

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ДИИНДОЛИЛМЕТАНА В ОТНОШЕНИИ ПОДАВЛЕНИЯ КСЕНОГРАФТОВ ОПУХОЛЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ

[В. И. Киселев¹](#), [В. М. Друх¹](#), [И. Н. Кузнецов²](#), [Е. Л. Муйжнек³](#), [О. И. Пчелинцева¹](#)

¹ФГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» (г. Москва)

²ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им.
А. И. Евдокимова» Минздрава России (г. Москва)

³ЗАО «МираксБиоФарма» (г. Москва)

Проведено доклиническое изучение специфической противоопухолевой активности новой фармацевтической композиции «Цинетон» на основе 3,3'-дииндолилметана, содержащей плюроник F127, в модели ксенографтов рака эндометрия человека CRL-1622 и НТВ-113. Исследование выполнено на 200 иммунодефицитных мышях линии BALB/c-nude (nu/nu). В экспериментальной группе животные получали исследуемую субстанцию внутривентрикулярно в дозе 133 мг/кг/сут в течение 32-х дней после имплантации опухолевых клеток. Противоопухолевую активность исследуемого препарата оценивали по степени угнетения роста опухоли (Т/С%). Продемонстрировано статистически значимое уменьшение размеров ксенографтных опухолей у животных, получавших фармацевтическую композицию на основе 3,3'-дииндолилметана, по сравнению с контролем, начиная с 8-го дня после имплантации опухолевых клеток. К 32-му дню исследования коэффициент соотношения средних относительных объемов опухоли в тестовой и контрольной группах составил 84,6 и 65,41 % для ксенографтов рака эндометрия CRL-1622 и НТВ-113 соответственно. Кроме того, продемонстрировано, что частота образования опухолей в экспериментальной группе снижалась на 35-40 %, что подтверждает способность новой фармацевтической композиции с высокой биодоступностью снижать туморогенность клеток линий рака эндометрия.

Ключевые слова: 3,3'-дииндолилметан (DIM); плюроник; противоопухолевая активность; рак эндометрия; ксенографт; CRL-1622; НТВ-113; доклинические исследования.

Киселев Всеволод Иванович — доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заместитель директора по науке Института медико-биологических проблем ФГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, e-mail: ekazueva@yandex.ru, vkis10@mail.ru

Друх Вадим Михайлович — кандидат медицинских наук, руководитель научных

проектов Института медико-биологических проблем ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, e-mail: DruhVM@ilmixgroup.ru

Кузнецов Игорь Николаевич — кандидат биологических наук, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», г. Москва, e-mail: Kuznetsovin@ilmixgroup.ru

Муйжнек Екатерина Леонидовна — кандидат биологических наук, директор по науке ЗАО «МираксБиоФарма», г. Москва, e-mail: MuyzhnekEL@ilmixgroup.ru

Пчелинцева Ольга Игоревна — научный сотрудник Института медико-биологических проблем ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, e-mail: pchelintseva87@mail.ru

Введение. Рак эндометрия (РЭ) является распространенной формой рака среди женщин с онкологическими заболеваниями женской репродуктивной системы. Риск развития РЭ связан в основном с возрастными гормонально-метаболическими изменениями у женщин. Жировая ткань, являясь источником эндогенных половых гормонов, продуцирует эстроген, который при длительном воздействии повышает риск заболевания РЭ [1]. При этом последние исследования, направленные на изучение эффективности и безопасности заместительной гормональной терапии, свидетельствуют о необходимости дифференцированного подхода в назначении этого вида терапии при РЭ [2].

3,3'-дииндолилметан (DIM) — перспективный противоопухолевый агент природного происхождения, который является продуктом метаболизма индол-3-карбинола (I3C) в организме животного или человека. Противоопухолевое действие DIM, многократно подтвержденное в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, реализуется благодаря его антиэстрогенной, антипролиферативной и проапоптотической активности [3–6]. Кроме того, DIM подавляет воспаление, оказывает антиангиогенное и антиметастатическое действия [7, 8].

Антиэстрогенные свойства DIM и I3C реализуются за счёт модулирования ферментной цитохромной системы и образования изоформы цитохрома P450-CYP1A1. Данная изоформа гидроксилирует эстрогены во 2-м положении, увеличивая уровень антипролиферативного 2-гидроксиэстронола (2-OHE1). Полученный метаболит является антагонистом рецептора эстрогенов и блокирует его активацию самими эстрогенами, а также их опасными проканцерогенными метаболитами, в частности, 16 α -гидроксиэстроном (16 α -OHE1), доля которого среди метаболитов эстрогена снижается. Таким образом, подавляется индукция эстрогензависимых генов, и клетка перестает получать избыточную эстрогензависимую стимуляцию [3].

В ходе многочисленных экспериментальных исследований была доказана универсальность противоопухолевой активности I3C и DIM, обусловленная способностью данного соединения блокировать также эстрогенезависимые пролиферативные пути, активируемые ростовыми факторами и цитокинами [9].

Недавно было обнаружено, что DIM является также селективным ингибитором особой минорной субпопуляции недифференцированных туморогенных клеток, так называемых опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые, согласно современным представлениям, являются главным источником опухолевых рецидивов и метастазов [10].

Несмотря на подтвержденную эффективность субстанции DIM в отношении многих патологических процессов, DIM зачастую демонстрирует низкую концентрацию в тканях и органах-мишенях [11, 12]. Это связано с тем, что DIM проявляет низкую растворимость в физиологических жидкостях и ограниченную способность проникать через барьерные мембраны. В связи с этим ведется работа по созданию лекарственной формы, удобной для применения и обладающей высокой биодоступностью.

Нами была разработана новая фармацевтическая композиция, представляющая собой мицеллярные наночастицы, состоящие из дииндолилметана и покрывающих его блок-сополимеров оксиэтилена и оксипропилена, известных под названием плюроник (Лутрол F127) [12, 13]. Плюроник F127 выполняет роль стабилизатора, благодаря уникальным физико-химическим свойствам. Являясь неактивным и нетоксичным ингредиентом, плюроник обеспечивает безопасность формуляции F127-DIM, гарантируя успешное применение в экспериментах на людях.

В недавнем исследовании сравнительной фармакокинетики было продемонстрировано, что биодоступность DIM в составе такой фармацевтической композиции в 17,8 раз выше биодоступности неформулированной кристаллической субстанцией DIM [14].

В связи с этим *целью настоящей работы* являлось экспериментальное изучение противоопухолевой активности новой фармацевтической композиции на основе DIM, содержащей плюроник, на экспериментальных моделях *in vivo* РЭ человека CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B).

Материалы и методы

Реактивы. Фармацевтическая композиция на основе 3,3'-дииндолилметана (DIM) («Цинетон»), содержащая плюроник F127 (ЗАО «ИльмиксГрупп», Россия), приготовлена по специальной запатентованной технологии [12, 13]

Клеточные линии. Штаммы опухолевых клеток РЭ человека CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B) были получены из НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова МЗ РФ (г. Санкт-Петербург). Для культивирования клеток CRL-1622 использовалась среда DMEM : F12 в соотношении 1 : 1 (Invitrogen, США), а для культивирования клеток НТВ-113 использовалась среда EMEM (Invitrogen, США) с добавлением 10 % фетальной сыворотки коров (HyClone, США). Клетки культивировались в монослой в пластиковых флаконах с обновлением среды каждые 3 дня при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ (Shel Lab, США). После достижения 80–90 % конfluэнтности клетки пассировали. Для этого промывали клетки 2 раза раствором Версена и обрабатывали 0,025 % трипсином (ПанЭко, РФ), а затем снимали, инкубируя в течение 10 минут при 37 °С. Клетки разбивали до получения однородной суспензии, отбирали требуемое количество клеток.

Животные и их содержание. В исследовании использовано 200 самок иммунодефицитных мышей линии Balb/c (nu/nu) (19–25 г) в возрасте 5–6 недель, полученных из питомника Charles River Laboratories GmbH (Германия). Перед исследованием животных подвергали 10-дневному карантину.

Клетки с животными были помещены в отдельные комнаты. Световой режим: 12 час — свет, 12 час — темнота. Животные находились в комнатах с контролируемыми параметрами микроклимата (температура 18–26 °С, относительная влажность 30–70 %, воздухообмен 8–10 объемов комнаты в час, световой режим день/ночь). Воздух проходил тройную систему очистки и на последней стадии фильтровался через HEPA-фильтры. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15-ти объемов помещения

в час. Мышей Balb/c-nude(nu/nu) содержали в индивидуально-вентилируемых клетках (по 4–8 мышей/в клетке), соединенных с аппаратом для кондиционирования воздуха. Клетки механически и химически очищались, автоклавировались перед использованием и менялись один раз в неделю.

Животные имели свободный доступ к воде и корму PMI LabDiet® 5K67. Для поения использовалась дистиллированная вода. Корм и воду предварительно стерилизовали автоклавированием.

В ходе исследования каждое животное ежедневно осматривалось (общее поведение и общее состояние животных) в установленное время до инъекции препарата и примерно через 2 часа после инъекции.

Эвтаназия животных производилась методом передозировки ингаляционного анестетика (эфира для наркоза). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием животных» (РФ).

Протокол лечения. Всем животным, отвечающим критериям включения в эксперимент, были имплантированы клетки РЭ линий CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B) подкожно вдоль позвоночника (в районе левой лопатки). Пассажи опухолевых клеток линии проводили введением 0,2 мл опухолевой взвеси в стерильном растворе PBS (Sigma, США), содержащей 5 млн клеток (25×10^6 клеток/мл) для оценки противоопухолевого действия и 2,5 млн клеток для оценки влияния на туморогенность клеток опухолей.

Через 3 дня после имплантации раковых клеток животные были распределены с помощью метода рандомизации для оценки противоопухолевого действия на 4 группы (2 экспериментальные и 2 контрольные), по 30 животных в каждой, и ещё на 4 группы (2 экспериментальные и 2 контрольные) по 20 животных в каждой для оценки влияния на туморогенность.

Фармацевтическая композиция вводилась животным экспериментальных групп через 24 часа после инокуляции внутрижелудочно (в/ж) через атравматичный металлический зонд ежедневно в концентрации 133 мг/кг. В контрольной группе животным ежедневно вводили аналогичное по объему количество растворителя — дистиллированной воды.

Оценка противоопухолевого действия композиции. Противоопухолевое действие исследуемой композиции оценивалось на основании сравнения в опытных и контрольной группах показателей продолжительности жизни животных, средних относительных объемов опухолей, а также частоты образования опухолей после перевивки животным опухолевых клеток РЭ.

Процент увеличения продолжительности жизни животных (УПЖ) вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ} = 100 \% \times (\text{СПЖ}_{\text{опыт}} - \text{СПЖ}_{\text{контроль}}) / \text{СПЖ}_{\text{контроль}},$$

где $\text{СПЖ}_{\text{опыт}}$ — средняя продолжительность жизни в экспериментальной группе;
 $\text{СПЖ}_{\text{контроль}}$ — средняя продолжительность жизни в контрольной группе.

Коэффициент средних относительных объемов опухолей в тестовой и контрольной группах (Т/С, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{Т/С} (\%) = \frac{V_{\text{эксп}}}{V_{\text{контр}}} \times 100 \%,$$

где $V_{\text{эксп}}$ — средний объем опухолей в экспериментальной группе;
 $V_{\text{контр}}$ — средний объем опухолей в контрольной группе.

Объем опухоли определяли по формуле:

$$V_{\text{оп}}(\text{мм}^3) = \frac{L \times W^2}{2},$$

где L — соответствует наибольшему, а W — наименьшему диаметру опухоли.

Регистрация динамики опухолевого роста проводилась по данным ежедневного измерения опухолей у мышей во всех группах. Оценки объема опухоли проводились с 7-го по 32-й день после перевивки.

Влияние приема фармацевтической композиции «Цинетон» на частоту образования опухолей, отражающей туморогенность перевиваемых опухолевых клеток, оценивалось на основании сравнения количества животных с пальпируемой опухолью после перевивки клеток линий РЭ человека НТВ-113 (HEC-1-B) и CRL-1622 (KLE) в опытных и контрольной группах.

Статистическая обработка. Полученные экспериментальные данные были обработаны статистически с помощью пакета Systatw 5 для персонального компьютера.

Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение, стандартная ошибка среднего, стандартное отклонение. Статистическое сравнение ингибирования роста опухолей проводилось с помощью t -теста Стьюдента. Различия определялись при 0,05 % уровне достоверности.

Результаты и обсуждение. На модели ксенографтов было проведено экспериментальное исследование *in vivo* противоопухолевого действия новой фармацевтической композиции на основе 3,3'-дииндолилметана (DIM) («Цинетон»), содержащей плюроник. Для этого были использованы штаммы опухолевых клеток рака эндометрия человека CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B). Они представляют собой клеточные линии РЭ разной степени дифференцировки: HEC-1-B — клетки высокодифференцированной аденокарциномы, а KLE — низкодифференцированной. Оба вида клеточных линий являются ER-негативными.

В модели РЭ человека CRL-1622 (KLE) средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы составила $32,9 \pm 6,55$ дня. Введение изучаемой фармацевтической композиции животным экспериментальной группы достоверно увеличило продолжительность жизни мышей до $55,1 \pm 8,74$ дня (при $p < 0,05$). Процент УПЖ по сравнению с контрольной группой составил 67 %.

Помимо регистрации продолжительности жизни мышей с перевитыми опухолями, было оценено влияние новой фармацевтической композиции на размер опухолей. С 8-го по 32-й день после перевивки тестируемая композиция оказывала выраженный противоопухолевый эффект на развитие ксенографтов РЭ человека CRL-1622 (KLE) (рис. 1). Соотношение Т/С постепенно увеличивалось от минимального значения 17,56 % (12-й день после перевивки) до максимального 84,6 % ($p < 0,05$) (32-й день после перевивки), проходя через несколько локальных минимумов 22,82 % (15-й день после перевивки) и 48,31 % (19-й день после перевивки), обусловленных гибелью нескольких животных в этот день. Все различия средних объемов ксенографтных опухолей в опытной и контрольной группах животных регистрировались как статистически значимые.

Средний объем развившихся опухолей составил в контрольной группе 1 635,05 мм³, а в опытной группе (животные, получавшие фармацевтическую композицию на основе DIM, содержащую плюроник) 1 465,08 мм³.

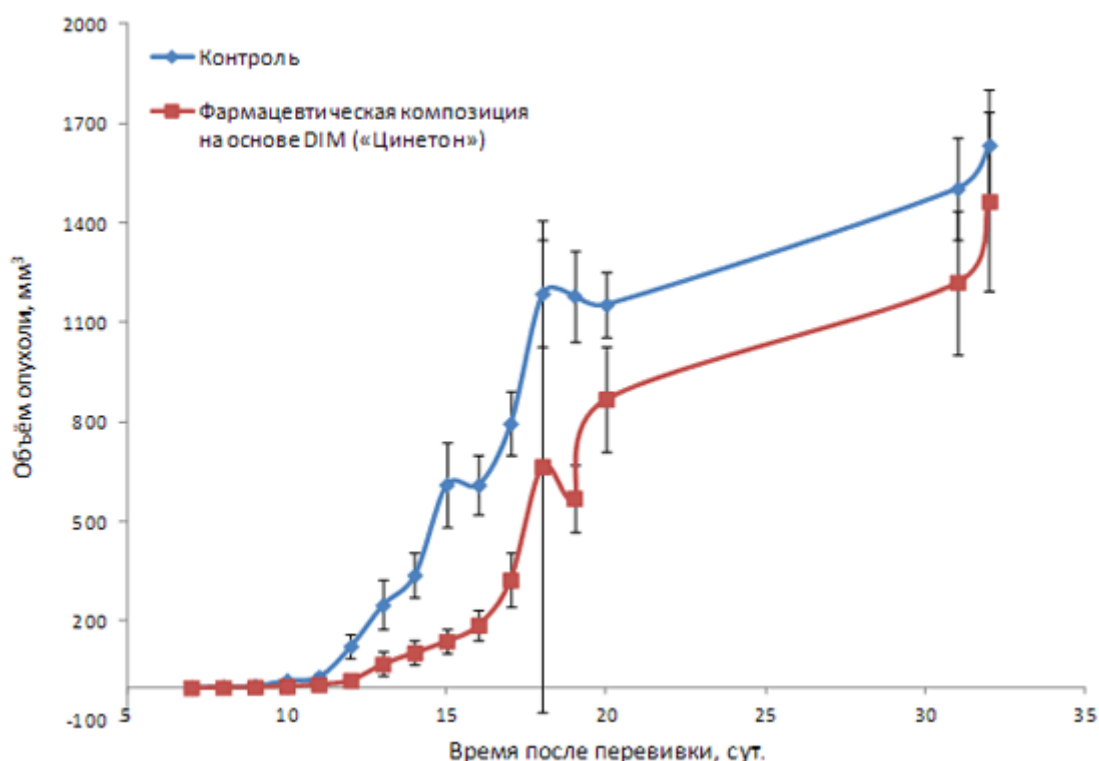


Рис. 1. Влияние фармацевтической композиции «Цинетон» на размер ксенографтных опухолей эндометрия человека CRL-1622 (KLE) после перевивки опухолевых клеток мышам Balb/c-nude(nu/nu). Достоверность различий между группами: $p < 0,05$

В параллельных группах мышей были проведены аналогичные эксперименты с использованием клеток РЭ человека линии НТВ-113 (HEC-1-B).

СПЖ мышей контрольной группы составила $35,4 \pm 5,14$ дня. Введение изучаемой фармацевтической композиции достоверно увеличило продолжительность жизни мышей до $53,4 \pm 7,50$ дня (при $p < 0,05$). УПЖ в результате приёма исследуемой композиции (133 мг/кг) составило 51 % по сравнению с контролем. Данные значения были близки к значениям, полученным для первой линии клеток CRL-1622 (KLE).

Изучение противоопухолевого эффекта фармацевтической композиции «Цинетон» в модели ксенографтов РЭ НТВ-113 (HEC-1-B) показало, что, как и в случае с клетками линии CRL-1622 (KLE), наблюдается торможение развития опухоли с 8-го по 32-й день после перевивки животным опухолевых клеток. Средний объем развившихся ксенографтных опухолей в контрольной группе составил 1 616,7 мм³, в то время как в опытной группе (животные, получавшие фармацевтическую композицию на основе DIM, содержащую плюроник) только 1 057,47 мм³. На протяжении всего времени проведения эксперимента соотношение Т/С постепенно увеличивалось от минимального значения 17,12 % (8-й день после перевивки) до максимального 65,41 % ($p < 0,05$) (32-й день после перевивки). Так же как в случае с линией клеток CRL-1622 (KLE), были отмечены локальные минимумы соотношения Т/С на 15-й день после перевивки (24,27 %) и на 19-й день после перевивки (45,86 %). Регистрация данных минимальных значений была связана с уменьшением размера выборки в результате гибели в эти дни животных с наибольшим размером опухоли. Все полученные значения были статистически значимы

($p < 0,05$). В целом, характер кривых на рис. 1 и 2, отражающих изменение размера ксенографтных опухолей эндометрия человека CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B) в опытной и контрольной группах, совпадает.

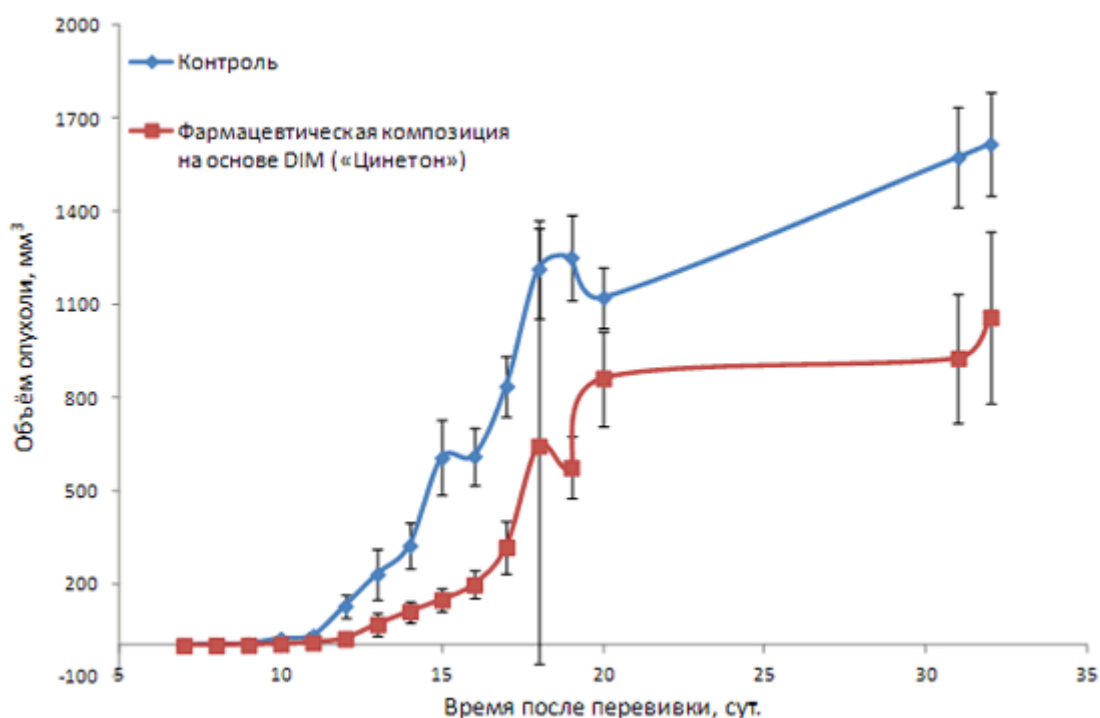


Рис. 2. Влияние фармацевтической композиции «Цинетон» на размер ксенографтных опухолей эндометрия человека НТВ-113 (HEC-1-B) после перевивки опухолевых клеток мышам Balb/c-nude(nu/nu). Достоверность различий между группами: $p < 0,05$

Нами также было изучено влияние приема фармацевтической композиции «Цинетон» на туморогенность опухолевых клеток. Результаты изучения частоты образования опухолей в опытной и контрольной группах животных для каждой из двух клеточных линий РЭ представлены в таблице.

Влияние фармацевтической композиции «Цинетон» на частоту образования опухолей эндометрия человека CRL-1622 (KLE) и НТВ-113 (HEC-1-B) после перевивки опухолевых клеток мышам Balb/c-nude(nu/nu)

Линия клеток	Терапия	Число животных с пальпируемой опухолью	Частота образования опухолей, %
CRL-1622 (KLE)	Дистиллированная вода	19	95,0
	«Цинетон», 133 мг/кг	12	60,0*
НТВ-113 (HEC-1-B)	Дистиллированная вода	19	95,0
	«Цинетон», 133 мг/кг	11	55,0*

Примечание: * — значимые отличия от контроля ($p < 0,05$)

Полученные результаты показывают, что частота образования опухолей в опытных группах, получавших «Цинетон», снижается на 35–40 %, что подтверждает способность новой фармацевтической композиции на основе DIM снижать туморогенность клеток линий РЭ человека НТВ-113 (HEC-1-B) и CRL-1622 (KLE).

Таким образом, в ходе доклинического исследования были получены данные,

свидетельствующие о значительном противоопухолевом эффекте фармацевтической композиции «Цинетон» на основе DIM, содержащей плюроник, а также о способности данной формуляции снижать туморогенность клеток РЭ человека линий НТВ-113 (HEC-1-B) и CRL-1622 (KLE). Противоопухолевый эффект был подтвержден на основании достоверного УПЖ мышей в результате приема исследуемой фармацевтической композиции, а также подавления роста ксенографтных опухолей.

Известно, что вещество DIM и его метаболический предшественник I3C подавляют пролиферацию различных опухолевых клеток, в частности лейкозных клеток, клеток рака молочной железы, рака предстательной железы, РЭ, рака толстой кишки [5, 15–18] за счёт блокирования сигнальных путей, опосредующих патологическую клеточную пролиферацию, а также множество других туморогенных сигнальных каскадов. DIM является мощным химиопрофилактическим агентом, благодаря подавлению образования канцерогенных ДНК-аддуктов и реактивных свободных радикалов [19]. Важным свойством DIM является также его способность подавлять ангиогенные и инвазивные процессы при канцерогенезе [7, 8].

Большое значение в профилактике онкогенеза в последнее время придается контролю эпигенетической активности генов. В 2013 году была показана ДНК-деметилирующая активность 3,3'-дииндолилметана [20]. Также было установлено, что DIM обладает самостоятельной ингибирующей активностью в отношении гистон-деацетилаз I класса [21, 22]. Данные свойства DIM важны для восстановления активности опухоль-супрессорных генов, эпигенетически блокируемой на этапе раннего канцерогенеза.

Наконец, чрезвычайно важным свойством DIM является его способность ингибировать активность ОСК в результате воздействия на критичные для самообновления стволовых клеток компоненты сигнальных каскадов [10].

Можно предположить, что наблюдаемые нами на животной модели противоопухолевые эффекты исследуемой фармацевтической композиции: уменьшение размеров ксенографтных опухолей у животных, УПЖ экспериментальных животных, а также снижение туморогенности клеток — обусловлены комплексным проявлением перечисленных эффектов со стороны ее активного вещества DIM.

Полученные в данном исследовании результаты полностью согласуются с ранее опубликованными данными активности субстанции DIM и его формуляций на клеточных линиях РЭ *in vitro* и *in vivo*.

В исследовании Chen и соавт. [23] 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 дииндолилметаном в концентрации 100 мкМ. Цитостатическое действие DIM было показано также на эндометриальных опухолевых клетках человека линии Ishikawa [24]. При концентрациях DIM меньше 50 мкМ наблюдались его антипролиферативные эффекты в результате ингибирования роста клеток. Так, DIM в концентрации 10 мкМ стимулировал уровень секретируемого TGF- α белка более чем в 10 раз, что подтвердило существенную роль DIM в активировании TGF- α -сигнального пути, обуславливающего мощный цитостатический эффект DIM. При использовании же DIM в концентрациях свыше 50 мкМ имела место индукция апоптоза опухолевых клеток.

В исследовании Kojima и соавт. [18] на крысах Donryu была изучена эффективность I3C в

случае спонтанного канцерогенеза эндометрия. Показано, что I3C, вводимый крысам в концентрации до 1000 ppm в течение 660 дней, значительно снижает частоту развития гормонзависимого РЭ, а также вероятность возникновения предраковых патологий за счет индукции гидроксирования эстрадиола по второму положению. Опираясь на ранее проведенные исследования, можно предположить, что данный факт обусловлен подавлением эстрогензависимого сигнального каскада в органе-мишени и торможением опухолевого роста, стимулируемого эстрогенами.

В 2013 году было показано, что I3C в сочетании с соевым изофлавоном генистеином усиливал апоптотические свойства белка TRAIL в раковых клетках эндометрия линии Ishikawa, благодаря активации так называемых рецепторов смерти DR4 и DR5 [25].

Как следует из результатов многочисленных экспериментов *in vitro in vivo*, DIM оказывает множественное противоопухолевое действие при разных видах рака. В нашем исследовании были использованы ER-негативные клеточные линии РЭ НТВ-113 (HEC-1-B) и CRL-1622 (KLE). При этом наблюдаемые противоопухолевые эффекты, скорее всего, были связаны с блокированием эстрогеннезависимых пролиферативных путей.

Полученные в исследовании результаты согласуются с ранее полученными экспериментальными данными, согласно которым DIM оказывал выраженный дозозависимый противоопухолевый эффект, существенно уменьшая конечный размер опухоли, развившейся после имплантации животным опухолевых клеток, и/или уменьшая количество вновь образованных опухолевых метастазов. Так, в исследовании [26] показатель Т/С составлял 47,2 % (SKOV-3-ксенографтная модель рака яичников), а в исследованиях [27, 28] эти показатели составляли соответственно 52,2 % (SKOV-3-ксенографтная модель рака яичников) и 51,6 % (PC-3-ксенографтная модель рака простаты) (величина Т/С рассчитана на основании оригинальных экспериментальных данных, приведенных в указанных публикациях), что близко к значениям Т/С, полученным нами.

В составе новой формуляции вспомогательное вещество плюроник значительно увеличивает биодоступность DIM. Кроме того, было показано, что плюроник в фармацевтических композициях способен существенно усиливать их проапоптотический эффект *in vitro* и *in vivo* [29, 30]. В наших экспериментах, помимо уменьшения объёмов ксенографтных опухолей (Т/С составил 84,6 и 65,41 % для ксенографтов РЭ CRL-1622 и НТВ-113 соответственно) удалось добиться сокращения частоты образования опухолей.

Заключение. Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет считать, что противоопухолевые свойства DIM (активного вещества препарата «Цинетон») обусловлены снижением туморогенного потенциала опухоли за счёт ингибирования активности ОСК, а также подавлением последующей опухолевой прогрессии за счёт таргетного блокирования основополагающих процессов канцерогенеза.

В составе новой фармацевтической композиции активное вещество DIM, благодаря повышенной биодоступности, способно максимально реализовать свой уникальный терапевтический потенциал.

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

Список литературы

1. Eliassen A. H. Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers : prospective studies / A. H. Eliassen, S. E. Hankinson // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2008. — Vol. 630. — P. 148-65.
2. Body Mass Index, Hormone Replacement Therapy, and Endometrial Cancer Risk : A Meta-Analysis Cancer / E. J. Crosbie, M. Zwahlen, H. C. Kitchener [et al.] // *Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2010. — Vol. 19 (12). — P. 3119-130.
3. Lord R. S. Estrogen metabolism and the diet-cancer connection: rationale for assessing the ratio of urinary hydroxylated estrogen metabolites / R. S. Lord, B. Bongiovanni, J. A. Bralley // *Altern. Med. Rev.* — 2002. — Vol. 7 (2). — P. 12-29.
4. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM) : From bench to clinic / S. Banerjee, D. Kong, Z. Wang [et al.] // *Mutat. Res.* — 2011. — Vol. 728 (1-2). — P. 47-66.
5. Choi H. J. Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3,3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells / H. J. Choi, Y. do Lim, J. H. Park // *BMC Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 9 (39). — P. 1-11.
6. Hong C. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells / C. Hong, G. L. Firestone, L. F. Bjeldanes // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 63 (6). — P. 1085-1097.
7. 3,3'- Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice / X. Chang, J. C. Tou, C. Hong [et al.] // *Carcinogenesis.* — 2005. — Vol. 26 (4). — P. 771-8.
8. Oral administration of 3,3'-diindolylmethane inhibits lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice / E. J. Kim, M. Shin, H. Park [et al.] // *J. Nutr.* — 2009. — Vol. 139 (12). — P. 2373-9.
9. Chang X. Inhibition of growth factor-induced Ras signaling in vascular endothelial cells and angiogenesis by 3,3'-diindolylmethane / X. Chang, G. L. Firestone, L. F. Bjeldanes // *Carcinogenesis.* — 2006. — Vol. 27 (3). — P. 541-50.
10. Diindolylmethane (DIM) selectively inhibits cancer stem cells / A. Semov, L. Iourtchenko, L. F. Liu [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2012. — Vol. 424 (1). — P. 45-51.
11. Physiological modeling of formulated and crystalline Diindolylmethane pharmacokinetics following oral administration in mice / M. J. Anderton, M. M. Manson, R. Verschoyle [et al.] // *Drug. Metab. Dispos.* — 2004. — Vol. 32 (6). — P. 632-8.
12. Kiselev V.A pharmaceutical composition for peroral administration of diindolylmethane / V. Kiselev, I. Vasilyeva// WO. — 2011. — 034465 A1.
13. Polymer Based Nano-Formulation of Diindolylmethane with High Oral Bioavailability / V. Kiselev, E. Klinskiy, S. E. Lee [et al.] // *J. Nanomed. Nanotechol.* — 2013. — Vol. 4 (2). — P. 1-3.
14. Сравнительное исследование фармакокинетики и биораспределения новой формуляции дииндолилметана с высокой биодоступностью / В. И. Киселев, В. М. Друх, И. Н. Кузнецов [и др.] // *Современные проблемы науки и образования.* — 2014. — № 2. — С. 1-7.
15. Takada Y. Indole-3-carbinol suppresses NF- κ B and I κ B α kinase activation causing inhibition of expression of NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells / Y. Takada, M. Andreeff, B. B. Aggarwal // *Blood.* — 2005. — Vol. 106 (2). — P. 641-9.
16. Down-regulation of uPA and uPAR by 3,3'-diindolylmethane contributes to the inhibition

- of cell growth and migration of breast cancer cells / A. Ahmad, D. Kong, Z. Wang [et al.] // J. Cell. Biochem. — 2009. — Vol. 108 (4). — P. 916-25.
17. Inactivation of uPA and its receptor uPAR by 3,3'-diindolylmethane (DIM) leads to the inhibition of prostate cancer cell growth and migration / A. Ahmad, D. Kong, S. H. Sarkar [et al.] // J. Cell. Biochem. — 2009. — Vol. 107 (3). — P. 516-27.
 18. Kojima T. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol / T. Kojima, T. Tanaka, H. Mori // Cancer Research. — 1994. — Vol. 54 (6). — P. 1446-9.
 19. Aggarwal B. B. Molecular Targets and Anticancer Potential of Indole-3-Carbinol and Its Derivatives / B. B. Aggarwal, H. Ichikawa // Cell. Cycle. — 2005. — Vol. 4 (9). — P. 1201-15.
 20. Epigenetic modifications of Nrf2 by 3,3'-diindolylmethane *in vitro* in TRAMP C1 cell line and *in vivo* TRAMP prostate tumors / T. Y. Wu, T. O. Khor, Z. Y. Su [et al.] // The AAPS J. — 2013. — Vol. 15 (3). — P. 864-874.
 21. 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells / L. M. Beaver, T. W. Yu, E. I. Sokolowski [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 2012. — Vol. 263 (3). — P. 345-51.
 22. Li Y. Chemopreventive agent 3,3'-diindolylmethane selectively induces proteasomal degradation of class I histone deacetylases / Y. Li, X. Li, B. Guo // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70 (2). — P. 646-54.
 23. Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV16-Transgenic Preneoplastic Cervical Epithelium / D. Z. Chen, M. Qi, K. J. Auborn, T. H. Carter // J. Nutr. — 2001. — Vol. 131 (12). — P. 3294-302.
 24. Leong H. Y. Cytostatic effects of 3,3-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor-alpha expression / H. Y. Leong, G. L. Firestone, L. F. Bjeldanes // Carcinogenesis. — 2001. — Vol. 22 (11). — P. 1809-17.
 25. The Synergistic Apoptotic Interaction of Indole-3-Carbinol and Genistein with TRAIL on Endometrial Cancer Cells / B. Parajuli, S. J. Shin, S. H. Kwon [et al.] // J. Korean Med. Sci. — 2013. — Vol. 28 (4). — P. 527-33.
 26. Kandala P. K. Diindolylmethane suppresses ovarian cancer growth and potentiates the effect of cisplatin in tumor mouse model by targeting signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) / P. K. Kandala, S. K. Srivastava // BMC Med. — 2012. — Vol. 10. — P. 9.
 27. Kandala P. K. Regulation of macroautophagy in ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo* by controlling glucose regulatory protein 78 and AMPK / P. K. Kandala, S. K. Srivastava // Oncotarget. — 2012. — Vol. 3. — P. 435-49.
 28. B-DIM impairs radiation-induced survival pathways independently of androgen receptor expression and augments radiation efficacy in prostate cancer / V. Singh-Gupta, S. Banerjee, C. K. Yunker [et al.] // Cancer Lett. — 2012. — Vol. 318. — P. 86-92.
 29. Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells / T. Minko, E. V. Batrakova, S. Li [et al.] // J. Control. Release. — 2005. — Vol. 105 (3). — P. 269-78.
 30. Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors / W. Zhang, Y. Shi, Y. Chen [et al.] // Biomaterials. — 2011. — Vol. 32 (11). — P. 2894-906.

STUDYING OF EFFICIENCY OF NEW PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF DIINDOLYLMETHANE CONCERNING SUPPRESSION XENOGRAFT OF ENDOMETRIUM TUMOURS

[V. I. Kiselev¹](#), [V. M. Drukh¹](#), [I. N. Kuznetsov²](#), [E. L. Muyzhnek³](#), [O. I. Pchelintseva¹](#)

¹FSEI HPE «Peoples' Friendship University of Russia» (Moscow c.)

²SBEI HPE «Moscow state medical stomatological university n. a. A. I. Evdokimov» of Ministry of Health (Moscow c.)

³PLC «MiraxBioPharma» (Moscow c.)

Preclinical studying of specific antitumoral activity of new pharmaceutical composition of «Cineton» on the basis of 3,3'-diindolylmethane, containing F127 pluronic, is carried out on CRL-1622 and HTB-113 xenograft models of endometrium cancer of the person. Research is performed on 200 immunodeficient BALB/c-nude (nu/nu) mice. Animals of experimental group received the studied substance intragastrically in a dose of 133 mg/kg/days within 32 days after implantation of tumor cells. Antitumoral activity of studied preparation was estimated on extent of oppression of tumor growth (% T/C). Statistically significant decrease of the sizes the tumors xenograft at the animals receiving pharmaceutical composition on the basis of 3,3'-diindolylmethane in comparison with control, since the 8th day after implantation of tumor cells is shown. By the 32nd day of research the coefficient of a ratio of average relative volumes of a tumor in test and control groups made 84,6 and 65,41% for CRL-1622 and HTB-113 ksenograft of endometrium cancer respectively. Besides, it is shown that the frequency of formation of tumors in experimental group decreased by 35-40% that confirms ability of new pharmaceutical composition with high bioavailability to reduce a tumorigenicity of cells of endometrium cancer.

Keywords: 3,3'-diindolylmethane (DIM); pluronic; antitumoral activity; endometrium cancer; xenograft; CRL-1622; HTB-113; preclinical researches.

About authors:

Kiselev Vsevolod Ivanovich — doctor of biological science, corresponding member of the RAS, deputy director on science of Institute of medicobiological problems at FSEI HPE «Peoples' Friendship University of Russia», e-mail: ekazueva@yandex.ru, vkis10@mail.ru

Drukh Vadim Mikhaylovich — candidate of medical science, principal of scientific projects of Institute of medicobiological problems at FSEI HPE «Peoples' Friendship University of Russia», e-mail: DruhVM@ilmixgroup.ru

Kuznetsov Igor Nikolaevich — candidate of biological science, assistant of chair of clinical laboratory diagnostics at SBEI HPE «Moscow state medical stomatological university n. a. A. I. Evdokimov» of Ministry of Health, e-mail: Kuznetsovin@ilmixgroup.ru

Muyzhnek Ekaterina Leonidovna — candidate of biological science, director of PLC «MiraxBioPharma», e-mail: MuyzhnekEL@ilmixgroup.ru

Pchelintseva Olga Igorevna — research associate of Institute of medicobiological problems at FSBEI HPE «Peoples' Friendship University of Russia», e-mail: pchelintseva87@mail.ru

List of the Literature:

1. Eliassen A. H. Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers : prospective studies / A. H. Eliassen, S. E. Hankinson // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2008. — Vol. 630. — P. 148-65.
2. Body Mass Index, Hormone Replacement Therapy, and Endometrial Cancer Risk : A Meta-Analysis Cancer / E. J. Crosbie, M. Zwahlen, H. C. Kitchener [et al.] // *Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2010. — Vol. 19 (12). — P. 3119-130.
3. Lord R. S. Estrogen metabolism and the diet-cancer connection: rationale for assessing the ratio of urinary hydroxylated estrogen metabolites / R. S. Lord, B. Bongiovanni, J. A. Bralley // *Altern. Med. Rev.* — 2002. — Vol. 7 (2). — P. 12-29.
4. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM) : From bench to clinic / S. Banerjee, D. Kong, Z. Wang [et al.] // *Mutat. Res.* — 2011. — Vol. 728 (1-2). — P. 47-66.
5. Choi H. J. Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3,3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells / H. J. Choi, Y. do Lim, J. H. Park // *BMC Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 9 (39). — P. 1-11.
6. Hong C. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells / C. Hong, G. L. Firestone, L. F. Bjeldanes // *Biochem. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 63 (6). — P. 1085-1097.
7. 3,3'- Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice / X. Chang, J. C. Tou, C. Hong [et al.] // *Carcinogenesis.* — 2005. — Vol. 26 (4). — P. 771-8.
8. Oral administration of 3,3'-diindolylmethane inhibits lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice / E. J. Kim, M. Shin, H. Park [et al.] // *J. Nutr.* — 2009. — Vol. 139 (12). — P. 2373-9.
9. Chang X. Inhibition of growth factor-induced Ras signaling in vascular endothelial cells and angiogenesis by 3,3'-diindolylmethane / X. Chang, G. L. Firestone, L. F. Bjeldanes // *Carcinogenesis.* — 2006. — Vol. 27 (3). — P. 541-50.
10. Diindolylmethane (DIM) selectively inhibits cancer stem cells / A. Semov, L. Iourtchenko, L. F. Liu [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2012. — Vol. 424 (1). — P. 45-51.
11. Physiological modeling of formulated and crystalline Diindolylmethane pharmacokinetics following oral administration in mice / M. J. Anderton, M. M. Manson, R. Verschoyle [et al.] // *Drug. Metab. Disposit.* — 2004. — Vol. 32 (6). — P. 632-8.
12. Kiselev V.A pharmaceutical composition for peroral administration of diindolylmethane / V. Kiselev, I. Vasilyeva// WO. — 2011. — 034465 A1.
13. Polymer Based Nano-Formulation of Diindolylmethane with High Oral Bioavailability / V. Kiselev, E. Klinskiy, S. E. Lee [et al.] // *J. Nanomed. Nanotechol.* — 2013. — Vol. 4 (2). — P. 1-3.
14. Comparative research of pharmacokinetics and biodistribution of a new formulation of diindolylmethane with high bioavailability / V. I. Kiselyov, V. M. Drukh, I. N. Kuznetsov [etc.] // *Modern problems of science and education.* — 2014. — № 2. — P. 1-7.
15. Takada Y. Indole-3-carbinol suppresses NF- κ B and I κ B α kinase activation causing inhibition of expression of NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products

- and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells / Y. Takada, M. Andreeff, B. B. Aggarwal // *Blood*. — 2005. — Vol. 106 (2). — P. 641-9.
16. Down-regulation of uPA and uPAR by 3,3'-diindolylmethane contributes to the inhibition of cell growth and migration of breast cancer cells / A. Ahmad, D. Kong, Z. Wang [et al.] // *J. Cell. Biochem.* — 2009. — Vol. 108 (4). — P. 916-25.
 17. Inactivation of uPA and its receptor uPAR by 3,3'-diindolylmethane (DIM) leads to the inhibition of prostate cancer cell growth and migration / A. Ahmad, D. Kong, S. H. Sarkar [et al.] // *J. Cell. Biochem.* — 2009. — Vol. 107 (3). — P. 516-27.
 18. Kojima T. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol / T. Kojima, T. Tanaka, H. Mori // *Cancer Research*. — 1994. — Vol. 54 (6). — P. 1446-9.
 19. Aggarwal B. B. Molecular Targets and Anticancer Potential of Indole-3-Carbinol and Its Derivatives / B. B. Aggarwal, H. Ichikawa // *Cell. Cycle*. — 2005. — Vol. 4 (9). — P. 1201-15.
 20. Epigenetic modifications of Nrf2 by 3,3'-diindolylmethane *in vitro* in TRAMP C1 cell line and *in vivo* TRAMP prostate tumors / T. Y. Wu, T. O. Khor, Z. Y. Su [et al.] // *The AAPS J.* — 2013. — Vol. 15 (3). — P. 864-874.
 21. 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells / L. M. Beaver, T. W. Yu, E. I. Sokolowski [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 2012. — Vol. 263 (3). — P. 345-51.
 22. Li Y. Chemopreventive agent 3,3'-diindolylmethane selectively induces proteasomal degradation of class I histone deacetylases / Y. Li, X. Li, B. Guo // *Cancer Res.* — 2010. — Vol. 70 (2). — P. 646-54.
 23. Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV16-Transgenic Preneoplastic Cervical Epithelium / D. Z. Chen, M. Qi, K. J. Auburn, T. H. Carter // *J. Nutr.* — 2001. — Vol. 131 (12). — P. 3294-302.
 24. Leong H. Y. Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor-alpha expression / H. Y. Leong, G. L. Firestone, L. F. Bjeldanes // *Carcinogenesis*. — 2001. — Vol. 22 (11). — P. 1809-17.
 25. The Synergistic Apoptotic Interaction of Indole-3-Carbinol and Genistein with TRAIL on Endometrial Cancer Cells / B. Parajuli, S. J. Shin, S. H. Kwon [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* — 2013. — Vol. 28 (4). — P. 527-33.
 26. Kandala P. K. Diindolylmethane suppresses ovarian cancer growth and potentiates the effect of cisplatin in tumor mouse model by targeting signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) / P. K. Kandala, S. K. Srivastava // *BMC Med.* — 2012. — Vol. 10. — P. 9.
 27. Kandala P. K. Regulation of macroautophagy in ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo* by controlling glucose regulatory protein 78 and AMPK / P. K. Kandala, S. K. Srivastava // *Oncotarget*. — 2012. — Vol. 3. — P. 435-49.
 28. B-DIM impairs radiation-induced survival pathways independently of androgen receptor expression and augments radiation efficacy in prostate cancer / V. Singh-Gupta, S. Banerjee, C. K. Yunker [et al.] // *Cancer Lett.* — 2012. — Vol. 318. — P. 86-92.
 29. Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells / T. Minko, E. V. Batrakova, S. Li [et al.] // *J. Control. Release*. — 2005. — Vol. 105 (3). — P. 269-78.
 30. Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors / W. Zhang, Y. Shi, Y. Chen [et al.] // *Biomaterials*. — 2011. — Vol. 32 (11). — P. 2894-906.