



МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫЙ БЕЛОК ТЕПЛОВОГО ШОКА mHSP70 КАК МАРКЕР ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Р. Б. Тагаева^{1,2}, Д. Е. Бобков^{1,2}, А. С. Нечаева², Е. В. Федоров², М. В. Диконенко²,
Н. М. Юдинцева^{1,2}, К. А. Самочерных², А. В. Ким², М. А. Шевцов^{1,2}

¹ФГБУН Институт цитологии РАН Министерства науки и высшего образования России,
Тихорецкий пр., д. 4, Санкт-Петербург, 194064

²НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, 197341

РЕЗЮМЕ. Мембранно-связанный белок теплового шока mHsp70 избирательно экспрессируется на поверхности опухолевых клеток, но не на соответствующих нормальных клетках; это делает его перспективной мишенью для тераностики злокачественных новообразований.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: прижизненно визуализировать mHsp70-положительные клетки в злокачественных новообразованиях головного мозга человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: проводился интраоперационный забор образцов гистологического материала от 7 пациентов со злокачественными опухолями и от 3 пациентов с очагами эпилептической активности. С помощью прижизненной конфокальной микроскопии определяли локализацию Hsp70. Для выявления межгрупповых различий в интенсивности зеленых пикселей (Hsp70) применяли критерий Краскала–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Разработана методика прижизненной окраски образцов опухолей и регистрации изображений с помощью метода лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Была выявлена повышенная экспрессия Hsp70 в опухолевых клетках по сравнению с контрольными клетками ткани мозга пациентов с эпилепсией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Впервые была проведена прижизненная визуализация mHsp70-положительных клеток в злокачественных опухолях головного мозга. Полученные результаты свидетельствуют о возможном использовании Hsp70 в качестве маркера опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембранно-связанный белок теплового шока mHsp70, опухоль головного мозга, прижизненная конфокальная микроскопия.

Для цитирования: Тагаева Р. Б., Бобков Д. Е., Нечаева А. С., Федоров Е. В., Диконенко М. В., Юдинцева Н. М., Самочерных К. А., Ким А. В., Шевцов М. А. Мембранно-связанный белок теплового шока mHsp70 как маркер злокачественных опухолей головного мозга. Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2023;15(2):98–101. DOI 10.56618/2071-2693_2023_15_2_98.

MEMBRANE-BOUND HEAT SHOCK PROTEIN mHSP70 AS A MARKER FOR MALIGNANT BRAIN TUMORS

R. B. Tagaeva^{1,2}, D. E. Bobkov^{1,2}, A. S. Nechaeva², E. V. Federov², M. V. Dikonenko², N. M. Yudintceva^{1,2},
K. A. Samochernykh², A. V. Kim², M. A. Shevtsov^{1,2}

¹Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), Ministry of Science and Higher Education of Russia,
4, Tikhoretskiy av., Saint Petersburg, 194064, Russia

²Personalized Medicine Centre, Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of Russia,
2, Akkuratova str., Saint Petersburg, 197341, Russia

SUMMARY. The membrane-bound heat shock protein mHsp70 is selectively expressed on the surface of tumor cells, but not on normal cells; it makes mHsp70 a promising target for theranostics of malignant tumors.

OBJECTIVE: *in vivo* visualization of mHsp70-positive cells in malignant human brain tumors.

MATERIALS AND METHODS: intraoperative sampling of histological material was carried out from 7 patients with malignant tumors and from 3 patients with epilepsy. Localization of Hsp70 was determined using live confocal microscopy. To identify intergroup differences in the intensity of green pixels (Hsp70), the Kruskal-Wallis test was applied.

RESULTS. A method for intravital staining of tumor samples and image registration by the laser scanning confocal microscopy was developed. High expression of mHsp70 was found in tumor cells compared to control cells in the brain tissue of patients with epilepsy.

CONCLUSION. For the first time, *in vivo* visualization of mHsp70-positive cells in malignant brain tumors was performed. The results indicate the possibility of using mHsp70 as a marker of tumor cells.

KEY WORDS: membrane-bound heat shock protein mHsp70, brain tumor, live confocal microscopy.

For citation: Tagaeva R. B., Bobkov D. E., Nechaeva A. S., Federov E. V., Dikonenko M. V., Yudincheva N. M., Samochernykh K. A., Kim A. V., Shevtsov M. A. Membrane-bound heat shock protein mHsp70 as a marker for malignant brain tumors. *Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A. L. Polenova*. 2023;15(2):98–101. DOI 10.56618/2071–2693_2023_15_2_98.

Введение.

Белки теплового шока Hsp70 представляют собой семейство высоко консервативных белков с молекулярной массой около 70 кДа. Индуцибельная форма белка Hsp70 (HSPA1A) сверхэкспрессируется в опухолевых клетках различного происхождения [1]. Она защищает их от апоптоза, способствует пролиферации и миграции, опосредует устойчивость к терапии [2]. Помимо внутриклеточной локализации индуцибельная форма Hsp70 была обнаружена в плазматической мембране различных опухолевых клеток, но не на соответствующих нормальных клетках [3]. Такая мембранно-связанная форма Hsp70 (mHsp70) может служить перспективной опухоль-ассоциированной мишенью для тераностики злокачественных новообразований.

Специфические агенты, нацеленные на mHsp70 (моноклональные антитела, Fab-фрагменты, пептиды), успешно применяются для визуализации и терапии опухолей в доклинических исследованиях [4,5]. Однако большая часть исследований проводится на моделях опухолей, образованных из клеточных линий, которые, как известно, отличаются по своему генотипу и фенотипу от клеток опухоли *in vivo*. Поэтому для дальнейшего использования mHsp70 в качестве мишени и проведения возможных клинических исследований необходимо показать его специфическую локализацию в злокачественных опухолях человека.

Цель исследования: прижизненно визуализировать mHsp70-положительные клетки в злокачественных новообразованиях головного мозга человека.

Материалы и методы: для детектирования mHsp70-положительных опухолевых клеток в злокачественных новообразованиях головного мозга проводили интраоперационный забор образцов гистологического материала из трех зон опухоли — контраст-накапливающей, перифокальной и некротической (по данным МРТ головного мозга) (Рисунок 1).

Критерии выбора гистологического материала для последующего исследования включали:

- 1) глиальные опухоли головного мозга III и IV степени злокачественности;
- 2) злокачественные эмбриональные опухоли головного мозга;
- 3) отсутствие лучевого и химиотерапевтического воздействия на опухоль до проведения операции.

В контрольную группу вошли пациенты с фармакорезистентной эпилепсией, которым было выполнено хирургическое удаление очагов эпилептической активности.

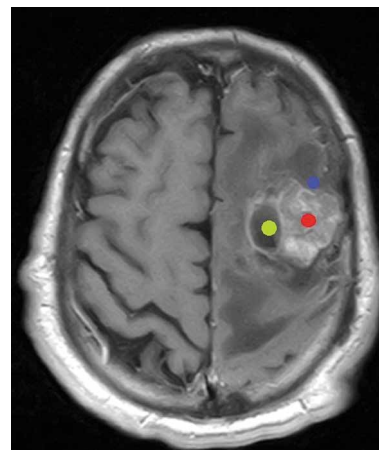


Рисунок 1. МРТ головного мозга пациента с опухолью головного мозга (T1-взвешенные изображения после введения контрастного вещества). Зоны образцов опухоли: красная зона — контраст-накапливающая, синяя — перифокальная, зеленая — зона некроза.

Figure 1. MRI of the brain tumor patient (T1-weighted images following the injection of contrast agent). Zones of tumor specimens: red zone — contrast-accumulating, blue — perifocal, green — necrosis.

Клинический диагноз подтверждался выполнением МРТ головного мозга с контрастным усилением и без него в режимах T1, T2, FLAIR. Всего был исследован материал от 11 пациентов (таблица 1).

Таблица 1. Гистологический материал от пациентов.
Table 1. Histological material from patients.

№ пациента	Клинический диагноз
1	Мультиформная глиобластома NOS (Grade IV)
2	Эпендимомы (Grade II)
3	Мультиформная глиобластома с мелкоклеточным компонентом без мутации в гене IDH1 (Grade IV)
4	Классическая медуллобластома WNT/nonShh — подгруппа без экспрессии p53 (Grade IV)
5	Мультиформная глиобластома (Grade IV)
6	Анапластическая эпендимомы (Grade III)
7	Анапластическая медуллобластома (Grade IV)
8	Фокальная кортикальная дисплазия
9	Фокальная кортикальная дисплазия
10	Фокальная кортикальная дисплазия

После забора материал доставлялся в лабораторию для проведения микроскопии. Материал прижизненно (без предварительной фиксации и пермеабиллизации) окрашивали флуоресцентно меченными Alexa Fluor 488 антителами к Hsp70 (Thermo Fisher, США) и красителем Hoechst33342 (Thermo Fisher, США) для выявления ДНК клеточных ядер. Для подтверждения жизнеспособности часть материала окрашивали метиловым эфиром тетраметилродамина (TMRM) (Thermo Fisher, США), выявляющим мембранный потенциал активных митохондрий. После окраски материал исследовали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с помощью микроскопа Leica TCS SP8 (Германия).

На полученных прижизненных конфокальных изображениях тканей (N = 297) анализировали средние значения интенсивностей зелёных пикселей, характеризующих окраску антителами к Hsp70. В исследуемую группу вошел материал опухолей от 6 пациентов. За норму принимали усреднённый сигнал от 3 образцов ткани, полученных в ходе хирургиче-

ских операций по удалению очагов эпилепсии (пациенты 8, 9, 10). В качестве отрицательного контроля использовали ткань опухоли (пациент 5), окрашенную флуоресцентно меченными вторичными антителами Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, США) без применения каких-либо специфических первичных антител. Для выявления межгрупповых различий был применен критерий Краскела–Уоллиса.

Результаты. Для оценки уровня экспрессии Hsp70 была разработана методика прижизненной окраски образцов опухолей и регистрации изображений с помощью метода лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Методика позволяет изучать особенности организации опухоли на клеточном и субклеточном уровнях, анализировать подвижность клеток без предварительной ферментативной диссоциации, фиксации и пермеабиллизации материала.

С помощью разработанного метода был исследован материал от 7 пациентов с злокачественными опухолями и 3 пациентов с эпилепсией. Пример полученных изображений показан на рисунках 2 и 3.

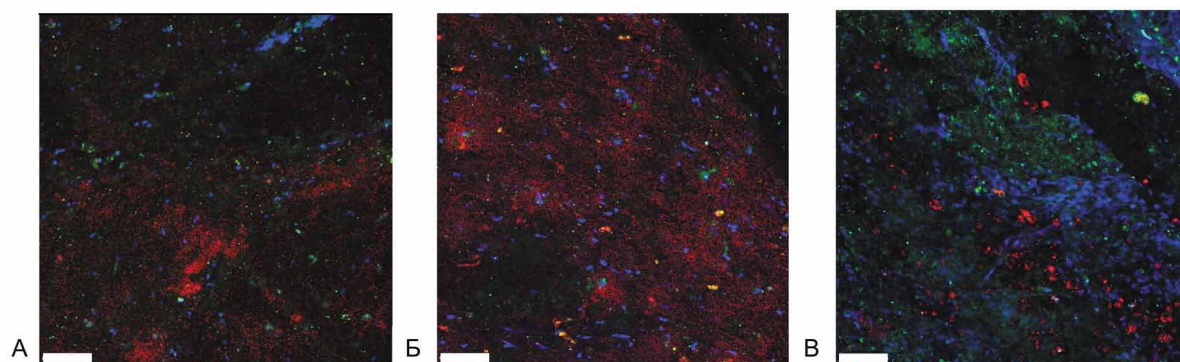


Рисунок 2. Прижизненные конфокальные изображения мультиформной глиобластомы (Grade IV).

Hsp70 — зелёный, TMRM — красный, ДНК — синий. А: контраст накапливающая зона, Б: перифокальная зона; В: некротическая зона; шкала 75 мкм.

Figure 2. Intravital confocal images of the multiform glioblastoma (Grade IV) 1. Hsp70 — green, TMRM — red, DNA — blue. A: contrast accumulating zone, B: perifocal zone, B: necrotic zone; scale bar 75 μm.

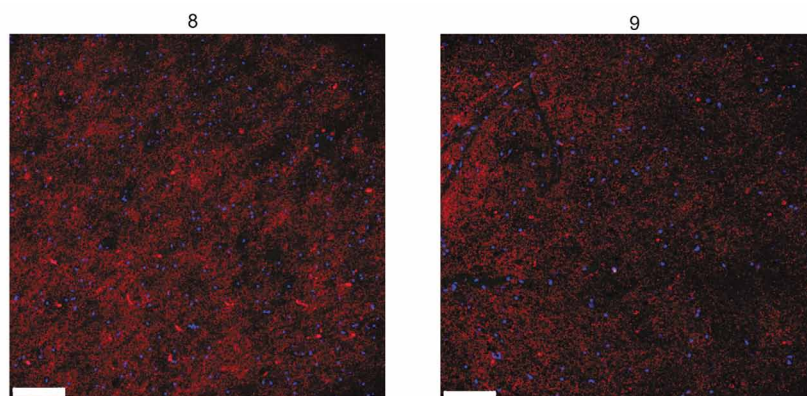


Рисунок 3. Прижизненные конфокальные изображения ткани головного мозга пациентов 8 и 9 с фокальной кортикальной дисплазией. Hsp70 — зелёный, TMRM — красный, ДНК — синий; шкала 100 мкм.

Figure 3. Live confocal microscopy images of the brain tissue of patients 8 and 9 with focal cortical dysplasia.

Hsp70 — green, TMRM — red, DNA — blue; scale bar 100 μm.

Для сравнения уровня экспрессии Hsp70 в образцах опухолевого материала провели анализ изображений по интенсивности зеленых пикселей (Hsp70). Результаты теста Краскела–Уоллиса для значений интенсивностей показали, что между исследуемой и контрольной группами имеются существенные отличия (Рисунок 4). Данные результаты свидетельствуют высоком уровне экспрессии Hsp70 в опухолевых клетках по сравнению с контролем.

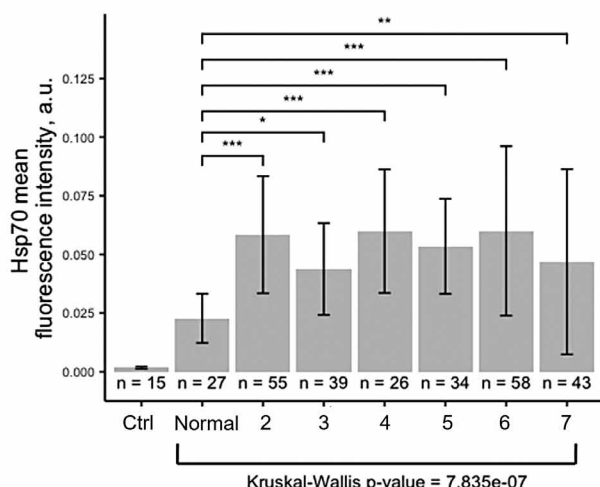


Рисунок 4. Значения интенсивностей зелёных пикселей (Hsp70) на прижизненных конфокальных изображениях опухоли. Значения столбцов представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость представлена как ns – $p \geq 0.05$, * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$.

Figure 4. Green pixel intensities (Hsp70) on live confocal microscopy images of brain tumors. Column values are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical significance is presented as ns – $p \geq 0.05$, * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$.

Заключение. Впервые была проведена прижизненная визуализация mHsp70-положительных клеток в злокачественных опухолях головного мозга. Была выявлена внутриядерная, цитоплазматическая и поверхностная окраска на Hsp70. Интенсивное окрашивание клеток TMRM свидетельствует об их жиз-

неспособности. На материале от 6 пациентов была выявлена повышенная экспрессия Hsp70 в опухолевых клетках по сравнению с контрольными клетками ткани мозга пациентов с эпилепсией. Полученные результаты свидетельствуют о возможном использовании Hsp70 в качестве маркера опухолевых клеток.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075–15–2022–301).

Financing. This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075–15–2022–301).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. **Compliance with patient rights and principles of bioethics.** All patients gave written informed consent to participate in the study.

ORCID авторов / ORCID of authors

Тагаева Руслана Батыровна/Tagaeva Ruslana Batyrovna
<https://orcid.org/0000-0001-8347-7274>

Бобков Данила Евгеньевич/Bobkov Danila Evhenjovich
<https://orcid.org/0000-0002-0358-9266>

Нечаева Анастасия Сергеевна/
Nechaeva Anastasiia Sergeevna
<https://orcid.org/0000-0001-9898-5925>

Федоров Евгений Вадимович/Fedorov Evgeny Vadimovich
<https://orcid.org/0000-0001-7862-9341>

Диконенко Михаил Викторович/
Dikonenko Mikhail Viktorovich
<https://orcid.org/0000-0002-8701-1292>

Юдинцева Наталья Михайловна/
Yudintceva Natalia Mikhailovna
<https://orcid.org/0000-0002-7357-1571>

Самочерных Константин Александрович/
Samochernykh Konstantin Aleksandrovich
<https://orcid.org/0000-0003-0350-0249>

Ким Александр Вонгиевич/Kim Alexander Vongievich
<https://orcid.org/0000-0002-6219-7270>

Шевцов Максим Алексеевич/Shevtsov Maxim Alekseevich
<https://orcid.org/0000-0002-8539-2239>

Литература/References

- Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends Biochem. Sci. 2006; 31:164–172. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.006>
- Shevtsov M, Huile G, Multhoff G. Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. Phil. Trans. R. Soc. B. 2017;373:20160526. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0526>
- Thorsteinsdottir J, Stangl S, Fu P, Guo K, Albrecht V, Eigenbrod S, Erl J, Gehrmann M, Tonn JC, Multhoff G, Schichor C. Overexpression of cytosolic, plasma membrane bound and extracellular heat shock protein 70 (Hsp70) in primary glioblastomas. J. Neurooncol. 2017;135:443–452. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2600-z>
- Stangl S, Gehrmann M, Dressel R, Alves F, Dullin C, Themelis G, Ntziachristos V, Staebelin E, Walch A, Winkelmann I. In vivo imaging of CT26 mouse tumours by using cmHsp70.1 monoclonal antibody. J. Cell Mol. Med. 2011;15:874–887. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01067.x>
- Shevtsov M, Stangl S, Nikolaev B, Yakovleva L, Marchenko Y, Tagaeva R, Sievert W, Pitkin E, Mazur A, Tolstoy P, Galibin O, Ryzhov V, Steiger K, Smirnov O, Khachatryan W, Chester K, Multhoff G. Granzyme B Functionalized Nanoparticles Targeting Membrane Hsp70-Positive Tumors for Multimodal Cancer Theranostics. Small. 2019;15: e1900205. <https://doi.org/10.1002/sml.201900205> (EDN: BZAHNZ)