

ФАРМАКОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ДИИНДОЛИЛМЕТАНА В ПОДАВЛЕНИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

В.И. Киселев, В.М. Друх, О.И. Пчелинцева

Институт медико-биологических проблем
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, Россия, 117198

И.Н. Кузнецов

Кафедра клинической лабораторной диагностики
Московский государственный медико-стоматологический
университет им. А.И. Евдокимова
ул. Десятская, 20-1, Москва, Россия, 127473

Е.Л. Муйжнек

Закрытое акционерное общество «МираксБиоФарма»
Кутузовский пр-т, 12-2, Москва, Россия, 121248

Е.А. Горбунова

Отделение ГОВЛ
Научный центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. академика В.И. Кулакова
ул. Академика Опарина, 4, Москва, Россия, 117997

Проведено исследование противоопухолевой эффективности новой фармацевтической композиции на основе дииндолилметана (ДИМ) с улучшенной биодоступностью в модели *in vitro*. Цитотоксическая активность тестируемой субстанции была исследована с помощью МТТ-теста. Показано, что исследуемая фармацевтическая композиция ДИМ подавляет рост опухолевых клеток линий рака эндометрия CRL-1622 ($IC_{50} = 41,9$ мкМ) и НТВ-113 ($IC_{50} = 52,2$ мкМ). Результаты исследования позволяют обосновать проведение дальнейших исследований противоопухолевой эффективности *in vivo*.

Ключевые слова: 3,3'-дииндолилметан (ДИМ), противоопухолевая активность, апоптоз, рак эндометрия.

Интерес к изучению терапевтических свойств 3,3'-дииндолилметана (ДИМ) весьма высок ввиду его доказанных противоопухолевых свойств и низкой токсичности. В частности, многими исследователями показано, что дииндолилметан является индуктором апоптоза в опухолевых клетках [1—3]. Проапоптотическое

действие реализуется благодаря различным молекулярным механизмам: ингибирование генов, опосредующих антиапоптотические клеточные события, индукция апоптотических генов, ингибирование белков клеточного цикла [5; 7; 8].

Сложности при работе с активной субстанцией DIM возникают из-за ее нестабильности, а также низкой проницаемости через мембранные барьеры, в связи с чем ведется работа по созданию лекарственной формы, удобной для применения и обладающей высокой биодоступностью.

Нами была разработана новая фармацевтическая композиция дииндолилметана, состоящая из активного вещества и вспомогательного компонента — плуроника (Лутрол F127) [4]. Благодаря предложенной высушенной форме композиций мицеллярных наночастиц (средний диаметр 60 нм), состоящих из дииндолилметана и покрывающих его блок-сополимеров оксиэтилена и оксипропилена, известных под названием «Плуроник» или «Полоксамер», была значительно улучшена степень проникновения формуляции в клетки, а также ее стабильность.

Целью работы являлось изучение цитотоксической активности новой формуляции дииндолилметана в опытах *in vitro* на культивируемых клетках рака эндометрия человека.

Материалы и методы. Реактивы. Фармацевтическая композиция на основе 3,3'-дииндолилметана была получена от ЗАО «МираксБиоФарма». Растворы тестируемой субстанции готовили непосредственно перед экспериментом. Для этого субстанцию растворяли в водноспиртовом растворе, содержащем 20% этанола, так, чтобы конечная концентрация 3,3'-дииндолилметана находилась в диапазоне 10—100 мкМ.

Культивирование клеток. Штаммы опухолевых клеток рака эндометрия CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B) были получены из НИИ онкологии имени проф. Попова, г. Санкт-Петербург. Культивирование клеток производили во влажной атмосфере (5% CO₂, 37 °С), при использовании для поддержания клеточной линии CRL-1622 среду DMEM: F12, и EMEM с добавлением 10% FBS для клеточной линии НТВ-113. Клетки культивировались с обновлением среды каждые 3 дня.

Определение противоопухолевой активности. Клеточные культуры были засеяны по 96-ти луночным планшетах в концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток на мл. После достижения клетками монослоя ростовая среда была заменена на среду, содержащую различные концентрации исследуемой формуляции. В качестве контроля использовали обычную ростовую среду.

Выживаемость опухолевых клеток после инкубации с препаратом оценивают с помощью МТТ-теста. Для этого за 2—4 часа до окончания инкубации в каждую лунку добавляют по 50 мкл (1 мг/мл) раствора МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]2,5-дифенилтетразолия бромид) в культуральной среде. После развития окраски среду удаляют, кристаллы формазана растворяют в 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и измеряют интенсивность окраски по поглощению при 540 нм на многоканальном спектрофотометре.

Выживаемость клеток оценивают в процентах от соответствующего контроля и выражают как среднее \pm стандартное математическое отклонение пяти независимых экспериментов. В каждом эксперименте одна экспериментальная точка

представляет собой среднее из 5-ти параллельных измерений. Величину IC50 определяют по графику зависимости остаточной выживаемости клеток (процент живых клеток относительно контроля) от концентрации DIM. Для исключения влияния цитотоксического воздействия препарата на клеточные линии в аликвотах внеклеточной жидкости определяют степень некроза клеток по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Статистическая обработка. Полученные экспериментальные данные были обработаны статистически с помощью пакета Systatw 5. Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение, стандартное отклонение. Сравнение между группами проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты. В ходе проведенного эксперимента были получены экспериментальные значения выживаемости опухолевых клеток, выражаемые в % от контроля в зависимости от концентрации изучаемой формуляции.

Инкубация клеток линии CRL-1622 с возрастающими концентрациями исследуемой формуляции DIM вызвала закономерное снижение выживаемости опухолевых клеток (табл. 1).

Таблица 1

Влияние новой фармацевтической композиции DIM на выживаемость опухолевых клеток рака эндометрия человека CRL-1622 (KLE)

Показатель	Концентрация изучаемой формуляции DIM (M ± s), мкМ			
	10	25	50	100
Выживаемость опухолевых клеток, % от контроля	98 ± 0,5	60 ± 9,1	44 ± 7,3	18 ± 3,6
P (отличие от концентрации в 10 мкМ)	—	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

На основании полученных данных была построена кривая выживаемости опухолевых клеток линии CRL-1622 (рис. 1).

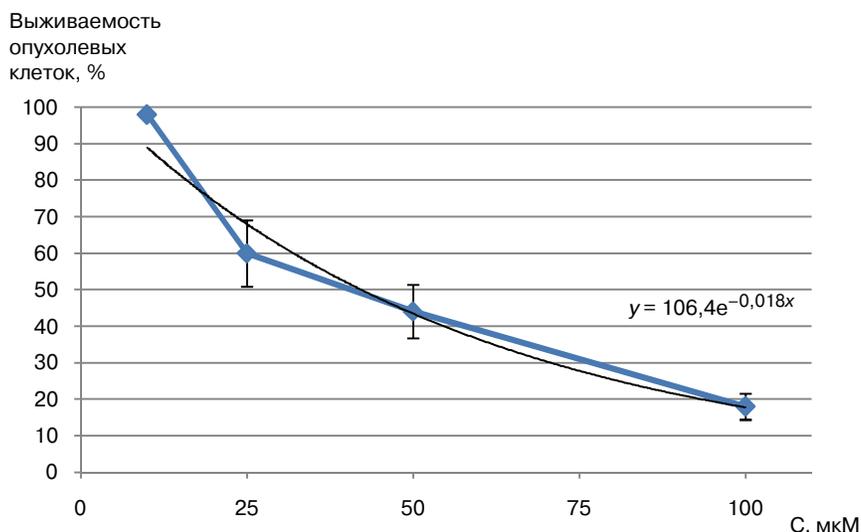


Рис. 1. Влияние новой фармацевтической композиции DIM на выживаемость опухолевых клеток рака эндометрия человека CRL-1622 (KLE)

При помощи экспоненциального регрессионного анализа определена формула для расчета зависимости выживаемости клеток от концентрации исследуемой фармацевтической композиции: $106,4e^{-0,018C}$ (C — концентрация изучаемой формуляции). Таким образом, значение IC_{50} для клеток линии рака эндометрия CRL-1622 (KLE) составило 41,9 мкМ.

Также проводилось исследование цитотоксического воздействия тестируемой фармацевтической композиции на опухолевые клетки рака эндометрия НТВ-113 (HEC-1-B). Для этого инкубировали клетки линии НТВ-113 с соответствующими концентрациями изучаемой формуляции DIM. Регистрировалось дозо-зависимое снижение числа активных жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 2

Влияние новой фармацевтической композиции DIM на выживаемость опухолевых клеток рака эндометрия человека НТВ-113 (HEC-1-B)

Показатель	Концентрация изучаемой формуляции DIM (M ± s), мкМ			
	10	25	50	100
Выживаемость опухолевых клеток, % от контроля	97 ± 0,6	75 ± 10,3	53 ± 6,2	22 ± 5,6
P (отличие от концентрации в 10 мкМ)	—	0,0007	< 0,0001	< 0,0001

На основании представленных в таблице 2 данных также были построены кривые выживаемости (рис. 2).

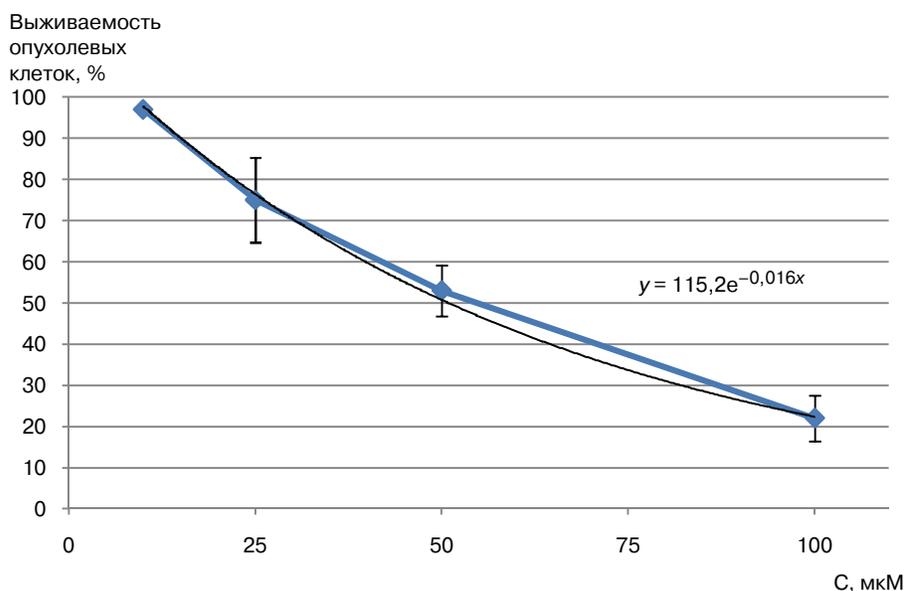


Рис. 2. Влияние новой фармацевтической композиции дииндолилметана на выживаемость опухолевых клеток рака эндометрия человека НТВ-113 (HEC-1-B)

Экспоненциальный регрессионный анализ позволил получить формулу для расчета зависимости выживаемости клеток от концентрации исследуемой фармацевтической композиции. Выживаемость вычисляется по формуле $115,2e^{-0,016C}$ (С — концентрация изучаемой формуляции). Значение IC_{50} для клеток линии рака эндометрия НТВ–113 (НЕС–1-В) на основании полученной формулы составило 52,2 мкМ.

Для определения причины гибели тестовых клеток измерялась активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в аликвотах внеклеточной жидкости. Активность ЛДГ оставалась в пределах нормы во всех экспериментах, что свидетельствует об отсутствии развития некроза, то есть гибель клеток была индуцирована по пути апоптоза.

Обсуждение. В результате проведенного эксперимента было доказано, что исследуемая фармацевтическая композиция 3,3'-дииндолилметана подавляет рост опухолевых клеток линии рака эндометрия CRL–1622 (KLE) и НТВ–113 (НЕС–1-В), причем чувствительность клеточной линий НТВ–113 к цитостатическому действию изучаемой субстанции немного больше, чем чувствительность CRL–1622. Также экспериментально была определена величина IC_{50} для опухолевых клеток линий рака эндометрия НТВ–113 и CRL–1622, которая составила 52,2 и 41,9 мкМ, соответственно.

Противоопухолевое действие может быть связано как с прямым цитотоксическим действием, так и другими механизмами, которые вызывают глубокое структурное изменение злокачественных клеток. При оценке цитотоксического воздействия фармацевтической композиции на основе 3,3'-дииндолилметана не наблюдалось некроза клеток, что указывает на отсутствие прямого цитотоксического эффекта и может являться подтверждением стимуляции апоптоза опухолевых клеток.

В исследовании Chen и др. [1] было показано, что DIM индуцирует апоптоз на различных линиях раковых клеток эндометрия. Авторами были зарегистрированы как ранние, так и поздние апоптотические изменения, а также гибель от 80 до 90% клеток при обработке раковых клеток DIM в концентрации 100 мкМ. Также цитостатические эффекты DIM были показаны на эндометриальных клетках человека Ishikawa [5]. При концентрациях DIM меньше 50 мкМ были отмечены антипролиферативные эффекты в результате ингибирования роста клеток. При использовании же DIM в концентрациях свыше 50 мкМ наблюдалась индукция апоптоза.

Кроме того, было показано, что обработка MDR (multidrug resistance) раковых клеток некоторыми противоопухолевыми формуляциями, содержащими плюроник, существенно усиливает проапоптотический сигналинг и значительно сдерживает противоапоптотические защитные механизмы *in vitro* и *in vivo* непосредственно за счет полимерного компонента [6; 9].

Таким образом, высокая чувствительность раковых клеточных линий эндометрия человека к действующему веществу улучшенной формуляции DIM позво-

ляет обосновать проведение дальнейших доклинических испытаний. Согласно результатам проведенного исследования новой фармацевтической композиции 3,3'-дииндолилметана можно ожидать торможения роста перевиваемых опухолей экспериментальных животных в дальнейших экспериментах *in vivo*.

Научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы были выполнены в ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» в рамках исполнения комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства «Производство лекарственных средств на основе биотехнологий для лечения социально-значимых заболеваний», финансируемого Министерством образования и науки Российской Федерации в соответствии с постановлением Правительства РФ № 218.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Chen D.Z., Qi M., Auborn K.J. et al.* Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV16-Transgenic Preneoplastic Cervical Epithelium // *J. Nutr.* — 2001. — V. 131. — P. 3294—3302.
- [2] *Ge X., Yannai S., Rennert G. et al.* 3,3'-Diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1996. — № 228. — P. 153—158.
- [3] *Hong C., Firestone G.L., Bjeldanes L.F.* Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — V. 63. — № 6. — P. 1085—1097.
- [4] *Kiselev V., Vasilyeva I.* A pharmaceutical composition for peroral administration of diindolylmethane // 2011. — WO2011034465 A1.
- [5] *Leong H., Firestone G.L., Bjeldanes L.F.* Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor- α expression // *Carcinogenesis.* — 2001. — V. 22. — № 11. — P. 1809—1817.
- [6] *Minko T., Batrakova E.V., Li S. et al.* Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells // *J. Control. Release.* — 2005. — V. 105. — P. 269—278.
- [7] *Nachshon-Kedmi M., Yannai S., Fares F.A.* Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC3, by 3,3'-diindolylmethane through the mitochondrial pathway // *Br. J. Cancer.* — 2004. — V. 91. — P. 1358—1363.
- [8] *Vanderlaag K., Samudio I., Burghardt R. et al.* Inhibition of breast cancer cell growth and induction of cell death by 1,1-bis(3'-indolyl)methane (DIM) and 5,5'-dibromoDIM // *Cancer Lett.* — 2006. — V. 236. — № 2. — P. 198—212.
- [9] *Zhang W., Shi Y., Chen Y. et al.* Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymericmicelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors // *Biomaterials.* — 2011. — V. 32. — P. 2894—2906.

ANTICANCER ACTIVITY OF A NEW PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF DIINDOLYLMETHANE BY INHIBITING THE CELL VIABILITY IN VITRO

V.I. Kiselev, V.M. Drukh, O.I. Pchelintseva

Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, Russia, 117198

I.N. Kuznetsov

Moscow State Medical Stomatological University
(MGMSU) n.a. A.I. Evdokimov
Delegatskaya str., 2/1, Moscow, Russia, 127473

E.L. Muyzhnek

ZAO «MiraxBioPharma»
Kutuzovsky av., 12, Moscow, Russia, 121248

E.A. Gorbunova

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
Acad. Oparina str., 4, Moscow, Russia, 117997

We have studied antitumor effects of a new pharmaceutical composition with improved bioavailability containing 3,3'-diindolylmethane (DIM) by *in vitro* modelling. Cytotoxicity of the test substance was determined by MTT assay. Pharmaceutical composition based on DIM inhibits the growth of tumor cell lines of endometrial cancer CRL-1622 (IC₅₀ = 41,9 μM) and HTB-113 (IC₅₀ = 52,2 μM). Results of the study allow to recommend the further investigation of antitumor activity *in vivo*.

Key words: 3,3'-diindolylmethane (DIM), anticancer activity, apoptosis, endometrial cancer.