

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2018.4.2.90>

Preparation of radiolabeled polycyclic aromatic hydrocarbon assemblies for biological assessment of diesel exhaust particulates

Chang Heon Lee,¹ Ha Eun Shim,¹ Lee Song,¹ Jongho Jeon^{1,2,*}

¹ Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup, Jeonbuk 56212, Republic of Korea,

² Department of Radiation Biotechnology and Applied Radioisotope Science, University of Science and Technology, Daejeon, Republic of Korea.

ABSTRACT

The potential health risk from inhalational exposure of diesel exhaust particulates (DEP) has gained considerable scientific interests. However, the long-term in vivo behavior of DEP have not been clearly understood due to the difficulty of accurate analysis of these substances in a living subject. We herein demonstrate a detail protocol for the preparation of radiolabeled DEP using a radioactive-iodine-tagged pyrene analog. The purified ¹²⁵I-labeled pyrene ([¹²⁵I]1) was obtained with a good radiochemical yield (32 ± 4%, n=3) and high radiochemical purity (>99%) from the stannylated precursor 2. Next, the purified [¹²⁵I]1 was successfully assembled into the DEP suspension in an efficient manner. The radiolabeled DEP was highly stable in a mouse serum for 7 days without significant deiodination or dissociation of [¹²⁵I]1. These results clearly indicate that the present radiolabeling method will be useful for biodistribution study of carbonaceous particulates in vivo.

Key Word: Radiolabeling, Radioactive iodine, PAHs, DEP

Introduction

독성 물질에 대한 노출과 관련된 인체 건강 위험을 더 잘 이해하려면, 유입 된 물질의 흡수, 이동, 배출 및 생체 내에서 물질과의 상호작용 등을 연구 하는 것이 필수적이다. 디젤 연료를 사용하는 엔진에서 발생하는 디젤 배기가스 입자(Diesel exhaust particle)는 인간의 건강과 환경에 심각한 악영향을 미치기 때문에 심각한 문제가 되고 있다(1-3). 최근 국제 암 연구소는(International agency for research on cancer, IARC) 디젤 배출물을 그룹 1의 인체 발암물질로 분류했으며(4), 몇 가지 독성학 연구에선 디젤 배기가스에 노출되면 만성폐질환, 천식, 폐암과 같은 호흡기 질환이 발생한다고 보고하였다(5-7). 디젤 배기가스 입자는 복합적인 혼

합물로, 고체 부분은 주로 다환 방향족 탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)를 포함한 다양한 유기 물질들로 구성되어 있고, 이와 관련된 다양한 독성학적 영향이 있어 우선순위가 높은 오염물질로 인식 되고 있다(8). 다환 방향족 탄화수소의 생물학적 흡수의 정량적 평가는 많은 부류의 화합물로 이루어져 있다는 물질의 특성 때문에 어려움을 겪는다. 실제로, 분자 검출에 주로 사용되는 분석 방법인 질량 분석법(Mass spectrometry)은 디젤 배기가스 입자가 넓은 입자 크기 분포를 가진 다양한 다환 방향족 탄화수소의 응집물로 구성되기 때문에 조직에서 디젤 배기가스 입자를 분석하기에는 부적합하다. 형광 물질을 이용한 광학 영상(Optical imaging)기술은 생체 내 분자를 추적하는데 자주 적용되었지만, 조직 깊은 곳에서 분자의 정량화는 신호 침투

Received: December 13, 2018 / Revised: December 19, 2018 / Accepted: December 21, 2018

Corresponding Author : Jongho Jeon, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, 29 Geumgu-gil, Jeongeup, Jeonbuk 56212, Republic of Korea, Tel: +82 63 570 3374; Fax: +82 63 570 3371; E-mail: jeonj@kaeri.re.kr

Copyright©2018 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

깊이의 한계로 인해 정확한 분석이 힘들다. 이러한 한계는 방사성동위원소를 사용하여 생체 내 유입된 물질의 고감도 검출을 가능하게 함으로써 극복할 수 있다. 본 연구에서는 체내에 흡수된 탄소성분의 미세입자를 추적하는데 활용할 수 있는, 방사성동위원소가 디젤 배기가스 입자 (^{125}I -DEP)를 합성하는 프로토콜을 소개하고자 한다.

Materials

본 연구에 사용된 Diesel particulate matter (NIST[®]SRM[®]2975), chloramine-T (#402869), 1-pyrenemethylamine hydrochloride (#401633), 4-iodobenzoic acid (#206547), sodium metabisulfite (#255556), acetic acid (#A6283), formic acid (#695076)는 Sigma-Aldrich Korea에서 구매하여 사용하였고, HPLC 용 acetonitrile (#100030)은 Merck에서 구매하였다. N-succinimidyl-4-(tributylstannyl)benzoate (#S8930)는 Synthonix에서 구매하였다. 표지에 사용된 방사성동위원소 ^{125}I NaI (in 0.1 M NaOH)는 새한산업에서 구매하였다. 구매한 모든 시약은 추가적인 정제 과정 없이 사용하였다. 실험 물질의 방사선량은 PerkinElmer사의 감마 카운터(1480 Wizard 3)를 사용하여 측정하였다. 물질의 분석과 정제에 사용된 고성능 액체 크로마토그래피(High performance

liquid chromatography, HPLC)는 Agilent사의 시스템 (Analytical HPLC: Infinity 1290, Preparative HPLC: Infinity 1260)을 사용했으며, 0.1%의 formic acid가 포함된 물(용액 A)과 0.1%의 formic acid가 포함된 acetonitrile(용액 B)을 HPLC 용매로 사용하였다. Analytical HPLC (Eclipse XDB-C18, 4.6 x 250 mm, 5 μm)는 1 mL/분의 속도, Preparative HPLC (Eclipse XDB-C18, 21.2 x 150 mm, 7 μm)는 10 mL/분의 속도로 용매를 흘려주었다. 표지 반응 후 C18 카트리지는 Waters사의 Sep-Pak plus light C18 cartridge (WAT023501)를 구매하여 사용하였다. 혈청 내 안정성 검사에서는 Sartorius Stedim Biotech 사의 VIVASPIN 500 원심분리 필터(2 mL)를 사용했다.

Protocol

1. ^{125}I 표지된 pyrene의 합성 (^{125}I 1)

1.1) Tributyl tin을 포함하고 있는 전구체2는 기존 본 연구팀에서 보고했던 방법을 활용하여 합성하였다(Figure 1) (9). 전구체 2 용액(1 mg in 100 μL DMSO)에 acetic acid (3 μL), ^{125}I NaI (55.5 MBq, 15 μL in 0.1 M NaOH)를 순서대로 첨가한다.

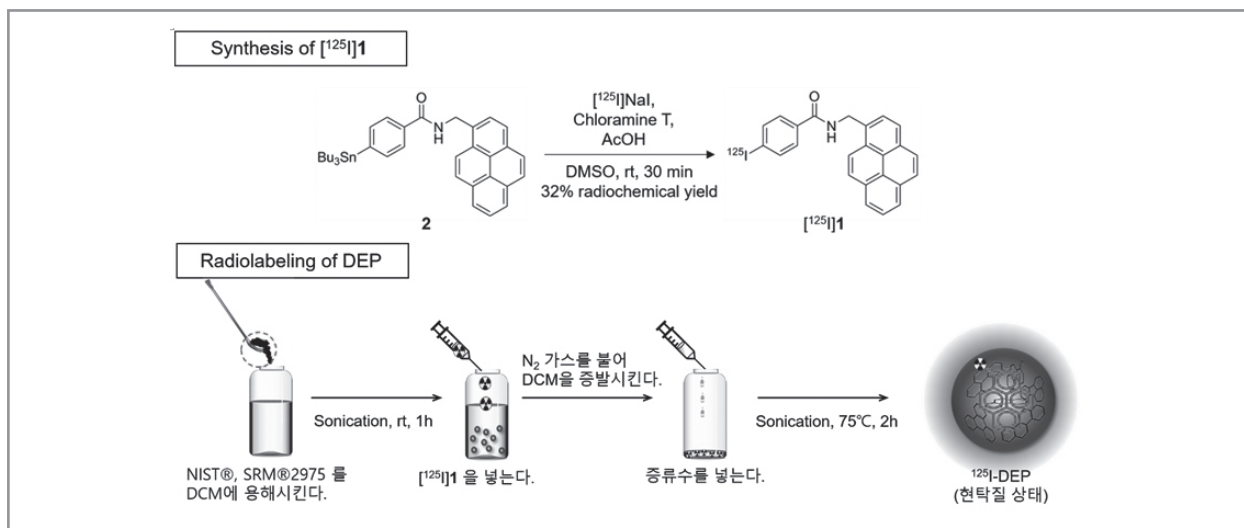


Figure 1. Synthetic procedure of ^{125}I 1 and radiolabeled DEP (^{125}I -DEP)

1.2) Chloramine T 를 증류수에 녹이고 (100 mg/mL), 상온에서 10 μ L(1 mg)를 1.1)에 첨가한다.

1.3) 상온에서 30분간 반응시킨 후, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 수용액 (2 mg/10 μ L)을 첨가하여 반응을 종료한다.

1.4) Analytical HPLC (flow rate: 1 mL/min, eluent gradient: 40% solvent B in solvent A for 0–2 min; 40–100% solvent B in solvent A for 2–25 min; 100% solvent B in solvent A for 25–35 min; retention time: 15.4 min)를 사용하여 표지 반응을 분석한다.

1.5) Preparative HPLC (flow rate: 10 mL/min, eluent gradient: 40% solvent B in solvent A for 0–2 min; 40–100% solvent B in solvent A for 2–25 min; 100% solvent B in solvent A for 25–35 min; retention time: 23.2 min)로 정제하여 ^{125}I 가 표지 된 화합물 [^{125}I]1을 얻는다.

1.6) 정제된 [^{125}I]1 용액에 30 mL의 물로 희석하고 tC18 light cartridge에 넣어준다. 물 (30 mL)로 씻어준 후, 에탄올 (2 mL)로 [^{125}I]1을 용출한다.

1.7) 진공 펌프를 활용하여 에탄올을 제거한다.

2. ^{125}I 표지된 디젤 배기가스 입자의 합성

2.1) DEP 분말(1.5 mg)에 dichloromethane (DCM, 4 mL)을 첨가하고 실온에서 1시간 동안 sonication하여 녹인다.

2.2) [^{125}I]1 (17.0 MBq)를 0.5 mL의 DCM에 녹인 후 2.1) 용액에 첨가한다.

2.3) 2.2) 용액의 DCM을 질소 가스 불어넣어 제거한다.

2.4) 용매를 완전히 제거한 후 물 (3 mL)를 2.3)에 첨가하고 75 $^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 sonication한다.

2.5) 원심분리 (13,000 rpm, 30 min, 4 $^\circ\text{C}$)를 이용하여 ^{125}I -pyrene이 도입된 다환 방향족 탄화수소를 정제한다.

2.6) 상등액(supernatant)은 제거하고, Pellet에 물 (2 mL)을 첨가하여 resuspension 한다.

3. ^{125}I 표지된 디젤 배기가스 입자의 마우스 혈청 내 안정성 검사.

3.1) 현탁질 (suspension)상태의 ^{125}I 표지된 디젤 배기가스 입자 (3.7 MBq/100 μ L)을 마우스 혈청 (1 mL)에 첨가하고 heating bath에서 37 $^\circ\text{C}$ 를 유지한다.

3.2) 3.1) 부분 샘플(100 μ L)을 각 시간(1.5, 5, 21, 28, 48, 72, 96, 168시간)마다 획득하여 물(400 μ L)과 섞어준다.

3.3) 3.2) 혼합물을 molecule weight cut off (5 KDa) 필터를 사용하여 원심분리 (13,000 rpm, 30 min) 한다.

3.4.) 분리된 상등액과 pellet를 감마 카운터 장비에서 측정한다.

Results & Discussion

본 연구의 전체 반응 과정을 요약하면 Figure 1과 같다. [^{125}I]1은 preparative HPLC로 정제하여 $32 \pm 4\%$ ($n=3$)의 방사화학적 수율로 얻을 수 있었다. Analytical HPLC 장비를 사용하여 분석한 결과 정제된 [^{125}I]1은 99% 이상의 방사화학적 순도와 비 방사성 기준 물질 1과 동일한 retention time을 보였다(Figure 2). 디젤 배기가스 입자가 [^{125}I]1 물질과 잘 조립되었는지 확인하기 위해 원심분리 여과를 했을 때, 방사능 검출기를 사용한 분석 결과 99% 이상의 방사능이 탄화수소 pellet에서 검출되었기 때문에 디젤 배기가스 입자에 [^{125}I]1 물질이 자기 조립(self-assembly) 형태로 결합되었음을 확인하였다. ^{125}I 표지된 디젤 배기가스 입자의 생체 내 안

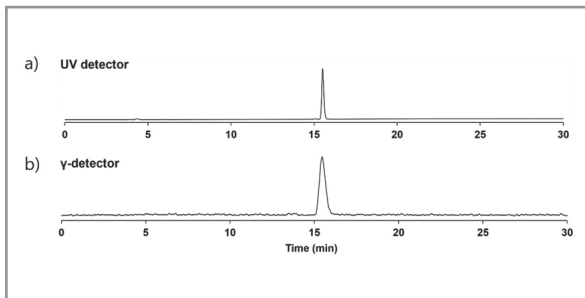


Figure 2. Analytical HPLC chromatogram of the purified $[^{125}\text{I}]1$. a) UV detector, and b) γ -detector.

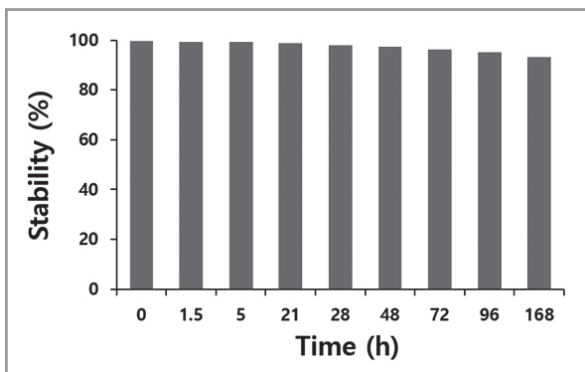


Figure 3. Stability test of ^{125}I -DEP in mouse serum. (Stability (%) = $\text{Cp} / (\text{Cp} + \text{Cs}) \times 100$, Cp = radioactivity in the pellet, Cs = radioactivity in the supernatant)

정성을 알아보기 위해 진행한 안정성 검사에서 마우스 혈청 내에서 1주일 후 93.6%의 안정성을 나타냈다 (Figure 3). 따라서 본 프로토콜을 통해 합성된 물질(^{125}I -DEP)이 장기간 체내 분포 평가 및 단일 광자 단층촬영을 통한 동태평가가 가능함을 나타낸다.

Conclusion

본 프로토콜에서는 다환 방향족 탄화수소 구조를 가진 디젤 배기가스 입자를 방사성 요오드를 사용하여 표지 하는 방법을 소개하였다. 이 물질을 사용하여 생체 내에서 유해한 화학 물질의 행동에 대한 중요한 정보를 제공하며, 궁극적으로 환경 역학에서 건강 영향을 모델링하는 데 있어 도움이 될 수 있을 것으로 예상된다. 이 연구에 사용된 Diesel particulate matter (NIST[®]SRM[®]2975)외에도 다양한 다환 방향족 탄화수소로 구성된 미세입자가 보고 되어 있다. 따라서 본 프로토콜은 한 가지 종류의 디젤 배기가스 입자에

만 국한되지 않고 다른 다환 방향족 탄화수소 기반의 환경독성 입자 및 탄소 기반 합성 물질의 체내 평가에도 활용될 것으로 기대된다.

References

1. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev* 2010;110:2858–2902.
2. Holland JP, Divilov V, Bander NH, Smith-Jones PM, Larson SM, Lewis JS. ^{89}Zr -DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo. *J Nucl Med* 2010;51:1293–1300.
3. Holland JP, Sheh Y, Lewis JS. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nucl Med Biol* 2009;36:729–739.
4. Pandya DN, Bhatt N, Yuan H, Day CS, Ehrmann BM, Wright M, Bierbach U, Wadas TJ. Zirconium tetraazamacrocyclic complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development. *Chem Sci* 2017;8:2309–2314.
5. Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Beylergil V, Lyashchenko S, Ruan S, Solomon SB, Durack JC, Carrasquillo JA, Lefkowitz RA, Gonen M, Lewis JS, Holland JP, Cheal SM, Reuter VE, Osborne JR, Loda MF, Smith-Jones PM, Weber WA, Bander NH, Scher HI, Morris MJ, Larson SM. ^{89}Zr -huJ591 immuno-PET imaging in patients with advanced metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014;41:2093–2105.
6. Ulaner GA, Hyman DM, Ross DS, Corben A, Chandarlapaty S, Goldfarb S, McArthur H, Erinjeri JP, Solomon SB, Kolb H, Lyashchenko SK, Lewis JS,

- Carrasquillo JA. Detection of HER2-Positive Metastases in Patients with HER2-Negative Primary Breast Cancer Using ^{89}Zr -Trastuzumab PET/CT. *J Nucl Med* 2016;57:1523–1528.
7. Gaykema SB, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN, Pleijhuis RG, Timmer-Bosscha H, Pot L, van Dam GM, van der Meulen SB, de Jong JR, Bart J, de Vries J, Jansen L, de Vries EG, Schröder CP. ^{89}Zr -bevacizumab PET imaging in primary breast cancer. *J Nucl Med* 2013;54:1014–1018.
8. Gaykema SB, Schröder CP, Vitfell-Rasmussen J, Chua S, Oude Munnink TH, Brouwers AH, Bongaerts AH, Akimov M, Fernandez-Ibarra C, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Swanton C, Banerji U. ^{89}Zr -trastuzumab and ^{89}Zr -bevacizumab PET to evaluate the effect of the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2014;20:3945–3954.
9. Bahce I, Huisman MC, Verwer EE, Ooijevaar R, Boutkourt F, Vugts DJ, van Dongen GA, Boellaard R, Smit EF. Pilot study of ^{89}Zr -bevacizumab positron emission tomography in patients with advanced non-small cell lung cancer. *EJNMMI Res* 2014;4:35.
10. Oosting SF, Brouwers AH, van Es SC, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Lub-de Hooge MN, Hollema H, de Jong JR, de Jong IJ, de Haas S, Scherer SJ, Sluiter WJ, Dierckx RA, Bongaerts AH, Gietema JA, de Vries EG. ^{89}Zr -bevacizumab PET visualizes heterogeneous tracer accumulation in tumor lesions of renal cell carcinoma patients and differential effects of antiangiogenic treatment. *J Nucl Med* 2015;56:63–69.
11. vanAsselt SJ, Oosting SF, Brouwers AH, Bongaerts AH, de Jong JR, Lub-de Hooge MN, Oude Munnink TH, Fiebrich HB, Sluiter WJ, Links TP, Walenkamp AM, de Vries EG. Everolimus reduces ^{89}Zr -bevacizumab tumor uptake in patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2014;55:1087–1092.