

УДК 576.535.5:612.014.481.1

Б. І. Геращенко¹✉, К. Салміна², Й. Крігерц², Й. Еренпрейса², А. М. Бабський³

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

²Латвійський науково-навчальний центр біомедицини, вул. Раушпітес, 1, Рига, LV-1067, Латвія

³Львівський національний університет ім. Івана Франка, вул. Михайла Грушевського, 4, Київ, 79005, Україна

ІНДУКОВАНА ПОЛІПЛОЇДІЯ ТА СОРТУВАННЯ ПОШКОДЖЕНОЇ ДНК МІКРОНУКЛЕАЦІЄЮ В РАДІОРЕЗИСТЕНТНИХ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ВПЛИВУ РЕНТГЕНІВСЬКИХ ПРОМЕНІВ

Мета: вивчення особливостей клітинного циклу опромінених епітеліальних стовбурових клітин печінки щурів (клітини лінії WB-F344) у процесі виживання, оцінюючи радіаційно-індуковані зміни ядерної морфології та плоідності ДНК із застосуванням аналізу зображень, отриманих за допомогою оптичного мікроскопа.

Матеріали і методи. WB-F344 клітини, які вирощувалися у моношарі без досягнення повного покриття, опромінювали у суспензії в дозах 1,0; 5,0 і 10,0 Гр рентгенівськими променями потужності 2,0 Гр/хв. Як інтактний контроль використовували неопромінені клітини. Після опромінення клітини висівали у 25-см² флакони в кількості, що не дозволяє контактне гальмування протягом кількох днів їх культивування. На 1, 2, 3 та 5-й день після опромінення досліджували ядерну морфологію і плоідність клітин, використовуючи стехіометричну реакцію з толуїдиновим синім і цитометрію зображень. На 7-й та 9-й день після опромінення досліджували тільки клітини, опромінені у великих дозах (10,0 Гр), в яких додатково оцінювали наявність пошкоджень ДНК (γ -H2AX), проліферативний стан (Ki-67), а також наявність факторів самооновлення, притаманних стовбуровим клітинам (OCT4 і NANOG).

Результати. Радіорезистентність WB-F344 клітин була доведена результатами, які вказують на те, що ці клітини не піддаються швидкій та масивній загибелі, мало схожій на апоптоз навіть у сильно опромінених клітинах. Натомість спостерігали затримку клітинного циклу, яка супроводжувалася поліплоїдизацією (через Ki-67-позитивне мітотичне прослизання або порушений цитокінез) і мікронуклеацією залежно від дози, проте мікронуклеація деякою мірою випереджала поліплоїдизацію. Поліплоїдні клітини, які здатні позбавлятися пошкоджень ДНК, можуть деполіплоїдизуватися через мітоз. Багато мікроядер містили γ -H2AX кластери, що передбачає виділення сильно пошкоджених фрагментів ДНК. Обидва фактори, OCT4 і NANOG, були виражені в інтактному контролі, проте їх експресія посилювалася після опромінення.

Висновки. Хоча факт мікронуклеації свідчить про наявність генотоксичного ефекту, WB-F344 клітини, ймовірно, можуть уникати загибелі шляхом сортування пошкодженої ДНК за допомогою мікроядер. Індукція поліплоїдії в цих клітинах може бути адаптивною для сприяння виживанню клітин і регенерації тканин з можливим залученням механізму самооновлення.

Ключові слова: WB-F344 клітини, рентгенівське опромінення, виживання клітин, поліплоїдизація, мікронуклеація, самооновлення.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2019. Вип. 24. С. 220–234. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-220-234

✉ Геращенко Богдан Іванович, e-mail: biger63@yahoo.com

B. I. Gerashchenko¹✉, K. Salmina², J. Krigerts², J. Erenpreisa², A. M. Babsky³

¹*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, 45 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine*

²*Latvian Biomedical Research and Study Centre, 1 Ratsupites St., Riga, LV-1067, Latvia*

³*Ivan Franko National University of Lviv, Faculty of Biology, 4 Mykhaila Hrushevskoho St., Lviv, 79005, Ukraine*

INDUCED POLYPLOIDY AND SORTING OF DAMAGED DNA BY MICRONUCLEATION IN RADIORESISTANT RAT LIVER EPITHELIAL STEM-LIKE CELLS EXPOSED TO X-RAYS

Objective. Rat liver stem-like epithelial cells (WB-F344) that under certain conditions may differentiate into hepatocyte and biliary lineages were subjected to acute X-irradiation with the aim to examine cell cycle peculiarities during the course of survival.

Materials and methods. Suspensions of WB-F344 cells that grew as a monolayer and reached sub-confluence were irradiated with 1, 5, and 10 Gy of X-rays (2 Gy/min). As an intact control, sham-irradiated cells were used. After irradiation, cells were plated into 25-cm² tissue culture flasks to culture them for over several days without reaching contact inhibition. On days 1, 2, 3, and 5 post-irradiation, cells were harvested and examined for nuclear morphology and DNA ploidy by stoichiometric toluidine blue reaction and image cytometry. On days 7 and 9 post-irradiation, only heavily irradiated (10 Gy) cells were examined. Also, 10 Gy-irradiated cells were chosen for immunofluorescence staining to monitor persistence of DNA lesions (γ -H2AX), cell proliferation (Ki-67), and self-renewal factors characteristic for stem cells (OCT4 and NANOG).

Results. Radioresistance of WB-F344 cells was evidenced by the findings that they do not undergo rapid and massive cell death that in fact was weakly manifested as apoptotic even in heavily irradiated cells. Instead, there was cell cycle progression delay accompanied by polyploidization (via Ki-67-positive mitotic slippage or via impaired cytokinesis) and micronucleation in a dose-dependent manner, although micronucleation to some extent went ahead of polyploidization. Polyploid cells amenable for recovering from DNA damage can mitotically depolyploidize. Many micronuclei contained γ -H2AX clusters, suggesting isolation of severely damaged DNA fragments. Both factors, OCT4 and NANOG, were expressed in the intact control, but became enhanced after irradiation.

Conclusions. Although the fact of micronucleation is indicative of genotoxic effect, WB-F344 cells can probably escape cell death via sorting of damaged DNA by micronuclei. Induction of polyploidy in these cells can be adaptive to promote cell survival and tissue regeneration with possible involvement of self-renewal mechanism.

Key words: WB-F344 cells, X-irradiation, cell survival, polyploidization, micronucleation, self-renewal.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2019;24:220-234. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-220-234

ВСТУП

Печінкові клітини-попередники, які відіграють центральну роль у розвитку та регенерації печінки, потенційно є біпотентними, оскільки за певних умов вони можуть диференціюватися в гепатоцити та клітини жовчних протоків (біліарні клітини), які є двома типами епітеліальних клітин у зрілій печінці. Ці клітини також здатні виконувати декілька раундів поділу навіть без попереднього ушкодження печінки. У наших попередніх експериментах з печінковими епітеліальними клітинами, які мають стовбурові характеристики (клітинна лінія WB-F344 [1] з вираженим диким типом *p53* [2]), показана їх відносна радіорезистентність, про що свідчить тест формування колоній [3]. Цито-

INTRODUCTION

Hepatic progenitor cells playing a central role in liver development and regeneration are potentially bipotent since under certain conditions they can differentiate into hepatocytes and bile duct cells, which are the two epithelial cell types in adult liver. These cells can also perform multiple rounds of cell division without a preceding injury to the liver. In our previous experiments with liver epithelial cells possessing stem-like characteristics (rat liver derived WB-F344 cell line [1] with apparently wild-type *p53* [2]), it has been shown that they are relatively radioresistant as evidenced by a colony formation test [3]. Flow

✉ Bogdan I. Gerashchenko, e-mail: biger63@yahoo.com

метричний аналіз вмісту ДНК в клітинах WB-F344, які піддавали впливу різних доз γ -променів (від 1,0 до 10,0 Гр з кроком опромінення в 1,0 Гр), однозначно виявив затримку клітинного циклу залежно від дози та часу [3]. Характер кінетики збільшення числа цих клітин, базуючись на їх підрахунку за допомогою приладу Коултера, свідчить про те, що вони не гинуть швидко та масово навіть після опромінення у високій дозі (10,0 Гр) [3]. Проте механізми, які потенційно можуть бути пов'язані з радіорезистентністю цих клітин, досі не були з'ясовані.

МЕТА

Ця робота має за мету вивчення особливостей клітинного циклу опромінених WB-F344 клітин у процесі виживання, оцінюючи радіаційно-індуковані зміни ядерної морфології та плідності ДНК із застосуванням аналізу зображень, отриманих за допомогою оптичного мікроскопа. Крім того, в опромінені клітинах, застосовуючи імунофлуоресцентне забарвлення, досліджували наявність дволанцюгових розривів ДНК (γ -H2AX), експресію факторів самооновлення, притаманних стовбуровим клітинам (OCT4 і NANOG), а також проліферацію (Ki-67).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Клітини та опромінення. В даному дослідженні клітини WB-F344 культивували в поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США) з доданою 7 % фетальною телячою сироваткою (FCS; Sigma-Aldrich) в CO₂-інкубаторі при 37 °С. Не досягаючи повного покриття, моношар 32-го пасажу клітин, культивованих у 75-см² флаконі, піддавали трипсинізації наступним способом: одразу ж після того, як поживне середовище було видалене, моношар клітин двічі промивали 0,25 % розчином Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), а відокремлені клітини суспендували у 263 мл поживного середовища. Перед опроміненням суспензію клітин розділяли на чотири 65-мілілітрові порції, якими потім заповнювали 25-см² культуральні флакони. Після цього додавали ще середовища (загальний об'єм середовища становив близько 70 мл), щоб мінімізувати присутність повітря у флаконах. Клітини опромінювали при 37 °С рентгенівськими променями (X-промені) у дозах 1,0; 5,0 і 10,0 Гр. X-промені генерували високоенергетичним лінійним прискорювачем Clinac 600C (Varian Medical Systems, США) за напруги 4 МВ та потужності дози 2,0 Гр/хв. Як інтактний контроль, використовували неопромінені клітини (0 Гр). Після опромінення клітинні суспензії в різних розведеннях поміщали у 25-см² флакони, оскільки опромінені клітини залежно від от-

cytometric DNA content analysis of WB-F344 cells exposed to various doses of γ -rays (ranged from 1 to 10 Gy with 1-Gy pace) clearly showed the dose- and time-dependent cell cycle progression delay [3]. The character of their growth kinetics based on Coulter cell counting suggests that they do not undergo rapid and massive cell death even after high-dose irradiation (10 Gy) [3]. However, the mechanisms that could potentially be attributed to the radioresistance of these cells remain to be clarified.

OBJECTIVE

The current work is aimed to examine during the course of survival of irradiated WB-F344 cells their cell cycle peculiarities based on the study of radiation-induced alterations in nuclear morphology and DNA ploidy using microscopy-based image analysis. In addition, using immunofluorescence staining, irradiated cells were monitored for persistence of DNA double stand breaks (γ -H2AX), expression of self-renewal factors characteristic for stem cells (OCT4 and NANOG), and proliferation (Ki-67).

MATERIALS AND METHODS

Cells and irradiation. In the present study, WB-F344 cells were cultured in RPMI 1640 growth medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 7 % fetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich) in CO₂-incubator at 37°C. A subconfluent monolayer of cells at passage 32 cultured in 75-cm² tissue culture flask was trypsinized as follows. Immediately after the growth medium was removed, cells monolayer was rinsed twice with 0.25 % Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), and detached cells were suspended in 263 ml of growth medium. Before irradiation, cell suspension was split into four 65-ml portions poured into 25-cm² tissue culture flasks followed by adding some more medium (the total volume of the medium was about 70 ml) to minimize the presence of air in the flasks. Cells were irradiated at 37 °C with X-rays at doses of 1, 5, and 10 Gy. X-rays were delivered by a high energy linear accelerator Clinac 600C (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) operating at voltage of 4 MV and dose rate of 2 Gy/min. As an intact control, sham-irradiated (0 Gy) cells were used. After irradiation, cells were seeded into 25-cm² flasks at different densities since irradiated cells depending on received

риманої дози можуть розмножуватися повільніше, ніж неопромінені. Перед початком культивування кількість неопромінених та клітин, опромінених в дозі 1,0 Гр, була приблизно $9 \cdot 10^4$, тоді як кількість клітин, опромінених в дозах 5,0 та 10,0 Гр, була приблизно $16 \cdot 10^4$ та $25 \cdot 10^4$, відповідно. Ці розрахунки ґрунтувалися на оцінці відмінностей кінетики росту клітин, які отримували різні дози γ -променів [3], так що при цих концентраціях клітин контактне гальмування не відбувалося протягом декількох днів культивування. Через кожен день після початку культивування 30 %-ну порцію середовища у всіх флаконах замінювали кондиційним середовищем. На 1, 2, 3 та 5-й день після опромінення клітини, які опромінювали в дозах 0; 1,0; 5,0 і 10,0 Гр, трипсинізували, потім суспендували у поживному середовищі та осаджували центрифугуванням протягом 5 хв. На 7-й та 9-й день після опромінення з культур збирали тільки клітини, опромінені в дозі 10,0 Гр. У всіх зразках супернатант видаляли способом інвертування центрифужних пробірок.

Забарвлення та аналіз ядерної ДНК. Осаджені клітини ретельно (без бульбашок) суспендували піпетуванням у залишках середовища (близько 0,2 мл) з подальшим нанесенням 25-мкл клітинних суспензій на покриті полі-L-лізином предметні скельця для мікроскопії (Thermo Fisher Scientific, США). Після того, як зразки були повністю висушені, їх забарвлювали стехіометричним ДНК-барвником толуїдиновим синім (ТВ; Thermo Fisher Scientific) згідно із запропонованим протоколом [4, 5], стисло представленим нижче. Клітини на предметних скельцях фіксували у суміші ацетон/етанол (1 : 1) протягом щонайменше 30 хв при 4 °C, підсушували, обробляли 5-н. розчином HCl протягом 20 хв при кімнатній температурі, а потім промивали в дистильованій воді (5 разів по 1 хв). Залишки води на поверхні предметних скельць обережно видаляли промокальним папером відразу ж перед 10-хвилинним забарвленням зразків в 0,05 % ТВ, розчиненого в 50 % цитрат-фосфатному буфері Мак Ілвайна (рН 4,0). Відразу ж після забарвлення зразки швидко промивали в дистильованій воді (3-разове занурення), після чого залишки води негайно видаляли промокальним папером з подальшою дегідратацією зразків у бутанолі (2 рази по 3 хв при 37 °C). Зразки потім обробляли ксилолом (2 рази по 3 хв при кімнатній температурі) перед тим, як їх покривали монтажною рідиною DPX (Sigma-Aldrich) для мікроскопії. З кожного зразка цифрові зображення щонайменше 200 випадково вибраних неспотворених клітинних ядер записували за збільшення об'єктива $\times 100$ з використанням мікроскопа Ergolux L03-10 (Leitz, Німеччина), оснащеного кольоровою відеока-

dose were expected to grow slower than sham-irradiated cells. The approximate numbers of seeded 0 Gy- and 1 Gy-irradiated cells were $9 \cdot 10^4$, while the numbers of 5 Gy- and 10 Gy-irradiated cells were about $16 \cdot 10^4$ and $25 \cdot 10^4$, respectively (calculations were based on estimation of the differences in growth kinetics of cells that received various doses of γ -rays [3]), so at these plating densities the contact inhibition was not achieved for over several days of cell culturing. Every other day after plating cells 30% of medium in all flasks was replaced with conditioned medium. On days 1, 2, 3, and 5 post-irradiation cells exposed to 0, 1, 5, and 10 Gy were trypsinized, resuspended in growth medium, and centrifuged for 5 min. On days 7 and 9 post-irradiation only 10 Gy-irradiated cells were collected. Supernatant in all samples was removed by inverting centrifuge tubes.

Nuclear DNA staining and analysis. Deposited cells were thoroughly (without air bubbles) resuspended by pipetting in the remnants of medium (about 0.2 ml) followed by careful smearing of 25- μ l cell suspensions on poly-L-lysine-coated microscope slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After samples were fully dried, they were stained with a stoichiometric DNA dye toluidine blue (TB; Thermo Fisher Scientific) as proposed [4, 5]. Briefly, cells on slides were fixed in acetone/ethanol mixture (1 : 1) for a least 30 min at 4 °C, dried, treated with 5N HCl for 20 min at room temperature, and then washed in distilled water (5 \times 1 min). The remnants of water on the surface of slides were carefully removed with a blotting paper followed by 10-min staining of samples with 0.05 % TB in 50 % McIlvain citrate-phosphate buffer (pH 4.0). Immediately after staining, samples were rapidly washed in distilled water (3 times by dipping), and the remnants of water were promptly removed with a blotting paper followed by dehydration of samples in butanol (2 \times 3 min at 37°C). Samples were then immersed in xylene (2 \times 3 min at room temperature) and embedded in DPX mounting medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for microscopy. Digital images of at least 200 randomly selected and undistorted cell nuclei from each sample were collected with $\times 100$ objective magnification using Ergolux L03-10 microscope (Leitz, Germany) equipped with

мерою DXС-390Р (Sony, Японія), відкаліброваною по зеленому каналу. Вміст ДНК у клітинному ядрі вимірювали за величиною інтегральної оптичної щільності (IOD) з використанням програмного забезпечення Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, США). Індуковану поліплоїдію оцінювали, підраховуючи клітини з плоїдністю, яка перевищує 5С.

Імунофлуоресцентне забарвлення. Фіксацію та імунофлуоресцентне забарвлення неопромінених та опромінених в дозі 10,0 Гр клітин, які були попередньо осаджені на покриті полі-L-лізином предметні скельця (Thermo Fisher Scientific), виконували, як описано у [5]. Зразки інкубували з первинними антитілами до Ki-67 (1 : 50, кролячі поліклональні, PA5-16785, Pierce), γ -H2AX (1 : 200, кролячі поліклональні, 4411-PC-100, Trevigen), OCT4 (1 : 200, кролячі поліклональні, ChIP-ступінь, ab19857, Abcam) і NANOG (1 : 50, мишачі моноклональні, N3038, Sigma) у зволоженій камері при 4 °С протягом ночі. Далі зразки інкубували протягом 40 хв у темряві при кімнатній температурі з відповідними вторинними антитілами: козячий антимишачий IgG Alexa Fluor 488 (1 : 300, A31619, Invitrogen), або козячий антикролячий IgG Alexa Fluor 488 або 594 (1 : 300, A11008 або A31631, відповідно, Invitrogen). Для чіткішої візуалізації клітинних ядер зразки додатково забарвлювали 4',6-діамідино-2-феніліндолом (DAPI; Sigma-Aldrich) у концентрації 0,25 мкг/мл протягом 2 хв перед покриттям фотознебарвлюючим реагентом ProLong Gold (Invitrogen).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Кінетика дозозалежних процесів поліплоїдизації та мікронуклеації в опромінених клітинах WB-F344 представлена на рисунках 1А та 1Б відповідно. Хоча на перший погляд обидва процеси здаються конкордантними, мікронуклеація трохи випереджала поліплоїдизацію незалежно від дози опромінення. Наприклад, клітини, які отримали дозу 1,0 Гр, продемонстрували значну мікронуклеацію на 2-й день після опромінення (рис. 1Б), тоді як помітне збільшення фракції поліплоїдних (PP) клітин з плоїдністю > 5С в клітинах, опромінених в дозі 1,0 Гр, спостерігали тільки після 3 днів з моменту опромінення (наприклад, на 5-й день після опромінення; рис. 1А). Проте на відміну від мікронуклеації (рис. 1Б), поліплоїдизація була більш стійкою, про що свідчить значно менш круте зниження фракції PP (> 5С) клітин в зразках, опромінених в дозах 5,0 та 10,0 Гр, після 3 днів з моменту опромінення (наприклад, на 5, 7 та 9-й дні після опромінення; рис. 1А).

DXС-390Р color video camera (Sony, Tokyo, Japan) calibrated in the green channel. DNA content per cell nucleus was measured as integral optical density (IOD) using Image-Pro Plus4.1 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Induced polyploidy was evaluated by counting cells of the ploidy exceeding 5С.

Immunofluorescence staining. Fixation and immunofluorescence staining of sham- and 10 Gy-irradiated cells that have been cytospinned on poly-L-lysine-coated microscopy slides (Thermo Fisher Scientific) were largely performed as described [5]. Samples were incubated with the primary antibodies to Ki-67 (1 : 50, rabbit polyclonal, PA5-16785, Pierce), γ -H2AX (1 : 200, rabbit polyclonal, 4411-PC-100, Trevigen), OCT4 (1 : 200, rabbit polyclonal, ChIP grade, ab19857, Abcam), and NANOG (1 : 50, mouse monoclonal, N3038, Sigma) in a humidified chamber overnight at 4 °С. Samples were then incubated for 40 min at room temperature in the dark with the appropriate secondary antibodies: goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1 : 300, A31619, Invitrogen) or goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 or 594 (1 : 300, A11008 or A31631, respectively, Invitrogen). To clearly visualize cell nuclei, samples were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) at concentration of 0.25 μ g/ml for 2 min followed by embedding them in the anti-fade reagent ProLong Gold (Invitrogen).

RESULTS AND DISCUSSION

The kinetics of dose-dependent polyploidization and micronucleation processes in irradiated WB-F344 cells is presented in Figures 1A and 1B, respectively. Although at first sight both processes seem to be concordant, micronucleation went slightly ahead of polyploidization regardless of the dose delivered to cells. For example, cells that received the dose as low as 1 Gy demonstrated considerable micronucleation on the 2nd day post-irradiation (Fig. 1B), whereas a marked increase of the fraction of polyploid (PP) cells with the ploidy of > 5С in 1 Gy-irradiated sample was observed only after passing 3 post-irradiation days (e. g., on the 5th day post-irradiation; Fig. 1A). However, contrary to micronucleation (Fig. 1B), polyploidization was more persistent as evidenced by much less steep declining of the fraction of PP (> 5С) cells in 5 Gy- and 10 Gy-irradiated samples after passing 3 post-irradiation days (e. g., on the 5th, 7th, and 9th days post-irradiation; Fig. 1A). On the 7th and 9th days post-

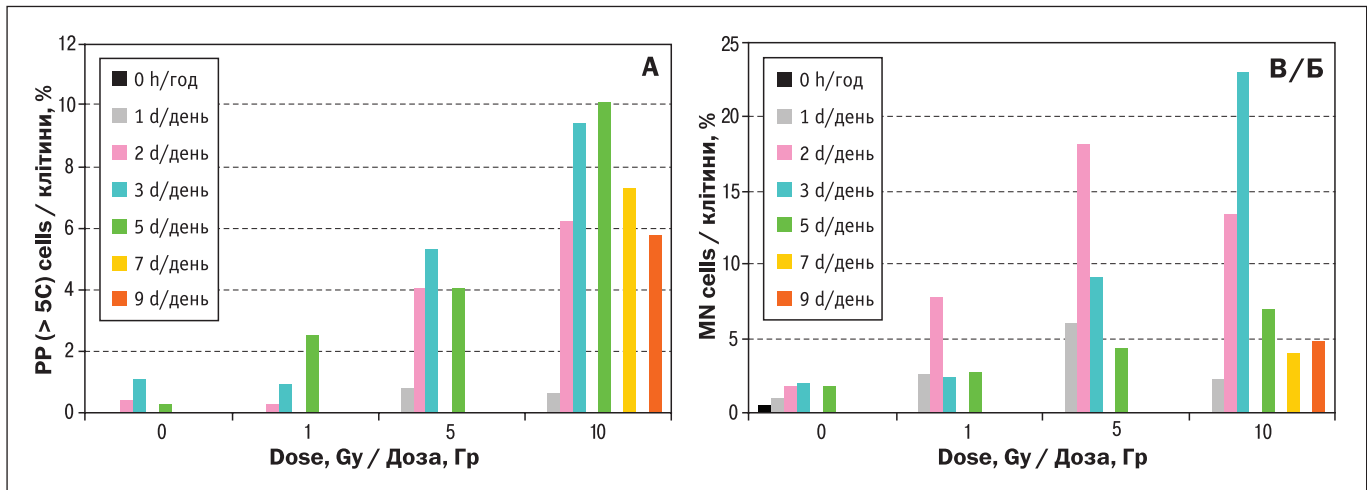


Рисунок 1. Кінетика поліплоїдизації (А) та мікронуклеації (Б) в клітинах WB-F344, опроміненіх різними дозами Х-променів (1,0; 5,0 і 10,0 Гр)

Відсотки мікроядерних (MN) і поліплоїдних (PP) клітин з плоїдністю більше 5C відображають наявні порції цих клітин в різний час після опромінення. Інтактний контроль (0 Гр), який був проаналізований на 0 год, являє собою ті клітини, що були зібрані з культури безпосередньо перед опроміненням. У цьому зразку PP (> 5C) клітини не були виявлені, тоді як популяція MN клітин становила близько 0,5%.

Figure 1. The time course of polyploidization (A) and micronucleation (B) in WB-F344 cells irradiated with various doses of X-rays (1, 5, and 10 Gy)

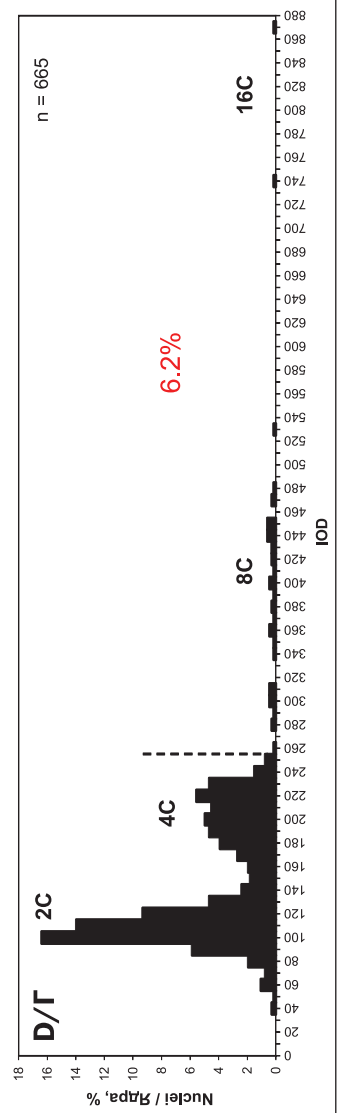
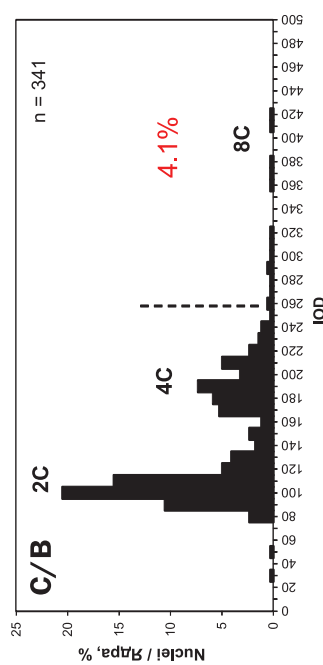
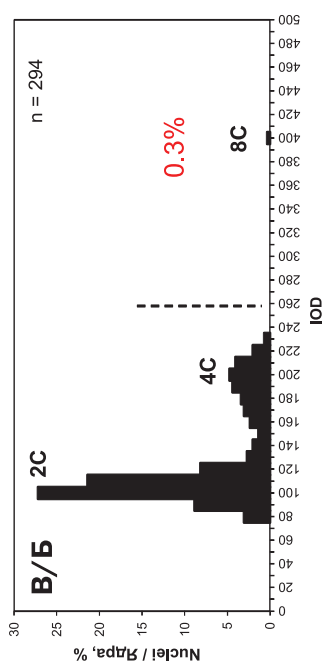
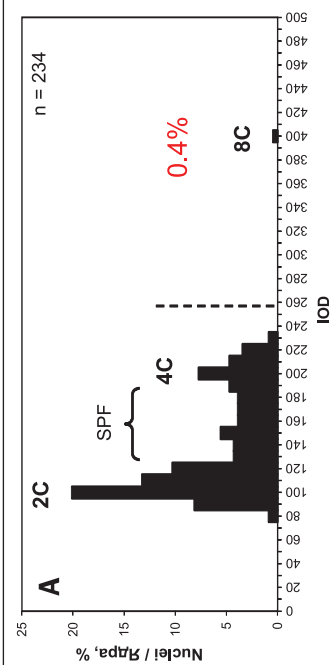
Percentages of micronucleated (MN) cells and polyploid (PP) cells of the ploidy of more than 5C represent persisting portions of these cells at various time points post-irradiation. The intact control (0 Gy) that was analyzed at 0 h represents cells collected from sub-confluent culture just before irradiations. In this sample, PP (> 5C) cells were not found (0%), whereas the population of MN cells was about 0.5%.

На 7-й та 9-й день після опромінення популяція мікроядерних (MN) клітин в зразку, опроміненому в дозі 10,0 Гр, була трохи менше 5 %, але не настільки малою, як в неопроміненіх зразках ($\leq 2\%$) (рис. 1Б).

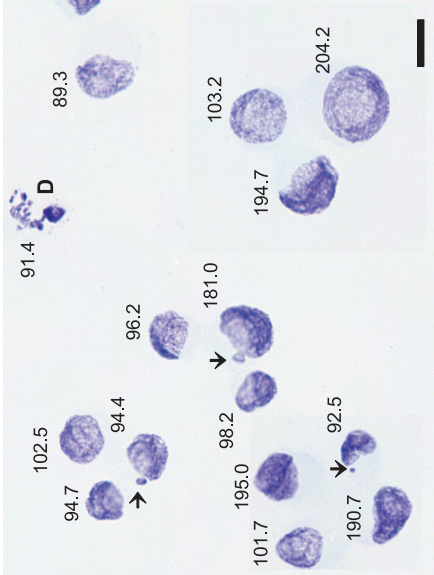
Той факт, що в опроміненіх зразках PP (> 5C) клітини були присутні довше, ніж MN клітини, ймовірно, пояснюється їх постійною генерацією протягом декількох днів з моменту опромінення, хоча після опромінення у помірних дозах (1,0 і 5,0 Гр) MN клітини утворювалися скоріше, ніж PP (> 5C) клітини (рис. 1А vs. рис. 1Б). Проте опромінення у високій дозі (10,0 Гр) може призвести до гальмування мікронуклеації, що підтверджується значним зниженням відсотків MN клітин протягом перших двох днів після опромінення порівняно з відсотками MN клітин у зразку, опроміненому в дозі 5,0 Гр (рис. 1Б). Також деякий гальмуючий вплив на продукцію PP (> 5C) клітин спостерігали після опромінення в дозі 10,0 Гр, враховуючи те, що частка цих клітин не була більше, ніж після опромінення в дозі 5,0 Гр (рис. 1А). Хоча проліферація опроміненіх WB-F344 клітин чітко пригнічувалася залежно від дози (добре описаний результат нашого попереднього дослідження [3]), цей процес не супроводжувався швидкою та масивною загибеллю клітин навіть у зразку, опроміненому в дозі 10,0 Гр, ґрунтуючись на мікроскопічних спостереженнях, що виявили наявність

irradiation, the population of micronucleated (MN) cells in 10 Gy-irradiated sample was slightly less than 5 %, but was not as small as in sham-irradiated ones showing $\leq 2\%$ (Fig. 1B).

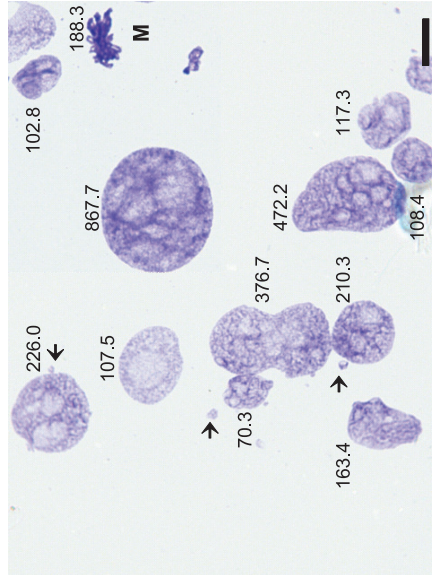
The fact that in irradiated samples PP (> 5C) cells persisted longer than MN cells is likely due to persistent generation of the former ones for over several days since irradiations were performed, although after irradiations with moderate doses (1 and 5 Gy) MN cells can be more readily produced than PP (> 5C) cells (Fig. 1A vs. Fig. 1B). However, high-dose irradiation (10 Gy) can inhibit micronucleation as evidenced by a considerable drop of the percentages of MN cells within the first 2 days post-irradiation compared with those of MN cells in 5 Gy-irradiated sample (Fig. 1B). Some inhibitory effect of high-dose irradiation (10 Gy) on the production of PP (> 5C) cells was also observed taking into account the fact that the fraction of these cells was not larger than that after 5-Gy irradiation (Fig. 1A). Although cell growth of irradiated WB-F344 cells was strictly inhibited in a dose-dependent manner (well-documented finding of our previous study [3]), it was not accompanied by rapid and massive cell death even in 10 Gy-irradiated sample based on microscopic observation revealing the



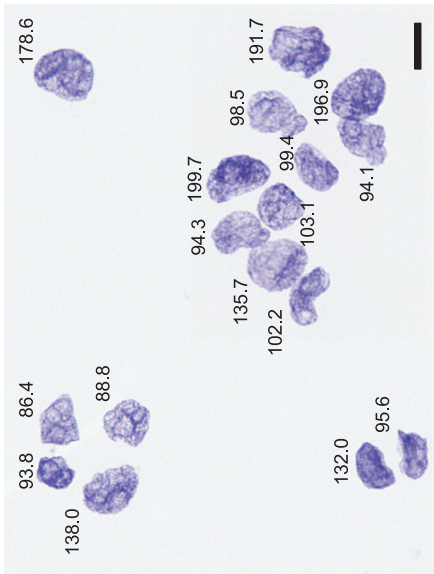
F/D



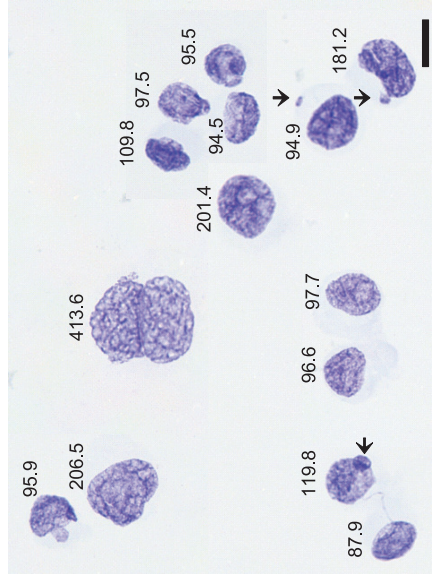
H/Е



E/Г



G/Е



відносно невеликого числа мертвих клітин зі слабкими проявами апоптозу. Проте радіаційно-індуковане гальмування проліферації клітин може бути пов'язане із затримкою прогресії клітинного циклу через запуск G_1 і G_2 контрольно-пропускних механізмів, викликаючи певні пертурбації у профілях вмісту ДНК. Наприклад, на 2-й день після опромінення відмічали залежне від дози зростання 4С ядерної фракції, припускаючи накопичення G_2/M клітин, в т. ч. РР клітин у фазі G_1 (рис. 2А–Г). Більш того, S-фазова фракція в опроміненних клітинах була значно меншою (рис. 2Б–Г), ніж у неопроміненних клітинах (рис. 2А). Ці спостереження фактично узгоджуються з раніше опублікованими даними [3]. Незважаючи на затримку клітинного циклу в опроміненних клітинах, спостерігали невелику кількість мітотичних клітин ($\leq 2\%$), що свідчить про відновлення ДНК від пошкоджень навіть після опромінення в дозі 10,0 Гр (метафазні хромосоми, рис. 2Є).

До профілів вмісту ДНК у ядрах неопроміненних та опроміненних клітин (рис. 2А–Г) додано відповідні зображення цих ядер, забарвлених ТВ (рис. 2Г–Є). Після опромінення більшість великих РР клітин з плоїдністю 8С і 16С зазвичай містили 1, 2 та іноді більше ядер (рис. 2Е і 2Є). Деякі великі одноядерні РР клітини ймовірно ділились біполярним мітозом (рис. 3А–В), що рідко спостерігається серед клітинних популяцій ссавців. Подібні мітози також спостерігали в інтактних клітинах, але значно меншою мірою через малочисельність великих РР клітин. Той факт, що РР клітини можуть бути проліферуючими, підтверджується позитивністю Ki-67 (рис. 4). Цікаво, що ядра Ki-67-позитивних РР клітин можуть містити численні та яскраві γ -H2AX осередки (можливо, внаслідок пошкодження ДНК), які ймовірно генеруються ендогенно під час поточних раундів реплікації

presence of relatively low numbers of dead cells weakly manifesting apoptotic features. Nevertheless, radiation-induced cell growth inhibition can be associated with cell cycle progression delay via G_1 and G_2 checkpoint mechanisms causing certain perturbations in DNA content profiles. For example, there was dose-dependent elevation of 4C fraction on the 2nd day after irradiations assuming accumulation of G_2/M cells including PP cells in G_1 phase (Fig. 2A–D). Moreover, S-phase fraction in irradiated cells was considerably smaller (Fig. 2B–D) than that in sham-irradiated ones (Fig. 2A). In fact, these findings are consistent with the previously published data [3]. In spite of cell cycle progression delay in irradiated cells, there was a small amount of mitotic cells ($\leq 2\%$), suggesting recovery from DNA damage even after 10-Gy irradiation (metaphase chromosomes, Fig. 2H).

DNA content profiles of the nuclei of sham-irradiated and irradiated cells (Fig. 2A–D) are supplemented with corresponding microphotographs of these nuclei stained with TB (Fig. 2E–H). After irradiations, most of the large PP cells having the ploidy of 8C and 16C usually contained 1, 2, and less often more nuclei (Figs. 2G and 2H). Some large mononuclear PP cells seemingly divide by bipolar mitosis (Fig. 3A–C), a rarely observed phenomenon in mammalian cell populations. Similar divisions were also seen in untreated cells but to a much lesser extent, simply because of persisting low numbers of large PP cells. The fact that PP cells can be proliferative is supported by Ki-67 positive staining (Fig. 4). Curiously, these Ki-67-positive PP cells may have numerous bright γ -H2AX foci assuming DNA lesions that are probably generated intrinsi-

Рисунок 2 (на лівій сторінці). Профілі вмісту ДНК (А–Г) і ядерна морфологія (Г'–Є) клітин WB-F344, які збирали з культур і забарвлювали ТВ на 2-й день після опромінення різними дозами X-променів (1,0; 5,0 і 10,0 Гр)

Панелі А і Г': неопромінені клітини (0 Гр), культура яких ініціювалася в той же час, що й культури опроміненних клітин (тобто відразу після опромінення). Панелі Б і Д: клітини, опромінені в дозі 1,0 Гр. Панелі В і Е: клітини, опромінені в дозі 5,0 Гр. Панелі Г і Є: клітини, опромінені в дозі 10,0 Гр. Значення IOD показані в умовних одиницях. Пунктирні лінії являють собою межі, що відокремлюють клітинні ядра з плоїдністю ДНК більше 5С, відсотки яких показані червоним кольором. Числові значення, показані поряд з ядрами, є IOD цих ядер. Стрілки вказують на очевидні мікроядра. Позначення: SPF – S-фазова фракція; D – ядро загиблої клітини; M – пучок метафазних хромосом. Масштабна смужка = 10 мкм.

Figure 2 (on the left page). DNA content profiles (A–D) and nuclear morphology (E–H) of WB-F344 cells collected and stained with TB on the 2nd day after irradiation with various doses of X-rays (1, 5, and 10 Gy)

Panels A and E: sham-irradiated cells (0 Gy) whose culture was initiated in the same time as the cultures of irradiated cells (i.e., just after irradiations). Panels B and F: 1 Gy-irradiated cells. Panels C and G: 5 Gy-irradiated cells. Panels D and H: 10 Gy-irradiated cells. IOD values are shown in arbitrary units. Dashed lines represent borders separating cell nuclei exceeding 5C DNA ploidy whose percentages are shown in red. The numeric values shown next to the nuclei represent IODs of these nuclei. Arrows show the apparent micronuclei. Denotations: SPF – S-phase fraction; D – the nucleus of a dead cell; M – the bunch of metaphase chromosomes. Scale bar = 10 μ m.

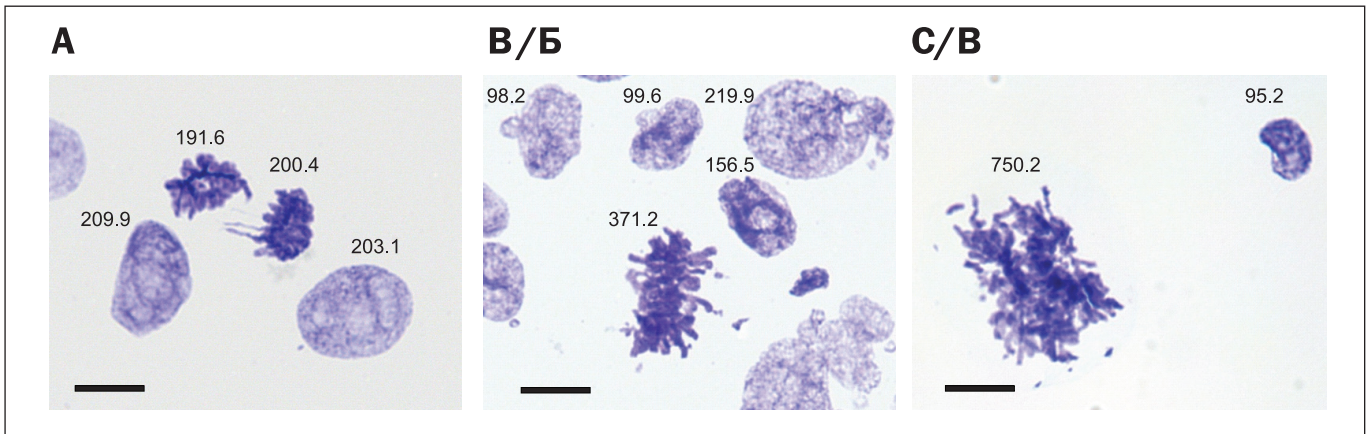


Рисунок 3. Вибрані зображення ядер WB-F344 клітин, які збирали з культур і забарвлювали ТВ на 5-й день після опромінення в дозі 1,0 Гр (А), та на 2-й і 9-й день після опромінення в дозі 10,0 Гр (Б і В, відповідно), демонструючи наявність великих РР клітин, що можуть поділятися біполярними мітозами. Числові значення, показані поряд з ядрами, є IOD цих ядер. Масштабна смужка = 10 мкм.

Figure 3. Selected images of the nuclei of WB-F344 cells collected and stained with TB on the 5th day after 1-Gy irradiation (A), and on the 2nd and 9th day after 10-Gy irradiation (B and C, respectively) demonstrating persistence of large PP cells that may be dividing by bipolar mitoses

The numeric values shown next to the nuclei represent IODs of these nuclei. Scale bar = 10 µm.

ДНК (рис. 4). Такі клітини не обов'язково зазнають загибелі, якщо пошкодження ДНК оперативним та належним чином ліквідуються. Потенціал репарації ДНК очевидно існує в ендополіплоїдних клітинах, які утворюються при важкому генотоксичному пошкодженні [6]. Більш того, РР клітини здатні залучати механізм відновлювання ДНК у відповідь на її розриви, пов'язані з реплікацією [7]. З іншого боку, деякі автори стверджують, що γ -H2AX осередки можуть з'являтися за відсутності пошкодження ДНК (незалежне від пошкодження ДНК мітоз-специфічне фосфорилування H2AX) [8, 9]. Однак, поточні етапи реплікації ДНК, що викликають ендополіплоїдію, очевидно виникають після генотоксичного стресу, який не може бути знятий одразу ж після опромінення.

cally during ongoing DNA replication rounds (Fig. 4). Such cells may not necessarily undergo cell death if DNA lesions are promptly and properly repaired. DNA repair potential appears to remain in endopolyploid cells produced by severe genotoxic damage [6]. Moreover, PP cells can rewire DNA damage response networks to repair replication-associated DNA breaks [7]. On the other hand, some authors report that γ -H2AX foci may form in the absence of DNA damage (DNA damage-independent mitosis-specific phosphorylation of H2AX) [8, 9]. Nevertheless, the ongoing DNA replication rounds causing endopolyploidy are likely to be preceded by genotoxic stress that cannot be tackled soon after irradiation.

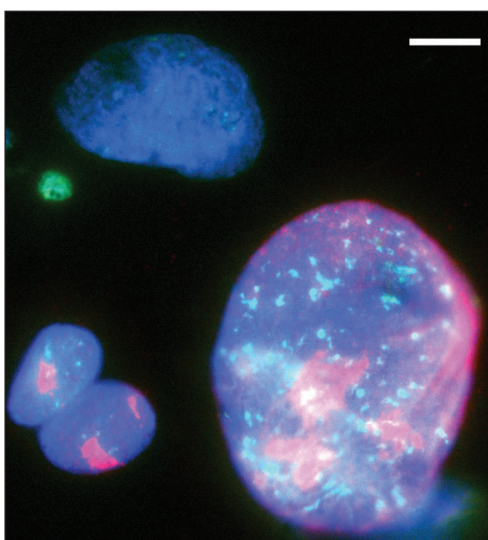


Рисунок 4. Імунофлуоресцентно забарвлені ядра WB-F344 клітин на 5-й день після опромінення в дозі 10,0 Гр (Ki-67 – червоний; γ -H2AX – зелений)

З метою контрастування ядер вони забарвлювалися DAPI, що специфічно зв'язується з ДНК (синій). Велике РР ядро, ймовірно, має плоїдність 16С. Два ядра, що прилягають один до одного (двоядерна клітина), походять з одного загального ядра і можуть містити загальну плоїдність 4С. Позитивне на γ -H2AX мікроядро, ймовірно, належить до мононуклеарної клітини з плоїдністю 4С, ядро якої розташоване вище. Масштабна смужка = 10 мкм.

Figure 4. Immunofluorescence stained nuclei of 10 Gy-irradiated WB-F344 cells on the 5th day post-irradiation (Ki-67 – red; γ -H2AX – green)

The nuclei were counterstained with DAPI for DNA (blue). The large PP nucleus is likely possessing 16C ploidy. Two juxtaposed nuclei originated from the one common nucleus may comprise the total ploidy of 4C as in binucleated cell. The micronucleus positive for γ -H2AX is likely to belong to mononucleated cell of the ploidy of 4C, whose nucleus is located nearby. Scale bar = 10 µm.

Що стосується радіаційно-індукованих MN клітин, у т. ч. тих, які містили поліплоїдні ядра, вони зазвичай мали 1–3 мікроядра (рідше > 3) і близько половини з них були позитивними на γ -H2AX. Позитивні на γ -H2AX мікроядра переважно спостерігали в PP клітинах. Ймовірно, ці мікроядра утворюються шляхом екструзії пошкодженої (нерепарованої) ДНК як в інтерфазних клітинах (рис. 5А і 5Б), так і в мітотичних (рис. 5В і 5Г). Накопичення кластерів дволанцюгових розривів ДНК у мікроядрах під час поліплоїдної метафази також виявлялося після потужного опромінення (30,0 Гр) клітин меланоми, які мають дикий тип *p53* [10]. Мікроядра з пошкодженою ДНК врешті-решт можуть бути видалені аутофагією з цитоплазми [11, 12].

Показано, що клітини WB-F344, які зазвичай містять фонові рівні NANOG і OCT4, можуть після опромінення посилювати експресію цих факторів самооновлення незалежно від фази клітинного циклу

As for radiation-induced MN cells, including those with polyploid nuclei, they usually contained 1–3 micronuclei (rarely > 3), and about a half of them were positive for γ -H2AX. Micronuclei positive for γ -H2AX were predominantly seen in PP cells. They are likely to be formed by extrusion of damaged (unrepaired) DNA either in interphase cells (Figs. 5A and 5B) or mitotic cells (Figs. 5C and 5D). Accumulation of the clusters of DNA double strand breaks in micronuclei during polyploid metaphase has been also observed in heavily irradiated (30 Gy) melanoma cells bearing wild-type *p53* [10]. Micronuclei with damaged DNA can eventually be removed by autophagy within the cytoplasm [11, 12].

WB-F344 cells normally expressing background levels of NANOG and OCT4 were found to express these self-renewal factors to a greater extent after irradiation regardless of the cell cycle phase posi-

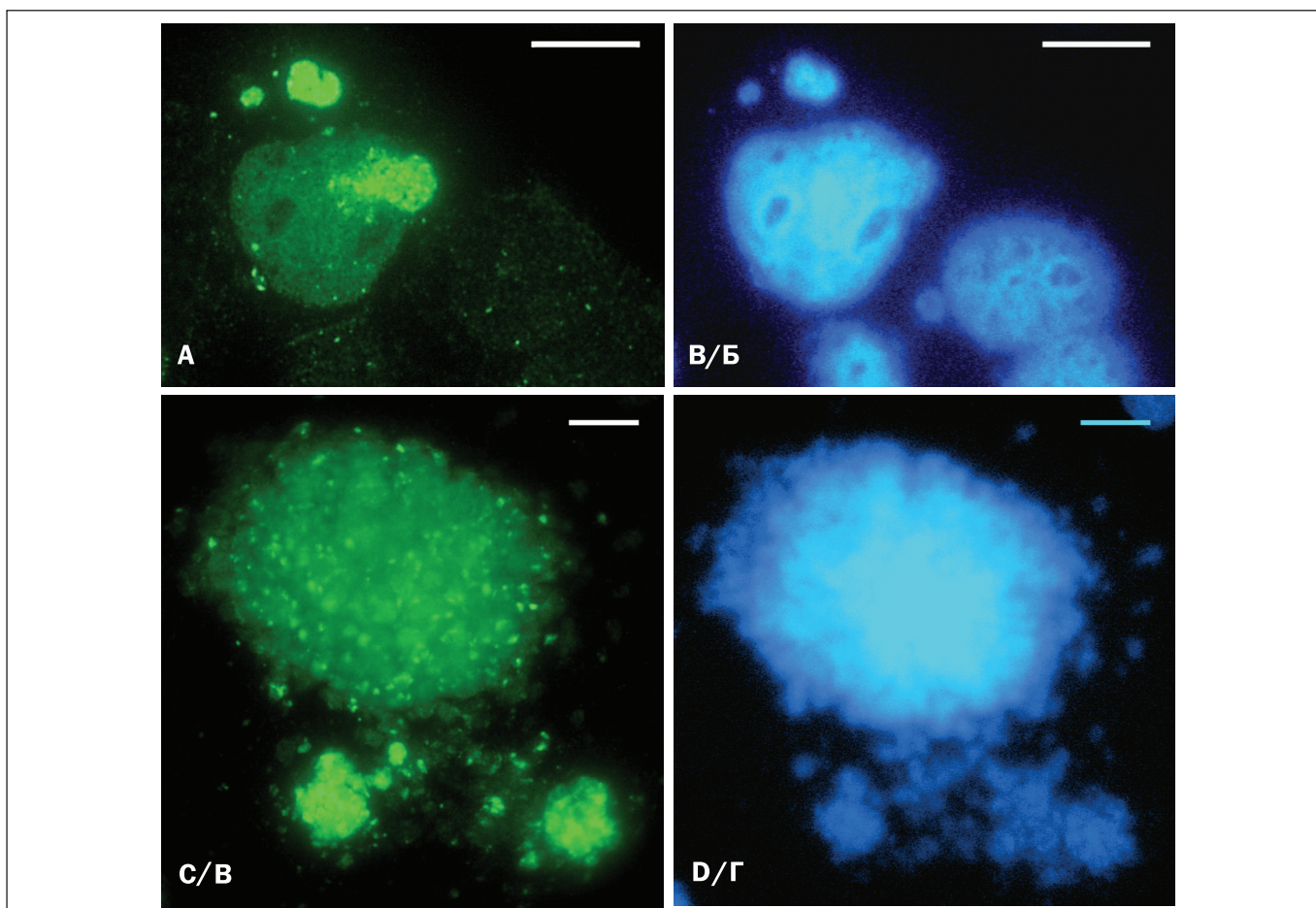


Рисунок 5. Екструзія пошкодженої ДНК та мікронуклеація у WB-F344 клітинах, опроміненних в дозі 10,0 Гр
Панелі А і Б: ядра інтерфазних клітин, забарвлених на γ -H2AX і DAPI, відповідно (2-й день після опромінення).
Панелі В і Г: метафазна поліплоїдна клітина, забарвлена на γ -H2AX і DAPI, відповідно (7-й день після опромінення).
Масштабна смужка = 10 мкм.

Figure 5. Extrusion of damaged DNA and micronucleation in 10 Gy-irradiated WB-F344 cells

Panels A and B: γ -H2AX- and DAPI-stained interphase cell nuclei, respectively (2nd day post-irradiation). Panels C and D: γ -H2AX- and DAPI-stained metaphase polyploid cell, respectively (7th day post-irradiation). Scale bar = 10 μ m.

(рис. 6А і 6Б, відповідно), і таке посилення може продовжуватися протягом щонайменше 5 днів, про що свідчать дані ОСТ4 імунофлуоресценції (рис. 6Б). Варто зазначити, що після опромінення з'явилася категорія клітин, які в основному представляють собою РР клітини з підвищеною експресією NANOG і ОСТ4 (рис. 6А і 6Б, відповідно). Поліплоїдизація клітин із супроводженням підвищеної експресії факторів самооновлення може свідчити про наявність пулу найбільш резистентних клітин. Радіаційно-індуковану поліплоїдизацію разом з активацією механізму самооновлення спостерігали в пухлинних

tion (Figs. 6A and 6B, respectively), and this elevation of self-renewal factors may persist for at least 5 days as evidenced from the data on OCT4 immunofluorescence (Fig. 6B). Notably, after irradiation, there was a category of cells mainly representing PP cells that expressed NANOG and OCT4 to a highest degree (Figs. 6A and Fig. 6B, respectively). Polyploidization of cells with elevated expression of self-renewal factors may be suggestive of the presence of the pool of most resistant cells. Radiation-induced polyploidization with up-regulated self-renewal network has

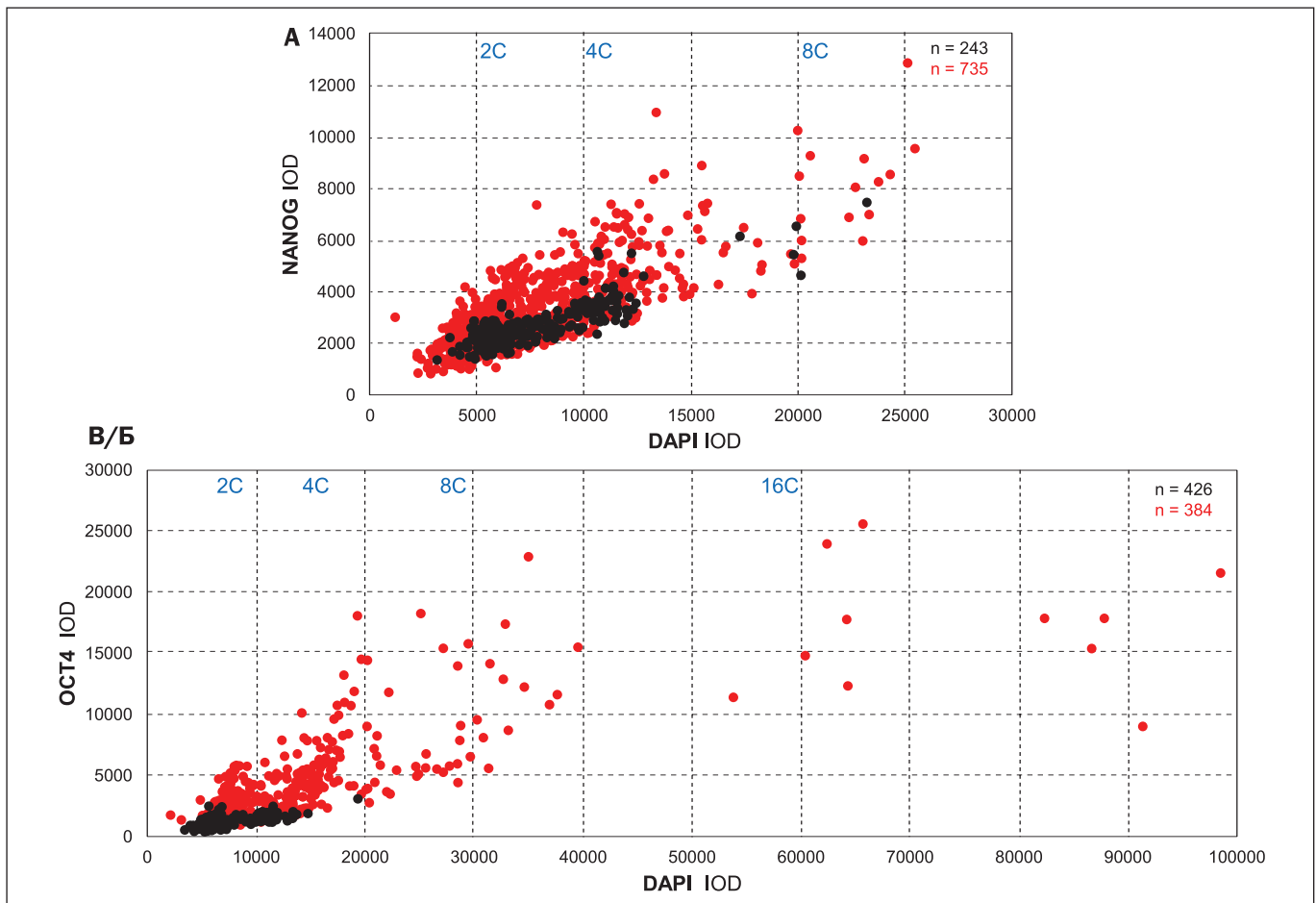


Рисунок 6. Підвищена експресія факторів самооновлення (NANOG і ОСТ4) в ядрах WB-F344 клітин, опромінених в дозі 10,0 Гр, на основі порівняння загальної інтенсивності флуоресценції з відповідних мішеней у опромінених (червоні точки) і неопромінених клітинах (чорні точки)

Зразки також забарвлювали DAPI для моніторингу позицій клітин за фазами клітинного циклу і ДНК плоїдності. Панель **А**: ~1,2-кратне посилення експресії NANOG на 2-й день після опромінення ($p < 0,001$, 2-сторонній t -розподіл Стюдента). Панель **Б**: ~1,7-кратне посилення експресії ОСТ4 на 5-й день після опромінення ($p < 0,001$, 2-сторонній t -розподіл Стюдента). РР ядра, які експресують найвищі рівні NANOG і ОСТ4, є ті, що мають IOD значення більше 8000 (А) і 10 000 (Б), відповідно. IOD значення показані в умовних одиницях.

Figure 6. Enhanced expression of self-renewal factors (NANOG and OCT4) in the nuclei of 10 Gy irradiated WB-F344 cells based on comparison of overall fluorescence intensities from corresponding targets in irradiated cells (red dots) and unirradiated cells (black dots)

Samples were counterstained with DAPI to monitor cell cycle and DNA ploidy position. Panel **A**: ~1.2-fold increase in NANOG expression on the 2nd day post-irradiation ($p < 0.001$, 2-sided Student's t -test). Panel **B**: ~1.7-fold increase in OCT4 expression on the 5th day post-irradiation ($p < 0.001$, 2-sided Student's t -test). PP nuclei expressing highest levels of NANOG and OCT4 are those having IODs larger 8000 (A) and 10000 (B), respectively. IOD values are shown in arbitrary units.

клітинах *in vitro* та *in vivo* [5, 13, 14], але не в нормальних клітинах. WB-F344 клітини, подібно до пухлинних клітин, можуть ендореплікувати ДНК, як засіб виживання під час генотоксичного стресу. Однак, з іншого боку, поліплоїдизація, яка відбувається в нормальній тканині (наприклад, в паренхімі печінки), як правило, супроводжує диференціацію клітин [15]. Цікаво, що підвищена експресія ще одного важливого фактора стовбурових клітин *c-MYC* нещодавно була відмічена у PP гепатоцитах по відношенню до диплоїдних гепатоцитів [16]. Деякі *p53*-дефіцитні PP пухлинні клітини здатні давати пара-диплоїдне потомство через деполіплоїдизаційні поділи та регульовану аутофагічну деградацію (тільки ті суб'ядра, які не містять NANOG і OCT4 та нездатні реплікувати ДНК, можуть зазнати деградації та елімінації через аутофагію) [17]. Можливо, подібні процеси відбуваються в клітинах WB-F344, які мають *p53* дикого типу, але подальші дослідження є необхідними для роз'яснення цього питання (хоча й рідше, але виникнення суб'ядерних PP клітин також спостерігали після опромінення). Варто згадати, що PP гепатоцити здатні зазнавати деполіплоїдизації, часто генеруючи пара-диплоїдні дочірні клітини [18], що є потенційним механізмом стрес-індукованої адаптації печінки на основі відбору анеуплоїдних, стресостійких фенотипів [19]. Однак, пізніше, за допомогою секвенування ДНК індивідуальних клітин була виявлена незначна анеуплоїдія у печінці [20].

Нарешті, повідомлялось, що існує взаємозв'язок між поліплоїдією та експресією генів, які сприяють виживанню клітин (через захист від апоптозу, пошкодження ДНК, гіпоксії і оксидативного стресу) та їх проліферації [21]. З іншого боку, гіпоксія та оксидативний стрес через регуляцію гліколітичних ферментів можуть активувати аеробний гліколіз, що сприяє стійкості до генотоксичної терапії [22]. На експериментах з WB-F344 клітинами встановлено, що ключовий гліколітичний фермент α -енолаза може бути залучений в радіаційній відповіді, як безпосередньо опромінених (5,0 Гр γ -променів), так і прилеглих до них клітин-свідків, для яких характерна підвищена проліферація [23, 24].

ВИСНОВКИ

Незалежно від того, що зазвичай мікронуклеація вказує на наявність генотоксичного ефекту, мікроядра в WB-F344 клітинах ймовірно відіграють певну роль в уникненні загибелі клітин шляхом сортування пошкодженої ДНК. Індукована поліплоїдія цих клітин, яка часто супроводжується мікронуклеацією, може бути адаптивною, сприяючи виживанню клітин і регенерації тка-

been observed in tumor cells *in vitro* and *in vivo* [5, 13, 14], but not in normal cells. WB-F344 cells like tumor cells may endoreplicate DNA as a means of survival during genotoxic stress. However, on the other hand, polyploidization that occurs in the normal tissue (e. g., in liver parenchyma) typically accompanies cell differentiation [15]. Interestingly, an elevated expression of another important stem cell factor *c-MYC* in PP hepatocytes compared with diploid ones has been recently reported [16]. Some *p53*-deficient PP tumor cells have been found to elicit near-diploid progeny through de-polyploidizing divisions and regulated autophagic degradation (only sub-nuclei lacking NANOG and OCT4 with inability to replicate DNA may undergo degradation and elimination through autophagy) [17]. Perhaps, similar processes occur in WB-F344 cells bearing wild-type *p53*, but further investigations are needed to clarify this issue (in fact, although more rarely, sub-nucleated PP cells were also seen after irradiations). It should be mentioned that PP hepatocytes can de-polyploidize, often generating near-diploid daughter cells [18], a potential mechanism for stress-induced liver adaptation based on selection of aneuploid, stress-resistant phenotypes [19]. However, more recently, single cell DNA sequencing revealed the rare occurrence of aneuploidy in the liver [20].

Finally, a clear link between polyploidy and gene expression network promoting cell survival (via protection from apoptosis, DNA damage, hypoxia, and oxidative stress) and proliferation has been reported [21]. On the other hand, hypoxia and oxidative stress by regulating glycolytic enzymes can activate aerobic glycolysis that promotes resistance to genotoxic treatment [22]. A key glycolytic enzyme α -enolase has been found to be involved in radiation responses of directly irradiated (5 Gy of γ -rays) as well as adjacent bystander WB-F344 cells characterized by enhanced proliferation [23, 24].

CONCLUSIONS

Regardless of the fact that micronucleation is indicative of genotoxic effect the micronuclei in WB-F344 cells can probably play a definite role in escaping cell death via sorting of damaged DNA. Induced polyploidy of these cells that is often coupled with micronucleation can be adaptive for promoting the cell sur-

нин із залученням механізму самооновлення, хоча прийнято вважати, що поліплоїдія сама по собі ініціюється в результаті незавершеного цитокінезу та дефектів в контрольно-пропускних механізмах клітинного циклу, які повинні активуватися в разі пошкодження ДНК.

ВИСЛОВЛЕННЯ ВДЯЧНОСТІ

Ми вдячні доктору Т. Хаясі за надання WB-F344 клітин, а також пані Г. Бока за опромінення клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tsao M. S., Smith J. D., Nelson K. G., Grisham J. W. A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp. Cell Res.* 1984. Vol. 154, no. 1. P. 38–52.
2. Kaufmann W. K., Behe C. I., Golubovskaya V. M. et al. Aberrant cell cycle checkpoint function in transformed hepatocytes and WB-F344 hepatic epithelial stem-like cells. *Carcinogenesis*. 2001. Vol. 22, no. 8. P. 1257–1269.
3. Gerashchenko B. I., Azzam E. I., Howell R. W. Characterization of cell-cycle progression and growth of WB-F344 normal rat liver epithelial cells following gamma-ray exposure. *Cytometry A*. 2004. Vol. 61A, no. 2. P. 134–141.
4. Erenpreisa J., Freivalds T. Anisotropic staining of apurinic acid with toluidine blue. *Histochemistry*. 1979. Vol. 60, no 3. P. 321–325.
5. Gerashchenko B. I., Salmina K., Eglitis J. et al. Disentangling the aneuploidy and senescence paradoxes: A study of triploid breast cancers non-responsive to neoadjuvant therapy. *Histochem. Cell Biol.* 2016. Vol. 145, no. 4. P. 497–508.
6. Ivanov A., Cragg M. S., Erenpreisa J. et al. Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116, Pt. 20. P. 4095–4106.
7. Zheng L., Dai H., Zhou M. et al. Polyploid cells rewire DNA damage response networks to overcome replication stress-induced barriers for tumour progression. *Nature Commun.* 2012. Vol. 3. Article 815.
8. McManus K. J., Hendzel M. J. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 2005. Vol. 16, no. 10. P. 5013–5025.
9. Tu W.-Z., Li B., Huang B. et al. γ H2AX foci formation in the absence of DNA damage: Mitotic H2AX phosphorylation is mediated by the DNA-PKcs/CHK2 pathway. *FEBS Lett.* 2013. Vol. 587, no. 21. P. 3437–3443.
10. Erenpreisa J., Salmina K., Belyayev A. et al. Survival at the brink: Chromatin autophagy of tumor cell in response to genotoxic challenge. In: *Hayat M. A., editor. Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging*. Vol. 12. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. P. 275–294.
11. Rello-Varona S., Lissa D., Shen S. et al. Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11, no. 1. P. 170–176.
12. Erenpreisa J., Huna A., Salmina K. et al. Macroautophagy-aided elimination of chromatin: Sorting of waste, sorting of fate? *Autophagy*. 2012. Vol. 8, no. 12. P. 1877–1881.

vival and tissue regeneration with involvement of self-renewal mechanism, though polyploidy itself is thought to be initiated by the failure in cytokinesis and defects in DNA damage checkpoints.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. T. Hayashi for providing WB-F344 cells and to Ms. G. Boka for irradiating cells.

REFERENCES

1. Tsao MS, Smith JD, Nelson KG, Grisham JW. A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp Cell Res.* 1984;154(1):38-52.
2. Kaufmann WK, Behe CI, Golubovskaya VM, Byrd LL, Albright CD, Borchet KM, et al. Aberrant cell cycle checkpoint function in transformed hepatocytes and WB-F344 hepatic epithelial stem-like cells. *Carcinogenesis* 2001;22(8):1257-69.
3. Gerashchenko BI, Azzam EI, Howell RW. Characterization of cell-cycle progression and growth of WB-F344 normal rat liver epithelial cells following gamma-ray exposure. *Cytometry A*. 2004;61A(2):134-41.
4. Erenpreisa J, Freivalds T. Anisotropic staining of apurinic acid with toluidine blue. *Histochemistry*. 1979;60(3):321-25.
5. Gerashchenko BI, Salmina K, Eglitis J, Huna A, Grjunberga V, Erenpreisa J. Disentangling the aneuploidy and senescence paradoxes: A study of triploid breast cancers non-responsive to neoadjuvant therapy. *Histochem Cell Biol.* 2016;145(4):497-508.
6. Ivanov A, Cragg MS, Erenpreisa J, Emzinsh D, Lukman H, Illidge TM. Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 20):4095-106.
7. Zheng L, Dai H, Zhou M, Li X, Liu C, Guo Z, et al. Polyploid cells rewire DNA damage response networks to overcome replication stress-induced barriers for tumour progression. *Nature Commun.* 2012;3:article 815.
8. McManus KJ, Hendzel MJ. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 2005;16(10):5013-25.
9. Tu W-Z, Li B, Huang B, Wang Y, Liu X-D, Guan H. γ H2AX foci formation in the absence of DNA damage: Mitotic H2AX phosphorylation is mediated by the DNA-PKcs/CHK2 pathway. *FEBS Lett.* 2013;587(21):3437-43.
10. Erenpreisa J, Salmina K, Belyayev A, Inashkina I, Cragg MS. Survival at the brink: Chromatin autophagy of tumor cell in response to genotoxic challenge. In: *Hayat MA, editor. Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging*. Vol. 12. 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 275-94.
11. Rello-Varona S, Lissa D, Shen S, Niso-Santano M, Senovilla L, Marino G, et al. Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle*. 2012;11(1):170-6.

13. Salmina K., Jankevics E., Huna A. et al. Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells. *Exp. Cell Res.* 2010. Vol. 316, no. 13. P. 2099–2112.
14. Lagadec C., Vlashi E., Della Donna L. et al. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells.* 2012. Vol. 30, no. 5. P. 833–844.
15. Brodsky W. Ya., Uryvaeva I. V. Cell polyploidy: Its relation to tissue growth and function. *Int. Rev. Cytol.* 1977. Vol. 50. P. 275–332.
16. Vazquez-Martin A., Anatskaya O.V., Giuliani A. et al. Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, no. 46. P. 75235–75260.
17. Erenpreisa J., Salmina K., Huna A. et al. Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation. *Cell Biol. Int.* 2011. Vol. 35, no. 7. P. 687–695.
18. Duncan A. W., Taylor M. H., Hickey R. D. et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature.* 2010. Vol. 467, no. 7316. P. 707–710.
19. Duncan A. W., Hanlon Newell A. E., Bi W. et al. Aneuploidy as a mechanism for stress-induced liver adaptation. *J. Clin. Invest.* 2012. Vol. 122, no. 9. P. 3307–3315.
20. Knouse K. A., Wu J., Whittaker C. A., Amon A. Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. Vol. 111, no. 37. P. 13409–13414.
21. Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: Evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics.* 2007. Vol. 89, no. 1. P. 70–80.
22. Zhong J., Rajaram N., Brizel D. M. et al. Radiation induces aerobic glycolysis through reactive oxygen species. *Radiother. Oncol.* 2013. Vol. 106, no. 3. P. 390–396.
23. Gerashchenko B. I., Howell R. W. Cell proximity is a prerequisite for the proliferative response of bystander cells co-cultured with cells irradiated with gamma-rays. *Cytometry A.* 2003. Vol. 56A, no. 2, P. 71–80.
24. Gerashchenko B. I., Yamagata A., Oofusa K. et al. Proteome analysis of proliferative response of bystander cells adjacent to cells exposed to ionizing radiation. *Proteomics.* 2007. Vol. 7, no. 12. P. 2000–2008.
12. Erenpreisa J., Huna A., Salmina K., Jackson TR, Cragg MS. Macroautophagy-aided elimination of chromatin: Sorting of waste, sorting of fate? *Autophagy.* 2012;8(12):1877-81.
13. Salmina K, Jankevics E, Huna A, Perminov D, Radovica I, Klymenko T, et al. Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells. *Exp Cell Res.* 2010;316(13):2099-112.
14. Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells.* 2012;30(5):833-44.
15. Brodsky WYa, Uryvaeva IV. Cell polyploidy: Its relation to tissue growth and function. *Int Rev Cytol.* 1977;50:275-332.
16. Vazquez-Martin A, Anatskaya OV, Giuliani A, Erenpreisa J, Huang S, Salmina K, et al. Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature. *Oncotarget.* 2016;7(46):75235-60.
17. Erenpreisa J, Salmina K, Huna A, Kosmacek EA, Cragg MS, Ianzini F, et al. Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation. *Cell Biol Int.* 2011;35(7):687-95.
18. Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Hanlon Newell AE, Lenzi ML, Olson SB. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature.* 2010;467(7316):707-10.
19. Duncan AW, Hanlon Newell AE, Bi W, Finegold MJ, Olson SB, Beaudet AL, et al. Aneuploidy as a mechanism for stress-induced liver adaptation. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3307-15.
20. Knouse KA, Wu J, Whittaker CA, Amon A. Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(37):13409-14.
21. Anatskaya OV, Vinogradov AE. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: Evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics.* 2007;89(1):70-80.
22. Zhong J, Rajaram N, Brizel DM, Frees AE, Ramanujam N, Batinic-Haberle I, et al. Radiation induces aerobic glycolysis through reactive oxygen species. *Radiother Oncol.* 2013;106(3):390-6.
23. Gerashchenko BI, Howell RW. Cell proximity is a prerequisite for the proliferative response of bystander cells co-cultured with cells irradiated with gamma-rays. *Cytometry A.* 2003;56A(2):71-80.
24. Gerashchenko BI, Yamagata A, Oofusa K, Yoshizato K, de Toledo SM, Howell RW. Proteome analysis of proliferative response of bystander cells adjacent to cells exposed to ionizing radiation. *Proteomics.* 2007;7(12):2000-8.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Герашченко Богдан Іванович – кандидат біол. наук, старший науковий співробітник (посада), ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Салміна Крістін – PhD (біол.), дослідник, Латвійський науково-навчальний центр біомедицини, м. Рига, Латвія

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Bogdan I. Gerashchenko – PhD (Biology), Senior Researcher, R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine

Kristine Salmina – PhD (Biology), Researcher, Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia

Крігерц Йекабс – бакалавр (інженерна справа), лаборант, Латвійський науково-навчальний центр біомедицини, м. Рига, Латвія

Еренпрейса Йекатерина – габілітований доктор наук медицини, провідний дослідник, академік Латвійської академії наук, Латвійський науково-навчальний центр біомедицини (м. Рига)

Бабський Андрій Мирославович – доктор біол. наук, завідувач кафедри біофізики та біоінформатики, професор, Львівський національний університет ім. Івана Франка

Jekabs Krigerts – Bc. Ing., Laboratory Assistant, Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia

Jekaterina Erenpreisa – Dr. habil. med., Leading Researcher, Academician of the Latvian Academy of Sciences, Latvian Biomedical Research and Study Centre (Riga)

Andriy M. Babsky – Dr. Sci. (Biology), Head of the Department of Biophysics and Bioinformatics, Professor, Ivan Franko National University of Lviv

Стаття надійшла до редакції 30.01.2019

Received: 30.01.2019