

3,3'-ДИИНДОЛИЛМЕТАН – СЕЛЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В.И. Киселев¹, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН,
В.Ю. Алахов², доктор биологических наук, профессор, **А.Б. Семов**², кандидат биологических наук,
Л.В. Юрченко², кандидат биологических наук, **Лиу Лин Фанг**², Ms.Sci., **Ли Шенгмин**², Ph.D.,
Ксю Ян², Ms.Sci., **Ксяюксу Су**², Ms.Sci., **Е.Л. Муйжнек**³, кандидат биологических наук,
М.А. Пальцев¹, академик РАН и РАМН, профессор

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

²Supratek Pharma Inc., Монреаль, Канада,

³ЗАО «МираксБиоФарма», Москва, Россия

E-mail: MuizhnekEL@ilmixgroup.ru

Растет количество доказательств, подтверждающих справедливость концепции опухолевых стволовых клеток (ОСК). Становится все более очевидно, что ОСК, обладая повышенной туморогенностью, метастазизирующей активностью и химиорезистентностью, являются источником опухолевого роста, включая развитие рецидивов и метастазов. В связи с этим существует острая необходимость идентификации новых нетоксичных соединений, избирательно действующих на ОСК. Нами впервые обнаружено, что 3,3'-дииндолилметан (ДИМ) является селективным и мощным ингибитором ОСК, культивируемых в бессывороточной среде в виде опухолевых сфероидов. Обработка ДИМ способствовала преодолению химиорезистентности ОСК к традиционным цитотоксическим препаратам. Предварительная инкубация опухолевых сфероидов с ДИМ, предшествовавшая их имплантации сингенным мышам, значительно тормозила развитие первичных опухолевых очагов и повышала выживаемость животных по сравнению с контролем. При использовании инновационных нанобиотехнологических подходов нами разработаны 2 лекарственных формуляции, в которых биодоступность ДИМ существенно повышена по сравнению с кристаллическим ДИМ, а также единственным формулированным аналогом – препаратом BioResponse-DIM (BR-DIM). Это позволяет максимально реализовать феноменальный терапевтический потенциал данного активного вещества.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки; 3,3'-дииндолилметан; Траниласт; таргетная противоопухолевая терапия

3,3'-DIINDOLYLMETHANE IS A SELECTIVE INHIBITOR OF CANCER STEM CELLS ACTIVITY

V.I. Kiselev¹, V.Yu. Alakhov², A.B. Semov², L.V. Iourtchenko²,

Liu Lin Fang², Li Shengmin², Xu Yan², Su Xiaoxue², E.L. Muizhnek³, M.A. Paltsev¹

¹National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

²Supratek Pharma Inc., Montreal, Canada

³ZAO «MiraxBioPharma», Moscow, Russia

There is a growing body of evidence confirming the validity of the concept of cancer stem cells (CSCs). It is becoming increasingly obvious that CSCs, possessing higher tumorigenicity, metastasis-initiating activity and chemoresistance, are a source of tumor growth, including the development of recurrences and metastases. In this regard, there is an urgent need to identify new non-toxic compounds that selectively act on CSCs. We have been the first to discover 3,3'-diindolylmethane (DIM) to be a selective and potent inhibitor of CSCs, cultured in serum-free medium as tumor spheroids. Treatment with DIM helped to overcome chemoresistance of CSCs to conventional cytotoxic drugs. Pre-incubation of tumor spheroids with DIM, which preceded the implantation into syngeneic mice significantly retarded the development of primary tumor foci and increased the survival of animals compared with control. With the use of innovative nanobiotechnological approaches we have developed two drug formulations in which bioavailability of DIM has been significantly increased compared with the crystalline DIM, and with the only formulated analogue – drug BioResponse-DIM (BR-DIM). This allows realize to the fullest degree the phenomenal therapeutic potential of this active substance.

Key words: cancer stem cells, 3,3'-diindolylmethane, Tranilast, targeted anti-cancer therapy

Согласно общепринятой стохастической (вероятностной) модели канцерогенеза, опухолевая трансформация определяется комплексом случайных генетических нарушений (мутаций) в единичной клетке или небольшом количестве клеток с последующей селекцией клеточных клонов с неконтролируемой пролиферацией и пониженным уровнем апоптотической гибели. В соответствии с этой моделью любая клетка

организма может стать источником опухоли и все клетки в составе растущей опухоли имеют одинаковый туморогенный (опухолеобразующий) потенциал. Однако в последние годы все более популярной становится другая модель канцерогенеза, в основе которой лежит так называемая концепция опухолевых стволовых клеток. Данная концепция объясняет происхождение преобладающего большинства опухолей только из особой

минорной (<1% всех клеток опухоли) субпопуляции недифференцированных опухолевых клеток, обладающих свойствами стволовых, и(или) их ближайших, более дифференцированных потомков – прогениторных клеток. Подобно нормальным стволовым клеткам, опухолевые стволовые клетки (ОСК), называемые также опухольиницирующими клетками (tumor-initiating cells), способны к самообновлению и дальнейшей дифференцировке в обычные нетуморогенные опухолевые клетки, составляющие основную массу опухоли [24].

В настоящее время справедливость теории ОСК подкреплена огромным количеством экспериментальных и клинических фактов. ОСК, впервые обнаруженные при остром миелолейкозе, впоследствии были выявлены при многих видах солидного рака [23]. Установлен широкий спектр молекулярных маркеров (антигенов), определяющих фенотип ОСК. Доказана возможность прямой инциации опухолевого роста *in vivo* при ксенотрансплантации малого количества (10–500) таких клеток иммунодефицитным животным. Разработаны методы получения и изучения свойств ОСК в условиях *in vitro*.

Помимо способности к самообновлению и дифференцировке, другим важнейшим свойством ОСК является повышенная способность к миграции и метастазированию, обусловленная в первую очередь умением расти и размножаться в свободном, неадгезивном состоянии. Присущий ОСК (а также нормальным стволовым клеткам) феномен «anchorage independence» позволяет им выживать и пролиферировать в неадгезивных условиях и при культивировании *in vitro* на бессывороточных средах с добавлением ростовых факторов образовывать объемные клеточные конгломераты в форме сфер (сфероидов). Способность к образованию неадгезивных сфероидов показана для ОСК различного происхождения и считается основополагающим свойством последних [23, 24].

Наконец, еще одним характерным и клинически важным признаком ОСК является присущая им множественная лекарственная устойчивость (резистентность). Установлено, что химиорезистентность ОСК обусловлена комплексом их биологических свойств, в частности повышенной активностью ДНК-репаративных систем, гиперэкспрессией АВС-мембранных транспортеров и антиапоптотических белков [24]. В последние годы обогащение популяции ОСК в результате инкубации опухолевых клеточных линий с препаратами традиционной химиотерапии (Доксорубицином, Цисплатином, Этопозидом, Митоксантроном) стало одним из методов получения ОСК [16]. Появляется все больше доказательств того, что неуспешность во многих случаях традиционной противоопухолевой химиотерапии и возникновение на ее фоне опухолевых рецидивов и метастазов объясняется элиминацией в ходе такого лечения только массы дифференцированных опухолевых клеток и нечувствительностью к нему высокотуморогенных химиорезистентных ОСК [21].

Таким образом, препараты, действие которых направлено на избирательное подавление активности ОСК, имеют огромную потенциальную значимость для таргетной противоопухолевой терапии и профилактики. В соответствии с концепцией ОСК такие препараты должны применяться в комбинации со стандартными химиотерапевтическими средствами с целью более эффективной элиминации опухоли и предотвращения рецидива заболевания. Однако существующие немногочисленные лекарственные средства – ингибиторы ОСК – или недостаточно эффективны (Метформин), или характеризуются чрезмерно высокой токсичностью (Салиномицин). В течение последних нескольких лет получены интересные данные о перспективности использования в качестве ингибиторов ОСК агонистов арил-гидрокарбонных рецепторов (AhRs) [10, 26], в частности известного антиаллергенного препарата Траниласта, обладающего также противоопухолевой активностью [19]. AhR – это фактор транскрипции, известный в первую очередь как рецептор, который связывается с токсинами (2,3,7,8-тетрахлородибензо-р-диоксин), а также с нетоксичными лигандами.

Мы предположили, что 3,3'-дииндолилметан (ДИМ) – вещество природного происхождения с доказанной мультитаргетной противоопухолевой активностью [4], являющееся одновременно нетоксичным агонистом AhRs [6], может оказаться эффективным ингибитором ОСК. В данном исследовании сравнивали антипролиферативное действие ДИМ и Траниласта на панели клеточных линий нескольких карцином и меланомы, которая включала родительские адгезивные опухолевые клетки и их аналоги, обладающие свойствами стволовых клеток. Наличие селективной ингибирующей активности ДИМ в отношении ОСК было изучено нами также в экспериментах *in vivo* на сингенной животной модели. В условиях *in vitro* было исследовано влияние ДИМ на основополагающие свойства ОСК: способность к самообновлению и химиорезистентность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Клеточную линию H460 (немелкоклеточный рак легкого человека) культивировали в среде RPMI-1640. Клеточные линии MCF-7 (рак молочной железы человека), B16, B16/F10 (мышинная меланома) и KB (рак головы и шеи) культивировали в среде DMEM. B16/F10 – это выведенная *in vivo* разновидность клеток B16 с повышенной метастатической активностью и множественной химиорезистентностью. Клеточные линии MESSA (рак матки человека) и Lovo (рак толстой кишки человека) поддерживали в среде McCo5A и F12 соответственно, клеточные линии культивировали в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C. Во все среды добавляли 10% эмбриональную бычью сыворотку (FBS), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Все реактивы для клеточного культивирования являлись продуктами компании Invitrogen.

Реактивы. В экспериментах использовали ДИМ (3,3'-метандиилбис(1H-индол); Alexis Corporations), Траниласт (N-[3,4-диметоксициннамоил]антраниловая кислота; Sigma), Паклитаксел (Bioxel Pharma), Доксорубин (Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd.) и SN-38 (Haorui Pharma-Chem Inc.), растворенные в DMSO (Sigma). Для роста опухолевых сфероидов, согласно рекомендациям производителя, использовалась среда СпТ-27 с соответствующими ростовыми факторами, разработанная для поддержания роста прогениторных клеток (CELLnTEC Advanced Cell Systems).

Культивирование первичных и вторичных опухолевых сфероидов. Рост опухолевых клеток в суспензии оценивали, как описано ранее [19]. Клетки определенной опухолевой линии суспендировали в бессывороточной среде СпТ-27, содержащей факторы роста, после чего высевали в 6-луночные пластиковые планшеты со сверхнизкой адсорбцией (Corning) в количестве 4–6 тыс. клеток на лунку (3 параллельные пробы) и культивировали в течение 8–14 дней. Дважды в неделю в культуральную среду добавляли свежеприготовленный раствор факторов роста. Определяли суммарное количество опухолевых сфероидов под микроскопом (40×), а затем пересчитывали на 1000 клеток. Процентную долю ОСК рассчитывали как количество опухолевых сфероидов на 100 клеток.

При изучении влияния ДИМ и Траниласта на образование первичных опухолевых сфероидов в 96-луночные пластиковые планшеты со сверхнизкой адсорбцией помещали по 500 клеток опухолевой линии (В16, В16/Ф10, КВ, Н460) на лунку (3 параллельные пробы) и культивировали в бессывороточной среде, содержащей ростовые факторы, в течение 8 дней. В течение всего времени инкубации в среде присутствовали ДИМ или Траниласт в различных концентрациях. Количество опухолевых сфероидов подсчитывали под микроскопом (40×); полученные величины обрабатывали статистически, используя двусторонний *t*-критерий Стьюдента. Концентрации ДИМ и Траниласта, ингибирующие образование опухолевых сфероидов на 50% (IC_{50}), рассчитывали с помощью нелинейного фиттинга кривых титрования.

Способность ОСК к самообновлению оценивали по образованию опухолевых сфероидов следующего поколения. Для этого первичные сфероиды собирали посредством мягкого центрифугирования, диссоциировали (трипсинизировали) до получения суспензии единичных клеток, подсчитывали, после чего повторно высевали в 96-луночные планшеты со сверхнизкой адсорбцией в количестве 500 клеток на лунку (3 параллельные пробы) и выращивали в бессывороточной среде, содержащей ростовые факторы, в течение 8–14 дней. Количество вторичных опухолевых сфероидов подсчитывали под микроскопом (40×); полученные величины обрабатывали статистически, используя двусторонний *t*-критерий Стьюдента.

При изучении влияния ДИМ на самообновление ОСК первичные опухолевые сфероиды (линии В16, В16/Ф10, КВ, Н460) выращивали в 6-луночных пластиковых планшетах со сверхнизкой адсорбцией в отсутствие (контроль) и в присутствии 2 мкМ ДИМ (опыт) (по 3 параллельные пробы) в течение 8 дней, после чего получали из них опухолевые сфероиды 2-го поколения, как описано выше. Количество контрольных и опытных вторичных опухолевых сфероидов подсчитывали под микроскопом (40×); полученные величины обрабатывали статистически, используя двусторонний *t*-критерий Стьюдента.

Изучение цитотоксичности. При изучении цитотоксичности ДИМ и Траниласта в отношении родительских адгезивных опухолевых клеток в 96-луночные пластиковые планшеты помещали по 4000 клеток определенной опухолевой линии на лунку (3 параллельные пробы) в 125 мкл соответствующей среды, содержащей 10% FBS. Спустя 24 ч в культуральную среду добавляли ДИМ или Траниласт в различных концентрациях. Выживаемость клеток определяли через 72 ч с помощью реагента для анализа клеточной пролиферации WST-1 (Clontech), согласно протоколу производителя. В отдельном планшете измеряли оптическую плотность контрольных клеток в нулевой момент времени (до добавления исследуемых веществ). Абсолютные значения оптической плотности, полученные при проведении WST-1-анализа, переводили в процентные величины клеточного роста, как описано в [17].

Процент клеточного роста при каждой концентрации препарата рассчитывали как:

$$[(Ti-T0)/(C-T0)] \cdot 100\%$$

для концентраций, при которых $Ti \geq T0$;

$$[(Ti-T0)/(T0-M)] \cdot 100\%$$

для концентраций, при которых $Ti < T0$,

где $T0$ – оптическая плотность в нулевой момент времени; C – оптическая плотность контрольных, необработанных клеток; M – оптическая плотность среды и Ti – оптическая плотность в опытных лунках с определенной концентрацией препарата. Процентные значения могут находиться в интервале от +100% до -100%. Концентрация, вызывающая 50% подавление клеточного роста (IC_{50}), – это концентрация вещества, при которой $100\% \cdot (Ti-T0)/(C-T0) = 50\%$, т.е. количество детектируемых живых клеток после 3-дневного роста составляет $1/2$ от контрольных клеток. Величины IC_{50} рассчитывали с помощью нелинейного фиттинга кривых, описывающих клеточный рост (%) по логарифмическому уравнению с 4 параметрами, используя программное обеспечение GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.).

При изучении влияния ДИМ на лекарственную резистентность ОСК в 6-луночные пластиковые планшеты со сверхнизкой адсорбцией помещали по 100 тыс. клеток опухолевой линии (В16, В16/Ф10, КВ) на

лунку (3 параллельные пробы) и культивировали в бесывороточной среде, содержащей ростовые факторы, в течение 8 дней. Рост опухолевых сфероидов происходил в отсутствие и в присутствии 2 мкМ ДИМ, после чего сфероиды собирали, трипсинизировали и высевали в обычные 96-луночные планшеты в количестве 3000 клеток на лунку (3 параллельные пробы) одновременно с родительскими адгезивными клетками. Клетки росли в FBS-содержащей среде как адгезивные культуры в течение 3 дней в присутствии различных концентраций Паклитаксела, Доксорубицина или SN-38, которые добавляли в культуральную среду спустя 24 ч после посева клеток. Процент клеточного роста при каждой концентрации препарата определяли через 72 ч с помощью реагента для анализа клеточной пролиферации WST-1 (Clontech), как описано выше. Величины IC_{50} рассчитывали с помощью нелинейного фиттинга кривых титрования. Резистентность ОСК относительно родительских адгезивных клеток рассчитывали как отношение: IC_{50} контрольных сфероидов/ IC_{50} адгезивных клеток, а резистентность ОСК, обработанных ДИМ, относительно родительских адгезивных клеток рассчитывали как отношение: IC_{50} сфероидов, обработанных ДИМ/ IC_{50} адгезивных клеток.

Исследования на животных. Мыши линии C57BL/6 были приобретены в Charles River Inc. Все манипуляции, проводимые с животными, были одобрены Комитетом по содержанию и использованию животных (Канада) и проводились согласно политике учреждения, а также «Правилам проведения работ с использованием животных» (РФ). Клетки мышинной меланомы В16 культивировали как опухолевые сфероиды без добавления ДИМ (В16/ОСК – группа сравнения) или с добавлением 2 мкМ ДИМ (В16/ОСК + ДИМ – основная группа). Перед имплантацией опухолевые сфероиды собирали посредством мягкого центрифугирования, промывали и трипсинизировали.

Для оценки выживаемости клеток использовали краситель трипановый синий. 1000 клеток в 200 мкл среды, содержащей 30% матригель, имплантировали подкожно в боковую область мышей. В группе В16/ОСК было 5, а в группе (В16/ОСК + ДИМ) – 6 животных. В обеих группах каждые 3 дня определяли объем опухолей по формуле: $TV = L \cdot W^2/2$, где TV – объем опухоли, L – длина опухоли и W – ширина опухоли, а также оценивали выживаемость животных (%). Животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, когда размер опухоли достигал предела или у животных появлялись признаки заболевания.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили, используя двусторонний *t*-критерий Стьюдента, с помощью программы GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc.). Кривые выживаемости анализировали с помощью логарифмического рангового критерия. Во всех экспериментах достоверность различий между группами $p < 0,05$ расценивалась как статистически значимая.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксичность ДИМ и Траниласта в адгезивных опухолевых клеточных линиях. Величины IC_{50} для ДИМ, полученные в адгезивных клеточных линиях карцином, находились в диапазоне 140–200 мкМ. В адгезивных клетках меланомы ДИМ проявлял большую цитотоксичность ($IC_{50} = 45$ мкМ). Траниласт в клеточных линиях карцином продемонстрировал более высокий ($IC_{50} = 40$ –

Таблица 1

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

Опухолевая клеточная линия	Количество опухолевых сфероидов/1000 клеток	ОСК, %
H460	35	3,5
KB	16	1,6
V16	16	1,6
V16/F10	11,6	1,2
MCF-7	0,5	0,05
Lovo	0,3	0,03
MESSA	0	0

Примечание. Определяли суммарное количество опухолевых сфероидов под микроскопом (40×), а затем пересчитывали на 1000 клеток. Процентную долю опухолевых стволовых клеток рассчитывали как количество опухолевых сфероидов на 100 клеток.

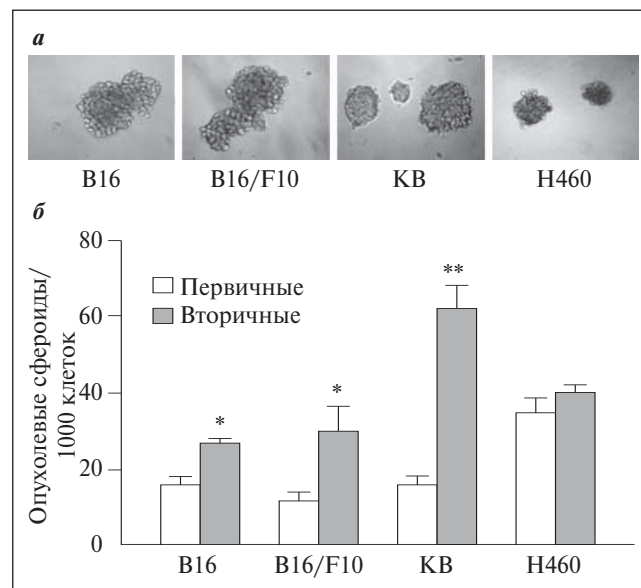


Рис. 1. Образование опухолевых сфероидов в различных опухолевых клеточных линиях. а – Типичные изображения опухолевых сфероидов, образуемых в опухолевых клетках V16, V16/F10, KB и H460 (100×); б – Количество первичных и вторичных опухолевых сфероидов, образованных в клетках V16, V16/F10, KB и H460, в расчете на 1000 клеток. Достоверность различий между группами: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

55 мкМ), а клетках меланомы – менее высокий ($IC_{50} = 100–120$ мкМ) цитотоксический потенциал, чем ДИМ.

Образование первичных и вторичных опухолевых сфероидов. Способность к образованию сфероидов в бессывороточной среде в неадгезивных условиях является основополагающим свойством нормальных и опухолевых стволовых клеток [24]. Так как опухолевые сфероиды имеют клональное происхождение, их количество отражает число ОСК в исходной гетерогенной клеточной популяции [18].

Как видно из табл. 1, наиболее высокое процентное содержание (3,5%) ОСК обнаружено нами в клетках Н460, далее по убывающей следовали клетки КВ, В16 и В16/Ф10. Существенно меньшее процентное содержание ОСК выявлялось в клетках МСF-7

и Lovo; в клетках МESSA ОСК не обнаружено. Для дальнейших экспериментов были выбраны первые 4 клеточные линии (Н460, КВ, В16, В16/Ф10), показавшие наибольшую способность к образованию опухолевых сфероидов. Следует отметить, что в клетках КВ и Н460 опухолевые сфероиды были компактными, плотными, правильной сферической формы. В клетках В16 и их разновидности – клетках В16/Ф10 – сфероиды были более рыхлыми, неправильной формы, часто образовывали макроагрегаты (рис. 1а). Во всех 4 тестируемых клеточных линиях выявлено образование вторичных опухолевых сфероидов, причем эффективность образования сфероидов 2-го поколения была выше, чем 1-го, особенно в клетках КВ (рис. 1б). Таким образом, все обнаруженные нами

ОСК проявляли характерную для них выраженную способность к самообновлению.

Влияние ДИМ и Траниласта на образование первичных опухолевых сфероидов. Во всех 4 исследуемых клеточных линиях способность ДИМ ингибировать образование опухолевых сфероидов была значительно выше, чем Траниласта. На рис. 2а представлены кривые титрования для ДИМ и Траниласта. Соответствующие значения IC_{50} для ДИМ и Траниласта представлены в табл. 2, из которой видно, что величины IC_{50} , отражающие степень ингибирования образования опухолевых сфероидов для ДИМ, находятся в низком, микромолярном, диапазоне – 0,5–2,8 мкМ. При этом ДИМ ингибировал рост опухолевых сфероидов в 30–300 раз эффективнее, чем рост родительских адгезивных клеток. Траниласт также ингибировал образование опухолевых сфероидов, однако величины IC_{50} для него составляли 10–19 мкМ, что приблизительно на порядок выше соответствующих величин для ДИМ и лишь в 3–10 раз ниже концентраций, необходимых для ингибирования роста родительских адгезивных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ДИМ является не только существенно более эффективным, но и более селективным ингибитором ОСК, чем Траниласт. Необходимо отметить, что, помимо сокращения числа опухолевых сфероидов, в присутствии ДИМ и Траниласта

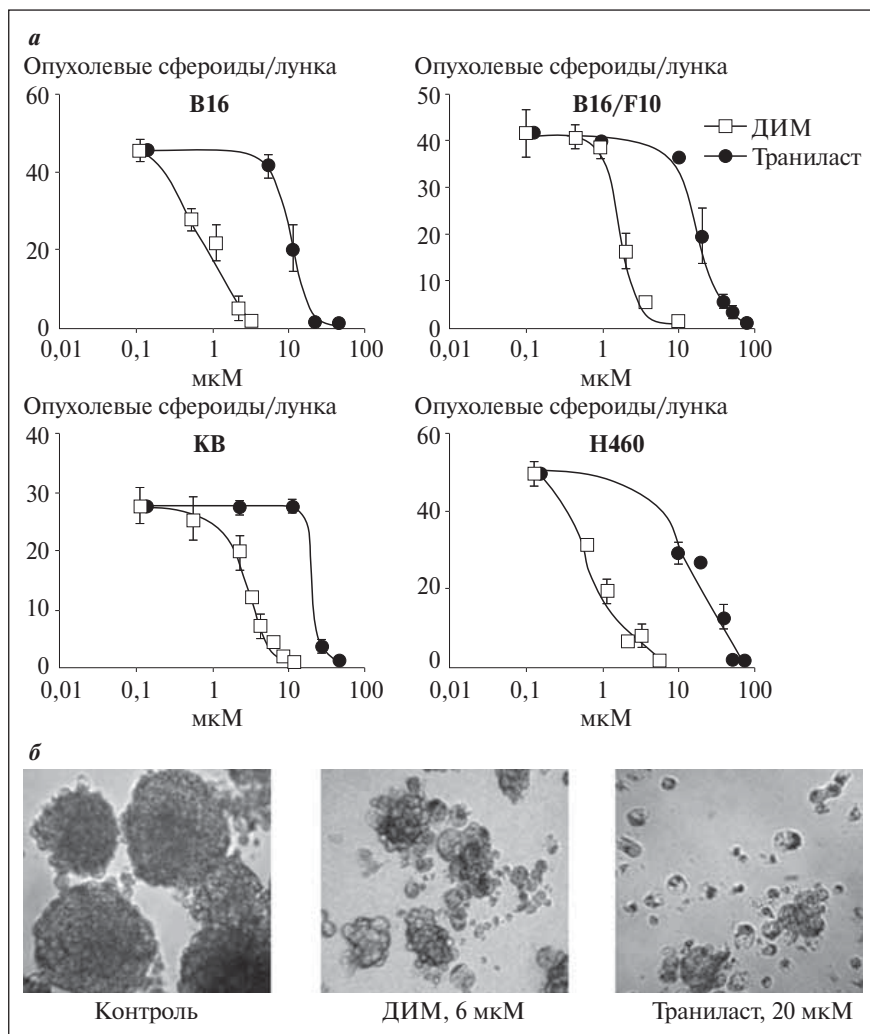


Рис. 2. Влияние ДИМ и Траниласта на образование опухолевых сфероидов. а – Количество опухолевых сфероидов, образованных в клетках В16, В16/Ф10, КВ и Н460 в присутствии различных концентраций ДИМ и Траниласта. Количество опухолевых сфероидов подсчитывали под микроскопом (40×). По оси абсцисс – концентрации ДИМ и Траниласта (мкМ), по оси ординат – количество опухолевых сфероидов на лунку; б – Типичные изображения контрольных опухолевых сфероидов, а также опухолевых сфероидов, обработанных 6 мкМ ДИМ и 20 мкМ Траниласта, в опухолевых клетках КВ (100×)

наблюдалось уменьшение их размера. Типичные изображения опухолевых сфероидов после их обработки ДИМ или Траниластом представлены на рис. 26.

ДИМ ингибирует самообновление ОСК. Культивирование первичных опухолевых сфероидов в присутствии ДИМ ингибировало их способность к самообновлению, о чем свидетельствовало пониженное количество вторичных опухолевых сфероидов, образованных из 1000 первичных клеток (рис. 3). Эффективность образования вторичных опухолевых сфероидов снижалась в 1,9 ($p < 0,05$) и 2,4 раза ($p < 0,01$) в клетках KB и H460 соответственно. Что касается клеток V16 и V16/F10, то эффективность образования вторичных опухолевых сфероидов в них снижалась в 1,7 и 3,0 раза соответственно, однако эффект не достигал статистической значимости.

ДИМ обращает лекарственную резистентность ОСК. В 3 из 4 изучаемых клеточных линий (за исключением линии H460) ОСК, культивируемые как опухолевые сфероиды, продемонстрировали повышенную резистентность к тестируемым цитотоксическим препаратам (табл. 3). Так, резистентность к Паклитакселу повышалась в 2,7–3,7 раза, к Доксорубину – в 2,3–5,4 раза (за исключением клеток V16/F10, которые изначально проявили чрезвычайно высокую резистентность к Доксорубину) и к SN-38 – в 2,0–12,0 раза. Добавление ДИМ при культивировании первичных сфероидов значительно повышало их чувствительность к цитотоксическим препаратам. Значения IC_{50} для всех препаратов в сфероидах, обработанных ДИМ, были всего в 1,0–1,8 раза выше, чем в родительских адгезивных клетках. В 2 случаях – с Паклитакселом и SN-38 – в клетках V16/F10 сфероиды, обработанные ДИМ, проявили даже большую чувствительность, чем родительские адгезивные клетки. На основании полученных данных можно заключить, что ДИМ проявляет выраженный сенсibiliзирующий эффект в отношении всех тестируемых цитотоксических препаратов – Паклитаксела, Доксорубина и SN-38, молекулярными мишенями которых являются, соответственно, микротрубочки, топоизомераза II и топоизомераза I. Таким образом, ДИМ повышает чувствительность ОСК к цитотоксическим препаратам независимо от механизма противоопухолевого действия последних.

ДИМ ингибирует *in vivo* рост опухолей, индуцированных ОСК. Для того чтобы выяснить, распространяются ли обнаруженные нами *in vitro* ингибирующие свойства ДИМ на условия *in vivo*, мы провели сравнительное исследование роста первичных опухолей, индуцированных ОСК, и ОСК, предварительно обработанными ДИМ. С этой целью опухолевые сфероиды, полученные из клеток мышиной меланомы V16, и аналогичные опухолевые сфероиды, полученные в присутствии 2 мкМ ДИМ, инъецировали подкожно сингенным мышам и наблюдали за динамикой опухолевого роста на протяжении 30 дней. Хотя каждому животному имплантировалось всего 1000 сфероидов, у всех мышей развивались злокачественные опухоли,

что свидетельствует об очень высоком туморогенном потенциале имплантированных меланомных клеток.

Как видно из рис. 4а, рост опухолей после инъекции ОСК, предварительно обработанных ДИМ, был существенно медленнее, чем опухолей, индуцированных необработанными ОСК ($p = 0,02$). К 30-му дню эксперимента средний объем опухоли в опытной группе (V16/ОСК + ДИМ) был почти вдвое меньше, чем в контрольной (V16/ОСК). Из полученных результатов следует, что уменьшение пула ОСК под действием ДИМ приводит к значимому подавлению роста индуцируемых ими первичных опухолей. Нами было также установлено, что обработка опухолевых сфероидов ДИМ, предшествующая их имплантации, не только замедляла последующий рост первичных опухолей, но и повышала выживаемость экспериментальных животных (рис. 4б). Различия в показателях выживаемости между группами достигали статистической значимости ($p = 0,03$).

Таблица 2

ИНГИБИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ В ПРИСУТСТВИИ ДИМ И ТРАНИЛАСТА

Опухолевая клеточная линия	ДИМ IC_{50} , мкМ	Кратность снижения IC_{50} ДИМ	Траниласт IC_{50} , мкМ	Кратность снижения IC_{50} Траниласта
V16	0,7	66	10	9,6
V16/F10	1,7	26	19	6,4
KB	2,8	73	18	3,0
H460	0,5	308	14	2,7

Примечание. Концентрации ДИМ и Траниласта, ингибирующие образование опухолевых сфероидов на 50% (IC_{50}), рассчитывали путем нелинейного фиттинга кривых титрования (рис. 2а). Кратность снижения IC_{50} ДИМ и Траниласта рассчитывали для каждого вещества как отношение IC_{50} опухолевых сфероидов/ IC_{50} адгезивных клеток.

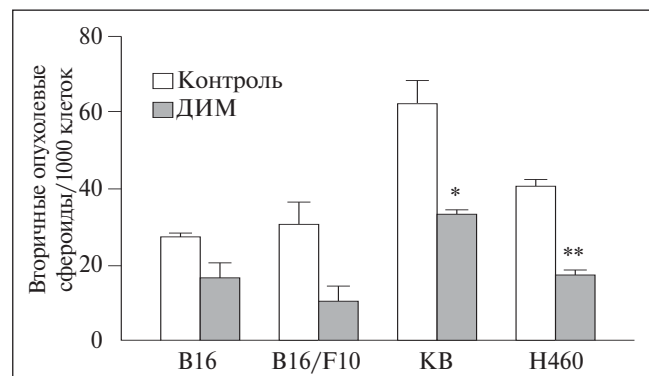


Рис. 3. Влияние ДИМ на самообновление ОСК различных клеточных линий. По оси абсцисс – опухолевые клеточные линии V16, V16/F10, KB и H460, по оси ординат – количество вторичных опухолевых сфероидов, образованных в отсутствие (контроль) и в присутствии 2 мкМ ДИМ в расчете на 1000 клеток. Достоверность различий между группами: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

В настоящее время ДИМ является одним из самых перспективных соединений природного происхождения, обладающих мультитаргетной противоопухолевой активностью. В многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что ДИМ эффективно модулирует активность в общей сложности более 20 молекулярных мишеней (белков и генов), опосредующих основные биологические процессы канцерогенеза: гормональнозависимую и гормональнонезависимую гиперпролиферацию, пониженный апоптоз, повышенные неоангиогенез, хроническое воспаление, инвазию и метастазирование [3, 4]. Единственным существенным препятствием при создании на основе ДИМ противоопухолевых препаратов является низкая биодоступность данного кристаллического вещества в тканях-мишенях. Обычно ДИМ демонстрирует низкую растворимость в физиологических жидкостях и имеет ограниченную способность проникать через барьерные мембраны. Известна также способность ДИМ связываться с белками плазмы крови и участвовать в различных неспецифических взаимодействиях в кровотоке, что еще больше снижает эффективность доставки данного соединения к очагу заболевания.

В то же время все большую популярность и научную обоснованность приобретает концепция, согласно которой источником опухолевого роста, в том числе образования опухолевых рецидивов и метастазов, является особая минорная популяция опухолевых не-

дифференцированных клеток — так называемых ОСК, нечувствительных к стандартным методам лечения — химиотерапии и лучевой терапии. Поиском веществ и разработкой на их основе лекарственных препаратов, избирательно подавляющих активность ОСК, занимаются многие исследователи за рубежом. Среди соединений такого рода особенно привлекательны нетоксичные вещества природного происхождения [15]. Как отмечалось выше, недавно было показано, что ингибирующей активностью в отношении ОСК обладают синтетические агонисты арил-гидрокарбонных рецепторов, в частности обладающий противоопухолевой активностью антиаллергенный препарат Траниласт [19].

Мы исследовали наличие у ДИМ в условиях *in vitro* и *in vivo* способность ингибировать активность ОСК, а также повышать чувствительность ОСК к традиционным цитотоксическим препаратам. Согласно данным литературы, ДИМ, как и Траниласт, является экзогенным лигандом арил-гидрокарбонных рецепторов, и взаимодействие AhRs с ДИМ опосредует один из механизмов противоопухолевой активности данного индола [6].

Нами обнаружено образование опухолевых сфероидов в 6 опухолевых клеточных линиях различного происхождения; при этом процентное содержание ОСК варьировало от 0,03 до 3,5%, что хорошо коррелирует с содержанием ОСК, определявшимся по пониженному включению витального красителя Hoechst 33342 [14].

Таблица 3

**ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОСК
К ЦИТОТОКСИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДИМ**

	IC ₅₀ , мкМ			Резистентность, кратность	
	Адгезивные клетки	Контрольные сфероиды	Сфероиды, обработанные ДИМ	ОСК относительно адгезивных клеток	ОСК, обработанные ДИМ, относительно адгезивных клеток
Паклитаксел					
B16	0,041	0,15	0,042	3,7	1,0
B16/F10	3,1	9,9	2,2	3,2	0,7
KB	0,0017	0,0046	0,0021	2,7	1,2
Доксорубицин					
B16	0,12	0,27	0,21	2,3	1,8
B16/F10	>10	>10	>10		
KB	0,08	0,43	0,12	5,4	1,5
SN-38					
B16	0,09	0,17	0,14	2,0	1,2
B16/F10	0,30	0,62	0,12	2,1	0,4
KB	0,07	0,84	0,10	12,0	1,4

Примечание. Концентрации цитотоксических препаратов, ингибирующие образование опухолевых сфероидов на 50% (IC₅₀), рассчитывали путем нелинейного фиттинга кривых титрования (не показано на рис.). Резистентность ОСК относительно родительских адгезивных клеток рассчитывали как отношение: IC₅₀ контрольных сфероидов/IC₅₀ адгезивных клеток, а резистентность ОСК, обработанных ДИМ, относительно родительских адгезивных клеток рассчитывали как отношение: IC₅₀ сфероидов, обработанных ДИМ/IC₅₀ адгезивных клеток.

В тестируемых клеточных линиях ДИМ в низких (микромольных) концентрациях эффективно ингибировал образование опухолевых сфероидов, при этом величины IC₅₀ для ДИМ в отношении опухолевых сфероидов были в 30–300 раз ниже соответствующих значений в отношении родительских адгезивных клеток. ДИМ, оказавшись значительно более эффективным и селективным ингибитором ОСК, чем другой известный агонист AhRs — Траниласт, подавлял образование опухолевых сфероидов в том же диапазоне концентраций, что и Салиномицин — первый селективный ингибитор ОСК, идентифицированный при широкомасштабном скрининге химических соединений [9]. Второй известный агент, избирательно действующий на ОСК, — Метформин, подавлял образование опухолевых сфероидов в концентрациях, в 50–100 раз более высоких [12], чем ДИМ.

Мы установили, что ДИМ негативно влияет на основополагающее свойство ОСК — способность

к самообновлению, снижая количество вторичных опухолевых сфероидов, образованных из 1000 первичных клеток, в 2–3 раза.

Другим характерным и клинически важным признаком ОСК является присущая им множественная лекарственная устойчивость. В соответствии с опубликованными данными [16, 23, 24], мы также обнаружили, что ОСК, культивируемые как опухолевые сфероиды, проявляли повышенную резистентность к ряду стандартных цитотоксических препаратов – таких, как Доксорубин, Паклитаксел и SN-38. При наличии низких, микромолярных, концентраций ДИМ во время роста опухолевых сфероидов обращало их химиорезистентность. Следовательно, можно ожидать, что препараты на основе ДИМ окажутся эффективными в комплексе с существующими цитотоксическими средствами у пациентов с рефрактерными или рецидивирующими опухолями.

Наконец, в экспериментах *in vivo* нам удалось обнаружить такой важный факт, как способность ДИМ подавлять рост опухолей, индуцированных ОСК. Обработка опухолевых сфероидов ДИМ, предшествующая их имплантации сингенным мышам, существенно замедляла рост образующихся в дальнейшем первичных опухолей по сравнению с опухолями, индуцированными необработанными сфероидами. Как следствие, выживаемость животных, которым имплантировали опухолевые сфероиды, обработанные ДИМ, оказалась значительно выше, чем мышам с имплантированными ОСК, не обработанными ДИМ. В предыдущих работах, в которых была установлена противоопухолевая активность ДИМ в отношении ксенотрансплантатных опухолей, данное вещество вводили животным перорально или подкожно, ежедневно после прививки ксеногенных опухолевых клеток [5, 13]. Нами показано, что ДИМ способен подавлять рост опухолей у мышей, если присутствовал при культивировании клеток, вызывающих эти опухоли, до их имплантации животным. При этом после имплантации опухоли ДИМ животным не вводили. В этом отношении ДИМ имеет сходство с Салиномицином – известным ингибитором ОСК [9].

Итак, мы показали, что ДИМ ингибирует рост родительских адгезивных опухолевых клеток с IC_{50} находящейся в диапазоне 45–200 мкМ, в то время как та же величина для ингибирования роста опухолевых сфероидов (ОСК) составляет 0,5–2,8 мкМ, или 500–2800 нМ. Важно сравнить указанные концен-

трации с концентрациями ДИМ, которые могут быть достигнуты в организме человека при пероральном приеме данного вещества. Известно, что в сыворотке крови здоровых добровольцев, с хорошей переносимостью принимавших перорально препарат BioResponse-DIM (BR-DIM) (BioResponse, LLC, Boulder, CO, USA) в однократной дозе 200 мг, средняя максимальная концентрация ДИМ в сыворотке крови (C_{max}) составляла 104 нг/мл, или 423 нМ [22]. BR-DIM представляет собой формуляцию ДИМ с улучшенной на 50% биодоступностью по сравнению с кристаллическим ДИМ. В I фазе другого клинического исследования, проводившегося у больных раком предстательной железы, после перорального приема BR-DIM в максимальной толерантной дозе 300 мг средняя величина C_{max} составляла 236 нг/мл, или 960 нМ [11]. Дальнейшее увеличение дозировки BR-DIM не приводило к росту C_{max} в плазме крови [25]. Однако для проведения II фазы данного исследования авторы рекомендуют применять однократную толерантную дозу BR-DIM, равную 225 мг, при которой средняя C_{max} составляла 134 нг/мл, или 545 нМ. Таким образом, концентрации ДИМ, которые могут быть достигнуты в результате приема пациентами доступных сегодня препаратов ДИМ, не достигают (в лучшем случае, находятся на нижней границе) диапазона концентраций ДИМ, необходимых для ингибирования ОСК, и существенно (на 1–2 порядка) ниже концентраций ДИМ, для которых показаны биологические эффекты в отношении нестволовых (адгезивных) опухолевых клеток в условиях *in vitro* [8, 20]. Таким образом, с помощью

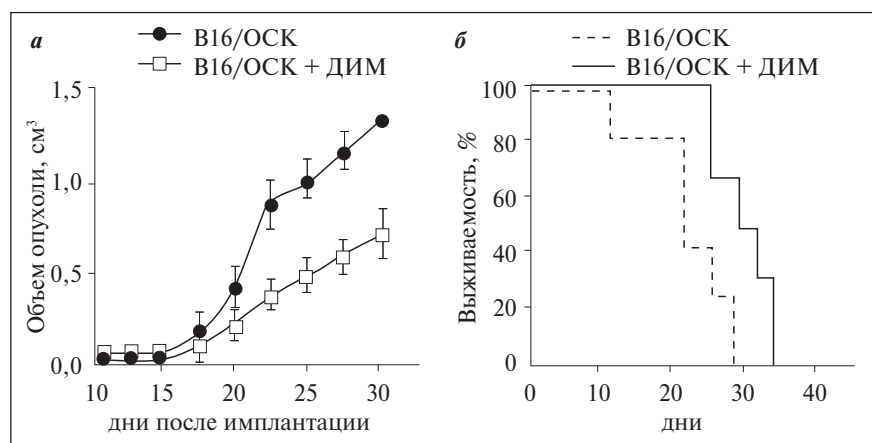


Рис. 4. ДИМ ингибирует активность ОСК в условиях *in vivo*. а – Рост первичных опухолей, индуцированных опухолевыми сфероидами линии V16, выращенными в отсутствие (V16/OСК) и в присутствии 2 мкМ ДИМ (V16/OСК + ДИМ), после их имплантации мышам C57BL/6. По оси абсцисс – дни после имплантации опухоли, по оси ординат – объем первичных опухолей; $p=0,02$ согласно двустороннему *t*-критерию Стьюдента; б – Выживаемость (%) мышам C57BL/6 с первичными опухолями, индуцированными опухолевыми сфероидами линии V16, выращенными в отсутствие (V16/OСК) и в присутствии 2 мкМ ДИМ (V16/OСК + ДИМ), после их имплантации мышам C57BL/6. По оси абсцисс – дни, по оси ординат – выживаемость, %; $p=0,03$ согласно логарифмическому ранговому критерию

препарата BR-DIM невозможно достичь необходимых конечных концентраций активного вещества, обеспечивающих его максимальный терапевтический эффект. Вероятно, именно по этой причине при лечении дисплазии шейки матки препаратом BR-DIM не удалось добиться достоверного клинического эффекта [7].

С учетом сказанного, при использовании инновационных биотехнологических подходов нами были разработаны и зарегистрированы 2 лекарственных формуляции ДИМ, пероральная биодоступность которого повышена по сравнению с существующими аналогами в 5–10 раз. Повышение биодоступности ДИМ в составе 1-го препарата – Цинетон® – достигается благодаря получению композиций мицеллярных наночастиц, состоящих из ДИМ и водорастворимого неионного блок-сополимера Плюроники F127 [2]. В составе 2-й лекарственной формы – препарата Инфемин®, также созданного на основе современного технологического решения, ДИМ находится в растворенном состоянии, благодаря чему быстро проникает в кровотоки и попадает в органы-мишени [1].

Наиболее рациональным способом использования данных препаратов при онкологических заболеваниях представляется их комбинированное применение со стандартными химиотерапевтическими препаратами и/или лучевой терапией. В этом случае активно проникающий в целевые органы и ткани ДИМ будет не только повышать противоопухолевый

эффект стандартного лечения, направленного против нетуморогенных дифференцированных опухолевых клеток, но и эффективно элиминировать ОСК, препятствуя при этом развитию множественной лекарственной резистентности, рецидивов и метастазов.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что 3,3'-дииндолилметан (ДИМ) является селективным и мощным ингибитором опухолевых стволовых клеток (ОСК), культивируемых в бессывороточной среде в виде опухолевых сфероидов.
2. Показано, что обработка ДИМ способствует преодолению химиорезистентности ОСК к традиционным цитотоксическим препаратам.
3. Установлено, что инкубация опухолевых сфероидов с ДИМ, предшествующая их имплантации сингенным мышам, значительно тормозит развитие первичных опухолевых очагов и повышает выживаемость животных по сравнению с контролем.
4. При использовании инновационных нанобиотехнологических подходов разработаны 2 лекарственных формуляции, в которых биодоступность ДИМ существенно повышена по сравнению с кристаллическим ДИМ и существующим аналогом – BR-DIM, что позволяет максимально реализовать противоопухолевый терапевтический потенциал данного активного вещества и повысить эффективность традиционного противоопухолевого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев В.И. Патент на изобретение РФ № 2419426 «Лекарственное средство на основе дииндолиметана (ДИМ) с повышенной биодоступностью и его использование в лечении гиперпластических и воспалительных заболеваний человека» / 2010. – Дата приоритета 6.04.2010. Дата публикации 27.05.2011.
2. Киселев В.И., Васильева И.Г. Патент на изобретение РФ № 2409363 «Фармацевтическая композиция для пероральной доставки дииндолиметана (ДИМ) и способы применения этих композиций» / 2009. – Дата приоритета 18.09.2009. Дата публикации 20.01.2011.
3. Киселев В.И., Сидорова И.С., Унанян А.А. и др. Гиперпластические процессы органов женской репродуктивной системы: теория и практика. – М., МЕДПРАКТИКА-М, 2011.
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 // *Mutat. Res.* – 2011; 728: 47–66.
5. Chang X., Tou J., Hong C. et al. 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice // *Carcinogenesis.* – 2005; 26: 771–8.
6. Chen I., McDougal A., Wang F. et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane // *Carcinogenesis.* – 1998; 19: 1631–9.
7. Del Priore G., Gudipude D., Montemarano N. et al. Oral diindolylmethane (DIM): pilot evaluation of nonsurgical treatment for cervical dysplasia // *Gynecol. Oncol.* – 2010; 116 (3): 464–7.
8. Fan S., Meng Q., Saha T. et al. Low concentration of diindolylmethane, a metabolite of indole-3-carbinol, protect against oxidative stress in a BRCA1-dependent manner // *Cancer Res.* – 2009; 69 (15): 6083–91.
9. Gupta P., Onder T., Jiang G. et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening // *Cell.* – 2009; 138: 645–59.
10. Hall J., Barhoover M., Kazmin D. et al. Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation // *Mol. Endocrinol.* – 2010; 24 (2): 359–69.
11. Heath E., Heilbrun L., 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 // *Am. J. Transl. Res.* – 2010; 2: 402–11.
12. Hirsch H., Iliopoulos D., Tschlis P. et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission // *Cancer Res.* – 2009; 69: 7507–11.
13. Kandala P., Srivastava S. 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) // *BMC Med.* – 2012; 10/9.
14. Levina V., Marangoni A., DeMarco R. et al. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties // *PLoS One.* – 2008; 3: e3077.
15. Li Y., Wicha M., Schwartz S. et al. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds // *J. Nutr. Biochem.* – 2011; 22 (9): 799–806.
16. Mimeault M., Batra S. New promising drug targets in cancer- and metastasis-initiating cells // *Drug Discov. Today.* – 2010; 15 (9–10): 354–64.
17. Monks A., Scudiero D., Skehan P. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1991; 83: 757–66.
18. Ponti D., Costa A., Zaffaroni N. et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties // *Cancer Res.* – 2005; 65: 5506–11.
19. Prud'homme G., Glinka Y., Toulina A. et al. Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist // *PLoS One.* – 2010; 5 (11): e13831.
20. Rahman K., Li Y., Wang Z. et al. Gene expression profiling revealed as target of diindolylmethane-induced cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells // *Cancer Res.* – 2006; 66 (9): 4952–9.
21. Rasheed Z., Kowalski J., Smith B. et al. Concise review: Emerging concepts in clinical targeting of cancer stem cells // *Stem Cells.* – 2011; 29 (6): 883–7.
22. Reed G., Sunega J., Sullivan D. et al. Single-dose pharmacokinetics and tolerability of absorption-enhanced 3,3'-diindolylmethane in healthy subjects // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2008; 17: 2619–24.
23. Tang C., Ang B., Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy // *FASEB J.* – 2007; 21 (14): 3777–85.
24. Wicha M., Liu S., Dontu G. Cancer stem cells: an old idea – a paradigm shift // *Cancer Res.* – 2006; 66 (4): 1883–90.
25. Zeligs M. US Patent 6.416.793. Formulation and use of controlled-release indole alkaloids.
26. Zhao S., Kanno Y., Nakayama M. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor represses mammosphere formation in MCF-7 cells // *Cancer Lett.* – 2011; doi: 10.1016/j.canlet.2011.11.025.