Akreditasi LIPI Nomor : 536/D/2007
Tanggal 26 Juni 2007

KARAKTERISTIK SENYAWA PENGKONTRAS *MRI (MAGNETIC RESONANCE IMAGING) GADOLINIUM(III)-DTPA* DALAM TUBUH HEWAN PERCOBAAN MELALUI SIMULASI ^{153}*Gd-DTPA* SEBAGAI *TRACER*

A.H. Gunawan, A. Mutalib, S. Aguswarini dan Ratna Dini H.
Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR)-BATAN
Kawasan Puspiptek, Serpong 15314, Tangerang

ABSTRAK

KARAKTERISTIK SENYAWA PENGKONTRAS *MRI (MAGNETIC RESONANCE IMAGING) GADOLINIUM(III)-DTPA* DALAM TUBUH HEWAN PERCOBAAN MELALUI SIMULASI ^{153}*Gd-DTPA* SEBAGAI *TRACER*. Perilaku senyawa pengkontras *MRI* (*Magnetic Resonance Imaging*) *Gd-DTPA* di dalam tubuh dapat dipelajari dengan mengamati biodistribusi di dalam jaringan tubuh serta laju *clearance* baik dalam urin maupun *feces* dengan menggunakan hewan percobaan. Kestabilannya di dalam aliran darah dapat diamati melalui penguraiannya di dalam serum darah setelah diinkubasi pada suhu tubuh. Studi ini perlu dilakukan karena erat kaitannya dengan aspek khasiat (*efficacy*) dan keselamatan (*safety*) penggunaan senyawa pengkontras untuk *MRI*. Dalam laporan ini akan disampaikan hasil uji biodistribusi, *clearance*, serta kestabilan senyawa *Gd-DTPA* di dalam serum darah dengan mengunakan senyawa bertanda ^{153}*Gd-DTPA*. Komplek ^{153}*Gd-DTPA* disintesis sama seperti *Gd-DTPA*, yaitu dengan mensuspensikan *DTPA* (*diethylenetriaminepentaacetic acid*) dalam larutan $^{153}GdCl_3$, kemudian suspensi direfluks selama 1 jam dan diperoleh larutan jernih ^{153}*Gd-DTPA*. Kemurnian radiokimia komplek ^{153}*Gd-DTPA* ditentukan melalui pengukuran dengan elektroforesa kertas dan kemurniannya diperoleh lebih besar dari 95 %. Uji biodistribusi senyawa komplek ^{153}*Gd-DTPA* dilakukan terhadap mencit dan uji yang sama dilakukan pula terhadap $^{153}GdCl_3$ untuk melihat biodistribusi Gd^{3+} bebas. Hasil percobaan menunjukkan bahwa ion $^{153}Gd^{3+}$ terakumulasi di beberapa organ seperti hati, jantung, paru dan limpa. Sedangkan akumulasi senyawa komplek ^{153}*Gd-DTPA* pada ginjal dicapai dalam waktu 2 jam setelah penyuntikan. Setelah 48 jam lebih dari 95 % komplek ^{153}*Gd-DTPA* dikeluarkan melalui urin dan *feces* dan aktivitas yang tersisa dalam tubuh hewan kurang dari 5 %. Hasil uji kestabilan senyawa kompleks dalam plasma darah pada suhu 37 ^{o}C sampai dengan 50 jam masih menunjukkan lebih dari 95 % sebagai ^{153}*Gd-DTPA*.

Kata kunci : ^{153}*Gd*, *Gd-DTPA*, Biodistribusi, *Clearance*, Kestabilan, *MRI*

ABSTRACT

CHARACTERISTIC OF MRI (MAGNETIC RESONANCE IMAGING) CONTRAST AGENT GADOLINIUM(III)-DTPA IN ANIMAL SIMULATED BY RADIOTRACER ^{153}Gd-DTPA. Characteristic of MRI contrast agent Gd-DTPA in the body can be studied by observing the stability in blood serum, biodistribution study in organ/tissues and clearance of the complex in urine and feces by using animal model. This study was performed in connection with efficacy and safety aspect of a Gd-DTPA complex as an MRI contrast agent. Gadolinium-153 DTPA was prepared by suspending of DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) in $GdCl_3$ solution in 1 N HCl. The suspension was refluxed for one hour until the clear solution of ^{153}Gd-DTPA obtained. Radiochemical purities of both $^{153}GdCl_3$ and ^{153}Gd-DTPA showed more than 95 % by mean of TLC and paper electrophoresis. The biodistribution studies of the $^{153}GdCl_3$ and ^{153}Gd-DTPA were performed using normal white mice with the aim of evaluating the side effects of Gd ions and the efficacy of the complex Gd-DTPA. Stability test of ^{153}Gd-DTPA was done by using blood human serum and observed quite stable up to 116 hours. Biodistribution pattern of ^{153}Gd ion tends to accumulate in the organs such as liver, heart, lung and spleen, while ^{153}Gd-DTPA complex accumulates with optimum activity in the kidney 2 hours after injection Clearance of ^{153}Gd-DTPA in the urine and feces showed more than 95 % at 48 hours after injection and less than 5 % of the activity still remains in the body. Stability test of ^{153}Gd-DTPA complex indicated that the complex was stable up to 50 hours after preparation.

Key words : ^{153}Gd, ^{153}Gd-DTPA, biodistribution, clearance, MRI

Edisi Khusus Oktober 2007, hal : 191 - 195
ISSN : 1411-1098

PENDAHULUAN

Senyawa kontras untuk *MRI* telah banyak digunakan sejak dasawarsa terakhir ini. Senyawa tersebut digunakan untuk meningkatkan gambaran atau citra (*image*) dari organ/jaringan yang sukar dibedakan melalui teknik pencitraan *MRI* biasa khususnya pada jaringan lunak sistem saraf pusat, hati, sistem pencernaan, *lymphatic system*, payudara, sistem kardiovascular dan paru. Dalam teknik *MRI*, jaringan dan organ dapat dibedakan dengan melihat perbedaan densitas proton air pada organ tersebut. Tumor dapat dideteksi karena jaringan tumor mempunyai densitas yang berbeda dari jaringan sehat sekitarnya [1,2].

Disain suatu senyawa kontras *MRI* memerlukan kesesuaian dari segi farmasi dan peralatan *MRI*. Meskipun ion-ion logam seperti Mn^{2+} dan Gd^{3+} merupakan logam bersifat paramagnetik untuk kontras yang baik tetapi harus dalam bentuk senyawa komplek yang stabil karena logam-logam tersebut sangat toksis [1].

Gadolinium (Gd) merupakan salah satu unsur paramagnetik sangat kuat dan memenuhi persyaratan penting sebagai senyawa kontras disamping mempunyai kemampuan menyerap netron yang sangat tinggi ($4,9 \times 10^4$ barns). *Gd-DTPA* telah di loloskan oleh FDA USA sebagai senyawa pengkontras dan digunakan secara luas di berbagai negara di dunia [1-3]. Hal ini dikarenakan selain senyawa komplek tersebut memiliki kestabilan komplek yang tinggi , aman, juga memberikan beberapa efek samping yang ringan seperti sedikit sakit kepala, mual seperti terbakar pada tempat penyuntikan, sedangkan reaksi alergi jarang sekali terjadi. Hasil pengujian menunjukkan pula bahwa *Gd-DTPA* dilaporkan beberapa kali lebih aman bila dibandingkan dengan senyawa kontras golongan iodium yang digunakan dalam *CT scans* [2,4] .

Perilaku senyawa pengkontras *MRI (Magnetic Resonance Imaging) Gd-DTPA* di dalam tubuh dapat dipelajari dengan mengamati biodistribusinya di dalam jaringan tubuh serta laju *clearance* baik dalam urin maupun *feces*, serta kestabilannya di dalam plasma darah. Studi ini perlu dilakukan karena erat kaitannya dengan aspek khasiat (*efficacy*) dan keselamatan (*safety*) penggunaan senyawa pengkontras untuk MRI [5,6].

Dalam penelitian ini perilaku senyawa kontras *Gd-DTPA* di dalam tubuh dipelajari dengan menggunakan kompleks radioaktif ^{153}*Gd-DTPA*. Preparasi komplek ^{153}*Gd-DTPA* dilakukan dengan merefluk campuran $^{153}GdCl_3$ dengan *DTPA (Diethylenetriaminepentacetic acid)* selama 1 jam. Kemurnian radiokimia dilakukan dengan menggunakan metode elektroforesa kertas dengan kertas *Advantec* sebagai fasa diam, elektrolit dapar fosfat pH 5, tegangan 200 volt dan waktu elektroforesis 2 jam.

METODE PERCOBAAN

Bahan dan Peralatan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa *Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)* yang disiapkan dari hasil sintesis yang dilakukan di P2RR BATAN. Larutan gadolinium radioaktif sebagai $^{153}GdCl_3$ disiapkan dengan mengiradiasi 100 mg serbuk logam gadolinium oksida (Gd_2O_3) *(Stream)*, hasil irradiasi kemudian dilarutkan dalam 10 mL HCl 1N. Bahan kimia lainnya seperti HCl, NaOH, aseton semuanya buatan *Merck*. Larutan salin, air suling dan gas nitrogen masing-masing diperoleh dari IPHA dan IGI.

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit dan tikus putih. Alat pencacah sinar gamma *(Gammatec II)* digunakan sebagai pencacah radioaktivitas pada penentuan kemurnian radiokimia. Kertas *Advantec* untuk elektroforesis, *Dose calibrator (Victoreen)* digunakan sebagai pencacah larutan *bulk*. Peralatan lain yang digunakan adalah *beaker glass*, *syringe*, *vial* dan *metabolic cage*.

Uji Biodistribusi Sediaan ^{153}*Gd-DTPA*

Sebanyak 0,1 mL sediaan ^{153}*Gd-DTPA* dengan aktivitas 100 μCi disuntikkan melalui vena ekor mencit setelah berat masing-masing mencit ditimbang. Mencit kemudian dibedah setelah selang 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.

Uji Stabilitas dalam Serum Sediaan ^{153}*Gd-DTPA*

Sebanyak 0,5 mL sediaan ^{153}*Gd-DTPA* dicampurkan dengan 0,5 mL serum darah manusia, kemudian diinkubasikan pada suhu 37 ^oC dalam inkubator. Selang waktu tertentu, campuran tersebut diambil dan ditentukan kemurnian radiokimianya dengan metode elektroforesis kertas.

Penentuan Lifofilisitas (Koefisien Partisi) Kompleks

Penentuan lifofilisitas komplek ^{153}*Gd-DTPA* didasarkan atas pengukuran koefisien distribusi senyawa komplek di fasa air dan fasa n-oktanol. Sebanyak 0,5 mL komplek ^{153}*Gd-DTPA* diambil dari larutan induk, diencerkan dengan larutan salin sampai *volume* 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi , kemudian pada larutan tersebut ditambahkan 1 mL n-oktanol, larutan *vortex* selama 2 menit dan dibiarkan sampai ke 2 fasa terpisah. Dari tiap fasa (fasa air dan fasa oktanol) masing-masing diambil 0,5 mL dan dicacah aktivitasnya dengan alat pencacah sinar gamma *(Gammatec II)* dan

lifofilisitasnya dihitung sebagai perbandingan cacahan dalam *fase* oktanol terhadap cacahan dalam fasa air.

Uji *Clearance* Komplek ^{153}*Gd-DTPA* Lewat Urin (*Renal Clearance)*

Besarnya perubahan aktivitas komplek dalam urin persatuan waktu merupakan laju *renal clearance*. Penentuan uji pencucian dari ginjal radiofarmaka ^{153}*Gd-DTPA* dilakukan dengan menyuntikkan 0,2 mL dengan aktivitas sekitar 200 μCi sediaan kepada tikus secara intra vena melalui vena ekor, kemudian tikus tersebut dimasukkan kedalam *metabolic cage*. Setelah selang waktu tertentu, urin ditampung dengan tabung reaksi yang sudah ditimbang dan aktivitas setiap tabung reaksi dicacah dengan alat pencacah gamma *(Gammatec II)*. Persentase aktivitas yang dikeluarkan melalui urin setelah selang waktu tertentu dihitung dibandingkan dengan standar yang telah diketahui cacahannya.

Uji *Clearance* Komplek ^{153}*Gd-DTPA* Lewat *Feces*

Besarnya perubahan aktivitas komplek dalam feces per satuan waktu merupakan laju *clearance*. Penentuan uji *clearance* yang melalui *feces* dari radiofarmaka ^{153}*Gd-DTPA* dilakukan dengan menyuntikkan 0,2 mL komplek dengan aktivitas 200 μCi kepada tikus secara intra vena melalui vena ekor, kemudian tikus tersebut dimasukkan ke dalam *metabolic cage*. Setelah selang waktu tertentu, *feces* ditampung dengan tabung reaksi yang sudah ditimbang dan aktivitas setiap tabung dicacah, kemudian dihitung persentase aktivitasnya dibandingkan dengan standar yang telah diketahui cacahannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

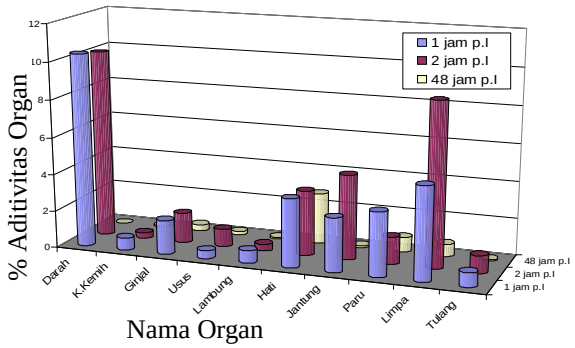
Pemakaian senyawa *Gd-DTPA* sebagai kontras dalam teknik *MRI* sangat umum digunakan, karena senyawa ini terkenal aman dan menghasilkan efek samping yang minimal dibanding dengan senyawa kontras lain. *Gadolinium* dalam sistem berkala termasuk dalam golongan unsur tanah jarang dengan nomor atom 64, mempunyai 30 isotop tetapi hanya 7 yang stabil ditemukan di alam dan unsur ini mempunyai 2 elektron pada kulit terluarnya. *Gadolinium* merupakan unsur paramagnetik yang memiliki 7 elektron yang tidak berpasangan di kulit f sehingga dapat digunakan sebagai senyawa kontras yang baik. Radioisotop *Gadolinium* dalam bentuk ion Gd^{3+} merupakan unsur yang toksis [6,7] sehingga dalam penelitian ini selain melihat karakteristik komplek *Gd-DTPA* dalam hewan percobaan terutama mengenai biodistribusi dan ekskresinya, juga dilihat karakteristik radionuklida Gd^{3+} dalam tubuh hewan percobaan.

Pengujian lipofilisitas Gd^{3+} dan kompleks Gd-DTPA dilakukan dengan menentukan koefisien distribusi sediaan dalam campuran oktanol/air. Hasil penentuan menunjukkan bahwa koefisien distribusi atau log $P_{o/w}$ Gd^{3+} dan *Gd-DTPA* masing-masing adalah -1,1135 dan -1,1245. Rendahnya lipofilisitas Gd^{3+} dan komplek *Gd-DTPA* menunjukkan bahwa senyawa sulit larut dalam lemak atau pelarut non polar, tetapi mudah sekali larut dalam air (*hidrofil*), karena itu *clearance* cenderung ke sistem renal.

Hasil pengujian biodistribusi radionuklida Gd^{3+} dan komplek *Gd-DTPA* ditunjukkan pada Tabel 1 dan Gambar 1 serta Gambar 2. Pengujian biodistribusi radionuklida ^{153}*Gd* dan komplek ^{153}*Gd-DTPA* dilakukan menggunakan hewan mencit putih dengan berat 25 g hingga 35 g. Organ dan jaringan yang diambil adalah darah, ginjal, paru, limpa, usus, lambung, hati, tulang, jantung dan otot.

Tabel 1. Hasil uji biodistribusi Gd^{3+} dan komplek *Gd-DTPA* pada mencit 1 jam, 2 jam dan 48 jam setelah penyuntikan (p.i. = *post injection).*

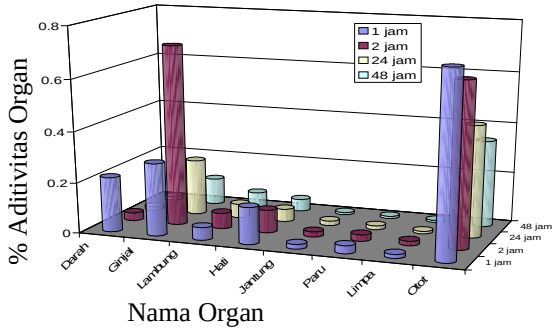
Nama Organ	% aktivitas/organ					
	1 Jam p.i.		2 Jam p.i.		48 Jam p.i.	
	Gd	Gd-DTPA	Gd	Gd-DTPA	Gd	Gd-DTPA
Darah	8,19	0,11	4,36	0,01	0,01	0,00
Ginjal	3,04	0,74	1,35	0,78	0,36	0,13
Usus	0,31	0,05	0,24	0,05	0,19	0,01
Lambung	1,03	0,07	0,24	0,10	0,09	0,08
Hati	19,9	0,07	10,8	0,08	2,78	0,02
Jantung	2,55	0,05	1,14	0,02	0,12	0,01
Paru	22,1	0,09	8,26	0,04	0,80	0,01
Limpa	25,8	0,06	22,5	0,02	0,67	0,03
Tulang	1,41	0,07	1,62	0,04	0,07	0,03
Otot	0,27	0,04	0,35	0,09	0,07	0,02



Gambar 1. Biodistribusi radionuklida ^{153}Gd dalam hewan mencit pada 1 jam, 2 jam, 24 jam dan 48 jam setelah penyuntikan (p.i.= *post injection*).

Gadolinium (III) alam hewan mencit terakumulasi pada organ organ jantung, hati, paru dan limpa. Bila dilihat dari tempat terjadinya penimbunan radioaktivitas tersebut, menunjukkan adanya bentuk partikel dari ^{153}*Gd* meskipun sediaan yang disuntikkan berbentuk larutan jernih yang terlebih dahulu telah disaring dengan penyaring 0,22 μm. Dari hasil percobaan secara *in vitro* dengan melihat perubahan pH larutan $GdCl_3$ pada pH diatas 5 akan terjadi endapan putih yang akan larut kembali bila pH diturunkan lebih kecil dari 5. Dari hasil percobaan tersebut setelah penyuntikan (pH 4) dalam darah pH larutan akan naik karena pengaruh pH tubuh

Edisi Khusus Oktober 2007, hal : 191 - 195
ISSN : 1411-1098

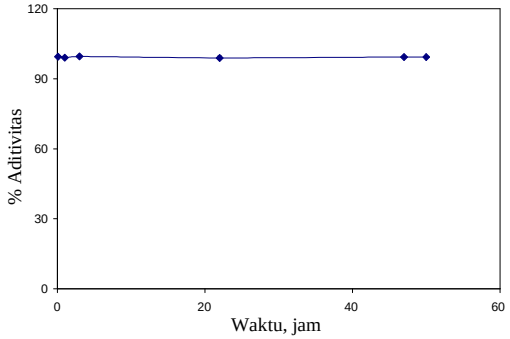


Gambar 2. Biodistribusi ^{153}*Gd-DTPA* dalam hewan mencit pada 1 jam, 2 jam, 24 jam dan 48 jam setelah Penyuntikan (p.i. = *post injection).*

(~ 7,4) dan dengan naiknya pH larutan kemungkinan terbentuknya endapan besar sekali, sehingga akan terjadi penimbunan pada organ hati, jantung, paru dan limpa.

Pada komplek ^{153}*Gd-DTPA* 1 jam setelah penyuntikan, akumulasi komplek masih agak tinggi pada darah dan ginjal, menunjukkan sediaan tersebut sebagian masih terdapat dalam darah dan sebagian lagi sudah mengalami ekskresi lewat ginjal. Konsentrasi ^{153}*Gd-DTPA* pada 2 jam dan 48 jam setelah penyuntikan dalam organ lain termasuk darah sudah sangat kecil sekali (< 0,1 %), konsentrasi yang terlihat agak tinggi pada ginjal menunjukkan bahwa masih terjadi ekskresi dari komplek ^{153}*Gd-DTPA*. Pada 48 jam setelah penyuntikan dari data *eksresi* lewat ginjal masih sekitar 1 % yang dikeluarkan lewat urin dan 0,2 % lewat *feces*.

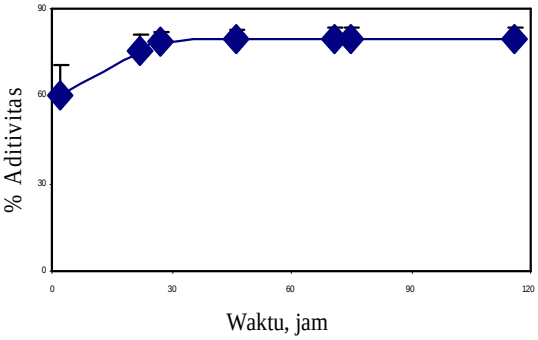
Ion-ion logam paramagnetik termasuk juga ion Gd^{3+} bersifat toksis bila diberikan secara langsung sehingga untuk meminimalisai toksisitasnya dibuat dalam bentuk komplek dengan ligan *(EDTA, DTPA, DOTA, TETA)* atau disalut dengan polimer seperti misalnya dengan dextran dan *arabino-galactan*. Untuk melihat stabilitas komplek ^{153}*Gd-DTPA* dalam tubuh manusia terutama dalam aliran darah, perlu dilakukan uji stabilitas komplek tersebut secara *in vitro* dengan menggunakan serum darah manusia dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3.



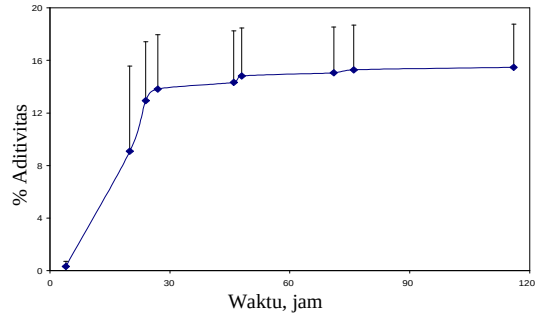
Gambar 3. Hasil uji stabilitas komplek ^{153}*Gd-DTPA* dalam serum darah manusia.

Parameter yang digunakan dalam pengujian stabilitas ini adalah kemurnian radiokimia sampai dengan 50 jam setelah pencampuran dengan serum darah, kemurnian komplek masih di atas 95 % sebagai ^{153}*Gd-DTPA*. Hal ini menunjukkan bahwa komplek tersebut stabil dalam dalam darah dalam tubuh manusia dan ini menunjukkan bahwa sediaan tersebut sangat aman karena tidak terurai menjadia ion $^{153}Gd^{3+}$ yang bersifat toksis.

Jalur *ekskresi* komplek ^{153}Gd-DTPA diamati dalam hewan tikus putih menggunakan alat *metabolic cage*. Hasil laju *ekskresi* komplek ^{153}Gd-DTPA dalam urin dan *feces* bisa dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5.



Gambar 4. Laju ekskresi komplek ^{153}*Gd-DTPA* pada urin tikus putih menggunakan alat *metabolic cage.*



Gambar 5. Laju ekskresi komplek ^{153}*Gd-DTPA* pada *feces* tikus putih menggunakan alat *metabolic cage.*

Pengamatan laju *ekskresi* sediaan ^{153}*Gd-DTPA* dilakukan selama 116 jam dengan cara menampung urin dan *feces* yang keluar setelah waktu tertentu. Pada 2 jam setelah penyuntikan sekitar 60,5 % komplek sudah diekskresikan lewat urin dan *feces* (urin = 60,2 % dan *feces* = 0,3 %). Ekskresi pada 48 jam setelah penyuntikan menunjukkan bahwa sekitar 94,5 % komplek ^{153}*Gd-DTPA* sudah diekskresikan baik lewat ginjal/urin (79, 4 %) maupun lewat *feces* (15,1 %) dan dari data hasil biodistribusi pada Tabel 1 ditunjukkan bahwa sampai dengan 48 jam setelah penyuntikan akumulasi pada ginjal dan lambung masih lebih tinggi dibanding organ lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa ekskresi pada ke 2 organ tersebut masih terjadi. Gambar 5 laju ekskresi komplek ^{153}*Gd-DTPA* pada *feces* tikus putih menggunakan alat *metabolic cage.*

Hasil pengamatan biodistribusi maupun *clearance* dari komplek ^{153}Gd-DTPA menunjukkan bahwa ekskresi komplek tersebut melalui ginjal dan *feces*, penimbunan aktivitas pada organ lainnya sangat kecil dan ekskresi pada 116 jam setelah penyuntikan tidak terlalu berbeda dengan ekskresi pada 48 jam setelah penyuntikan.

KESIMPULAN

Telah dilakukan pengujian pra klinik dari sediaan ^{153}*Gd-DTPA* yang meliputi uji biodistribusi, lipofilisitas, stabilitas dalam serum darah dan *clearance* dengan menggunakan hewan percobaan. Hasil biodistribusi menunjukkan bahwa sediaan ^{153}*Gd-DTPA* yang masih terdapat dalam tubuh hewan tikus putih sangat kecil sekali yaitu sekitar 4 % dan sisanya (96 %) diekskresikan melalui urin dan *feces*. Data hasil uji *clearance* menunjukkan bahwa sampai dengan 48 jam setelah penyuntikan sekitar 94,5 % ^{153}*Gd-DTPA* dikeluarkan dari tubuh tikus. SejumLah kecil yang masih tersisa (~ 4 %) diduga bukan merupakan bentuk komplek ^{153}*Gd-DTPA* dan untuk mengetahui lebih jauh perlu dilakukan penelitian tersendiri.

DAFTAR ACUAN

[1]. VOLKOV A., *Contrast Agent in MRI*, http://www.cc.utah.edu/~avba51/mrl.html

[2]. LOWE M., *Contrast Agent for MRI*, http://www.le.ac.uk/chemistry/research/ chrimpl10.html

[3]. *MRI Contrast Agent*, http://www.macrocyclics.com/dar/MRI-Contrast.Agent/html

[4]. GRIES, HEINZ; ROSENBERG, DOUWE; WEINMANN, HANNS-JOACHIM, *Diagnostic Media*,United States Patent 4647447, http://www.freepatentsonline.com/4647447.html

[6]. MEADE; THOMAS J., *Magnetic Resonance Imaging Agents for the Delivery of Therapeutic Agents*, United States Patent 6713046, http://www.freepatentsonline.com/6713046.html

[7]. CACHERIS, WILLIAM P.; QUAY, STEPHEN C., *Heterocyclic Derivatives of DTPA Used for Magnetic Resonance Imaging*, United States Patent 5087440, http://www.freepatentsonline.com/5087440.html

[8]. RANNEY; DAVID F., *Physically and Chemically Stabilized Polyatomic Clusters for Magnetic Resonance Image and Spectral Enhancement*, United States Patent 5, 213, 788, http://www.freepatentsonline.com/5,213,788.html