

PREPARASI DAN STUDI AWAL BIODISTRIBUSI ^{99m}Tc –IMUNOGLOBULIN M YANG AKAN DIGUNAKAN SEBAGAI PREPARAT PENATAH INFEKSI/INFLAMASI

Laksmi A, Sri Setiowati, Karyadi, Gina M, Widyastuti W, Agus A.
Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka BATAN
Kawasan Puspiptek, Tangerang, Banten

ABSTRAK

PREPARASI DAN STUDI AWAL BIODISTRIBUSI ^{99m}Tc – IMUNOGLOBULIN M YANG AKAN DIGUNAKAN UNTUK PREPARAT PENATAH INFEKSI/INFLAMASI.

Radiofarmaka telah menunjukkan manfaat yang nyata dan spesifik dalam pelayanan kesehatan, terutama untuk diagnosis dan terapi antara lain untuk penyakit kanker, inflamasi dan infeksi. Kasus infeksi dan inflamasi banyak terdapat di Indonesia, teknik kedokteran nuklir menggunakan radiofarmaka berbasis antibodi poliklonal yang ditandai dengan teknesium-99m merupakan salah satu metode alternatif yang sedang dikembangkan untuk diagnosis infeksi dan inflamasi. Saat ini telah dilakukan preparasi ^{99m}Tc - Imunoglobulin M (^{99m}Tc -IgM), preparasi ^{99m}Tc -IgM dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu: reduksi IgM menggunakan merkaptoetanol dengan perbandingan molar IgM terhadap merkaptoetanol 1:2000-12000, pemurnian melalui kolom PD-10, analisis hasil reduksi dan pengukuran hasil pemurnian dilakukan dengan HPLC *size exclusion* dan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm serta pelabelan IgM dengan ^{99m}Tc . Pelabelan ini dilakukan dengan menambahkan kit MDP yang mengandung Sn(II) dan co-ligand serta larutan ^{99m}Tc perteknetat dari generator $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Hasil penandaan dianalisis dengan kromatografi lapis tipis/kromatografi kertas untuk mengetahui kemurnian radiokimianya. Untuk mengetahui stabilitas sediaan di dalam tubuh manusia dilakukan uji stabilitas dalam serum manusia selama 1 dan 2jam, Uji biodistribusi dilakukan pada mencit yang diinduksi dengan bakteri. Hasil analisis dengan kromatografi lapis tipis/kromatografi kertas diperoleh kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -IgM lebih besar 90% untuk perbandingan molar Ab:Me 1:12000. Hasil pengujian kestabilan dalam serum manusia menunjukkan kemurnian radiokimia masih stabil sampai 2 jam, hasil uji biodistribusi menunjukkan peningkatan akumulasi cacahan pada daerah yang diinfeksi(paha kanan) dibandingkan dg daerah yang tidak diinfeksi (paha kiri).

Kata kunci : Antibodi, imunoglobulin-M,biodistribusi, ^{99m}Tc , infeksi/inflamasi

ABSTRACT

PREPARATION AND BIODISTRIBUTION STUDY OF ^{99m}Tc IMMUNOGLOBULIN M AS INFECTION/INFLAMMATION IMAGING AGENT. The superiority of radiopharmaceutical compare to the other techniques of medical services, especially for diagnosis and therapy of several deadly diseases such as cancer or diagnosis of infection and iflammation . Infection diseases are common in Indonesia , Nuclear medicine techniques which uses polyclonal antibody based radiopharmaceutical labeled with technetium-99m offers an alternative method of diagnosis infection/inflammation. Preparation of ^{99m}Tc – Immunoglobulin M(^{99m}Tc -IgM) and its analysis have been carried out. This preparation needs several steps , first reducing IgM using mercaptoetanol with molar ratio 1:2000-12000, purification using PD-10

column (sephadex G-25,Pharmacia), and the reduced IgM was labeled with ^{99m}Tc and MDP as transchelator. The reduced IgM was analysed using size exclusion_HPLC The radiochemical purity of ^{99m}Tc - IgM was analysed using TLC/paper chromatography. The stability in the human body was carried out by using fresh human serum after 1 and 2 hours incubation, Biodistribution test on infected mice was carried out, the radiochemical purity of ^{99m}Tc - IgM analysed with TLC/paper chromatography was higher than 90 % for molar ratio Ab:Me 1:12000. The stability of labeled IgM in fresh human serum was stable after 1 and 2 hours incubation, biodistribution test showed higher uptake in the site of infection (right thigh) compare to the site of uninfecation (left thigh).

Keywords : Antibody, immunoglobulin-M, biodistribution, ^{99m}Tc , infection/inflammation

PENDAHULUAN

Kasus infeksi dan inflamasi banyak terdapat di Indonesia, berbagai upaya penyembuhan telah dilakukan, antara lain dengan teknik kedokteran nuklir. Inflamasi jaringan dengan atau tanpa infeksi merupakan gangguan yang bersifat heterogen dan dapat melibatkan berbagai organ dalam tubuh dengan manifestasi klinik yang bervariasi. Inflamasi adalah suatu respon yang terjadi pada jaringan yang terluka, sedangkan infeksi adalah inflamasi yang disertai dengan kontaminasi mikro-organisme [1]. Pada umumnya diagnosis infeksi tidak sulit terutama apabila sudah terbentuk abses (pembengkakan), namun demikian pada keadaan tertentu diagnosis menjadi sulit apabila keluhan, gejala klinik dan hasil pemeriksaan fisik ditemukan gambaran yang tidak jelas. Pada keadaan demikian modalitas pencitraan untuk deteksi dan penentuan lokasi inflamasi/infeksi menjadi suatu hal penting dalam klinik, karena dapat memberikan informasi yang penting dalam penanganan penyakit sekaligus dapat memberikan konfirmasi eradikasi infeksi setelah pemberian antibiotik [2].

Pada saat ini beberapa modalitas diagnostik dapat digunakan untuk deteksi dan lokalisasi infeksi. Teknik diagnostik tersebut dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu kelompok yang didasarkan pada

perubahan anatomis dan fisiologis. Kelompok yang didasarkan pada perubahan anatomis misalnya pencitraan menggunakan sinar-x konvensional, USG, CT dan MRI, sedangkan kelompok yang didasarkan pada perubahan fisiologis adalah pencitraan menggunakan teknik kedokteran nuklir. Pada pencitraan menggunakan radionuklida, informasi yang diperoleh berupa perubahan yang terjadi dalam proses patofisiologi dan patobiokimia pada penderita. Kelebihan pencitraan dengan teknik kedokteran nuklir dibandingkan dengan pencitraan anatomis adalah tidak dipengaruhi oleh perubahan anatomi dan secara rutin dapat dilakukan pada seluruh tubuh tanpa memberikan paparan radiasi tambahan [2].

Akhir akhir ini penelitian/pengembangan mengenai radiofarmaka penyidik infeksi dan inflamasi berkembang dengan pesat, misalnya monoklonal antibodi bertanda, fragmen antibodi, peptida kemotaktik dan antibiotik bertanda [3].

Penandaan monoklonal antibodi dengan ^{111}In diperkenalkan oleh Locker dkk. [4] dan Rusckowski dkk. [5], tetapi secara umum prosedur penandaan dengan ^{111}In cukup rumit. Pencitraan dengan ^{111}In lamban sampai 24 jam serta menghasilkan kualitas pencitraan yang kurang optimal [6]. Adanya kelemahan penggunaan ^{111}In telah memacu peneliti untuk menggunakan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ yang merupakan radionuklida ideal untuk pencitraan

menggunakan kamera gamma. Dibandingkan dengan ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ memberikan beberapa keuntungan seperti paparan radiasi yang diterima penderita relatif lebih rendah, kualitas pencitraan lebih baik dengan pencitraan lebih pendek, serta diagnostik dapat ditegakkan lebih cepat dalam beberapa jam dengan akurasi cukup tinggi dibandingkan dengan ^{111}In yang memerlukan waktu 24 jam [7]. Dalam penelitian ini dilaporkan hasil preparasi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgM, uji kemurnian radiokimia, uji kestabilan dalam serum manusia, uji biodistribusi pada mencit yang sudah diinduksi dengan bakteri, yang akan digunakan sebagai preparat penatah infeksi/inflamasi. Penandaan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgM memakai metoda langsung, yaitu IgM direduksi lebih dahulu untuk memutus gugus disulfida menjadi sulfida yang bebas sehingga memungkinkan untuk berikatan dengan $^{99\text{m}}\text{Tc}$, diharapkan penelitian ini dapat menyumbangkan tambahan informasi dalam pengembangan Radiofarmaka penatah infeksi/inflamasi.

BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan ialah $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), MDP (fluka), kolom PD-10 (sephadex G-25 Pharmacia), Merkptoetanol (Sigma), IgM (Sigma-Aldrich), air bebas mineral, air bidestilasi steril (IPHA), larutan HCl 0,01 N, larutan PBS

0,01M pH 7,4, gas nitrogen (lokal), mencit putih, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Batan teknologi), ITLC-SG (Gelman).

Alat yang digunakan ialah peralatan gelas standar, tabung mikro, *syringe* dan pipet eppendorf berbagai ukuran, timbangan analitik, pH meter, HPLC (Shimadzu) dengan kolom SE (BIORAD), Spektrofotometer UV, peralatan kromatografi kertas/lapis tipis, TLC scanner (Veensstra Instrumen).

Reduksi dan pemurnian IgM

Sebanyak 250 μl larutan IgM yang mengandung 24 mg/ml IgM direduksi dengan cara direaksikan dengan merkptoetanol dengan perbandingan molar 1:2000, 1:4000 dan 1:12000, diinkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar, variasi perbandingan molar ini dimaksudkan untuk melihat optimasi kebutuhan reduktor, hasil reduksi dilewatkan pada kolom PD-10 yang telah diaktifkan, kemudian dielusi dengan larutan PBS 0,01M pH 7,4 yang telah dijenuhkan dengan gas nitrogen, eluat ditampung tiap 1 ml yang masing - masing fraksi diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm, fraksi yang mengandung IgM dihitung kadarnya menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi standar IgM.

Penandaan ^{99m}Tc - IgM

Kit MDP (PRR) yang mengandung 10 mg MDP ditambahkan larutan NaCl fisiologis (salin) hingga volume akhir 5 ml kemudian divortex, lalu ditambahkan sebanyak 2-10 μl ke dalam tabung mikro yang mengandung (25-100) μl 3000 ppm larutan IgM yang telah direduksi, selanjutnya ditambahkan sebanyak (2-10) mCi larutan ^{99m}Tc dari generator Mo99/Tc-99m, diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit

Analisa

Fraksi IgM yang telah direduksi diidentifikasi dengan HPLC menggunakan kolom *size exclusion* (SE) dengan eluen larutan PBS pH 7 dan detektor UV pada panjang gelombang 280 nm dngan prinsip pemisahan berdasarkan perbedaan berat molekul. Untuk spesi yang berat molekulnya lebih besar akan terelusi lebih awal, kemudian hasilnya dibandingkan dengan IgM yang belum direduksi, kemurnian radiokimia diuji dengan kromatografi kertas menggunakan eluen aseton untuk menentukan kandungan(%) ^{99m}Tc bebas dan kromatografi lapis tipis dengan eluen etanol-NH₄OH-air (2:1:5) untuk menentukan kandungan % ^{99m}Tc koloid + kompleks , dengan demikian kemurnian radiokimia ^{99m}Tc - IgM dapat dihitung. Untuk mengetahui stabilitas sediaan di dalam tubuh dilakukan uji stabilitas dalam serum manusia

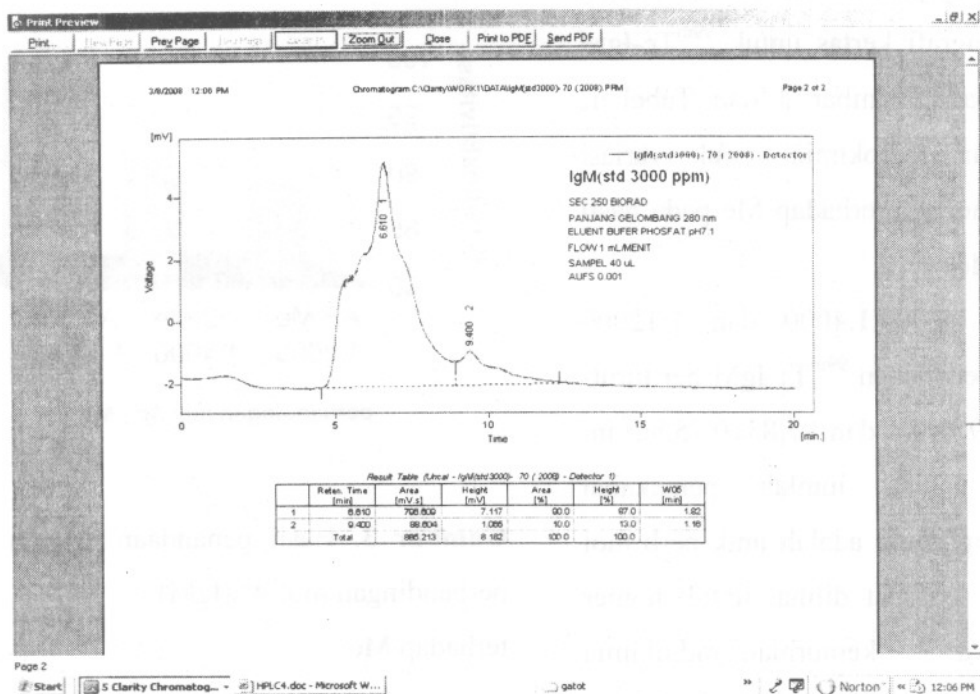
dengan cara mereaksikan sediaan yang telah ditandai ^{99m}Tc dengan serum manusia dan PBS , diinkubasi selama 1 dan 2 jam, hasilnya dianalisis kromatografi kertas / kromatografi lapis tipis

Uji biodistribusi

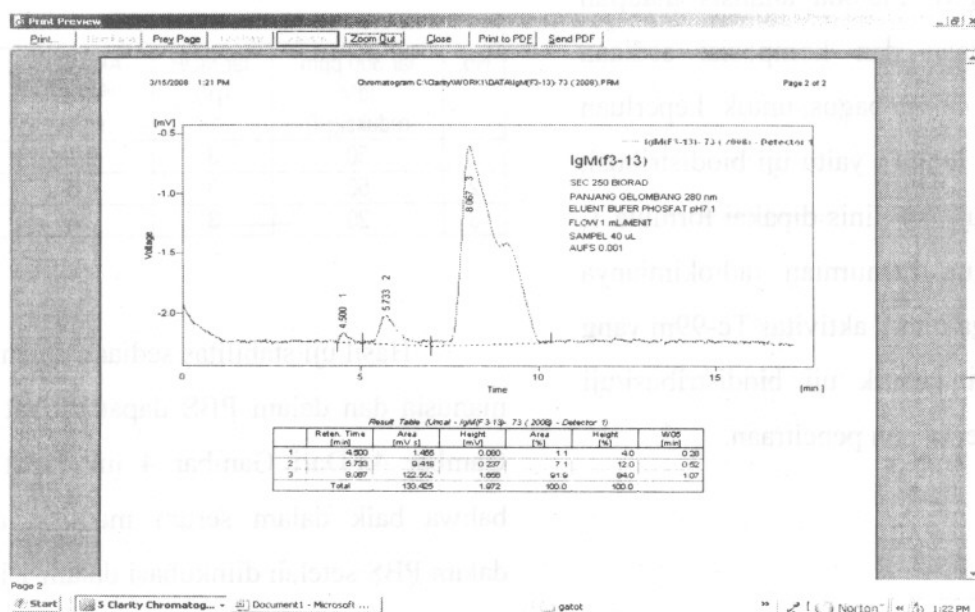
Uji biodistribusi dilakukan dengan cara menyuntikkan 0,2 ml (50-150 μCi) ^{99m}Tc IgM pada mencit yang telah diinduksi dengan bakteri (paha kanan) Setelah 1 jam hewan dibedah dan organ yang dicacah termasuk darah, kandung kemih,ginjal, usus halus, lambung , hati, jantung, paru-paru, paha kiri dan paha kanan dicacah radioaktivitasnya. Perhitungan radioaktivitas pada masing-masing organ dilakukan dengan menghitung prosentase aktivitas organ terhadap standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Hasil pengujian dengan HPLC untuk IgM standar menunjukkan puncak tunggal pada menit ke 6,610 ditunjukkan pada Gambar 1 dan untuk IgM hasil reduksi menunjukkan puncak pada menit ke 8,067 yang ditunjukkan pada Gambar 2, hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi fragmentasi molekul pada IgM hasil reduksi atau ikatan disulfida pada antibodi tersebut telah tereduksi menjadi sulfida bebas ,sehingga mudah berikatan dg ^{99m}Tc .



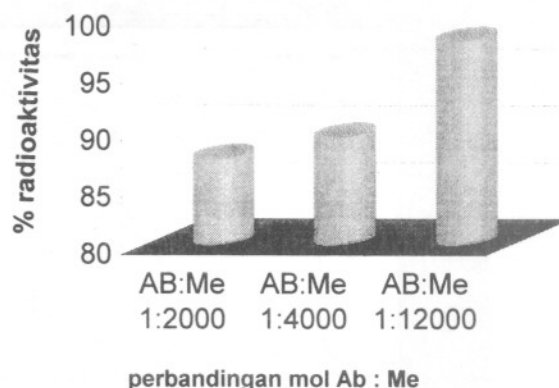
Gambar 1. Kromatogram HPLC IgM standar kolom SE250 BIORAD, eluen buffer fospat pH 7 , detektor UV dengan panjang gelombang 280 nm



Gambar 2. Kromatogram HPLC hIgG hasil reduksi kolom SE250 BIORAD, eluen buffer fospat pH 7, detektor UV dengan panjang gelombang 280nm.

Hasil pengujian kemurnian radiokimia dengan kromatografi kertas untuk ^{99m}Tc -IgM dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 1, hasil kemurnian radiokimia untuk variasi perbandingan mol Ab terhadap Me pada hasil reduksi untuk Mol

Ab:Me 1:2000, 1:4000 dan 1:12000 menghasilkan penandaan ^{99m}Tc -IgM berturut-turut $87,5 \pm 4$, $89,4 \pm 0,4$ dan $97,85 \pm 0,75$, hal ini menunjukkan bahwa jumlah pemakaian reduktor yang optimum adalah untuk perbandingan mol 1:12000, Tabel 1 dapat dilihat untuk nomor percobaan 1 s/d 3 kemurnian radiokimia untuk beberapa komposisi untuk hasil reduksi pada perbandingan mol Ab:Me 1:2000 masih di atas 90% hal ini menunjukkan bahwa baik hasil reduksi IgM, metoda analisis maupun metoda penandaan dan komposisi sediaan yang digunakan cukup bagus, untuk keperluan percobaan lebih lanjut, yaitu uji biodistribusi, pencitraan dan uji preklinis dipakai formula 1, karena disamping kemurnian radiokimianya cukup tinggi juga untuk aktivitas Tc- 99m yang tinggi diperlukan untuk uji biodistribusi/ uji preklinis serta keperluan pencitraan.



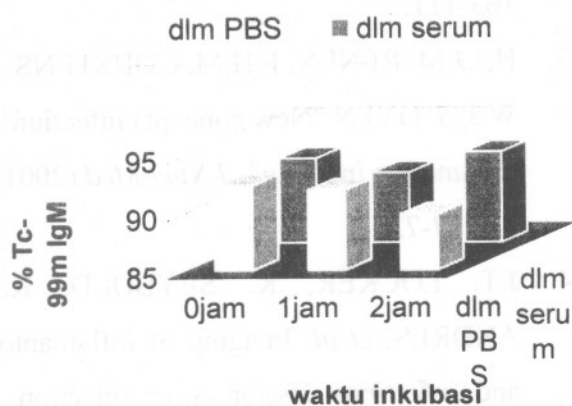
Gambar 3. Hasil penandaan dengan variasi perbandingan mol Ab(IgM) terhadap Me

Tabel 1. Hasil Analisis Kemurnian Radiokimia dengan TLC. Untuk hasil reduksi dengan perbandingan molar Ab : Me 1:12000

No.	lar 300 ppm IgM reduksi(μl)	lar MDP (μl)	Aktivitas ^{99m}Tc (mCi)	% ^{99m}Tc -IgM
1	50	3	9,1	98,6
2	50	3	2,3	97,1
3	20	3	2,3	95,3

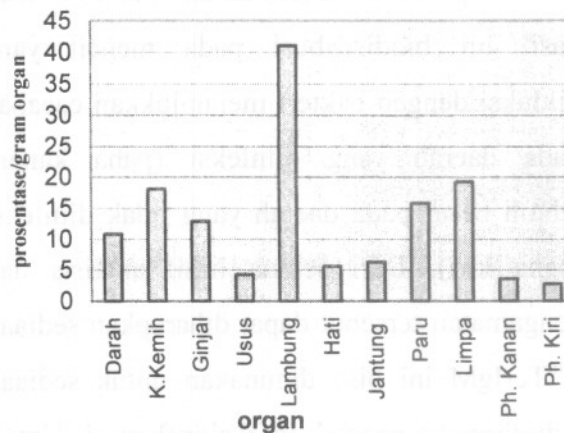
Hasil uji stabilitas sediaan dalam serum manusia dan dalam PBS dapat dilihat pada Gambar 4. Dari Gambar 4 ini dapat dilihat bahwa baik dalam serum manusia ataupun dalam PBS setelah diinkubasi dalam 1 jam dan 2 jam, kemurnian radiokimia sediaan relatif konstan (rerata diatas 90%). Hal ini menunjukkan bahwa sediaan ^{99m}Tc IgM yang dihasilkan cukup stabil dalam tubuh manusia sampai 2 jam, diharapkan sediaan ini bisa

digunakan untuk kepentingan diagnosis infeksi maupun inflamasi.



Gambar 4. Uji stabilitas ^{99m}Tc-IgM dalam serum manusia dan dalam PBS

Hasil uji biodistribusi dapat dilihat pada Gambar 5, hewan percobaan yang dipakai adalah mencit yang diinduksi bakteri (paha kanan), dan organ yang dicacah adalah darah, kandung kemih, ginjal, usus halus, lambung, hati, jantung, paru-paru, limpa, paha kiri, dan paha kanan. Pengambilan organ dan pencacahan dilakukan 1 jam setelah penyuntikan, hasil uji biodistribusi menunjukkan cacahan pada daerah yang diinfeksi (paha kanan) lebih besar dibandingkan dengan paha kiri.



Gambar 5. Uji biodistribusi ^{99m}Tc-IgM pada mencit yang diinduksi bakteri. Hasil biodistribusi Tc-99m-IgM pada 1 jam pengamatan

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil kromatogram HPLC dan ditunjang dengan hasil penandaan IgM dengan ^{99m}Tc dapat diketahui bahwa reduksi IgM dengan menggunakan merkaptoetanol dengan perbandingan mol 1: 2000-12000 dan pemurnian dengan kolom PD-10 menunjukkan telah terjadi reduksi pada antibodi. Keberhasilan penandaan ^{99m}Tc IgM dapat dilihat dari hasil uji kemurnian radiokimia yang mencapai lebih besar dari 90% untuk perbandingan Ab:Me 1: 12000, hal ini menunjukkan bahwa hasil reduksi IgM dapat digunakan untuk penandaan IgM dengan radioisotop ^{99m}Tc. Dari uji stabilitas sediaan

dalam tubuh dapat disimpulkan bahwa sediaan ini cukup stabil dalam tubuh manusia. Dari hasil uji biodistribusi pada mencit yang diiduksi dengan bakteri menunjukkan cacahan pada daerah yang diinfeksi (paha kanan) lebih besar pada daerah yang tidak diinfeksi (paha kiri). Dari semua hasil analisis dan pengamatan tersebut dapat diharapkan sediaan ^{99m}Tc -IgM ini bisa digunakan untuk sediaan radiofarmaka penatah infeksi/inflamasi. Untuk itu perlu diteruskan dengan uji preklinis lebih lanjut serta diharapkan penelitian ini juga dapat menyumbangkan tambahan informasi dalam pengembangan Radiofarmaka penatah infeksi/inflamasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada PT Batan Teknologi atas bantuannya dalam menyediakan larutan perteknetat ^{99m}Tc . Juga kepada Kementerian Riset dan Teknologi atas bantuannya melalui program Insentif. Demikian pula kepada rekan-rekan di PRR yang tidak dapat disebutkan satu persatu, baik secara langsung maupun tidak langsung terlibat dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. I.M. ROITT, "Essential immunology" 6th ed. Oxford: Blackwell Scientific (1989).
2. A. HUSSEN, S. KARTAMIHARJA. Peranan Teknik Kedokteran Nuklir dalam Penentuan fokus Infeksi, Kumpulan Makalah Pertemuan Ilmiah Dwi tahunan PKBNI-PKNI-BATAN, Jakarta, (2002), 103-111.
3. H.J.J.M. RENEN, F.H.M. CORSTENS, W.J.G. OYEN, "New concepts infection/ inflammation imaging", *J Nucl Med* (2001), 45:167-73.
4. J.T. LOCKER, K. SEYBOLD, R.Y. ANDRES, *et al.* Imaging of inflamantory and infectious lesion after injection of radioiodinated monoclonal antigranulocyte antibodies. *Nucl Med Commun.* (1986), 7: 659-670.
5. M. RUSCKOWSKI, B. FITZ, D.J. HNATOWICH, Lokalization of infection using strepavidin and biotin; an alternatiive to nonspesific polyclonal immunoglobulin. *J Nucl Med.* (1992), 33:1810-1815.
6. C.J. PALESTRO, F.L. WEILAND, J.E. SEABOLD, Localizing infection with a technetium - 99m-labeled peptide: initial results. *Nuc Med Commun*, **22** (6), (2001), 695-701.
7. FOGELMAN, I., "Bone scanning in clinical Nuclear Medicine", 3^d ed, Maisey, Britton and Coiler Eds, Chapman & Hall Medical, London, (1991), 147-150.