

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К БЕЛКУ РУСТИЦИАНИН «3G7H8» НА КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ НА МОДЕЛИ КСЕНОГРАФТОВ НА МЫШАХ

Тюмин Иван Валерьевич

Аспирант, МРНЦ им. А.Ф. Цыба филиала
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России
inbio@bk.ru

STUDY OF ANTITUMOR ACTIVITY
OF MONOCLONAL ANTIBODY
TO THE PROTEIN RUSTICYANIN «3G7H8»
ON CERVICAL CARCINOMA CELLS
ON THE MODEL OF XENOGRAFTS
ON MICE

I. Tyumin

Summary. The antitumor activity of monoclonal antibody to the protein rusticyanin «3G7H8» was studied. The effect on animal weight and tumor growth rate on cervical carcinoma cells on xenografts model of immunodeficient mice was studied. Antitumor activity was shown at twofold administration of the investigated antibody.

Keywords: monoclonal antibody, rusticyanin protein.

Аннотация. Проведено изучение противоопухолевой активности моноклонального антитела к белку рустицианин «3G7H8». Изучено влияние на вес животных и скорость роста опухоли на клетках карциномы шейки матки на модели ксенографтов иммунодефицитных мышей. Показана противоопухолевая активность при двукратном введении исследуемого антитела.

Ключевые слова: моноклональное антитело, белок рустицианин.

Введение

С 2011 года энергетическое перепрограммирование признано одной из ключевых особенностей раковой клетки [1]. Роль микроэлементов в формировании этих изменений при этом остается малоизученной. В частности, широкие возможности железа по переносу электронов делают его универсальным кофактором, участвующим в огромном количестве биохимических реакций, жизненно важных для клеточного гомеостаза, включая клеточное дыхание и репликацию ДНК. У онкологических пациентов системный метаболизм железа обычно изменен [2]. Опухолевые клетки используют различные механизмы повышения биодоступности железа для стимулирования роста [3].

Существующая и обсуждаемая в научных кругах теория симбиогенеза объясняет механизмы возникновения некоторых органелл эукариотической клетки, в частности митохондрий. В результате изучения последовательности оснований в митохондриальной ДНК были получены весьма убедительные доводы в пользу того, что митохондрии — это потомки аэробных бактерий (прокариот), поселившихся некогда в предковой эукариотической клетке и «научившимися» жить в ней в качестве симбионтов (организмов, участвующих в симбиозе). Опираясь на теорию симбиогенеза и наличие большего количества данных использования опухолями тако-

го микроэлемента как железо, мы предположили приобретение опухолевой клеткой в процессе онкогенеза дополнительного энергетического (дыхательного) пути с использованием ионов железа и возможность существования в опухолевой клетке железоопосредованной окислительно-восстановительной реакции — окисление двухвалентного железа в трехвалентное, сопровождающееся выделением энергии [4].

В качестве биомишени для дальнейших экспериментальных работ был выбран бактериальный белок рустицианин, который является белком-акцептором электрона в энергетической цепи окислительно-восстановительных реакций с участием ионов железа, и который находится в периплазматическом пространстве и переносит электрон на цитохромы, давая начало каскаду реакций с конечным образованием АТФ [5]. Мы предположили, что именно гомолог рустицианина предположительно может существовать в опухолевой клетке.

На следующем этапе было проведено клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантного белка рустицианина, иммунизация этим белком лабораторных мышей, получение клеточных линий гибридомом, тестирование полученных моноклональных антител методом ИФА и наработка выбранных клонов. Был выделен наиболее активный клон антител к рустицианину «3G7H8» и показана его цитотоксическая активность *in vitro* в исследовании на клеточных культурах.

Данный молекулярный каскад, биоминерал и разработанная биомолекула (моноклональное антитело к белку рустисианин «3G7H8») требует дополнительного изучения и может представлять интерес для разработки таргетных противоопухолевых препаратов нового класса.

Цель исследования: проведение испытания противоопухолевой активности моноклонального антитела к белку рустисианин «3G7H8» на клетках карциномы шейки матки в модели ксенографтов на мышах.

Методы исследования

Для исследования были выбраны иммунодефицитные безтимусные мыши (линия — Athymic Nude, Charles River GmbH) как модель, позволяющая провести ксенотрансплантацию и выращивание опухолей человека в животных. Безтимусные мыши являются общепринятой моделью для использования в исследовании специфической активности противоопухолевых препаратов. Данное исследование будет проведено на самках мышей. Животных содержали в комнатах с контролируемыми параметрами микроклимата (температура 20–25°C и 30–70 % относительная влажность, воздухообмен 10–15 объемов комнаты в час, световой режим день/ночь 12/12 часов). Основные правила содержания и ухода соответствовали правилам, утвержденным в ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» [6,7]. Дизайн исследования: было использовано 15 животных при подборе дозы клеток и 35 животных в основном исследовании.

Клетки HeLa, перевивка опухоли мышам

Клетки карциномы шейки матки человека HeLa клон S3 наращивали во флаконах в среде DMEM с добавлением 10 % FBS, 2mM глутамина, MEM аминокислоты, Напируват, антибиотик-антимикотик (Streptomycin, Amphotericin B, Penicillin, применение в 1X, Gibco, 100X) до 80–90 % конfluence в во влажной атмосфере при 95 % воздуха и 5 % CO₂ при 37°C. Культуральную среду меняли два раза в неделю. После периода адаптации, животным перевивали клетки HeLaS3. Этот день считали днем 0 исследования. Клетки собирать с помощью TrypLE Express (Invitrogen), промывали и суспендировали в стерильном физиологическом растворе до необходимой конечной концентрации. Полученную суспензию клеток вводили SC (подкожно) в левый бок мышам по 200 мкл на мышь.

Предварительное исследование (подбор дозы перевиваемых клеток)

В предварительном исследовании изучено несколько доз клеток HeLaS3, перевиваемых мышам. Исследова-

ны дозы 1*10⁶ и 5*10⁶ клеток/мышь без матригеля и 1*10⁶ с матригелем. По результатам предварительного исследования была выбрана концентрация клеток, которая обеспечивает нужную скорость роста опухоли (не очень быструю и не очень медленную, чтобы можно было изучить влияние вводимого препарата).

Основные результаты

В основном исследовании выбранная концентрация клеток (1*10⁶ с матригелем) была введена 35 мышам. При достижении опухолями размеров 100–300 мм³, животные были рандомизированы на группы так, чтобы средний размер опухоли не различался между группами (Таблица 1). После рандомизации начали введение исследуемых препаратов. Введение исследуемого и контрольного препаратов и растворителя проводили внутривенно по схеме, описанной в Таблице 1. Объем введения 7 мл/кг. Наблюдение за животными проводили 28 дней после первого введения препаратов. Наблюдение включало в себя взвешивание и измерение объема опухоли (3 раза в неделю).

Таблица 1.

Распределение животных по группам

Номер группы	Препарат	Доза, мг/кг	Кратность введения	Количество животных
1	Группа «Контроль» (физиологический раствор)	0	2 раза (1-й и 14 дни после рандомизации)	9
2	Группа сравнения (Бевацизумаб)	14	1 раз (день рандомизации)	9
3	антитело «3G7H8»	14	1 раз (день рандомизации)	10
4	антитело «3G7H8»	14 (7)	2 раза (день рандомизации (14 мг/кг) и 14-й день после рандомизации (7мг/кг))	7

Объем опухоли определяли по формуле: $L \times W^2 / 2 = \text{мм}^3$, где L — соответствует наибольшему диаметру опухоли, W — наименьшему. Измерения будут проводить с помощью штангенциркуля. В ходе исследования было изучено ингибирование роста опухоли (TGI — Tumor Growth Inhibition) — параметр, который рассчитывается по следующей формуле: $(\Delta C - \Delta T) \times 100 / \Delta C, \%$, где ΔC — среднее изменение размера опухоли в контрольной группе, получавшей растворитель, ΔT — среднее изменение размера опухоли в экспериментальной группе. Изменение размеров опухолей рассчитывалось по разнице среднего размера опухоли в день начала лечения и в день последнего измерения.

Также рассчитывался индекс роста опухоли: $li = Vi/V0$, где i — сутки эксперимента, $V0$ — объем опухоли в день начала лечения.

Анализ данных

Для всех данных применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартное отклонение. Для статистического сравнения использован непараметрический критерий Краскала-Уоллиса. Для статистического сравнения повторяющихся измерений (изменения массы тела животных и объема опухолей в течение эксперимента) использован Repeated measures ANOVA. Различия определены при $p < 0,05$ уровне значимости.

Статистическая обработка проведена с использованием программы GraphPadPrism.

Результаты и их обсуждение

При изучении характера роста опухоли при перевивании разного количества клеток линии HeLa S3 мышам ($1 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^6$ клеток/мышь без матригеля и $1 \cdot 10^6$ с матригелем), показано, что наиболее подходящий рост продемонстрировали опухоли, возникшие после введения $1 \cdot 10^6$ клеток/мышь с матригелем. Введение такой концентрации обеспечивало плавный рост опухолей до объема примерно 2000 мм^3 за 30 дней. Измерение массы тела проводили 3 раза в неделю, начиная с дня первого введения препаратов. Показано, что введение препаратов не влияет на массу тела животных.

Измерение размеров опухолей проводили 3 раза в неделю. На 7-й день после перевивания клеток, животные были рандомизированы на группы и проведено первое введение исследуемых препаратов. Второе введение антитела было проведено животным соответствующей группы через 14 дней после первого введения (на 21-й день исследования).

Показано, что однократное введение препарата сравнения Бевацизумаб приводит к замедлению роста опухоли. Начиная с 18-го дня после введения (25-й день исследования) и до конца наблюдения размеры опухолей у животных, получивших Бевацизумаб меньше, чем у контрольных. При введении исследуемого антитела (как однократно, так и двукратно) отличий в размере опухолей с группой контроль не выявлено ($p > 0,05$).

При расчете ингибирования роста опухоли по группам показано, что данный параметр для препарата сравнения Бевацизумаб составляет 70 % ($p < 0,05$). Однократное введение препарата сравнения Бевацизумаб приводит к снижению индекса прироста опухоли начиная с 14-го дня после введения (21-й день исследования) и до конца наблюдения. При введении исследуемого антитела однократно отличий с группой контроль по данному параметру не выявлено. При введении двукратно продемонстрировано снижение индекса прироста опухоли на 28-й день после первого введения (35-й день исследования). Параметр ингибирования роста опухоли для исследуемого антитела составляет 16,1 % при его однократном введении и 32,7 % при двукратном соответственно ($p < 0,05$).

Заключение

Проведено изучение противоопухолевой активности моноклонального антитела к белку рустицианин «3G7H8» в сравнении с зарегистрированным препаратом (Бевацизумаб). Изучено влияние препаратов на вес животных и скорость роста опухоли в модели ксенографтов с клетками линии HeLaS3. Введение препаратов не влияет на массу тела животных. Индекс ингибирования роста опухоли по группам показал, что данный параметр для препарата сравнения Бевацизумаб составляет 70 % ($p < 0,05$). Для исследуемого антитела «3G7H8» при однократном введении в дозе 14 мг/кг индекс ингибирования роста опухоли — 16,1 %, при этом отличий в индексе прироста опухоли и размерах опухоли по сравнению с группой контроль не было ($p > 0,05$).

При двукратном введении исследуемого антитела «3G7H8» (14 мг/кг и 7 мг/кг с интервалом в 2 недели) была обнаружена противоопухолевая активность: индекс ингибирования роста опухоли составил 32,7 % ($p < 0,05$). Отличий в размере опухолей по сравнению с группой контроль не было ($p > 0,05$).

Таким образом, в проведенном пилотном исследовании показана противоопухолевая активность моноклонального антитела «3G7H8» при двукратном введении. Результаты свидетельствуют о том, что при увеличении дозы и/или кратности введения возможно увеличение его противоопухолевой активности, поэтому необходимы его дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Senga S.S., Grose R.P. Hallmarks of cancer—the new testament. // *Open Biol.* 2021, 200358.
2. Hentze, M.W.; Muckenthaler, M.U.; Andrews, N.C. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. // *Cell.* 2004, 117, 285–297.
3. Zachary E., Zachary T., Joseph M. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. // *Nature Reviews Drug Discovery.* 2022. 21,141–162.
4. Skouta R., Dixon S.J., Wang J., et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 4551–4556.
5. Спецглавы биохимии конспект лекций модуль 2 «Обмен веществ и энергии»: учебно-методическое пособие / Е.А. Бессолицына — Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. — 112 с.
6. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» от 1 августа 2015 (идентичен OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice).
7. ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

© Тюмин Иван Валерьевич (inbio@bk.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»