیمه عمر کوتاه کبالت-۵۵، برای انجام مطالعات اولیه و بررسیهای کامل در زمینه نشاندارسازی، استفاده از رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷ به مراتب مناسبتر است. مطالعات جامع به منظور تعیین بهترین دما، اسیدیته، زمان و غلظت واکنشگرها برای نشاندارسازی با کبالت-۵۷ انجام شد. نتایج اولیه نشان دادند که بلئومایسین (به مقدار ۰/۳ میلی‌گرم) در محیط اسیدی ضعیف تا خنثی در دمای اتاق و در حضور کلرید کبالت (۰/۴ میلی‌کوری)، در محیط آبی کمپلکس تشکیل می‌دهد. کنترل‌های کیفی، از جمله کنترل رادیونوکلئیدی، رادیوشیمیایی و شیمیایی روی محصولات اولیه انجام گرفت که نشان‌دهنده امکان استفاده از این ترکیب در آزمونهای زیست‌شناختی بود. این نتایج در آینده نزدیک برای تهیه ترکیب [^{۵۵}Co] - بلئومایسین مورد استفاده قرار خواهند گرفت تا تصویربرداری و داده‌های زیست‌شناختی از آن تهیه شود.

واژه‌های کلیدی: کبالت-۵۷، سیکلوترون، کنترل کیفی، بلئومایسین، ترکیبات نشاندار، برش‌نگاری محاسبه شده با گسیل تک فوتون

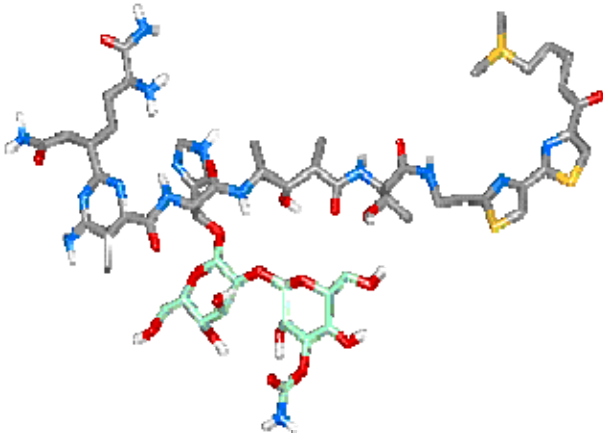
Preparation and Quality Control of Radiolabelled Cobalt-57 Bleomycins for Oncological Studies

A.R. Jalilian^{*}, P. Rowshanfarzad, J. Moafian, M.R. Ensaf, M. Sabet
Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute,
AEOI, P.O. Box: 31485-498, Karaj - Iran

Abstract: [⁵⁵Co] bleomycin has been widely used in oncological studies. Due to relative short half life of cobalt-55, optimization and feasibility studies for determination of the best labeling conditions is preferably performed using cobalt-57. In this study, the optimization of complexation conditions for time, temperature and ligand concentration were performed. The best labeling yield was obtained at room temperature in pH of 4-7, using 0.4 mCi of ⁵⁷CoCl₂ with 0.3mg of BLM in 30 minutes. The final radiopharmaceutical solution underwent common quality control tests, validating our future studies for animal scanning studies using [⁵⁵Co]bleomycin complex.

Keywords: Cobalt-57, Cyclotron, Quality Control, Bleomycin, Labelled Compounds, Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)

*email: ajalilian@nrcam.org



شکل ۱- ساختار فضایی آنتی‌بیوتیک بلئومایسین.

در بعضی از مطالعات انجام شده، پس از بررسی دقیق و جداسازی مولکولهای فعال موجود در نمونه‌های دارویی بلئومایسین، به بررسی خواص توموگرافی ایزومرها پرداخته شده است. این رادیودارو در سرطانهای ریه [۶]، همچنین در پیگیری میزان موفقیت آمیز بودن شیمی درمانی یا پرتودرمانی [۷ و ۸] بکار رفته است. مقایسه آن با ترکیب نشاندار دیگر بلئومایسین یعنی ایندیوم-۱۱۱ بلئومایسین [۹] نشان داد، در حالی که تومورها تقریباً حالت مردگی پیدا کرده باشند، کمپلکس ایندیوم فعال‌تر می‌شود. در صورتی که در مورد تومورهای جوانتر استفاده از کمپلکس کبالت ارجحیت دارد [۱۰].

نکته قابل توجه در مورد کبالت بلئومایسین، دفع ۷۰ درصدی آن از طریق مجاری ادراری است که نشان‌دهنده عدم تغییر در ساختار کمپلکس می‌باشد [۱۱]. در دهه ۱۹۹۰ روشی برای تهیه این رادیودارو با پایداری و آکتیویته ویژه بالا بکار رفت [۱۲]. در این روش بسیاری از لیگاندهای کبالت برای تصویربرداری از تومورها و درمان آنها مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

با توجه به تجارب قبلی ما در تولید رادیوداروها و بررسیهای کیفی-زیست‌شناختی ترکیبات نشاندار بلئومایسین برای مقاصد تشخیصی و درمانی [۱۳، ۱۴ و ۱۵] و لزوم انجام تحقیقات بیشتر در زمینه رادیوداروهای کبالت، به منظور دستیابی به سایر رادیوداروهای ایزوتوپ کبالت یعنی کبالت-۵۵ که در تصویربرداری به روش گسیل پوزیترون کاربرد دارد، برآن شدیم تا در ضمن امکان‌سنجی تولید کبالت-۵۷ با خلوص رادیودارویی مطلوب، به تهیه و کنترل کیفی مهمترین رادیوداروی حاوی این رادیوایزوتوپ یعنی رادیوداروی ^{57}Co -BLM پردازیم.

۱- مقدمه

رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷ توسط گروه تحقیق و توسعه پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی ایران تولید شده است. رادیوداروی ^{57}Co - بلئومایسین از معدود رادیوداروهای حاوی این رادیوایزوتوپ است که تاکنون در مطالعات بالینی متعددی بکار رفته است اما امروزه کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. کبالت-۵۷ از اولین ایزوتوپهای بکار رفته در پزشکی هسته‌ای است که از حدود دهه ۱۹۷۰ در نشاندارسازی ترکیبات طبیعی مانند سیانوکوئبالامین (ویتامین B_{12} فعال) [۱] و آنتی‌بیوتیکهای ضد سرطان مانند بلئومایسین مورد استفاده قرار گرفته است.

ترکیب ^{55}Co - بلئومایسین که در تصویربرداری با گسیل پوزیترون کاربرد فراوانی دارد، به لحاظ مطالعات بالینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به نیمه عمر نسبتاً طولانی رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷ (۲۷۱/۹ روز) در مقایسه با کبالت-۵۵ (۱۷/۵ ساعت)، بدون شک مناسبتر آن است که مطالعات اولیه و بهبود شرایط نشاندارسازی به منظور تحقیق در زمینه این رادیوداروها، ابتدا با استفاده از کبالت-۵۷ انجام شود. مشخصات هسته‌ای این دو رادیوایزوتوپ به طور خلاصه در جدول ۱ درج شده‌اند [۲].

رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷ را می‌توان با استفاده از واکنش $^{57}\text{Co}(\text{p},\text{x})^{57}\text{Ni}(\text{nat})$ در سیکلوترون تولید کرد. با وجود این که کمپلکسهای نشاندار شده با این عنصر نسبت به مس و تکنسیوم فراوانی کمتری دارند، از پایداری مناسبی برخوردار هستند. آنتی‌بیوتیک بلئومایسین (شکل ۱) در درمان بالینی سرطانها طی سه دهه اخیر با موفقیت بکار رفته است. از طرفی کمپلکسهای نشاندار بلئومایسین، مانند کبالت بلئومایسین، در انکولوژی کاربردهای متنوعی دارد که از آن جمله می‌توان به بررسی متاستازهای مغزی [۳] و سرطانهای صدفی بافت سر و گردن [۴]، همچنین پیگیری میزان اثربخشی شیمی درمانی [۵] اشاره کرد.

جدول ۱- مشخصات هسته‌ای رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷.

رادیوایزوتوپ	نیمه عمر	انرژیهای گاما (keV) و شدت (%)
^{57}Co	۲۷۱/۹ روز	۱۴/۴(۹/۱۶)، ۱۲۲(۸۵/۶)، ۱۳۶/۴۷(۱۰/۶۸)
^{55}Co	۱۷/۵۳ ساعت	۹۳۱/۳(۷۵)، ۴۷۷/۲(۲۰/۲)، ۱۳۱۶/۴(۷/۰۹)، ۱۴۰۸/۴(۱۶/۸۸)



۲- روش کار

کلیه مواد شیمیایی از شرکت‌های Aldrich و Merck تهیه شدند. «کروماتوگرافی روی لایه نازک» مواد غیرنشاندار، با استفاده از لایه سیلیکاژل روی پایه آلومینیومی (مدل F 1500/LS 254, 20x20cm, TLC Ready Foils Schleicher & Schuell) صورت گرفت. بلئومایسین به صورت نمک سولفات (BLEO-S) ساخت شرکت داروسازی Nippon Kayaku در کشور ژاپن، از طریق داروخانه سیزده آبان وابسته به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران در اختیار قرار گرفت. آکتیویته ویژه ماده نشاندار شده، با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از ماده غیررادیوآکتیو روی کروماتوگرام حساب شد. رادیوکروماتوگرافی روی یک موتور متحرک مجهز به آشکارساز ژرمانیوم فراخالص مدل (GC 1020-7500 SL) با استفاده از لایه‌های سیلیکاژل روی پایه آلومینیوم صورت گرفت. کلیه شمارشها با استاندارد به پیک ۱۲۲ کیلو الکترون ولت به انجام رسید. سولفات و کلراید نیکل با درجه خلوص ۹۹ درصد برای ساخت هدف مورد استفاده قرار گرفت.

۱-۲ استخراج و خالص‌سازی کبالت-۵۷ از هدف

هدف نیکل (Ni) طبیعی به ضخامت تقریبی ۱۰۰ میکرون به روش آبکاری لایه ضخیم بر روی زیرلایه مسی دارای روکش نازکی از طلا نشانده شد. روکش طلا برای جلوگیری از ورود مس به محصول و ساده‌تر شدن فرایند پردازش شیمیایی هدف مورد استفاده قرار گرفت. ماده هدف پس از انجام بمباران با پروتونهای ۲۲ MeV، در ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول گرم اسید کلریدریک ۱۲ نرمال حل شد. این محلول تبخیر و ماده باقیمانده در ۲۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۹ نرمال حل شد. این محلول به ستون مبادله یونی (100-200 mesh, AG 1X8 Cl-form, h:7 cm, Ø:1 cm) که قبلاً با ۲۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۹ نرمال شسته شده بود، تزریق گردید. کبالت در ستون کروماتوگرافی جذب شده و یونهای نیکل با عبور ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۹ نرمال از ستون خارج شدند. سپس برای استخراج کبالت، ستون با ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۵ نرمال شسته شد. این مراحل ۵ ساعت به طول انجامید.

۲-۲ کنترل کیفی

۱-۲-۲ خلوص شیمیایی

تولید کبالت-۵۷ با بمباران هدف نیکل جامد نشانده شده بر روی پایه‌ای از جنس مس طبیعی دارای روکش طلا صورت گرفت. بنابراین، محلول نهایی کلرور کبالت-۵۷ از نظر وجود نیکل مورد بررسی قرار گرفت. کنترل کیفی محصول با استفاده از روشهای رنگ‌سنجی با استفاده از معرف دی‌متیل گلی‌اکسیم انجام شد.

۲-۲-۲ خلوص رادیونوکلئیدی

درجه خلوص رادیونوکلئیدی محصول به وسیله آشکارساز ژرمانیوم فراخالص (HPGe) جفت شده با آنالیزور چند کاناله مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که در این تحقیق به دلیل استفاده از نیکل طبیعی به عنوان ماده هدف، ناخالصیهای کبالت-۵۶ و کبالت-۵۸ نیز تولید شدند که پس از گذشت یک سال، تقریباً به طور کامل واپاشیده شدند و ماده رادیوآکتیو مورد نظر برای انجام فرایند نشاندارسازی آماده شد.

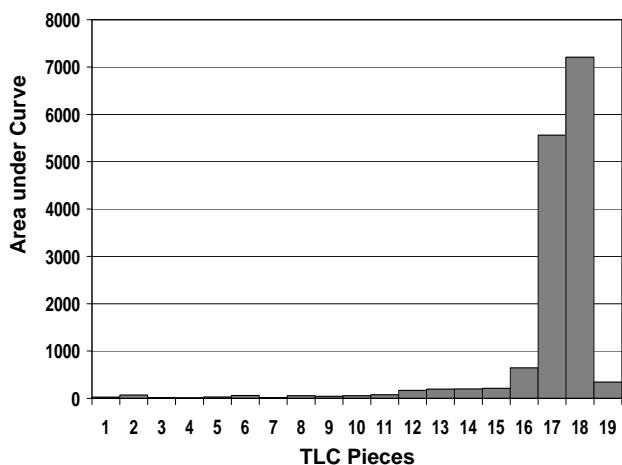
۳-۲ تهیه کبالت-۵۷ بلئومایسین

ویال ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول رادیوآکتیو ^{57}Co - کلرید کبالت (۰/۴ میلی کوری) با افزودن آب کاملاً خالص و تبخیر مجدد (سه مرتبه تکرار)، برای نشاندارسازی آماده شد. مخلوط هر بار با جریان هوا و حرارت ملایم ۵۰ درجه سلسیوس خشک می‌شد. سپس با افزودن مقداری از محلول نمکی نرمال حاوی بلئومایسین (۱ میلی گرم بلئومایسین در میلی‌لیتر)، ضمن بهم خوردن به مدت ۱۵، ۴۵ و ۶۰ دقیقه در دماهای ۲۵، ۴۵ و ۸۰ درجه سلسیوس حرارت داده می‌شد. محلول رادیوآکتیو پس از رسیدن به دمای محیط، به منظور کنترل کیفی به روش کروماتوگرافی روی لایه نازک سیلیکاژل با حلال استات آمونیوم- متانول ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، مورد بررسی قرار گرفت. خلوص رادیوشیمیایی به صورت دو رادیوپیک رادیوآکتیو ^{57}Co - کبالت بلئومایسین در $R_f=0/4$ و $R_f=0/68$ به دست آمد. برای انجام دادن تستهای زیست‌شناختی، محلول نهایی از ستون Millex با منافذ ۰/۲۲ میکرونی عبور داده

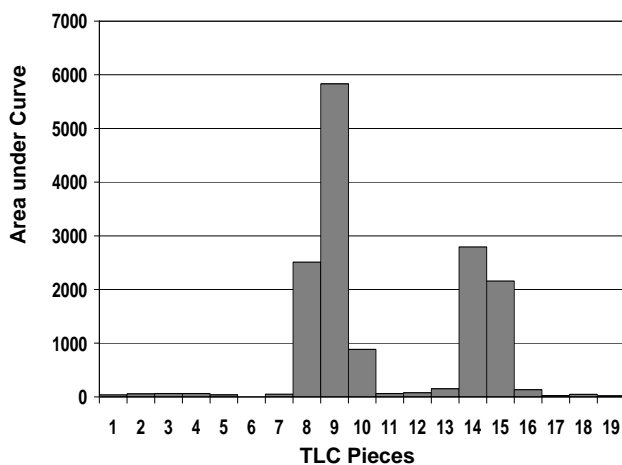
مولکول نشاندار به واسطه درگیر شدن گروه‌های قطبی NH, SH در مولکول اولیه، پس از نشاندار شدن با کبالت-۵۷ دارای قطبیت اندکی کمتر از فرم آزاد می‌شود. از همین خاصیت می‌توان در جداسازی شیمیایی $[^{57}\text{Co}]\text{-BLM}$ از یون نیکل و سایر کمپلکسهای احتمالی فاقد اثر دلخواه، استفاده کرد.

کنترل کیفی محصول نشاندار شده: خلوص رادیوشیمیایی $[^{57}\text{Co}]\text{-BLM}$ به دست آمده، به روش کروماتوگرافی روی لایه نازک سیلیکاژل بررسی شد. شکل ۳ رادیوکروماتوگرام محلول حاصل از واکنش را نشان می‌دهد.

به منظور دستیابی به بهترین شرایط واکنش، آزمایشهایی برای تعیین اسیدیته، دما، زمان و نسبت BLM به کبالت آکتیو انجام گرفت.



شکل ۲- رادیوکروماتوگرام محلول کبالت-۵۷ شسته شده با اسید کلریدریک بر اساس پیک ۱۲۲ keV.



شکل ۳- رادیوکروماتوگرام محلول نشاندار شده کبالت-۵۷ بلئومایسین بر اساس پیک ۱۲۲ keV.

شد. سپس آزمونهای کنترل کیفی (شامل کنترل رادیونوکلئیدی، رادیوشیمیایی و شیمیایی) روی محلول حاصل به عمل آمد.

۴- کنترل کیفی داروی کبالت-۵۷ بلئومایسین

به منظور انجام دادن کنترل کیفی، محلول رادیوآکتیو حاصل به روش کروماتوگرافی روی لایه نازک سیلیکاژل با حلال بند ۲-۳ به عنوان فاز متحرک، مورد بررسی قرار گرفت. خلوص رادیوشیمیایی، با مقایسه رادیوپیک مولکولهای نشاندار $[^{57}\text{Co}]$ بلئومایسین در $R_f=0/68$ و $R_f=0/40$ نسبت به رادیوپیک یون کبالت-۵۷ در $R_f=0/9$ بررسی شد (شکل ۲).

۳- یافته‌ها و بحث

بمباران: پس از ۲۰۰۰ میکروآمپر ساعت بمباران پروتونی با انرژی ۲۲ میلیون الکترون ولت و شدت جریان ۱۸۰ میکروآمپر، محصول نهایی (^{57}Co) با آکتیویته ۲۲ میلی کوری به دست آمد. بهره تولید در حدود ۱۱ میکروکوری بر میکروآمپر ساعت حاصل شد.

کنترل کیفی محصول کبالت-۵۷: کنترل شیمیایی با استفاده از معرف دی‌متیل‌گلی‌اکسیم به انجام رسید. در صورت وجود یونهای نیکل، محلول به رنگ قرمز درمی‌آید. با وجود این که حداکثر دقت عملی در این تحقیق برای نیکل ۲ بخش در میلیون در اسیدیته بکار رفته بود، هیچ تغییر رنگی در محلول مشاهده نشد، و این بیانگر عدم وجود یونهای مذکور تا حد بسیار پایین‌تر از محدوده مجاز است.

در طیف کامل نمونه حاصل از آشکارساز ژرمانیوم فراهالض که یک سال پس از انجام بمباران گرفته شد، دو فوتوپیک ۱۲۲ و ۱۳۶ کیلوالکترون ولت مشاهده شد که هر دو مربوط به رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷ هستند. بنابراین، محصول دارای درجه خلوص رادیونوکلئیدی بالایی است.

نشاندارسازی: در هر نشاندارسازی، نسبت دو رادیوپیک رادیوداروی $[^{57}\text{Co}]\text{-BLM}$ در $R_f=0/68$ و $R_f=0/42$ (که وابسته به دو ایزومر بلئومایسین هستند) به یون آزاد کبالت در $R_f=0/9$ معیار موفقیت‌آمیز بودن نشاندارسازی در نمونه دارویی محسوب می‌شود. فرم $[^{57}\text{Co}]\text{-BLM}$ که دارای جذب فرابنفش است، بیشینه جذب رادیوآکتیویته را نیز دارا می‌باشد. این



بنابراین آکتیویته ویژه حدود $1/9-3/8 \text{ Ci/mmole}$ خواهد بود.

۴- نتیجه گیری

مراحل کنترل کیفی محصول نشان داد که کبالت-۵۷ تولید شده توسط این گروه تحقیقاتی، دارای ویژگیهای کاملاً مطلوب برای تهیه رادیوداروها است. مولکول دارویی BLM با کبالت-۵۷ نشاندارسازی و رادیودارو با درصد خلوص قابل قبول (بالای ۹۹ درصد) به دست آمد. رادیوداروی حاصل پس از عبور از صافی میکروبی ۰/۲۲ میکرون، قابل تجویز به بیمار است و به واسطه خلوص رادیوشیمیایی بالای ۹۹ درصد، بدون حامل و با آکتیویته ویژه بالای 2 Ci/mmole در آینده قابل ارسال به مراکز احتمالی درخواست‌کننده رادیودارو خواهد بود. با توجه به نیمه عمر بالای رادیودارو ارسال به مکانهای دور از مرکز به سهولت امکانپذیر است. مجموع مراحل نشاندارسازی و فرموله کردن رادیودارو در حدود ۳۰ دقیقه به طول انجامید. مهمتر از همه اینکه در صورت تولید کبالت-۵۵ که یک رادیویازوتوپ PET می‌باشد و با توجه به کاربرد گسترده رادیوداروهای PET و رویکرد متخصصین به خرید و استفاده از دوربینهای PET با استفاده از داده‌های این تحقیق، شرایط بهینه برای تولید ^{55}Co -BLM به صورت قابل استفاده در کاربردهای بالینی فراهم است.

- **اثر اسیدیته:** با توجه به اینکه BLM دارای گروههای شبه قلیایی است که قادرند بطور مستقیم با یونهای فلزی واکنش دهند، برای کمپلکس شدن نیازی به بار الکتریکی ندارد. در صورت قلیایی شدن محیط، احتمال شکست مولکول بلئومایسین وجود دارد و در محیطهای اسیدی، پروتون‌دار شدن این گروههای قلیایی از ایجاد کمپلکس جلوگیری می‌کند. بنابراین بهترین دامنه اسیدی شدن بین ۴-۷ در نظر گرفته شد.

- **اثر دما:** افزایش دمای واکنش تا ۹۰ درجه سلسیوس کمکی به افزایش بازده نکرد، ولی از ۹۰ درجه سلسیوس بالاتر، تولید محصول نشاندار دچار اختلال شد و خالص‌سازی محصول نهایی نیز با اشکال مواجه گردید. با توجه به این که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بازده بسیار مناسبی به دست آمد، همین دما بعنوان دمای مناسب انتخاب شد.

- **اثر زمان:** در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (دمای بهینه)، در ۲۵ دقیقه اول بازده رادیوشیمیایی بسیار عالی به دست آمد و پس از آن، تغییر محسوسی ایجاد نشد.

- **اثر نسبت کبالت رادیوآکتیو به BLM** واکنش مقادیر ۰/۳، ۰/۶، ۱، ۲ میلی گرم BLM با ۳۰۰-۴۰۰ میکروکوری از محصول (به صورت کلرید کبالت) در شرایط پیش گفته بررسی شد. بهترین واکنش با حدود ۲-۳ میلی گرم BLM حاصل شد و استفاده از مقادیر بیشتر از این مقدار ماده، تغییری در بازده ایجاد نکرد. اما BLM غیررادیوآکتیو در اتصال با سلول سرطانی با داروی نشاندار رقابت می‌کند و اثرهای سمی نیز دارد. بنابراین مناسب‌ترین نسبت برای کبالت رادیوآکتیو بر حسب میلی کوری و BLM بر حسب میکروگرم، به نسبت تقریباً یک به یک تعیین شد.

- **بررسی پایداری:** پس از گذشت ۱۵ ساعت، هیچگونه تغییری در خلوص رادیوشیمیایی محلول کمپلکس نشاندار شده مشاهده نشد که نشان‌دهنده پایداری کمپلکس رادیودارویی حاصل است.

- **محاسبه آکتیویته ویژه:** در صورتیکه A آکتیویته بکار رفته در فرمولاسیون ($0/4 \text{ mCi}$)، Ra بازده نشاندارسازی (۹۹درصد) و M جرم مولکولی (1422 gr/mol) و W وزن ماده مصرفی ($0/3-0/6 \text{ mgr}$) باشد، آکتیویته ویژه A_s از رابطه زیر حساب می‌شود:

$$A_s = (A \times Ra \times M/W)$$

References:

1. R.A. Beck, J.M. Anes, L.M. Savini, R.A. Mateer, "Picomolar quantitation of free sulfite in foods by means of [⁵⁷Co]hydroxocobalamin and radiometric chromatography of [⁵⁷Co]sulfitecobalamin. Method, applications and significance of coexisting sulfides," J. Chromatogr. A. **881(1-2)**, 345-356 (2000).
2. R.B. Firestone, V.S. Shirley, C.M. Baglin, J. Zipkin, "Table of isotopes," 8th edition, John Wiley and Sons, New York, 1333 (1996).
3. D. Front, E. Even-Sapir, G. Iosilevsky, O. Israel, A. Frenkel, G.M. Kolodny, M. Feinsud, "Monitoring of ⁵⁷Co-bleomycin delivery to brain metastases and their tumors of origin," J. Neurosurg. **67(4)**, 506-510 (1987).
4. T. Pertynski and K. Durski, "⁵⁷Co-bleomycin scintigraphy in staging of carcinoma of the cervix," Nuklearmedizin, **24(1)**, 48-51 (1985).
5. T. Pertynski, G. Reznik, P. Mariss, M.B. Ketkar, H. Haindl, G. Dieffenbach, "The influence of chemotherapy on the distribution of ⁵⁷Co-bleomycin in chemically induced squamous cell carcinoma of mouse skin," Eur. J. Nucl. Med., **4(1)**, 55-59 (1979).
6. D. Slosman, B. Polla, R. Egeli, D. Townsend, C. Signorelli, R. Megevand, A. Donath, "Cobalt-57 bleomycin scanning for lung cancer detection: a prospective study in thoracic surgery," Nucl. Med. Commun, **6(4)**, 235-244 (1985).
7. J.P. Homasson, A. Pecking, S. Roden, M. Angebault, J.P. Bonniot, "Tumor fixation of bleomycin labeled with ⁵⁷cobalt before and after cryotherapy of bronchial carcinoma," Cryobiology, **29(5)**, 543-548 (1992).
8. E. Even-Sapir, L. Bettman, G. Iosilevsky, D. Milshtein, A. Frenkel, G.M. Kolodny, S. Ben-Haim, O. Israel, D. Front, "SPECT quantitation of cobalt-57-bleomycin to predict treatment response and outcome of patients with lung cancer," J. Nucl. Med., **35(7)**, 1129-1133 (1994).
9. A.R. Jalilian, M. Mirzaii, A.R. Karimian, J. Moafian, G. Aslani, S. Moradkhani, M. Kamalidehghan, S. Daneshvari, F. Tabeie, G. Raisali, "Production of ¹¹¹In-bleomycin," Iran. J. Nuclear. Med., **23**, 19-26 (2005).
10. D.Y. Hou, H. Hoch, G.S. Johnston, K.C. Tsou, R.J. Farkas, E.E. Miller, "Stability of ¹¹¹In-bleomycin in vivo-properties compared with ⁵⁷Co-bleomycin," Eur. J. Nucl. Med., **8(12)**, 535-540 (1983).
11. J. Bier, E. Loer, J. Franke, "Kinetics of ⁵⁷Co-bleomycin in sheep after intra-arterial injection in the head and neck region," Recent. Results. Cancer. Res., **86**, 141-151 (1983).
12. J. Belehradec and L.M. Mir, "Stable [⁵⁷Co]-bleomycin complex with a very high specific radioactivity for use at very low concentrations," Biochem. Biophys. Res. Commun, **173(1)**, 259-264 (1990).
13. A.R. Jalilian, P. Rowshanfarzad, M. Sabet, A. Novinrooz, G. Raisali, "Preparation of [⁶⁶Ga]Bleomycin Complex as a Possible PET Radiopharmaceutical," J. Radioanal. Nucl. Chem. **264(3)**, 617-621 (2005).
14. A.R. Jalilian, B. Fateh, M. Ghergherehchi, A. Karimian, M. Matloobi, S. Moradkhani, M. Kamalidehghan, "Preparation, distribution, stability and tumor imaging properties of [⁶²Zn]Bleomycin in normal and tumor-bearing mice," Iran.J.Radiat.Res., **1(1)**, 37-44 (2003).
15. A.R. Jalilian, P. Rowshanfarzad, A. Rahiminejad-Kisomi, S. Moradkhani, F. Motamedi, "Preparation, biodistribution and stability of [⁶⁵Zn]bleomycin complex," DARU, **12(3)**, 115-122 (2004).