

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОЙ ФОРМУЛЯЦИИ ДИИНДОЛИЛМЕТАНА С ВЫСОКОЙ БИОДОСТУПНОСТЬЮ

Киселев В.И.¹, Друх В.М.¹, Кузнецов И.Н.², Муйжнек Е.Л.³, Горбунова Е.А.⁴, Пчелинцева О.И.¹

¹ФГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»; 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

²Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

³Закрытое акционерное общество «МираксБиоФарма»; 121248, г. Москва, Кутузовский пр-кт., 12, стр. 2

⁴ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Академика Опарина д. 4, e-mail: pchelintseva87@mail.ru.

Целью исследования являлось проведение сравнительной оценки фармакокинетики и относительной биодоступности новой фармацевтической композиции на основе 3,3'-дииндолилметана (DIM), содержащей плуроник, и чистой субстанции DIM. Исследование проведено на 98 крысах. Тестируемые вещества вводили двум группам крыс внутривенно в дозе 60 мг/кг. Концентрация активной субстанции в крови измерялась с использованием метода ВЭЖХ. Также оценивались основные фармакокинетические характеристики. Было показано, что C_{max} чистой субстанции DIM в плазме животных составила 0,21±0,02 мкг/мл, в то время как C_{max} улучшенной формуляции DIM достигала 3,23±0,12 мкг/мл. Также было показано, что биодоступность DIM в составе новой фармацевтической композиции, содержащей плуроник, в 17,8 раза выше по сравнению с чистой субстанцией.

Ключевые слова: 3,3'-дииндолилметан (DIM), фармакокинетика, биодоступность, плуроник, доклинические испытания.

COMPARATIVE PHARMACOKINETIC STUDY AND RELATIVE BIOAVAILABILITY OF A NEW PHARMACEUTICAL COMPOSITION BASED ON DIINDOLYLMETHANE.

Kiselev V.I.¹, Drukh V.M.¹, Kuznetsov I.N.², Muzyhnek E.L.³, Gorbunova E.A.⁴, Pchelintseva O.I.¹

¹Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Miklukho-Maklaya St., 6, Moscow, 117198, Russia

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

³ZAO «MiraxBioPharma», 12 Kutuzovsky av., Moscow, 121248, Russia

⁴Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Academica Oparina St., 4, Moscow, 117997, Russia; e-mail: pchelintseva87@mail.ru.

This preclinical study was carried out to estimate pharmacokinetics and relative bioavailability of a new pharmaceutical composition with a high bioavailability comprising 3,3'-diindolylmethane (DIM) and pluronic. A new formulation and pure DIM substance were tested in 98 rats. These substances were intragastrically administered to animals in the doses of 60 mg/kg. Concentrations of DIM in blood plasma were measured by HPLC. Besides, pharmacokinetic parameters were determined. It was shown that C_{max} of the pure DIM substance achieved 0,21±0,02 µg/ml, when C_{max} of a new pharmaceutical composition based on DIM reached 3,23±0,12 µg/ml. Bioavailability of a new pharmaceutical formulation was about 17,8-fold higher compared to pure DIM substance.

Keywords: 3,3'-diindolylmethane (DIM), pharmacokinetics, bioavailability, pluronic, preclinical study.

Введение

Субстанция 3,3'-дииндолилметан (DIM), благодаря мультитаргетному механизму действия, является широко признанным терапевтическим агентом. Одним из наиболее важных свойств данной субстанции является его противоопухолевая активность,

реализуемая за счёт антипролиферативного, проапоптотического и противовоспалительного действия [2-4; 6; 9].

На данный момент рядом авторов проведен ряд доклинических испытаний, подтверждающих противоопухолевый потенциал DIM [3-6]. Однако было выявлено, что субстанция DIM демонстрирует низкую биодоступность в тканях и органах, что усложняет использование всего спектра терапевтических активностей в клинике [1;7]. Недавно нами было проведено сравнительное исследование, целью которого являлась оценка фармакокинетических параметров различных формуляций DIM [8]. Результаты показали низкую биодоступность чистой субстанции DIM, а также его кристаллической формы, вводимых животным перорально в концентрации 200 мг/кг. В то же время в крови экспериментальных животных детектировалась в пять раз более высокая концентрация DIM при использовании жидкой формуляции, вводимой в дозе 0,1 мг/кг.

Поиски путей увеличения биодоступности DIM остаются актуальными. Данное исследование посвящено оценке фармакокинетических характеристик улучшенной формуляции DIM с высокой биодоступностью, содержащей плуроник. Благодаря плуронику F127 – блок-сополимеру оксиэтилена и оксипропилена – достигается солюбилизация водонерастворимого соединения, а также модуляция клеточного Р-гликопротеина – транспортного белка, обеспечивающего эффективный перенос веществ. Кроме того, есть данные об усилении противоопухолевых свойств некоторых лекарственных соединений, композиции которых содержат плуроник [10].

Целью данного исследования является сравнение фармакокинетики чистой субстанции DIM и новой фармацевтической композиции на основе DIM, содержащей плуроник, а также оценка их биодоступности.

Материалы и методы

Реагенты. Чистая субстанция DIM; формуляция на основе DIM, содержащая плуроник («Цинетон» - производитель ЗАО «МираксБиоФарма», Россия): Дииндолилметан (0,1 г), Лутрол (0,45 г) (ЗАО «МираксБиоФарма», Россия).

Животные. Исследования проведены на 98 крысах массой $0,22 \pm 0,02$ кг, полученных из питомника «Рапполово», г. Санкт-Петербург. Животные содержались в стандартных клетках при 12-часовом режиме освещения и свободном доступе к корму и воде. Длительность карантина (акклиматизационного периода) животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние). Животные были разделены на 2 группы. Препарат и субстанция вводились

внутрижелудочно: в дозе 60 мг/кг - с утра натощак. Стандартное питание животные получали через 2 часа после начала эксперимента.

Сбор и подготовка образцов крови. Забор крови проводился после декапитации животных через: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; и 12,0 часов после введения тестируемой субстанции (по 6 животных на каждую точку в обеих группах). Пробы крови центрифугировали (ОПн – 8 УХЛ4.2, Россия) 15 минут при 3 000 об/мин, отбирали по 1,5–2,0 мл плазмы, замораживали и хранили при –20 °С до анализа. Перед анализом во все образцы плазмы крови в объеме 1 мл добавляли 5 мл этилацетата, а затем центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. Отбирали надосадочный слой, упаривали, добавляли 200 мкл ацетонитрила и аликвоту вводили в хроматограф.

Количественное определение в крови. Анализ проб с целью определения концентрации дииндолилметана в образцах плазмы крови осуществляли методом ВЭЖХ на колонке Ascentis, C18, (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм) на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Beckman, США) с УФ-детектором с диодной матрицей SPD M20A (230 нм) (Шимадзу). Элюент: 70% ацетонитрила, 30% водного буфера, содержащего 6 мг додецилсульфата, 0.6 мг кислого фосфорно-кислого калия на 1 л H₂O, pH 5 (H₃PO₄). Скорость элюирования - 1.0 мл/мин. Хроматографирование проводили при комнатной температуре (22-24 °С).

Для описания фармакокинетики DIM в плазме крови использовалась программа WinNonlin® (Pharsight, USA), с помощью которой были получены следующие показатели: C_{max} - максимальная концентрация (мкг/мл), T_{max} – время достижения максимума концентрации, T_{1/2} – период полувыведения (ч), MRT – среднее время удерживания (ч), V_{ss} – стационарный объем распределения (мл/кг). Площадь (AUC) под кривыми зависимости концентрации в плазме от времени (от 0 до ∞) вычисляли с помощью линейного трапецеидального метода.

Статистическая обработка данных. Полученные экспериментальные данные были обработаны статистически помощью пакета Systatw 5 для персонального компьютера. Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение, стандартное отклонение среднего результата, стандартная ошибка среднего, коэффициент вариации (CV). Данные представлены в формате M±m, где M - среднее арифметическое значение, m - стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

По результатам внутрижелудочного введения чистой субстанции DIM был получен фармакокинетический профиль, согласно которому вещество начинало детектироваться в кровотоке через 15 мин, при этом максимум концентрации C_{max} достигался через 2 часа

после введения и наблюдался около 120 минут ($0,21 \pm 0,02$ мкг/мл). Далее концентрация DIM начинала плавно снижаться, и через 12 часов после введения DIM определялся в крови в минимальных количествах (около $0,06$ мкг/мл). $T_{1/2}$ составило $5,26 \pm 0,71$ час для субстанции DIM (рис. 1).

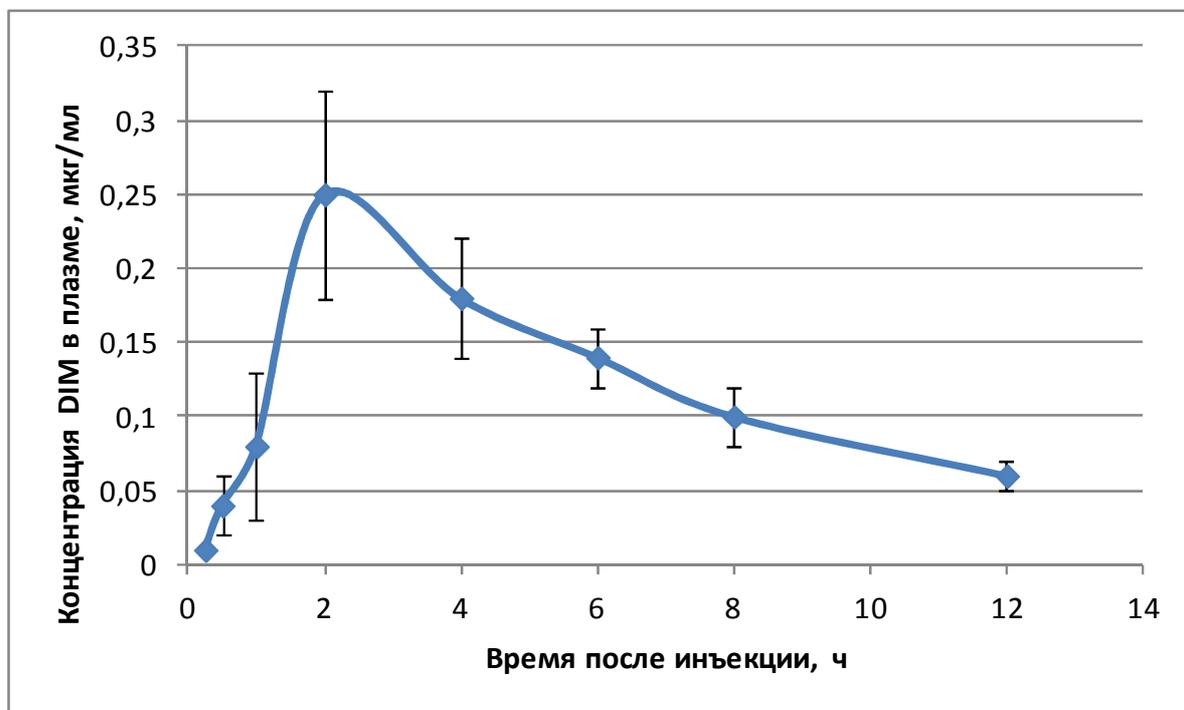


Рис. 1. Усредненная динамика концентрации DIM в плазме крови экспериментальных животных при внутривенном введении субстанции, 60 мг/кг.

Общее среднее время присутствия препарата в организме — показатель MRT составляет порядка 11 часов ($11,69 \pm 0,55$ час). Величина кажущегося стационарного объема распределения — показатель V_{ss} — составляет порядка 357 л/кг. Разброс индивидуальных значений умеренный: коэффициент вариации CV составил 14–55%.

На следующем этапе оценивалась фармакокинетика новой улучшенной фармацевтической композиции на основе DIM. После введения экспериментальным животным DIM начинал определяться в системном кровотоке также через 15 минут, но максимум концентрации составил $3,23 \pm 0,12$ мкг/мл, наблюдаясь также в течение 120 минут. Далее концентрация DIM медленно снижается, определяясь в крови через 12 часов после введения в минимальных количествах (около 2 мкг/мл). Последующее снижение концентрации характеризуется временем половинного убывания $T_{1/2}$ порядка 5 часов ($5,38 \pm 0,10$ час). Все полученные показатели статистически значимы ($p < 0,05$) (рис. 2).

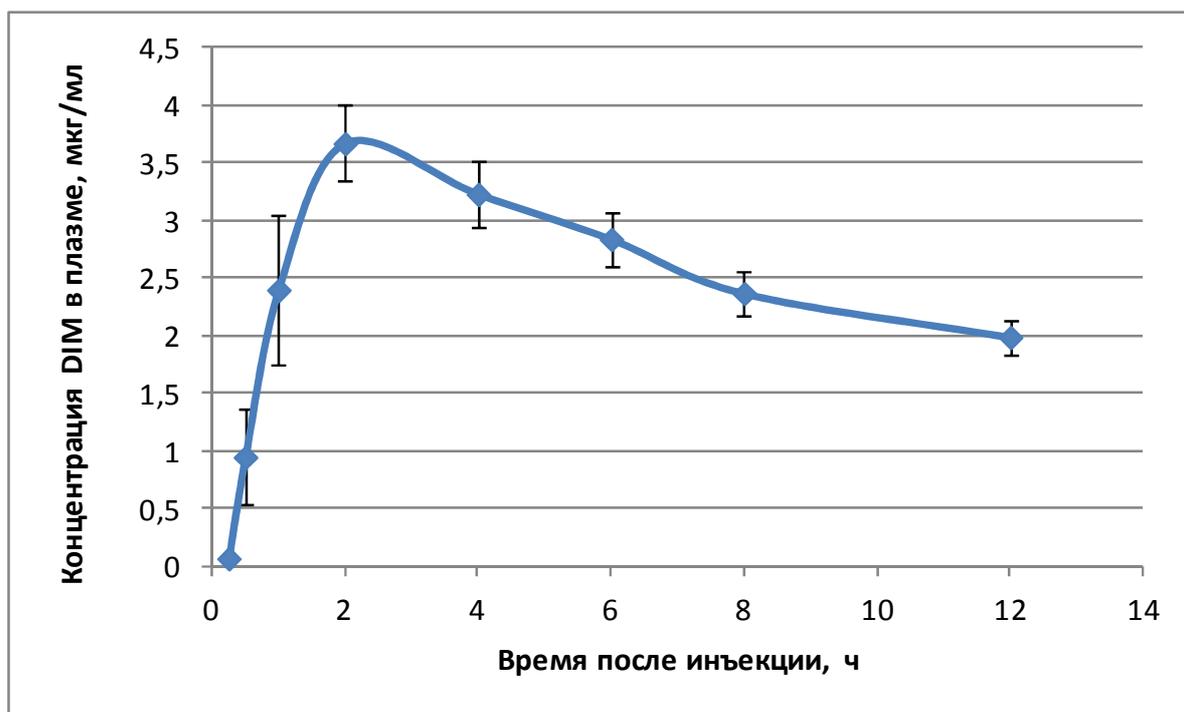


Рис. 2. Усредненная динамика концентрации DIM в плазме крови экспериментальных животных при внутривенном введении улучшенной фармацевтической композиции на основе DIM, 60 мг/кг.

Показатель MRT составляет порядка 11 часов ($11,66 \pm 0,16$ час). Величина кажущегося стационарного объема распределения — показатель V_{ss} — составляет порядка 19 мл/кг. Коэффициент вариации CV лежал в пределах от 8 до 42%.

Метод ВЭЖХ позволяет получить высокочувствительные, специфичные и надежные результаты. По результатам исследования были выявлены различия в фармакокинетике чистой субстанции DIM и улучшенной фармацевтической композиции на основе DIM, содержащей плуроник. Так, внутривенное введение чистой субстанции DIM в дозе 60 мг/кг не продемонстрировало достижения высоких концентраций в плазме крови. C_{max} неформулированного DIM оказалась примерно в 15 раз ниже максимальной концентрации активной субстанции в составе новой формуляции, содержащей плуроник ($0,21 \pm 0,02$ против $3,23 \pm 0,12$ мкг/мл).

Помимо оценки фармакокинетических параметров, были рассчитаны показатели относительной биодоступности (табл. 1).

Таблица 1. Показатели относительной биодоступности DIM у крыс при внутривенном введении фармацевтической композиции на основе DIM, 60 мг/кг.

№ образца	Субстанция	AUC мкг*ч/мл	Относительная биодоступность (AUC_{DIM_New})/ AUC_{DIM}	Изменение относительной биодоступности (AUC_{DIM_New} - AUC_{DIM})/ AUC_{DIM}, %
1	Дииндолилметан	1,98	-	-
2	Фармацевтическая композиция на основе DIM	35,50	17,8	1692

Как видно из полученных данных, относительная биодоступность DIM в составе новой фармацевтической композиции, содержащей плуроник, была выше в 17,8 раза по сравнению с чистой субстанцией.

Заключение

Полученные результаты подтвердили высокую биодоступность новой формуляции DIM, содержащей в своём составе плуроник, при введении животным внутрижелудочно в концентрации 60 мг/кг. Относительная биодоступность новой фармацевтической композиции на основе DIM в 17,8 раза превышает биодоступность чистой субстанции DIM, что позволяет использовать терапевтический потенциал этой субстанции и делает данную фармацевтическую композицию приоритетным кандидатом для дальнейших исследований.

Благодарности

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.

Список литературы

1. Anderton M.J. Physiological modeling of formulated and crystalline Diindolylmethane pharmacokinetics following oral administration in mice / Anderton M.J., Manson M.M., Verschoyle R. et al. // Drug Metab Disposit. – 2004. – Vol. 32. – P. 632-638.

2. Banerjee S. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM): from bench to clinic / Banerjee S., Kong D., Wang Z. // *Mutat Res.* – 2011. – Vol. 728. – P. 47-66.
3. Bradlow H.L. Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice / Bradlow H.L., Michnovicz J., Telang N.T. et al. // *Carcinogenesis.* – 1991. – Vol. 12. – P. 1571-1574.
4. Chang X. 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice / Chang X., Tou J.C., Hong C. et al. // *Carcinogenesis.* – 2005. – Vol. 26 (4). – P. 771-778.
5. Elackattu A.P. A controlled safety study of diindolylmethane in the immature rat model/ Elackattu A.P., Feng L., Wang Z. // *Laryngoscope.* – 2009. – Vol. 119. – P. 1803-1808.
6. Ge X. 3,3'-Diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells / Ge X., Yannai S., Rennert G. et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 1996. – Vol. 228. – P. 153-158.
7. Heath E.I., Heilbrun L.K., Li J. A phase I dose-escalation study of oral BR-DIM (BioResponse 3,3'-Diindolylmethane) in castrate-resistant, non-metastatic prostate cancer / Heath E.I., Heilbrun L.K., Li J. et al. // *Am J Transl Res.* – 2010. – Vol. 2. – P. 402-411.
8. Paltsev M. Comparative preclinical pharmacokinetics study of 3,3'-diindolylmethane formulations: is personalized treatment and targeted chemoprevention in the horizon? / Paltsev M., Kiselev V., Muyzhnek E. et al. // *EPMA J.* – 2013. – Vol. 4 (1). – P. 25.
9. Weng J.R. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. / Weng J.R., Tsai C.H., Kulp S.K. et al. // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 262. – P. 153-163.
10. Zhang W. Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors / Zhang W., Shi Y., Chen Y. et al. // *Biomaterials.* – 2011. – V. 32. – P. 2894–2906.

Рецензенты:

Провалова Н.В., д.м.н., заместитель главного врача по научной работе НМУ «ЛДЦ», г. Томск.

Миронова Э.М., д.б.н., главный научный сотрудник отдела клинических исследований ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ, г. Москва.