

**PREPARASI DAN UJI BIODISTRIBUSI
RENIUM-186-ETILEN DISISTEIN ($^{186}\text{Re-EC}$) SEBAGAI PREPARAT
ENDOVASCULAR BRACHYTHERAPY**

Widyastuti, Cecep Taufik, Evi Sovilawati

ABSTRAK

PREPARASI DAN UJI BIODISTRIBUSI RENIUM - 186 - ETILEN DISISTEIN ($^{186}\text{Re-EC}$) SEBAGAI PREPARAT ENDOVASCULAR BRACHYTHERAPY. Kasus restenosis atau penyempitan kembali pembuluh arteri jantung paska proses *angioplasty* banyak terjadi dan dapat mengakibatkan masalah yang serius. Salah satu cara penanggulangannya ialah dengan metoda *endovascular brachytherapy* yaitu pembalanan bagian sempit arteri jantung dikombinasi dengan radiasi interna menggunakan senyawa $^{186}\text{Re-EC}$ dimana radiasi β yang dipancarkan akan menghancurkan sel sel hiperplasia yang terbentuk didalam pembuluh arteri yang mengakibatkan penyumbatan pembuluh tersebut. Telah dilakukan serangkaian percobaan untuk mencari kondisi optimum penandaan $^{186}\text{Re-EC}$, antara lain dengan memvariasikan waktu inkubasi untuk penyempurnaan reaksi kompleksasi $^{186}\text{Re-EC}$, penambahan asam askorbat sebagai anti oksidan, dan pengaturan pH menjadi pH netral setelah pembentukan $^{186}\text{Re-EC}$ untuk menyesuaikan dengan pH tubuh sehingga dapat diperoleh senyawa kompleks yang stabil dengan kemurnian radiokimia yang tinggi. Uji biodistribusi pada hewan percobaan telah pula dilakukan untuk melihat sifat farmakokinetika sediaan bertanda ini. Hasil percobaan menunjukkan bahwa waktu inkubasi 15 menit pada suhu ruangan sudah cukup untuk memperoleh kompleks $^{186}\text{Re-EC}$ dengan kemurnian radiokimia yang tinggi (diatas 85%), demikian juga penambahan asam askorbat dalam jumlah setara dengan reduktor yang digunakan dapat meningkatkan kestabilan kompleks $^{186}\text{Re-EC}$. Perubahan pH dari pH reaksi kompleksasi (pH 2) hingga pH netral tidak mempengaruhi kestabilan kompleks $^{186}\text{Re-EC}$, sehingga untuk keamanan pasien pada saat pemakaian sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ dapat diatur pada pH 6 – 7. Pengujian pada mencit sehat menunjukkan akumulasi radioaktif yang tinggi pada ginjal dan kandung kemih, hal ini menunjukkan sifat farmakokinetik sesuai dengan yang diharapkan. Hasil formula terbaik $^{186}\text{Re-EC}$ adalah terdiri dari 4 mg etilen disistein (EC) dalam dapar natrium bikarbonat 0.5 M, 2 mg timah klorida dihidrat, 2 mg asam askorbat dan 100 μg perenat, dan stabil selama lebih dari satu minggu pada pH 6-7.

Kata kunci : Radiofarmaka, etilen disistein, Rений-186 (^{186}Re), *endovascular brachytherapy*, penandaan, $^{186}\text{Re-EC}$.

ABSTRACT.

PREPARATION AND BIODISTRIBUTION OF RHENIUM-186-ETHYLENE DICYSSTEINE ($^{186}\text{Re-EC}$) FOR ENDOVASCULAR BRACHYTHERAPY. Restenosis or renarrowing of coronary artery following angioplasty procedure is commonly occurred and causes serious problem. Endovascular brachytherapy, – a ballooning procedure into the narrowing coronary artery combined with internal radiation - using $^{186}\text{Re-EC}$ is an alternative method to solve this problem from which β radiation

will destroy hyperplasia cells built up in the vessel walls that cause blockage. Experiments to obtain optimal condition of labeling $^{186}\text{Re-EC}$, such as variation of incubation time, addition of ascorbic acid as an antioxidant and pH adjustment to neutral of the final solution have been carried out in order to get a radiolabeled compound with high radiochemical purity and stability. Biodistribution in experimental animal has also been carried out to see its pharmacokinetic behaviour. The results showed that incubation time of 15 minutes at room temperature is sufficient to form $^{186}\text{Re-EC}$ complex with high radiochemical purity (more than 85%). The addition of an equivalent amount of ascorbic acid to the reducing agent used can increase the stability of the $^{186}\text{Re-EC}$ complex. The pH adjustment from acidic to neutral did not affect the stability, therefore to avoid irritation at the time of administration, the pH of the solution could be adjusted to 6-7. Administration to normal mice showed high accumulation in kidney and bladder, revealed good pharmacokinetic behaviour of this labeled compound. The results showed that $^{186}\text{Re-EC}$ preparation can be formulated using 4 mg of ethylene dicysteine (EC) dissolved in sodium bicarbonate buffer 0.5 M, 2 mg of stannous chloride dihydrate, 2 mg of ascorbic acid and 100 μg of perchlorate, stable more than a week at pH 6-7.

Keywords : Radiopharmaceuticals, ethylene dicysteine, Rhenium-186 (^{186}Re), endovascular brachytherapy, labeling, $^{186}\text{Re-EC}$.

PENDAHULUAN

Kasus restenosis banyak terjadi pada penderita penyempitan pembuluh arteri jantung yang telah menjalani operasi *balloon angioplasty*. Restenosis adalah peristiwa menyempitnya kembali atau penyumbatan pembuluh arteri disebabkan oleh efek sampingan dari angioplasty (balonisasi). Mekanisme terjadinya restenosis melalui 3 tahap, yaitu *elastic recoil*, *chronic remodeling* dan *pembentukan neointimal hyperplasia*. Elastic recoil ialah kembalinya dinding pembuluh arteri ke posisi semula (seperti sistem pegas), chronic remodeling ialah kontraksi dinding pembuluh arteri secara perlahan-lahan menyebabkan lumen (rongga pembuluh darah) mengecil, sedangkan pembentukan neointimal hyperplasia ialah pembentukan jaringan otot polos secara berlebihan, dimana jaringan tersebut terdiri dari sel-sel otot polos dan matriks disekitarnya yang membelah diri di dalam dinding pembuluh dan terbawa ke dalam lumen arteri [1].

Salah satu metoda pencegahan restenosis yang cukup prospektif ialah *endovascular brachytherapy* menggunakan sediaan radiofarmaka pemancar β^- , dimana sediaan radiofarmaka tersebut berbentuk larutan dan dimasukkan ke dalam balon bertekanan rendah.[2,3,4]. Resiko penggunaan metoda *endovascular brachytherapy* yang menggunakan larutan senyawa radioaktif adalah terjadinya kebocoran/pecahnya balon yang mengakibatkan masuknya radioisotop ke dalam sirkulasi darah [4]. Oleh karena itu diperlukan suatu senyawa berbentuk radiofarmaka yang mudah diekskresikan melalui urin, akumulasi pada organ lain yang bukan organ sasaran sekecil mungkin, dan mempunyai kestabilan kimia yang tinggi [5].

Radionuklida yang dapat digunakan untuk keperluan ini antara lain ialah Iridium-192, Strontium/Yttrium-90, Phosphor-32, Rений-186 dan Rений-188 [1]. Beberapa jenis radiofarmaka diketahui dapat digunakan untuk *endovascular brachytherapy*, yaitu preparat penyidik fungsi ginjal seperti $\text{Na}^{186}\text{ReO}_4$, $^{186}\text{Re-MAG}_3$, dan $^{186}\text{Re-DTPA}$. Ketiga senyawa bertanda tersebut mempunyai kelemahan, antara lain $\text{Na}^{186}\text{ReO}_4$ dan $^{186}\text{Re-DTPA}$ memberikan paparan pada lambung dan tiroid, sedangkan $^{186}\text{Re-MAG}_3$ kurang stabil pada penyimpanan setelah 6 jam baik pada suhu kamar maupun suhu 4°C [6,7]. Sediaan $^{186}\text{Re-Etilen Disistein}$ ($^{186}\text{Re-EC}$) memberikan prospek yang lebih baik mengingat $^{99\text{m}}\text{Tc-EC}$ telah dikenal sebagai preparat penyidik fungsi ginjal yang sama baiknya dengan $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ tetapi lebih stabil pada penyimpanan [5].

Preparasi senyawa kompleks rений memerlukan kondisi yang lebih khusus dibandingkan senyawa kompleks teknesium karena kecenderungan kompleks Re yang mudah teroksidasi kembali menjadi ion perrenat. Untuk meningkatkan kestabilan senyawa kompleks Re perlu ditambahkan anti oksidan seperti asam askorbat. Kompleksasi $^{186}\text{Re-EC}$ yang optimal terjadi pada pH 2-3, dan memerlukan pemanasan pada suhu air mendidih selama 30 menit [7]. Untuk menyempurnakan reaksi kompleksasi perlu dilakukan percobaan pelabelan dengan waktu inkubasi (setelah selesai pemanasan) yang divariasikan. Disamping itu, pH sediaan parenteral diharapkan mendekati pH netral agar tidak menyakitkan pada waktu penyuntikan, maka perlu diamati kestabilan sediaan ini pada pH netral (pH 6-7). Sediaan $^{186}\text{Re-HEDP}$ dilaporkan bahwa stabilitasnya meningkat setelah ditambahkan asam askorbat dengan kadar yang sebanding dengan kadar $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [9].

Penelitian ini akan menetapkan kondisi optimum penandaan $^{186}\text{Re-EC}$ untuk memperoleh senyawa bertanda $^{186}\text{Re-EC}$ yang mempunyai kemurnian radiokimia dan stabilitas yang tinggi. Untuk meningkatkan stabilitas senyawa kompleks $^{186}\text{Re-EC}$ akan ditambahkan asam askorbat dengan kadar yang sama dengan kadar $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ yang digunakan.

BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan dan Peralatan

Etilen Disistein (EC) diperoleh dari bantuan IAEA, larutan perrenat $^{186}\text{ReO}_4$ disiapkan di P2RR-BATAN, asam askorbat (Merck), bahan kimia standar (Merck), air steril untuk injeksi dan larutan NaCl 0.9 % (IPHA) diperoleh dari pasar lokal. TLC silica gel G, eluen aseton dan salin digunakan buatan Merck, TLC scanner (Veenstra

Instrument), indikator pH universal pH 1-14. Untuk mengukur radioaktivitas pada organ mencit digunakan alat pengukur radioaktivitas (Capintec).

Tata Kerja

Uji kemurnian EC.

Untuk meyakinkan bahwa etilen disistein masih dalam keadaan murni (masih mengandung gugus fungsi esensial yaitu COOH), maka terlebih dahulu dilakukan pengukuran dengan FT-IR untuk memeriksa serapan IR, dan pengukuran titik leleh, serta hasilnya dibandingkan dengan data menurut literatur.

Pelabelan $^{186}\text{Re-EC}$. [5]

Etilen Disistein (4 mg, $1,5 \times 10^{-2}$ mol) dilarutkan dalam 0,4 mL dapar bikarbonat (0,5 M, pH 9,0), kemudian diencerkan dengan 0,4 mL larutan NaCl 0,9 % (salin). Ke dalam larutan EC ditambahkan 20 μL (2 mg) larutan $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ dalam HCl pekat. Kemudian ditambahkan larutan perrenat $^{186}\text{ReO}_4$ (yang mengandung $\pm 100 \mu\text{g Re}$), dan pH diatur pada 2. Larutan reaksi dialiri gas N_2 selama 5 menit dan dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit.

Variasi waktu inkubasi.

Setelah pemanasan larutan reaksi selama 30 menit, larutan didiamkan selama variasi waktu tertentu yaitu 15, 30, 45, 60 menit, kemudian dianalisis kemurnian radiokimianya dengan TLC. Waktu inkubasi yang memberikan % kemurnian radiokimia tertinggi akan digunakan sebagai acuan untuk percobaan selanjutnya.

Penambahan asam askorbat sebagai anti oksidan

Ke dalam larutan reaksi yang telah dipanaskan ditambahkan 2 mg asam askorbat, dan diinkubasi selama waktu tertentu (waktu optimal yang diperoleh dari hasil tahap sebelumnya, kemudian dianalisa kemurnian radiokimianya dengan TLC. Senyawa bertanda tersebut disimpan dalam lemari pendingin dan dianalisa kemurnian

radiokimianya dengan cara yang sama tiap hari selama seminggu untuk mengamati stabilitasnya. Pengamatan dilakukan juga pada set percobaan lain tanpa penambahan asam askorbat sebagai pembanding.

Pengaturan pH akhir larutan pada pH netral

Larutan reaksi diatur pH nya dari 2 menjadi 6-7, baik untuk larutan yang ditambahkan maupun yang tidak ditambahkan asam askorbat, kemudian dianalisa dengan TLC. Senyawa bertanda tersebut disimpan dalam lemari pendingin dan dianalisa dengan TLC setiap hari selama seminggu untuk mengamati stabilitasnya. Pengamatan dilakukan juga pada set percobaan lain dengan pH tetap (pH 2) sebagai pembanding.

Analisis kemurnian radiokimia dengan TLC

Larutan percobaan (5 µL) ditotolkan pada dua strip TLC silica gel G berukuran 15 x 1 cm yang sebelumnya telah diaktifkan pada suhu 100°C selama 10 menit, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam bejana kromatografi dan dielusi masing-masing dengan aseton dan larutan NaCl 0,9% (salin) hingga ketinggian ± 10 cm. Kromatogram kemudian dikeringkan dan dianalisis dengan TLC scanner. TLC dalam aseton digunakan untuk mengetahui % $^{186}\text{ReO}_4^-$, yang akan merambat naik bersama permukaan pelarut, sedangkan $^{186}\text{Re-EC}$ dan koloid $^{186}\text{ReO}_2$ tetap berada di titik penotolan. TLC dalam salin digunakan untuk mengetahui % koloid $^{186}\text{ReO}_2$ yang akan tertinggal di titik penotolan, sementara $^{186}\text{Re-EC}$ dan $^{186}\text{ReO}_4^-$ akan terelusi bersama permukaan pelarut. Dengan diketahuinya % $^{186}\text{ReO}_4^-$ dan % koloid $^{186}\text{ReO}_2$ sebagai pengotor, maka % kemurnian radiokimia $^{186}\text{Re-EC}$ dapat dihitung.

Uji biodistribusi

Masing-masing 100 µL larutan $^{186}\text{Re-EC}$ (± 100 µCi) disuntikkan pada 6 ekor mencit sehat melalui vena ekor, kemudian masing-masing 2 ekor mencit tersebut dibunuh pada 1, 3, dan 24 jam paska penyuntikan, dan dilakukan pengukuran radioaktifitas pada kandung kemih dan urin, ginjal, usus halus, darah, lambung, hati, jantung, limpa, paru-paru, tulang dan otot.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji kemurnian etilen disistein yang dilakukan dengan mengukur serapan sinar infra merah dan titik leleh memberikan serapan pada 1591 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus karboksilat, dan titik leleh pada $253^{\circ}\text{C} - 257^{\circ}\text{C}$ yang tidak jauh berbeda dengan literatur (di literatur dinyatakan $251^{\circ}\text{C} - 253^{\circ}\text{C}$) [8].

Pengaruh waktu inkubasi terhadap % kemurnian radiokimia diamati dari variasi waktu inkubasi (interval waktu setelah pemanasan hingga analisa dengan TLC), menunjukkan bahwa waktu inkubasi 15 menit hingga 60 menit tidak memberikan perbedaan yang berarti pada % kemurnian radiokimia. Dengan demikian waktu inkubasi 15 menit digunakan sebagai acuan prosedur untuk percobaan selanjutnya (Tabel 1).

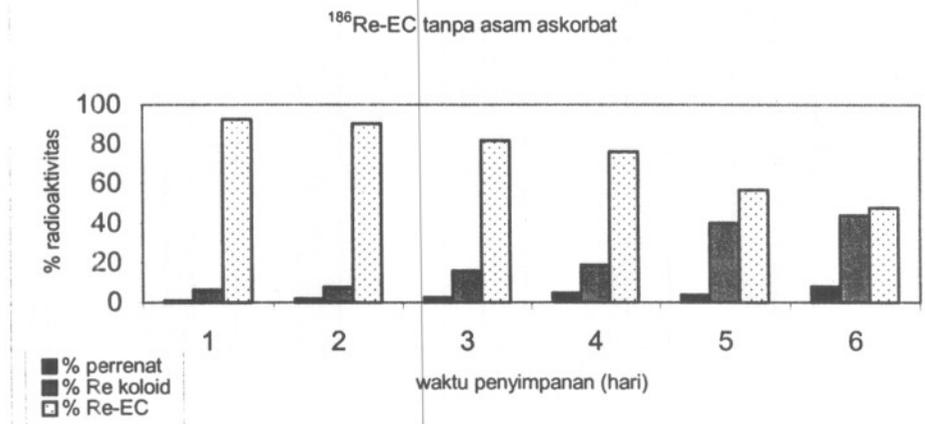
Tabel 1. Pengaruh waktu inkubasi terhadap tingkat kemurnian radiokimia $^{186}\text{Re-EC}$

Waktu penyimpanan	% Radiokimia		
	% $^{186}\text{ReO}_4$ (TLC aseton)	% $^{186}\text{ReO}_2$ (TLC salin)	$^{186}\text{Re-EC}$ (perhitungan)
15 menit	9,7	5,1	85,2
30 menit	10,3	9,1	80,6
45 menit	10,7	5,5	83,8
60 menit	9,5	7,2	83,3

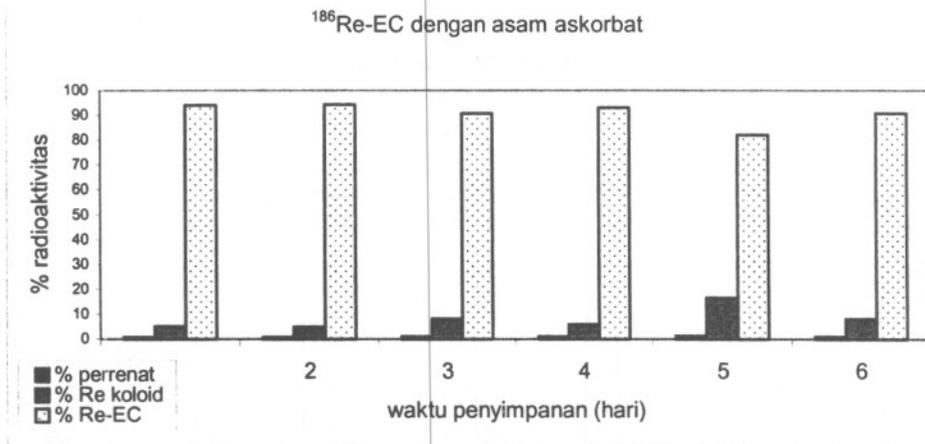
Pengaruh penambahan asam askorbat terhadap stabilitas sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ terlihat dengan jelas setelah hari ke-2, dimana tingkat kemurnian radiokimia sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ tanpa penambahan asam askorbat menurun dari 92,6% menjadi 81,7%, sedangkan tingkat kemurnian radiokimia sediaan yang mengandung asam askorbat tidak berubah hingga hari ke-7 yaitu tetap > 90% (Gambar 1, 2 dan 3). Hal ini menunjukkan bahwa asam askorbat berfungsi sebagai anti oksidan yang mencegah teroksidasinya kembali kompleks Re menjadi perrenat.

Pengaturan pH akhir larutan $^{186}\text{Re-EC}$ sampai 6-7 (pH netral) dapat ditunjukkan berpengaruh pada peningkatan stabilitas, yaitu setelah penyimpanan > 1 hari sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ pH netral menunjukkan kemurnian radiokimia lebih tinggi dibandingkan sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ pH 2 (pH reaksi), baik untuk sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ yang ditambahkan asam askorbat maupun yang tidak. Hal ini menunjukkan bahwa sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ relatif lebih stabil disimpan pada pH netral dibandingkan pada pH asam (Gambar 4, 5 dan 6).

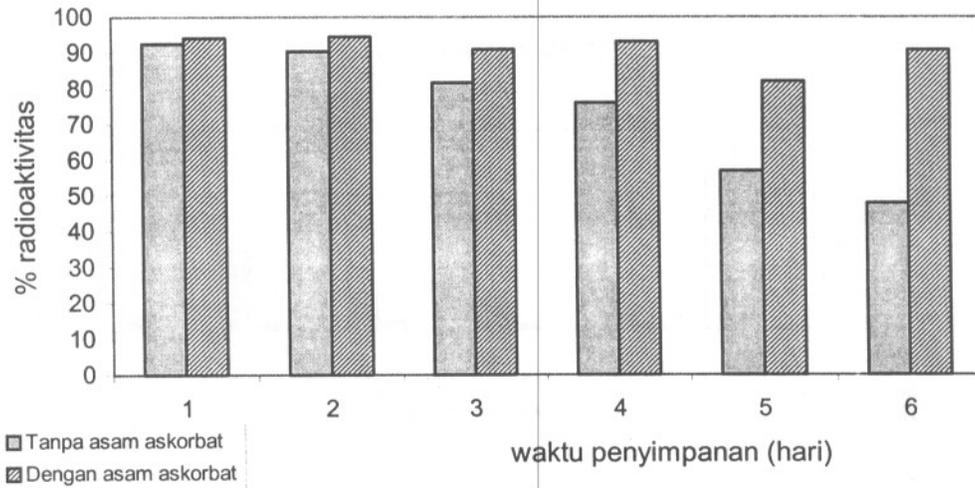
Disamping itu pH netral juga menguntungkan bagi pasien karena dapat dihindarkan rasa sakit pada saat penyuntikan.



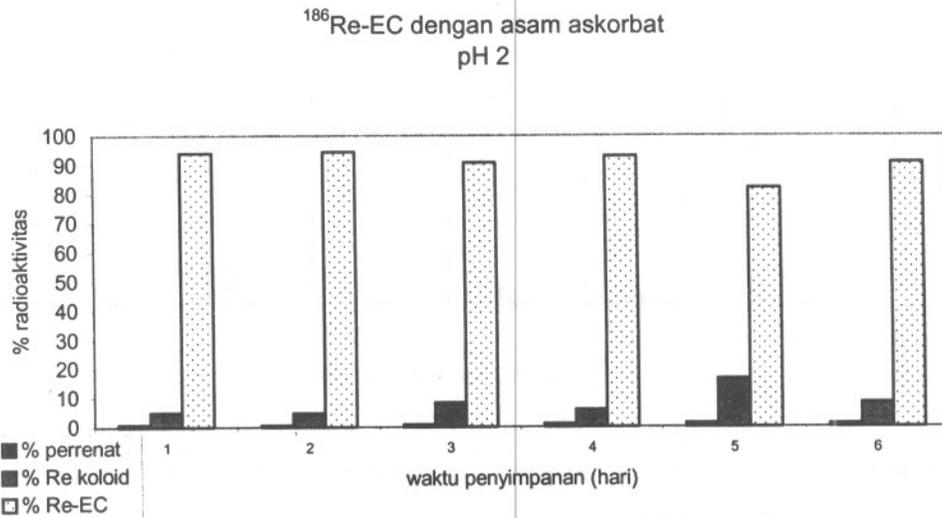
Gambar 1. Stabilitas $^{186}\text{Re-EC}$ formula standar pada penyimpanan



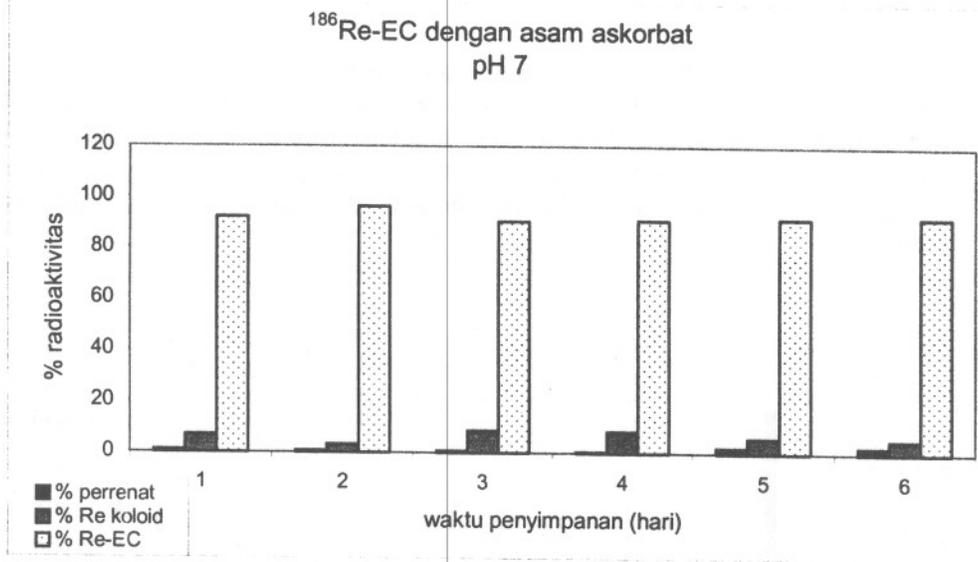
Gambar 2. Stabilitas $^{186}\text{Re-EC}$ dengan penambahan asam askorbat pada penyimpanan



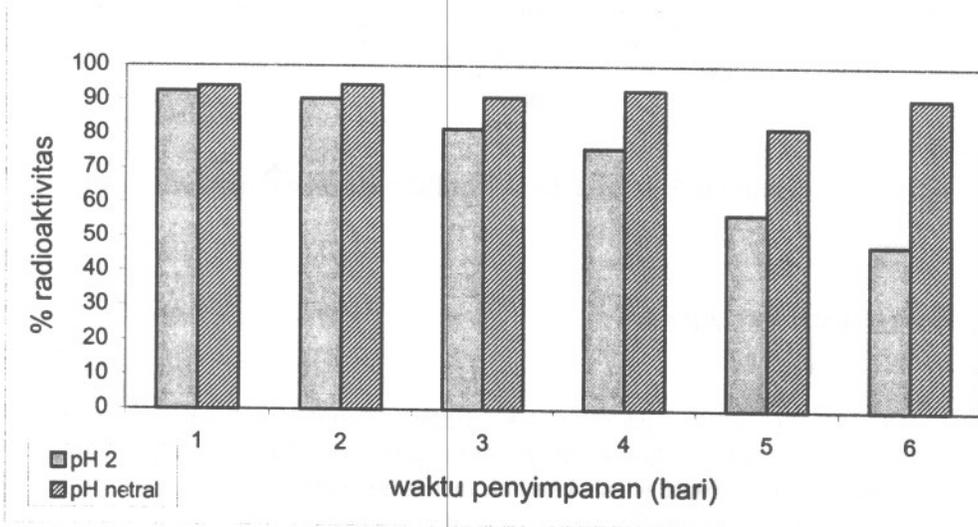
Gambar 3. Pengaruh penambahan asam askorbat terhadap stabilitas ¹⁸⁶Re-EC



Gambar 4. Stabilitas ¹⁸⁶Re-EC dengan penambahan asam askorbat pada pH 2

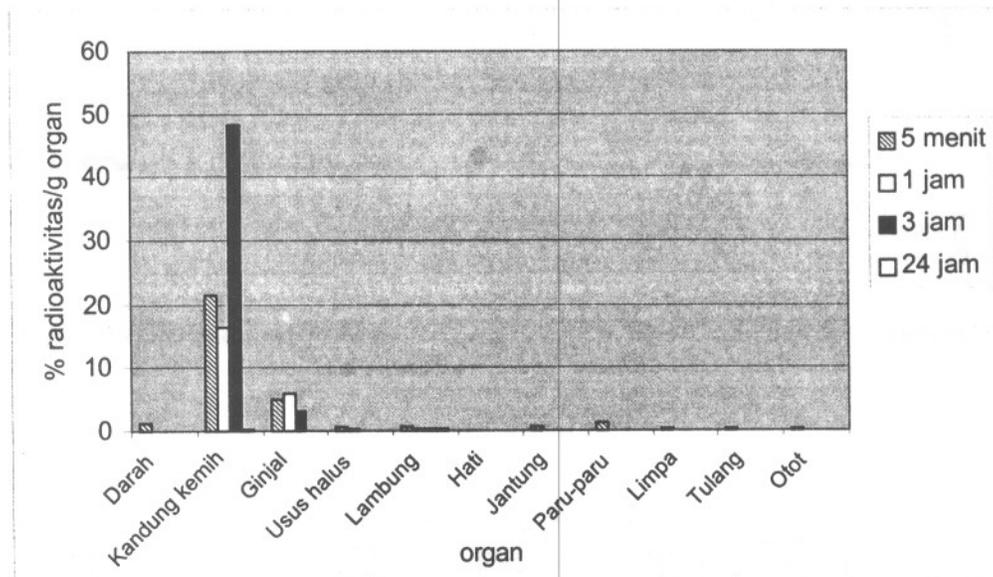


Gambar 5. Stabilitas $^{186}\text{Re-EC}$ dengan penambahan asam askorbat pada pH netral



Gambar 6. Pengaruh pH terhadap stabilitas $^{186}\text{Re-EC}$

Uji biodistribusi pada mencit yang diamati setelah 5 menit, 1 jam, 3 jam dan 24 jam paska penyuntikan $^{186}\text{Re-EC}$ menunjukkan akumulasi yang tinggi pada kandung kemih dan ginjal, hal ini sesuai dengan yang diharapkan untuk sediaan radiofarmaka, karena akumulasi pada organ-organ lain yang tidak diharapkan sangat kecil sehingga tidak mengganggu pencitraan dan tidak memberikan paparan pada organ-organ yang sehat (Gambar 7).



Gambar 7. Akumulasi $^{186}\text{Re-EC}$ pada organ mencit

KESIMPULAN DAN SARAN

Penambahan asam askorbat ke dalam formula sediaan $^{186}\text{Re-EC}$ dapat mempertahankan kestabilan kompleks Rений karena berfungsi sebagai anti oksidan yang dapat mencegah teroksidasinya kembali menjadi perrenat.

Telah dapat disusun formula pembuatan senyawa bertanda $^{186}\text{Re-EC}$ dengan kemurnian radiokimia dan stabilitas yang tinggi, sehingga dapat dilanjutkan ke tahap penelitian perhitungan dosimetri untuk *endovascular brachytherapy*.

PH reaksi kompleksasi $^{186}\text{Re-EC}$ telah diketahui pada pH 2, tetapi pengaturan pH menjadi 6-7 setelah terbentuknya kompleks $^{186}\text{Re-EC}$ terbukti dapat mempertahankan kestabilan kompleks.

Uji biodistribusi pada mencit sehat menunjukkan akumulasi yang tinggi hanya pada kandung kemih dan ginjal, hal ini menunjukkan sifat farmakokinetika yang diharapkan dari suatu sediaan radiofarmaka untuk diagnosis maupun terapi, meskipun idealnya akumulasi sediaan radiofarmaka yang paling tinggi hanya pada organ sasaran, tetapi keadaan tersebut sangat sulit dicapai.

Disarankan untuk mempelajari kemungkinan preparasi kit kering EC yang belum dilabel dengan ^{186}Re , sehingga masa daluarganya lebih lama.

DAFTAR PUSTAKA

1. MASJHUR, J. "Intravascular Radionuclide Therapy to Prevent Restenosis Following Transluminal Coronary Angioplasty". Kongres Nasional PKNI IV – PKBNI VI. Surabaya, Indonesia, 6-7 Nopember (2000).
2. KNAPP F. F. Jr., CALLAHAN A. P., BEETS A. L., et al, "Intraarterial Irradiation with Rhenium-188 for Inhibition of Restenosis by PTCA – Strategy and Evaluation of Species for Rapid Urinary Excretion" (abstract), *J. Nucl. Med.* 38 (1997), 124P
3. Oh S. J., MOON D. H., PARK S. W., et al, "Comparison of Radiation Absorbed Dose of Re-188 Radiopharmaceuticals for Intracoronary Radiation Therapy in case of Balloon Rupture" (abstract), *J. Nucl. Med.* 40 (1999), 41P.
4. WEINBERGER J. AND KNAAP F. F., "Use of Liquid-filled Balloons for Coronary Irradiation." In: *Vascular Brachytherapy*, 2nd ed. (Edited by Waksman R.), Futura Publishing Co., Inc., Armonk, NY. (1999), pp. 521-535.
5. DAS, T., BANERJEE, S., SAMUEL, G., et al, "[$^{186/188}\text{Re}$] Rhenium-Ethylene Dicysteine (Re-EC): Preparation and Evaluation for Possible Use in Endovascular Brachytherapy", *Nucl. Med. & Biol.*, Vol. 27 (2000), pp. 189-197.
6. LEE J., CHOI Y. J., LEE D. S., et al, "Rhenium-188-DTPA Liquid-filled Balloon to inhibit Restenosis after Angioplasty: Development of Software of Dose Calculation and Application" (abstract), *J. Nucl. Med.* 40 (1999), 181P.
7. WANG T. S., WEINBERGER J., FAWWAZ R. A. et al, "in-vitro Stability Evaluation of Re-188-MAG3: A Potential Therapeutic Agent for Prevention of Restenosis after CTPA" (abstract), *J. Nucl. Med.*, 40 (1999), 152P.
8. ADANG H.G., MUTALIB A., BAGIAWATI S. et al, "Preparasi dan Uji Stabilitas Radiofarmaka $^{186}\text{Re-HEDP}$ ", *Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir, P3TkN-BATAN*, Bandung, Juni 2001, pp. 136-142.

9. IAEA-TECDOC-805, Production of ^{99m}Tc radiopharmaceuticals for brain, heart and kidney imaging : Synthesis of L,L-EC and L,L-ECD and their characterization, Juli 1995, pp. 53-56