

UJI BIODISTRIBUSI DAN *CLEARANCE* SENYAWA BERTANDA $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA PADA TIKUS PUTIH NORMAL (GALUR *WISTAR*)

Azmairit Aziz, Nurhayati T., Iswahyudi
Puslitbang Teknik Nuklir, Badan Tenaga Nuklir Nasional

ABSTRAK

UJI BIODISTRIBUSI DAN *CLEARANCE* SENYAWA BERTANDA $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA PADA TIKUS PUTIH NORMAL (GALUR *WISTAR*). Senyawa $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA merupakan radiofarmaka pemancar- β untuk terapi kanker tiroid medular. Telah dilakukan uji biodistribusi dan *clearance* senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA dengan preparasi sampel secara destruksi basah menggunakan asam nitrat pekat terhadap organ, darah dan urine hewan percobaan tikus putih normal. Hasil uji biodistribusi menunjukkan bahwa penimbunan aktivitas pada organ tiroid normal relatif kecil ($1,80 \pm 0,58\%$) pada selang waktu 30 menit setelah penyuntikan secara intravena. Penimbunan aktivitas lebih besar terdapat pada ginjal, kemudian diikuti oleh paru-paru dan hati. Hasil uji *clearance* menunjukkan bahwa senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA mempunyai waktu *clearance* darah yang cukup cepat, dimana dalam waktu 30 menit setelah penyuntikan, aktivitas per gram darah tinggal $2,75 \pm 0,30\%$. Uji *clearance* senyawa bertanda tersebut di dalam urine dalam waktu 24 jam setelah penyuntikan, diperoleh aktivitas per mL urine hanya tinggal $2,29 \pm 0,91\%$.

Kata kunci : renium, asam meso 2,3-dimerkaptosuksinat, kanker tiroid medular, uji biodistribusi, uji *clearance*.

ABSTRACT

BIODISTRIBUTION AND CLEARANCE TESTS OF $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA IN NORMAL WHITE RATS (A STRAIN OF WISTAR). $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA is a β -emitting radiopharmaceutical for medullary thyroid carcinoma therapy. Biodistribution and clearance tests of $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA was done by wet destruction method using concentrate liquid of nitric acid in the organ, blood and urine of normal white rats. Biodistribution test showed a smaller accumulation of activity per gram normal organ of the thyroid ($1.80 \pm 0.58\%$) at 30 minutes after intravenous injection. The higher accumulation of activity was apparent in kidney, and then followed by lung and liver. Clearance test of $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA showed a short enough blood clearance time with $2.75 \pm 0.30\%$ of the activity remained in the blood at 30 minutes after injection. The

urine clearance of $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA with in 24 hours after injection was $2.29 \pm 0.91\%$ of the activity per mL urine.

Key words : rhenium, dimercaptosuccinic acid (DMSA), medullary thyroid carcinoma, biodistribution test, clearance test.

PENDAHULUAN

Radiofarmaka untuk keperluan terapi yang ditandai dengan radioisotop pemancar- β seperti ^{186}Re saat ini sangat banyak digunakan di bidang kedokteran nuklir karena radioterapi dengan menggunakan berkas eksternal walaupun cukup efektif untuk tumor-tumor malignan dan metastase, akan tetapi cara tersebut mempunyai kekurangan karena jaringan-jaringan normal dekat jaringan tumor / kanker juga menerima dosis radiasi [1,2].

Senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA merupakan radiofarmaka pemancar- β untuk terapi kanker tiroid medular yang analog dengan $^{99m}\text{Tc}^{(V)}$ -DMSA untuk diagnosis kanker tiroid medular melalui pencitraan dengan teknik tomografi [3,4,5].

Pada penelitian terdahulu telah berhasil dilakukan pembuatan radioisotop ^{186}Re dari hasil iradiasi garam amonium perenat [6] dan sintesis senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA melalui penandaan ligan DMSA dengan radioisotop renium-186 menggunakan reduktor SnCl_2 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit sambil dialiri gas nitrogen [7].

Untuk mengetahui sejauh mana senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA yang telah diperoleh dapat memenuhi sasaran yang diharapkan maka dalam penelitian ini dilakukan evaluasi biologis pada hewan percobaan antara lain adalah uji biodistribusinya untuk mengetahui penimbunan senyawa tersebut pada organ tertentu. Disamping itu, untuk mengetahui berapa lama senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA yang diperoleh tersebut berada di dalam tubuh, maka dilakukan uji *clearancenya* baik di dalam darah maupun di dalam urine hewan percobaan tikus putih normal. Uji

biodistribusi dan *clearance* dilakukan dengan preparasi sampel secara destruksi basah dengan menggunakan asam nitrat pekat sambil dipanaskan di atas penangas air, sehingga diperoleh sampel dengan bentuk geometri lapisan tipis yang memenuhi syarat untuk dapat dicacah dengan alat pencacah Geiger Muller.

BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan dan peralatan

Asam meso 2,3-dimerkaptosuksinat (DMSA) buatan Fluka, amonium perenat (NH_4ReO_4 99,999%) buatan Aldrich yang diiradiasi di reaktor TRIGA 2000 Bandung, NaCl fisiologis (0,9%) dan akuabides steril buatan IPHA, eter teknis, NaHCO_3 , timah (II) klorida, HCl, HNO_3 pekat, NaOH serta pereaksi-pereaksi lain buatan E. Merck. Hewan percobaan adalah tikus putih normal galur wistar dengan berat badan 200-300 gram. Peralatan yang digunakan terdiri dari pencacah- β Geiger Muller, pisau bedah, penangas air, peralatan gelas, seperangkat alat kromatografi lapisan tipis dan alat elektroforesis (Bijou-ADCO).

Tata kerja

Sintesis $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA

Disiapkan tiga macam larutan sebagai berikut:

1. Sebanyak 8 mg asam meso 2,3-dimerkaptosuksinat (DMSA) dilarutkan dengan 0,4 mL larutan dapar NaHCO_3 0,5 M (pH 9) dan 2,8 mL larutan NaCl fisiologis, kemudian dialiri gas nitrogen selama lebih kurang 5 menit.
2. Sebanyak 20 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan 1 mL HCl pekat (7,68 N), kemudian dialiri gas nitrogen selama lebih kurang 5 menit.
3. Larutan ^{186}Re -perenat yang sudah dialiri dengan gas nitrogen (selama lebih kurang 15 menit).

Ke dalam larutan 1 ditambahkan sebanyak 80 μL larutan 2, dan 35 μL larutan 3, kemudian dialiri gas nitrogen selama 30 menit, pH larutan diamati pada pH ~ 1 ,

selanjutnya pH ditepatkan menjadi 8-8,5 dengan penambahan NaOH 1 N. Kemudian ditentukan kemurnian radiokimianya dengan metode kromatografi lapisan tipis dan metode elektroforesis.

Pengujian kemurnian radiokimia senyawa $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA

Kemurnian radiokimia senyawa $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA ditentukan dengan metode kromatografi lapisan tipis (KLT) menggunakan pelat silika gel 60 (2x10 cm) sebagai fase diam dan aseton sebagai fase gerak. Sedangkan metode elektroforesis dilakukan dengan menggunakan pelat pendukung kertas kromatografi Whatman 3 MM dan dapar fosfat 0,02 M pH 7,5 sebagai larutan elektrolitnya, dimana pemisahan dilakukan selama 1 jam pada tegangan 300 Volt. Kemudian kromatogram dan kertas elektroforesis dikeringkan, dipotong-potong dan dicacah dengan alat pencacah Geiger Muller.

Uji biodistribusi senyawa $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA pada hewan percobaan

Sebanyak 0,1 - 0,2 mL $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA (~ 100-300 μCi) disuntikkan pada beberapa kelompok tikus putih normal melalui vena ekor. Percobaan dilakukan tiga kali pengulangan. Setelah selang waktu tertentu (10, 30, 60, 120, 180 menit dan 24 jam), tikus-tikus tersebut (dilakukan triplo untuk setiap interval waktu) dibunuh dengan eter. Selanjutnya dilakukan pembedahan, diambil organ-organ yang diperlukan dan ditimbang. Setelah itu organ-organ tersebut beserta larutan standar sediaan $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA di destruksi dengan cara destruksi basah menggunakan 2 mL asam nitrat pekat. Penambahan asam nitrat dilakukan sedikit demi sedikit sambil dipanaskan di atas penangas air mendidih sehingga diperoleh sampel dengan bentuk geometri lapisan tipis dan kering. Kemudian aktivitasnya diukur dengan alat pencacah Geiger Muller. Persentase penimbunan aktivitas per gram organ dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Penimbunan aktivitas per gram organ (\%)} = \frac{\text{Cacahan per gram organ}}{\text{Cacahan dosis yang diberikan}} \times 100\%$$

Uji clearance senyawa $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA pada darah hewan percobaan

Sebanyak 0,1 - 0,2 mL $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA (~ 30-100 μCi) disuntikkan pada sekelompok (triplo) tikus putih normal melalui vena ekor. Percobaan dilakukan tiga kali pengulangan. Setelah selang waktu tertentu (10, 30, 60, 120, 180 menit dan 24 jam), sejumlah darahnya diambil, ditambahkan asam nitrat pekat sedikit demi sedikit sebanyak 2 mL sambil dipanaskan di atas penangas air mendidih sehingga membentuk lapisan tipis dan kering. Kemudian aktivitasnya diukur dengan alat pencacah Geiger Muller. Hal yang sama dilakukan pula untuk larutan standar sediaan $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA. Persentase aktivitas per gram darah dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas per gram darah (\%)} = \frac{\text{Cacahan per gram darah}}{\text{Cacahan dosis yang diberikan}} \times 100\%$$

Uji clearance senyawa $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA pada urine hewan percobaan

Sebanyak 0,1-0,2 mL $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA (~ 30-100 μCi) disuntikkan pada sekelompok (triplo) tikus putih normal melalui vena ekor. Percobaan dilakukan lima kali pengulangan. Setelah selang waktu tertentu (1, 2, 3, 4, 5 dan 24 jam) sebanyak 10 μL urinenya diambil, selanjutnya ditambahkan asam nitrat pekat sedikit demi sedikit sebanyak 2 mL sambil dipanaskan di atas penangas air mendidih sehingga membentuk lapisan tipis dan kering, kemudian aktivitasnya diukur dengan alat pencacah Geiger Muller. Hal yang sama dilakukan pula untuk larutan standar sediaan $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA. Persentase aktivitas per mL urine dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas per mL urine (\%)} = \frac{\text{Cacahan per mL urine}}{\text{Cacahan dosis yang diberikan}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil sintesis senyawa $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA melalui penandaan ligan DMSA dengan radioisotop renium-186 menggunakan reduktor SnCl_2 memberikan kemurnian radiokimia sebesar $\pm 97\%$ ($97,11 \pm 0,49\%$).

Suatu radiofarmaka selain harus memenuhi persyaratan kemurnian radiokimianya, yaitu di atas 90%, juga perlu ditunjang dengan uji biologisnya yaitu dengan melakukan uji biodistribusi untuk mengetahui penimbunan senyawa tersebut pada organ tertentu, serta uji *clearance* baik di dalam darah maupun di dalam urine untuk mengetahui berapa lama senyawa tersebut berada di dalam tubuh.

Preparasi sampel organ, darah dan urine hewan percobaan dengan cara destruksi basah, menggunakan asam nitrat pekat untuk mendapatkan sampel berupa lapisan tipis cukup efektif selama pencacahan. Sampel berbentuk lapisan tipis ini berguna untuk mencegah terjadinya serapan diri sinar- β oleh sampel itu sendiri, sehingga memberikan efisiensi pencacahan yang cukup tinggi.

Tabel 1. Uji biodistribusi senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA pada tikus putih normal.

Organ	Penimbunan aktivitas / gram organ (%)					
	10 menit	30 menit	60 menit	120 menit	180 menit	24 jam
Otot	$1,06 \pm 0,20$	$0,44 \pm 0,23$	$0,25 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,03$	$0,004 \pm 0,0037$
Tulang	$0,89 \pm 0,27$	$0,91 \pm 0,25$	$0,74 \pm 0,25$	$0,62 \pm 0,24$	$0,67 \pm 0,25$	$0,02 \pm 0,02$
Darah	$6,67 \pm 1,29$	$3,76 \pm 0,90$	$3,87 \pm 1,10$	$0,91 \pm 0,15$	$0,37 \pm 0,17$	$0,04 \pm 0,03$
Usus	$1,24 \pm 0,18$	$0,75 \pm 0,13$	$0,74 \pm 0,13$	td	$0,27 \pm 0,02$	td
Lambung	$2,26 \pm 0,44$	$1,48 \pm 0,22$	$0,82 \pm 0,40$	$0,44 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,11$	$0,05 \pm 0,06$
Hati	$2,49 \pm 0,36$	$1,83 \pm 0,42$	$1,54 \pm 0,41$	$1,40 \pm 0,13$	$1,13 \pm 0,18$	$0,55 \pm 0,29$
Lympa	$1,66 \pm 0,18$	$0,91 \pm 0,19$	$0,91 \pm 0,19$	td	$0,58 \pm 0,03$	td
Ginjal	$5,87 \pm 0,54$	$6,56 \pm 2,06$	$8,66 \pm 1,32$	$6,00 \pm 0,81$	$6,34 \pm 1,28$	$4,78 \pm 1,45$
Jantung	$1,64 \pm 0,25$	$0,72 \pm 0,15$	$0,72 \pm 0,15$	td	$0,37 \pm 0,28$	td
Paru-paru	$3,39 \pm 0,32$	$2,01 \pm 0,51$	$1,33 \pm 0,50$	$0,79 \pm 0,20$	$0,44 \pm 0,15$	$0,03 \pm 0,02$
Thyroid	$2,95 \pm 0,56$	$1,80 \pm 0,58$	$1,23 \pm 0,42$	$0,66 \pm 0,09$	$0,45 \pm 0,11$	$0,01 \pm 0,006$

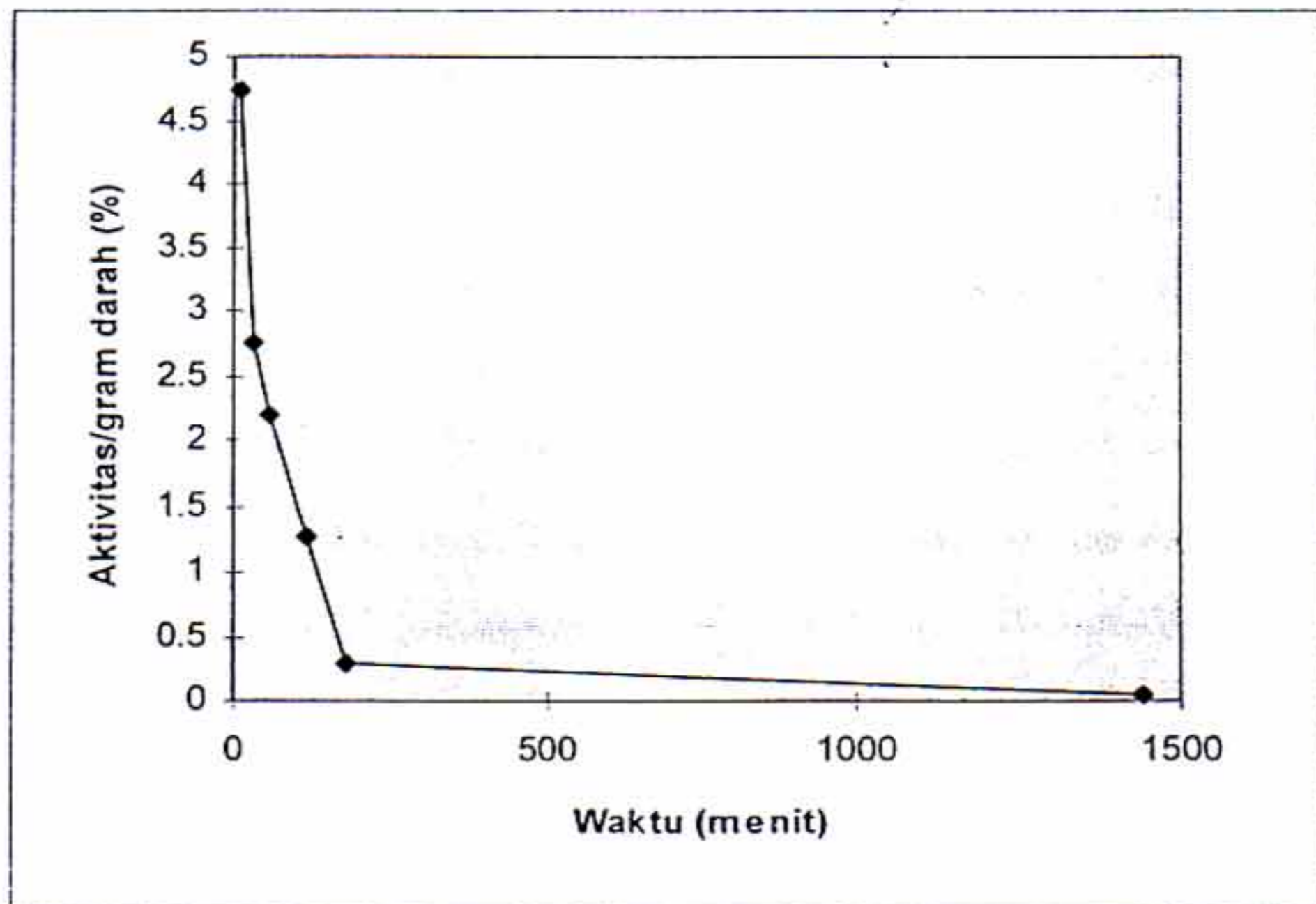
Ket : td = tidak diamati.

Tabel 1 menunjukkan hasil uji biodistribusi senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA pada beberapa kelompok hewan percobaan dengan 3 kali pengulangan. Dari data pada Tabel 1 terlihat bahwa penimbunan aktivitas pada ginjal cukup besar baik pada interval waktu 30 menit ($6,56 \pm 2,06\%$) maupun pada interval waktu 24 jam ($4,78 \pm 1,45\%$) setelah penyuntikan secara intravena, kemudian diikuti oleh paru-paru dan hati. Terjadinya penimbunan aktivitas yang cukup besar pada ginjal disebabkan karena terbentuknya campuran kompleks $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - $\text{Sn}^{(III)}$ - DMSA secara *in vivo*, dimana senyawa tersebut mengalami penimbunan aktivitas pada ginjal [8]. Di samping itu juga terlihat aktivitas pada tulang terakumulasi cukup lama, bila dibandingkan dengan organ-organ lain selain ginjal, dimana pada interval waktu 30 menit setelah penyuntikan memberikan hasil sebesar $0,91 \pm 0,25\%$ dan pada interval waktu 3 jam setelah penyuntikan memberikan hasil sebesar $0,67 \pm 0,25\%$. Sedangkan pada organ-organ lain terlihat bahwa penimbunan aktivitas senyawa tersebut menurun dengan cepat dengan bertambahnya waktu.

Pada uji biologis senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA ini sebaiknya digunakan hewan percobaan yang terkena kanker tiroid medular karena senyawa ini dapat digunakan untuk terapi kanker tiroid medular. Akan tetapi, karena hewan percobaan tersebut belum tersedia, maka pengujian ini dilakukan pada hewan percobaan normal. Pada hasil percobaan ini terlihat bahwa penimbunan aktivitas pada organ tiroid normal relatif kecil ($2,95 \pm 0,56\%$) pada selang waktu 10 menit setelah penyuntikan yang kemudian menurun hingga $0,66 \pm 0,09\%$ pada selang waktu 2 jam setelah penyuntikan. Untuk tujuan terapi, setelah penyuntikan diharapkan senyawa bertanda tersebut dapat terakumulasi maksimum dan dalam waktu yang sesingkat mungkin masuk pada organ sasaran (yang terkena kanker tiroid medular).

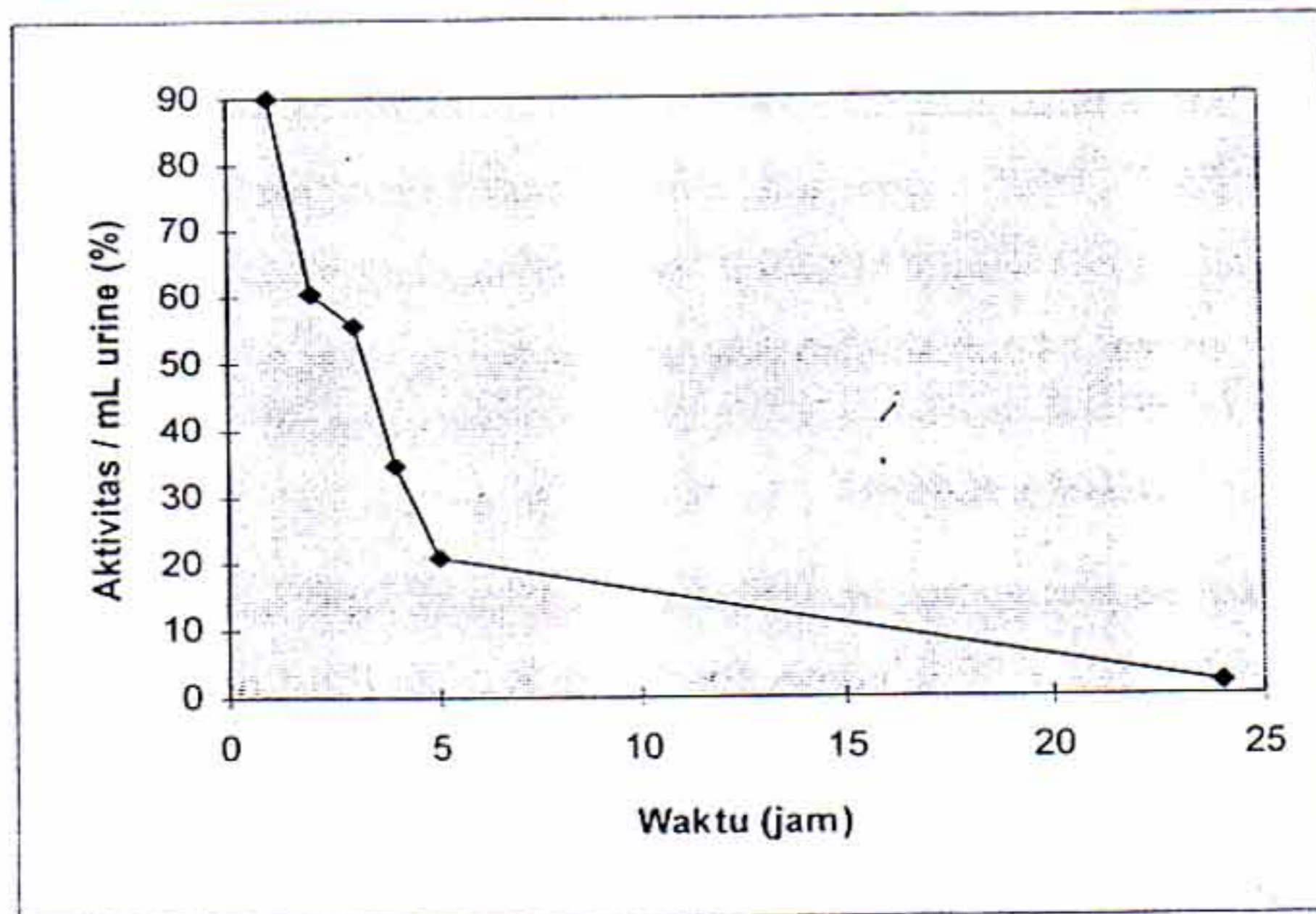
Senyawa kompleks renium lebih mudah teroksidasi secara *in-vivo* membentuk perenat (ReO_4^-) pada organ normal. Sebaliknya, keadaan organ yang terkena kanker bersifat kekurangan oksigen sehingga senyawa kompleks renium lebih stabil dan dapat

bertahan lebih lama pada organ tersebut. Keadaan ini mengakibatkan senyawa bertanda $^{186}\text{Re}(\text{V})$ -DMSA akan keluar lebih cepat dari organ tiroid normal dibandingkan dengan organ tiroid yang tidak normal (terkena kanker). Hal ini merupakan salah satu keuntungan senyawa bertanda renium sebagai bahan untuk terapi kanker [1,9].



Gambar 1. Uji *clearance* senyawa bertanda $^{186}\text{Re}(\text{V})$ -DMSA dalam darah tikus putih normal.

Hasil uji *clearance* senyawa bertanda $^{186}\text{Re}(\text{V})$ -DMSA di dalam darah hewan percobaan tikus putih normal dengan 3 kali pengulangan terlihat pada Gambar 1. Dari hasil ini diperoleh bahwa senyawa bertanda tersebut mempunyai waktu *clearance* yang cukup cepat di dalam darah, di mana dalam waktu 10 menit setelah penyuntikan, aktivitas per gram darah tinggal $4,74 \pm 0,01\%$ yang kemudian menurun hingga $0,05 \pm 0,01\%$ dalam waktu 24 jam setelah penyuntikan.



Gambar 2. Uji *clearance* senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA dalam urine tikus putih normal.

Gambar 2 menunjukkan hasil uji *clearance* senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA di dalam urine hewan percobaan dengan 5 kali pengulangan. Pada gambar terlihat bahwa sebagian besar senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ -DMSA diekskresikan melalui urine. Uji *clearance* senyawa bertanda tersebut di dalam urine pada selang waktu 2 jam setelah penyuntikan, diperoleh aktivitas per mL urine sebesar $60,25 \pm 10,96\%$ dan dalam waktu 24 jam setelah penyuntikan hanya tinggal $2,29 \pm 0,91\%$.

KESIMPULAN

Penimbunan aktivitas senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA pada organ tiroid normal sebesar $2,95 \pm 0,56\%$ pada selang waktu 10 menit setelah penyuntikan yang kemudian menurun hingga $0,66 \pm 0,09\%$ pada selang waktu 2 jam setelah penyuntikan.

Senyawa bertanda $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA mempunyai waktu *clearance* yang cukup cepat di dalam darah, dimana dalam waktu 10 menit setelah penyuntikan, aktivitas per

gram darah tinggal $4,74 \pm 0,01\%$ yang kemudian menurun hingga $0,05 \pm 0,01\%$ dalam waktu 24 jam setelah penyuntikan.

$^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMSA sebagian besar diekskresikan melalui urine dengan aktivitas per mL urine pada selang waktu 2 jam setelah penyuntikan sebesar $60,25 \pm 10,96\%$ dan dalam waktu 24 jam setelah penyuntikan hanya tinggal $2,29 \pm 0,91\%$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bpk. Iswandi I., Ibu Rochestri S., Bpk. Yana S., Bpk. F.X. Sutomo, Ibu Nanih K., dan Ibu Entit S. yang telah membantu penulis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. KOTHARI, K., et.al., Preparation of ^{186}Re Complexes of Dimercaptosuccinic Acid and Hydroxy Ethylidine Diphosphonate, *Proceedings of Modern Trend in Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy*, (1998) 539-555.
2. VOLKERT, A.V., HOFFMAN T.J., *Chem. Rev.*, 99 (9) (1999) 2269-2292.
3. EDWARD, C., et.al., Synthesis of Carrier-free Rhenium-188(V)DMSA Using Triphenyl Phosphine as A Facile Reducing Agent, *J. Label. Comp. Radiopharm.*, 33 (1) (1992) 65-75.
4. BISUNADAN, M., et.al., Synthesis and Characterization of (^{186}Re)Rhenium^(V)-Dimercaptosuccinic Acid: A Possible Tumour Radiotherapy Agent, *Appl. Radiat. Isot.*, 42 (2) (1991) 167-171.
5. HORIUCHI, K., et.al., Challenges Associated with Re-186: From 'Carrier-free' $^{99\text{m}}\text{Tc}^{(V)}$ - DMS To 'Carrier' Containing $^{186}\text{Re}^{(V)}$ - DMS, *Proceedings of Modern Trend in Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy*, (1998) 557-567.
6. AZIZ, A., IDRIS, I., Pembuatan radioisotop ^{186}Re dari hasil iradiasi garam amonium perenat, (belum terbit).