

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.05

РЕЗИСТЕНТНЫЕ К ДЕЙСТВИЮ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ МНОГОЯДЕРНЫЕ КЛЕТКИ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИНИЯХ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

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

¹ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. акад. А. М. Гранова, Санкт-Петербург, 197758;

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

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

* электронный адрес: mpsamoylovich@gmail.com

Глиобластомы отличаются неоднородностью новообразований, возникающих у разных пациентов, а также высокой гетерогенностью клеточного состава каждой опухоли. В работе исследовано действие фотонного облучения в разных режимах и дозах на клетки двух новых (T2 и R1) и двух давно изучаемых (T98G и A172) линий глиобластом. В отличие от глиобластом A172 и R1, в которых при относительно невысоких дозах облучения все клетки погибали, в клетках T98G и T2 после более высоких доз облучения выживала популяция резистентных клеток. Она была представлена одноядерными и многоядерными непролиферирующими клетками крупного размера, которые сохраняли жизнеспособность более 1 мес. Клетки характеризовались многократным по сравнению с исходной популяцией усилением экспрессии генов ростовых и проангиогенных факторов, генов ряда белков внеклеточного матрикса и генов белков, связанных с мезенхимным фенотипом. Профиль активности исследованных генов в популяциях переживающих клеток T98G и T2 после облучения оказался идентичным профилю экспрессии тех же генов после действия другого генотоксического фактора — фотемустина. Таким образом, резистентные к действию генотоксических факторов переживающие клетки характеризуются высокой активностью генов тех белков, которые могут влиять как на сами опухолевые клетки, так и на их микроокружение.

Ключевые слова: глиобластома, A172, T98G, R1, T2, облучение, фотемустин, переживающие клетки, многоядерные клетки, резистентные клетки, мезенхимные маркеры, гены ростовых факторов, гены белков экстраклеточного матрикса, генотоксические факторы

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что общепринятые средства лечения онкологических заболеваний, такие как химио- и лучевая терапия, могут способствовать возникновению резистентных клонов опухолевых клеток, во многом определяющих прогрессию заболевания. Изучение этого аспекта действия терапевтических агентов необходимо для оптимизации уже существующих протоколов лечения, а также поиска новых подходов в лечении онкологических заболеваний.

Большинство опухолей человека характеризуется определенным уровнем клеточной гетерогенности. Гетерогенность (плеоморфизм) представляет собой вариабельность морфологических и функциональных характеристик, которая затрагивает фенотипические, генетические и эпигенетические признаки опухолевых клеток (Herppner, 1984; Visvader, 2011; Marusyk et al., 2012). В последние годы внимание исследователей было привлечено к

одной из субпопуляций, входящих в состав опухолевых тканей и клеточных линий, а именно к гигантским многоядерным клеткам. Частота их встречаемости в зависимости от локализации опухоли и фазы заболевания составляет от 0.1 до 20 % (Herppner, 1984; Hope, Bhatia, 2011). Долгое время считалось, что гигантские клетки, несущие признаки клеточного старения и утратившие способность пролиферировать, элиминируются из популяции с помощью апоптоза или других механизмов клеточной гибели (Kawano et al., 1995). Однако в работах последних лет появились убедительные доказательства того, что не все подобные клетки погибают. После длительного периода покоя некоторые из них вновь приобретают способность делиться, а образующиеся при этом дочерние клетки проявляют свойства, присущие стволовым клеткам (Weihua et al., 2011; Zhang et al., 2014; Kaur et al., 2015; Mirzayans et al., 2017). В дальнейшем эти клетки могут принимать участие в процессах метастазирования, реци-

дивирования, а также в формировании лекарственной устойчивости и радиорезистентности опухолей. Накопленные факты определили интерес к изучению свойств и судьбы гигантских многоядерных клеток.

Формированию гигантских многоядерных клеток опухоли способствует действие различных генотоксических факторов. Было показано, что воздействие на линии глиобластом T98G и T2 высоких доз фотемустина, химиотерапевтического препарата из группы производных нитрозомочевины, сопровождается доминированием в популяции многоядерных непролиферирующих клеток, сохраняющих жизнеспособность в течение длительного времени (Киселева и др., 2018). Эти клетки обладали рядом свойств, которые указывали на возможность их участия в прогрессии опухоли.

В настоящей работе представлены результаты изучения действия фотонного излучения на клетки четырех линий глиобластом человека — A172, T98G, R1 и T2. Исследовано влияние облучения в различных режимах на пролиферацию клеточных популяций, на присутствие в них резистентных к облучению клеток, а также изменение экспрессии генов ростовых факторов, генов, ассоциированных с мезенхимным фенотипом, и генов белков внеклеточного матрикса. Проведено сопоставление действия облучения и фотемустина на клетки четырех линий глиобластом человека.

Материал и методика

Клеточные линии. Клетки A172 и T98G были получены из коллекции клеточных культур Научно-исследовательского института гриппа Министерства здравоохранения РФ (Санкт-Петербург). Клеточные линии R1 и T2 были выделены из операционного материала пациентов в Лаборатории клеточной биологии Петербургского института ядерной физики (Гатчина, Ленинградская обл.) и к началу исследований прошли 23 и 29 пассажей соответственно (Киселева и др., 2017). Клетки линий глиобластом культивировали в ростовой среде, содержащей α -MEM, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), глутамин и гентамицин. Клетки культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в воздушной среде. Пересев клеток проводили, используя раствор из смеси трипсина и версена.

Облучение клеток. Культуры клеток глиобластом подвергали действию фотонного пучка на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment System™ (Elekta, Швеция) с энергией излучения 6 МэВ, мощность дозы составляла 460 сГр/мин. Клетки, предназначенные для облучения, выращивали до состояния 70%-ного конфлюэнтного монослоя в невентилируемых флаконах площадью 25 см² (NUNC, Дания). При проведении облучения флаконы с клетками помещали в углубление парафинового рассеивателя с толщиной стенок 1.2 см и располагали по отношению к источнику излучения таким образом, чтобы на пути фотонов не было границы воздуха и жидкости, которая могла бы приводить к значительным дозиметрическим погрешностям. При выборе дозы однократного облучения руководствовались опубликованными данными (Sato et al., 1997; Sasaki et al., 2013). При определении режимов и суммарной дозы фракционированного облучения клеток ориентировались на схемы радиотерапии пациентов. Клетки облучали однократно в дозе 10 Гр или фракционированно по 2 Гр/сут в течение 5 сут, затем после 2-суточного перерыва продолжали облучение до до-

стижения суммарной дозы 36 или 50 Гр или по 5 Гр/сут до достижения суммарной дозы 60 Гр. Для оценки повторного действия облучения клетки глиобластом A172 и T98G после однократного облучения в дозе 10 Гр доращивали до 70%-ного конфлюэнтного монослоя, пересевали и вновь облучали в дозе 20 Гр. В клеточных культурах первую замену ростовой среды проводили через 1 ч после очередного сеанса облучения, затем 2/3 среды заменяли каждые 2—3 сут.

Морфологические исследования. Живые клетки наблюдали и фотографировали, используя инвертированный микроскоп со встроенной камерой Prima Vert (Carl Zeiss, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали после окраски 4%-ным раствором трипанового синего. Для морфологического анализа клетки фиксировали ледяным этанолом, окрашивали по Май-Грюнвальду—Гимзе и фотографировали, используя инвертированный микроскоп с цифровой камерой (Nikon, Япония).

Исследование активности генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в популяциях однократно облученных клеток проводили после пересева и восстановления клетками 70%-ного конфлюэнтного монослоя. Двукратно облученные, а также облученные во фракционированном режиме клетки, сохраняющие пролиферативную активность, тоже исследовали на 1-м пассаже после облучения. Из непролиферирующих клеток, облученных во фракционированном режиме, мРНК выделяли через 30—40 сут после последнего сеанса облучения.

Этапы анализа и последовательности использованных 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. Для сравнения уровней экспрессии генов в клетках до и после облучения использовали метод относительного количественного определения экспрессии гена (метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Величина $2^{-\Delta\Delta C_t}$ представляет собой кратность разницы между экспрессией гена в облученных и интактных клетках (Livak, Schmittgen, 2001).

Использованные реактивы: среда α -MEM, глутамин, гентамицин, раствор трипсина—версена, трипановый синий, фосфатно-солевой буферный раствор без Ca²⁺ и Mg²⁺ (БиолоТ, Россия); набор красителей Май-Грюнвальда—Гимза (Bio-Optica, Италия); ЭТС Nuclon (Thermo Scientific, США).

Статистическая обработка. Исследования были выполнены в 3—6 повторностях. Для статистической обработки данных использовали программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. Для проверки достоверности различий применяли U-критерий Манна—Уитни.

Результаты

Однократное облучение культур клеток глиобластом A172, R1, T98G и T2 в дозе 10 Гр вызывало их морфологические изменения. В культурах A172 и R1 на 3—7-е сут после воздействия наряду с гибелью части клеток выявляли немногочисленные многоядерные клетки. В течение 2-й нед после воздействия клетки возобновляли деление. В клетках линий T98G и T2 после облучения в дозе 10 Гр

Действие облучения на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом

| Линия | Суммарная доза облучения с указанием разовой (в скобках), Гр | | | | |
|-------|--|--------|--------------|--------------|------------------------|
| | 10 | 36 (2) | 50 (2) | 60 (5) | (10 + 20) ^а |
| A172 | 15 | 18 | Все погибают | Все погибают | Все погибают |
| R1 | 22 | 26 | То же | НО | НО |
| T98G | 8 | НО | 13 | ПЖК | ПЖК |
| T2 | 26 | ПЖК | ПЖК | НО | НО |

Примечание. Указано время (сут) от момента окончания облучения до достижения культурой состояния 70%-ного конфлюэнта. ^а Клетки после первого облучения (10 Гр) растили до 70%-ного конфлюэнта, пересевали и по достижении 70%-ного конфлюэнта облучали повторно (20 Гр). ПЖК — непролиферирующие переживающие клетки, НО — не определяли.

наряду с клонами некрупных пролиферирующих клеток отмечали увеличение числа крупных одноядерных и многоядерных клеток. Ранее было показано, что интактные клетки всех этих линий имеют одинаково высокую пролиферативную активность (Киселева и др., 2016, 2017). Время, необходимое облученным клеткам для достижения 70%-ного конфлюэнта, различалось для отдельных линий. После облучения в дозе 10 Гр это время составляло 8 сут для клеток T98G и 26 сут для клеток T2, а для клеток A172 и R1 — 15 и 22 сут соответственно (см. таблицу). Таким образом, однократное облучение глиобластом в дозе 10 Гр не отменяло пролиферацию клеток, но увеличивало полиморфизм клеточных популяций.

В популяциях клеток глиобластом, подвергнутых облучению, а также в интактных клетках всех четырех линий оценивали экспрессию генов ростовых факторов (*TGFβ1*, *VEGF*, *FGF(b)*, *EGF*, *HGF*), генов, характерных для клеток мезенхимных линий (*FAP* и *αSMA*), генов белков внеклеточного матрикса (тенасцина C — *TNC* и тромбоспондина 1 — *THBS1*) и гена транскрипционного фактора *Zeb1*.

В клетках линий A172 и R1, восстановившихся после однократного облучения в дозе 10 Гр, активность большинства исследованных генов была в пределах значений, характерных для интактных клеток. Исключение составляли экспрессия гена *HGF*, достоверно сниженная в облученных клетках R1, и активность гена *αSMA*, возросшая в клетках A172 (рис. 1, а). В клетках T98G и T2, облученных однократно в дозе 10 Гр, экспрессия большинства генов проявляла тенденцию к увеличению. В обеих клеточных линиях была достоверно усилена активность генов *FAP* и *Zeb1*, в клетках T2 возрастала экспрессия генов *VEGF* и *TNC* (рис. 1, б).

Фракционированное облучение клеток глиобластом в дозе 36 Гр не предотвращало полностью пролиферацию клеток линий A172 и R1 и наряду с массовой гибелью клеток сопровождалось появлением большого числа крупных одноядерных клеток, а также клеток, имеющих 2 ядра и более (рис. 2, б, в). Восстановление клеточного моноклона до 70%-ного конфлюэнта в этих культурах происходило медленнее, чем после однократного облучения в дозе 10 Гр. Увеличение дозы фракционированного облучения до 50 Гр вызывало гибель всех клеток в культурах глиобластом A172 и R1 в течение 10—14 сут (см. таблицу).

Фракционированное облучение клеток A172 и R1 в суммарной дозе 36 Гр приводило к снижению активности гена *TNC* в обеих клеточных линиях и генов *TGFβ1* и *HGF* в клетках T2. Экспрессия *αSMA* в клетках A172

была повышена. Активность других исследованных генов оставалась в пределах, характерных для интактных клеток. Таким образом, тенденции изменения активности генов, отмеченные после облучения в дозе 10 Гр, усилились при фракционированном облучении в дозе 36 Гр (рис. 1, в).

Линии глиобластом T98G и T2 были более устойчивы к действию облучения. Клеточная популяция T98G после облучения в суммарной дозе 50 Гр представляла собой сочетание клонов пролиферирующих клеток с непролиферирующими крупными одноядерными и многоядерными клетками (рис. 2, е). Нарастание клеток до 70%-ного конфлюэнта после облучения в дозе 50 Гр происходило дольше, чем после однократного облучения в дозе 10 Гр (см. таблицу). После облучения в дозе 60 Гр в клеточной культуре наступало прекращение пролиферации и сохранялись только непролиферирующие переживающие клетки (рис. 2, ж).

В клетках T98G, облученных фракционированно в суммарной дозе 50 Гр, активность всех генов, кроме *αSMA* и *TGFβ1*, была увеличена по сравнению с интактными клетками (рис. 1, г). Клетки T2 при достижении дозы 36 Гр прекращали пролиферацию, однако гибель культуры не наступала, так как значительная часть популяции сохранялась в виде непролиферирующих переживающих крупных одноядерных и многоядерных клеток (рис. 2, и). При увеличении суммарной дозы до 50 Гр эта клеточная популяция не погибала и сохраняла жизнеспособность более 36—40 сут (срок наблюдений). В клетках линии T2 после окончания облучения в дозе 50 Гр уровень экспрессии генов *VEGF*, *FGF(b)*, *EGF*, *FAP*, *TNC* и *Zeb* был увеличен ($P \leq 0.05$; рис. 1, з).

Действие двукратного облучения исследовали на клетках линий T98G и T2. Клетки, которые сохранили способность к пролиферации после первого облучения в дозе 10 Гр, дорастивали до 70%-ного конфлюэнта, пересевали в новый флакон и по достижении 70%-ного конфлюэнта облучали повторно в дозе 20 Гр. Повторное облучение клеток полностью блокировало клеточную пролиферацию, в культурах оставались только непролиферирующие переживающие клетки. Они были представлены одноядерными и многоядерными клетками, которые отличались крупными размерами и сохраняли жизнеспособность более 1 мес (срок наблюдения). Спустя 30 сут после повторного облучения в культурах клеток T98G активность всех исследованных генов была усилена, при этом максимальная активация (в десятки и сотни раз) была отмечена для генов *HGF*, *FAP* и *TNC* (рис. 1, д).

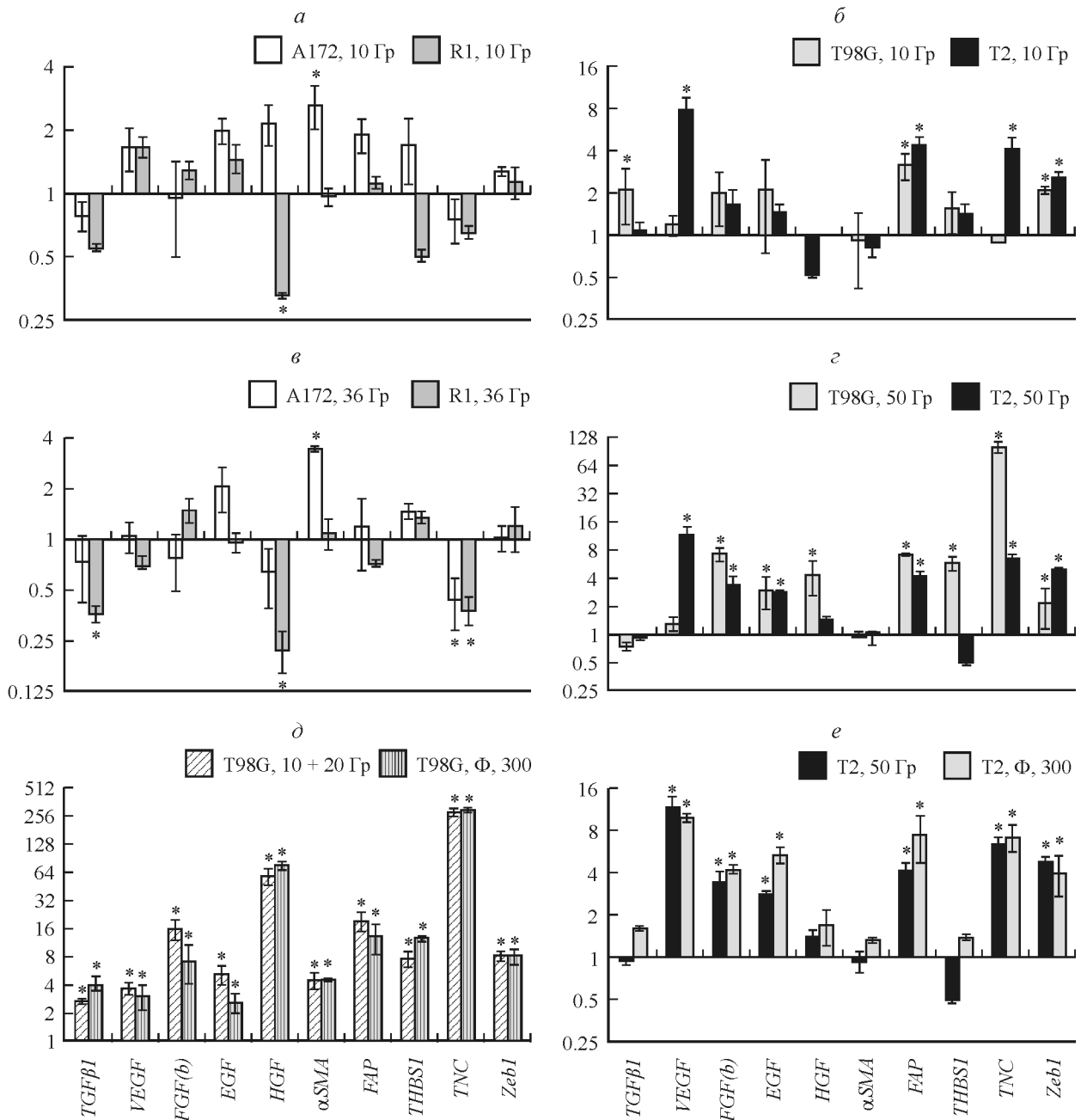


Рис. 1. Изменение экспрессии генов в клетках линий глиобластом человека A172 (а, в), R1 (а, в), T98G (б, г, д) и T2 (б, г, е) после однократного облучения в дозе 10 Гр (а, б), после фракционированного облучения в суммарной дозе 36 (в) и 50 (г, е) Гр, после двукратного облучения в дозах 10 и 20 (10 + 20) Гр (д) и после однократного воздействия фотемустина (Ф) в дозе 300 мкг/мл (д, е).

По горизонтали — исследуемые гены; по вертикали — кратность разницы между экспрессией гена в облученных и интактных клетках (величина $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Экспрессия генов в интактных клетках принята за 1; звездочка показывает достоверность различия при $P \leq 0.05$ (критерий Манна—Уитни); вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

Обсуждение

Проведенное ранее сравнение четырех культивируемых линий глиобластом человека (A172, R1, T98G и T2) показало, что по ряду признаков, таких как наличие нейрональных маркеров CD133/2 и CD56, уровень экспрессии генов *HGF* и *FAP*, реакция на действие алкилирующего препарата фотемустина, клетки линии T98G имели сходство с клетками T2, а линия A172 — с клетками R1 (Киселева и др., 2016, 2017, 2018). В настоящей работе

было установлено, что линии T98G и T2 отличались от глиобластом A172 и R1 также по реакции на действие другого генотоксического фактора — ионизирующего излучения. В отличие от культур A172 и R1, в которых при относительно невысоких дозах облучения все клетки погибали, в культурах T98G и T2 после более высоких доз облучения оставалась популяция непродлиферирующих резистентных клеток.

Эта популяция, обозначаемая как переживающая, была представлена одноядерными и многоядерными

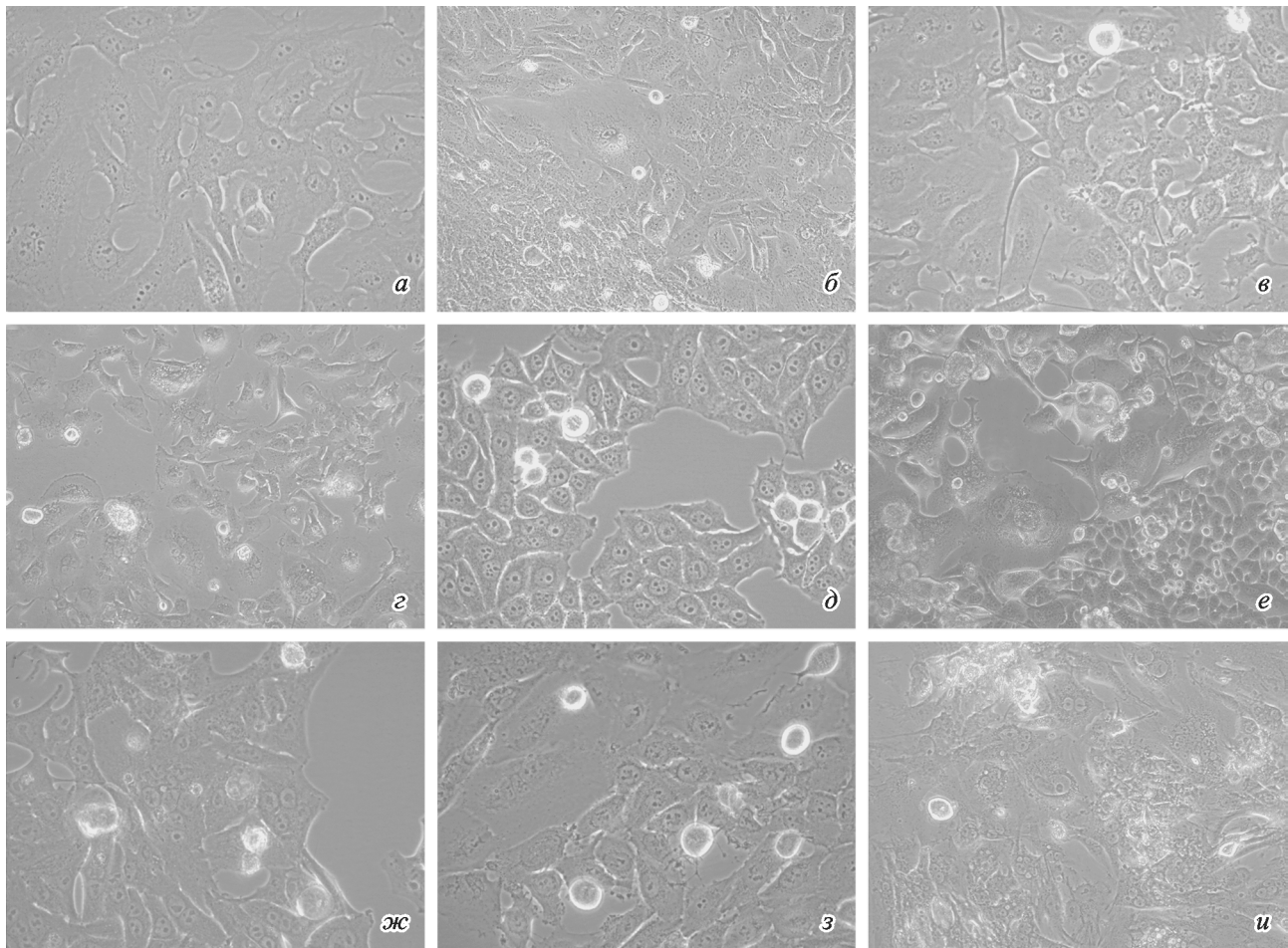


Рис. 2. Клетки линий глиобластом человека A172 (а, б), R1 (в, г), T98G (д—ж), T2 (з, и) в контроле (а, в, д, з) и после фракционированного облучения в суммарной дозе 36 (б, г, и), 50 (е) и 60 (ж, з) Гр.

Фазовый контраст, увел.: об. 20× (б, г, е), 40× (а, в, д, ж, з).

клетками крупного размера и характеризовалась многократным по сравнению с исходной популяцией усилением экспрессии ряда генов. В течение всего периода наблюдений (более 1 мес после окончания сеансов облучения) резистентные клетки оставались живыми, но не пролиферировали. Вопрос о том, могут ли эти клетки перейти в фазу пролиферации и при каких условиях, остается открытым. Существенно то, что через 1 мес после окончания облучения в переживающих клетках T98G и T2 были активированы гены проангиогенных и ростовых факторов, а также гены белков внеклеточного матрикса и гены, активация которых сопряжена с эпителио-мезенхимным переходом. В популяции переживающих клеток глиобластомы T98G экспрессия генов *HGF*, *FAP* и *TNC* возрастала в десятки и сотни раз по отношению к исходным значениям в интактных клетках. В облученных клетках T2 наибольший рост активности был отмечен для гена *VEGF*. Таким образом, переживающие клетки не пролиферировали, но активно экспрессировали гены тех белков, которые могут влиять как на сами опухолевые клетки, так и на их микроокружение.

Присутствие высокорезистентных переживающих клеток в линиях глиобластом T98G и T2 после действия алкилирующего противоопухолевого препарата фотемустина было описано ранее (Киселева и др., 2018). Профиль активности генов ростовых и проангиогенных фак-

торов, а также ряда белков внеклеточного матрикса в популяциях переживающих клеток T98G и T2 после облучения оказался практически идентичным профилю экспрессии тех же генов после действия фотемустина (рис. 1, д, е).

Резистентные многоядерные клетки, подобные тем, которые описаны в настоящей работе, привлекают особое внимание в связи с их возможной ролью в эволюции и прогрессии опухолей. Формированию таких клеток способствует действие различных стрессорных факторов, таких как гипоксия и ее миметики, радиация и химиотерапевтические препараты (Zhang et al., 2014; Kaur et al., 2015; Niu et al., 2016). Рассматривается несколько механизмов образования многоядерных клеток, в частности эндорепликация, связанная с нарушением цитокинеза, слияние одноядерных клеток и клеточный каннибализм, представляющий собой поглощение одних клеток другими (Hosaka et al., 2004; Ariizumi et al., 2009; Weihua et al., 2011; Krajcovic, Overholtzer, 2012). Гомотипическое слияние клеток — редкое явление для большинства опухолей, в глиобlastомах оно происходит с большей частотой. Облучение способно индуцировать слияние одноядерных резистентных клеток с образованием многоядерных клеток, которые могут пребывать некоторое время в латентном состоянии, а затем способны активироваться и входить в митоз (Kaur et al., 2015). Авторы цитируемой рабо-

ты подчеркивают, что многоядерные клетки образуются вследствие облучения, а не являются теми многоядерными клетками, которые встречаются в некотором количестве в интактных культурах глиобластом. Многоядерные клетки в том или ином количестве присутствовали в трех из четырех интактных линий глиобластом, использованных в настоящей работе (Киселева и др., 2016, 2017). В культурах глиобластом T98G и T2, подвергнутых фракционированному облучению в сравнительно высоких дозах, многоядерные клетки представляли основную часть популяции. Это может указывать на то, что многоядерные клетки в линиях T98G и T2 образовались в результате действия радиации (рис. 2, е—з).

Гетерогенность индивидуальных глиобластом заставляет исследователей вести поиск прогностических маркеров, которые позволят определять стратегию терапии индивидуальных опухолей. В качестве таких маркеров рассматривают следующие признаки популяций опухолевых клеток: присутствие и количество стволовых CD133⁺-клеток, мутационные варианты и активность гена опухолевого супрессора p53, уровень продукции опухолевыми клетками ростовых факторов (VEGF, HGF и др.), синтез белков внеклеточного матрикса — тенасцина и тромбоспондина — и целый ряд других. Мало шансов надеяться на использование единичных маркеров, вероятно, требуется учитывать совокупность многих признаков конкретной опухоли.

Применительно к настоящему исследованию фенотипические различия между двумя парами линий, демонстрирующих разные типы ответа на генотоксические воздействия, касались прежде всего экспрессии маркеров стволовых клеток CD133/2 и CD56, которые присутствовали на клетках A172 (3 %) и R1 (20 %) и не выявлялись на клетках T98G и T2 (Киселева и др., 2016, 2017). Присутствие этих мембранных антигенов связывают с предрасположенностью клеток к нейрональной дифференцировке. Относительно белка p53 известно, что клетки A172 имеют ген дикого типа, а клетки T98G синтезируют мутантный белок (Melendez et al., 2011). В клетках R1 и T2 белок p53 был выявлен иммуногистохимически, однако использованные антитела не позволили установить, были белки мутантными или дикого типа (Киселева и др., 2017).

Исходные линии A172 и R1 отличались от T98G и T2 более активной экспрессией генов проангиогенных факторов, ростовых факторов, генов белков внеклеточного матрикса и белков, связанных с мезенхимным фенотипом. В наибольшей степени это касалось генов *TNC*, *FAP* и *HGF*, экспрессия которых в клетках T98G и T2 была существенно ниже, чем в клетках A172 и R1. *TNC* рассматривают как один из маркеров опухолевых стволовых клеток глиобластомы (Nie et al., 2014), а белки *FAP* и *HGF* ассоциируют с прогрессией этой опухоли (Basilico et al., 2014; Busek et al., 2016). Таким образом, линии A172 и R1, изначально содержавшие в составе популяции клетки с характеристиками стволовых (CD133⁺ и CD56⁺) и имевшие более высокий уровень экспрессии генов, ассоциированных с активацией опухолевого процесса, были более чувствительны к генотоксическим факторам, чем линии T98G и T2, которые проявили устойчивость к воздействиям за счет формирования популяции переживающих клеток. При действии генотоксических факторов (фотемустина и облучения) по мере увеличения их дозы в линиях A172 и R1 регистрировали снижение активности генов ростовых факторов, генов белков матрикса и бел-

ков, связанных с мезенхимным фенотипом. В линиях T98G и T2 по мере увеличения дозы воздействий, наоборот, происходил значительный рост активности тех же генов. Этот эффект, вероятнее всего, был связан со смесью клеточных популяций, поскольку именно переживающие клетки, доля которых в линиях T98G и T2 нарастала по мере увеличения дозы воздействия, отличались высоким уровнем синтеза мРНК обозначенных белков.

Таким образом, популяции резистентных многоядерных переживающих клеток выявлялись после генотоксических воздействий в двух из четырех изученных линий глиобластом. Эти результаты подтверждают устоявшиеся представления о высоком уровне гетерогенности глиобластом и свидетельствуют о принципиально разной реакции клеточных популяций этих опухолей на действие одних и тех же генотоксических факторов.

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.)
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартамян Н. Л., Пиневиц А. А., Самойлович М. П. 2018. Действие фотемустина на клетки линий глиобластом человека. Цитология. 60 (1): 21—29. (Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Samoilovich M. P. 2018. Fotemustine effect on human glioblastoma cell lines. Cell Tissue Biol. 12 (2): 93—101.)
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартамян Н. Л., Пиневиц А. А., Филатов М. В., Самойлович М. П. 2017. Характеристика новых клеточных линий глиобластом человека. Цитология. 59 (10): 669—675. (Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Filatov M. V., Samoilovich M. P. 2017. Characterization of new human glioblastoma cell lines. Cell Tissue Biol. 12 (1): 1—6.)
- Ariizumi T., Ogose A., Kawashima H., Hotta T., Umezumi H., Endo N. 2009. Multinucleation followed by an acytokinetic cell division in myxofibrosarcoma with giant cell proliferation. J. Exp. Clin. Cancer Res. 28: 44.
- Basilico C., Hultberg A., Blanchetot C., Jonge N., Festjens E., Hanssens V., Ospera S.-I., De Boeck G., Mira A., Cazzanti M., Morrello V., Dreier T., Saunders M., Haard H., Michieli P. 2014. Four individually druggable MET hotspots mediate HGF-driven tumor progression. J. Clin. Invest. 124: 3172—3186.
- Busek P., Balaziová E., Matrasova I., Hilser M., Tomas R., Syrucek M., Ztmanova Z., Krepela E., Belacek J., Sedo A. 2016. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. Tumour Biol. 37: 13 961—13 971.
- Heppner G. H. 1984. Tumor heterogeneity. Cancer Res. 44: 2259—2265.
- Hope K., Bhatia M. 2011. Clonal interrogation of stem cells. Nat. Methods. 8: S36—S40.
- Hosaka M., Hatori M., Smith R., Kokubun S. 2004. Giant cell formation through fusion of cells derived from a human giant cell tumor of tendon sheath. J. Orthop. Sci. 9: 581—584.
- Kaur E., Rajendra J., Jadhav S., Shridhar E., Goda J. S., Moiyadi A., Dutt S. 2015. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. Carcinogenesis. 36: 685—695.
- Kawano H., Kubota T., Sato K., Goya T., Arikawa S., Wakisaka S. 1995. Immunohistochemical study of giant cell in glioblastoma. Clin. Neuropathol. 14: 118—123.
- Krajcovic M., Overholtzer M. 2012. Mechanisms of ploidy increase in human cancers: a new role for cell cannibalism. Cancer Res. 72: 1596—1601.

Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods*. 25 : 402—408.

Marusyk A., Almendro V., Polyak K. 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer*. 12 : 323—334.

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.

Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Wang Y. W., Kumar P., Murray D. 2017. Multinucleated giant cancer cells produced in response to ionizing radiation retain viability and replicate their genome. *Int. J. Mol. Sci*. 18 : 360—375.

Nie S., Gurrea M., Zhu J., Thakolwiboon S., Heth J., Muraszko K. M., Fan X., Lubman D. M. 2014. Tenascin-C: novel candidate marker for cancer stem cells in glioblastoma identified by tissue microarrays. *J. Proteome Res*. 14 : 814—822.

Niu N., Zhang J., Zhang N., Mercado-Uribe I., Tao F., Han Z., Pathak S., Multani A. S., Kuang J., Yao J., Bast R. C., Sood A. K., Hung M.-C., Liu J. 2016. Linking genomic reorganization to tumor initiation via the giant cell cycle. *Oncogenesis*. 5 : 1—12.

Sasaki A., Nakajo T., Tsunoda Y., Yamamoto G., Kobayashi Y., Tsuji M., Udaka Y., Mizutani T., Oguchi K. 2013. Gene analysis and dynamics of tumor stem cells in human glioblastoma cells after radiation. *Hum. Cell*. 26 : 73—79.

Satoh E., Naganuma H., Sasaki A., Nagasaka M., Ogata H., Nukui H. 1997. Effect of irradiation growth factor-beta secretion by malignant glioma cells. 33 : 195—200.

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

Weihua Z., Lin Q., Ramoth A. J., Fan D., Fidler I. J. 2011. Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell. *Cancer*. 117 : 4092—4099.

Zhang S., Mercado-Uribe I., Xing Z., Sun B., Kuang J., Liu J. 2014. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploidy giant cells. *Oncogene*. 33 : 116—128.

Поступила 26 IV 2018

MULTINUCLEAR CELLS RESISTENT TO GENOTOXIC FACTORS IN CULTURED HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINES

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

¹ Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies named after A. M. Granov, St. Petersburg, 197758,

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

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

* e-mail: mpsamoylovich@gmail.ru

Glioblastomas are characterized by significant differences of neoplasms occurring in individual patients, as well as high heterogeneity of cell content within each tumor. The influence of photonic irradiation applied in different modes and doses on the cells of two new glioblastoma cell lines (T2 and R1) and long-studied lines of glioblastoma (T98G and A172) was investigated. In contrast to A172 and R1 cultures, in which all the cells died after exposure to relatively low radiation doses, in T98G and T2 lines a radioresistant cell population survived after higher doses of irradiation. This population was represented by large single or multinuclear non-proliferating growth-arrested cells. These cells remained viable for more than a month and in comparison with the intact cells were characterized by a multiple increase in the expression of genes encoding growth and proangiogenic factors, some extracellular matrix proteins as well as proteins connected with mesenchymal phenotype. The pattern of gene activity of growth-arrested irradiated T98G and T2 cells turned to be identical to gene pattern of the same cells treated with another genotoxic factor — fotemustine. Consequently, growth-arrested resistant cells in T98G and T2 glioblastomas actively expressed genes encoding the proteins that could affect both the tumor cells and their microenvironment.

Key words: glioblastoma, A172, T98G, R1, T2, irradiation, fotemustine, growth-arrested cells, multinuclear cells, resistant cells, mesenchymal markers, growth factor genes, extracellular matrix protein genes, genotoxic factors