Перейти в содержание Вестника РНЦРР МЗ РФ N13

Текущий раздел: Молекулярная медицина

Доклиническое исследование влияния новой фармацевтической композиции на основе 3,3'-дииндолилметана на репродуктивную функцию и иммунную систему.

Кузнецов И.Н. [1], Ашрафян Л.А.[2], Киселев В.И.[3], Друх В.М. [4], Муйжнек Е.Л.[5], Пчелинцева О.И.[4]

[1]Закрытое акционерное общество «ИльмиксГрупп», г. Москва;

[2]ФГБУ«Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва;

[3]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва;

[4]ФГОУ высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов», г. Москва;

[5]Закрытое акционерное общество «МираксБиоФарма», г. Москва.

Адрес документа для ссылки: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v13/papers/pchelintseva_v13.htm

Статья опубликована 30 октября 2013 года.

Контактная информация:

Кузнецов Игорь Николаевич – к.б.н, генеральный директор ЗАО «ИльмиксГрупп»;

Ашрафян Левон Андреевич – д.м.н., член-корреспондент РАМН, руководитель отделения комбинированных методов лечения гинекологических заболеваний отдела хирургии РНЦРР;

Киселев Всеволод Иванович – д.б.н., член-корреспондент РАМН, советник директора НИЦ «Курчатовский институт»;

Друх Вадим Михайлович – к.м.н., руководитель научных проектов Института медико-биологических проблем РУДН;

Муйжнек Екатерина Леонидовна – к.б.н., директор по науке ЗАО «МираксБиоФарма»;

Пчелинцева Ольга Игоревна - научный сотрудник Института медико-биологических проблем РУДН.

Контактное лицо: Пчелинцева Ольга Игоревна тел 8 (916) 722 19 77,

e-mail: pchelintseva87@mail.ru

Резюме

Цель исследования

Доклиническое изучение влияния новой фармацевтической композиции «Инфемин» на основе 3,3'-дииндолилметана на репродуктивную функцию и иммунную систему.

Материалы и методы

Исследование выполнено на лабораторных животных, обладающих высокой скоростью репродукции (крысах, мышах). Проведена оценка выживаемости плодов животных после воздействия препарата «Инфемин». Изучено влияние препарата на гаметогенез экспериментальных животных, а также на гуморальный и клеточный иммунный ответ у интактных и стрессированных животных.

Результаты

Установлено, что вводимая доза формуляции «Инфемин» 1000 мг/кг в пересчете на 3,3'-дииндолилметан не оказывает отрицательного влияния на гаметогенез и тератогенез у экспериментальных животных. Препарат оказывает стимулирующее воздействие на гуморальный и клеточный иммунитет при эмоциональном стрессе.

Выводы

Доказано, что новая фармацевтическая композиция на основе 3,3'-дииндолилметана не обладает репродуктивной токсичностью и стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет.

Ключевые слова: *репродуктивная токсичность; 3,3'-дииндолилметан; гаметогенез; доклинические исследования; иммунитет.*

Preclinical study of effects of a novel 3,3'-diindolylmethane based pharmaceutical composition on reproductive function and immune system.

I.N. Kuznetsov[1], L.A. Ashrafyan[2], V.I. Kiselev[3], V.M. Drukh[4], E.L. Muyzhnek[5], O.I. Pchelintseva[4]

[1] CJSC «IlmixGroup», Moscow;

[2]Federal State Budget Establishment Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (RSCRR) of Ministry of Health and Social Development of Russian Federation, Moscow

[3]National Research Centre "Kurchatov Institute" Moscow;

[4]Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow

[5]CJSC "MiraxBioPharma", Moscow.

Summary

Purpose of the study: Preclinical study of the impact of a novel 3,3'-diindolylmethane based pharmaceutical composition «Infemin» on reproductive function and immune system.

Materials and methods

The study was conducted on laboratory animals which have a high reproduction rate (rats, mice). The survival of animal fetuses after use of the preparation was estimated. The preparation influence on gametogenesis and also on humoral and cellular immune response in intact and stressed animals have been studied.

Results

It was found that administered «Infemin» dose 1000 mg/kg counted for 3,3'-diindolylmethane has no negative influence on gametogenesis and teratogenesis in experimental animals. The preparation stimulates humoral and cellular immunity under emotional stress conditions.

Conclusions

The novel 3,3'-diindolylmethane based pharmaceutical composition has no reproductive toxicity and stimulates humoral and cellular immunity.

Key words: *reproductive toxicity; 3,3'-diindolylmethane; gametogenesis; preclinical study; immunity.*

Оглавление:

Введение

Цель исследования

Материалы и методы

Результаты

Выводы

Список литературы

Введение

К настоящему времени в литературе накоплен огромный пласт экспериментального и практического материала, свидетельствующего о том, что 3,3'-дииндолилметан (ДИМ) является одним из самых перспективных соединений природного происхождения, эффективных в отношении опухолей различного генеза (Ge et al., 1996; Dalessandri et al., 2004; Chang et al., 2005; Garikapaty et al., 2006; Del Priore et al., 2010; Heath et al., 2010). Уникальность ДИМ обусловлена его способностью одновременно блокировать множество молекулярных механизмов, стимулирующих патологическую клеточную пролиферацию и последующий канцерогенез. Показано, что в условиях *in vitro* и *in vivo* ДИМ подавляет гормон-зависимую и гормон-независимую клеточную пролиферацию, стимулирует апоптоз опухолевых клеток, подавляет воспаление, а также оказывает антиангиогенный и антиметастатический эффекты (Banerjee et al., 2011). Так в экспериментах *in vivo* ДИМ, введенный подкожно экспериментальным животным (5 мг/кг, ежедневно), на 76% подавлял патологический неоангиогенез (Chang et al., 2005; Kong et al., 2007). В экспериментах на животной модели метастатического рака молочной железы пероральное

введение ДИМ мышам BALB/c (10 мг/кг, ежедневно) существенно понижало в сыворотке крови уровень провоспалительных цитокинов, а также сигнальных белков, опосредующих миграцию, инвазию и адгезию опухолевых клеток. При этом значительно сокращалось число метастазов в легких. Недавно было обнаружено, что ДИМ является также селективным ингибитором особой минорной субпопуляции недифференцированных туморогенных клеток, т.н. «опухолевых стволовых клеток» (ОСК) (Киселев и др., 2012; Semov et al., 2012;), которые согласно современным представлениям, являются главным источником опухолевых рецидивов и метастазов (Reya et al., 2001; Alison et al., 2010).

Единственным существенным препятствием при создании на основе ДИМ противоопухолевых лекарственных препаратов является его низкая биодоступность в органах-мишенях. Обычно ДИМ демонстрирует низкую растворимость в физиологических жидкостях и имеет ограниченную способность проникать через барьерные мембраны. Известна способность данного соединения связываться с белками плазмы крови, а также участвовать в различных неспецифических взаимодействиях в кровотоке, что существенно снижает эффективность его доставки к очагу заболевания.

С учетом всего вышесказанного был создан препарат «Инфемин», который представляет собой помещенный в твердые желатиновые капсулы раствор, содержащий активное вещество – 3,3’-дииндолилметан, а также вспомогательные компоненты органического происхождения, обеспечивающие максимальную биодоступность и стабильность препарата при хранении (Киселев, 2010). В составе новой формуляции, созданной нами на основе современного технологического решения, ДИМ находится в растворенном состоянии, благодаря чему быстро проникает в кровоток и попадает в органы-мишени. Данный препарат предназначен для лечения и профилактики воспалительных, а также предопухолевых и опухолевых заболеваний репродуктивной системы.

Известно, что одним из этапов доклинического изучения лекарственного препарата является исследование его действия на репродуктивную функцию (репродуктивной токсичности) и развитие потомства (токсикологии развития). Репродуктивная токсичность относится к числу наиболее опасных побочных эффектов лекарственных препаратов. Подобный негативный эффект может проявляться в нарушении формирования мужских и женских гамет (гаметопатии) вследствие хромосомных аберраций и мутаций генов, а также в повреждении гамет при их слиянии и образовании зиготы. Результатом повреждения половых клеток может быть невозможность беременности, гибель зародыша, тератогенез. Очевидно, что данный вид исследований требует особого внимания при разработке лекарственных средств, так как чем тщательнее изучена токсичность препарата в экспериментах на животных, тем меньше вероятность

возникновения нежелательных реакций и побочных эффектов в последующих клинических испытаниях (Гуськова, 2003; Хабриев, 2005).

В настоящей работе было всесторонне изучено влияние формуляции «Инфемин» на репродуктивную функцию у самцов и самок экспериментальных животных. В том числе были получены результаты, характеризующие потенциальные мутагенные свойства препарата по тесту на доминантные летальные мутации (доминантные летали). Кроме того, было исследовано влияние данного препарата на иммунную систему, что имеет особое значение с учетом его потенциального применения в качестве противоопухолевого средства.

Перейти в оглавление статьи >>>

Цель исследования состояла в изучении репродуктивной токсичности новой фармацевтической композиции на основе 3,3'-дииндолилметана и ее влияния на иммунную систему экспериментальных животных.

Перейти в оглавление статьи >>>

Материалы и методы

Реактивы. Для получения формуляции использовали кристаллический ДИМ (3,3′-метандиилбис(1*H*-индол)) (Alexis Corporations, Швейцария), в качестве растворителя использовалась смесь рыбьего жира, α-токоферола ацетата и полисорбата 80. Также в исследовании применялись: крахмал (Sigma-Aldrich, США), уксусная кислота (Sigma-Aldrich, США) и NaCl-физиологический раствор (Sigma-Aldrich, США).

Животные. Исследования проводились на белых беспородных крысах (самцы и самки) и линейных мышах C57BL/6, CBA и FI (CBAxC57BL/6), поступивших из питомника РАМН (п. Рапполово, г. Санкт-Петербург) в возрасте 3 месяцев. Животные содержались при световом режиме: 12 час - свет, 12 час - темнота. Температура воздуха поддерживалась на уровне 19-25 °С, относительная влажность - 50-70 %. Предварительно всех животных помещали в 30-дневный карантин, в течение которого проводился ежедневный осмотр, а также оценивалось их поведение и состояние.

В ходе экспериментов препараты и растворитель вводили животным внутрижелудочно через атравматичный металлический зонд. Точность дозирования достигалась изменением вводимого объема. Введение осуществляли медленно.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием животных» (РФ).

Влияние препарата «Инфемина» на сперматогенез. Для изучения возможного мутагенного действия ДИМ на мужские половые клетки и способность продуцировать генетически здоровое потомство самцов крыс спаривали с интактными самками в определенные фазы сперматогенеза и оценивали эмбриональные потери (летали). Препарат вводился самцам внутрижелудочно в дозах 10 мг/кг и 1000 мг/кг в пересчете на ДИМ. Группа положительного контроля получала циклофосфамид (ЦФА) - известный дисморфоген и цитостатик, доза которого была подобрана таким образом, чтобы не индуцировать тотальную гибель и поражение всех сперматогенных клеток. Животные контрольной группы получали растворитель. Введение препаратов самцам осуществлялось в течение 60 дней, после чего интактных самок подсаживали к самцам в соотношении 2:1, сроком на два эстральных цикла. Оплодотворение регистрировали с помощью вагинальных мазков. Для оценки способности к оплодотворению и зачатию вычисляли индекс, характеризующий отношение числа беременных животных к общему числу подсаженных самок в процентах.

Влияние препарата «Инфемин» на оогенез. Оценка влияния формуляции «Инфемин» на женский гаметогенез (оогенез) проводилась путем анализа последствий острого воздействия вводимого препарата на формирование гамет и зрелые фолликулы у самок крыс. Самок крыс после 15-дневного воздействия препаратом «Инфемин» (10 мг/кг в пересчете на ДИМ) спаривали с самцами в течение текущего эстрального цикла для достижения беременности. Половину самок подвергали эвтаназии, осуществляемой одномоментной декапитацией на 19-20-й день беременности. На вскрытии подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантаций в матке, а также количество живых и погибших плодов. На основании этих данных определяли уровень пред- и постимплантационной смертности зародышей. Предимплантационную смертность определяли по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке, постимлантационную смертность - по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. Другую половину самок оставляли до родов, фиксировали количество живых плодов, их массу и размер.

Влияние препарата «Инфемин» на иммунную систему. Определение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили с использованием внутривенной иммунизации мышей линии C57BL/6 эритроцитами барана в дозе $2x10^5$ клеток. Разрешающую дозу эритроцитов ($1x10^8$ клеток в 0,04 мл физиологического раствора) вводили в подушечку задней лапы на 7 сутки после иммунизации. Местную воспалительную реакцию учитывали через 24 часа по разнице масс опытной (Ро) и контрольной (Рк) лапок. Индекс реакции (ИР) вычисляли для каждой мыши по формуле:

$$ИР = \frac{Ро – Рк}{Рк} \times 100\%.$$

Развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) вызывали введением в подушечку правой задней лапы мышей FI (CBAxC57BL/6) подкожно $2x10^6$ клеток лимфатических узлов родительского генотипа (CBA). В левую лапу вводили сингенные лимфоциты. На 9-е сутки определяли число клеток в 5 мл гомогената левого (контроль) и правого (опыт) лимфоузла. Определение реакций ЗГТ и РТПХ у экспериментальных животных проводили после однократного внутрибрюшинного и 14-дневного внутрижелудочного введения им препарата «Инфемин» в дозе 1000 мг/кг.

Исследования влияния препарата «Инфемин» на иммунную систему стрессированных животных проводили после 14 дневного его введения мышам линии C57BL/6 в дозе 1000 мг/кг в пересчете на ДИМ. После этого животных иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ). На 7-й день после иммунизации в селезенке мышей определяли число антителобразующих клеток (АОК), а также титры гемагглютинина (ГА) и ЭБ на 7-й и 14-й дни после иммунизации. Результаты учитывали макроскопически. Экспериментальный эмоциональный стресс у животных вызывали скученностью (40 мышей в клетке размером 17x25x8 см) в течение 10-ти дней.

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов у стрессированных мышей C57BL/6 оценивали, используя в качестве объекта фагоцитоза опсонизированные иммуноглобулины G (IgG) ЭБ. Макрофаги привлекали в брюшную полость 4%-ным раствором гидролизованного крахмала. На 3-4 сутки животным внутрибрюшинно вводили 0,5 мл 5% взвеси ЭБ. Отмывали взвесь клеток. В окрашенном по Романовскому-Гимзе препарате определяли процент фагоцитирующих клеток. Для определения фагоцитарного индекса ($ФИ_1$) число захваченных ЭБ расчитывали спектрофотометрически по концентрации гемоглобина с использованием калибровочной кривой. Через 3 часа инкубации при 37 °С вновь определяли фагоцитарный индекс ($ФИ_2$). Индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) определяли по формуле:

$$ИЗФ = \frac{ФИ_1 – ФИ_2}{ФИ_1} \times 100\ \%.$$

При определении фагоцитарной активности *in vivo* мышам внутривенно вводили 25% раствор туши в объеме 0,5 мл затем в течение 15 минут через каждые 3 минуты брали кровь из орбитального синуса (0,02 мл) и вносили в 1 мл 3% уксусной кислоты. После взятия крови животное забивали, определяли вес тела, печени и селезенки. Оптическую

плотность гемолизированной крови определяли спектрофотометрически при длине волны 610 нм и строили график f(D). Находили точку lg 0' (нулевого времени) и lg 10' (по графику). Рассчитывали константу (К) фагоцитоза по формуле:

$$K = \frac{\lg 0' - \lg 10'}{10},$$

а затем вычисляли истинный показатель фагоцитоза (α) по формуле:

$$\alpha = \frac{\text{вес тела}}{\text{вес печени} + \text{вес селезенки}} \times K$$

Статистическую значимость различий регистрируемых показателей между группами экспериментальных животных рассчитывали по *t*-критерию Стьюдента и критерию Манна-Уитни.

Перейти в оглавление статьи >>>

Результаты

Влияние препарата «Инфемин» на сперматогенез

Проведенный нами анализ эмбриональных потерь у интактных самок крыс, спаренных с подопытными самцами в первые две недели после воздействия на последних препаратом «Инфемин», а также определение числа беременных самок крыс, свидетельствует об отсутствии у исследуемой композиции мутагенных свойств. Уровни доимплантационных и постимплантационных потерь плодов животных соответствовали контрольным значениям. Данные по оценке репродуктивной функции самцов крыс представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Влияние препарата «Инфемин» на репродуктивную функцию самцов крыс в сравнении с циклофосфамидом (ЦФА) и контролем.

	Контроль	**«Инфемин»**				**ЦФА**	
		10 мг/кг		**1000 мг/кг**			
Сроки обследования (недели)		1	2	1	2	1	2

Количество беременных самок	10	10	10	10	10	10	10
Количество желтых тел на самку (M±m)*	11.4±0.67	10.9±0.62	10.2±0.53	10.3±0.73	10.2±0.63	9.7±0.4	10.7±0.5
Кол-во мест имплантации на самку (M±m)	9.5±0.81	10.5±0.58	10.1±0.58	9.0±0.45	10.7±0.56	7.3 ±0.9	9.5±0.5
Доимплантационная гибель в группе в расчете на помет (M±m)	0.9±0.18	1.4±0.34	1.2±0.21	1.2±0.41	0.4±0.21	1.4±0.5	0.6±0.1
Постимплантационная гибель в группе в расчете на помет (M±m)	0.5±0.31	0.4±0.16	0.33±0.17	0.4±0.15	0.4±0.21	0.8±0.3	1.1±0.1
Кол-во живых плодов в одном помете (M±m)	9.0±0.93	10.1±0.67	9.79±0.44	9.5±0.42	9.2±0.55	7.3±1.0	8.7±0.5
Масса тела плодов (г) (M±m)	1.39±0.7	1.36±0.5	2.40±0.5	2.43±0.7	2.43±0.5	-	-
Теменно-копчиковый размер (см) (M±m)	2.100±0.2	1.96±0.1	2.95±0.2	2.0±0.3	3.0±0.1	-	-
Масса плаценты (г) (M±m)	0.61±0.2	0.58±0.1	0.61±0.2	0.59±0.0	0.62±0.3	-	-
Суммарный эмбрио(фето)леталь ный эффект в расчете на (M±m)	1.4±0.4	1.7±0.28	1.57±0.24	0.7±0.52	1.0±0.25	2.3±0.7	0.9±0.1

* M - среднее значение; m - стандартная ошибка среднего.

Как видно из таблицы, ни в один из сроков спаривания подопытных самцов с интактными самками доимплантационная, постимплантационная и суммарная гибель плодов у крыс

после воздействия формуляции «Инфемин» существенно не отличались от соответствующих показателей в контрольной группе. В ходе проведенного эксперимента не было обнаружено существенных различий и в показателях, характеризующих ростовые процессы плодов, а также частоту появления плодов с той или иной патологией. В то же время ЦФА подтвердил свой статус дисморфогена. Спаривание самцов крыс с интактными самками на двух сроках после воздействия ЦФА приводило к повышенной суммарной гибели плодов. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии негативного влияния фармацевтической композиции «Инфемин» на репродуктивную функцию самцов крыс.

В экспериментах по изучению функционального состояния сперматозоидов крыс было установлено, что формуляция на основе ДИМ не влияет на численность зрелых сперматозоидов эпидидимиса (1 неделя после воздействия) и не снижает количество подвижных форм сперматозоидов (Таблица 2). Как видно из таблицы, оценка жизнеспособности сперматозоидов не выявила снижения их резистентности ни в одной из опытных групп экспериментальных животных. Анализ общего числа и характера патологических форм сперматозоидов после воздействия на самцов препаратом «Инфемин», а также численности эпидидимиальных сперматозоидов в течение 4-х сроков наблюдения после воздействия, также не выявил каких-либо отличий от контроля. Вместе с тем в группе положительного контроля (животные, принимавшие ЦФА) отмечалось снижение численности эпидидимиальных сперматозоидов на 1-й неделе после воздействия, что является свидетельством их чувствительности к действию данного препарата. Оценка числа подвижных и неподвижных сперматозоидов в свежеприготовленной суспензии содержимого эпидидимисов в группе животных, принимавших ЦФА, выявила уменьшение числа подвижных форм сперматозоидов.

На основании результатов, полученных в ходе двухнедельного (от начала воздействия) наблюдения, можно высказать предположение об отсутствии влияния препарата «Инфемин» на спермиогенез (окончательную дифференцировку сперматозоидов).

Таблица 2. Влияние препарата «Инфемин» на функциональное состояние сперматозоидов в эпидидимисах крыс в сравнении с ЦФА и контролем.

	Контроль	**«Инфемин»**								**ЦФА**			
		10 мг/кг				**1000 мг/кг**							
Сроки		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

обследования (недели)													
Количество животных	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Кол-во сперматозоидов 10^6 / эпидидимис (M±m)* x 10^6 / г ткани (M±m)	155.0±7.0 305.0±11.4	154.0±7.0 302.0±10.3	169.2±6.9 315.2±11.7	167.7±3.0 328.0±16.1	153.0±5.2 277.3±9.0	148.0±6.0 301.0±11.1	172.7±4.8 346.6±19.3	159.0±3.7 372.9±10.6	156.0±6.2 332.0±19.4	88.0±9.8 202.7±38.0	129.7±20.1 297.6±29.6	102.4±26.6 246.5±59.2	123.4±25.0 409.9±43.6
Кол-во подвижных сперматозоидов % (M±m)	93.2±1.9	94.2±0.8	90.4±0.2	89.6±1.9	89.2±0.1	93.0±0.7	87.5±0.7	90.0±0.6	90.9±0.5	39.2±1.0	56.0±3.4	42.2±4.3	36.3±2.3
Время подвижности сперматозоидов, мин (M±m)	82.8±4.3	81.8±3.2	93.2±2.1	92.4±2.0	76.6±1.8	77.7±2.0	73.5±3.2	76.3±1.9	72.1±2.6	-	-	-	-
Осмотическая резисте	1.7	1.5	2.84±0.	1.7	2.7	0.3	1.8	1.7	1.7	3.1±0.	3.3±0.	3.0±0.	3.4±0.

нтность сперматозоидов % NaCl (M±m)			3							1	1	2	1
Кислотная резистентность сперматозоидов время (M±m)	5.7 ±1.3	4.6 ±0.2	5.2 ±0.0	1.2 ±0.1	1.5 ±0.2	3.6 ±0.0	2.0	0.8 ±0.4	1.2 ±0.0	-	-	-	-
PH гомогената эпидидимиса (M±m)	5.6 ±0.1	3.5 ±0.0	5.7 ±0.3	5.8 ±0.4	5.6 ±0.0	3.5 ±0.0	6.7 ±0.4	5.7 ±0.3	6.7 ±0.3		6.1 ±0.3	6.0 ±0.0	6.1 ±0.0
Патологические формы всего (на 200 сперм) (M±m)	0.2 ±0.6	0.3 ±0.1	0.0 ±0.4	0.7 ±0.4	1.4 ±0.5	0.3 ±0.2	0.2 ±0.2	2.3 ±0.7	1.1 ±0.4	1.5 ±0.1	3.1 ±1.5	1.5 ±0.7	6.0 ±0.4

* M - среднее значение; m - стандартная ошибка среднего

Влияние препарата «Инфемин» на оогенез

В ходе проведенных исследований было установлено, что у большинства самок крыс течение эстрального цикла соответствовало норме как до, так и после воздействия на них изучаемой формуляции (Таблица 3). Беременность наступала, как правило, при первом же их спаривании с самцами.

Таблица 3. Влияние препарата «Инфемин» (10 мг/кг в пересчете на ДИМ) на эстральный

цикл самок крыс.

«Инфемин», доза	К-во самок до/после воздействия	Длительность эстрального цикла и его фаз (дни) M±m*						К-во нар цик
		До воздействия			После воздействия			
		Полный цикл	Диэструс	Эструс	Полный цикл	Диэструс	Эструс	
0 мг/кг	25/10	4.10± 0.9	1.15 ± 0.4	1.0	4.14 ± 0.10	2.10 ± 0.4	1.0	
10 мг/кг	25/10	3.16 ± 0.10	2.17 ±0.2	1.0	4. 11 ±0.9	2.19 ± 0.3	1.0	
1000 мг/кг	25/10	3.11± 0.8	1.16± 0.3	1.0	4.32± 0.8	1.14± 0.3	1.0	

M - среднее значение; m - стандартная ошибка среднего

Оценка влияния композиции «Инфемин» на зрелые фолликулы яичников самок крыс, а также анализ прироста массы тела самок за период беременности и массы матки с плодами не выявили значимых различий с контролем, а также различий между группами, получавших минимальную и максимальную дозы ДИМ-содержащей композиции. Все подопытные осемененные самки были оплодотворены в течение ближайшей после воздействия стадии эструса эстрального цикла. Индекс оплодотворения был равен 100%. Все показатели, по которым оценивалось развитие плодов после воздействия на животных различных доз формуляции, полностью соответствовали значениям этих показателей в контроле. Статистически значимых различий между соответствующими показателями в опытной и контрольной группах или внутри подопытных групп обнаружено не было (Таблица 4). Таким образом, новая фармацевтическая композиция на основе ДИМ при воздействии на самок крыс в исследуемых дозах не оказывала влияния на зрелые фолликулы яичников.

Таблица 4. Влияние композиции «Инфемин» на зрелые фолликулы яичников у самок крыс.

	Контроль	«Инфемин»	
		10 мг/кг	1000 мг/кг
Количество осемененных самок	9	9	9
Количество беременных самок	9	9	9

Индекс оплодотворения (%)	100	100	100
Прирост массы тела самок (1-20-й день беременности (ДБ)) (M ± m) *	85.3± 10.5	87.4± 9.5	72.2 ± 6.8
Масса матки (20-й ДБ) (M±m)	46.2 ± 2.2	45.0 ± 1.5	43.5 ± 2.0
Количество желтых тел на самку (M±m)	12.3±0.71	11.1±0.40	10.3±0.60
Кол-во мест имплантации на самку± (M±m)	10.77±0.7	10.0±0.48	9.68±0.74
Доимплантационная гибель в расчете на помет (M±m)	0.57±0.19	1.11±0.34	0.65±0.24
Постимплантационная гибель в расчете на помет (M±m)	0.57±0.1	0.43±0.29	0.89±0.25
Кол-во живых плодов в одном помете (M±m)	11.21±0.8	10.68±0.68	9.77±0.69
Масса тела плодов (г) (M±m)	1.41±0.5	2.43±0.1	2.44±0.6
Теменно-копчиковый размер (см) (M±m)	1.97±0.2	2.0±0.2	1.96±0.2
Масса плаценты (г) (M±m)	0.58±0.1	0.57±0.2	0.59±0.3
Суммарный эмбрио(фето)летальный эффект в расчете на помет (M±m)	1.11±0.40	0.55±0.44	0.54±0.34

* M - среднее значение; m - стандартная ошибка среднего

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния композиции «Инфемин» (дозы 10 мг/кг и 1000 мг/кг в пересчете на ДИМ) на формирование гамет у самок крыс (Таблица 5). Как видно из таблицы, все показатели, регистрируемые в ходе данных исследований, полностью соответствовали контролю.

Таблица 5. Влияние композиции «Инфемин» на гаметогенез у самок крыс.

	Контроль	**«Инфемин»**	
		10 мг/кг	**1000 мг/кг**
Количество беременных самок	9	9	11
Прирост массы тела самок (1-20-й день беременности (ДБ)) (M±m)*	84.3± 9.6	82.0± 3.1	81.4 ± 3.2

Масса матки (20-й ДБ) (M±m)	45.2 ± 2.2	42.6 ± 3.4	43.3 ± 1.92
Количество желтых тел на самку (M±m)	11.3±0.70	10.32±0.43	10.73±0.37
Кол-во мест имплантации на самку (M±m)	10.79±0.7	9.57±0.45	9.17±0.46
Доимплантационная гибель в расчете на помет (M±m)	0.56±0.19	0.78±0.21	0.54±0.31
Постимплантационная гибель в расчете на помет (M±m)	0.55±0.2	0.78±0.36	0.36±0.20
Кол-во живых плодов в одном помете (M±m)	10.21±0.9	10.79±0.71	10.83±0.81
Масса тела плодов (г) (M±m)	1.41±0.6	2.40±0.6	2.44±0.6
Теменно-копчиковый размер (см) (M±m)	2.97±0.1	2.98±0.1	2.96±0.3
Масса плаценты (г) (M±m)	0.60±0.1	0.59±0.2	0.60±0.2
Суммарный эмбрио(фето)летальный эффект в расчете на помет (M±m)	0.11±0.3	0.55±0.40	0.90±0.30

* M - среднее значение; m - стандартная ошибка среднего

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что однократное введение фармацевтической композиции «Инфемин» самкам крыс в исследуемых дозах не влияет на формирование гамет, зрелые фолликулы в яичниках, овуляцию, оплодотворение и не приводит к дисморфогенезу плодов.

Влияние препарата «Инфемин» на иммунную систему

Влияние фармацевтической композиции «Инфемин» на иммунную систему было изучено посредством определения гуморального и клеточного иммунного ответа у интактных и стрессированных мышей линии C57BL/6, слабоотвечающих на Т-зависимый антиген – ЭБ, а также у интактных мышей линии CBA и FI (CBAxC57BL/6), оппозитно реагирующих на этот антиген, при его однократном внутрибрюшинном введении и недельном внутрижелудочном введении.

Как видно из Таблицы 6, однократное внутрибрюшинное введение экспериментальным животным композиции «Инфемин» в дозе 1000 мг/кг в пересчете на ДИМ не изменяло интенсивность реакций клеточного типа. При 14-ти дневном внутрижелудочном введении

мышам линии C57BL/6, развивающих в 2-2,5 раза более выраженную реакцию ГЗТ, чем мыши линии CBA, препарат подавлял интенсивность реакции. На развитие РТПХ исследуемая композиция при внутрижелудочном введении направленного влияния не оказывала.

Таблица 6. Влияние композиции «Инфемин» (1000 мг/кг в пересчете на ДИМ) на развитие реакций клеточного иммунитета у мышей.

№	Вид реак-ции	Путь введения препарата	Линия, пол, вес мышей	Индекс реакции (M±m)*		
				Контроль	10 мг/кг	1000 мг/кг
1	ГЗТ	Внутрибрюшинно	C57BL/6, самцы, 18-20г	28.7±3.1	24.0±1.9	26.2±2.9
2	ГЗТ	Внутрибрюшинно	CBA, самцы, 19-21 г	16.8±1.3	21.1±2.8	23.5±2.2
3	ГЗТ	Внутрижелудочно	C57BL/6, самцы, 20-22г	46.1±3.6	47.3±4.7	37.1±3.1**
5	ГЗТ	Внутрижелудочно	CBA, самцы, 20-22 г	17.4±1.8	18.8±1.5	17.2±1.2
6	РТПХ	Внутрибрюшинно	F_1(CBA×C57BL), самцы, 18-20 г	1.6±0.09	2.0±0.1	2.0±0.09
8	РТПХ	Внутрижелудочно	F_1(CBA×C57BL), самцы, 18-20 г	3.5±0.1	3.5±0.2	3.3±0.1

* M - среднее значение; m - стандартная ошибка среднего; **P<0.05

Результаты исследования влияния препарата на выраженность иммунодефицитного состояния, индуцированного эмоциональным стрессом, представлены в Таблице 7.

Как видно из таблицы, скученность животных в течение 10 дней приводит к подавлению гуморального иммунного ответа (числа антителобразующих клеток (АОК) и титра гемагглютинина (ГА), подавлению завершенности фагоцитоза и скорости очищения крови от инертных частиц туши. Все перечисленные нарушения, за исключением последнего, индуцированы стрессом. 14-дневное внутрижелудочное введение препарата «Инфемин» в дозе 1000 мг/кг в пересчете на ДИМ предотвращает эти нарушения.

Таким образом, можно заключить, что внутрижелудочное введение формуляции «Инфемин» оказывает защитный эффект на иммунную систему животных от депрессивных эффектов эмоционального стресса.

Таблица 7. Влияние композиции «Инфемин» (1000 мг/кг в пересчете на ДИМ) на иммунную систему стрессированных мышей.

Показатели иммунореактивности, единицы измерения	**Интактные животные**	**Стрессированные животные**			
		Контроль	**P_1**	**«Инфемин» 1000 мг/кг**	**P_2**
Число АОК на 10^6 кл. на селезенку	4.9	2.3	<0.01	5.9	<0.01
Титр ГА на 14 день (M±m)	5.4±0.11	4.4±0.24	<0.001	4.2±0.32	<0.01
ГЗТ (M±m индекса реакции)	14.4±8.1	25.6±3.10	<0.01	25.1±2.6	>0.05
РТПХ (M±m индекса реакции)	2.3±0.09	2.01±0.12	>0.05	2.01±0.10	>0.05
Фагоцитоз, фагоцитозный индекс (M±m)	12.9±3.5	16.9±3.1	>0.05	15.4±1.9	>0.05
Индекс завершенности фагоцитоза, % (M±m)	36.2±7.3	16.6±3.3	<0.05	33.4±5.0	<0.01
Клиренс туши, индекс (M±m)	4.41±0.13	3.08±0.21	<0.01	3.60±0.1	<0.01

P_1 – достоверность различий между показателями контрольной группы и группы интактных животных; P_2 – достоверность различий между показателями опытной группы и группы стрессированных животных

Перейти в оглавление статьи >>>

Выводы

1. В ходе проведенного исследования были получены данные об отсутствии репродуктивной токсичности препарата «Инфемин». Введение данной композиции самцам крыс не влияло на численность зрелых сперматозоидов эпидидимиса, не снижало количество их подвижных форм, а также не вызывало изменений резистентности и появления патологических форм сперматозоидов. Таким образом, данная формуляция не оказывала негативного влияния на интегральный показатель - репродуктивную функцию самцов. Однократное введение фармацевтической композиции самкам крыс в дозах 10 мг/кг и 1000 мг/кг в пересчете на ДИМ не влияло на зрелые фолликулы яичников, их

овуляцию, оплодотворение и не приводило к дисморфогенезу плодов. Доза препарата 10 мг/кг в пересчете на ДИМ не оказывала влияния на созревание фолликулов. Все показатели, регистрируемые в ходе данных исследований, полностью соответствовали контролю.

2. При изучении влияния препарата «Инфемин» на иммунную систему было установлено, что при его внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении экспериментальным животным не изменялась выраженность реакций ГЗТ и РТПХ. При 14-дневном внутрижелудочном введении мышам композиции в дозе 1000 мг/кг в пересчете на ДИМ предотвращалось снижение гуморального иммунного ответа и нарушение функции макрофагов, вызываемые эмоциональным стрессом.

3. Практически полное отсутствие репродуктивной и иммунной токсичности новой фармацевтической композиции «Инфемин» является уникальным для противоопухолевого средства. Установленное стимулирующее действие данного препарата на иммунную систему создает предпосылки для будущего его использования в онкологии и обосновывает перспективы дальнейших доклинических и клинических исследований.

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.

Перейти в оглавление статьи >>>

Список литературы:

1. *Гуськова Т.А.* Токсикология лекарственных средств. Москва: Русский врач. 2003. с. 144.

2. Киселев В.И., Алахов В.Ю.,Семов А.Б. с соавт. 3,3'-дииндолилметан – селективный ингибитор активности опухолевых стволовых клеток. // Молекулярная медицина. 2012. N4. стр. 32-40.

1. *Киселев В. И* Лекарственное средство на основе дииндолилметана (dim) с повышенной биодоступностью и его использование в лечении гиперпластических и воспалительных заболеваний человека // Патент на изобретение №:2419426. 2010

2. *Хабриев Р.У.* Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва: Медицина. 2005 г.

3. *Alison M.R., Islam S., Wright N.A.* Stem cells in cancer: instigators and propagators? // Journal of cell science. 2010 V. 123. P. 2357-2368.

4. *Banerjee S., Kong D., Wang Z. et al.* Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM): from bench to clinic. // Mutation Research. 2011.V. 728. N2. P. 47-66.

5. *Chang X., Tou J.C., Hong C. et al.* 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. // Carcinogenesis. 2005. V . 26. N4. P. 771-778.

6. *Dalessandri K.M., Firestone G.L., Fitch M.D. et al.* Pilot study: effect of 3,3'-diindolylmethane supplements on urinary hormone metabolites in postmenopausal women with a history of early-stage breast cancer. // Nutrition and Cancer. 2004. V. 50. N2. P. 161-167.

7. *Del Priore G., Gudipude D.K., Montemarano N. et al.* Oral diindolylmethane (DIM): pilot evaluation of nonsurgical treatment for cervical dyslasia. // Gynecologic Oncology. 2010. V. 116. N 3. P. 464-467.

8. *Garikapaty V.P., Ashok B.T., Tadi K. et al.* 3,3'-Diindolylmethane down-regulates pro-survival pathway in hormone independent prostate cancer. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006. V. 340. P. 718-725.

9. *Ge X., Yannai S., Rennert G. et al.* 3,3'-Diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1996. V. 228. P. 153-158.

10. *Heath E.I., Heilbrun L.K., Li J. et al.* A phase I dose-escalation study of oral BR-DIM (BioResponse 3,3'-Diindolylmethane) in castrate-resistant, non-metastatic prostate cancer. // American Journal of Translational Research. 2010. V. 2. N4. P. 402-411.

11. *Kong D., Li Y., Wang Z. et al.* Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. // Cancer Research. 2007. V. 67. N 7. P. 3310-3319.

12. *Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. // Nature. 2001. V. 414. P. 105-111.

13. *Semov A., Iourtchenko l., Lin Fang Liu et al.* Diindolylmethane (DIM) selectively inhibits cancer stem cells. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012. V. 424. P. 45-51.

Перейти в оглавление статьи >>>

ISSN 1999-7264

© Вестник РНЦРР Минздрава России

© Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России