
EVALUASI BIOLOGIS RADIOFARMAKA ^{186}Re EDTMP SEBAGAI ALTERNATIF *BONE PAIN PALLIATIVE AGENT*

A. H. Gunawan, A. Mutalib, S. Bagiawati, E. Sovilawati., S. Aguswarini, Abidin

ABSTRAK

Evaluasi Biologis Radiofarmaka ^{186}Re -EDTMP (Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis(methylene phosphonic acid)) sebagai Alternatif *Bone Pain Palliative Agent*. Beberapa penyakit kanker seperti prostat, payudara, paru-paru dan ginjal dapat mengalami metastase ke tulang. Samarium-153 EDTMP merupakan radiofarmaka yang sampai saat ini secara luas digunakan untuk mengurangi rasa sakit akibat metastase kanker ke tulang. Penandaan EDTMP dengan radionuklida ^{186}Re telah berhasil dibuat dengan kemurnian radiokimia yang tinggi dan stabil sampai hari ke 8 setelah pembuatan. Pada kompleks ^{186}Re -EDTMP yang telah dibuat, dilakukan pengujian biologis seperti biodistribusi, uji pencucian dari darah, uji pencucian dari ginjal, uji lipofilisitas, uji pengikatan pada hidroksiapatit, pencitraan dengan kamera gamma, uji sterilitas dan uji pirogenitas. Hasil uji biodistribusi dan pencitraan dengan kamera gamma menunjukkan bahwa penimbunan pada tulang yang tinggi terjadi pada 24 jam setelah penyuntikan dan diperoleh gambaran kamera gamma yang lebih baik dari pada 2 jam setelah penyuntikan. Kadar kompleks dalam darah mencapai puncaknya setelah 5 menit setelah penyuntikan dan menurun drastis pada 1 jam setelah penyuntikan. Sedangkan dalam urin 24 jam setelah penyuntikan diperoleh aktivitas sekitar 38% yang diekresikan dalam bentuk perenat bebas. Hasil uji pengikatan kompleks dengan hidroksiapatit menunjukkan kompleks terikat kuat pada hidroksiapatit (68%) sampai dengan hari ke 2 setelah pencampuran. Hasil pengujian sterilitas dan pirogenitas menunjukkan sediaan tersebut steril dan bebas pirogen.

Kata Kunci : ^{186}Re -EDTMP , tulang, kemurnian radiokimia, biodistribusi.

ABSTRACT

Biological Evaluation of ^{186}Re -EDTMP (Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis(methylene phosphonic acid)) as an Alternative *Bone Pain Palliative Agent*. Bone pain is a common complication for patient with bone metastases from prostate, breasts, lung and renal cancers. Samarium-153 EDTMP is one of the most widely used radiopharmaceutical for the treatment of metastatic bone pain. Preparation of ^{186}Re -EDTMP have been carried out with high radiochemical purity and this complex was stable up to 8 days. Biodistribution pattern of the injected complex in mice indicates that the accumulated optimum activity in the bone was obtained 24 hours post injection. Rhenium-186-EDTMP complex contents in the blood reach optimum activity after 5 minutes and decrease drastically at 1 hours post injection. The complex showed major renal clearance up to 38% as perrhenate ion within 24 hours after injection. Rhenium-186

EDTMP revealed strong binding to hidroxyapatite ($\pm 68\%$) and stable up to 2 days. Sterility and pyrogenicity test indicated that the complex were sterile and pyrogen free.

Keywords : ^{186}Re -EDTMP, bone, radiochemical purity, biodistribution.

PENDAHULUAN

Pengobatan secara sistemik terhadap pasien penderita penyakit kanker yang mengalami metastase ke tulang digunakan khemoterapi, senyawa immunologi dan radiasi eksternal. Rasa sakit yang disebabkan kanker yang mengalami metastase ke tulang diobati dengan menggunakan analgetika dan bahkan menggunakan narkotika seperti kodein dan morfin [1,2].

Secara ideal radiofarmaka untuk terapi harus cepat diambil sel tumor, mempunyai perbandingan *tumor-non tumor* yang tinggi, tertimbun cukup lama pada sel tumor dan cepat diekskresikan dari tubuh. *Uptake* yang tinggi pada tumor dan pencucian dari ginjal yang cepat sangat penting untuk perbandingan *tumor-background* yang tinggi dan untuk mengurangi beban radiasi pada organ lainnya seperti ginjal, hati dan sumsum tulang [1,3].

Pemakaian senyawa bertanda dengan radionuklida pemancar sinar beta untuk pengobatan penyakit kanker tulang dan sebagai palliatif dari rasa sakit pada tulang telah dikembangkan dan merupakan alternatif yang penting dalam pengobatan penyakit kanker. Keuntungan penggunaan radionuklida bertanda penyidik tulang adalah spesifik terhadap tumor sehingga dapat meminimalkan dosis radiasi pada sel-sel sehat sekitarnya dibanding pengobatan dengan radiasi eksternal. Radionuklida pemancar sinar beta ^{186}Re diharapkan dapat berperan tidak hanya sebagai *diagnostic agent* tetapi sinar betanya dapat digunakan untuk terapi. Dalam sistem berkala, renium berada dalam satu kelompok yang sama dengan teknesium (grup VII A), karenanya kedua unsur tersebut memiliki sifat kimia yang mirip satu sama lain [4,5,7].

Ketidakstabilan secara *in vivo* dari golongan pirofosfat yang mempunyai ikatan fosfor anorganik (P-O-P) telah menyebabkan dikembangkannya komplek dari golongan difosfonat dan tetrafosfonat (MDP, HEDP, EDTMP, DTPMP) yang mempunyai ikatan fosfor organik (P-C-P) sebagai penyidik tulang. EDTMP yang merupakan golongan tetrafosfonat, sebelumnya telah berhasil ditandai dengan ^{153}Sm dan memperlihatkan biodistribusi yang serupa dengan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP juga telah digunakan secara luas untuk paliatif kanker yang metastase ke tulang [5,7,8].

Dalam penelitian sebelumnya, telah dilaporkan hasil preparasi radiofarmaka ^{186}Re -EDTMP dengan kemurnian radiokimia yang tinggi dan sediaan

tersebut stabil pada penyimpanan di suhu kamar sampai hari ke 8 [9]. Dalam makalah ini akan dilaporkan hasil evaluasi biologis dari radiofarmaka tersebut yang meliputi uji biodistribusi, uji lipofilisitas, uji pencucian dari darah, uji pencucian dari ginjal, pengikatan pada kristal hidroksi apatit dan penyidikan dengan kamera gamma .

TATA KERJA

Bahan dan Peralatan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis(methylene phosphonic Acid)* (EDTMP) yang disiapkan dari hasil sintesis yang dilakukan di P2RR BATAN. Perenat radioaktif, $^{186}\text{Re O}_4^-$, disiapkan dengan mengirradiasi 2 mg serbuk logam Rений (Re) diperkaya 97% (Isotek), kemudian dilarutkan dalam 3 mL HNO_3 2N, dikisatkan dan dilarutkan kembali dengan air. Bahan kimia lainnya seperti $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HCl, NaOH, metanol, asam askorbat, HNO_3 , aseton semuanya buatan Merck. Larutan salin, air suling dan gas nitrogen masing-masing diperoleh dari IPHA dan IGI. Rений-186 EDTMP disiapkan dengan menggunakan 54 mg EDTMP, 3 mg Asam Askorbat, pH reaksi 2,5 pada suhu 90°C selama 15 menit. Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit, tikus putih dan kelinci. *Radiochromatography scanner* (Bioscan) digunakan sebagai pencacah radioaktivitas. Kertas Whatman-1 untuk kromatografi, *Dose calibrator* (Victoreen) digunakan sebagai pencacah larutan bulk. Peralatan lain yang digunakan adalah *beaker glass*, syringe, vial dan *metabolic cage* .

Uji Biodistribusi Sediaan ^{186}Re -EDTMP

Sebanyak 0,1 mL sediaan ^{186}Re -EDTMP dengan aktivitas 200 μCi disuntikkan melalui vena ekor mencit setelah berat masing-masing mencit ditimbang. Mencit kemudian dibedah setelah interval waktu tertentu dan diambil organ-organ otot, tulang, darah, ginjal, limpa, jantung, paru, usus halus, lambung, kandung kemih dan hati. Setiap organ dicacah dengan alat pencacah sinar gamma dan dihitung persentase cacahan pada tiap gram organ atau tiap organ.

Penentuan lifofilisitas (koefisien partisi) kompleks [6]

Penentuan lifofilisitas kompleks $^{186}\text{Re-EDTMP}$ didasarkan atas pengukuran koefisien distribusi senyawa kompleks di fasa air dan fasa n-oktanol. Radioaktivitas dari tiap fase dicacah dan lifofilisitasnya dihitung sebagai perbandingan cacahan dalam fase oktanol terhadap cacahan dalam fasa air.

Uji Pencucian dari Darah (*blood clearance*)

Besarnya perubahan aktivitas kompleks di dalam darah per satuan waktu menyatakan laju *blood clearance*. Penentuan uji pencucian dari darah radiofarmaka $^{186}\text{Re-EDTMP}$ dilakukan dengan menyuntikkan 0,1 mL sediaan dengan aktivitas 200 μCi ke tubuh kelinci, kemudian darahnya diambil setelah 1, 5, 10, 30, 60 menit dan 24 jam setelah penyuntikan. Darah tersebut masing-masing dicacah kemudian di plotkan dalam bentuk grafik antara waktu terhadap aktivitas kompleks di dalam darah.

Uji Pencucian dari Ginjal (*renal clearance*)

Besarnya perubahan aktivitas kompleks dalam urin per satuan waktu merupakan laju *renal clearance*. Penentuan uji pencucian dari ginjal radiofarmaka $^{186}\text{Re-EDTMP}$ dilakukan dengan menyuntikkan 0,2 mL dengan aktivitas 400 μCi sediaan kepada tikus, kemudian tikus tersebut dimasukkan kedalam *metabolic cage*. Setelah selang waktu tertentu, urin ditampung dengan tabung reaksi yang sudah ditimbang dan aktivitas setiap tabung dicacah, kemudian dihitung persentase aktivitasnya. Dari sini dapat diketahui persentase aktivitas yang dikeluarkan setelah selang waktu tertentu.

Pengikatan pada kristal hidroksiapatit [10]

Ke dalam masing-masing 2 mL suspensi 25% hidroksiapatit dalam dapar fosfat pH 7,0, dimasukkan 50 μL kompleks $^{186}\text{Re-EDTMP}$ (aktivitas $\pm 100 \mu\text{Ci}$), diaduk dan diinkubasi pada suhu 37°C selama waktu tertentu (10, 20, 40, 60 menit, 24 jam dan 48 jam). Setelah inkubasi masing-masing tabung reaksi disentrifugal dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Fraksi filtrat dan endapan dipisahkan dan masing-masing diukur aktivitasnya dengan alat pencacah gamma.

Penyidikan dengan Menggunakan Kamera Gamma

Sebanyak 0,2 mL sediaan ^{186}Re -EDTMP dengan aktivitas 400 μCi disuntikkan melalui vena ekor tikus putih. Selang waktu tertentu dilakukan pencitraan pada tikus dicacah dengan kamera gamma setelah terlebih dahulu tikus tersebut dibius menggunakan pentotal (dosis 30 mg/kg berat badan).

Uji sterilitas

Uji sterilitas terhadap sediaan ^{186}Re -EDTMP dilakukan berdasarkan prosedur yang tercantum dalam Farmakope Indonesia [11]. Di dalam *laminair flow hood*, sebanyak 0,2 mL kompleks dengan aktivitas $\pm 400 \mu\text{Ci}$ dimasukkan ke dalam tabung perbenihan yang berisisi TSB dan FTG. Pengamatan dilakukan sampai 2 minggu setelah inkubasi.

Uji pirogenitas

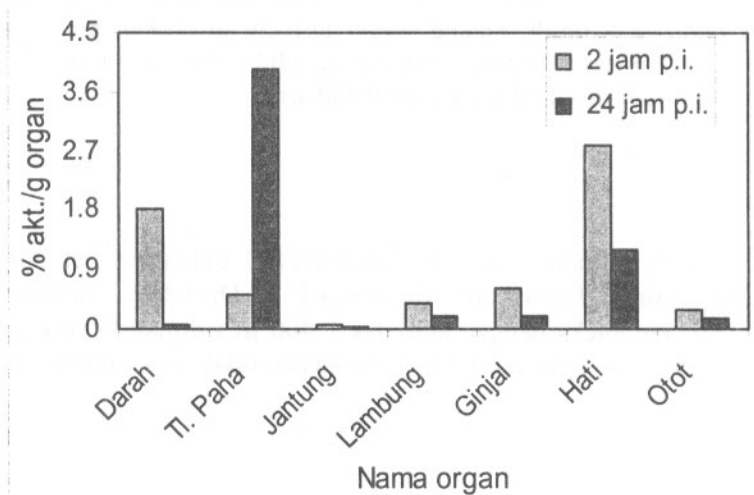
Uji pirogenitas terhadap sediaan ^{186}Re -EDTMP dilakukan menggunakan prosedur yang tercantum dalam Farmakope Indonesia [11] yaitu menggunakan kelinci (3 ekor) dengan berat kelinci 2,5 - 3 kg. Pengamatan dilakukan dengan mengukur perubahan suhu tubuh kelinci sampai dengan 3 jam setelah penyuntikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

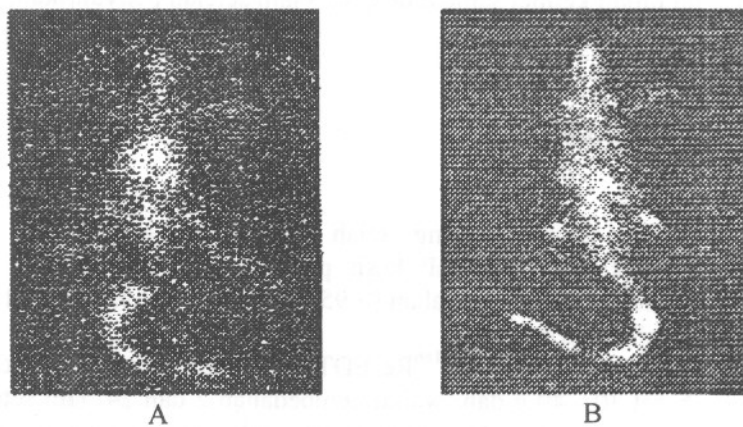
Berdasarkan formula yang telah dilaporkan sebelumnya [9], kemurnian radiokimia kompleks ^{186}Re -EDTMP hasil penandaan baik pada pH reaksi (pH 2,5) ataupun pH 5,0, tidak terjadi perubahan (> 95 %) dan kompleks tersebut digunakan untuk melakukan pengujian berikutnya.

Uji biodistribusi kompleks ^{186}Re -EDTMP dilakukan menggunakan hewan mencit putih dengan berat 30 - 40 g dan waktu pembedahan 2 dan 24 jam setelah penyuntikan (Gambar 1) memperlihatkan bahwa aktivitas pada organ target (tulang) yang tinggi dicapai jam ke 24 setelah penyuntikan dengan perbandingan tulang/otot yang besar (± 27 kali) dibanding dengan 2 jam setelah penyuntikan (± 2 kali). Pada saat tersebut penimbunan aktivitas pada organ lain sangat kecil sehingga gambaran

rangka yang diperoleh lebih jelas dibanding dengan 2 jam setelah penyuntikan (Gambar 2).



Gambar 1. Hasil biodistribusi ^{186}Re -EDTMP pada mencit putih (2 jam p.i.= 2jam setelah penyuntikan; 24 jam p.i. = 24 jam setelah penyuntikan).



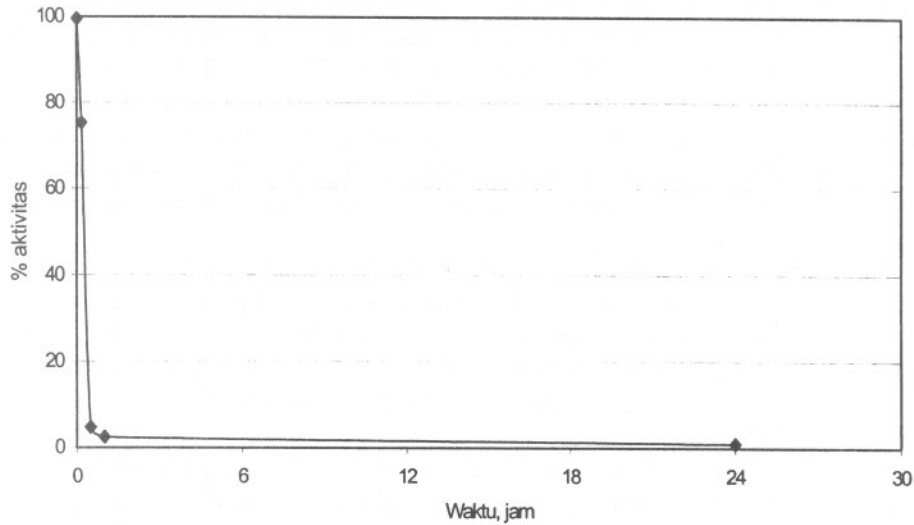
Gambar 2. Hasil pencitraan radiofarmaka ^{186}Re -EDTMP dengan kamera gamma pada 2 dan 24 jam setelah penyuntikan (A = 2 jam dan B = 24 jam).

Gambaran pencitraan dengan kamera gamma yang lebih baik diperoleh pada 24 jam setelah penyuntikan, hal ini disebabkan setelah 24 jam penyuntikan konsentrasi aktivitas dalam darah sangat kecil sekali (0,06%/g organ). Kualitas gambaran rangka/tulang yang diperoleh dengan kamera gamma ^{186}Re -EDTMP tidak sebaik $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP atau ^{153}Sm -EDTMP, karena intensitas sinar gamma pada ^{186}Re lebih kecil dibandingkan dengan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dan ^{153}Sm (masing-masing 90% dan 30%) yaitu hanya 9%. Konsentrasi aktivitas dalam ginjal sampai dengan 24 jam setelah penyuntikan tidak terlalu drastis penurunannya karena ekskresi kompleks ^{186}Re -EDTMP dan metabolitnya melewati organ tersebut.

Hasil penentuan lipofilisitas (koefisien partisi) radiofarmaka ^{186}Re -EDTMP yang didasarkan pada pengukuran koefisien distribusi senyawa kompleks di fasa air dan fasa n-oktanol menunjukkan bahwa harga $\text{Log } P_{\text{oct}} = -1,1295$ ($P = 0,07421$). Rendahnya lipofilisitas ^{186}Re -EDTMP menunjukkan bahwa kompleks sukar larut dalam lemak atau pelarut non polar, tetapi mudah sekali larut dalam air (hidrofil), karena itu clearance cenderung ke sistem renal [4,6].

Hasil penentuan aktivitas kompleks dalam darah menggunakan hewan tikus, menunjukkan konsentrasi tertinggi kompleks dicapai 5 menit setelah penyuntikan (99,5 %) dan persen aktivitas menurun drastis mulai pada menit ke 60 (2,4%), pada 24 jam setelah penyuntikan hanya 0,9% aktivitas yang tersisa dalam darah (Gambar 3). Penurunan kadar kompleks dalam darah ini disebabkan karena sebagian kompleks sudah terekskresikan dan sebagian lainnya terdistribusi ke organ seperti hati, paru, ginjal, lambung dan jaringan lain termasuk juga ke organ target (tulang).

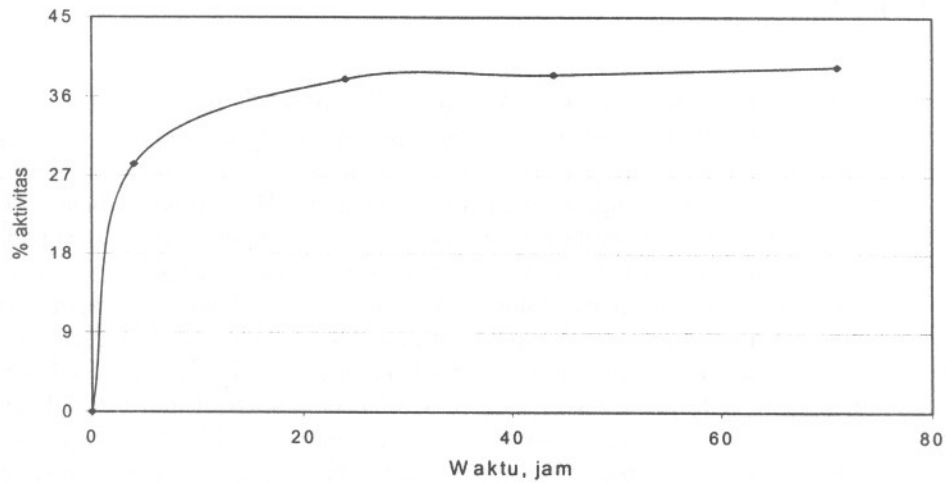
Hasil penentuan aktivitas ^{186}Re -EDTMP yang diekskresikan lewat ginjal melalui urin dengan menggunakan alat *Metabolic Cage* pada selang waktu penampungan 3, 24, 24 dan 48 jam setelah penyuntikan (Gambar 4), menunjukkan bahwa sampai dengan 24 jam setelah penyuntikan sekitar 38% dari total aktifitas diekskresikan lewat urin. Hasil ekskresi lewat *feces* setelah 24 jam diperoleh 1,4% dari aktivitas total dengan bentuk metabolit yang diekskresikan sebagai perenat bebas. Adanya ekskresi lewat *feces* ini kemungkinan bukan dari hasil pemecahan kompleks, tetapi merupakan perenat bebas yang masuk ke lambung dan diekskresikan lewat *feces*. Kompleks ^{186}Re -EDTMP pada umumnya mengalami penguraian selama metabolisme di dalam tubuh terutama ketika masuk ke hati yang bertugas untuk memecah kompleks menjadi metabolit yang mudah diekskresikan, dalam hal ini adalah perenat.



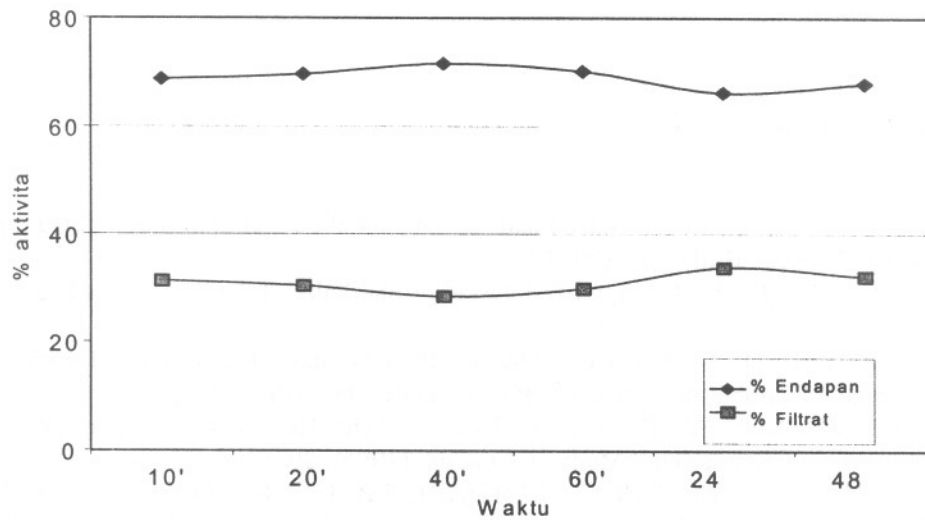
Gambar 3. Hasil uji pencucian dari darah $^{186}\text{Re-EDTMP}$ dalam tikus putih.

Uji pengikatan kompleks $^{186}\text{Re-EDTMP}$ pada kristal hidroksiapatit dilakukan menggunakan suspensi hidroksiapatit 25% dalam dapar fosfat pH 7,0 dengan memvariasikan waktu pengukuran aktivitas yang terdapat pada filtrat dan endapan [10]. Hasil yang diperoleh (Gambar 5) menunjukkan bahwa sampai dengan hari ke 2 (48 jam) setelah pencampuran, kompleks $^{186}\text{Re-EDTMP}$ yang terdapat pada endapan hidroksiapatit masih $> 65\%$ ($\pm 68\%$) sedang sisanya (32%) terdapat pada filtrat. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks $^{186}\text{Re-EDTMP}$ terikat sangat kuat pada hidroksiapatit yang merupakan salah satu komponen utama yang terdapat pada tulang. Beberapa peneliti sebelumnya juga pernah melaporkan bahwa EDTMP dalam tulang terikat kuat pada kristal hidroksiapatit dan mineral-mineral tulang seperti Ca, Mg dan fosfor [10].

Hasil pengujian sterilitas dari sediaan $^{186}\text{Re-EDTMP}$ menunjukkan bahwa sediaan adalah steril dibuktikan dengan tidak terjadinya pertumbuhan bakteri dan kapang pada media TSB dan FTG sampai dengan waktu pengamatan 14 hari. Hasil uji pirogenitas juga menunjukkan kenaikan suhu pada ke 3 ekor kelinci yang disuntik dengan sediaan $^{186}\text{Re-EDTMP}$ lebih kecil dari $1,4^\circ\text{C}$ (masing-masing $0,1$, $0,1$ dan $0,2^\circ\text{C}$) dan ini menunjukkan radiofarmaka $^{186}\text{Re-EDTMP}$ adalah bebas pirogen.



Gambar 4. Hasil uji pencucian dari ginjal ^{186}Re -EDTMP dalam tikus putih.



Gambar 5. Hasil uji pengikatan ^{186}Re -EDTMP pada kristal hidksiapatit (in vitro)

KESIMPULAN.

Telah dilakukan evaluasi biologis dari kompleks ^{186}Re -EDTMP dengan melakukan beberapa pengujian seperti biodistribusi, penentuan lipofilisitas, uji pencucian dari darah (*blood clearance*), uji pencucian dari ginjal (*renal clearance*), pencitraan dengan kamera gamma dan uji pengikatan pada hidroksiapatit. Hasil biodistribusi ^{186}Re -EDTMP menunjukkan bahwa akumulasi pada tulang 24 jam jauh lebih tinggi dari pada 2 jam setelah penyuntikan dan hasil pencitraan dengan kamera gamma pada 24 jam lebih jelas dari pada 2 jam setelah penyuntikan. Rhenium-186 EDTMP mencapai kadar maksimum dalam darah 5 menit setelah penyuntikan (99,5%) dan turun secara drastis dalam waktu 1 jam setelah penyuntikan (2,4%). Ekskresi kompleks ^{186}Re -EDTMP lewat urin (ginjal) mencapai 38% pada waktu 24 jam setelah penyuntikan dan total ekskresi lewat *feces* hanya sekitar 1,4% dari aktivitas total. Rhenium-186 EDTMP yang terikat pada kristal hidroksiapatit mencapai 71% pada 60 menit setelah pencampuran dan sampai dengan 2 hari masih sekitar 68% yang terikat pada hidroksiapatit.

Dari hasil beberapa pengujian tersebut diharapkan kompleks ^{186}Re -EDTMP dapat merupakan suatu alternatif untuk terapi paliatif pada kanker tulang atau metastase kanker lain ke tulang disamping radiofarmaka yang telah ada sekarang seperti ^{153}Sm -EDTMP dan ^{186}Re -HEDP.

DAFTAR PUSTAKA

1. H. VERA RUIZ, "Radiopharmaceuticals as Therapeutic Agents in Medical Care and Treatment", IAEA Bulletin, 1 (1993).
2. ALDO N. SERAFINI, "Therapy of Metastatic Bone Pain", J. Nucl. Med., 42 (2001) : 895- 904.
3. SHUANG LIU, D. SCOTT EDWARDS, "Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals", Bioconjugate Chemistry, 28(1)(2001),7-34
4. A. OWUNWANNE, M. PATEL, S. SADEK, "The Handbook of Radiopharmaceuticals", Chapman & Hall Medical, London, (1995), 29-38.
5. S. BANERJEE, G. SAMUEL, K. KOTHARI, P.R. UNNI, H.D. SARMA, M.R.A. PILLAI, "Tc-99m and Re-186 Complexes of Tetra-phosphonate Ligands and their Biodistribution Pattern in Animal Models", Nuclear Medicine and Biology, Vol. 28 (2001) : 205-213.
6. B. MAZIERE, "Physical and Chemical Requirements for a Radiopharmaceutical", European Radiopharmacy Course, Paris – France, November 2000.

7. S.J. OH, K.S. WON, D.H. MOON, J.H. CHEON, H.J. HA, J.M. JEONG, H.K. LEE, "Preparation and Biological Evaluation of ^{186}Re -ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis (methylene phosphonic acid) as a Potential Agent for Bone Pain Palliation", *Nuclear Medicine Communications*, 23 (2002),75-81.
8. A. N. SERAFINI, "Therapy of Metastatic Bone Pain", *J. Nucl. Med.*, 42 (2001), 895- 904.
9. A.H. GUNAWAN, A. MUTALIB, DJOHARLY, HERLINA, E .SARMINI,, KARYADI, ABIDIN, "Preparasi dan Uji Stabilitas Radiofarmaka Rhenium-186-EDTMP", *Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir Peran Sains dan Teknologi Nuklir Dalam Pemberdayaan Potensi Nasional*, Puslitbang Tknik Nuklir-BATAN, Bandung 11-12 Juli 2000, hal. 272-280.
10. S. DJAJUSMAN., S. R. TAMAT, F.W.FAISAL, "Pengujian in vitro Pengikatan Senyawa ^{153}Sm -EDTMP pada Komponen Darah", *Jurnal Radioisotop dan Radiofarmaka* , Vol.2, No.1,2, 1999: 19-30.
11. DEPARTEMEN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA, "Farmakope Indonesia", Edisi IV ,(1995), 855-909.