

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА Hsp70 НА ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Н. М. Юдинцева^{1,2,*}, Е. А. Оганесян^{1,2,3}, Д. Е. Бобков¹, Р. Б. Лихоманова¹, Н. А. Аксенов¹,
А. С. Нечаева^{2,3}, Ю. А. Улитин³, К. А. Самочерных³, М. А. Шевцов^{1,2,3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, 194100, Российская Федерация

³ Центр персонализированной медицины, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197341, Российская Федерация

* E-mail: yudintceva@mail.ru

Аннотация. Обоснование и цель. В связи с высокой инвазивностью клеток мультиформной глиобластомы (МГБ) существует острая необходимость в разработке новых терапевтических стратегий, в частности направленных на подавление клеточной подвижности. В работе охарактеризованы три первичные культуры клеток МГБ человека. **Методика.** Использовали конфокальную микроскопию и проточную цитометрию. **Результаты.** Охарактеризованы три первичные культуры клеток МГБ, у которых выявлена экспрессия мембранной формы белка теплового шока Hsp70 (mHsp70). Показано, что ингибиторы Hsp70 (PES, действующий на субстрат-связывающий домен белка, и JG-98, действующий на нуклеотид-связывающий домен) способствовали снижению средней скорости движения клеток, при этом наиболее выраженный эффект наблюдали при воздействии ингибитора JG-98. **Заключение.** Полученный результат позволяет предположить, что нуклеотид-связывающий домен Hsp70 наиболее активно вовлечен в процессы миграции и инвазии опухолевых клеток, и это свидетельствует о перспективности использования Hsp70 в качестве мишени для таргетной терапии злокачественных новообразований головного мозга.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, белок теплового шока Hsp70, клеточная подвижность, ингибиторы Hsp70

Принятые сокращения: МГБ — мультиформная глиобластома; ГБ — глиобластома; СК — стволовые клетки; GFAP (glial fibrillary acidic protein) — глиальный фибриллярный кислый белок; mHsp70 — мембранная форма белка теплового шока (Hsp) 70; JG-98 (benzothiazole rhodacyanine) — бензотиазол родацианин; NFP (neurofilament protein) — белок нейрофиламента; NSE (neuron-specific enolase) — нейронспецифическая енолаза; PES (2-phenylethanesulfonamide) — 2-фенилэтинсульфонамид.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-58-55001 Китай_a).

Соблюдение этических стандартов. Протокол клинического исследования был одобрен Комитетом по этике Федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова № 2712-20 от 21 декабря 2020 г. и соответствовал принципу Хельсинкской декларации. Все пациенты подписали форму информированного добровольного согласия на предоставление материала для проведения научных исследований и дальнейшего опубликования результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Ссылка для цитирования: Юдинцева Н. М., Оганесян Е. А., Бобков Д. Е., Лихоманова Р. Б., Аксенов Н. А., Нечаева А. С., Улитин Ю. А., Самочерных К. А., Шевцов М. А. Оценка влияния белка теплового шока Hsp70 на подвижность клеток первичных культур мультиформной глиобластомы человека. Цитология / Cell and Tissue Biology, 2025, том 67, № 4, с. 236. doi: 10.7868/S3034606125040031

Поступила в редакцию 16.07.2025

После исправлений 03.08.2025

Принята к публикации 05.08.2025

УДК 57.085.23; 57.576.5

DOI: 10.7868/S3034606125040031

Evaluation of Heat Shock Protein Hsp70 Effects on Cell Motility in Primary Culture of Human Glioblastoma Multiforme

N. M. Yudintceva^{a,b,*}, E. A. Oganesyana^{a,b,c}, D. E. Bobkov^a, R. B. Likhomanova^a, N. A. Aksenov^a,
A. S. Nechaeva^c, Y. A. Ulitin^c, A. N. Samochernykh^c, M. A. Shevtsov^{a,b,c}

^a Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russian Federation

^b Saint Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Center for Personalized Medicine of the Almazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of Russia,
St. Petersburg, 197341, Russian Federation

* e-mail: yudintceva@mail.ru

Abstract. Due to the high invasiveness of glioblastoma multiforme (MGB) cells, there is an urgent need to develop new therapeutic strategies, in particular, aimed at suppressing cell motility. In this work, three primary human MGB cell cultures were characterized using confocal microscopy and flow cytometry methods and the expression of the membrane form of the heat shock protein Hsp70 (mHsp70) was revealed. It has been shown that Hsp70 inhibitors (PES acting on the substrate-binding domain of the protein and JG-98 acting on the nucleotide-binding domain) contributed to a decrease in the average speed of cell motility, while the most pronounced effect was observed when cells were exposed to the JG-98 inhibitor. The obtained results suggest that the nucleotide-binding domain of Hsp70 is most actively involved in the processes of migration and invasion of tumor cells, and indicates the prospects of using Hsp70 for targeted therapy of malignant brain tumors.

Keywords: glioblastoma multiforme, Hsp70, heat shock protein, cellular motility, Hsp70 inhibitors

Funding. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (project ID: 19-58-55001 China_a).

Ethics approval and consent to participate. All studies were conducted in accordance with the principles of biomedical ethics as outlined in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. They were also approved by the Ethics Committee of the Center for Personalized Medicine of the Almazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia; protocol no. 2712-20 dated December 21, 2020). Each participant in the study provided a voluntary written informed consent to the use of his biomaterials for research and subsequent publication of the results after receiving an explanation of the potential risks and benefits, as well as the nature of the upcoming study.

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Yudintceva N. M., Oganesyana E. A., Bobkov D. E., Likhomanova R. B., Aksenov N. A., Nechaeva A. S., Ulitin Y. A., Samochernykh A. N., Shevtsov M. A. Tsitologiya / Cell and Tissue Biology, 2025, vol. 67, no. 4, p. 237. doi:10.7868/S3034606125040031

Received July 16, 2025

Revised August 3, 2025

Accepted August 5, 2025

Злокачественные глиомы являются наиболее распространенными первичными опухолями головного мозга (Ostrom et al., 2013). Согласно системе классификации ВОЗ мультиформная глиобластома (МГБ) относится к глиомам IV степени (Louis et al., 2021). Это активно прогрессирующее заболевание с агрессивным фенотипом, характеризующимся активной пролиферацией клеток, их повышенным инвазивным потенциалом, а также процессами неоангиогенеза (Schaff et al., 2023). Средняя продолжительность жизни пациентов с МГБ составляет 12–15 мес. при стандартной форме лечения, сочетающей хирургическую резекцию и последующую лучевую и химиотерапию темозоломидом (Giering et al., 2017). Одним из важных факторов в прогрессии МГБ является высокая инвазивность клеток. Клетки глиобластомы способны быстро проникать как в близлежащие, так и в отдаленные ткани, что способствует устойчивости к лечению и высокой доли рецидивов (Armento et al., 2017; Gupta et al., 2024). Клетки МГБ способны мигрировать на большое расстояние от опухоли, делая невозможной полную хирургическую резекцию и при этом приобретая резистентность к воздействию облучения. Таким образом, крайне важной задачей является разработка новых терапевтических стратегий, направленных на подавление инвазии клеток МГБ.

Несмотря на многочисленные исследования по разработке биомаркеров для выявления и прогнозирования МГБ, лишь немногие из них дали многообещающие результаты и оценка их эффективности по-прежнему представляет собой не решенную задачу (Lan et al., 2024). На основе подробного генетического анализа изменения профиля экспрессирующихся белков МГБ была создана огромная база данных биомаркеров различных классов. Но, к сожалению, это пока не привело к значительным прорывам в лечении МГБ, что вероятно, связано с молекулярной гетерогенностью опухоли (Muir et al., 2020).

Одной из перспективных мишеней для таргетной терапии опухоли головного мозга являются белки теплового шока (heat shock proteins, Hsp), которые представляют большое семейство консервативных белков, действующих как молекулярные шапероны и играющих ключевую роль во внутриклеточном белковом гомеостазе (протеостазе), регуляции апоптоза, защите от различных стрессовых факторов (например, гипоксии, теплового и оксидативного стрессов). Было показано, что помимо внутриклеточной локализации, члены различных семейств HSP экспонированы на плазматической мембране злокачественно трансформированных, а не нормальных, что делает их привлекательными в качестве возможных мишеней для терапии и диагностики рака (Kumar et al., 2016; Shevtsov et al., 2020)

Одним из таких белков является белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (Hsp70). Показано, что при регуляции пролиферации и апоптоза Hsp70 связывает и регулирует β 4-галактозилтрансферазу 5 (Sun et al., 2019). В целом, истощение Hsp70 значительно снижает клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию, а также способствует клеточному апоптозу в раковых клетках (Shan et al., 2016; Sun et al., 2019). Выявлено взаимодействие Hsp70 с другими белками и его влияние на специфические сигнальные пути, такие как ERK1/2 и PI3K/AKT, которые связаны с выживаемостью, а также инвазией и миграцией опухолевых клеток (Liu et al., 2021). Высокий уровень экспрессии мембранной формы

Hsp70 (mHsp70) выявлен у опухолевых клеток различных типов, включая первичные глиобластомы (Thorsteinsdottir et al., 2017), карциному головы и шеи, карциному легкого (Breuninger et al., 2018), колоректальный рак и рак желудка (Pfister et al., 2007), остеосаркому (Uozaki et al., 2000) и др. Белок mHsp70 также участвует в ассоциации опухолевых клеток с внеклеточным матриксом, влияя на их подвижность и инвазию, что также делает его привлекательным в качестве мишени для терапии МГБ (Barreca et al., 2017).

В исследованиях на различных клеточных линиях было показано, что подавление Hsp70 с помощью shRNA существенно снижало инвазию и миграционные способности клеток колоректального рака (линии COLO205, HCT116) и рака молочной железы (линии MCF7 и MDA-MB231) (Jagadish et al., 2016). Данный эффект в отношении подвижности клеток был дополнительно подтвержден в экспериментах с эпителиальными клетками рака яичников другими исследователями (Gupta et al., 2017). Кроме того, было выявлено, что повышенная экспрессия изоформы 14-3-3 σ (стратифин) индуцировала экспрессию фактора теплового шока 1 α (HSF1 α) и Hsp70 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы при посредничестве сигнального пути GSK3 β / β -катенин, что, в свою очередь, увеличивало подвижность опухолевых клеток и при этом снижало инвазию клеток (Wang et al., 2016).

Можно предполагать, что клетки с высокой экспрессией mHsp70 обладают повышенной подвижностью, и это свойство способно обеспечить им преимущество в выживаемости, устойчивости к химиотерапии и высокую инвазивность. В связи с этим mHsp70 можно рассматривать в качестве потенциального клинического биомаркера для диагностики МГБ, а также при разработке подходов, направленных на снижение инвазивного потенциала опухолевых клеток.

В нашей работе оценено влияние на подвижность клеток первичной культуры МГБ mHsp70 и двух его ингибиторов: 2-фенилэтилсульфонамид/пифитрина- μ (PES), воздействующего на субстрат-связывающий домен, и бензотиазолродацианина (JG-98), взаимодействующего с нуклеотид-связывающим доменом белка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал. Работа проведена с использованием послеоперационного материала от пациентов с диагнозом МГБ (РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия).

Реактивы, посуда, антитела. Использованы питательная среда DMEM/F12 и бессывороточная добавка B27 (Thermo Fisher Scientific, США), эпидермальный фактор роста (EGF), основной фактор роста фибробластов (β FGF) и гентамицин (Gibco, США), раствор аккумулята (StemPro®Accutase, Gibco, США), бычий сывороточный альбумин и фосфатный забуференный солевой раствор Дульбекко без кальция и магния (Sigma-Aldrich, США), поли-L-лизин (Sigma-Aldrich, США), TritonX100 (MP Biomedicals, США); Tween 20 (Servicebio, Китай), монтирующая среда Mounting Medium, содержащая DAPI (Ibidi, Германия); Hoechst 33342 (Lumiprobe, Россия); PES (Sigma-Aldrich, США), JG-98 (MedChemExpress, США), чашки с неадгезивной поверхностью (кат. номер 171099,

Nunc, США), клеточный фильтр с диаметром пор 40 мкм (CellStainer, США).

Первичные антитела: кроличьи моноклональные антитела против глиального фибриллярного кислого белка GFAP (PA5-16291); моноклональные антитела мыши против β -3-тубулина, клон 2G10 (β -3 tubulin monoclonal antibody (2G10) (Thermo Fisher, США); кроличьи антитела к SOX2, клон D6D9, конъюгированные с Alexa Fluor® 555 (SOX2 eFluor 570-SOX2 (D6D9) XP® rabbit mAb (Alexa Fluor® 555 Conjugate) (Cell Signaling Tech, США); антитела мыши против Hsp70, конъюгированные с FITC (анти-Hsp70-FITC, MultiImmune, Германия); изотипические антитела мыши против иммуноглобулина человека, конъюгированные с FITC (IgG1(mouse)-FITC, Beckman Coulter, США). **Вторичные антитела:** козы против тяжелых цепей IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor® 488 (goat anti-rabbit IgG (Heavy Chain) Superclonal™ secondary antibody; Thermo Fisher, США); антитела козы против иммуноглобулина мыши, конъюгированные с Alexa Fluor™ 555 (Alexa Fluor™ 555 conjugated anti-mouse IgG, Thermo Fisher, США).

Выделение и культивирование клеток. Из фрагментов послеоперационного материала были выделены клетки в соответствии со стандартным протоколом (Seidel et al., 2015). Работа выполнена на трех первичных клеточных культурах МГБ человека: IN1, ABD, MTS (аббревиатура названий условна и соответствует инициалам пациентов). Клетки получали из фрагментов послеоперационного материала от пациентов с диагнозом МГБ. Первичные культуры клеток МГБ культивировали в инкубаторе при 37 °C в атмосфере 5 %-ного CO₂ в среде DMEM/F12, содержащей B27 (250 мкг/мл, EGF и β FGF (по 20 нг/мл), а также гентамицин (50 мкг/мл). Для создания условий, в которых клетки формировали сфероиды, клеточную суспензию после выделения помещали в чашки с неадгезивной поверхностью. Смену среды выполняли два раза в неделю.

Диссоциация сфероидов и получение клеточной суспензии. Для последующего анализа клеток с помощью конфокальной микроскопии, проточной цитофлуориметрии и оценки клеточной подвижности получали одноклеточную суспензию. Для этого сфероиды диссоциировали с использованием раствора ацетаза в режиме 37 °C в течение 20 мин на термощейкере (150 RPM/мин). Для инактивации действия фермента в раствор вносили промыочный буфер, содержащий 2 % бычьего сывороточного альбумина и фосфатного забуференного солевого раствора Дульбекко без кальция и магния в соотношении 1:1. Центрифугировали в течение 3 мин при 0.2 g. Осадок разводили в небольшом объеме питательной среды и пропускали через клеточный фильтр с диаметром пор 40 мкм. Для создания адгезивной поверхности использовали покровные стекла (для дальнейшего приготовления препаратов для конфокальной микроскопии) или поверхность культуральной посуды (для оценки клеточной подвижности), которые покрывали поли-L-лизинном в течение 15 мин. Перед нанесением суспензии клеток на поверхность стекол/лунок раствор поли-L-лизина удаляли и один раз промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS).

Оценка экспрессии маркеров нейрональных, глиальных и стволовых клеток в первичных культурах МГБ
ЦИТОЛОГИЯ, 2025, том 67, № 4 / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2025, vol. 67, no. 4

с помощью метода конфокальной микроскопии. Суспензию клеток на поверхности покровных стекол, покрытых поли-L-лизинном, культивировали в течение ночи в условиях CO₂ инкубатора. Далее клетки однократно отмывали PBS и в течение 15 мин фиксировали 4 %-ным формалином, затем трижды отмывали PBS и инкубировали в 0.1 %-ном растворе TritonX100 в течение 15 мин для пермеабиллизации мембраны. После трехкратной отмывки PBS вносили первичные антитела в разведении 1:250 и инкубировали в течение ночи при 4 °C. Для оценки экспрессии маркеров нейронального и глиального происхождения использовали первичные антитела против GFAP и против β -тубулина, а в качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Alexa Fluor® 488 и мыши, конъюгированные с Alexa Fluor™ 555 соответственно в разведении 1:1000. Стволовые клетки в первичных культурах МГБ выявляли с использованием конъюгированных с Alexa Fluor® 555 антител к SOX2. Для оценки экспрессии mHsp70 клетки инкубировали с анти-Hsp70-FITC антителами в разведении 1:250 в течение 25 мин на льду в темноте. После инкубирования клетки три раза промывали раствором 0.1 %-ного Tween 20 в PBS и фиксировали в 10 %-ном растворе формалина. Препараты монтировали с использованием среды Mounting Medium, содержащей краситель DAPI. Число экспериментов для каждой клеточной культуры составляло не менее трех. В работе был использован конфокальный микроскоп (Olympus FV3000, Япония) с конфокальной системой Olympus IX83 microscope, (Olympus Corporation, Япония). Для выявления иммунофлуоресценции использовали диодный лазер с длиной волны 488 и 561 нм, для детекции ядер — 405 нм.

Оценка экспрессии mHsp70 в клеточных популяциях первичных культур МГБ с помощью метода проточной цитометрии. Клетки инкубировали с анти-Hsp70-FITC антителами в объеме 50 мкл в течение 25 мин на льду, затем выполняли трехкратную отмывку раствором холодного PBS и центрифугировали при 0.4 g и 4 °C в течение 3 мин. Осадок разводили в 200 мкл PBS. В качестве контролей использовали неокрашенные клетки и клетки, инкубированные с анти-IgG1-FITC антителами (Beckman Coulter, США). Использовали изотипические антитела и антитела против mHsp70 в разведении 1:10. Концентрация клеток в экспериментах составляла не менее 1 млн/мл, число повторов — не меньше трех. Анализ экспрессии mHsp70 для первичных клеточных культур МГБ проводили с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Оценка клеточной подвижности. Оценку клеточной подвижности выполняли с помощью долгосрочной прижизненной визуализации. Клетки высевали в 12-луночный планшет, предварительно покрытый поли-L-лизинном, с конфлюэнтностью около 15 %. Ядра окрашивали Hoechst 33342. Для оценки влияния ингибиторов Hsp70 вещества PES (1 мкМ; Sigma-Aldrich, США) и JG-98 (50 нМ; MedChemExpress, США), действующих соответственно на субстрат-связывающий и нуклеотид-связывающий домен белка, вносили в среду непосредственно перед экспериментом. В качестве контроля использовали клетки в стандартных условиях культивирования. Каждые 15 мин регистрировали по 10 полей зрения в каждой лунке, съемку проводили в течение 24 ч. Для регистрации

треков движения, характеризующихся средней скоростью, использовали систему Image ExFluorer (LCI, Корея) со встроенным искусственным интеллектом, позволяющим автоматически определять среднюю скорость. Данные представляли в виде медианы с 95 %-ным доверительным интервалом.

Статистический анализ. Массивы данных были получены в формате таблиц Excel и статистически обработаны при использовании программного обеспечения GraphPad Prism 9.4.1.681 (GraphPad Software Inc., США). Данные были проверены на нормальное распределение с помощью теста Шапиро–Уилка (W-тест). При определении различий в группах с нормально и ненормально распределенными данными использовали тесты ANOVA и Краскела–Уоллиса соответственно. Если данные проходили проверку на нормальность, то для выявления статистически значимых различий использовали *t*-критерий Стьюдента (*t*-test). Данные представлены в виде средних значений с указанием 95 %-ного интервала для каждого набора данных отдельно. Ширину доверительных интервалов оценивали методом Уилсона. Если данные не прошли W-критерий, использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе получены первичные опухолевые культуры клеток МГБ с использованием методики, которая позволяет выделять и корректно поддерживать опухолевые клетки в виде сфероидных культур (Seidel

et al., 2015). Клетки в чашках с неадгезивной поверхностью находились в суспензионном состоянии, что постепенно приводило к спонтанному образованию ими неоднородных сфероидов размером от 50 мкм до 2 мм (рис. 1а).

Полученные сфероиды являются высоко пациент-специфическими клетками и формируют сфероиды различной формы и размеров даже в пределах одной клеточной популяции. Существует возможность формирования нейросфер одинакового размера. Это возможно после проведения диссоциации и перевода “родительской” нейросферы в одноклеточную суспензию, с последующим проведением как минимум 20 пассажей клеток (Wu et al., 2010; Zhang et al., 2009), однако это существенно изменяет состав выделенной популяции клеток и их свойства. Диссоциация сфероидов непосредственно после формирования клетками первичных сфероидов позволяет производить оценку различных свойств всей клеточной популяции (Tafani et al., 2011). Такие первичные опухолевые культуры могут служить оптимальной моделью для изучения механизмов, лежащих в основе ключевых аспектов биологии ГБ, включая онкогенность, иерархию СК, инвазию и терапевтическую резистентность. После диссоциации клеточных сфероидов и перевода их в 2D-условия культивирования клетки МГБ представляли собой гетерогенную популяцию с различной морфологией (рис. 1б).

Первичные клетки, выделенные из образцов опухолей человека и культивируемые в бессывороточных сфероидных культурах при малом числе пассажей в условиях определённого уровня факторов роста, гораздо точнее воспроизводят ключевые этапы физиологии опухолевых

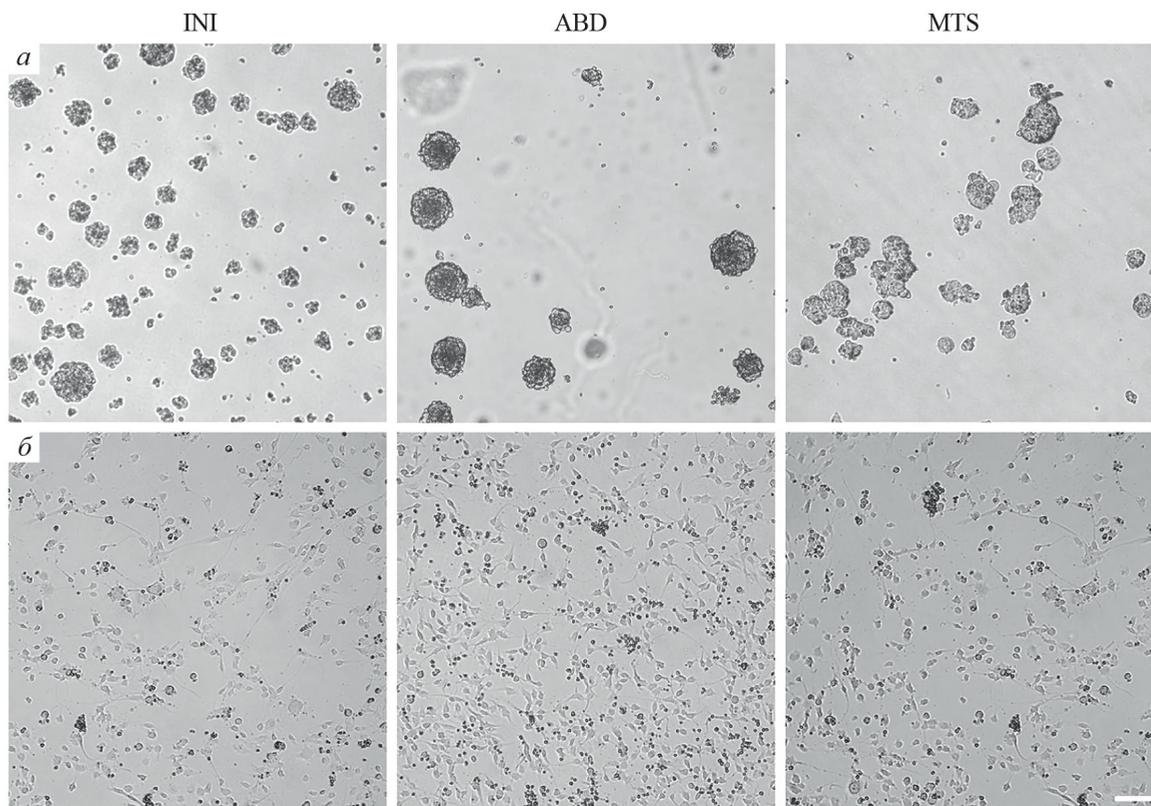


Рис. 1. Морфология вариантов клеток в культуре (INI, ABD, MTS) первичной мультиформной глиобластомы (МГБ). а — Культивирование клеток в виде сфероидов (верхний ряд), б — клетки, адгезированные на матриксе (нижний ряд). Инвертированный микроскоп Nikon SF100 (Япония). Масштабный отрезок: 100 мкм.

клеток. Такие культуры гораздо больше похожи на первичную опухоль, из которой они были получены (Lee et al., 2006).

Для диагностики ГБ используется несколько маркеров, но ни один из них не является исключительно специфичным для опухоли. Разработанная исследователями панель маркеров включает в себя астроцитарный маркер GFAP, глиальный маркер S100B (связывающий кальций белок S100B), нейрональный маркер β 3-тубулин, опухолевый маркер виментин и маркеры клеток-предшественников нестин и SOX2, а также маркер пролиферации Ki-67 и маркер фибробластов TE7 (Grube et al., 2021).

Большое количество данных за последнее десятилетие указывает на то, что ГБ и другие опухоли имеют иерархическую организацию разнородных типов клеток, которые генерируются и поддерживаются клетками, обладающими

характеристиками стволовых клеток (СК). СК опухоли в значительной степени ответственны за прогрессирование и рецидив заболевания, а также опосредуют резистентность к проводимой терапии (Vargas-Toscano et al., 2021). Популяция СК, инициирующая опухоль, оптимально сохраняется и поддерживается в первичных культурах клеток ГБ. Известны различные молекулярные биомаркеры, связанные с плюрипотентностью СК (Muc, Oct, Nanog, SOX2, Nestin и др).

Экспрессия GFAP, β 3-тубулина и SOX2, входящих в панель маркеров глиобластомы, была выявлена во всех исследуемых первичных культурах клеток МГБ и представлена на рис. 2. Полученные данные позволяют утверждать, что клетки первичных культур относятся к опухолям ЦНС, в частности к ГБ. Кроме того, в наших предыдущих исследованиях была показана достаточно высокая колокализация Hsp70 с SOX2 в фрагментах опухолевой

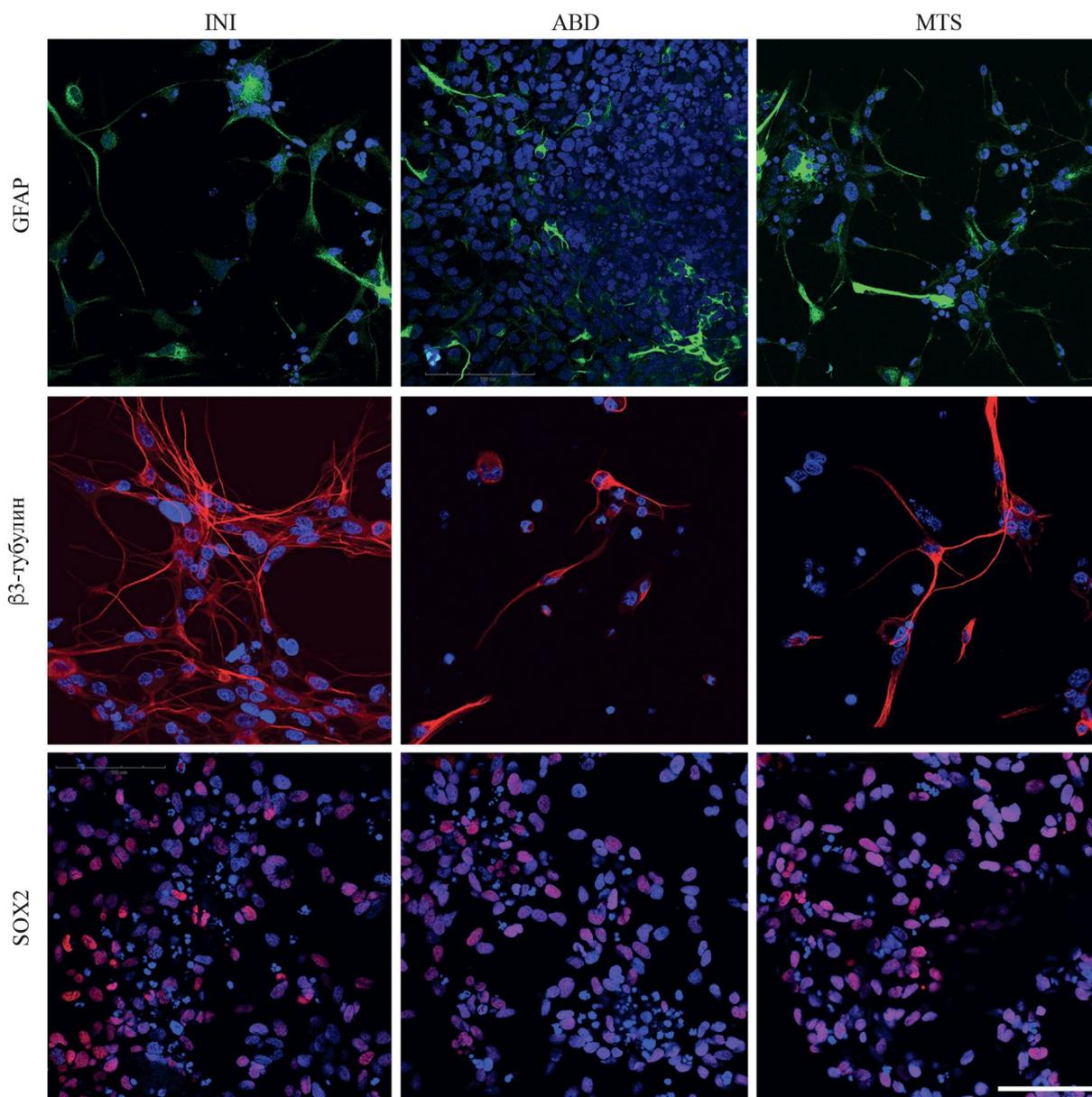


Рис. 2. Оценка экспрессии маркеров нейрональных, глиальных и стволовых клеток в первичных культурах (INI, ABD, MTS) МГБ человека. Конфокальная микроскопия. GFAP — зеленый цвет, β 3-тубулин и SOX2 — красный, DAPI (окраска ядер) — синий. Масштабный отрезок: 100 мкм.

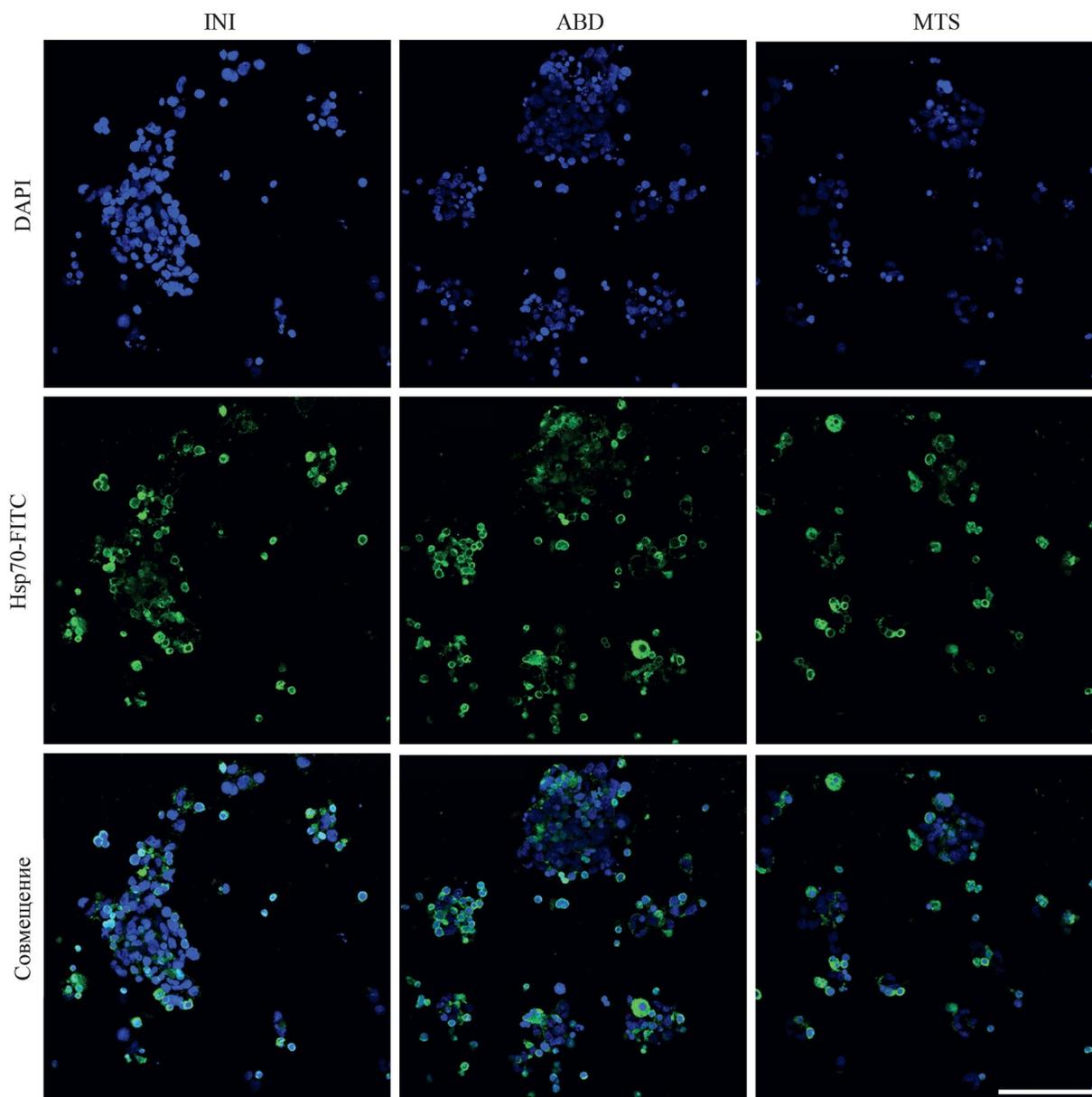


Рис. 3. Оценка экспрессии mHsp70 у клеток первичных культур (INI, ABD, MTS) МГБ человека. Конфокальная микроскопия. Анти-Hsp70-FITC антитела — зеленый цвет, DAPI (окраска ядер) — синий. Масштабный отрезок: 100 мкм.

ткани (Yudiniceva et al., 2022), что позволяет предполагать эффективность воздействия таргетной терапии на mHsp70 и снижение потенциала опухоли.

Для оценки роли mHsp70 в подвижности клеток предварительно показали, что исследуемые клетки трех первичных культур МГБ положительны по экспрессии mHsp70 (рис. 3, 4). На представленных цитограммах можно выделить две субпопуляции клеток: с высоким и низким уровнем экспрессии mHsp70 (рис. 4). Для оценки доли клеток с положительной экспрессией mHsp70 порог отсечения был установлен индивидуально для каждой первичной культуры, на основе среднего значения интенсивности флуоресценции, выявленной для изотипического контроля. Для клеток первичных культур он составлял 246.0, 20.8 и 440.6 усл. ед для клеток INI, ABD и MTS соответственно. Значения интенсивности флуоресценции для клеток, превышающих данные значения,

рассматривали как клетки mHsp70-позитивные. Согласно полученным данным доля mHsp70-позитивных клеток в каждой популяции составляла приблизительно 68, 76 и 92 % для INI ABD и MTS соответственно. Полученные данные подтверждают наличие выраженной экспрессии мембранной формы Hsp70 в исследуемых первичных клеточных культурах МГБ.

Оценку клеточной подвижности выполняли с помощью анализа траекторий единичных клеток, которые затем нормализовали и представляли, как дополнительный способ визуализации клеточной подвижности (рис. 5 а, б). Для того чтобы оценить, какой из доменов Hsp70 может быть вовлечен в регуляцию клеточной подвижности, использовали его ингибиторы PES и JG-98, действующие на субстрат-связывающий и нуклеотид-связывающий домен белка соответственно, в нетоксичных для клеток концентрациях (данные МТТ-теста не приведены). Была

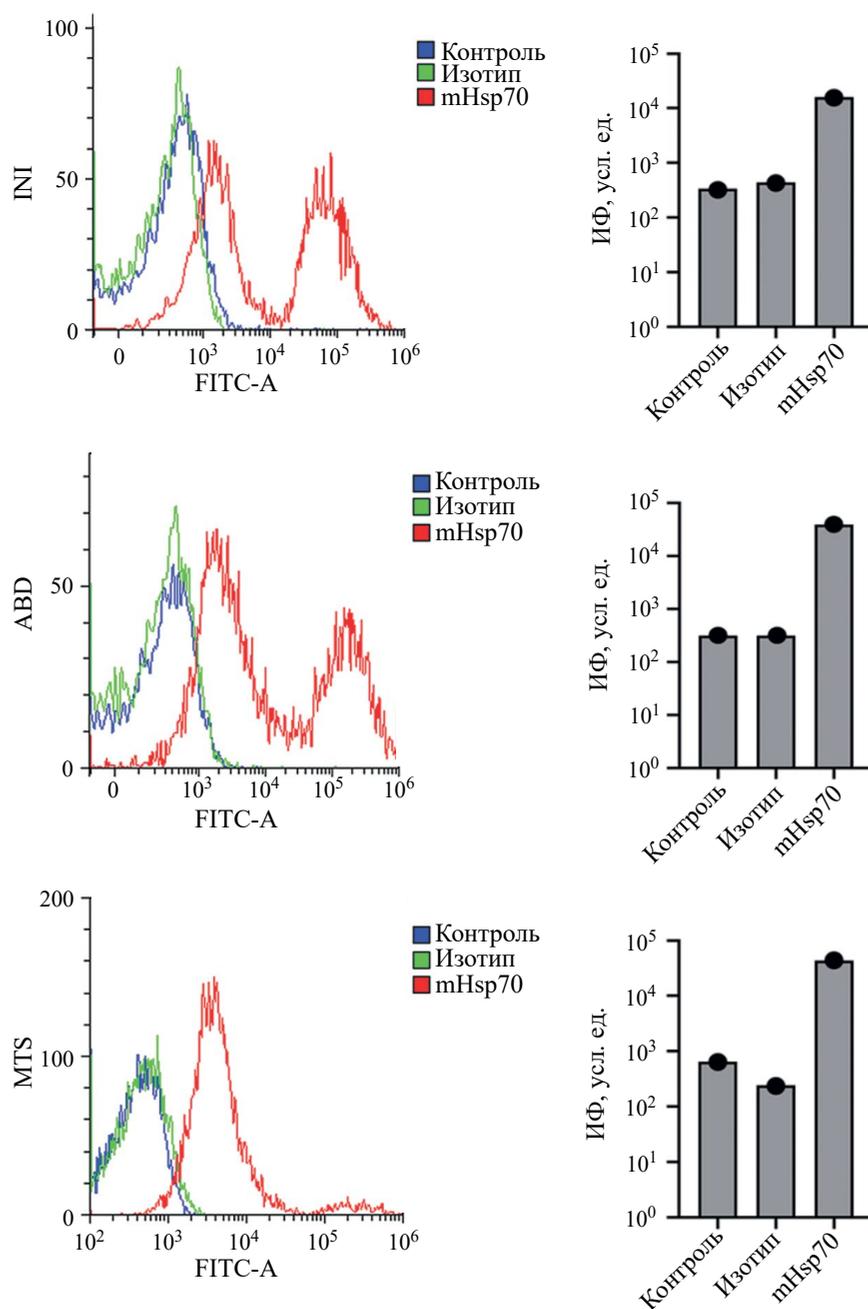


Рис. 4. Оценка экспрессии mHsp70 у клеток первичных культур (INI, ABD, MTS) МГБ человека. Проточная цитометрия. Показаны гистограммы распределения числа клеток по маркеру (слева) и графики (справа) средней интенсивности флуоресценции клеток (ИФ, средние значения).

проведена статистическая обработка и на основе полученных числовых значений, представленных в табл. 1, построены графики (рис. 5е), отражающие влияние ингибиторов Hsp70 на среднюю скорость движения клеток МГБ.

Показано, что клетки первичных культур МГБ имеют различную среднюю скорость движения. Так, наиболее подвижными оказались клетки MTS (24.65 ± 0.17 мкм/ч) по сравнению с INI (16.07 ± 0.476 мкм/ч). Используемые ингибиторы способствовали снижению средней скорости движения клеток, при этом наиболее выраженный статистически достоверный эффект наблюдали при воздействии ингибитора JG-98. Анализ данных показал, что его применение приводило почти к двукратному снижению

средней скорости движения клеток первичных культур ABD и MTS (табл. 1, рис. 5е). Полученный результат позволяет предположить, что нуклеотид-связывающий домен Hsp70 наиболее активно вовлечен в процессы миграции и инвазии опухолевых клеток (Likhomanova et al., 2025).

Таким образом, было показано, что клетки первичной культуры МГБ обладают высокой экспрессией mHsp70, а применение ингибиторов Hsp70 существенно снижает их подвижность, что позволяет рассматривать данный белок в качестве потенциального клинического биомаркера для диагностики МГБ, а также при разработке подходов, направленных на снижение инвазивного потенциала опухолевых клеток.

Таблица 1. Значения средней скорости движения клеток первичных культур МГБ человека на поли-L-лизине под действием ингибиторов Hsp70 (PES, JG-98)

Клетки первичной культуры МГБ	Средняя скорость, мкм/ч
INI: контроль	16.07 ± 0.476
+PES	11.74 ± 0.509
+JG-98	9.44 ± 0.853
ABD: контроль	21.77 ± 0.797
+PES	10.87 ± 0.419
+JG-98	9.12 ± 0.723
MTS: контроль	24.65 ± 0.17
+PES	23.84 ± 0.832
+JG-98	12.67 ± 0.863

Примечание. Указаны средние значения скорости и стандартное отклонение или стандартная ошибка среднего.

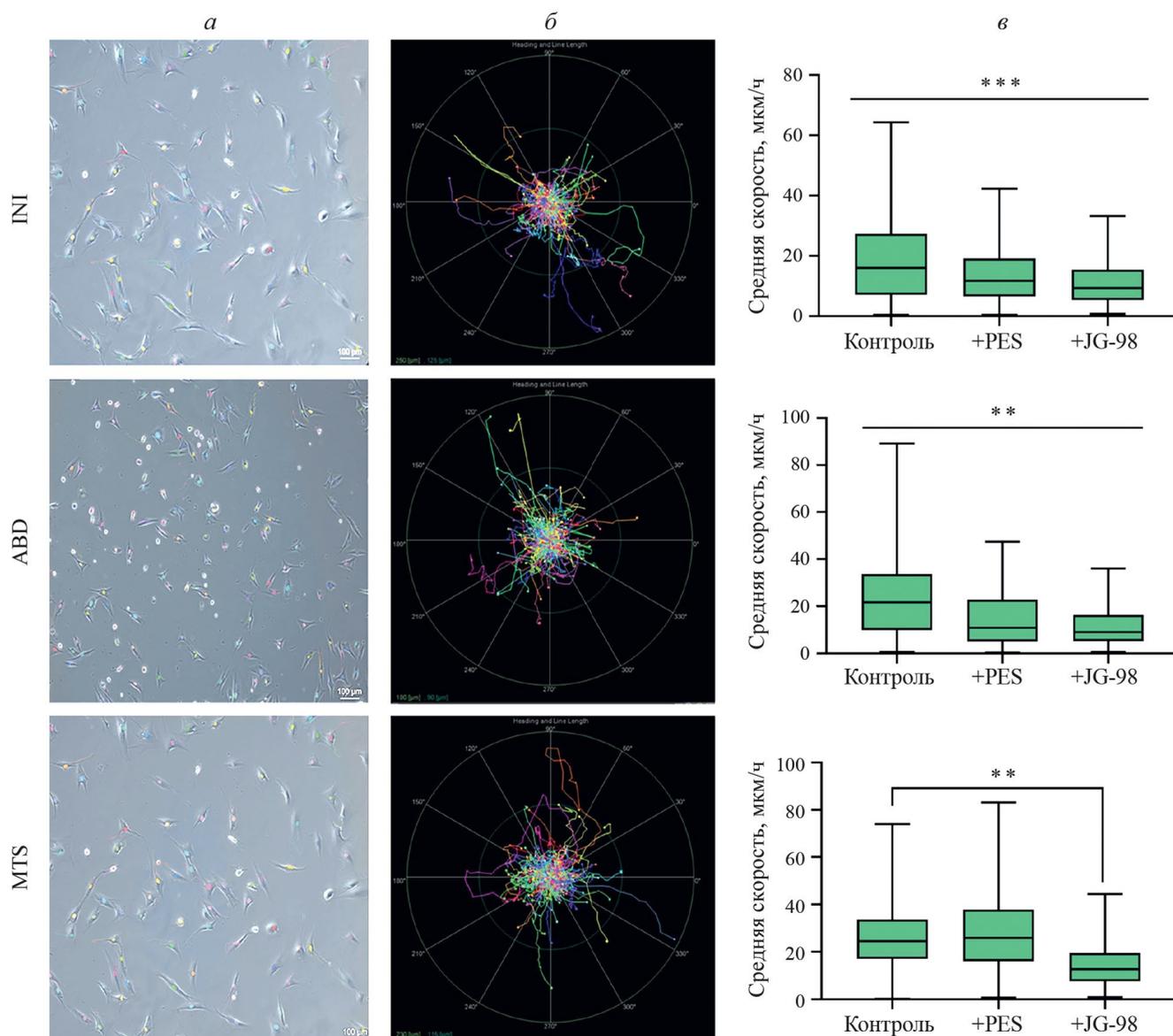


Рис. 5. Траектории движения единичных клеток МГБ (INI, ABD, MTS; *a*, *б*) и оценка клеточной подвижности (*в*). *a* — Примеры движения единичных клеток; *б* — нормализованные клеточные треки; *в* — диаграммы (boxplot), отражающие медианные значения скорости миграции клеток, межквартильный размах и экстремальные значения для клеток первичных культур МГБ. Различия между группами достоверны при $P < 0.01$ (**) и $P < 0.001$ (***), критерий Манна–Уитни. Варианты эксперимента: контроль (стандартные условия культивирования) и добавление в среду ингибитора PES (+PES) или JG-98 (+JG-98).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Armento A., Ehlers J., Schötterl S., Naumann U.* 2017. Molecular mechanisms of glioma cell motility. In: S. de Vleeschouwer (Ed.). Glioblastoma. V. 5. Brisbane (AU): Codon Publications, ISBN-13:978-0-9944381-2-6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-1010>
2. *Barreca M. M., Spinello W., Cavalieri V., Turturici G., Sconzo G., Kaur P., Tinnirello R., Asea A. A., Geraci F.* 2017. Extracellular Hsp70 enhances mesoangioblast migration via an autocrine signaling pathway. *J. Cell Physiol.* V. 232. P. 1460. <https://doi.org/10.1002/jcp.25722>
3. *Breuninger S., Stangl S., Werner C., Sievert W., Lobinger D., Foulds G. A., Wagner S., Pickhard A., Piontek G., Kokowski K., Gehrman M., Wagner B., Wiegand S., Multhoff G.* 2018. Membrane Hsp70-a novel target for the isolation of circulating tumor cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *Front. Oncol.* V. 8. P. 497. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00497>
4. *Gieryng A., Pszczolkowska D., Walentynowicz K. A., Rajan W. D., Kaminska B.* 2017. Immune microenvironment of gliomas. *Lab. Invest.* V. 97. P. 498. <https://doi.org/1038/labinvest.2017.19>
5. *Grube S., Freitag D., Kalff R., Ewald C., Walter J.* 2021. Characterization of adherent primary cell lines from fresh human glioblastoma tissue, defining glial fibrillary acidic protein as a reliable marker in establishment of glioblastoma cell culture. *Cancer. Rep. (Hoboken).* V. 4. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1324>
6. *Gupta N., Jagadish N., Surolia A., Suri A.* 2017. Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) a novel cancer testis antigen that promotes growth of ovarian cancer. *Am. J. Cancer. Res.* V. 7. P. 81.
7. *Gupta R. K., Niklasson M., Bergström T., Segerman A., Betsholtz C., Westermark B.* 2024. Tumor-specific migration routes of xenotransplanted human glioblastoma cells in mouse brain. *Sci. Rep.* V. 14. P. 81. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51063-7>
8. *Jagadish N., Parashar D., Gupta N., Agarwal S., Suri V., Kumar R., Suri V., Sadasukhi T. C., Gupta A., Ansari A. S., Lohiya N. K., Suri A.* 2016. Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) is a novel therapeutic target for colorectal cancer and is associated with tumor growth. *BMC. Cancer.* V. 16. P. 561. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2592-7>
9. *Kumar S., Stokes J., 3rd, Singh U. P., Scissum Gunn K., Acharya A., Manne U., Mishra M.* 2016. Targeting Hsp70: a possible therapy for cancer. *Cancer. Lett.* V. 374. P. 156. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056>
10. *Lan Z., Li X., Zhang X.* 2024. Glioblastoma: An update in pathology, molecular mechanisms and biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* V. 25. P. 3040. <https://doi.org/.3390/ijms25053040>
11. *Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N. M., Pastorino S., Purow B. W., Christopher N., Zhang W., Park J. K., Fine H. A.* 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer. Cell.* V. 9. P. 391. <https://doi.org/.1016/j.ccr.2006.03.030>
12. *Likhomanova R., Oganessian E., Yudincheva N., Fofanov G., Nechaeva A., Ulitin A., Kim A., Aksenov N., Shatrova A., Ziganshin R., Bobkov D., Samochnykh K., Combs S. E., Shevtsov M.* 2025. Glioblastoma cell motility and invasion is regulated by membrane-associated heat shock protein Hsp70. *J. Neuro-Oncol.* V. 175. P. 255. <https://doi.org/1007/s11060-025-05127-5>
13. *Liu H., Li Z., Li Q., Jia C., Zhang N., Qu Y., Hu D.* 2021. HSP70 inhibition suppressed glioma cell viability during hypoxia/reoxygenation by inhibiting the ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 53. P. 405. <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09904-5>
14. *Louis D. N., Perry A., Wesseling P., Brat D. J., Cree I. A., Figarella-Branger D., Hawkins C., Ng H. K., Pfister S. M., Reifenberger G. et al.* 2021. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* V. 23. P. 1231. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
15. *Muir M., Gopakumar S., T aylor J., Lee S., Rao G.* 2020. Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets. *Expert. Opin. Ther. Targets.* V. 24. P. 605. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1762568>
16. *Ostrom Q. T., Gittleman H., Farah P., Ondracek A., Chen Y., Wolinsky Y., Stroup N. E., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J. S.* 2013. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006—2010. *NeuroOncol.* 2014. V. 16 (5). P. 760. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not151>

17. Pfister K., Radons J., Busch R., Tidball J. G., Pfeifer M., Freitag L., Feldmann H. J., Milani V., Issels R., Multhoff G. 2007. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer*. V. 110. P. 926. <https://doi.org/10.1002/cncr.22864>
18. Schaff L. R., Mellingshoff I. K. 2023. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review. *JAMA*. V. 329. P. 574. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>
19. Seidel S., Garvalov B. K., Acker T. 2015. Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens. *Methods. Mol. Biol.* V. 1235. P. 263. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1785-3_19
20. Shan N., Zhou W., Zhang S., Zhang Y. 2016. Identification of HSPA8 as a candidate biomarker for endometrial carcinoma by using iTRAQ-based proteomic analysis. *OncoTargets. Ther.* V. 9. P. 2169. <https://doi.org/10.2147/ott.s97983>
21. Shevtsov M., Balogi Z., Khachatryan W., Gao H., Vigh L., Multhoff G. 2020. Membrane-associated heat shock proteins in oncology: from basic research to new theranostic targets. *Cells*. V. 9. Art. ID: 1263. <https://doi.org/10.3390/cells9051263>
22. Sun G., Cao Y., Dai X., Li M., Guo J. 2019. Hsc70 interacts with β 4gal5 to regulate the growth of gliomas. *Neuromolecular Med.* V. 21. P. 33. <https://doi.org/10.1007/s12017-018-08520-8>
23. Sun G., Cao Y., Xu Y., Huai D., Chen P., Guo J., Li M., Dai Y. 2019. Overexpression of Hsc70 promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells. *J. Cell. Biochem.* V. 120. P. 10707. <https://doi.org/10.1002/jcb.28362>
24. Tafani M., Di Vito M., Frati A., Pellegrini L., De Santis E., Sette G., Eramo A., Sale P., Mari E., Santoro A., Raco A., Salvati M., De Maria R., Russo M. A. 2011. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J. Neuroinflammation*. V. 8. Art. ID: 32. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-32>
25. Thorsteinsdottir J., Stangl S., Fu P., Guo K., Albrecht V., Eigenbrod S., Erl J., Gehrmann M., Tonn J. C., Multhoff G., Schichor C. 2017. Overexpression of cytosolic, plasma membrane bound and extracellular heat shock protein 70 (Hsp70) in primary glioblastomas. *J. Neurooncol.* V. 135. P. 443. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2600-z>
26. Uozaki H., Ishida T., Kakiuchi C., Horiuchi H., Gotoh T., Iijima T., Imamura T., Machinami R. 2000. Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol. Res. Pract.* V. 196. P. 665. [https://doi.org/10.1016/s0344-0338\(00\)80118-1](https://doi.org/10.1016/s0344-0338(00)80118-1)
27. Vargas-Toscano A., Janiak C., Sabel M., Kahlert U. D. 2021. A preclinical pipeline for translational precision medicine-experiences from a transdisciplinary brain tumor stem cell project. *J. Pers. Med.* V. 11. P. Art. ID: 892. <https://doi.org/10.3390/jpm11090892>
28. Wang C., Zhang Y., Guo K., Wang N., Jin H., Liu Y., Qin W. 2016. Heat shock proteins in hepatocellular carcinoma: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Int. J. Cancer*. V. 138. P. 1824. <https://doi.org/10.1002/ijc.29723>
29. Wu A., Wei J., Kong L. Y., Wang Y., Priebe W., Qiao W., Sawaya R., Heimberger A. B. 2010. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncol.* V. 12. P. 1113. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq082>
30. Yudin tseva N. M., Mikhrina A. L., Nechaeva A. S., Shevtsov M. A. 2022. Assessment of Heat-Shock Protein Hsp70 Colocalization with markers of tumor stem-like cells. *cell and tissue biology. Cell and Tissue Biol.* V. 16. P. 459. <https://doi.org/10.1134/S1990519X22050108>
31. Zhang P., Lathia J. D., Flavahan W. A., Rich J. N., Mattson M. P. 2009. Squelching glioblastoma stem cells by targeting REST for proteasomal degradation. *Trends. Neurosci.* V. 32. P. 559. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.07.005>