

*М.А. Шевцов^{1,2}, С.В. Шатик³, А.В. Токарев³, М.И. Мостова³, Л.А. Тютин³, Н.В. Бычкова⁴,
А.Л. Михрина⁵, К.В. Онохин¹, Д.А. Мешалкина¹, И.В. Романова⁵, О.Н. Савченко³,
А.А. Иванова³, С.В. Абкин¹, В.А. Хачатрян², И.В. Гужова¹, Б.А. Маргулис¹*

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА rhHSP70 В МОДЕЛЯХ ИНТРАКРАНИАЛЬНОЙ ГЛИОМЫ С6 У КРЫС ПОРОДЫ WISTAR И ПОДКОЖНОЙ МЕЛАНОМЫ В16/F10 У МЫШЕЙ ЛИНИИ С57BL/6

¹ ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург

² ФГБУ «Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. профессора А.Л. Поленова» Минздрава России, Санкт-Петербург

³ ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург

⁴ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург

⁵ ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург

Впервые произведена оценка биораспределения рекомбинантного белка теплового шока rhHsp70 у крыс с привитой интракраниальной глиомой С6 оценивалось с помощью метода иммунофлуоресценции накопление шаперона rhHsp70 конъюгированного с флуорохромом Alexa Fluor® 555 в опухолевых клетках при внутриопухолевом либо внутривенном введении. Для оценки специфичности накопления рекомбинантного белка клетки глиомы С6 были трансфицированы лентивирусом LVHTM, экспрессирующим маркерный белок GFP. При локальной инъекции (50 мкг, 5 мкл) конъюгат шаперона накапливался внутри клеток С6. При внутривенном введении (3 мг/кг) отмечалось накопление rhHsp70 внутри цитоплазмы С6-GFP+ клеток спустя 24 часа от момента инфузии белка. Для изучения распределения rhHsp70 в органах животных и привитых опухолях белок был помечен радионуклидом I¹²³. Оценка распределения и накопления меченого белка проводилась на модели подкожной меланомы В16/F10 у мышей линии С57BL/6 с применением однофотонного эмиссионного компьютерного томографа (ОФЭКТ). Спустя 60 минут от момента внутривенного введения rhHsp70-I¹²³ (20 МВq, 5 мкг шаперона) отмечалось накопление препарата преимущественно внутри печени и ткани опухоли. При этом коэффициент дифференциального накопления меченого белка КДН_{опухоль/фон} составил 3,14. При сравнении уровня фиксации rhHsp70-I¹²³ в ткани печени и в опухоли оказалось, что КДН_{опухоль/печень}=0,76. Через 24 часа от момента инъекций препарата rhHsp70-I¹²³ наблюдалось повышение уровня фиксации меченого белка в тканях печени и меланомы: КДН_{опухоль/фон}=3,43; КДН_{опухоль/печень}=0,78.

Ключевые слова: молекулярный шаперон, rhHsp70, глиома С6, меланома В16/F10, биораспределение

Введение

Молекулярные шапероны, в частности белок теплового шока Hsp70, представляют большой практический интерес для современной онкологии, так как они способны активировать врожденный и адаптивный противоопухолевый иммунный ответ и потому могут быть использованы в разработке новых иммунотерапевтических подходов [2, 3]. Ранее в серии экспериментов на модели интракраниальной глиомы С6 у крыс была продемонстрирована терапевтическая эффективность локальной внутриопухолевой доставки препарата рекомбинантного белка rhHsp70 [5, 21]. В модели меланомы В16/F10 локальная аппликация препарата Hsp70 в гидрогеле также приводила к значимой регрессии опухоли [6]. При анализе *in vitro* возможных механизмов иммуномодулирующей противоопухолевой активности шаперона было обнаружено, что белок способен проникать в раковые клетки, вытесняя на поверхность мембраны собственный, внутриклеточный Hsp70. В результате транслокации на плазмалемму шаперона клетки становились более узнаваемыми НК-клетками и чувствительными к их цитолитическому действию [21]. Тем не менее, до сих пор остаются открытыми вопросы о распределении и накоплении шаперона непосредственно в опухолевой ткани в условиях *in vivo*; происходит ли при местном введении препарата его аккумуляция в трансформированных клетках. С практической точки зрения большой интерес представляет вну-

тривенное введение белка. Однако в этом случае необходимо оценить возможность прохождения Hsp70 через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) и накопление его в опухолевых клетках.

Ранее изучались биораспределение и иммуногенность наноструктур на основе малых белков теплового шока [17]. Шапероны способны при определённых условиях самоорганизовываться из 24 субъединиц с октаэдрической симметрией в полые сферические наноструктуры с внешним диаметром в 12 нм и внутренним диаметром 6,5 нм [18,19]. Полученные наноструктуры HspG41C-RGD4C в комплексе с терапевтическими молекулами способны были связываться в экспериментах *in vitro* с клетками меланомы [14–16]. Авторы для оценки локализации наноструктур белка конъюгировали цистеин-обогащенные формы HspG41C с красителем Texas Red@C₂-maleimide [15]. Для изучения биораспределения шаперон HspG41C был связан с ¹²⁵I. ¹²⁵I-HspG41C либо HspG41C-TRC вводился (50 мкг препарата на животное) внутривенно мышам BALB/c, при этом время инкубации с белком составило от 1 до 24 час, после чего животные умерщвлялись, и производился анализ накопления препарата (в ткани легкого, печени, почек). Наносферы выявлялись с применением метода иммунофлуоресценции на эндотелии легочных сосудов, интерстициальных периваскулярных областях и в альвеолярных лимфатических протоках. При интраназальном введении препарат спустя 1 ч накапливался в лимфатических узлах респираторного тракта (трахеобронхиальные и шейные лимфатические узлы). При исследовании ткани печени оказалось, что спустя 1 ч после внутривенного введения наноструктуры локализовались в синусоидах печени (клетки Купфера, эндотелиальные клетки). В почках наносферы накапливались в тубулах и интерлобулярной соединительной ткани. Через 1 ч после в/в введения ¹²⁵I-HspG41C наносферы определялись во всех органах и тканях животного (при этом менее 0,1% введенной дозы в тканях головного мозга). Пятью наиболее значительными местами накопления препарата оказались мочевой пузырь, щитовидная железа, печень, селезёнка и слюнные железы. Через 24 ч 80% наноструктур выводились из организма с мочой и калом (56-66% изначальной дозы). При этом предварительная иммунизация шапероном не приводила к значимому изменению биораспределения наноструктур [17], что указывает на низкую иммуногенность наноконплексов на основе белков теплового шока.

В настоящем исследовании была оценена возможность накопления препарата рекомбинантного белка rhHsp70 в опухолевой ткани *in vivo*. Для этого было использовано два подхода — из-

учение аккумуляции препарата шаперона конъюгированного с флуорохромом Alexa Fluor® 555, либо с радиоизотопом йода I¹²³. Распределение препарата rhHsp70-Alexa Fluor® 555 в тканях опухоли с визуализацией при помощи метода иммунофлуоресценции изучалось на модели интракраниальной глиомы C6 у крыс породы Wistar. Накопление меченого белка rhHsp70-I¹²³ в опухолевой ткани оценивалось на модели подкожной меланомы B16/F10 у мышей линии C57BL/6.

Материалы и методика

Белок теплового шока rhHsp70 был очищен с помощью двухступенчатой хроматографии на геле DEAE-Sepharose и хроматографии с применением АТФ-агарозы (Sigma, USA). Примеси бактериального липополисахарида (ЛПС) удаляли при помощи инкубации препарата с гелем полимиксина В (Sigma, USA). Оценка количества ЛПС в растворе очищенного белка осуществлялась с помощью теста LAL E-Toxate (Sigma Aldrich, USA). В конечном растворе белка содержание эндотоксина было ниже 0,5 EU/mg.

Для оценки распределения шаперона rhHsp70 в клетках глиомы C6 *in vivo*, последний был конъюгирован с флуорохромом Alexa Fluor® 555 (Invitrogen, USA) по методике фирмы производителя. Для оценки накопления препарата меченого белка непосредственно в клетках глиомы C6 последние были инфицированы при добавлении в культуральную среду упаковочного вируса LVHTM экспрессирующего маркерный белок GFP. Lentивирсы были получены на клетках линии HEK-T293, которые были трансфицированы векторной плазмидой LVTHM (7,5 мкг), pCMV-VSV-G (2 мкг) и упаковочной pCMV-dR8.9 (6,5 мкг) плазмидами при помощи полиэтилениминового метода. Эффективность заражения клеток C6 зелёным флуоресцентным белком (GFP) анализировалась с применением метода проточной цитометрии (Cytomics FC 500, BECKMAN COULTER, USA). На основании параметров прямого и бокового светорассеяния для анализа была выбрана однородная популяция клеток, в которой было оценено относительное количество GFP+ клеток по зелёному каналу флуоресценции.

Для экспериментов *in vivo* была использована модель интракраниальной глиомы C6 у крыс самцов породы Wistar [4]. Животные (вес 280-320 гр., n=10) получены из вивария «Рапполово» АМН. Крысы анестезированы введением интраперитонеально раствора «Zoletyl-100» («Virbac santé Animale», Франция) и 2% раствора «Rometa» («СПОФА», Чехия), 10 мг и 2 мг соответственно. В область nucl.caudatus dexter инъектировали 10 мкл суспензии клеток C6 (конц. 1×10⁶/мл) либо C6 экспрессирующих маркерный белок GFP. На 20 сутки от момента имплантации клеток проводили оценку накопления препарата шаперона при: (i) локальном (внутриопухоловом) введении rhHsp70-Alexa Fluor® 555 (50 мкг конъюгата белка в 5 мкл); (ii) при в/в введении rhHsp70-Alexa Fluor® 555 (3 мг/кг конъюгата; 300 мкл раствора на в/в в хвостовую вену). Спустя 24 ч от момента локального или в/в препарата животные умерщвлялись и выделяли головной мозг. Иммунофлуоресцентные криосрезы ткани опухоли дополнительно окрашивали DAPI, заключали в стёкла и анализировались в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Вторым этапом изучали возможность конъюгации шаперона с радиоизотопом I¹²³ и распределение в организме животных меланомой B16/F10. Йодирование белков проводили с использованием пробирок, обработанных Йодо-

геном (1,3,4,6 тетрахло-3,6-дифенилглюкурин, 10 мкг в пробирке) [20]. В пробирку вносили 10-20 мкг белка, растворенного в 5-10 мкл деионизованной воды, 40 мкл 2М фосфатного буферного раствора (рН=7,0) и 200 мкл раствора йодида натрия, I^{123} в 0,01М растворе гидроксида натрия с активностью 30-50 МВк. Реакционную смесь активно перемешивали и инкубировали при температуре 25 °С в течение 15 мин при периодическом перемешивании. Йодированный белок выделяли из реакционной смеси с помощью гель-фильтрации [10]. После окончания инкубации реакционную смесь наносили на гель-фильтрационную колонку с Сефадексом G-25 sf, объемом 5 мл. Сорбент был уравновешен 0,2М фосфатным буферным раствором (рН=7,0), с добавлением 0,05 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), в дальнейшем колонку элюировали тем же раствором. Колонку предварительно калибровали растворами голубого декстрана (высокомолекулярная фракция, V_0) и хромата натрия (никомолекулярная фракция, V_e). После нанесения пробы колонку элюировали изотоническим раствором хлорида натрия со скоростью 0,2 мл/мин. Собирали объемы, соответствующие V_0 и V_e . Радиоактивность фракций измеряли с помощью дозиметра Curiecounter-4 (PTW). Исходя из активности I^{123} , взятого в реакцию и активности (скорректированной на распад) высокомолекулярной фракции, полученной после гель-фильтрации, рассчитывали радиохимический выход реакции в процентах (%). Для отработки условий йодирования в качестве объекта использовали человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (Sigma, USA). Биологическую активность меченного белка rhHsp70- I^{123} проверяли в тесте шаперонной активности. Молекулярную структуру шаперона оценивали в SDS-электрофорезе с последующей окраской геля по Кумасси. Определение субстратсвязывающей (шаперонной) активности rhHsp70 проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) методом Ваврзинова и соавт., модифицированным нами [1].

Программа исследований биораспределения rhHsp70- I^{123} включала в себя изучение функциональной пригодности препарата на самках мышей линии C57BL/6 (вес 26-30 гр., $n=10$), полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» ГУНЦБМТ РАМН (пос. Столбовая, Московская обл., Россия). Животным были подкожно привиты опухоли меланомы (введение подкожно $2,0 \times 10^6$ клеток мышинной меланомы B16/F10). Во время эксперимента все животные содержались в стандартных условиях (специальное помещение, рекомендованный рацион, свободный доступ к питьевой воде). За 3 дня до исследования с целью блокирования щитовидной железы, животных поили йодированной водой и мазали брюшко 5% настойкой йода.

Спустя 14 дней от момента подкожной имплантации меланомы меченый белок rhHsp70- I^{123} (20-40 МВк) вводили в орбитальный синус в объеме 0,2 мл. Исследование проводили в статическом режиме на однофотонном эмиссионном компьютерном томографе (ОФЭКТ) (Infinia, GE Healthcare, USA) через 60 мин и 24 ч после введения меченного белка. Животных фиксировали в стандартных укладках на специальных станках, в положении на живот, таким образом, чтобы обеспечить полную неподвижность в течение всего времени исследования. Запись исследования проводили на матрицу 256×256 с использованием низкоэнергетического коллиматора высокого разрешения, с набором не менее 30000 импульсов на проекцию.

Определяли распределение меченного белка после его введения, динамику изменений накопления и концентрации его в органах животных и трансплантированных опухолях. Оценка результатов полученных скантинграмм осуществлялась на основании качественных критериев визуального анализа. Оценивали физиологическое накопление в органах и тканях, а также патологическое накопление в опухолевом очаге: количество очагов, размеры, локализацию, интенсив-

ность накопления меченного белка в них. Количественная обработка данных заключалась в выборе зон интереса с последующим вычислением $KDN_{\text{опухоль/фон}}$, $KDN_{\text{опухоль/печень}}$.

Полученные в процессе исследования медико-биологические данные обрабатывались с использованием программной системы STATISTICA for Windows (версия 8). Статистически достоверные различия учитывались при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов *in vivo* на модели интракраниальной глиомы С6 флуоресцентный белок rhHsp70-Alexa Fluor® 555 вводили непосредственно в опухолевый узел либо в/в. Оказалось, что при локальном внутриопухолевом введении rhHsp70 равномерно распределяется непосредственно в клетках глиомы С6. При в/в введении шаперон также накапливался в трансформированных клетках. При оценке иммунофлуоресцентных срезов опухоли препарат аккумуляровался спустя 24 ч от момента введения в цитоплазме клеток С6. Для того, чтобы оценить непосредственное распределение препарата были использованы клетки С6-GFP+. По результатам проточной флуоцитометрии эффективность заражения С6 клеток лентивирусом LVTHM, экспрессирующих маркерный белок GFP, составила 68,5%. Оказалось, что шаперон rhHsp70-Alexa Fluor® 555 локализовался непосредственно в цитоплазме опухолевых клеток (рис. 1).

В эксперименте с в/в введением применялась концентрация шаперона из расчета 3 мг/кг белка на животное. При использовании более низких количеств белка не наблюдалось накопление препарата в опухоли. Вероятно, шаперон захватывался клетками Купфера печени. [13, 22]. Это подтверждается данными по оценке распределения наноструктур на основе шаперонов, которые накапливались преимущественно в печени [17]. В исследовании С.Р. Kaiser и соавт. не наблюдалось проникновение наноструктур в головной мозг, тогда как согласно нашим наблюдениям шаперон проникал через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ), накапливаясь в клетках глиомы С6. По всей видимости, при увеличении вводимого белка (до 1 мг на животное; в исследовании [17]—50 мкг) происходило насыщение рецепторов ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС) и далее не связавшийся шаперон смог проникать через ГЭБ в глиому. К настоящему времени было описано несколько рецепторов для Hsp70, которые экспрессированы на клетках РЭС: TLR-2/TLR-4 [7-9], CD91 [11], сквенджер рецепторы LOX-1 [12,23], SREC-1 [23] и FEEL-1 [23].

В ходе отработочной серии экспериментов при мечении ЧСА был получен радиохимиче-

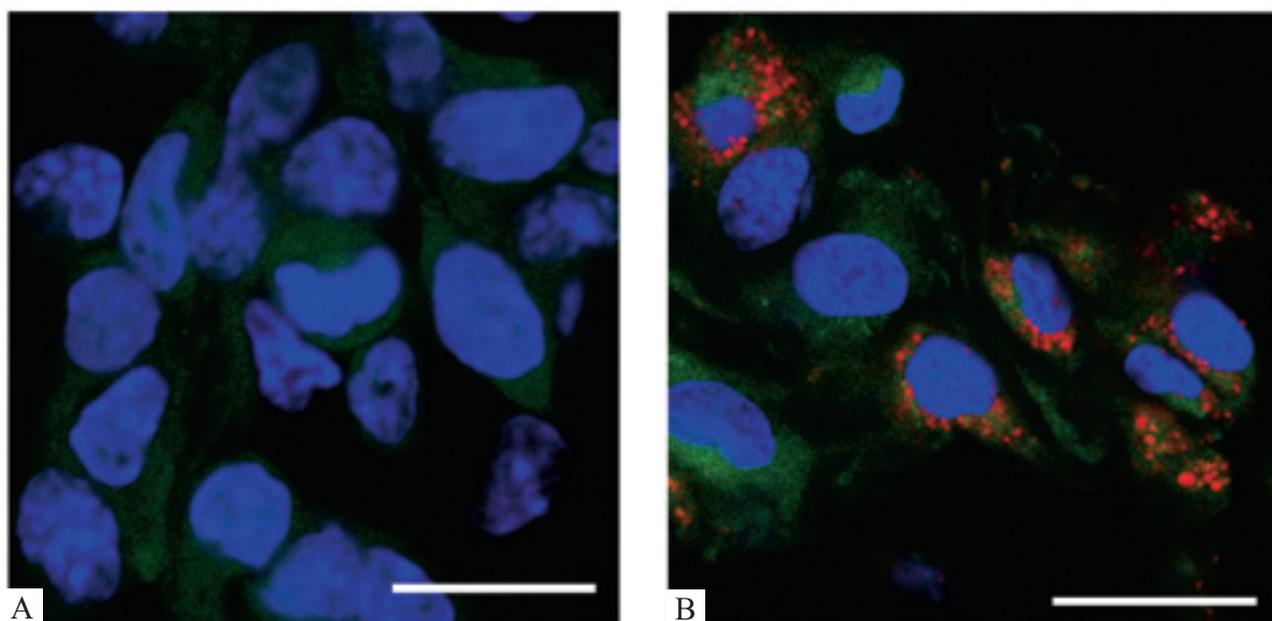


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное исследование криосрезов ткани глиомы С6. (А) Контроль. Представлены клетки глиомы С6 трансфицированные маркерным белком GFP (зелёный цвет). Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет). Шкала – 7,5 мкм. (В) Препарат глиомы С6 через 24 часа от момента внутривенного введения rhHsp70-Alexa Fluor® 555 (3 мг/кг) (красный цвет). Отмечается эндоплазматическое накопление конъюгата шаперона в клетках С6, трансфицированных белком GFP (зелёный цвет). Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет). Шкала – 7,5 мкм. Для получения иммунофлуоресцентных изображений использован иммерсионный объектив HCX PL APO 100×1.40 NA (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

ский выход 75–85%. Основные потери (около 10–15 % стартовой активности были связаны с неспецифической сорбцией йодированного белка в реакционной пробирке и на выделительной колонке). В основной серии экспериментов с белком rhHsp70 радиохимический выход колебался от 27 до 40%, при этом около 30—35% стартовой активности сорбировалось в реакционной пробирке и на выделительной колонке, остальная активность была представлена непрореагировавшим йодидом натрия, I^{123} . При анализе биологической активности конъюгата rhHsp70- I^{123} при помощи метода определения его шаперонной активности было показано, что активность белка практически не отличается от нативного препарата рекомбинантного шаперона rhHsp70 (рис. 2).

При оценке распределения конъюгата rhHsp70- I^{123} после введения препарата в орбитальный синус мышей с подкожной меланомой B16/F10 оказалось, что уже спустя 60 мин (от момента инъекции) отмечалась гиперфиксация меченого белка в печени и в опухоли (рис. 3).

При этом коэффициент дифференциального накопления $KДН_{опухоль/фон}$ составил 3,14 в передней проекции ($KДН_{опухоль/фон} = 3,32$ в задней проекции). При сравнении уровня фиксации в ткани печени и в опухоли оказалось, что $KДН_{опухоль/печень (спереди)} = 0,76$; $KДН_{опухоль/печень (сзади)} = 0,85$. Через 24 часа от момента введения препарата rhHsp70- I^{123} наблюдалось повышение уровня фиксации конъюгата в тканях печени и меланомы: $KДН_{опухоль/фон (спереди)} = 3,43$; $KДН_{опухоль/фон (сзади)} = 3,59$ (рис. 3).

При сопоставлении уровня накопления конъюгата rhHsp70- I^{123} в тканях меланомы и печени было выявлено, что спустя 24 ч сохраняется то же соотношение, что и при 60 мин после введения меченого белка: $KДН_{опухоль/печень (спереди)} = 0,78$; $KДН_{опухоль/печень (сзади)} = 0,82$.

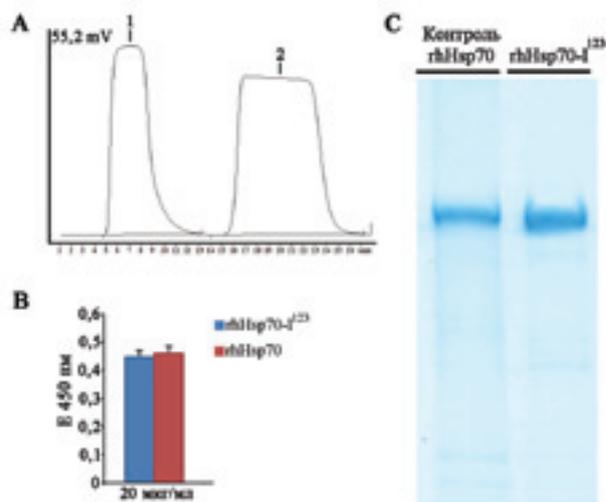


Рис. 2. Оценка стабильности и функциональной активности меченого белка rhHsp70- I^{123} . (А) Отделение йодированного белка теплового шока (пик 1) от непрореагировавшего I^{123} (пик 2) при помощи метода гель-фильтрации. По оси ординат указан сигнал детектора радиоактивности. По оси абсцисс — время (минуты). (В) Оценка шаперонной активности меченого белка в сравнении с неконоъюгированным рекомбинантным белком rhHsp70. По оси ординат представлена оптическая плотность; по оси абсцисс — концентрация белка в пробе (20 мкг/мл). Данные представлены в виде $M \pm m$. (С) SDS-электрофорез проб меченого белка с последующей окраской геля по Кумасси. В качестве контроля использован чистый рекомбинантный шаперон rhHsp70. Не отмечается деградации препарата меченого белка.

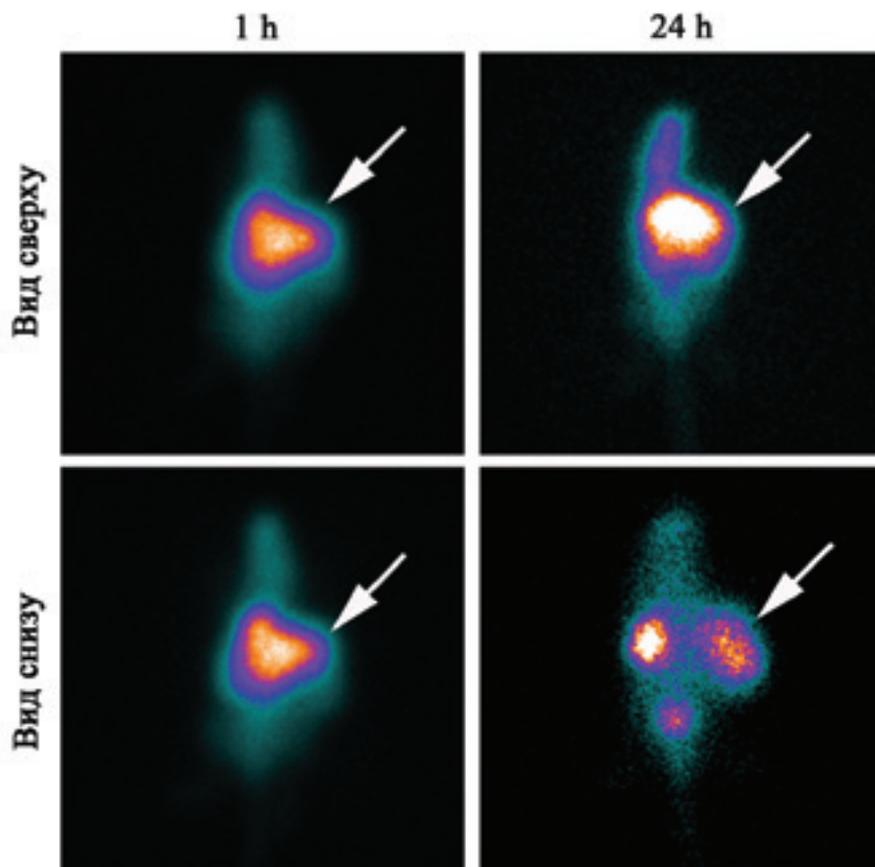


Рис. 3. Сцинтиграммы биораспределения rhHsp70-I123 на модели подкожной меланомы B16/F10 у мышей линии C57BL/6 (вид спереди и вид сзади). Представлены результаты исследований через 1 час и 24 часа от момента внутривенного введения (орбитальный синус) меченого белка с использованием ОФЭКТ (Infinia, GE Healthcare, USA). Отмечается накопление препарата в ткани печени и меланоме (указано белыми стрелками).

Результаты распределения конъюгата rhHsp70-I¹²³ в организме животных согласуются с результатами распределения наноструктур на основе белков теплового шока [17]. Однако при наличии новообразования нами было показано, что наблюдается перераспределение шаперона rhHsp70 в сторону наибольшего накопления в опухолевой ткани. Полученные данные являются предварительными и требуют более детального дальнейшего изучения. Факт того, что при внутривенном введении препарата рекомбинантного белка наблюдается аккумуляция его в ткани опухоли, открывает перспективы системного применения шаперона в терапии новообразований.

Работа выполнена в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве между ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Минздравсоцразвития России» (ФГБУ «РНЦРХТ Минздравсоцразвития России») и ФГБУН «Институт цитологии РАН» при поддержке гранта Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта РФФИ 01-04-01049.

За проведение экспериментальной работы авторы выражают благодарность О.Г. Геньбач, Н.В. Королевой, Д.Н. Сулову, проф. О.В. Галибину и Л.Н. Глушанковой за предоставленные плазмиды для производства лентивирусов; доктору Sistonen L. (Biocenter, Turku, Finland) за любезно предоставленную культуру клеток меланомы B16/F10.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазарев В.Ф., Онохин К.В., Антимонова О.И., и др. Кинетика изменения шаперонной активности белков Hsp70 и Hdj1 в клетках миелоидной лейкемии человека U-937 после теплового или лекарственного preconditionирования // Биохимия. — 2011. — Т. 76. — С. 724-730.
2. Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Маргулис Б.А. Белки теплового шока в клинической онкологии // Современ. Онкол. — 2012. — Т. 14. — С. 63-68.
3. Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Оникиенко С.Б., Маргулис Б.А. Молекулярные шапероны и бактериальный полисахарид как иммуномодулирующие факторы в противоопухолевой терапии новообразований головного мозга // Нейрохирургия и неврология детского возраста. — 2011. — Т. 28. — С. 73-84.

4. Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Поздняков А.В., и др. Модели интракраниальной опухоли у животных в доклинической нейроонкологии. // Нейрохирургия и неврология детского возраста. — 2011. — Т. — № 4. — С. 20-32.
5. Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Поздняков А.В., и др. Шаперонная терапия в модели интракраниальной глиобластомы крыс // Вопросы онкологии. — 2012. — Т. 58., № 5. — С. 653-657.
6. Abkin S.V., Pankratova K.M., Komarova E.Yu., et al. Hsp70 chaperone-based gel composition as a novel immunotherapeutic anti-tumor tool // Cell Stress & Chaperones. — 2012.[
7. Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperone activity of Hsp72 // Exerc. Immunol. Rev. — 2005—Vol. 11.—P. 34-45.
8. Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine // Nat. Med. — 2000. —Vol. 6.—P. 435-442.
9. Asea A., Rehli M., Kabling E., et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 // J. Biol. Chem. — 2002.—Vol. 277.—P. 15028-15034.
10. Baily G.S. Labeling of peptides and protein by radioiodination. From: Methods in molecular biology. Vol. 32. Basic protein and peptide protocols. 1994. Humana Press inc. pp. 441—447.
11. Basu S., Binder R.J., Ramalingam T., Srivastava P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin // Immunity. — 2001.—Vol. 14.—P. 303-313.
12. Delneste Y., Magistrelli G., Gauchat J., et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation // Immunity. — 2002.—Vol. 17.—P. 353-362.
13. Dini L., Lentini A., Diez G.D., et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells // J. Cell Sci. — 1995.—Vol. 108.—P. 967-973.
14. Flenniken M.L., Liepold L.O., Crowley B.E., et al. Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture // Chem. Commun. (Camb). — 2005.—Vol. 28.—P. 447-449.
15. Flenniken M.L., Willits D.A., Brumfield S., et al. 2003. The small heat shock protein cage from *Methanococcus jannaschii* is a versatile nanoscale platform for genetic and chemical modification // NanoLetters.— 2003.—Vol. 3.—P. 1573-1576.
16. Flenniken M.L., Willits D.A., Harmsen A.L., et al. Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into a heat shock protein cage architecture // Chem. Biol.— 2006.—Vol. 13.—P. 161-170.
17. Kaiser C.R., Flenniken M.L., Gillitzer E., et al. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo // Int. J. Nanomedicine.— 2007.—Vol. 2.—P. 715-733.
18. Kim K.K., Kim R., Kim S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein // Nature.— 1998.—Vol. 394.—P. 595-599.
19. Kim R., Kim K.K., Yokota H., et al. Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1998.—Vol. 95.—P. 9129-9133.
20. Salacinsky P.R.P. et al. Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1, 3, 4, 6-Tetrachloro-3a, 6a-diphenyl glycoluril (Iodogen) // Analytical Biochemistry.— 1981.—Vol. 117.—P. 136-146.
21. Shevtsov M.A., Pozdnyakov A.V., Romanova I.V., et al. Immunomodulatory effect of Hsp70 in the model of rat glioblastoma C6 in rodents. EORTC-EANO Conference 2011. Trends in Central Nervous System Malignancies, Bucharest, Romania, 25-26 March 2011. Proceedings book, p. 31.
22. Steffan A.M., Gendrault J.L., McCuskey R.S, et al. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells // Hepatology.— 1986.—Vol. 6.—P. 830-836.
23. Theriault J.R., Adachi H., Calderwood S.K. Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70 // J. Immunol.— 2006.—Vol. 177.—P. 8604-8611.

M.A. Shevtsov,^{1,2} S.V. Shatik,³ A.V. Tokarev,³ M.I. Mostova,³ L.A. Tyutin,³ N.V. Bychkova,⁴ A.L. Mikhrina,⁵ K.V. Onokhin,¹ D.A. Meshalkina,¹ I.V. Romanova,⁵ O.N. Savchenko,³ A.A. Ivanova,³ S.V. Abkin,¹ W.A. Khachatryan,² I.V. Guzhoval,¹ B.A. Margulis¹

BIODISTRIBUTION OF THE RECOMBINANT HEAT SHOCK PROTEIN rhHSP70 IN THE MODELS OF INTRACRANIAL C6 GLIOMA IN WISTAR RATS AND SUBCUTANEOUS B16/F10 MELANOMA IN C57BL/6 MICE

¹Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St.Petersburg

²A.L. Polenov Research Neurosurgical Institute, St.Petersburg

³Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St.Petersburg

⁴A.M.Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine", St.Petersburg

⁵I.M.Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St.Petersburg

For the first time it was evaluated the biodistribution of recombinant heat shock protein in rhHsp70 rats with grafted intracranial C6 glioma. It was assessed using the fluorescent antibody accumulation chaperone rhHsp70 conjugated with fluorochrome Alexa Fluor® 555 in tumor cells by intratumoral or intravenous administration. Assessment of the distribution and accumulation of labeled protein was carried out on the model of subcutaneous B16/F10 melanoma in C57BL/6 mice with the use of single-photon emission computer tomography. After 60 minutes after intravenous administration rhHsp70-I¹²³ (20 MBq, 5 mg chaperone) accumulation of the drug mainly in the liver and tumor tissue was showed. The coefficient of the differential accumulation of the labeled protein $KDN_{\text{tumor}} / \text{background}$ was 3.14. It was turned out that comparing the level of fixation of rhHsp70-I¹²³ in the liver and the tumor $KDN_{\text{tumor}} / \text{liver} = 0.76$. After 24 hours from the time of injection of rhHsp70-I¹²³ it was observed increase the level of fixation of the labeled protein in the liver and melanoma: $KDN_{\text{tumor}} / \text{background} = 3.43$; $KDN_{\text{tumor}} / \text{liver} = 0.78$.

Поступила в редакцию 26.10.2012