

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.151.89>

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗРАБОТАННОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА

Научная статья

Тюмин И.В.¹, Гривцова Л.Ю.², Тюмина О.В.^{3,*}

¹ ORCID : 0000-0002-7053-9285;

² ORCID : 0000-0001-9103-9688;

³ ORCID : 0000-0002-5608-1925;

^{1,2} Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба, Обнинск, Российская Федерация

³ Самарский областной медицинский центр Династия, Самара, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (centr123[at]bk.ru)

Аннотация

Энергетическое перепрограммирование стало важной характеристикой раковых клеток, однако роль микроэлементов, таких как железо, в этих процессах остается недостаточно изученной, а тема актуальной. Мы предположили, что в процессе онкогенеза опухолевые клетки могли приобрести дополнительный энергетический путь с использованием ионов железа и разработали моноклональное антитело к белку, который участвует в переносе электронов в цепи окислительно-восстановительных реакций с железом.

Цель исследования: оценить способность разработанного моноклонального антитела 3G7H8 подавлять рост злокачественных клеток человека *in vitro*.

Материалы и методы: использовали две клеточные линии: HeLa (адгезивная культура) и K562 (суспензионная культура). Для HeLa применяли систему xCELLigence для анализа роста клеток в реальном времени. Для K562 проводили 3-дневное культивирование с подсчетом клеток и оценкой жизнеспособности.

Основные результаты: антитело 3G7H8 значительно подавляло рост клеток HeLa по сравнению с контролем. При добавлении антитела к культуре K562 количество клеток уменьшалось на 61-72% за 3 дня, в то время как в контроле увеличивалось на 83%.

Выводы: моноклональное антитело 3G7H8 продемонстрировало антипролиферативный эффект на обеих клеточных линиях и потенциальную противоопухолевую активность разработанного моноклонального антитела *in vitro*. Результаты указывают на перспективность терапевтического применения разработанного антитела, особенно для лечения рака шейки матки.

Ключевые слова: моноклональное антитело 3G7H8, антипролиферативный эффект.

EVALUATION OF THE ABILITY TO SUPPRESS THE GROWTH OF HUMAN MALIGNANT CELLS IN CULTURE *IN VITRO* USING THE DEVELOPED MONOCLONAL ANTIBODY

Research article

Tyumin I.V.¹, Grivtsova L.Y.², Tyumina O.V.^{3,*}

¹ ORCID : 0000-0002-7053-9285;

² ORCID : 0000-0001-9103-9688;

³ ORCID : 0000-0002-5608-1925;

^{1,2} A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russian Federation

³ Samara Regional Medical Center Dinasty, Samara, Russian Federation

* Corresponding author (centr123[at]bk.ru)

Abstract

Energy reprogramming has become an important characteristic of cancer cells, but the role of micronutrients such as iron in these processes remains understudied and the topic is relevant. We hypothesised that during oncogenesis, tumour cells might have acquired an additional energy pathway using iron ions and developed a monoclonal antibody to a protein that is involved in electron transfer in the chain of redox reactions with iron.

Aim of the study: to evaluate the ability of the developed monoclonal antibody 3G7H8 to inhibit the growth of human malignant cells *in vitro*.

Materials and methods: two cell lines were used: HeLa (adherent culture) and K562 (suspension culture). For HeLa, the xCELLigence system was used to analyse cell growth in real time. For K562, a 3-day culture with cell counting and viability assessment was performed.

Main results: 3G7H8 antibody significantly inhibited the growth of HeLa cells compared to control. When the antibody was added to K562 culture, the number of cells decreased by 61-72% in 3 days, while the control increased by 83%.

Conclusions: The 3G7H8 monoclonal antibody demonstrated antiproliferative effect on both cell lines and potential antitumour activity of the developed monoclonal antibody *in vitro*. The results indicate the promising therapeutic application of the developed antibody, especially for the treatment of cervical cancer.

Keywords: 3G7H8 monoclonal antibody, antiproliferative effect.

Введение

С 2011 года энергетическое перепрограммирование стало важной характеристикой раковых клеток, однако роль микроэлементов, таких как железо, в этих процессах остается недостаточно изученной [1], [2], [3]. Железо, обладая способностью к переносу электронов, участвует во многих биохимических реакциях, критически важных для клеточного гомеостаза, включая дыхание и репликацию ДНК [4], [5], [6]. У онкологических пациентов метаболизм железа часто изменен, и опухолевые клетки используют разные механизмы для увеличения его биодоступности [6], [7], [8]. Согласно теории симбиогенеза, митохондрии происходят от аэробных бактерий, которые стали симбионтами предковых эукариотических клеток [9], [10]. Мы предположили, что в процессе онкогенеза опухолевые клетки могли приобрести дополнительный энергетический путь с использованием ионов железа, включая окислительно-восстановительные реакции. В качестве объекта для дальнейших исследований был выбран бактериальный белок рустицианин, который участвует в переносе электронов в цепи окислительно-восстановительных реакций с железом и способствует образованию АТФ. Мы предположили существование его гомолога в опухолевых клетках. На следующем этапе мы провели клонирование, экспрессию и очистку рекомбинантного рустицианина, иммунизировали лабораторных мышей, получили клеточные линии гибридом и протестировали моноклональные антитела методом ИФА. Выделен наиболее активный клон антител к рустицианину «3G7H8».

Цель исследования: оценить способность разработанного моноклонального антитела 3G7H8 подавлять рост злокачественных клеток человека *in vitro*.

Методы и принципы исследования

Исследование проведено в лаборатории ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия». Для оценки антипролиферативного эффекта разработанного антитела 3G7H8 (мышинное) было проведено два эксперимента с адгезивной клеточной линией и суспензионной клеточной линией. Оценка воздействия антитела на адгезивную клеточную культуру линии HeLa (аденокарцинома шейки матки) проводилась с использованием инструмента xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США), позволяющего детектировать клеточный индекс в режиме реального времени. Исследуемое моноклональное антитело концентрации – 0,01442 мг добавлялось к клеточной культуре. Контролем служила клеточная линия HeLa без добавления антитела. Оценка антипролиферативного эффекта антитела 3G7H8 проводилась через 70 часов, в 15 сериях.

Для оценки антипролиферативного эффекта разработанного антитела на суспензионной культуре K562 (миелогенный лейкоз) проводилось культивирование в течение трех дней в 24-луночных планшетах с использованием среды RPMI в инкубаторе Thermo Scientific (США) при температуре 37°C. В каждую лунку добавлялось по 1 мл среды, содержащей 1 млн клеток K562. Исследуемое моноклональное антитело в двух концентрациях (концентрация 1 – 0,01442 мг, концентрация 2 – 0,02884 мг) добавлялось к клеточной культуре. Подсчет клеток и оценка жизнеспособности проводились на клеточном анализаторе Countess 2FL с трипановым синим по утвержденной производителем методике в день 1 до добавления исследуемого вещества и на третий день культивации. Контролем служила суспензионная культура K562 без добавления антитела. Эксперимент проводился в 10 сериях. Статистический анализ проводился с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 21.

Основные результаты

Получены следующие результаты оценки антипролиферативного эффекта антитела 3G7H8 с использованием аппарата xCELLigence DP (ACEA Biosciences) на адгезивной линии HeLa: снижение клеточного индекса через 10 часов в контроле – $2,6 \pm 0,2$, в основной группе – $1,2 \pm 0,1$, в 2,1 раза ($p < 0,05$), через 70 часов культивирования клеточный индекс в контроле – $4,1 \pm 0,2$, в основной группе – $1,5 \pm 0,1$, в 2,7 раза ($p < 0,05$).

Представленные на рис.1 график роста клеток в отсутствии или присутствии антител 3G7H8 в культуральной среде демонстрируют, что использование антител 3G7H8 значительно подавляет рост опухолевых клеток тестированной линии и не подавляет рост контрольной культуры. Таким образом, полученные моноклональные антитела 3G7H8 ингибируют клеточный ответ, замедляя темп пролиферации опухолевых клеток *in vitro*. Результаты указывают на перспективность терапевтического использования моноклонального антитела 3G7H8 для лечения рака шейки матки человека.

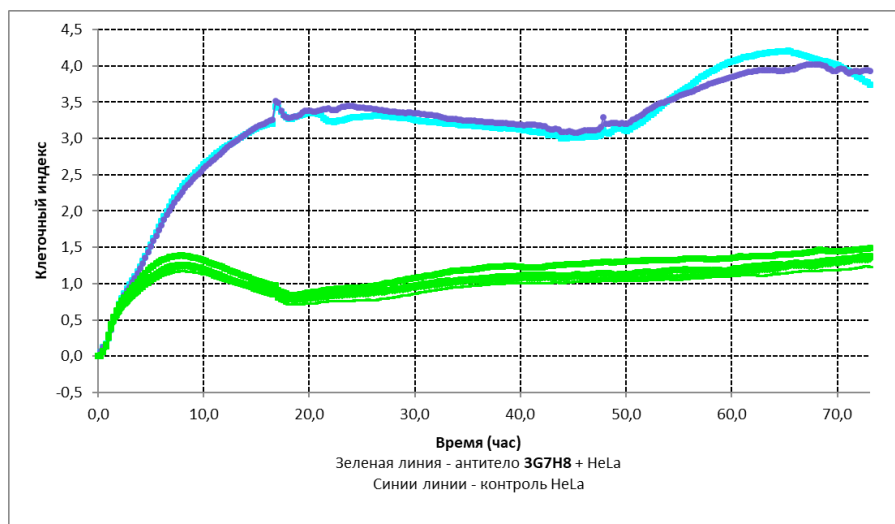


Рисунок 1 - График роста клеток в отсутствие или присутствии антител 3G7H8

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.151.89.1>

Получены следующие результаты оценки антипролиферативного эффекта антитела 3G7H8 с использованием суспензионной культуры K562: при добавлении антитела 3G7H8 количество клеток K562 уменьшается, при концентрации 1 антитела 3G7H8 среднее количество клеток снизилось с 1,038,700 до 408,900 за 3 дня (снижение на 60,6%, $p < 0,05$). При концентрации 2 антитела 3G7H8 среднее количество клеток снизилось с 1,020,500 до 283,500 за 3 дня (снижение на 72,2%, $p < 0,05$). В контрольных лунках без добавления антител количество клеток увеличилось с 1,010,500 до 1,926,000 за 3 дня (увеличение на 90,6%) ($p < 0,05$) (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты исследования антипролиферативного действия моноклонального антитела 3G7H8 на клеточных моделях — культура K562

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.151.89.2>

№ серии	Моноклональное антитело 3G7H8 концентрация 1		Моноклональное антитело 3G7H8 концентрация 2		Контроль	
	Количество клеток день 1	Количество клеток день 3	Количество клеток день 1	Количество клеток день 3	Количество клеток день 1	Количество клеток день 3
1	1 070 000	399 000	1 010 000	290 000	1 000 000	2 010 000
2	1 010 000	420 000	1 030 000	310 000	990 000	1 800 000
3	1 050 000	380 000	1 015 000	300 000	1 010 000	1 900 000
4	990 000	400 000	1 000 000	270 000	1 050 000	1 900 000
5	1 040 000	490 000	1 040 000	295 000	1 020 000	1 970 000
6	1 097 000	350 000	990 000	250 000	980 000	1 910 000
7	1 060 000	450 000	1 070 000	300 000	1 030 000	2 000 000
8	1 000 000	430 000	1 020 000	280 000	1 015 000	2 020 000
9	1 030 000	380 000	1 010 000	290 000	1 010 000	1 900 000
10	1 040 000	390 000	1 020 000	250 000	1 000 000	1 850 000
Ср. знач.	1 038 700	408 900	1 020 500	283 500	1 010 500	1 926 000*
Ст. откл.	31 196	38 091	21 266	19 755	19 033	68 731

Примечание: * $p < 0,05$ (уровень значимости различий контрольной и основных групп на 3 день культивирования)

При добавлении антитела 3G7H8 в концентрации 1 средняя жизнеспособность клеток K562 снизилась с 96% до 9% за 3 дня ($p < 0,001$). При концентрации 2 антитела 3G7H8 средняя жизнеспособность снизилась с 97% до 2% за 3 дня ($p < 0,001$). В контрольной группе средняя жизнеспособность осталась высокой, снизилась с 97% до 92% за 3 дня ($p > 0,05$) (таблица 2).

Таблица 2 - Результаты исследования жизнеспособности опухолевых клеток на клеточных моделях - культура K562 (миелогенный лейкоз)

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.151.89.3>

№ серии	Моноклональное антитело 3G7H8 концентрация 1		Моноклональное антитело 3G7H8 концентрация 2		Контроль	
	Жизнеспособность день 1, %	Жизнеспособность день 3, %	Жизнеспособность день 1, %	Жизнеспособность день 3, %	Жизнеспособность день 1, %	Жизнеспособность день 3, %
1	95	10	95	3	98	93
2	96	8	99	1	99	95
3	95	11	98	2	95	90
4	97	9	95	3	94	91
5	95	12	98	2	98	91
6	99	8	95	3	97	92
7	96	9	99	2	96	95
8	97	10	95	2	97	93
9	98	8	97	3	98	90
10	96	9	99	1	96	94
Ср. знач.	96	9	97	2	97	92*
Ст. откл.	1	1	2	1	1	2

Примечание: * $p < 0,001$ (уровень значимости различий контрольной и основных групп на 3 день культивирования)

Обсуждение

Моноклональное антитело 3G7H8 ингибирует пролиферацию и жизнеспособность опухолевых клеток на обеих клеточных линиях *in vitro*: значительно подавляло рост клеток HeLa, а также эффективно подавляло пролиферацию и жизнеспособность клеток K562 по сравнению с контролем *in vitro*. Эффект зависит от концентрации: при более высокой концентрации (концентрация 2) наблюдается более выраженное подавление роста и жизнеспособности клеток. В контрольной группе клетки продолжают активно делиться и сохраняют высокую жизнеспособность. Эти результаты указывают на перспективность использования моноклонального антитела 3G7H8 для терапии злокачественных новообразований.

Механизмы действия моноклонального антитела 3G7H8, приводящие к подавлению роста и жизнеспособности опухолевых клеток, требуют дополнительного изучения. Необходимо исследовать, какие молекулярные мишени и сигнальные пути вовлечены в реализацию антипролиферативного эффекта данного антитела. Ограничения проведенного исследования включают использование только двух клеточных линий *in vitro*. Для более полной оценки противоопухолевой активности антитела 3G7H8 требуется расширение спектра тестируемых опухолевых клеток, а также исследование на животных моделях.

Перспективы дальнейших исследований должны быть направлены на более глубокое понимание механизмов взаимодействия антитела 3G7H8 с опухолевыми клетками. Это может включать изучение влияния антитела на ключевые внутриклеточные процессы, такие как метаболизм, апоптоз, ангиогенез и др. Также необходимо получение дополнительных данных, подтверждающих противоопухолевую активность антитела *in vivo*, что является важным этапом для перехода к клиническим испытаниям.

Заключение

Проведенное исследование показало потенциальную противоопухолевую активность разработанного моноклонального антитела 3G7H8 *in vitro*. Для практического применения результатов исследования необходимо в дальнейшем:

- оптимизация условий культивирования опухолевых клеток *in vitro* для максимизации эффекта антитела 3G7H8, включая подбор оптимальной концентрации, времени инкубации и т.д.;
- исследование комбинированного применения антитела 3G7H8 с другими противоопухолевыми агентами (химиотерапевтические препараты, таргетные препараты, иммунотерапия) для потенцирования противоопухолевого эффекта;
- оценка профиля безопасности и переносимости антитела 3G7H8 в доклинических исследованиях, необходимая для планирования клинических испытаний.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют перспективность дальнейшего изучения моноклонального антитела 3G7H8 в качестве потенциального противоопухолевого агента, особенно для лечения рака шейки матки. Однако для реализации его терапевтического потенциала требуются дополнительные комплексные исследования,

направленные на выяснение механизмов действия и получение доклинических данных, подтверждающих эффективность и безопасность.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Сообщество рецензентов Международного научно-исследовательского журнала
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.151.89.4>

Conflict of Interest

None declared.

Review

International Research Journal Reviewers Community
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.151.89.4>

Список литературы на английском языке / References in English

1. Gao M. Ferroptosis is an autophagic cell death process / M. Gao, P. Monian, Q. Pan [et al.] // *Cell Res.* — 2016. — Vol. 26. — № 9. — P. 1021–1032. — DOI: 10.1038/cr.2016.95.
2. Senga S.S. Hallmarks of cancer - the new testament / S.S. Senga, R.P. Grose // *Open Biol.* — 2021. — Vol. 11. — № 1. — 200358 p. — DOI: 10.1098/rsob.200358. — EDN MZSPZT.
3. Skouta R. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models / R. Skouta, S.J. Dixon, J. Wang [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2014. — Vol. 136. — Issue 12. — P. 4551–4556. — DOI: 10.1021/ja411006a.
4. Brown R.A.M. Altered Iron Metabolism and Impact in Cancer Biology, Metastasis, and Immunology / R.A.M. Brown, K.L. Richardson, T.D. Kabir [et al.] // *Front. Oncol.* — 2020. — Vol. 10. — № FEB. — 476 p. — DOI: 10.3389/fonc.2020.00476. — EDN SCYYYYF.
5. Hentze M.W. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism / M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, N.C. Andrews [et al.] // *Cell.* — 2004. — Vol. 117. — Issue 3. — P. 285–297. — DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00343-5.
6. Zanutelli M.R. Energetic costs regulated by cell mechanics and confinement are predictive of migration path during decision-making / M.R. Zanutelli, A. Rahman-Zaman, J.A. VanderBurgh [et al.] // *Nat Commun.* — 2019. — Vol. 10. — № 1. — 4185 p. — DOI: 10.1038/s41467-019-12155-z. — EDN ZGSGCH.
7. Fiorito V. The Multifaceted Role of Heme in Cancer / V. Fiorito, D. Chiabrando, S. Petrillo [et al.] // *Front. Oncol.* — 2019. — Vol. 9. — 1540 p. — DOI: 10.3389/fonc.2019.01540.
8. Zhao N. The Tumor Suppressor, P53, Decreases the Metal Transporter, ZIP14 / N. Zhao, A.S. Zhang, A.M. Wortham [et al.] // *Nutrients.* — 2017. — Vol. 9. — Issue 12. — 1335 p. — DOI: 10.3390/nu9121335.
9. Stine Z.E. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology / Z.E. Stine, Z.T. Schug, J.M. Salvino [et al.] // *Nature Reviews Drug Discovery.* — 2022. — Vol. 21. — № 2. — P. 141–162. — DOI: 10.1038/s41573-021-00339-6. — EDN: JZIZVB.
10. Park J.S. Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture / J.S. Park, C.J. Burckhardt, R. Lazcano [et al.] // *Nature.* — 2020. — Vol. 578. — P. 621–626. — DOI: 10.1038/s41586-020-1998-1.