

Доклиническая оценка терапевтического потенциала радиофармацевтического лекарственного препарата на основе микросфер альбумина 5–10 мкм с рением-188

А.В. Зверев¹, к.б.н. О.Е. Клементьева², М.В. Жукова², А.С. Красноперова²

¹ Завод «Медрадиопрепарат» – филиал ФГУП «Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России, Москва

² ФГБУ «ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, Москва

РЕЗЮМЕ

Ревматоидное поражение суставов зачастую сопровождается болями, ограничением подвижности и ведет к постепенному разрушению сустава. Методом выбора в лечении этого заболевания в настоящее время признается радионуклидная терапия суставов (радиосиновэктомия).

Материал и методы: исследование выполнено на крысах линии Wistar и кроликах породы шиншилла, которым было проведено моделирование острого асептического синовита коленного сустава. Для выполнения процедуры радиосиновэктомии внутрисуставно вводили суспензию на основе микросфер альбумина 5–10 мкм, меченных рением-188 (МСА 5–10 мкм, ¹⁸⁸Re).

Результаты исследования: данные, полученные при исследованиях крыс, демонстрируют достоверные различия в значениях, полученных для правой задней лапы у животных с моделью патологии, и контрольных животных, а также между группами леченных и нелеченных животных. Отмечается увеличение доли опорной функции пораженной конечности у животных, получавших лечение радиофармпрепаратом, до результатов, достоверно не отличающихся от контрольных цифр на 7-е сут наблюдения. В первые 2 сут уровень боли у леченных и нелеченных кроликов был одинаковым, наблюдалась хромота опорного типа, практически отсутствовала опора на больную лапу. На 4-е сут при пальпации и сгибании конечности кролики, которым внутрисуставно вводили препарат, не выказывали болевой реакции. Хромота опорного типа была практически не выражена. На 7-е сут у кроликов, получавших лечение, при пальпации не отмечалось ни хромоты, ни признаков болезненности.

Выводы: исследования терапевтического потенциала МСА 5–10 мкм, ¹⁸⁸Re, выполненные на двух видах лабораторных животных с острым асептическим синовитом коленного сустава, показали эффективность его внутрисуставного введения по критериям снижения болевой чувствительности пораженной конечности у крыс и положительной динамики восстановления двигательной активности у кроликов.

Ключевые слова: сустав, воспаление, радиосиновэктомия, радиофармацевтический препарат, рений-188.

Для цитирования: Зверев А.В., Клементьева О.Е., Жукова М.В., Красноперова А.С. Доклиническая оценка терапевтического потенциала радиофармацевтического лекарственного препарата на основе микросфер альбумина 5–10 мкм с рением-188 // РМЖ. 2018. № 10. С. 1–№.

ABSTRACT

Preclinical evaluation of the therapeutic potential of a radiopharmaceutical drug based on 5-10 micron albumin microspheres with rhenium-188

Zverev A.V.¹, Klementieva O.E.², Zhukova M.V.², Krasnoperova A.S.²

¹ Plant "Medradiopreparat", a branch of the "Federal Center for Design and Development of Nuclear Medicine Facilities" of FMBA of Russia, Moscow

² Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of FMBA of Russia, Moscow

The rheumatoid disease of joints is often accompanied by pain, limited mobility and leads to a gradual destruction of the joint. Currently, the method of choice in the treatment of this disease is a radionuclide therapy of joints (radiosynovectomy).

Patients and Methods: the study was performed on Wistar rats and chinchilla rabbits, in which an acute aseptic synovitis of the knee joint was simulated. A suspension based on 5-10 micron albumin microspheres labeled with rhenium-188 (MSA 5–10 micron, ¹⁸⁸Re) was intraarticularly introduced to perform the radiosynovectomy.

Results: the data obtained in the studies of rats show significant differences in the values obtained for the right hind paw in animals with a model of pathology and control animals, as well as between groups of treated and untreated animals. There is an increase in the proportion of the supporting function of the affected limb in animals treated with a radiopharmaceutical to the results that are not significantly different from the control figures on the seventh day of observation. In the first two days the level of pain in the treated and untreated rabbits was the same, lameness of the supporting type was observed, there was

practically no support for the diseased paw. On the fourth day, the rabbits, which recieved the intraarticularly injected drug, did not show a pain reaction during palpation and flexion of the limb. Lameness of the supporting type was practically not expressed. On the seventh day, the treated rabbits did not have lameness or signs of pain during palpation.

Conclusions: *studies of the therapeutic potential of MCA 5–10 micron, ¹⁸⁸Re performed on two types of laboratory animals with acute aseptic synovitis of the knee joint showed the effectiveness of its intraarticular administration according to the criteria for reducing the pain sensitivity of the affected limb in rats and the positive dynamics of restoring motor activity in rabbits.*

Key words: *joint, inflammation, radiosynovectomy, radiopharmaceutical, rhenium-188.*

For citation: *Zverev A.V., Klementieva O.E., Zhukova M.V., Krasnoperova A.S. Preclinical evaluation of the therapeutic potential of a radiopharmaceutical drug based on 5-10 micron albumin microspheres with rhenium-188 //RMJ. 2018. № 10. P. 2–№.*

ВВЕДЕНИЕ

Основными заболеваниями, связанными с гипертрофией (увеличением объема и массы) синовиальных клеток являются синовит, ревматоидный артрит, гемофилический артрит и, в некоторых случаях, травматическое заболевание сустава [1, 2]. Воспаление приводит к росту числа макрофагов, увеличению продукции синовиальной жидкости, избыточному высвобождению активных молекул, усиливающих воспаление и создающих так называемый порочный круг. Эти изменения сопровождаются болями, ограничением подвижности и ведут к постепенному разрушению сустава [3]. На поздних стадиях в патогенезе суставных патологий преобладают процессы, обусловленные соматической мутацией синовиальных фибробластов и дефектами апоптоза. Вследствие этого клетки-мишени начинают терять способность отвечать на регулирующие противовоспалительные стимулы и приобретают устойчивость к фармакологическим воздействиям. Поэтому обычные методы лечения – фармакологическая терапия и хирургическая операция – часто не позволяют справиться с болезнью, и существует высокая вероятность рецидива спустя 3–5 лет [2]. Поэтому в настоящее время в мире радионуклидная терапия суставов (радиосиновэктомия) признается методом выбора в лечении ревматоидного поражения суставов. Данный метод лечения по эффективности сопоставим с хирургическим (72,6% и 75,2% положительных результатов соответственно). Основными достоинствами радиосиновэктомии являются ее минимальная травматичность, относительная простота исполнения, не требующая сложных и длительных послеоперационных реабилитационных ме-

роприятий. Также следует отметить, что хрящевая ткань относительно радиационно устойчива, поэтому радиоактивное вещество с эффективным проникающим воздействием сквозь мягкие ткани можно вводить непосредственно в сустав, не оказывая вредного воздействия на здоровые ткани, его окружающие. Все вышеперечисленное позволяет характеризовать процедуру радиосиновэктомии как перспективную альтернативу обычным методам лечения воспалительных заболеваний суставов [2, 4, 5].

Существуют требования к радиофармпрепаратам, используемым для радиосиновэктомии. Размеры меченой частицы должны быть достаточно малы (2–10 мкм), чтобы частица могла быть фагоцитирована макрофагами, но не настолько малы (<2 мкм), чтобы способствовать быстрому биологическому выведению из сустава, приводящему за счет диффузии к «утечке» радионуклида из пораженного сустава в организм в течение первых 12 ч [6].

Для целей радиосиновэктомии используются бета-излучающие радионуклиды. При попадании в полость сустава радионуклиды в форме коллоидов распознаются иммунной системой организма в качестве инородных тел и фагоцитируются внешним клеточным слоем синовиальной оболочки. Вследствие селективного облучения синовиальной оболочки происходят некроз клеток и уменьшение воспаления. Артроскопическое исследование показывает сокращение числа и размера синовиальных ворсинок, а также уменьшение переполненности кровью сосудов оболочки [7]. Далее происходит прогрессирующее уплотнение соединительной ткани синовиальной оболочки, сосудов и редко – повреждение костей сустава [8].



Рис. 1. Внешний вид процедуры исследования на приборе «Тест инвалидности»

Через несколько месяцев отмечается полное предотвращение скопления моноцитов и лимфоцитов в синовиальной оболочке [9]. Дальнейшее разрушение полости сустава не происходит. После замены фиброзной ткани синовиальная оболочка не реагирует на иммунологическую стимуляцию, достигается отсутствие рецидива воспалительного процесса и длительный срок ремиссии. Радиосиноэктомия – это удивительный метод лечения воспалительных заболеваний суставов, широко применяющийся в мире [12]. К сожалению, в настоящее время в России не производится и не ввозятся импортные радиофармацевтические препараты для радиосиноэктомии, что негативным образом влияет на возможности оказания медицинской помощи многим пациентам.

Появление на отечественном рынке генератора $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, который может быть установлен непосредственно в терапевтическом отделении медицинского учреждения и эксплуатироваться в течение нескольких месяцев, диктует возможность его использования для разработки нового радиофармпрепарата для радиосиноэктомии. Период полураспада рения-188 составляет 16,9 ч, средняя энергия испускаемых β -частиц – 776 кэВ ($E_{\text{max}} = 2,11$ МэВ, 79%). Средняя длина пробега частиц в ткани составляет 3,8 мм, максимальное проникновение радионуклида – 11 мм. Это позволяет проводить радиосиноэктомию суставов средних и крупных размеров, таких как голеностопный, коленный, локтевой или тазобедренный [10]. Рений-188 распадается до осмия-188 с испусканием γ -квантов с энергией 155 кэВ (15%), что дает возможность визуализировать локализацию введенного радиофармпрепарата методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), оценивать накопление в ткани и рассчитывать поглощенную дозу, а также проводить дозиметрическое планирование [11].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемый радиофармацевтический лекарственный препарат (РФЛП) представляет собой суспензию на основе микросфер альбумина 5–10 мкм, меченных рением-188 (МСА 5–10 мкм, ^{188}Re) для внутрисуставного введения с целью выполнения процедуры радиосиноэктомии. Для приготовления препарата необходимо получить радиоактивный рений-188 путем элюирования из генератора или заказать активную фармацевтическую субстанцию, производимую промышленным способом. Другой, «холодной» частью препарата является набор реагентов, состоящий из трех флаконов с лиофильно высушенным содержимым. Получение препарата происходит при последовательном перемешивании радиоактивного рения-188 с микросферами альбумина и добавлением вспомогательных веществ. Основным параметром качественного связывания рения-188 и микросфер альбумина является нагревание реакционной смеси при 100° С. Весь процесс занимает не более 2 ч, и стерильный препарат готов для применения.

Изучение терапевтического потенциала выполнено на самках крыс линии Wistar и кроликов породы шиншилла. Исследования выполнены на животных с моделью острой воспалительной патологии суставов, а именно острым асептическим синовитом коленного сустава. Методика моделирования суставной патологии заключается во введении в полость коленного сустава раздражающего вещества, которое нарушает процессы синтеза/резорбции тканей сустава и приводит к выраженным воспалительно-деструктивным изменениям в суставе и параартикулярных тканях. В данном исследовании был использован метод, предложенный В.М. Коваленко с соавт. [13]. В качестве ирританта применялся витамин А в виде 3,44%-ного масляного раствора ретинола ацетата (1 мг ретинола ацетата соответствует 2907 МЕ витамина А) из расчета 8,0–8,5 мг на 1 кг массы тела кролика и 13,5–13,9 мг на 1 кг массы тела крысы. Процесс развития патологии занимал в среднем 7 дней и контролировался ежедневной пальпацией сустава и визуальной оценкой опорной функции пораженной конечности. Для выполнения исследований терапевтического потенциала РФЛП крысам в сустав с модельной патологией вводили 0,05 мл препарата с объемной активностью 70,8 МБк/мл, дозировка для кроликов составила 0,1 мл препарата с объемной активностью 192,0 МБк/мл, т. е. 3,6 и 19,2 МБк на животное соответственно. Критерием терапевтической эффективности являлось уменьшение болевого синдрома. Степень выраженности болевого синдрома у крыс оценивали с помощью прибора «Тест инвалидности» (Panlab Harvard Apparatus, Испания) (рис. 1). Этот тест является основным для изучения болевой чувствительности у грызунов при отсутствии внешнего болевого стимула, например, при воспалении или повреждении нервов

Радиофармацевтический лекарственный препарат «МСА 5-10 мкм, ^{188}Re » для терапии воспалительных заболеваний синовиальной оболочки.

Простота приготовления позволяет получать РФЛП в медицинских учреждениях непосредственно перед инъекцией пациенту.

РАДИО СИНОВЭКТОМИЯ

НЕХИРУРГИЧЕСКИЙ МЕТОД МЕСТНОГО ЛЕЧЕНИЯ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СУСТАВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

- воздействие ионизирующего излучения на синовиальную пролиферацию,
- образование фиброзного уплотнения,
- уменьшение воспалений в суставе,
- снижение болевого синдрома и улучшение двигательных функций сустава.



ПРИМЕНЕНИЕ:

- ревматоидный артрит;
- гемартроз при гемофилии;
- пигментный виллонодулярный синовит;
- остеоартроз;
- недифференцированные артриты.

ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНСКОМ УЧРЕЖДЕНИИ.
Предназначен для специалистов.
Имеются противопоказания.
Необходимо проконсультироваться со специалистом.

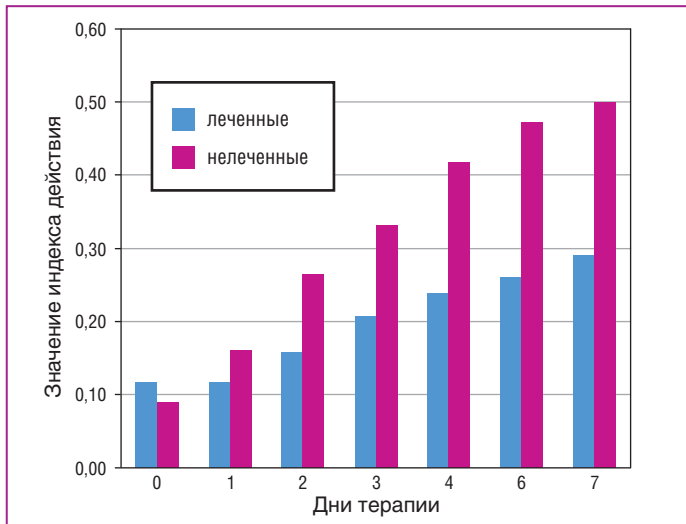


Рис. 2. Динамика изменения значения индекса действия РФЛП МСА 5–10 мкм, ^{188}Re у крыс

одной из задних лап. Тестер инвалидности имеет два датчика веса и позволяет дать количественную оценку спонтанных изменений положения тела животного, отражающих степень испытываемой боли, путем измерения веса, который животное переносит на каждую из задних лап.

Всех крыс, включенных в эксперимент, в течение 1 нед., предшествовавшей моделированию патологии, подвергали тренировке. Для этого ежедневно каждое животное помещали в прибор на 5–10 мин. Данная манипуляция выполнялась с целью минимизации вероятности получения артефактных результатов, вызванной повышенной тревожностью животного, оказавшегося в непривычной для него обстановке.

Измерение проводили в режиме реального времени в течение 10 с, после чего оно автоматически останавливалось. Во время проведения исследования на дисплее устройства выдаются графики, отображающие величину приложенного веса для каждого датчика. Устройство вычисляет средний вес, приложенный на левый и правый датчики в течение выбранного периода измерения. После этого данные с устройства передаются в компьютер в виде числовых значений.

По результатам измерений рассчитывали индекс действия (ИД) РФЛП, значение которого отражает долю участия пораженной конечности в реализации опорной функции по формуле:

$$\text{ИД} = \frac{\Pi_{\text{пр}}}{\Pi_{\text{пр}} + \Pi_{\text{лев}}},$$

где:

$\Pi_{\text{пр}}$ – показатель (средний вес, приложенный на датчики прибора, г) правой лапы с моделью патологии;

$\Pi_{\text{лев}}$ – показатель (средний вес, приложенный на датчики прибора, г) левой лапы, интактной у всех групп животных.

Степень выраженности болевого синдрома у кроликов определяли по результатам исследования свободной пробежки с наблюдением двигательной активности, интенсивности движений конечностью с воспаленным суставом, пробегаемой дистанции на протяжении 7 дней после введения препарата. Исследование двигательной активности выполняли путем наблюдения за свободными передвижениями животных на протяжении 30 мин.

Таблица 1. Дистанция свободной пробежки животных и кратность пробежек за 30 минут наблюдения

День после введения РФЛП	Леченные		Нелеченные	
	Кол-во пробежек	Дистанция пробега, м	Кол-во пробежек	Дистанция пробега, м
0 (непосредственно перед введением РФЛП)	0,33±0,58	0,03±0,06	1,00±1,00	0,13±0,13
1	1,33±0,58	0,40±0,22	0,67±0,58	0,08±0,08
2	2,00±0,01	0,87±0,30	1,33±0,58	0,38±0,13
3	4,00±1,00	1,33±0,74	1,33±0,58	0,38±0,08
4	4,67±1,53	2,20±0,46	2,33±0,58	0,82±0,28
6	7,33±2,08	4,77±1,38	3,33±0,58	1,63±0,34
7	8,33±1,53	7,13±1,11	4,00±1,00	2,47±0,85

За этот период времени регистрировали количество пробежек (серий непрерывных прыжков) и дистанцию, преодоленную за каждую пробежку, с дискретностью 0,05 м. Также ежедневно проводили пальпацию области воспаления с наблюдением за ответной реакцией животного. Наблюдение за животными осуществляли на протяжении 7 дней после инъекции (кроме 5-го дня, который пришелся на воскресенье), что соответствует ~10 периодам полураспада радионуклида.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, полученные при исследованиях крыс, демонстрируют достоверные различия в значениях, полученных для правой задней лапы у животных с моделью патологии и контрольных животных, а также между группами леченных и нелеченных животных (рис. 2). Отметим, что в норме животное опирается на обе конечности с примерно одинаковой силой, т. е. значение ИД у здорового животного должно быть примерно равно 0,50.

Полученные результаты наглядно демонстрируют увеличение доли опорной функции пораженной конечности у животных, получавших лечение РФЛП, от практически полного отказа от пользования лапой до введения РФЛП до результатов, достоверно не отличающихся от контрольных цифр на 7-е сут наблюдения. В группе нелеченных животных нарушенная функция полностью не восстанавливалась.

Изучение терапевтического действия РФЛП у кроликов также показало достоверный эффект обезболивания. В течение 7 дней после введения РФЛП у животных пальпаторно оценивали степень выраженности болевой реакции и интенсивность хромоты. В первые 2 сут уровень боли у леченных и нелеченных кроликов был одинаковым, наблюдалась хромота опорного типа с ярко выраженным укорочением шага в заднем отрезке и практически отсутствующей опорой на больную лапу. На 4-е сут при пальпации и сгибании тазовой конечности в коленном суставе кролики, которым внутрисуставно вводили препарат, не выказывали болевой реакции. Хромота опорного типа была практически не выражена, животные практически полноценно опирались на пораженную конечность. Кролики, не получавшие лечения, выдавали

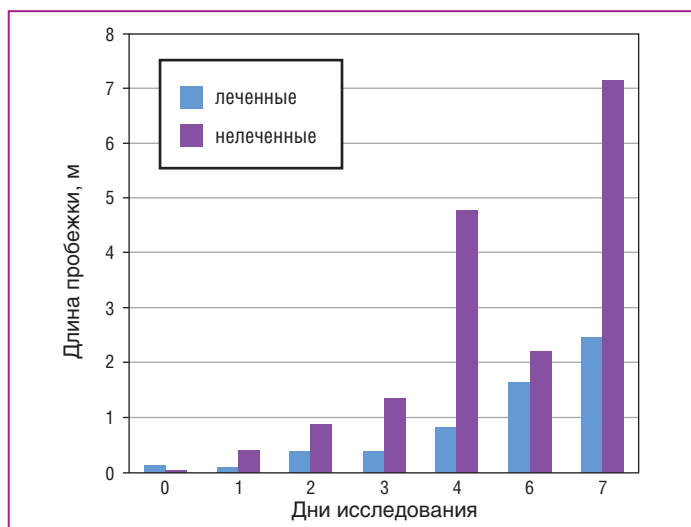


Рис. 3. Динамика изменения средней длины пробежки кроликов с моделью острого синовита после внутрисуставного введения РФЛП

сильную болевую реакцию на пальпацию пораженного сустава, опоры на больную конечность практически не было, шаг в заднем отрезке был укорочен. На 7-е сут у кроликов, получавших лечение, при пальпации не отмечалось признаков болезненности вообще, хромота также не отмечалась. У кроликов, не получавших лечение, болевая реакция при пальпаторном исследовании сустава продолжала проявляться, хотя и с существенно меньшей интенсивностью. Также животные начали использовать пораженную конечность для осуществления опорной функции, однако доля ее участия была существенно снижена, т. к. кролики продолжали ее беречь. Обобщенная по группам характеристика двигательной активности животных, отражающая средние значения количества пробежек и пройденную дистанцию, показана в таблице 1.

По результатам, изложенным в таблице 1, была вычислена средняя длина одной пробежки для животных каждой группы. Полученные результаты отражены графически на рисунке 3.

Представленные данные наглядно демонстрируют прогрессирующее улучшение двигательной активности леченных животных по сравнению с группой не получавших лечения. Характерно увеличение не только количества пробежек и преодолеваемой дистанции, но и длины одной пробежки, что говорит о существенном улучшении самочувствия животных.

Выводы

Исследования терапевтического потенциала РФЛП МСА 5–10 мкм, ^{188}Re , выполненные на двух видах лабораторных животных с острым асептическим синовитом коленного сустава, показали эффективность его внутрисуставного введения по критериям снижения болевой чувствительности пораженной конечности у крыс и положительной динамики восстановления двигательной активности у кроликов.

Литература

1. Chinol M., Vallabhajosula S., Goldsmith S.J. et al. Chemistry and biological behavior of Samarium-153 and Rhenium-186-labeled hydroxyapatite particles: potential radiopharmaceuticals for radiation synovectomy // *J Nucl Med.* 1993. Vol. 34(9). P. 1536–1542.

- Shortkroff S., Sledge C.B. Radiation synovectomy. In *Principles of Nuclear Medicine*. 2nd edition/ Edited by Wagner H.N. Jr., Szabo Z., Buchanan J.W. Philadelphia: WB Saunders Co, 1995. P. 1021–1028.
- Liepe K., Крылов В.В. Радиосиновиортез в лечении воспалительных заболеваний суставов // *Научно-практическая ревматология*. 2013. Т. 51(6). С. 714–720 [Liepe K., Krylov V.V. Radiosynoviortez v lechenii vospalitel'nykh zabolevaniy sustavov // *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2013. T. 51(6). S. 714–720 (in Russian)].
- Harbert J.C. Radiocolloid therapy in joint disease In: *Nuclear medicine therapy* / Edited by: Harbert J.C. New York: Thieme Medical, 1987. P. 169–186.
- Doherty M. Potential rheumatologic applications of intra-articular radiocolloid therapy // *Geriatric Medicine Today*. 1984. Vol. 3. P. 31–42.
- Noble J., Jones A.G., Davies M.A. et al. Leakage of radioactive practice system from synovial joint studied with a gamma camera; its application to radiation synovectomy // *J Bone Joint Surg Am.* 1983. Vol. 65(3). P. 381–389.
- Wang S.J., Lin W.Y., Chen M.N. et al. Histologic study of effects of radiation synovectomy with Rhenium-188 microsphere // *Nucl Med Biol.* 2001. Vol. 28(6) P. 727–732.
- Mohr W., Mohing W., Hersener J. Morphological changes in the articular capsule tissue after preliminary synoviorthesis // *Z Rheumatol.* 1977. Vol. 36(9–10). P. 316–331.
- Menkes C.J. Gelenkverödung mittels radioaktiver Isotope bei rheumatoider Arthritis // *Therapiewoche*. 1979. Vol. 29. P. 498–501.
- Shamim S.A., Kumar R., Halanaik D. et al. Role of rhenium-188 tin colloid radiosynovectomy in patients with inflammatory knee joint conditions refractory to conventional therapy // *Nucl Med Commun.* 2010. Vol. 31(9). P. 814–820.
- Kamaleshwaran K.K., Gounder T.S., Krishnan B. et al. Radiosynovectomy of ankle joint synovitis in juvenile rheumatoid arthritis treated with rhenium-188 tin colloid and imaging with SPECT/CT // *Egypt Rheumatol Rehabil.* 2015. Vol. 42. P. 159–161.
- Clunie G., Fischer M.; EANM. EANM Procedure Guidelines for Radiosynovectomy // *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003. Vol. 30(3). P. 12–16.
- Коваленко В.М., Вікторов О.П., Корж М.О. и др. Спосіб моделювання остеоартрозу з синовіітом / Патент 79206. Україна, МПК8 G 09 В 23/28, заявник і патентовласник Інститут кардіології ім. акад. М.Д. Стражеска АМН України. № 200510418. Заявл. 4.11.2005. Опубл. 25.05.2007. Бюл. № 7 [Kovalenko V.M., Viktorov O.P., Korzh M.O. y dr. Sposib modelyuvannya osteoartrozu z synoviyitom / Patent 79206. Ukrayina, MPK8 G 09 V 23/28, zayavnyk i patentovlasnyk Instytut kardiologiyi im. akad. M.D. Strazheska AMN Ukrayiny. № 200510418. Zayavl. 4.11.2005. Opubl. 25.05.2007. Byul. № 7 (in Ukrainian)].