

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

© Л. Н. Киселева,^{1,*} А. В. Карташев,^{1,3} Н. Л. Вартамян,¹
А. А. Пиневиц,^{1,2} М. В. Филатов,⁴ М. П. Самойлович^{1,2}

¹ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, 197758,

² С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова,
Санкт-Петербург, 191015,

и ⁴ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, Санкт-Петербург, 188300;

* электронный адрес: luba_kiseleva@mail.ru

Глиобластомы — опухоли нейроэктодермального происхождения, отличающиеся высокой степенью гетерогенности. Опухолевые клетки, выделенные из операционного материала пациентов с глиобластомами, представляют собой неоднородные популяции, различающиеся по морфологии, фенотипу и генетическим особенностям. В настоящей работе представлена характеристика двух новых линий глиобластом — R1 и T2, выделенных из опухолевой ткани пациентов в 2010 г. Исследованы морфологические и цитохимические особенности клеток, экспрессия нейрональных, мезенхимных и эндотелиальных маркеров, а также активность генов, кодирующих ряд ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и внутриклеточных белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения. Клетки линий R1 и T2 различались между собой морфологически: для линии T2 было характерно присутствие многоядерных клеток. По экспрессии β -тубулина III, MGMT и белка p53 клеточная линия R1 была более гетерогенна, чем линия T2. Линии глиобластом R1 и T2 различались также по присутствию и соотношению клеточных популяций, несущих мезенхимные, нейрональные и эндотелиальные маркеры. Так, нейрональные маркеры CD133/2 и CD56 были обнаружены только на клетках линии R1. Общим линиям были свойственны высокая активность генов ростовых факторов *TGF β 1*, *VEGF* и *FGF2(b)*, более низкая активность *EGF*, а также высокая экспрессия генов *THBS1* и *α SMA*, однако активность большинства изученных генов в клетках R1 была выше, чем в клетках T2. Наибольшие различия наблюдали в отношении экспрессии *HGF*, *FAP* и *TNC*. При сравнении двух новых линий глиобластом R1 и T2 с давно используемыми линиями A172 и T98G показано, что линия R1 обладает значительным сходством с A172, а глиобластома T2 — с клетками T98G. По-видимому, различия между линиями R1 и T2 определяются в большей степени не временем культивирования, а характеристиками исходных опухолей.

Ключевые слова: линии глиобластом, поверхностные маркеры, ростовые факторы, экспрессия генов.

Принятые сокращения: ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка, dNTP — дезоксинуклеозидтрифосфаты, EGF — эпидермальный ростовой фактор, FAP — белок активированных фибробластов, FGF2(b) — основной фактор роста фибробластов 2, GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок, HGF — гепатоцитарный фактор роста, MGMT — O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, α SMA — гладкомышечный актин α 2, TGF β 1 — трансформирующий ростовой фактор β 1, THBS1 — тромбоспондин-1, TNC — тенасцин С, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

Глиобластомы представляют собой опухоли нейроэктодермального происхождения, отличающиеся высокой степенью гетерогенности. Каждая глиобластома несет в себе черты уникальности. Опухоли, возникшие у разных пациентов, различаются по морфологии, фенотипу и генетическим особенностям клеток. При этом каждая из таких опухолей сформирована неоднородными клеточными популяциями. Наконец, по мере развития глиобластомы эволюционируют, изменяются соотношение и свойства составляющих их клеток. В этой ситуации подходы к терапии глиобластом, учитывающие особенности

конкретной опухоли, могли бы оказаться более эффективными, чем универсальные схемы лечения этого заболевания. Однако признаки глиобластом, которые могли бы служить надежными маркерами при выборе средств терапии пациентов, до сих пор не определены.

Для изучения морфологических, фенотипических, биохимических и генетических особенностей глиобластом используют клеточные линии, полученные из опухолевой ткани пациентов. Несмотря на актуальность исследования давно созданных постоянных клеточных линий, сохраняется необходимость получения новых линий

глиобластом для изучения многообразия их форм, вариантов изменчивости и поиска значимых для создания средств индивидуализированной терапии маркеров.

В настоящей работе охарактеризованы две новые линии глиобластом — R1 и T2, выделенные из операционного материала пациентов в лаборатории клеточной биологии ПИЯФ (Санкт-Петербург) в 2010 г. Цель работы состояла в определении морфологических и цитохимических особенностей клеток, экспрессии нейрональных, мезенхимных и эндотелиальных поверхностных маркеров, а также активности генов, кодирующих ряд ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и внутриклеточных белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения.

Материал и методика

Клеточные линии. Линия R1 получена из опухолевого материала пациента мужского пола в возрасте 45 лет с диагнозом продолженный рост глиобластомы левой лобной доли, линия T2 — из опухолевого материала пациента мужского пола в возрасте 61 года с диагнозом мультиформная глиобластома правых теменной и затылочной долей. Обе линии были получены в 2010 г. Материал получали с информированного согласия пациентов.

Клетки линий глиобластом культивировали в среде α -MEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), глютамин и гентамицин, при 37 °C и 5 % CO₂. Пересев клеток проводили каждые 3—4 сут, используя раствор из смеси трипсина и версена. К началу исследований линии R1 и T2 прошли 29 и 23 пассажей соответственно.

Морфологические и иммуноцитохимические исследования. Для морфологического анализа клетки фиксировали ледяным этанолом, окрашивали по Май-Грюнвальду—Гимзе и фотографировали, используя инвертированный микроскоп с цифровой камерой (Nikon, Япония). Для иммуноцитохимического исследования клетки культивировали в камерах на стеклах (BD Falcon CultureSlides). Присутствие маркерных белков выявляли с помощью антител к виментину, глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), β -тубулину III, Ki67, S100, p53 и MGMT. Для визуализации использовали набор реагентов Dako REAL EnVision Detection System-HRP/DAB+. Ядра окрашивали гематоксилином. Изображения получали с использованием сканера Leica SCN 400 (Leica Microsystems, Германия) при помощи программы Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Германия).

Проточная цитометрия. После снятия с поверхности флаконов клетки дважды отмывали буферным раствором BD FBS, затем инкубировали с антителами в течение 30 мин при 4 °C. Использовали антитела к поверхностным маркерам CD31, CD90, CD106 и CD147 (меченные FITC), антитела к CD29, CD34, CD44, CD56, CD73, CD105, CD146, CD151 и CD166 (меченные фикоэритрином), антитела к CD133/2 (меченные аллофикоцианином), а также соответствующие изотипические контроли. Для фиксации окрашенных клеток применяли раствор BD CellFix. Исследования проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Данные анализировали с помощью программы BD Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США).

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Порядок

проведения исследования и последовательности праймеров описаны ранее (Киселева и др., 2016). Для реакции обратной транскрипции во всех образцах использовали 500 нг РНК. Уровень экспрессии генов представляли в виде разницы (Δ CT) между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH*. CT — пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции.

Статистическая обработка. Исследования проведены в 3—4 повторностях. Для статистической обработки данных применяли программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. Для проверки достоверности различий использовали U-критерий Манна—Уитни.

Использованные реактивы: среда α -MEM с глютамином, гентамицин и раствор трипсин—версен (БиолоТ, Россия); набор красителей Май-Грюнвальд-Гимза (Bio-Optica, Италия); гематоксилин (Histoline, Россия); моноклональные кроличьи антитела к β -тубулину класса III (клон EP1569Y, Epitomics, США); моноклональные кроличьи антитела к Ki67 (клон SP6, Thermo Scientific, США); моноклональные мышьиные антитела к p53 (клон DO-7; Leica Biosystems, Германия); моноклональные мышьиные антитела к виментину (клон V9); моноклональные мышьиные антитела к GFAP (клон 6F2); поликлональные кроличьи антитела к S100 и Dako REAL EnVision Detection System-HRP/DAB+ kit (DAKO, Дания); поликлональные кроличьи антитела к MGMT (Abcam, Англия); моноклональные антитела к CD133/2 APC (клон 293C3; Miltenyi Biotec, Германия); меченные флуорохромами моноклональные антитела к CD29, CD31, CD34, CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD147, CD151 и CD166, соответствующие изотипические контроли, BD FBS и BD CellFix (Becton Dickinson, США); TRIzol Reagent (Life Technologies, США); M-MuLV обратной транскриптазы, смесь dNTP, random-праймер, Hot-start Taq-ДНК-полимераза, буфер для Hot-start Taq-ДНК-полимеразы и раствор MgCl₂ (Сибэнзим, Россия); Sybr Green (BioDye, Россия); RiboLock RNase inhibitor и ЭТС Hyclone (Thermo Scientific, США).

Результаты

Линия глиобластомы R1 по морфологическому составу была представлена клетками астроцитарной и отростчатой форм, в то время как для линии T2 были характерны веретеновидные и астроцитарные клетки. Линия T2 отличалась присутствием большого количества крупных и многоядерных клеток (рис. 1).

Обе линии глиобластом обладали высокой пролиферативной активностью. При иммуноцитохимическом исследовании маркер пролиферации Ki67 был выявлен более чем в 90 % клеток R1 и T2 (рис. 2, а, б). При посевной дозе 16 тыс. кл./см² время удвоения культуры R1 в логарифмической фазе роста составляло 36—40 ч, в культуре T2 этот показатель варьировал в пределах 32—36 ч.

Иммуноцитохимический анализ клеток R1 и T2 показал, что практически все они содержали белок промежуточных филаментов виментин и не несли в цитоплазме маркеров нейроглии GFAP и S100. Нейрональный маркер β -тубулин III был выявлен во всех клетках линии T2 и в большинстве (около 80 %) клеток линии R1. Белок p53 был также обнаружен во всех клетках линии T2 и только в небольшой популяции (около 20 %) клеток R1. Фер-

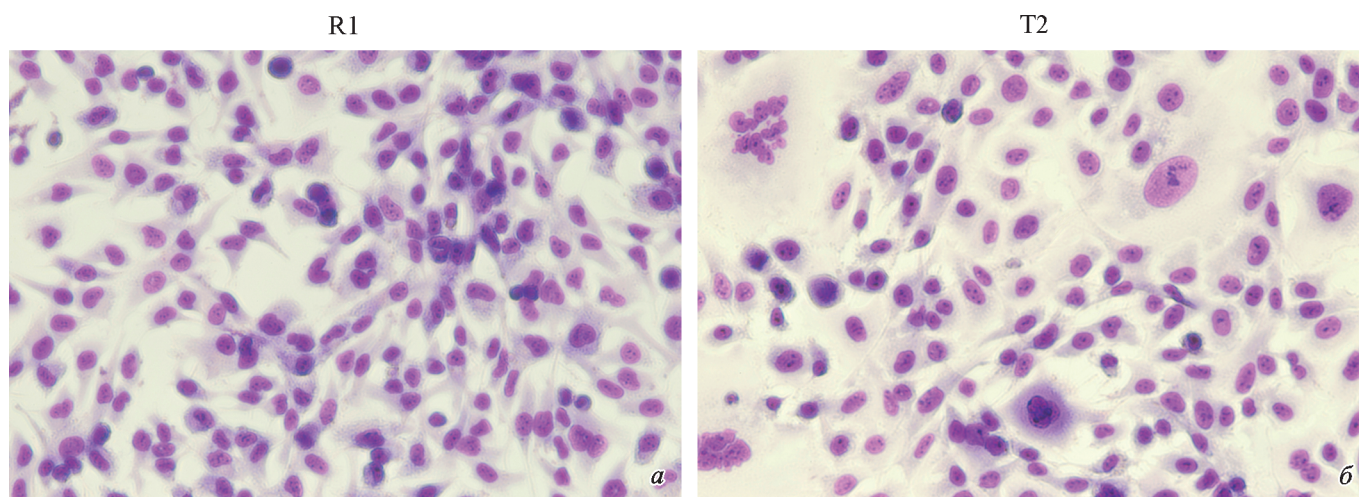


Рис. 1. Клеточные линии глиобластом R1 (а) и T2 (б).

Окраска по Май-Грюнвальду—Гимзе. Об. 20×.

мент MGMT, участвующий в процессе репарации ДНК, был выявлен в обеих клеточных линиях, однако присутствовал не во всех клетках. Таким образом, по экспрессии β -тубулина III и белка p53 линия глиобластомы R1 представляла собой более гетерогенную популяцию клеток, чем линия T2.

Известно, что экспрессия нейрональных или мезенхимных маркеров в глиобластомах во многом определяет перспективы развития опухоли и ее эволюционирование (Philips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). При рассмотрении результатов анализа поверхностных антигенов маркеры, относящиеся к этим линиям дифференцировки, были выделены отдельно. Более 95 % клеток линий R1 и T2 несли на своей поверхности мезенхимные маркеры CD29, CD44 и CD166 (см. таблицу). По экспрессии двух других маркеров мезенхимных клеток — CD90 и CD105 — линии глиобластом значительно различались между собой. Оба эти маркера были представлены на большинстве клеток T2 и только на четверти популяции клеток линии R1 (рис. 3). При исследовании нейрональных маркеров были выявлены еще более выраженные различия между двумя линиями (см. таблицу; рис. 3). Линия T2 не содержала клеток, экспрессирующих CD56 (NCAM) и CD133/2, тогда как в составе глиобластомы R1 присутствовало 70.0 % CD56⁺ и 20.0 % CD133/2⁺-клеток. Белок клеточной адгезии CD106 (VCAM) был обнаружен только на клетках линии R1 (10.2 % клеток) (рис. 3). Эндотелиальных маркеров CD31 и CD34 не было обнаружено ни на одной из линий глиобластом.

На клетках линий R1 и T2 был высоко экспрессирован мембранный белок CD151, связанный с подвижностью и метастазированием клеток (Kohno et al., 2002), и гликопротеин CD147, стимулирующий синтез матричных металлопротеиназ и способствующий ангиогенезу (Tang et al., 2005; Yang et al., 2013).

Оценка уровня экспрессии генов в клетках линий R1 и T2 показала, что этим клеткам свойственны высокая активность генов ростовых факторов *TGF β 1*, *VEGF* и *FGF2(b)* и существенно более низкая активность гена *EGF*. Ген *HGF* в клетках R1 был экспрессирован на более высоком уровне, чем в клетках T2. Обе клеточные линии характеризовались высокой экспрессией генов тромбо-

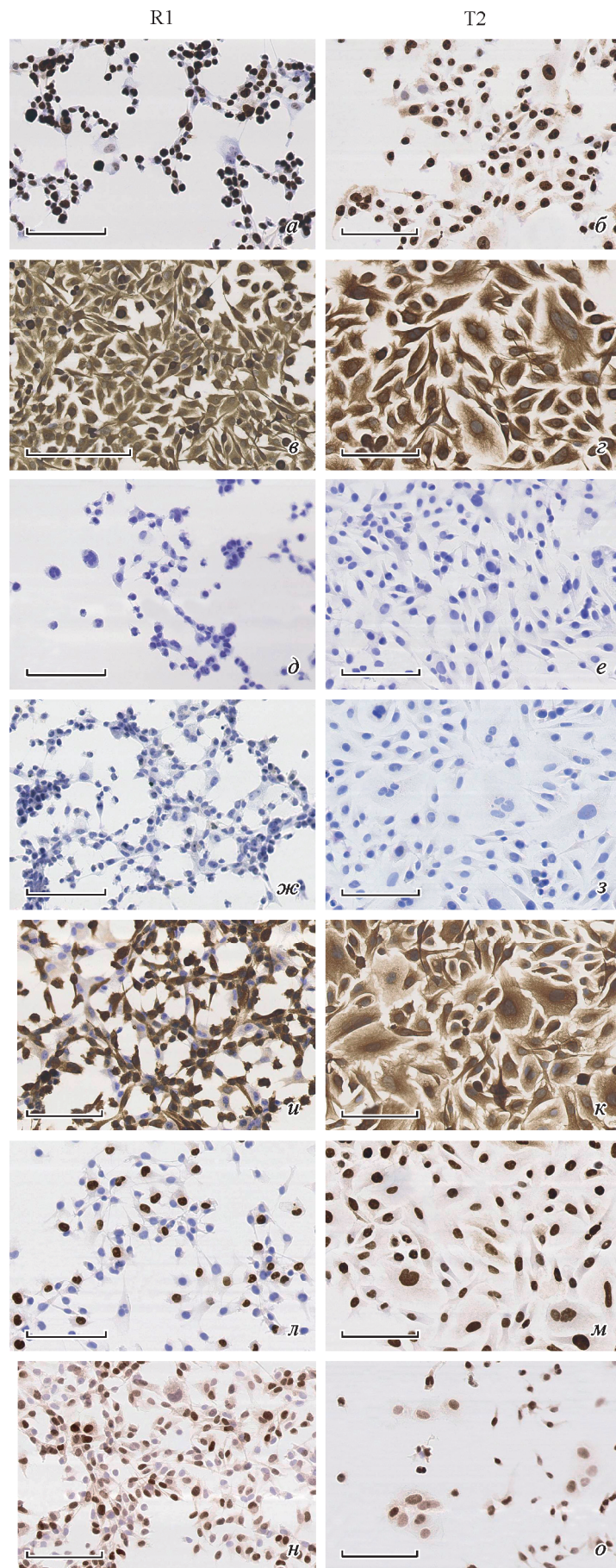
спондина (*THBS1*) и α SMA. Активность генов тенастина С (*TNC*) и *FAP* в клетках R1 была существенно выше, чем в клетках T2 (рис. 4).

Обсуждение

Получение культивируемых линий глиобластом и использование их в качестве экспериментальных моделей ведутся с середины XX в., и к настоящему времени описаны десятки таких клеточных линий. Наряду с общими характеристиками они имеют индивидуальные особенности и широко используются в лабораторной практике.

Экспрессия поверхностных маркеров в линиях глиобластом R1 и T2

Маркер	Доля позитивных клеток, %	
	R1	T2
Мезенхимные маркеры		
CD29	99.1 \pm 0.5	99.0 \pm 0.2
CD44	99.4 \pm 0.2	99.2 \pm 0.3
CD166	96.0 \pm 0.8	97.9 \pm 1.1
CD73	84.0 \pm 2.0	99.4 \pm 0.2
CD90	25.3 \pm 2.0	70.4 \pm 1.9
CD105	28.8 \pm 2.2	70.4 \pm 1.6
Нейрональные маркеры		
CD56	70.0 \pm 3.0	0.5 \pm 0.1
CD133/2	20.0 \pm 3.2	0.4 \pm 0.1
Эндотелиальные маркеры		
CD106	10.2 \pm 0.6	0.20 \pm 0.05
CD31	0.20 \pm 0.05	0.10 \pm 0.05
CD34	0.7 \pm 0.2	0.20 \pm 0.05
Другие маркеры		
CD146	74.9 \pm 2.3	98.8 \pm 0.6
CD147	98.7 \pm 0.3	99.6 \pm 0.2
CD151	99.0 \pm 0.3	96.9 \pm 0.6



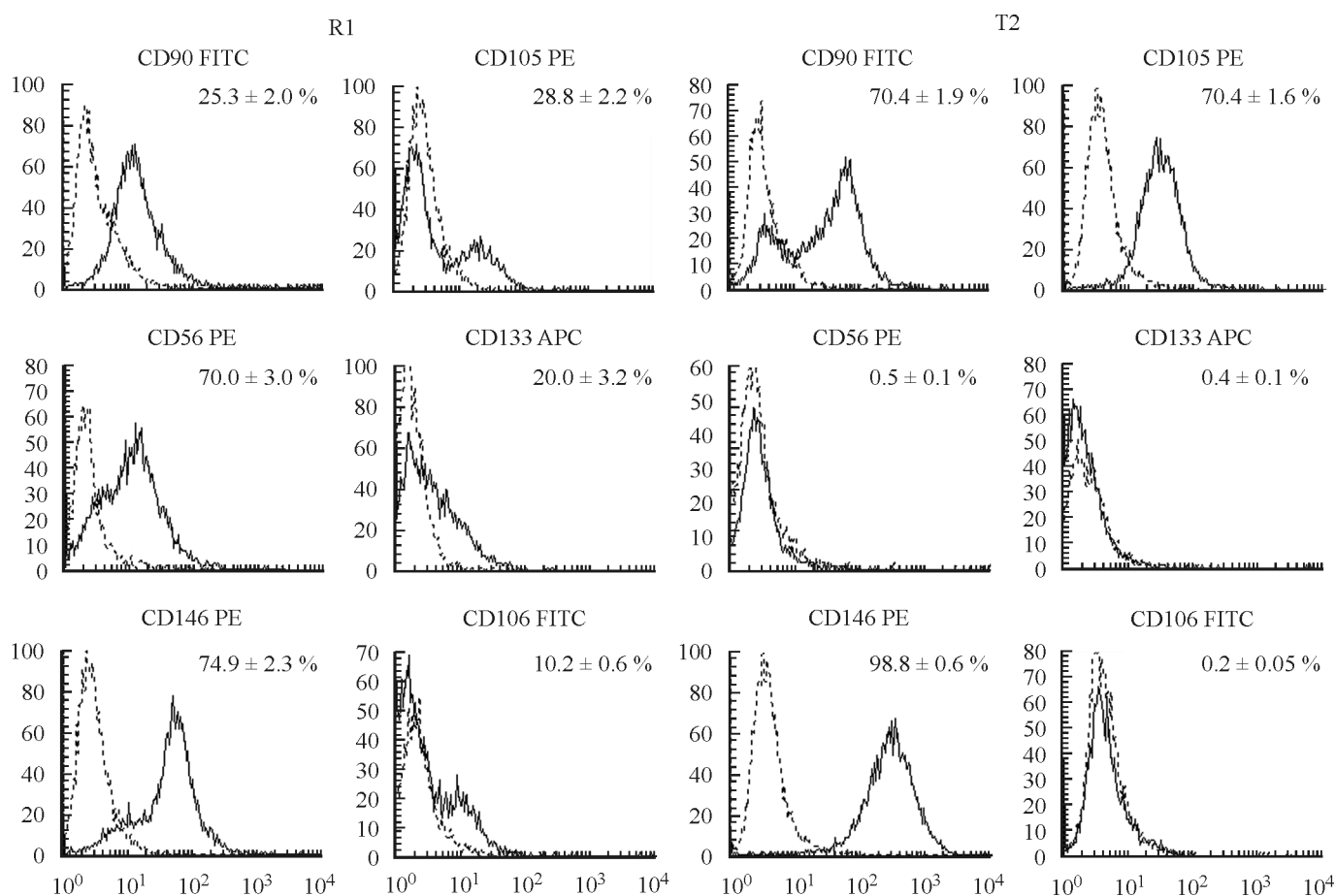


Рис. 3. Гистограммы распределения экспрессии поверхностных маркеров клеток R1 и T2, выявленные при цитофлуориметрическом анализе.

По горизонтали — интенсивность флуоресценции (усл. ед.); по вертикали — число событий. На каждой гистограмме указана доля клеток, несущих соответствующий антиген, по сравнению с изотипическим контролем.

Длительное культивирование клеточных линий может сопровождаться утратой ими ряда исходно присущих свойств и приобретением новых. Для изучения такой высокогетерогенной опухоли, как глиобластома, целесообразно одновременно использовать несколько различающихся между собой клеточных линий. Это диктует необходимость получения и изучения новых линий глиобластом, а также сравнения их с известными клеточными линиями. Ранее в работе Киселевой с соавторами (2016) были приведены сравнительные характеристики линий глиобластом A172 и T98G, давно используемых в лабораторной практике. В настоящей работе представлена характеристика двух новых клеточных линий глиобластом человека — R1 и T2.

Морфологически линии R1 и T2 представляли собой гетерогенные популяции клеток. При этом линия T2, так же как и глиобластомы A172 и T98G, характеризовалась присутствием большого числа крупных и многоядерных клеток. Всем четырем клеточным линиям была свойственна высокая скорость пролиферации. Новые линии не экспрессировали GFAP, в чем были схожи с клетками A172 и T98G. Результаты иммуноцитохимических иссле-

дований показали, что по экспрессии β -тубулина III, MGMT и белка p53 линия R1 представлена более гетерогенными популяциями, чем линия T2.

Важной характеристикой опухолевых клеток является экспрессия маркеров, связанных с устойчивостью к терапии. Так, устойчивость к химиотерапии может быть связана с репарирующей активностью фермента MGMT. Клетки глиобластом R1 и T2, так же как и клетки T98G, экспрессировали MGMT, что отличало их от клеток A172 (Yoshino et al., 2010). Одним из факторов, регулирующих клеточный цикл и играющих важную роль в развитии апоптоза, является белок p53. В настоящей работе для выявления этого белка использовали антитела клона DO-7, которые связывают не только белок дикого типа, но и его мутантную форму. При иммуноцитохимическом исследовании p53 был обнаружен во всех клетках глиобластомы T2, в то время как линия R1 оказалась гетерогенной по этому показателю — только около 20 % клеток в ней были p53-позитивными. Известно, что для клеток T98G характерна экспрессия мутантного белка p53, а клетки A172 экспрессируют ген дикого типа (Melendez et al., 2011).

Рис. 2. Внутриклеточные антигены в клетках линий R1 (а, в, д, ж, и, л, н) и T2 (б, з, е, з, к, м, о), выявленные методом иммуноцитохимии: Ki67 (а, б), виментин (в, з), GFAP (д, е), S100 (ж, з), β -тубулин (и, к), p53 (л, м) и MGMT (н, о).

Масштабные отрезки — 100 мкм.

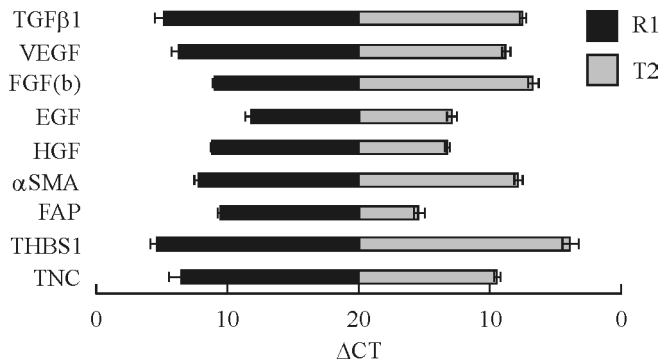


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов в клетках линий глиобластом R1 и T2.

По горизонтали — уровни ΔСТ; по верикали — названия генов.

Популяции клеток новых линий глиобластом R1 и T2, как и ранее описанных линий A172 и T98G, высоко экспрессировали мезенхимные маркеры CD29, CD44 и CD166 и были однородными по этим показателям. По экспрессии других мезенхимных маркеров — CD105 и CD90 — новые линии различались между собой и отличались от клеток линий A172 и T98G. Наименьшие по численности популяции клеток, несущие маркеры CD90 и CD105, были выявлены в линии T98G, а наибольшие — в линии T2. Нейрональные маркеры CD133/2 и CD56 обнаружены на клетках линий R1 и A172, в то время как на клетках T2 и T98G этих маркеров выявлено не было. Вероятнее всего, это можно объяснить более активной экспрессией в клетках R1 и A172 генов, опосредующих нейрональную дифференцировку. Ранее отмечалось наличие обратной корреляции в экспрессии генных паттернов, ассоциированных с экспрессией гена CD133, и паттернов, связанных с индукцией эпителиально-мезенхимального перехода (Zarkoob et al., 2013). Большинство клеток новых линий глиобластом и линий A172 и T98G экспрессировало маркеры CD147 и CD151. Антиген CD146 присутствовал более чем у 95 % клеток A172, T98 и T2 и только у 75 % клеток R1. При этом 10 % клеток R1 несли молекулы клеточной адгезии CD106 (VCAM-1), отсутствовавшие на клетках линии T2 и описанных ранее линий. Эндотелиальных маркеров CD31 и CD34 не было обнаружено ни в одной из рассматриваемых линий.

Изучение экспрессии генов также выявило различия между клетками линий R1 и T2. Активность большинства изученных генов в клетках R1 была выше, чем в клетках T2, при этом наибольшие различия наблюдались в отношении генов *HGF* и *FAP* (рис. 4). Аналогичные результаты были получены нами ранее для клеток линий A172 и T98G. Так, клеткам A172 был свойствен более высокий уровень экспрессии генов *VEGF*, *FGF(b)*, *EGF* и *THBS1*, а наибольшие различия между этими линиями касались генов *HGF*, *TNC* и *FAP*.

Изучение новых линий R1 и T2 и их сравнение с давно существующими A172 и T98G позволили наряду с общими свойствами выявить ряд индивидуальных характеристик. Оказалось, что по некоторым показателям наблю-

дается сходство между клетками глиобластом R1 и A172, а также между линиями T2 и T98G. По-видимому, различия между линиями определяются в большей степени не временем культивирования, а характеристиками исходного материала опухоли. Использование нескольких различающихся между собой линий целесообразно при исследовании действия на глиобластомы химиотерапевтических препаратов и облучения, так как дает возможность лучшего понимания индуцируемых ими процессов и дальнейшей разработки более эффективных схем лечения.

Список литературы

- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартамян Н. Л., Пиневиц А. А., Самойлович М. П. 2016. Характеристика клеточных линий A172 и T98G. Цитология. 58 (5): 349—355. (Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Samoilovich M. P. 2016. Characteristics of A172 and T98G cell lines. Cell Tissue Biol. 10 (5): 341—348.)
- Kohno M., Hasegawa H., Miyake M., Yamamoto T., Fujita S. 2002. CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. Int. J. Cancer. 97: 336—343.
- Melendez B., Garcia-Claver A., Ruano Y., Campos-Martin Y., de Lope A. R., Perez-Magan E., Mur P., Torres S., Lorente M., Velasco G., Mollejo M. 2011. Copy number alterations in glioma cell lines. In: Glioma. Exploring its biology and practical relevance. Rijeka: InTech. 429—448.
- Philips H. S., Kharbanda S., Chen R., Forrest W. F., Sariano R. H., Wu T. D., Misra F., Nigro J. M., Colman H., Soroceanu L., Williams P. M., Modrusan Z., Feuerstein B. G., Aldape K. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell. 9: 157—173.
- Tang Y., Nakada M. T., Kesavan P., McCabe F., Millar H., Rafferty P., Bugelski P., Yan L. 2005. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. Cancer Res. 65: 3193—3199.
- Verhaak R. G., Hoadley K. A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M. D., Miller C. R., Ding L., Golub T., Mesirov J. P., Alexe G., Lawrence M., O'Kelly M., Tamayo P., Weir B. A., Gabriel S., Winckler W., Gupta S., Jakkula L., Feiler H. S., Hodgson J. G., James C. D., Sarkaria J. N., Brennan C., Kahn A., Spellman P. T., Wilson R. K., Speed T. P., Gray J. W., Meyerson M., Getz G., Perou C. M., Hayes D. N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Genome Atlas Research Network. Cancer Cell. 17: 98—110.
- Yang M., Yuan Y., Zhang H., Yan M., Wang S., Feng F., Ji P., Li Y., Li B., Gao G., Zhao J., Wang L. 2013. Prognostic significance of CD147 in patients with glioblastoma. J. Neurooncol. 115: 19—26.
- Yoshino A., Ogino A., Yachi K., Ohta T., Fukushima T., Watanabe T., Katayama Y., Okamoto Y., Naruse N., Sano E., Tsumoto K. 2010. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. Int. J. Oncol. 36: 1367—1377.
- Zarkoob H., Taube J. H., Singh S. K., Mani S. A., Kohandel M. 2013. Investigating the link between molecular subtypes of glioblastoma, epithelial-mesenchymal transition, and CD133 cell surface protein. PLoS ONE. 8: e64169.

CHARACTERIZATION OF NEW HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINES

L. N. Kiseleva,^{1,*} A. V. Kartashev,^{1,3} N. L. Vartanyan,¹ A. A. Pinevich,^{1,2}
M. V. Filatov,⁴ M. P. Samoilovich^{1,2}

¹ Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, 197758,

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034,

³ North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg, 191015,

and ⁴ St. Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov, St. Petersburg, 188300;

* e-mail: luba_kiseleva@mail.ru

Glioblastomas are tumors of neuroectodermal origin characterized by high degree of heterogeneity. Tumor cells isolated from surgical material of patients with glioblastomas represent heterogeneous populations differing in morphology, phenotype and genetic characteristics. This paper presents the description of two new glioblastoma cell lines — R1 and T2, isolated from tumor tissue of patients in 2010. We investigated morphological and cytochemical cell characteristics, expression of neuronal, mesenchymal, and endothelial markers, as well as the activity of genes encoding a number of growth factors, extracellular matrix proteins and intracellular proteins typical for cells of mesenchymal origin. R1 and T2 cell lines differed morphologically. T2 cell line was characterized by the presence of multinuclear cells. According to the expression of β -tubulin III, MGMT and p53 protein, the R1 cell line was more heterogeneous than T2. R1 and T2 glioblastoma cell lines also differed in presence and ratio of cell populations with mesenchymal, neuronal, and endothelial markers. Thus, neuronal markers CD133/2 and CD56 were detected only on R1 cells. Both lines were characterized by high activity of growth factor genes *TGF β 1*, *VEGF*, *FGF2(b)*, lower activity of *EGF* and high expression of *THBS1* and *α SMA* genes. However, the activity of most of the genes under study in R1 cells was higher than in T2 cells. The greatest differences were observed in the expression of *HGF*, *FAP*, and *TNC*. When comparing two new glioblastoma cell lines R1 and T2 with continuously cultivated lines A172 and T98G it was shown that R1 line had remarkable similarity with A172, while T2 glioblastoma resembled T98G cells. Apparently, the differences between R1 and T2 cell lines are associated not with the time of cultivation but with characteristics of the initial tumors.

Key words: glioblastoma cell lines, A172, T98G, surface markers, growth factors, gene expression.