

ИЗУЧЕНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ГЛИОМ ЧЕЛОВЕКА НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ И ОБРАЗЦАХ ОПУХОЛЕЙ

© Г. В. Тимин,¹ Ю. С. Лахина,² Д. А. Гуляев,² Е. Н. Толкунова^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

и ²Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. А. Л. Поленова
(филиал Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова),
Санкт-Петербург, 191014;

* электронный адрес: entolk62@mail.ru

Представленная работа посвящена поиску «клеток происхождения» глиом человека. У образцов опухолевой ткани глиом и полученных из них клеточных линий методом ОТ-ПЦР проанализирована экспрессия молекулярных маркеров, специфичных для различных клеток нервной ткани (NeuN, MOG, MBP, NG2, Olig2, Vimentin, GFAP и Aldh1L1), маркеров стволовых клеток (Oct4 и c-Kit) и раковых стволовых (CD133) клеток. Показано, что профили экспрессии этих маркеров для различных типов глиом перекрываются, что не позволяет определить тип «клеток происхождения». Мы считаем, что для изучения происхождения глиом на клеточных линиях, полученных из первичных культур, необходимы более сложные условия культивирования, нежели обычно используемая среда с сывороткой.

Ключевые слова: глиомы, раковые стволовые клетки, клетки происхождения.

Принятые сокращения: ОТ-ПЦР — обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией, РСК — раковые стволовые клетки.

Глиомы — это группа опухолей головного мозга, имеющих глиальное происхождение. По частоте встречаемости глиомы составляют лишь 2 % от всех новообразований у человека, однако они характеризуются крайне негативным прогнозом (Hayat, 2011). В основе классификации глиомных опухолей лежит гистологическое сходство ткани глиом со здоровой глией (Zong et al., 2012). Таким образом, глиомные опухоли подразделяют на астроцитарные, эпендимные, олигодендроглиальные и глиомы смешанного типа. Помимо этого, в протоколе «Международная классификация онкологических заболеваний» (МКБ-О), разработанном Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), вводится степень злокачественности — так называемый грейд опухоли, определяемый по четырем гистологическим признакам, который оказался очень удобным прогностическим критерием (Louis et al., 2007). Грейд I приписывается доброкачественным опухолям, тогда как самый высокий, IV, грейд приписывается опухолям с некротизированными областями и означает наихудшие прогнозы для пациентов.

Популяции клеток глиомы присуща гетерогенность, которая проявляется в фенотипическом, функциональном и генетическом различии клеток, принадлежащих одной опухоли. В настоящее время существуют две основные модели для объяснения опухолевой гетерогенности — модель раковых стволовых клеток и модель клональной эволюции (Shackleton et al., 2009). Мы придерживаемся модели раковых стволовых клеток (РСК). Само понятие РСК возникло как аналогия с тканевыми стволовыми клетками (Valent et al., 2012). Присутствие в одной опухо-

ли клеток различной морфологии и пролиферативной активности породило предположение о том, что в опухоли, как и в организме, есть клетки, подобные стволовым — способные к самообновлению своей популяции и к дифференцировке во все другие типы клеток, встречающиеся в данной опухоли (Magee et al., 2012). Идентификация и изоляция РСК осуществляются на основании характерного для каждого типа опухоли спектра молекулярных маркеров. Глиомные РСК впервые были описаны как популяция CD133⁺-клеток (Singh et al., 2004), хотя идея о существовании стволовоподобных клеток глиомы появилась раньше (Ignatova et al., 2002).

Во взрослом головном мозге стволовые клетки обнаружены в двух зонах — субвентрикулярной и субгранулярной. В субвентрикулярной зоне локализованы нейральные стволовые клетки В-типа (type B neural stem cells) (Doetsch et al., 1999). Они являются производными радиальной глии, которая образуется на ранней стадии развития нервной системы из нейроэпителиальных клеток и играет важную роль в нейрональной миграции во время формирования коры мозга (Merkle et al., 2004). Клетки В-типа дают начало нейрональным предшественникам, астроцитам и предшественникам олигодендроцитов (Fuentelba et al., 2012). Сходным образом протекает постнатальный нейрогенез в субгранулярной зоне. Таким образом, во взрослом мозге нервная ткань представлена зрелыми клетками (нейронами, астроцитами, олигодендроцитами и эпендимоцитами) и стволовыми клетками (предшественниками нейронов и олигодендроцитов, нейральными стволовыми клетками).

Классификация глиомных опухолей, основанная на гистологической схожести ткани опухоли со здоровой глией, иногда не вполне корректно отождествляется с происхождением глиомы. Трудность решения вопроса о происхождении связана с анаплазией глиомных клеток, гетерогенностью опухоли и присутствием стволовых клеток во взрослом мозге. Из каких клеток произошел тот или иной тип глиомы, пока неясно (Modrek et al., 2014). Для обозначения клеток, которые начинают неконтролируемо делиться и образовывать опухоль, введено понятие «клетки происхождения» опухоли (cells of origin). Наиболее вероятными клетками происхождения считаются стволовые клетки (Visvader, 2011). Это не исключает возможности происхождения опухоли от дифференцированных клеток.

Мы предполагаем, что профиль экспрессии молекулярных маркеров клеток происхождения сохраняется и в клетках зрелой опухоли. В таком случае, анализируя образцы операционного материала, мы сможем понять, клетки какого типа служат клетками происхождения для различных глиом. Наш выбор молекулярных маркеров для выявления клеток происхождения основан на недавней обзорной работе (Modrek et al., 2014). Кроме маркеров, специфичных для различных клеток нервной ткани (NeuN, MOG, MBP, NG2, Olig2, Vimentin, GFAP и Aldh1L1), мы анализировали экспрессию маркеров стволовых клеток (Oct4 и c-Kit) и РСК глиом (CD133) (Guo et al., 2011; Cabrera et al., 2015; Wu et al., 2015). Все выбранные для исследования молекулярные маркеры приведены в таблице. На втором этапе работы мы ставили целью понять, будет ли использование клеточных линий, полученных из первичных культур глиомы человека, адекватным методом для исследования ранних этапов канцерогенеза и поиска клеток происхождения глиомы. Для этого мы сравнили клеточные линии глиомы с образцами опухоли, из которых они были получены, по экспрессии молекулярных маркеров из таблицы. С помощью генетической конструкции, которая экспрессируется под энхансером 2A2В гена *Oct4*, мы проводили обогащение клеточных линий по стволочному компоненту и затем так же анализировали экспрессию молекулярных маркеров.

Материал и методика

Образцы глиом человека. Использовано 20 образцов опухолевой ткани, в том числе 9 образцов глиобластомы (грейд IV), 4 — анапластической астроцитомы (грейд III), 2 — фибриллярной астроцитомы (грейд II), 4 — олигодендроглиомы (грейд II), 1 образец нейроцитомы (грейд I). Образцы опухолей были получены во время хирургических операций, осуществляемых в плановом порядке в Российском научно-исследовательском нейрохирургическом институте им. А. Л. Поленова (РНХИ; Санкт-Петербург). Работы, проводимые в рамках этого исследования, были одобрены Этическим комитетом РНХИ.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. Тотальную РНК из клеток или из образца глиомной опухоли (с предварительной гомогенизацией) выделяли с помощью набора GenJET RNA purification kit (Thermo Scientific, Литва) по фирменному протоколу. Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop, США). Растворы тотальной РНК хранили при -80°C .

На каждую реакцию обратной транскрипции в объеме 20 мкл брали от 0.5 до 11 мкл раствора тотальной РНК в зависимости от ее концентрации. Реакцию проводили с помощью набора Revertaid reverse transcriptase (Thermo Scientific, Литва) по фирменному протоколу с использованием в качестве праймеров random hexamer primer из набора. Полученную кДНК хранили при -20°C . ПЦР проводили в объеме 25 мкл с использованием фермента DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, Литва) по фирменному протоколу. Программа амплификации включала в себя 35 циклов. Продукты ПЦР анализировали путем электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Гель фотографировали с помощью документирующего устройства ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Для дизайна праймеров использовали ресурсы primer-BLAST Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и IDT OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Последовательности праймеров для идентификации экспрессии генов *Oct4* и *Vimentin* заимствованы из данных литературы (Velpula et al., 2011; Jez et al., 2014). Молекулярные маркеры и соответствующие им праймеры указаны в таблице.

Получение клеточных линий глиом и культивирование в виде монослоя. Получение первичных культур клеток глиом проводили на основании методов выведения в культуру РСК глиобластомы и нейтральных стволовых клеток (Yuan et al., 2004; Rietze, Reynolds, 2006). Использовали образцы опухолевой ткани глиом через 2—3 ч после резекции. Ткань промывали, измельчали на фрагменты по 1 мм³ и подвергали ферментативному перевариванию в среде для диссоциации клеток. Среду для диссоциации готовили на основе раствора Хэнкса, к 200 мл которого добавляли 476 мг HEPES, 40 мг ЭДТА, 50 мг трипсина и 1 мл 0.1 %-ного раствора ДНКазы I. Среду стерилизовали фильтрованием и хранили при -20°C . Обработку образцов средой для диссоциации проводили в клеточном инкубаторе при 37°C в течение 30—60 мин в зависимости от структуры образца. После инкубирования среду с дезинтегрированными клетками центрифугировали для сбора клеток (150 g, 5 мин). Клетки суспендировали в среде DMEM-F12, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, и рассевали по 2 млн живых клеток на флакон 75 см². Клетки оседали и росли как монослой во флаконе в CO₂-инкубаторе при 37°C . После первого пересевания дальнейшее культивирование клеток глиомы в монослое проводили в культуральных чашках 10 см (Falcon, США) в тех же условиях. Полученные клеточные линии пересевали с использованием 1%-ного раствора трипсина (Gibco, США) 1 раз в 3 сут в соотношении 1 : 3.

Упаковка вирусных частиц и заражение клеток *in vitro* вирусом. Для сборки вирусных частиц клетки линии HEK293T трансфицировали кальций-фосфатным методом, вводя плазмидную конструкцию на основе лентивирусного интегрирующегося вектора, а также вспомогательные плазмиды для обеспечения сборки вирусных частиц (<http://tcf.epfl.ch/page-6766-en.html>). Среду, в которой культивировали трансфицированные клетки, собирали в течение 48 ч после трансфекции, содержащиеся в ней вирусные частицы концентрировали ультрацентрифугированием по стандартной методике (<http://tcf.epfl.ch/page-6764.html>).

Инфекцию раковых клеток лентивирусом проводили в 24-луночной планшете, в который за 1 сут до заражения высевали клетки с плотностью 100 тыс. клеток на 1 лун-

Молекулярные маркеры для идентификации различных клеток нервной ткани, стволовых и раковых стволовых клеток и праймеры к ним для проведения ОТ-ПЦР

Маркер	Клетки	Прямой праймер (5'—3')	Обратный праймер (5'—3')
NeuN (neuron-specific nuclear protein)	Нейроны	GCATGACCCTGTACACACCA	TTCTCTGTAGGGTCCGAGGG
MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein)	Олигодендроциты	CCTGGGAAGAACGCTACAGG	GATCTGCAGGAGGAGCACAG
MBP (myelin basic protein)	»	AAGTACCTGGCCACAGCAAG	GGAGCCGTAGTGAGCAGTTC
NG2 (chondroitin sulfate proteoglycan 4)	Предшественники олигодендроцитов	GGTGGTTTCAGATCGGGAGG	CAGTGACGTTCACTACGGCT
Olig2 (oligodendrocyte lineage transcription factor 2)	Предшественники олигодендроцитов, нейральные стволовые клетки	ATTTTCGGGTCCGAGGGAAG	GCCGGCAGAAAAAGGTCATC
Vimentin	Нейральные стволовые клетки	GAACGCCAGATGCGTGAAATG	CCAGAGGGAGTGAATCCAGATTA
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Нейральные стволовые клетки, астроциты	GCACGCAGTATGAGGCAATG	TAGTCGTTGGCTTCGTGCTT
Aldh1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1)	Астроциты	TCCATCCAGACCTTCCGCTA	CAGGGGATAGTTCAGGGGA
CD133 (prominin 1)	РСК глиом	TTTCCAAATCCAGGAGCAAC	ACAGGAAGGGAGGGAGTCAT
Oct4	Стволовые клетки	GTTGATCCTCGGACCTGGCTA	GGTTGCCTCTCACTCGGTTCT
c-Kit (CD117)	» »	GATGGCACCTGAAAGCATTT	TCCGGAAGCCTTCTTTGATC

ку. К клеткам добавляли 10 мкл концентрированных вирусных частиц. Заражение проводили в среде для культивирования. Через 3 сут после вирусного заражения клетки пересевали в культуральные чашки 10 см. Для отбора клеток, экспрессирующих ген устойчивости к пуромидину, в стандартную среду культивирования добавляли раствор пуромидина до концентрации 30 мг/л. Культивирование клеток с антибиотиком производили в течение 10—14 сут, меняя среду каждые 2 сут.

Использованные реактивы: моногидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид натрия, параформальдегид, бычий сывороточный альбумин, трипсин, агароза, титидий бромид, Тритон X-100 и Trisma Base (Fluka, США); дрожжевой экстракт и пептон (Difco, США); смесь антибиотиков и антимиотиков, глутамин и среды для культивирования клеток эукариот (Gibco, США); телячья эмбриональная сыворотка (Sigma, США).

Результаты и обсуждение

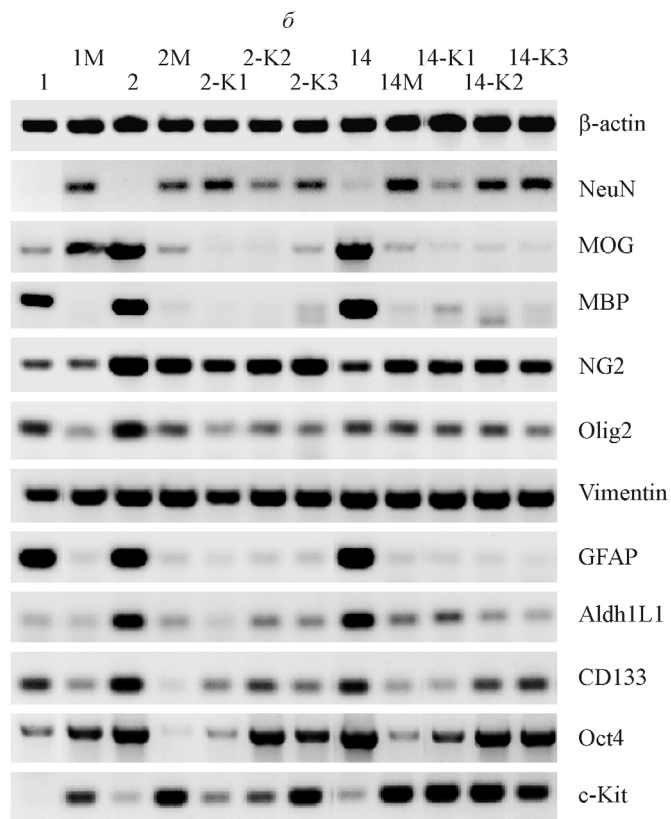
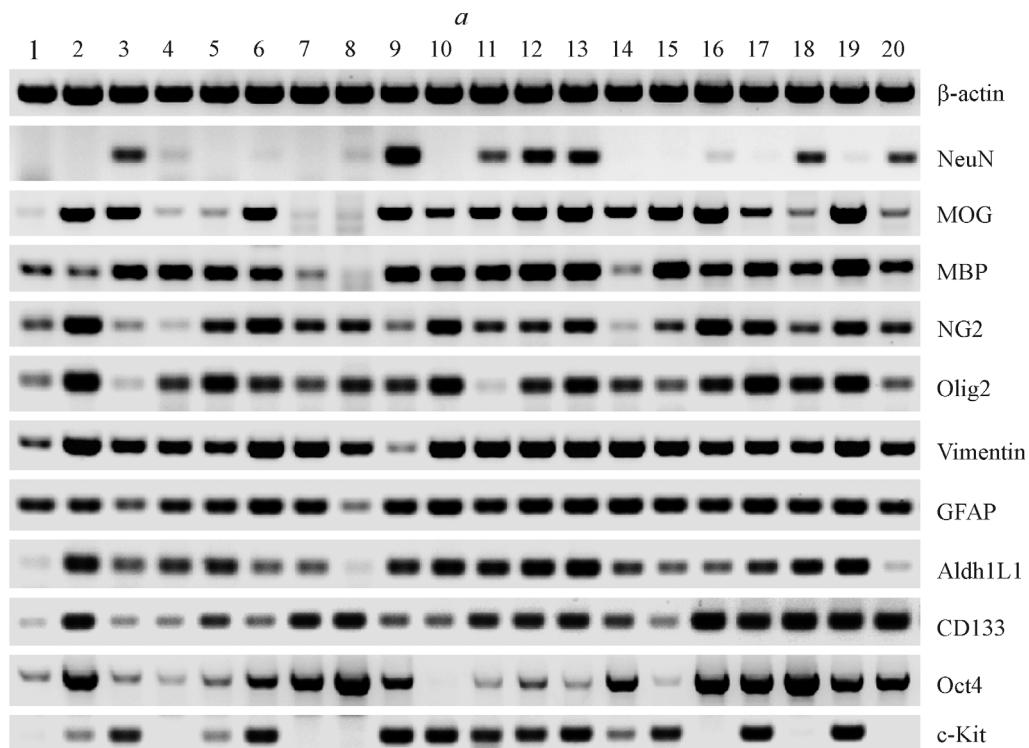
Сравнение образцов глиом различного типа по экспрессии молекулярных маркеров методом ОТ-ПЦР. Из 19 образцов глиом и 1 образца нейроцитомы, полученных как операционный материал, была выделена РНК и проведена ОТ-ПЦР с праймерами, указанными в таблице. Результаты приведены на рисунке, а. Во всех образцах обнаружена экспрессия молекулярных маркеров, соответствующих нескольким типам клеток нервной ткани, что не позволяет сделать вывод о типе клеток происхождения каждой из опухолей. Мы получили перекрывающиеся профили экспрессии молекулярных маркеров между группами образцов глиобластомы, астроцитомы и олигодендроглиомы. Экспрессия маркера стволовых клеток Oct4 и маркера РСК (CD133) в

среднем оказалась выше в образцах олигодендроглиомы, а не глиобластомы, вопреки нашим ожиданиям.

Данные результаты подтверждают гетерогенность ткани глиомы. Составляющие ее клетки могут значительно различаться по профилю экспрессируемых молекулярных маркеров, а метод ОТ-ПЦР не позволяет анализировать отдельные субпопуляции клеток в образце опухоли. Тем самым, в полученном профиле экспрессии нельзя выделить вклад мажорной для данного образца опухоли клеточной субпопуляции от вклада всех остальных клеток. Также стоит отметить, что выбор молекулярных маркеров строился на том предположении, что клетки глиом экспрессируют тот же набор маркеров, что и клетки, из которых они произошли. Таким образом, была недооценена анапластичность глиомных клеток, способность обнаруживать свойства, присущие сразу нескольким типам клеток нервной ткани.

Получение клеточных линий глиом и сравнение их с образцами глиом по экспрессии молекулярных маркеров. Из операционного материала двух пациентов с глиобластомой (образцы 1 и 2) и одного пациента с фибриллярной астроцитомой (образец 14) были получены клеточные линии в форме монослоя (1М, 2М и 14М соответственно). По мере культивирования в популяциях клеток глиом происходило уменьшение гетерогенности. После первого посева клетки, по морфологии напоминающие эпителиальные, образовывали плотный монослой. Явление потери гетерогенности в первичной культуре клеток глиомы при культивировании в среде с сывороткой уже было описано (Lee et al., 2006).

Для обогащения клеточных линий глиом по стволу компоненту мы заражали клетки лентивирусными частицами, несущими генетическую конструкцию, которая экспрессирует ген устойчивости к антибиотику под контролем энхансера 2A2В гена Oct4. Эта конструкция



Профили экспрессии молекулярных маркеров опухолевой ткани глиом (*a*) и клеточных линий глиом (*b*). ОТ-ПЦР и электрофорез.

a — опухоли: глиобластома (1—9), анапластическая астроцитома (10—13), фибриллярная астроцитома (14, 15), олигодендроглиома (16—19), нейрочитома (20). *b* — линии клеток глиом (1M, 2M и 14M), полученные из глиобластомы (1, 2) и фибриллярной астроцитомы (14) и обогащенные по стволовому компоненту клоны (К) из линии 2M (2-K1, 2-K2 и 2-K3) и линии 14M (14-K1, 14-K2 и 14-K3).

была создана ранее в нашей лаборатории (Лисковых и др., 2011). При наличии эндогенной экспрессии *Oct4* происходит активация энхансера 2A2B и экспрессии гена устойчивости к пуromицину под промотором гена тимидинкиназы. После проведения селекции на устойчивость к пуromицину отбирали отдельные клеточные клоны, пассировали и наращивали в монослое для дальнейшего использования (обогащенные по стволовому компоненту клоны — К из линии 2М получили названия 2-K1, 2-K2 и 2-K3, а из линии 14М — 14-K1, 14-K2 и 14-K3).

Для выяснения вопроса о сходстве свойств клеточных линий глиом и опухолевой ткани, из которой они были получены, выделяли РНК и проводили ОТ-ПЦР с праймерами, указанными в таблице. Результаты приведены на рисунке, б. Как следует из рисунка, все исследованные линии клеток глиомы по сравнению с образцами опухолей обладают следующими особенностями: 1) увеличивается экспрессия нейронального маркера NeuN; 2) снижается экспрессия олигодендроцитарных (MOG и MBP) и астроцитарных (Aldh1L1 и GFAP) маркеров; 3) увеличивается экспрессия маркера стволовых клеток c-Kit; 4) уменьшается экспрессия маркера РСК глиом CD133; 5) сохраняется сходный уровень экспрессии маркеров нейральных стволовых клеток (Vimentin, Olig2).

Мы предполагаем, что увеличение экспрессии NeuN связано со склонностью нейральных стволовых клеток к спонтанной дифференцировке в нейрональном направлении *in vitro*, тогда как снижение экспрессии олигодендроцитарных и астроцитарных маркеров является следствием потери гетерогенности в популяции клеток опухоли при культивировании. Особый интерес вызывает увеличение экспрессии маркера c-Kit, что позволяет предположить, что этот маркер свидетельствует в большей мере не о стволовости клеток, а о высоком пролиферативном потенциале. Существуют различные мнения по поводу того, можно ли считать CD133 маркером РСК глиом (Calabrese et al., 2007; Wang et al., 2008; Kelly et al., 2009). В работе на первичных культурах колоректального рака описана потеря экспрессии CD133 во время культивирования (Fan et al., 2015). Мы считаем, что наблюдаемое нами снижение уровня экспрессии CD133 в клеточных линиях глиом также связано с культивированием клеток.

Таким образом, мы пришли к выводу о том, что клеточные линии глиом в среде с сывороткой не являются подходящей моделью глиомы для поиска клеток происхождения. Кроме того, мы показали, что обогащение по стволовому компоненту приводит к повышению экспрессии *Oct4*, но не влияет на уровень экспрессии других молекулярных маркеров.

Есть работа, в которой сравнивается влияние бессывороточных сред с ростовыми факторами и сред с сывороткой на свойства культивируемых клеток глиобластомы (Lee et al., 2006). Авторы пришли к заключению, что первичные культуры в средах с ростовыми факторами лучше сохраняют свойства изначальной опухоли. Однако нам пока неизвестны работы, в которых был бы предложен набор ростовых факторов, гарантирующий сохранение всех субпопуляций клеток глиомных опухолей при культивировании.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

Список литературы

- Лисковых М. А., Чуйкин И. А., Ранян А., Сафина Д. А., Толкунова Е. Н., Минина Ю. М., Жданова Н. С., Дыбан П. А., Маллинс Дж., Костылева Е. И., Чихирджина Е. В., Бадер М., Аленина Н., Томлин А. Н. 2011. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток крысы: анализ условий репрограммирования и культивирования. Цитология. 53 (12): 939—945. (Liskovykh M. A., Chuykin I. A., Ranjan A., Safina D. A., Tolkunova E. N., Minina Yu. M., Zhdanova N. S., Dyban P. A., Mullins John J., Kostyleva E. I., Chikhirzhina E. V., Bader M., Alenina N., Tomilin A. N. 2012. Generation of rat induced pluripotent stem cells: reprogramming and culture medium. Cell Tissue Biol. 6 (2): 115—121.)
- Cabrera M. C., Hollingsworth R. E., Hurt E. M. 2015. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. World J. Stem Cells. 7: 27—36.
- Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T. L., Fuller C., Hammer B., Oh E. Y., Gaber M. W., Finklestein D., Allen M., Frank A., Bayazitov I. T., Zakharenko S. S., Gajjar A., Davidoff A., Gilbertson R. J. 2007. A perivascular niche for brain tumor stem cells. Cancer Cell. 11: 69—82.
- Doetsch F., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell. 97: 703—716.
- Fan F., Bellister S., Lu J., Ye X., Boulbes D. R., Tozzi F., Scusi E., Kopetz S., Tian F., Xia L., Zhou Y., Bhattacharya R., Ellis L. M. 2015. The requirement for freshly isolated human colorectal cancer (CRC) cells in isolating CRC stem cells. Br. J. Cancer. doi: 10.1038.
- Fuentealba L. C., Obernier K., Alvarez-Buylla A. 2012. Adult neural stem cells bridge their niche. Cell Stem Cell. 10: 698—708.
- Guo Y., Liu S., Wang P., Zhao S., Wang F., Bing L., Zhang Y., Ling E.-A., Gao J., Hao A. 2011. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* in human gliomas. Histopathology. 59: 763—775.
- Hayat M. A. 2011. Tumors of the central nervous system. 1. Gliomas: Glioblastoma (Part 1). Springer. 456 p.
- Ignatova T. N., Kukekov V. G., Laywell E. D., Suslov O. N., Vrionis F. D., Steindler D. A. 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. Glia. 39: 193—206.
- Jez M., Ambady S., Kashpur O., Grella A., Malcuit C., Vilner L., Rozman P., Dominko T. 2014. Expression and differentiation between OCT4A and its Pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. PLoS ONE. 9. doi: 10.1371.
- Kelly J. J., Stechishin O., Chojnacki A., Lun X., Sun B., Senger D. L., Forsyth P., Auer R. N., Dunn J. F., Cairncross J. G., Parney I. F., Weiss S. 2009. Proliferation of human glioblastoma stem cells occurs independently of exogenous mitogens. Stem Cells. 27: 1722—1733.
- 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. 9: 391—403.
- Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O. D., Cavenee W. C. 2007. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th edition. Lyon: IARC. 312 p.
- Magee J. A., Piskounova E., Morrison S. J. 2012. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. Cancer Cell. 21: 283—296.
- Merkle F. T., Tramontin A. D., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101: 17 528—17 532.
- Modrek A. S., Bayin N. S., Placantonakis D. G. 2014. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. World J. Stem Cells. 6: 43—52.
- Rietze R. L., Reynolds B. A. 2006. Neural stem cell isolation and characterization. Methods Enzymol. 419: 3—23.

Shackleton M., Quintana E., Fearon E. R., Morrison S. J. 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 138 : 822—829.

Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman R. M., Cusimano M. D., Dirks P. B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432 : 396—401.

Valent P., Bonnet D., De Maria R., Lapidot T., Copland M., Melo J. V., Chomienne C., Ishikawa F., Schuringa J. J., Stassi G., Huntly B., Herrmann H., Soulier J., Roesch A., Schuurhuis G. J., Wohrer S., Arock M., Zuber J., Cerny-Reiterer S., Johnsen H. E., Andreeff M., Eaves C. 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat. Rev. Cancer*. 12 : 767—775.

Velupula K. K., Dasari V. R., Tsung A. J., Dinh D. H., Rao J. S. 2011. Cord blood stem cells revert glioma stem cell EMT by down regulating transcriptional activation of Sox2 and Twist1. *Oncotarget*. 2 : 1028—1042.

Visvader J. E. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*. 469 : 314—322.

Wang J., Sakariassen P. Ø., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Bøe S. O., Svendsen A., Prestegarden L., Ruusland G., Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P. Ø. 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int. J. Cancer*. 122 : 761—768.

Wu B., Sun C., Feng F., Ge M., Xia L. 2015. Do relevant markers of cancer stem cells CD133 and Nestin indicate a poor prognosis in glioma patients? A systematic review and meta-analysis. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 34 : 44. doi: 10.1186.

Yuan X., Curtin J., Xiong Y., Liu G., Waschmann-Hogiu S., Farkas D. L., Black K. L., Yu J. S. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 23 : 9392—9400.

Zong H., Verhaak R. G., Canoll P. 2012. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 12 : 383—394.

Поступила 25 IX 2015

THE STUDY OF THE ORIGIN OF HUMAN GLIOMA BASED ON CELL LINES AND TUMOR SPECIMENS

G. V. Timin,¹ Yu. S. Lakhina,² D. A. Gulyaev,² E. N. Tolkunova^{1, *}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

and ² Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery

(part of Federal V. A. Almazov North-West Medical Research Centre), St. Petersburg, 191014;

* e-mail: entolk62@mail.ru

The present study is dedicated to the search of human glioma «cells of origin». Specimens of the tumor tissue have been analyzed via the RT-PCR method to potentially reveal the expression of molecular markers characteristic of various cells of nerve tissue (NeuN, MOG, MBP, NG2, Olig2, Vimentin, GFAP, Aldh1L1), as well as markers of stem (Oct4, c-Kit) and cancerous stem (CD133) cells. We have shown that the expression profiles of these markers for different types of gliomas intersect, which does not allow to determine the type of «cells of origin». So, in order to study the origin of glioma using cell lines derived from primary cultures, we need a more sophisticated culture conditions, rather than the commonly used serum-based media.

Key words: glioma, cancer stem cells, cells of origin.