

# Pôvodný článok

## "Nádorové liečebné polia" prostredníctvom elektromagnetickej indukcie majú rôzne účinky cez bunkové línie gliómov a amplitúdy elektrického poľa

Rea Ravin<sup>1</sup>, Teddy X Cai<sup>1</sup>, Aiguo<sup>Li4</sup>, Nicole<sup>Briceno4</sup>, Randall H<sup>Pursley5</sup>, Marcia<sup>Garmendia-Cedillos7</sup>, Tom<sup>Pohida5</sup>, Herui<sup>Wang4</sup>, Zhengping<sup>Zhuang4</sup>, Jing<sup>Cui4</sup>, Nicole Y<sup>Morgan6</sup>, Nathan H<sup>Williamson1</sup>, Mark R<sup>Gilbert4</sup>, Peter J<sup>Basser1</sup>

<sup>1</sup>Section on Quantitative Imaging and Tissue Sciences, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, NIH, Bethesda, Maryland, USA; <sup>2</sup>Deloptics, Inc, Rockville, Maryland, USA; <sup>3</sup>The Wellcome Centre for Integrative Neuroimaging, FMRIB, Nuffield Department of Clinical Neurosciences, Oxford University, Oxfordshire, UK; <sup>4</sup>Neuro-Oncology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland, USA; <sup>5</sup>Instrumentation Development and Engineering Applications Section, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, NIH, Bethesda, Maryland, USA; <sup>6</sup>Trans-NIH Shared Resources on Biomedical Engineering and Physical Sciences, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, NIH, Bethesda, Maryland, USA

Prijaté 30. júna 2023; schválené 15. októbra 2023; Epub 15. februára 2024; publikované 28. februára 2024

**Abstrakt:** Predchádzajúce štúdie uvádzajú, že striedavé elektrické polia (EF) v režime strednej frekvencie (100-300 kHz) a nízkej intenzity (1-3 V/cm) - označované ako "Tumor Treating Fields" (TTFields) - majú špecifický antiproliferačný účinok na bunky multiformného glioblastómu (GBM). Mechanizmus(y) účinku však stále nie je(sú) úplne objasnený(é), čo bráni klinickému prijatiu liečby založenej na TTFields. S cieľom pokročiť v štúdiu takejto liečby *in vitro* sme vyvinuli indukčné zariadenie na dodávanie EF do bunkových kultúr, ktoré v porovnaní s predchádzajúcimi zariadeniami zlepšuje tepelnú a osmolárnu reguláciu. Pomocou tohto indukčného zariadenia sme aplikovali kontinuálne elektromagnetické polia (EMP) s frekvenciou 200 kHz s radiálnym profilom amplitúdy EF s rozpätím 0-6,5 V/cm na kultúry primárnych potkaních astrocytov a niekoľko ľudských bunkových línií GBM - U87, U118, GSC827 a GSC923 - počas 72 hodín. Hustota buniek sa hodnotila prostredníctvom segmentovaných hustôt pixelov z expresie GFP (U87, U118) alebo z farbenia (astrocyty, GSC827). Ďalšie analýzy RNA-Seq sa vykonali na bunkách GSC827 a GSC923. Ošetrované kultúry všetkých bunkových línií vykazovali pri nižších amplitúdach EF (0 - 3 V/cm) len malú alebo žiadnu zmenu v proliferácii. Pri vyšších amplitúdach (> 4 V/cm) sa pozorovali odlišné účinky. Zjavná hustota buniek sa zvýšila (U87), znížila (GSC827, GSC923) alebo vykazovala len malé zmeny (U118, astrocyty). Analýzy RNA-Seq na ošetrovaných a neošetrovaných bunkách GSC827 a GSC923 odhalili rozdielne exprimované súbory zaujímavých génov, napríklad tie, ktoré súvisia s kontrolou bunkového cyklu. Zvýšená a znížená regulácia však nebola konzistentná naprieč bunkovými líniami ani amplitúdami EF. Naše výsledky nenaznačujú žiadny konzistentný, antiproliferačný účinok EMF s frekvenciou 200 kHz naprieč bunkovými líniami GBM a sú tak v rozpore s predchádzajúcimi zisteniami *in vitro*. Účinky sa skôr líšili v rôznych bunkových líniách a režimoch amplitúdy EF, čo zdôrazňuje potrebu posúdiť účinok(-y) TTFields a podobných ošetrovaní na základe jednotlivých bunkových línií.

**Kľúčové slová:** Glioblastoma multiforme (GBM), striedavé elektrické polia, nádorové liečivé polia, elektromagnetická indukcia, génová expresia

### Úvod

Multiformný glioblastóm (GBM) je najčastejší a najsmrteľnejší primárny nádor mozgu dospelých. Napriek multimodálnemu liečebnému plánu je medián prežitia pacientov len 14-16 mesiacov od stanovenia

diagnózy - malé percento pacientov preživa päť a viac rokov [1-3].

Kirson *a kol.* [4] uviedli, že elektrické polia strednej frekvencie (100-300 kHz) s nízkou intenzitou (1-3 V/cm) - označované ako "Tumor Treating Fields" (TTFields) - majú antiproliferačný účinok, ktorý inhibuje rýchlosť rastu GBM buniek v kultúre, pričom nemajú žiadny výrazný účinok na nedeliace sa bunky. Tento inhibičný účinok bol zaznamenaný v závislosti od frekvencie s

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

vrchol pri 200 kHz pre bunky GBM. Účinok závisel aj od amplitúdy elektrického poľa (EF); pri vyšších amplitúdach EF ( $> 1$  V/cm) sa u niektorých gliómových bunkových línií pozorovala viac ako 50 % inhibícia rýchlosti rastu [4, 5]. V následných štúdiách sa zistilo, že TTFpole má za následok de- kreáciu nádorov u zvierat a ľudí [4 - 6] a metastatické šírenie [7]. Pod vplyvom TTFields sa pozorovala aj abnormálna mitotická morfológia buniek vrátane krvácania s následnou apoptózou [8, 9].

Spoločnosť Novocure Ltd. odvtedy tieto predklinické výsledky premietla do praxe. Systém Optune™ (predtým NovoTTF-100A) bol vyvinutý na aplikáciu TTFields *in vivo*. Systém pozostáva zo sústavy elektród pripevnených na oholenú pokožku hlavy pacienta. V roku 2011 bol systém Optune™ schválený americkým Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) na liečbu recidívy GBM na základe klinickej štúdie fázy III (NCT00379470), v ktorej sa porovnávali TTFields s chemoterapiou podľa výberu lekára [10]. V roku 2015 bol systém Optune™ s adjuvantným temozolomidom (TMZ) schválený na liečbu novodiagnostikovaného GBM po chirurgickom zákroku a rádioterapii na základe štúdie (NCT00916409), v ktorej sa porovnávali TTFields v kombinácii s TMZ so samotným TMZ [11].

### *TTFields nemajú jasný mechanizmus účinku*

Napriek pokračujúcemu klinickému, predklinickému a teoretickému výskumu zostáva mechanizmus (mechanizmy) účinku TTFields neúplne preskúmaný. Výpočtové modely predpokladajú, že útlm EF v bunkách závisí od frekvencie [12 - 14]. Pri nižších frekvenciách sú EF "tíenené" (t. j. brzdené elektrickým odporom a kapacitnou reaktanciou) a nepreniknú cez bunkovú membránu, zatiaľ čo v strednom frekvenčnom rozsahu (100 - 500 kHz) môžu EF v rôznych fázach bunkového cyklu preniknúť s pomerne malým amplitúdovým útlmom [13]. V dôsledku toho môžu mať polia TTF v zásade priamy biofyzikálny účinok (účinky) na vnútro buniek GBM. Kirson a kol. iniciatívne [4] navrhli dva účinky, ktoré považovali za špecificky antimitotické: (1) TTFields môžu ovplyvniť dipólové usporiadanie nabitých molekúl, konkrétne

tubulínu a septínových dimérov, a (2) TTFields môžu mať za následok nerovnomerné EF (t. j. gradienty EF) v štiepnej brázde deliacej sa bunky. Prvý mechanizmus by narušil mitotické

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

tvorbu vretienka a pravdepodobne aj lokalizáciu septínového komplexu na anafázovej stredovej čiare vretienka. Druhý mechanizmus by počas cytokinézy vytváral významné dielektroforetické sily (DEP), ktoré by mohli viesť k agregácii polarizovateľných makromolekúl smerom k štiepnej brázde a od nej, čo by narušilo proces štiepenia.

Nedávne výpočtové a teoretické analýzy Tuszyńského *a kol.* [12] a Liho *a kol.* [15] však naznačujú, že klinicky relevantné zosilnenia EF (1 - 3 V/cm) vytvárajú elektrostatické sily, ktoré sú príliš malé na to, aby významne ovplyvnili rotačnú dynamiku tubulínu alebo septínu, t. j. tieto sily sú oveľa menšie ako tepelná energia uvedených dimérov, čo spochybňuje prvý navrhovaný mechanizmus. Pokiaľ ide o druhý mechanizmus, tieto modely [12, 13] predpovedajú, že TFields môžu vytvárať významné DEP sily, čo poskytuje teoretický dôkaz pre rušivý pohyb polarizovateľných makromolekúl počas cytokinézy. Li *et al.* [15] však predpokladajú, že tento pohyb by bol príliš pomalý v porovnaní s trvaním telofázy na to, aby ovplyvnil delenie buniek. TFields môžu tiež spôsobiť biofyzikálne účinky nad rámec tých, ktoré navrhli Kirson *a kol.* [4], vrátane, ale nielen: šírenia iónových vln pozdĺž a okolo mikrotubulárnych vlákien [12], zmien vo vodivosti iónových kanálikov [16], zmien membránového potenciálu [15], zvýšenej permeability membrán [17] a Joulovho ohrevu cytoplazmy a/alebo kultivačného prostredia [18].

Narastajúci počet prác poukazuje na špecifické biomolekulárne dráhy v mechanizme (mechanizmoch) účinku TFields (pozri prehľad [19]). Napríklad sa zistilo, že TFields aplikované *in vitro* vedú k oneskorenej oprave poškodenia DNA prostredníctvom downregulácie BRCA [20], k dvojvláknovému zlomu DNA [21] a k zvýšeniu autofágie prostredníctvom downregulácie signálnej dráhy fosfoinozítid 3-kináza/Akt/jadrový faktor  $\kappa$ B [22]. Medzi ďalšie zaznamenané účinky patrí zvýšená imunogénna smrť buniek [7] a znížená migrácia a invázia buniek [23, 24]. Tieto dráhy môžu pôsobiť za vyššie uvedenými biofyzikálnymi účinkami alebo spolu s nimi. TFields môžu mať aj synergický účinok s adjuvantnou chemoterapiou. Túto hypotézu

podporuje klinické zistenie, že TFields sú najúčinnnejšie v kombinácii s TMZ [11, 24].  
TFields

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

môže zvýšiť účinok TMZ tým, že naruší rezistenciu buniek GBM na viaceré lieky, čo je čiastočne spôsobené nadmernou expresiou transportérov ABC (ATP-Binding Cassette), ABCG2 a ABCB1 [25]. V nedávnej práci sa hodnotili aj zmeny expresie v celom genóme v dôsledku TTFields, pričom sa okrem iného zaznamenali účinky na gény súvisiace s bunkovým cyklom a bunkovou smrťou [26, 27]. Hoci v pozorovaných účinkoch polí TTFields môže zohrávať úlohu mnoho mechanizmov, žiadny z nich nebol jednoznačne preukázaný *in vivo*.

V komunite neuroonkológov prebieha diskusia o účinnosti TTFields a Optune™. Od roku 2019 zostáva miera prijatia približne 30 % (t. j. 30 % vhodných pacientov s GBM dostáva TTFields tam, kde je k dispozícii) [19]. Toto pomalé prijímanie môže byť okrem iných faktorov spôsobené nedostatkom jasného mechanizmu účinku, o ktorom sa diskutuje vyššie, a/alebo absenciou fiktívnej kontrolnej skupiny v otvorených klinických štúdiách (podrobnejší klinický pohľad pozri Wick [28]). S cieľom pomôcť vyriešiť túto diskusiu spoločnosť Novocure Ltd. sprístupnila výskumníkom svoj testovací systém *in vitro* s názvom Inovitro™. Odvtedy boli publikované nezávislé štúdie využívajúce systém Inovitro™ na skúmanie rôznych mechanizmov účinku (napr. [21, 29]). Ako zásadný doplnok k týmto štúdiám sme sa snažili preskúmať účinky stredne častých elektrických polí (EF) s nízkou amplitúdou na ľudské bunkové línie GBM pomocou úplne odlišnej metódy aplikácie EF.

### *Prepracovanie experimentov in vitro TTFields*

Systém Inovitro™, ktorý je podrobne opísaný v práci Porat *et al.* [30], nie je bez metodických problémov. Systém pozostáva z dvoch párov ortogonálne orientovaných, kapacitne prepojených elektród pripevnených na misky s bunkovými kultúrami. Tieto elektródy sú izolované keramikou a pripojené ku generátoru funkcií a zesilňovaču. Striedavé EF sa generujú s periodickým prepínaním medzi dvojicami elektród [5, 30], aby sa maximalizovala účinnosť akýchkoľvek efektov závislých od orientácie, ako sú napríklad sily DEP počas cytokinézy.

Hlavným úskalím systému Inovitro™ je tvorba tepla. Značné množstvo tepla vzniká

prostredníctvom kontaktných elektród a Joulovým ohrevom (elektricky) vodivých

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

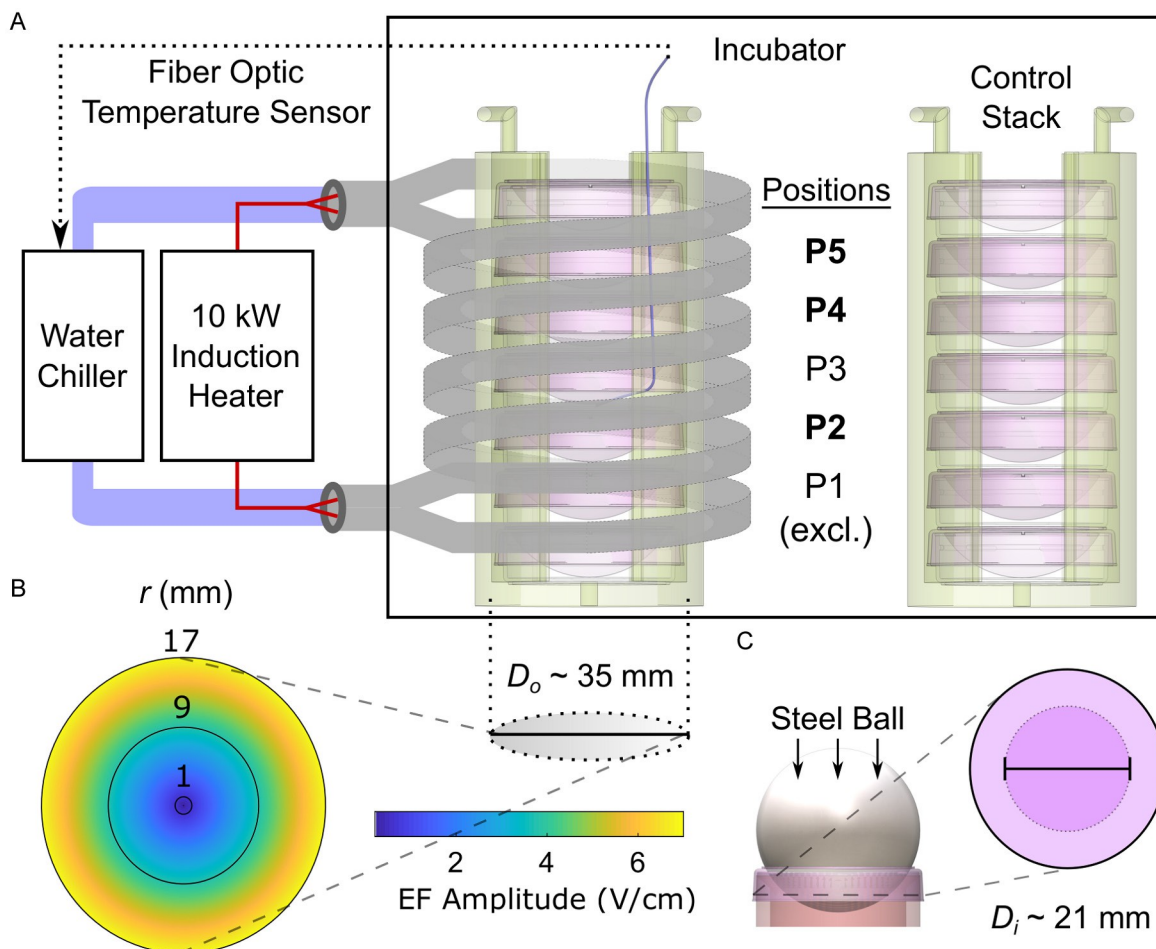
kultivačné médium. Na udržanie fyziologickej teploty 37 °C v kultivačnom médiu navrhujú vývojári systému Inovitro™, aby sa používal v inkubátore s teplotou 18 °C. Okrem toho je systém navrhnutý tak, aby sa dal prerušovane vypínať [30]. Použitie chladiaceho prostredia prináša ďalšie výzvy. Chladnejší a suchší vzduch obklopujúci teplé kultivačné médium môže urýchliť odparovanie v dôsledku zvýšeného gradientu tlaku pary. V dôsledku toho môže byť osmolárna regulácia ohrozená počas dlhšieho časového obdobia.

Pri vývoji nášho zariadenia na aplikáciu EF sme zohľadnili príslušné konštrukčné obmedzenia systému Inovitro™. Aby sme zmiernili ťažkosti spojené s tvorbou tepla, rozhodli sme sa použiť indukčný, a teda bezkontaktný spôsob podávania EF. Týmto spôsobom sa eliminuje vodivé teplo. Podrobné informácie o nastavení sú uvedené v práci Ravin, Cai *et al* [31]. V skratke, elektromagnetické polia (EMP) s požadovanou frekvenciou (200 kHz) boli generované vo vzduchovej solenoidovej cievke pripojenej k priemyselnému indukčnému ohrievaču a umiestnenej v inkubátore (pozri Metódy, obrázok 1A). Vzniká indukovaný obvodový EF pro- file s amplitúdou, ktorá lineárne narastá od stredu cievky (obrázok 1B). Radiálne narastajúci profil EF v každej kultivačnej miske nám umožňuje vykonať experiment "titrácie dávky" EF, pričom každá miska má jadro s malým alebo žiadnym EF, ktoré slúži ako vnútorná kontrola. Akékoľvek zmätky medzi miskami, ako napríklad rozdiely v osmolárnych podmienkach, nemôžu prispieť k rozdielom pozorovaným v rámci tej istej misky, a preto sme sa im vyhli. Vytvára sa aj malé, vertikálne (alebo osovo) striedavé magnetické pole. Problémom však zostáva Joulovo ohrevanie kultivačného média.

Na riešenie Joulovho ohrevu sa cievka aktívne ochladzovala pod teplotu inkubátora, čím sa vytvárali čisté konvekčné tepelné straty, ktoré sa dajú nastaviť tak, aby sa vyvážil Joulov ohrev kultivačného média a udržiavala sa ustálená teplota. Pritom sa EMP môže aplikovať nepretržite bez ovplyvnenia teploty kultivačného média. Boli tiež prijaté opatrenia na zlepšenie osmolárnej regulácie (pozri Metódy, obrázok 1C).

Tento experimentálny testovací systém nám umožňuje vyhodnotiť výsledky, ktoré uvádzajú Kirson *et al*. [4], ako aj rozšíriť rozsah "dávky" EF alebo amplitúdy

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok 1. Schéma experimentálnej aparatury a metód. A. Zostava na aplikáciu EMP s frekvenciou 200 kHz. Cievka (vnútorný priemer = 5 cm, výška = 8 cm, 3 závit, dvojito zabalená) bola pripojená k indukčnému ohrievaču a obalená vodným plášťom. Voda cirkulovala pomocou chladiacej slučky. Cievka bola potom upevnená v inkubátore. Do cievky sa umiestnili rukávy so siedmimi na sebe uloženými miskami, z ktorých päť bolo umiestnených v cievke vo vertikálnych polohách označených P1-P5. P1 bola vylúčená z dôvodu pozorovanej variability teploty. Teplota sa monitorovala pomocou optického snímača v strede misky P3; preto bola vylúčená aj miska P3. Samostatný kontrolný zásobník bol umiestnený mimo cievky. B. Nameraný profil amplitúdy EF. Vonkajší priemer,  $D_o = 35$  mm je prekrytý. C. Schéma tvarovania veka proces, ktorý sa používa na zmenšenie exponovanej plochy. Viečka boli tvarované tak, aby sa dotýkali vnútorného priemeru približne  $D_i = 21$  mm.

nad rámec tých, ktoré sa používali predtým. V tejto práci uvádzame výsledky 72-hodinovej nepretržitej aplikácie EMP s frekvenciou 200 kHz v rozsahu 0-6,5 V/cm na rôzne bunkové línie. Podľa našich vedomostí uvádzame prvé výsledky striedavej stimulácie EF v rozsahu nad 5 V/cm. Skúmali sme dve ľudské bunkové línie GBM použité v predchádzajúcich štúdiách: U87 a U118 a dve nedávno validované kmeňové bunkové línie GBM: GSC827, GSC923 [32]. Ako príklad normálnych buniek centrálného nervového systému sa študovali aj primárne astrocyty potkanov. Hustota segmentovaných pixelov sa hodnotila prostredníctvom expresie GFP v

prípade U87 a U118 a prostredníctvom bunkových

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

Farbenie zelenou farbou CMFDA a Hoechstom 33342 pre GSC827, GSC923 a astrocyty potkanov ako proximálne meranie hustoty buniek. Časový priebeh intenzity farbenia CellTracker a Hoechst v bunkách GSC827 a GSC923 sa hodnotil s cieľom zistiť, či liečba ovplyvňuje aktivitu púmp, ktoré odstraňujú CellTracker a Hoechst, konkrétne ABC transportérov (aktivita ABC transportérov sa považuje za zdroj rezistencie na viaceré lieky v GBM [25]). Nakoniec sa analýzy RNA-Seq vykonali na bunkách GSC827 a GSC923 odobratých z rôznych radiálnych oblastí misiek - zodpovedajúcich



## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

na rôzne amplitúdy EF - na posúdenie účinkov na expresiu génov po liečbe.

Materiály a metódy

### *Bunkové kultúry*

Bunky U87 a U118 exprimovali GFP, zatiaľ čo bunky GSC827, GSC923 a astrocyty potkanov nie. Pre všetky kultúry sa 3 ml bunkovej suspenzie umiestnili do 35 mm kultivačných misiek (Corning, Falcon). Pre U87, U118, GSC827, GSC923 a potkaních astrocytov bola hustota nanosenia buniek na misku  $1,0 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $7,5 \times 10^4$ ,  $7,5 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^5$ . Počet opakovaní bolo 21, 24, 18, 12 a 15 v rovnakom poradí.

Bunky U87 a U118 (ATCC, Glioma Tumor Cell Panel TCP-1018™) sa uchovávali v 75 ml bankách s kultivačným médiom DMEM doplneným 10 % FBS, 1 % penicilínom a streptomycínom (Gibco; Thermo Fisher Scientific). Bunky sa pasážovali dvakrát týždenne a bunkové kultúry sa udržiavali v inkubátore s 5 % CO<sub>2</sub> pri 37 °C. Pred každým experimentom sa GBM bunky označené GFP oddelili z kultivačnej nádoby pomocou Accutase™ (Sigma) a znovu sa suspendovali v médiu. Na podporu prichytenia buniek sa bunky umiestnili na misky potiahnuté poly-D-lyzínom (0,05 mg/ml) (Sigma).

Na objasnenie účinkov EMP indukovaných frekvenciou 200 kHz na transkriptomické profily mozgových nádorov sme vykonali RNA-Seq na kultúrach bunkových línií GSC827 a GSC923, ktoré pochádzajú z neuroonkologického oddelenia [32], a nie z tradičných modelových bunkových línií; GSC827 pochádza od 60-ročného mužského pacienta s GBM a GSC923 od 56-ročnej pacientky s GBM. Tieto bunkové línie lepšie reprezentujú heterogenitu, ktorá sa môže vyskytovať u pacientov s GBM. Bunky GSC827 a GSC923 sa pestovali v suspenzii v 75 ml bankách s médiom NBE zloženým z média DMEM/F-12 doplneného 10 ml P/S, 5 ml L-glutamínu, 5 ml rastového doplnku N2, 10 ml rastového doplnku B27, EGF (25 ng/ml) a bFGF (25 ng/ml). Bunky sa pasážovali raz týždenne, pričom sa vytvorené guľôčky disociovali pomocou Accutase™. Medzi jednotlivými pasážami sa

médium raz vymenilo. Bunky sa rozmiestnili na misky potiahnuté Matrigelom (0,4 mg/ml, 356234 Corning), opäť na podporu prichytenia.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

Astrocyty boli izolované z kôry postnatálnych potkanov medzi 1. a 3. dňom po narodení. Astrocyty boli kultivované v DMEM + 10 % FBS pri 10 %  $CO_2$ . Po 7 dňoch rastu sa banky cez noc pretrepali, aby sa znížila kontaminácia progenitorovými bunkami oligodendrocytov a mikrogliami. Keď kultúry dosiahli 75 % konfluenciu (približne 3 týždne), bunky boli odstránené pomocou Accutase™ a následne zmrazené. Pred experimentmi sa bunky rozmrazili a rozmiestnili do 75 ml banky s DMEM. Pri 75 % konfluencii boli bunky odstránené pomocou Accutase™ a rozmiestnené na misky potiahnuté Poly-D-Lyzínom.

### *Kontinuálne dodávanie EMP s frekvenciou 200 kHz do bunkových kultúr*

Testovací systém, schematicky znázornený na obrázku 1, je podrobne opísaný v publikácii Ravin, Cai *et al.* [31]. V skratke, systém bol napájaný priemyselným indukčným ohrievačom s výkonom 10 kW (DP-10-400, RDO Induction LLC, Washington NJ) založený na konštrukcii rezonančného LC obvodu. Indukčné zariadenie bolo pripojené k dvojitej medenej cievke so vzduchovým jadrom. Cievka bola opláštená a pripojená k vodnému chladiču (Durachill©, PolyScience), ktorý odoberá teplo a tým reguluje teplotu cievky (obrázok 1A). Cievka bola upevnená vo vnútri inkubátora s 5 %  $CO_2$  (MCO-18M Multigas Incubator, SANYO Electric Co. Ltd., Osaka, Japonsko) cez plexisklové okienko. Plastové obaly na misky na bunkové kultúry boli vytlačené 3-D tlačou vo vlastnej réžii. V každom puzdre sa nachádzalo sedem 35 mm misiek vo vertikálnom stohu. Horné a dolné tanierové okraje boli naplnené iba médiom; stredných päť tanierov obsahovalo bunkové kultúry a ich pozície boli označené P1-P5 (obrázok 1A).

Cievka bola aktívne chladená vodou na teplotu približne 22 °C, ktorá sa dala regulovať, aby sa odvádzalo teplo generované Joulovým ohrevom prostredníctvom ustálenej konvekcie a udržiavala sa tak konštantná fyziologická teplota v kultivačnom médiu. Experimentálna teplota sa merala nepretržite pomocou optického snímača teploty umiestneného v strede misky na P3 v rámci cievky, ktorá obsahovala len kultivačné

médium (obrázok 1A). Táto teplota sa diaľkovo monitorovala, kontrolovala a zaznamenávala. Počas všetkých experimentov sa udržiavali stabilné teplotné podmienky (37 °C ± 0,5 °C). Podobné teploty sa udržiavali na všetkých miskách v polohách P2-P5, ale nie v P1, kde sa namerala teplota o niekoľko °C nižšia [31]. Misky v polohe P1 boli vylúčené

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

zo všetkých analýz. Pri každom 72-hodinovom experimente boli vytvorené tri experimentálne opakovania párových porovnaní misiek na pozíciách: P2, P4, P5.

odstránili. Každý pár misiek

Očakávaný profil EF generovaný v cievke indukčným zariadením možno vypočítať zo základných princípov elektriny a magnetizmu. Vo vnútri cievky sa amplitúda indukovanej EF lineárne zvyšuje od nuly v strede taniera/cievky,  $r = 0$ , po maximum pri  $r = R$ , vonkajšom polomere taniera. Zatiaľ čo amplitúda EF sa priestorovo mení v radiálnom smere, v azimutálnom alebo obvodovom smere sa mení. Pri využívanom výkone 3,19 kW sme namerali maximálnu amplitúdu EF 6-7 V/cm pk-pk na obvode paraboly, znázornenú na obrázku 1B. Tento profil EF sa experimentálne meral pomocou drôtených slučiek [31] a získala sa lineárna zhoda pre amplitúdu EF,  $|E|$ , ako funkciu  $r$  (pozri obrázok 1B).

$$|E(r \leq R)| \approx 4,42 r \text{ [V/cm]}. \quad (1)$$

Kontrolné puzdro bolo umiestnené v tom istom inku- bátore ďaleko od cievky a mimo jej vertikálnej osi (pozri obrázok 1 v publikácii [31]), aby sa zabránilo šíreniu alebo rozptylu EMP.

Počas experimentov sa nevykonávali žiadne zmeny médií. Na zmiernenie strát médií sa pomer objemu média k jeho povrchu znížil dvomi spôsobmi: (1) zvýšením objemu média v miske z bežných 2 ml na 3 ml a (2) zmenou tvaru veka všetkých misiek tak, aby sa zakryla časť odkrytej plochy povrchu a aby sa kondenzát presmeroval späť do média (obrázok 1C). Tvarovanie sa uskutočnilo zahriatím viečok pomocou teplovzdušnej pištole a ich následným tvarovaním pomocou oceľovej guľôčky. Dosiahlo sa zmenšenie povrchu o  $\approx 36\%$ . Pri týchto úpravách sa nameril nárast osmolarity v priebehu 72 hodín o 17 % a 6,5 % z počiatočnej osmolarity 314 milimol v upravených a kontrolných kondíciách [31].

### *Konfokálne zobrazovanie a farbenie*

Radiálne sa meniaci amplitúda EF znemožňuje použitie konvenčných metód zdvíhania a počítania buniek, pretože tieto metódy vylučujú kritické priestorové informácie. Namiesto toho boli celé misky zobrazené *in situ* spojením políčok. Na konci experimentov sa misky z puzdier úplne

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

(kontrolné, ošetrované) sa zobrazovali striedavo. Otáčavá orientácia každej misky bola zachovaná pomocou značiek výrobcu, t. j. všetky misky mali indexovacie značky a boli umiestnené tak, aby smerovali rovnakým smerom v inkubátore a na zobrazovacom stupni.

Misky boli pripevnené na stolík laserového skenovacieho konfokálneho mikroskopu Zeiss LSM 780. Na zobrazovanie sa použil prístroj EC Plan-NeoFluor 5 ×, Použilo sa 0,16 N.A. V kultúrach U87 a U118 sa zobrazil GFP. V prípade kultúr GSC827, GSC923 a potkaních astrocytov sa pred zobrazovaním odstránilo médium NBE a pridalo sa 1 ml média NBE s CellTracker Green CMFDA (C7025, Thermo Fisher) v koncentrácii 2,5 μM alebo s Hoechstom 33342 v koncentrácii 3 μg/ml. Pre GFP aj CellTracker sa použil laser s vlnovou dĺžkou 488 nm, rozdeľovač lúča 488/562 nm a filtre s vlnovou dĺžkou 500-555 nm. Pre Hoechst 33342 sa použila vlnová dĺžka exci- tácie 405 nm a zárezový reflektor 405 nm. Pre všetky snímky sa zošlo spolu 484 oblastí záujmu s 5 % prekrytím. Konečná veľkosť obrazu bola 10 726 × 10 726 pixelov (px). Pri zobrazovaní sa dbalo na to, aby sa nepoužívali nasycujúce parametre; parametre sa počas všetkých experimentov udržiavali konštantné. Na posúdenie schopnosti buniek GSC827 a GSC923 vyčerpáť CellTracker a Hoechst sa po niektorých experimentoch vykonali prídavné zobrazovacie štúdie na zadržanie CellTrackera aj Hoechstu. Bunky sa po prvom zobrazovaní dvakrát premyli 1 ml média NBE a potom sa umiestnili späť do inkubátora na 2 hodiny (bez ošetrovania). Po uplynutí 2 hodín sa misky opäť zobrazovali s rovnakým protokolom a parametrami zobrazovania.

### *Spracovanie obrazu*

Cieľom spracovania obrazu bolo kvantifikovať hustotu segmentov v px ako funkciu radiálnej vzdialenosti. Každý obraz bol najprv rozdelený (t. j. binovaný) na 25 rovnako dlhých prstencov alebo pásov. Kvôli prispôbeniam, ktoré zakrývajú spodnú časť misky, bola do analýzy zahrnutá len horná časť pásma od 18. pásma (pozri obrázok S1, kde je ukázkový obrázok celej misky). Z dôvodu deformácií na okraji misky boli vyradené aj 23. - 25. pásmo. Obrázky

boli najprv kontrastne vylepšené pomocou metódy morfolologickej transformácie, pri ktorej sa

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

"horný klobúk" sa pridá a "spodný klobúk" sa z obrazu vyradí. Na tento krok sa použil štruktúrny prvok v tvare disku s polomerom 3 px. Obrázky sa potom denoizovali pomocou Wienerovho filtra  $3 \times 3$ .

sa pridali 3 ml DMEM/F-12 na zastavenie

Následne sa vykonala segmentácia podľa jednotlivých pásiem v dvoch krokoch: binarizácia a otvorenie (obrázok 2C). Prahové hodnoty pre binarizáciu obrazu sa vybrali na základe jednotlivých pásiem pomocou Otsuovej metódy. Pre všetky typy buniek okrem U87 sa vypočítal jeden prah. Pre U87 sa vypočítali dva prahy a použil sa nižší z nich kvôli prítomnosti jasnejších buniek vykazujúcich vysokú expresiu GFP. Po binarizácii sa vykonal krok otvorenia s polomerom 6 px. Nakoniec sa pre každý pás vypočítal pomer px popredia a pozadia ako približná miera hustoty buniek. Px v popredí sa použili ako maska na neskorší výpočet intenzity px v jednotlivých pásmach na posúdenie aktivity čerpania. Všetko spracovanie obrazu sa vykonalo pomocou programu MATLAB 2019a (Natick, MA). Pozri Metódy v ref. [31], kde sú uvedené ďalšie podrobnosti a reprezentačný kód. Analýzy obrazov sa vykonávali párovým spôsobom, t. j. medzi každou dvojicou kontrolných a ošetrovaných kultúr v rovnakej polohe cievky (P2, P4, P5). Hustoty Px sa normalizovali na (t. j. vydělili) priemernú hustotu Px každej kontrolnej misky vo všetkých zahrnutých pásmach pred spojením výsledkov v pároch na ďalšie štatistické analýzy.

Na overenie zhody medzi denzitou px a počtom experimentálnych buniek boli vykonané ďalšie kontrolné experimenty na bunkách U87. V týchto experimentoch sa použil rozsah hustoty platničiek a bunky sa po zobrazení zdvihli a spočítali. Pozoroval sa lineárny vzťah medzi počtom experimentálnych buniek a celkovou (t. j. bez binningu) segregovanou hustotou px (obrázok S2). Takto stanovená segmentovaná hustota px teda slúži ako robustný ukazovateľ hustoty buniek (pozri aj obrázok 6 v ref. [31]).

### *Extrakcia RNA*

Analýzy RNA-Seq sa vykonali na bunkách GSC827 a GSC923 z 3 experimentov (N = 9). Na konci týchto experimentov sa médium nahradilo 1 ml Accutase™ na sedem minút, kým sa bunky nezačali zaokrúhľovať. Potom

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

bunky pred odletom. Pomocou 200 µl pipety sa bunky ručne zbierali z 3 oblastí v každej miske: (1) z polomeru 4 mm okolo stredu misky a potom z 3 mm pásov centrovanych v radiálnej vzdialenosti (2) 8,5 mm a (3) 15,5 mm od stredu misky. Tieto oblasti sú opäť označené ako ošetrovaný stred (TC), ošetrovaný stred (TM), resp. ošetrované okolie (TS) a podobne aj pre kontrolné kultúry (CC, CM, CS). Oblasti boli udržiavané v konzistentnom stave pomocou sledovaného diagramu.

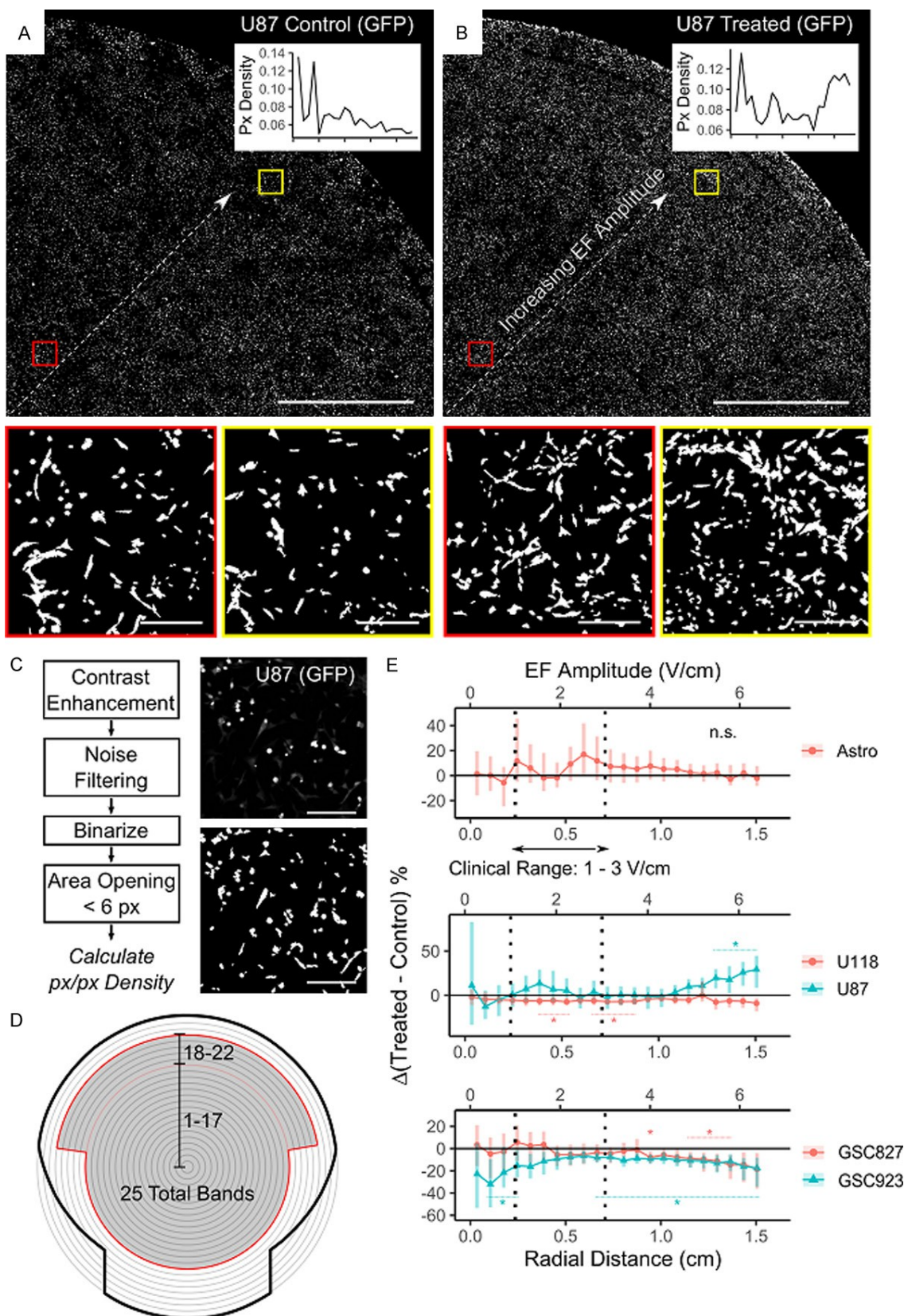
Bunky sa rozpustili, znovu sa suspendujú v DMEM/F-12 a uchovávajú sa na ľade. Vzorky sa centrifugovali pri 800 × g počas 5 minút pri 18 °C. Médium sa odsalo a bunkový pelet sa znovu suspendoval v 350 µl RLT pufru (Qiagen RNeasy Mini Kit, č. 74104). Extrakcia bola automatizovaná pomocou QIAcube nastavenej na protokol RNA-RNeasy mini s trávením DNaseI a 35 µl DEPC vodnej elúcie. Množstvo RNA sa meralo pomocou súpravy Qubit RNA so širokým rozsahom (Thermo Fisher, č. Q10211) s použitím 1 µl vzorky. Kvalita sa určila spustením 1 µl vzorky na BioAnalyzer RNA Nano chip (Agilent, č. 5067-1511) pre RIN. Transkriptomická knižnica sa pripravila pomocou súpravy Illumina TrueSeq stranded mRNA library Prep podľa pokynov výrobcu. Knižnica bola sekvenovaná na platforme Illumina NovaSeq SP s použitím 150 bp párových čítaní, ktoré vykonali výskumné zariadenia NCI pre pokročilé technológie.

### *Analýza RNA-seq a identifikácia odlišne exprimovaných génov*

Čítania špecifické pre jednotlivé vlákna RNA-seq sa analyzovali pomocou programu CCBP Pipeliner ([github.com/CCBR/Pipeliner](https://github.com/CCBR/Pipeliner)). Táto pipeline vykonáva niekoľko úloh: kontrolu kvality pred zarovnaním čítaní, úpravu sekvenčných čítaní, zarovnanie s ľudským genómom, kontrolu kvality po zarovnaní čítaní, kvantifikáciu znakov a identifikáciu diferencielne exprimovaných génov (DEG). Vo fáze kontroly kvality sa nezávisle hodnotila kvalita sekvenovania každej vzorky pomocou nástrojov FastQC, Preseq, Picard, RSeQC, SAMtools a QualiMap. Vzorky mali 44 až 55 miliónov čítaní, ktoré prešli filtrom, s viac ako 92 % bázami nad skóre kvality Q30. Sekvenčné čítania, ktoré

prešli prahovými hodnotami kontroly kvality, boli orezané na sekvenovanie adaptérov.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok 2. Zhrnutie výsledkov segmentovanej hustoty px. (A) Vzorový obrázok pravého horného kvadrantu kontrolnej misky U87 po všetkých krokoch spracovania obrazu (mierka = 5 mm). Vložený graf znázorňuje vypočítané hustoty px z

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

pásma 1-22 (pozri D). Sú zobrazené zväčšené škvry v blízkosti stredu a okraja (mierka = 0,25 mm). (B) Zodpovedajúca ošetrená miska. Všimnite si rastúci trend hustoty px s amplitúdou EF. (C) Kroky spracovania obrazu. Vpravo je porovnaný vzorový surový obraz pre bunky U87 (hore) s konečným binarizovaným obrazom (dole). (D) Schéma diskretizácie misky na 25 rovnakých prstencových pásov. Zahnutá oblasť je zatienená. (E) Agregované výsledky. Rozdiel medzi normalizovanými hustotami px pre rôzne bunkové línie je vykreslený ako funkcia radiálnej vzdialenosti (spodná os) aj amplitúdy EF (horná os) s použitím rovnice (1) na konverziu osí. Chybové úsečky = 90 % intervaly spoľahlivosti z bootstrapovaných párových rozdielov s 1000 opakovanými vzorkovaniami. Na zistenie významných zmien v rozdieloch liečených a kontrolných hodnôt sa vykonali aj jednovýberové Wilcoxonove testy podpísaných hodnôt v jednotlivých pásmach (\* =  $P < 0,05$ ). Počet opakovaní bol  $N = 15, 24, 21, 12, 18$  pre, v poradí podľa legendy, astrocyty potkanov (Astro), U118, U87, GSC827 a GSC923. Všimnite si, že v menších skupinách sa očakáva menší počet buniek, a teda vyššia variabilita.

s použitím algoritmu Cutadapt s referenčným genómom (Human - hg38). Transkripty boli anotované a kvantifikované pomocou programu STAR. DEG sa určili pomocou metód EdgeR, DESeq2 a limma/voom. DEG sme de- rivovali pomocou prahových hodnôt  $P \leq 0,05$  a záhybových zmien  $\geq 1,3$  alebo  $\leq -1,3$  vo všetkých troch metódach porovnávaním a kontrastovaním oblastí TS vs. TC, TM vs. TC a TS vs. TM. Keďže počet DEG bol malý, na funkčnú analýzu sa použili aj DEG odvodené z EdgeR s použitím rovnakých prahových hodnôt. DEG sme odvodili aj kontrastovaním oblastí TS vs. CS, TM vs. CM a TC vs. CC s použitím rovnakých prahov ako pri ostatných kontrastoch. Gény vykazujúce úroveň expresie, ktoré korelovali s oblasťou amplitúdy EF (t. j.  $TC < TM < TS$  alebo  $TC > TM > TS$ ), boli identifikované pomocou Pearsonovej korelácie s prahom  $P < 0,05$  a korelačným koeficientom  $r > 0,45$ .

Vykonalí sme GSEA porovnaním TS vs. TC, TM vs. TC, TS vs. TM, TS vs. CS, TM vs. CM a

### *Analýza ciest a sietí*

Analýza ciest a sietí bola vykonaná pomocou Ingenuity Pathway Analysis (IPA; qiagenbioinformatics.com) a Cytoscape (cytoscape.org). Do IPA bolo nahraných viac ako 2 000 DEG a pre každý kontrast sa vykonala analýza jadra s použitím génov s reguláciou smerom nahor aj nadol. Výstupy z kanonických dráh, upstream analýzy, dis-eáz a funkcií a analýzy regulátorov boli skontrolované s cieľom objasniť potenciálne základné molekulárne funkcie. Okrem toho sa na ďalšie rozšírenie chápania biologickej funkcie použilo prekrývanie dráh a sieťová analýza. Na funkčnú analýzu v programe Cytoscape bola sieť GBM stiahnutá z databázy STRING a gény korelované s oblasťou amplitúdy EF boli prekryté na vytvorenie príslušných sietí.

### *Analýza obohatenia génových súborov (GSEA)*



## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

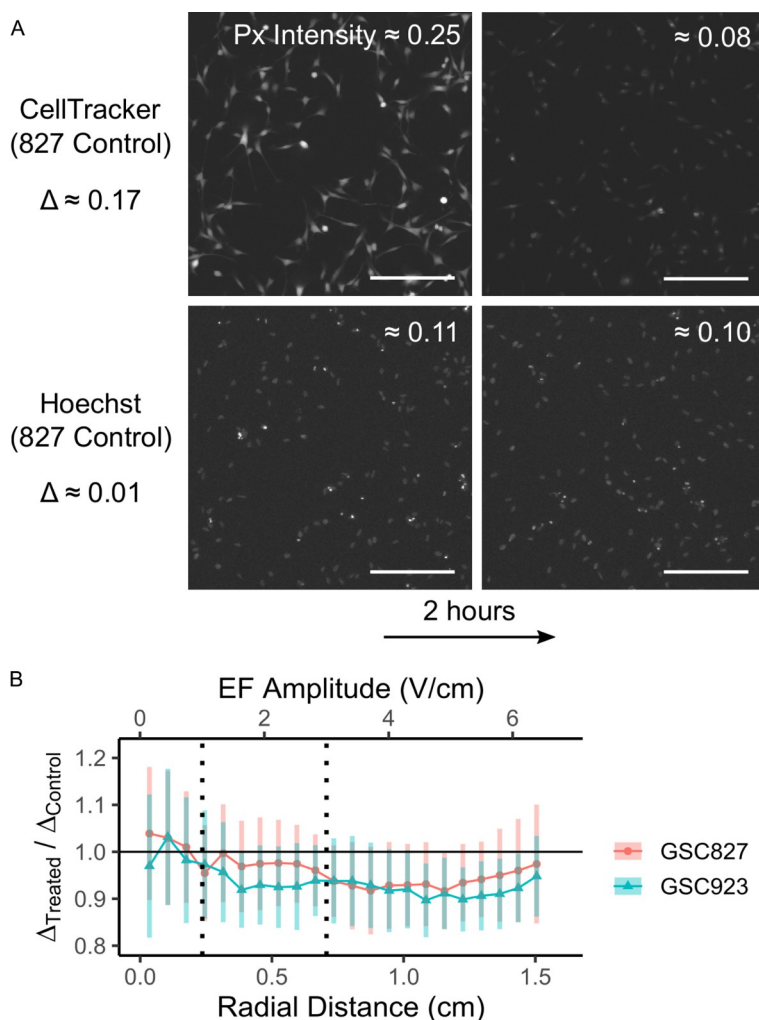
TC vs. CC.  
(<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Analýza GSEA sa vykonala pomocou desktopovej aplikácie JavaGSEA (GSEA ver. 4.1). Pri filtrovaní databáz GSEA boli vylúčené kurátorské súbory génov MSigDB C2 a C5, ktoré mali menej ako 10 génov alebo viac ako 500 génov. P-hodnoty sa vypočítali 1000-násobným permutovaním vzoriek na identifikáciu obohatených súborov génov. Nominálna P-hodnota menšia ako 0,05 a normalizované skóre obohatenia (ES) väčšie ako 1,4 z výstupov GSEA sa použilo ako prah na určenie súborov génov s vyššou alebo nižšou reguláciou pre každé porovnanie alebo kontrast. Na zhlukovanie a sumarizáciu výstupov GSEA sa použil program R (ver. 4.0.5).

### Výsledky

#### *Ošetrovanie indukovanými EMP s frekvenciou 200 kHz má rôzny vplyv na rýchlosť rastu rôznych bunkových línií*

Výsledky sú znázornené ako percentuálny rozdiel medzi konečnou liečenou a kontrolnou hustotou pixelov, vyjadrený ako funkcia radiálneho pásma alebo ekvivalentne ako amplitúda EF (obrázok 1B). Príklad dvojice kontrolných a ošetrovaných kultúr U87 je zobrazený na obrázkoch 2A, 2B po všetkých krokoch spracovania obrazu. Zobrazené obrázky poskytujú príklad zvýšenia hustoty buniek v závislosti od radiálneho pásma v ošetrovanej miske U87, najmä pri amplitúdach EF presahujúcich 4 V/cm. Podrobnosti o krokoch spracovania a segmentácie obrazu sú uvedené v časti Metódy (obrázok 2C, 2D). Zistilo sa, že účinky pri rôznych amplitúdach EF sa pre rôzne bunkové línie líšia (obrázok 2E). Potkanie astrocyty a bunky U118 vykazujú malé alebo žiadne zmeny pri akejkoľvek amplitúde EF, hoci U118 vykazuje malý (< 5 %) rozdiel v celom rozsahu, ktorý je v niektorých pásmach významný; bunky GSC827 a GSC923 vykazujú pokles približne o 10 - 20 %, ale len pri väčších amplitúdach EF (4 - 6 V/cm); a bunky U87 vykazujú nárast až o 30 % pri väčších amplitúdach EF. Výsledky farbenia Hoechstom (U118, GSC827, GSC923, astrocyty) boli podobné s

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok 3. Výsledky pre čerpacie aktivity. A. Príkladové snímky z oblasti blízko stredu kontrolnej misky GSC827 (mierka = 0,25 mm). Všetky snímky sú zobrazené s plochým, normalizovaným zvýšením jasnosti o 0,15 na uľahčenie vizualizácie. Všimnite si, že pokles intenzity segmentovaného px,  $\Delta$ , je oveľa väčší pre CellTracker ako pre Hoechst. B. Pomer nameraného poklesu intenzity CellTrackera za 2 hodiny,  $\Delta$ , pre ošetrované a kontrolné podmienky v GSC827 a GSC923. N = 12, 18 pre GSC827 a GSC923. Error bars = 90 % intervaly spoľahlivosti z bootstrapovaných párových rozdielov s 1000 opakovanými vzorkovaniami.

s výnimkou GSC827, ktorý nevykazoval žiadnu zmenu v hustote segmentovaných px pri meraní pomocou farbenia Hoechstom. Tieto výsledky sú uvedené v dodatku ([obrázok S3](#)).

Všimnite si, že výsledky pre astrocyty, bunky

bol zistený relatívne nízky počet mŕtvych buniek, čo naznačuje, že bunková smrť nebola faktorom prispievajúcim k zaznamenaným účinkom (pozri [obrázok S4](#) pre protokol a vzorové výsledky farbenia PI). Pri niektorých experimentoch s bunkami U118 a potkaních astrocytov sa vykonalo dodatočné farbenie pomocou anexínu V, ktorý sa spája s apoptotickými bunkami. V kultúrach astrocytov potkanov sa našlo len málo apoptotických buniek. Niektoré apoptotické bunky sa našli v kultúrach U118 (< 0,5 % px/px alebo približne 3 % hustoty segmentovaných px z GFP), ale nezistil sa žiadny rozdiel medzi ošetrovanými a kontrolnými kultúrami (pozri [obrázok S5](#) pre protokol a výsledky farbenia Annexinom V).

*V bunkách GSC827 a GSC923 je zjavná pumpovacia aktivita po ošetrovaní len mierne znížená*

Na vyhodnotenie vplyvu EMP indukovaného frekvenciou 200 kHz na aktivitu čerpadiel sa v kultúrach GSC827 a GSC923 skúmal časový priebeh intenzity farbenia CellTracker a Hoechst. CellTracker je čerpaný transportérmi ABCG1/ABCG2 a slabou transportérom ABCB1 [33]. Hoechst je pumpovaný ABCG2 a ABCB1 [33].

GSC827 a GSC923 predstavujú reakciu len živých buniek, pretože CellTracker sa zachytáva len živými bunkami. Pri niektorých experimentoch s bunkami U87 a U118 sa dodatočné farbenie uskutočnilo propidiumjodidom (PI), farbivom, ktoré prepúšťa len mŕtve bunky. Vo všetkých takýchto experimentoch,

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

Zníženie intenzity px po 2 hodinách sa hodnotilo pre kultúry GSC827 a GSC923 s použitím px v popredí pre každé meranie, ako je uvedené na obrázku 2, ako masky. Vo všetkých kultivačných miskách sa pozorovalo veľké zníženie intenzity ( $\approx 75\%$ ,  $\sim 0,15$  a.j.) pre CellTracker, ale malé alebo žiadne zníženie sa pozorovalo pre Hoechst ( $< 5\%$ ,  $\leq 0,01$  a.u.) v celej miske. Na stránke

Oblasť príkladu je znázornená na obrázku 3A. Rozdiel

ferencia intenzity CellTrackera po 2 hodinách,  $\Delta$ , bola vypočítaná pre každú misku na základe jednotlivých pásiem. Tieto hodnoty  $\Delta$  sa potom porovnali

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

medzi ošetrenými a kontrolnými miskami ako pomer:  $\Delta$ Ošetrené/ $\Delta$ Kontrola. Výsledky sú uvedené na obrázku 3B. V prípade oboch bunkových línií bola zjavná pumpovacia aktivita CellTrackera v ošetrených miskách len mierne znížená pri stredných amplitúdach EF ( $> 2$  V/cm). Zníženie intenzity pre Hoechst bolo príliš malé na to, aby sa dalo významne porovnať rovnakým spôsobom bez vylúčenia odľahlých hodnôt. Analogické výsledky pre Hoechst sú uvedené na obrázku S6; nebol pozorovaný žiadny rozdiel v zjavnej aktivite čerpania.

*Transkriptomické rozdiely medzi líniami ľudských gliómových kmeňových buniek GSC827 a GSC923 sú väčšie ako účinky liečby*

Analýzy sa vykonali na bunkách odobratých z 3 oblastí v každej kultivačnej miske: (1) blízko stredu, (2) medzi stredom a okrajom a (3) blízko okraja. Tieto oblasti sú označené ako ošetrený stred (TC), ošetrený stred (TM) a ošetrené okolie (TS), v uvedenom poradí (pozri Metódy, obrázok 4A). V celom texte sa tieto oblasti označujú ako "oblasti amplitúdy EF". Priemerná amplitúda EF ( E ) v každej oblasti je 0,85, 3,61 a 6,58 V/cm (obrázok 4A). Porovnávali sa dvojice regiónov (napr. TS vs. TC), pričom sa vytvorili rôzne párové kontrasty. Na porovnanie s kontrolnými miskami sa použilo identické rozdelenie oblastí misiek, označené ako kontrolný stred (CC), kontrolný stred (CM), resp. kontrolné okolie (CS).

Analýza hlavných komponentov (PCA) bez dohľadu ukazuje, že vzorky z týchto dvoch bunkových línií sa premietajú do dvoch oddelených skupín a že účinky liečby, ktoré sú zosúladené s bunkovými líniami, sú oveľa menšie ako vnútorné rozdiely medzi bunkovými líniami (obrázok 4B-D). Nekontrolovaná PCA indikuje, že TS je jasne oddelená od TC a TM, ale globálny rozdiel medzi TC a TM v oboch bunkových líniiach je malý (obr. 4C, 4D). Výsledky z GSEA sú zhrnuté na obrázku 4E; účinky na súbory génov osobitného záujmu, ako sú tie, ktoré súvisia s reguláciou bunkového cyklu, sú označené.

Všimnite si, že pri všetkých porovnaníach je podiel spoločne regulovaných alebo redukovaných DEG medzi GSC827 a GSC923 malý a pohybuje sa v rozmedzí 2,1 - 4,3 %

identifikovaných génov (obrázok S7A). V súlade s týmito zisteniami je nadmerná

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

lap obohatených súborov génov v kontraste TS vs. TC z databáz MSigDB C2 a C5 je slabý, pohybuje sa v rozmedzí 2,1-7,6 % (obrázok S7B). Tieto zistenia naznačujú, že tieto dve bunkové línie majú globálne odlišné profily génovej expresie a sú transkriptomicky odlišnými entitami, hoci obe sú gliómovými kmeňovými bunkovými líniami odvodenými od pacientov s GBM.

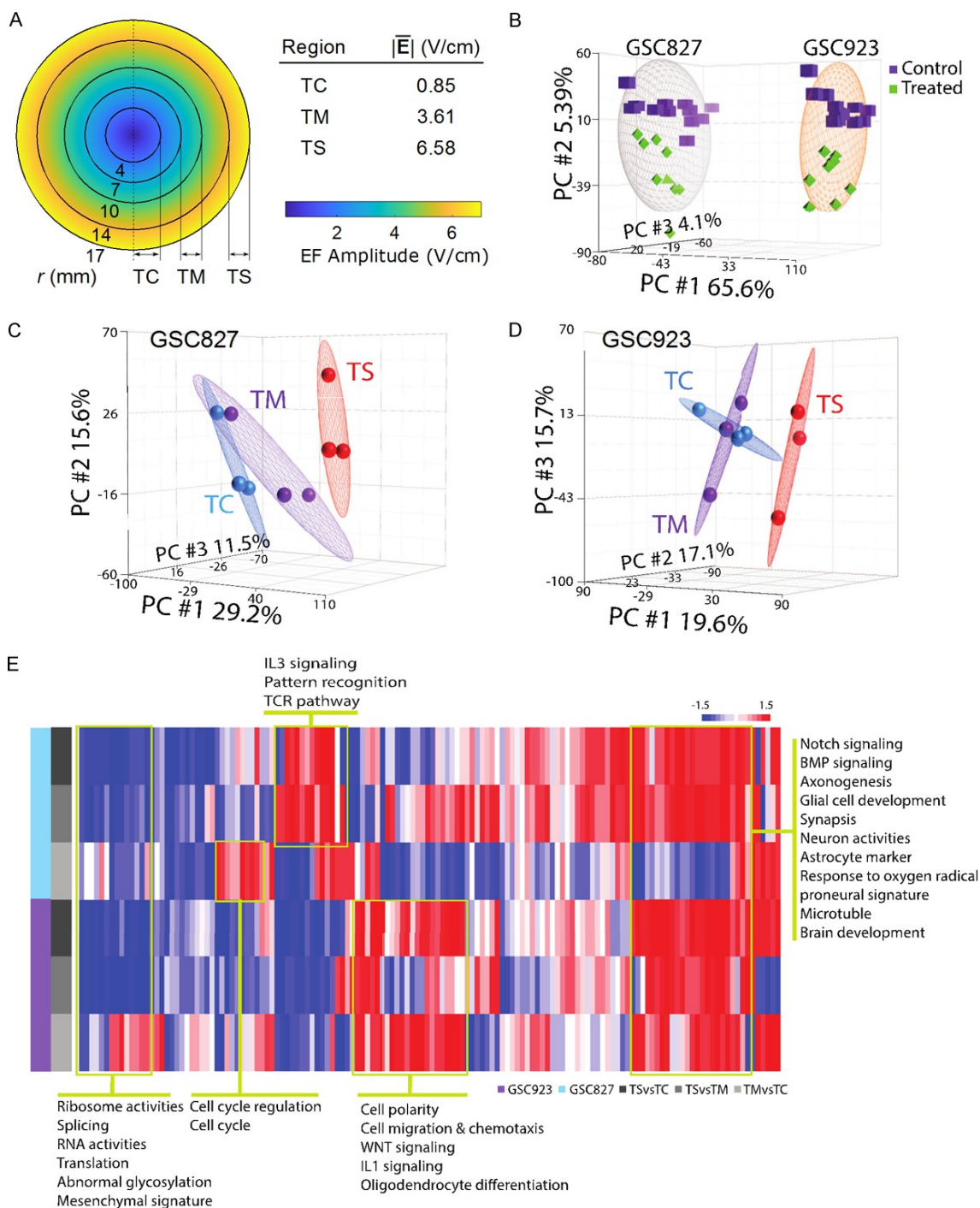
*Transkriptomické rozdiely medzi kontrolnými kultúrami a stredom misky v ošetrovaných kultúrach sú väčšie ako účinky ošetrovania*

Bunky boli kultivované aj v kontrolných miskách umiestnených v tom istom inkubátore, ale ďaleko od cievky, aby sa zabránilo vystaveniu EMP. Tieto misky slúžia ako oddelená kontrola (od TC) na vyhodnotenie akýchkoľvek potenciálnych mätúcich účinkov, ako je znížená regulácia osmolarity - účinok, ktorý sme kvantifikovali v našej predchádzajúcej publikácii [31]. PCA bez dohľadu naznačuje, že profily expresie génov vo všetkých troch oblastiach kontrolných misiek (CC, CM, CS) pre GSC827 a GSC923 sa prekrývajú, ale sú výrazne oddelené od TC (obr. S8A-D). Priemerná amplitúda EF v oblasti TC je 0,85 V/cm (obrázky 1A, 4A), čo by nemala byť dostatočná amplitúda EF na vyvolanie podstatných účinkov na expresiu génov ani na rast buniek. Prekvapivo je teda rozdiel v expresii génov medzi kontrolnými miskami (CC, CM, CS) a TC kvalitatívne väčší ako rozdiel medzi oblasťami v ošetrovaných miskách (TC vs. TM, TC vs. TS). Tento rozdiel naznačuje, že účinok EMP 200 kHz na expresiu génov ako taký bol menší ako potenciálny vplyv osmolarity, striedavého magnetického poľa alebo iných experimentálnych rozdielov. Napriek tomu sme sa rozhodli použiť TC ako referenciu vo všetkých ďalších štatistických porovnaníach na meranie účinkov liečby v tejto štúdii, čím sme sa vyhli týmto potenciálnym zmätkom medzi jednotlivými miskami pri analýzach RNA-Seq. Pre úplnosť uvádzame aj analýzy s použitím kontrolnej misky ako referencie (t. j. TS vs. CS, TM vs. CM a TC vs. CC); tieto zistenia sa do veľkej miery prekrývali so zisteniami s použitím TC ako referencie (obrázok S9).

*Liečba transformovala bunky GSC827 a GSC923 z mezenchymálnych na proneu- rálne obohatené znaky*

Analýza obohatenia génových súborov (GSEA) zistila, že liečba transformovanými GSC827 a

# Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok 4. Experimentálny dizajn RNA-Seq a funkcie na vysokej úrovni ovplyvnené rôznymi oblasťami amplitúdy EF pre dve línie gliómových kmeňových buniek, GSC827 a GSC923. A. Schéma liečby a usporiadanie misiek. Ošetrená miska je rozdelená na tri diskkrétne oblasti: TC, TM a TS. Priemerná amplitúda EF v každej oblasti je znázornená vpravo. B. Analýza hlavných komponentov (PCA) všetkých vzoriek pre GSC827 a GSC923 bez dohľadu, pričom sa spájajú ošetrené (TC, TM, TS) a kontrolné oblasti (CC, CM, CS). Elipsy zvyrazňujú oddelenie medzi bunkovými líniami. C, D nekontrovaná PCA GSC827 a GSC923 oddelených podľa oblasti ošetrených misiek. E. Funkčné zhrnutie analýzy obohatenia súboru génov pre kontrasty TS vs. TC, TS vs. TM a TM vs. TC v oboch bunkových líniiach.

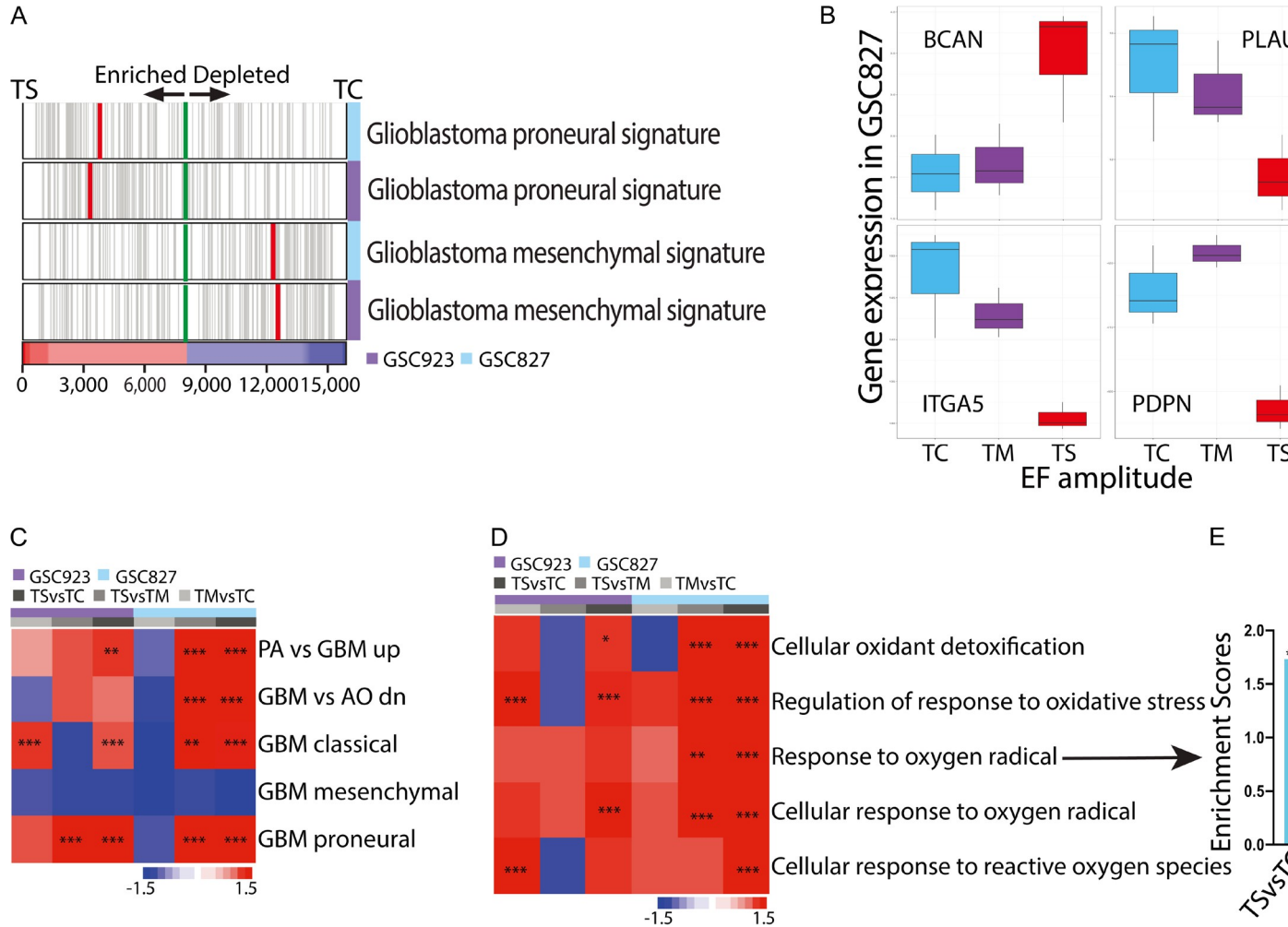
bunky GSC923 sa zmenili z buniek obohatených o mezenchymálne znaky na

bunky obohatené o proneurálne znaky

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

(obrázok 5A, 5B). Účinky boli významné v kontraste TS vs. TC a TS vs. TM,

# Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok 5. Liečba zmenila mezenchýmové (MES) znaky na proneurálne (PN) znaky v oboch bunkových líniách a zvýšila bunkovú odpoveď na kyslíkové radikály v oboch bunkových líniách. A. Analýza obohatenia znakov MES a znakov PN. Zelená čiara označuje miesta, kde hodnoty sú záporné. Červená čiara označuje miesto, kde sa začína súbor vedúceho okraja. Obrázkový pruh pod ním označuje zoradenú úroveň. Úroveň expzie pre vybrané gény v signatúre podtypu GBM v GSC827. C. Vzor expzie súborov génov súvisiacich s nádornými mechanizmami. D. Enrichment scores (ES) súborov génov súvisiacich s bunkovou odpoveďou na kyslíkové radikály.



## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

ale nie v kontraste TM vs. TC (obrázok 5C). V každej bunkovej línii bolo približne štyridsať proneurálnych a mezenchymálnych signatúrnych génov, ktoré významne súviseli s oblasťami amplitúdy EF (obrázok S10A-C), ale tieto gény sa medzi oboma bunkovými líniami slabo prekrývali; len 8 génov bolo spoločných pre obe bunkové línie (obrázok S10B). BCAN, proneurálny podpisový gén, bol pozitívne korelovaný s oblasťami amplitúdy EF v oboch bunkových líniiach (obrázky 5B, S10D). ITAG5, prognostický mezenchymálny signifikantný gén, bol negatívne korelovaný s oblasťami intenzity EF v oboch bunkových líniiach (obrázky 5B, S10D). PDPN a PLAUR, ktoré indukujú expresiu mezenchymálnych génov a podporujú epitelialno-mezenchymálny prechod, boli regulované smerom nadol len v oblasti TS (obrázky 5B, S10D). Liečba tiež zmenila vzor expresie z podpisu obohateného o GBM na podpisy anaplastického oligodendroglíómu (AO) a pilocytárneho astrocytómu (PA) v GSC827 (obrázok 5C). V prípade GSC923 boli odhalené zmeny v rovnakom smere, ale neboli významné (obrázok 5C).

*Liečba zvýšila expresiu génov súvisiacich s bunkovou odpoveďou na kyslíkové radikály v bunkách GSC827 a GSC923*

Liečba zvýšila bunkovú odpoveď na oxidačný stres v oboch bunkových líniiach. Päť génových súborov súvisiacich s bunkovou odpoveďou na kyslíkové žiarenie bolo v prípade kontrastov TM vs. TC a TS vs. TM v GSC827 významne zvýšených (obr. 5D, 5E). V GSC923 boli niektoré, ale nie všetky rovnaké súbory génov významne posilnené v kontrastoch TM vs. TC a TS vs. TC (obrázok 5D). Tento účinok bol výraznejší v GSC827 ako v GSC923 (obr. 5D, 5E), čo poukazuje na rôznu reakciu na liečbu v jednotlivých bunkových líniiach.

*Liečba zvýšila expresiu génov súvisiacich s kontrolou a reguláciou bunkového cyklu v bunkách GSC827*

Z našej analýzy siete GBM vyplynuli dve korešpondujúce siete. Pre GSC827: GFAP, SOX2, TERT, MDM2, ATP1B2 a PROM1 boli pozitívne korelované, zatiaľ čo CD44, CDK4, CCND1, TP53, MTOR a CLPTM1L boli negatívne korelované s oblasťami amplitúdy EF (obrázok 6A). V prípade GSC923 boli

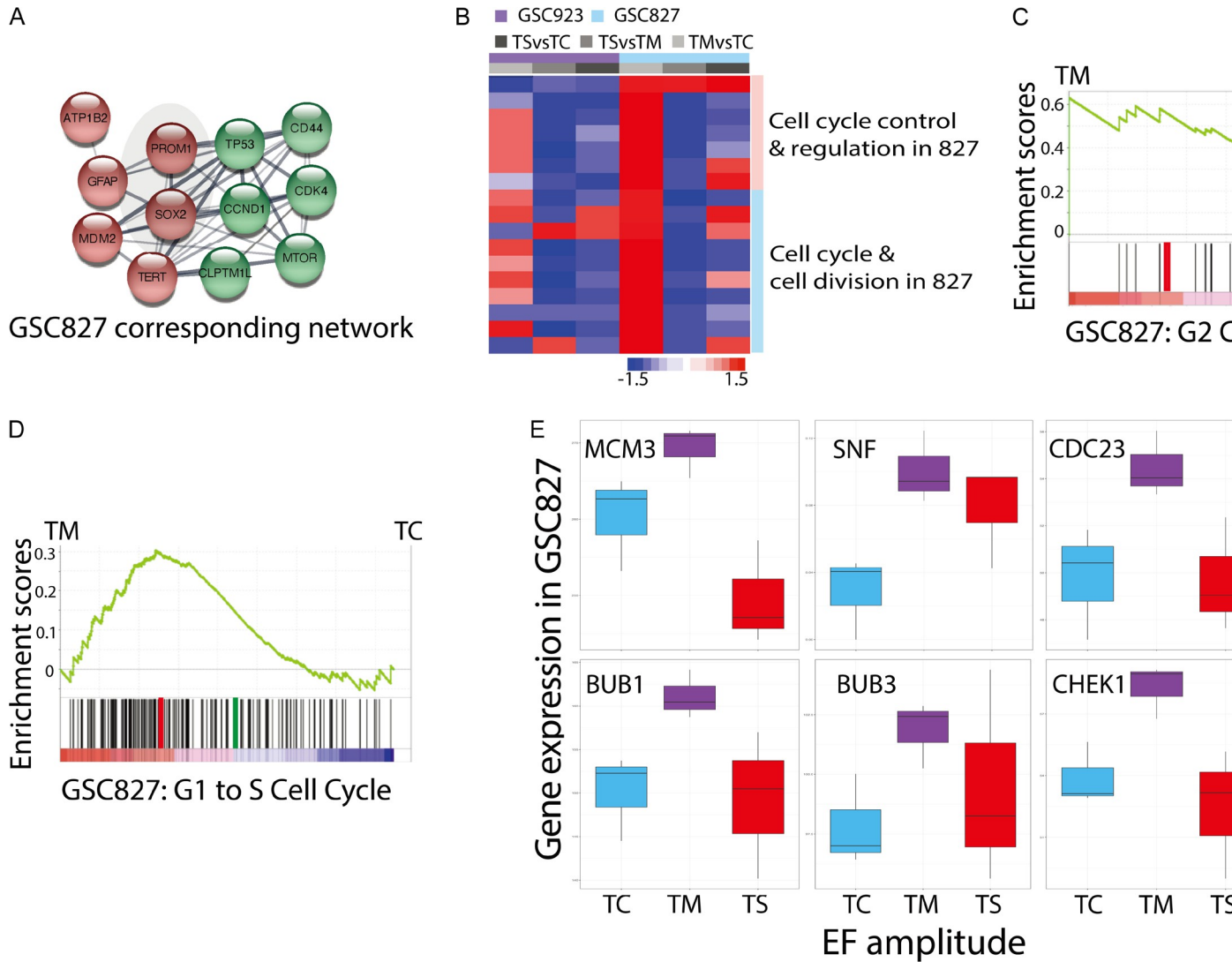
pozitívne korelované gény v príslušnej sieti EFNB3, PDGFRA, IDH1, NOTCH1, FGF2, GFAP, ATP1B2, zatiaľ čo negatívne korelované gény

boli CXCR4, CCND1, EPHA2, CLPTM1L (obrázok S10E). Pozitívne korelované gény pre obe bunkové línie boli GFAP a ATP1B2 a negatívne korelované gény boli CCND1 a CLPTM1L. GFAP je marker astrocytov a ATP1B2 je membránový proteín zodpovedný za vytvorenie a udržiavanie elektrochemických gradientov iónov  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  cez membránu. CCND1 je regulačnou jednotkou CDK4 alebo CDK6 a je potrebná na prechod bunkového cyklu G1/S. CLPTM1L je transmembránový proteín, ktorý sa spája so zlou prognózou, je nadmerne exprimovaný v seróznej adenokarcinóme vaječníkov a udeľuje rezistenciu voči chemoterapeutickému zabíjaniu [34].

Naša GSEA identifikovala aj sedemnášť súborov génov súvisiacich s reguláciou bunkového cyklu, ktoré boli významne obohatené v GSC827 pri porovnaní TM a TC (obr. 6B-E). Úplný zoznam týchto súborov génov je podrobne uvedený v tabuľke S1. Prekvapivo, väčšina týchto génových súborov bola buď znížená, alebo zvýšená, ale nedosahovala významnú úroveň v ostatných dvoch kontrastoch (TS vs. TM alebo TS vs. TC) v rámci tej istej bunkovej línie (obrázok 6B), čo naznačuje rôznorodé účinky v rôznych amplitúdach EF. V GSC923 nebola väčšina týchto súborov génov významne obohatená v rovnakom smere ako v GSC827 pre kontrast TM vs. TC (obrázok 6B). Hladiny expresie vybraných diferencielne exprimovaných génov (DEG) súvisiacich s kontrolou bunkového cyklu - CHEK1, BUB1 a BUB3 - sú znázornené na obrázku 6E. CHEK1 je členom rodiny Ser/Thr proteínkináz a je potrebný na zastavenie bunkového cyklu sprostredkované kontrolným bodom v reakcii na poškodenie DNA alebo prítomnosť replikovanej DNA. BUB1 a BUB3 kódujú Ser/Thr kinázy mitotického kontrolného bodu, ktoré fungujú tak, že fosforylujú členov komplexu mitotického kontrolného bodu a aktivujú kontrolný bod vretena. Všetky tieto gény boli významne regulované pri porovnaní TM a TC v GSC827 (obrázok 6E). Zobrazené sú aj hladiny expresie niekoľkých ďalších vybraných DEG - SNF, MCM3 a CDC23 (obrázok 6E). SNF je proteín kontrolného bodu bunkového cyklu. CDC23 má zásadnú úlohu pri progresii bunkového cyklu cez prechod G2/M. MCM3 sa podieľa na tvorbe replikačných vidlíc a je nevyhnutný pre iniciáciu replikácie DNA a

progresiu bunkového cyklu. V GSC923 nebol žiadny z týchto génov významne regulovaný, čo opäť poukazuje na rôznu odpoveď na liečbu v rôznych bunkových líniách.

# Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok 6. Liečbou indukovaná expresia génov súvisiacich s reguláciou bunkového cyklu v GSC827. A. Sieťová analýza zodpovedajúcich uzly sa vzťahujú na gény regulované smerom nahor a zelené uzly na gény regulované smerom nadol. B. Vzor expresie súborov génov v GSC827 a kontrolou bunkového cyklu. C. Analýza obohatenia súboru génov pre zastavenie bunkového cyklu G2. Zelená čiara sleduje obohatenie súboru génov prechodu bunkového cyklu z G1 do S. E. Úrovně expresie vybraných génov zapojených do regulácie bunkového cyklu.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

*Liečba zvýšila expresiu génov súvisiacich so signalizáciou NOTCH a vývojom mozgu v bunkách GSC923*

axonogenezou, neuronálnymi aktivitami a vývojom mozgu a znížila sa expresia génov súvisiacich s funkciami ribozómu a aktivitami RNA,

Výsledkom liečby bola regulácia signálnych dráh NOTCH a BMP v GSC923 (obrázok 7A-E). Celkovo devätnásť dráh alebo súborov génov súvisiacich so signalizáciou NOTCH z databáz MSigDB C2 a C5 bolo v GSC923 významne posilnených vo všetkých kontrastoch TS vs. TC, TS vs. TM a TM vs. TC (obrázky 7A, 7B, [S10F](#)). Tieto účinky boli menej výrazné v GSC827 a iba štyri súbory génov dosiahli hladinu významnosti vo všetkých troch kontrastoch (obrázok [S10F](#)). Úrovně expresie vybraných regulovaných DEG zapojených do signalizácie NOTCH sú znázornené na obrázku 7E.

Súbory génov súvisiace s diferenciáciou a vývojom mozgových buniek, ako je tvorba astrocytov a oligo- dendrocytov, boli tiež posilnené liečbou GSC923 (obrázky 7C, 7D, [S11A](#), [S11B](#)). Všimnite si, že gény zapojené do signalizácie NOTCH, ako napríklad NOTCH1 a HES1/5, sú v zozname génov na okraji funkcií diferenciácie mozgových buniek. Transkripčné faktory SOX1/6/9, ktoré tiež prispievajú k vývoju mozgu, boli v GSC923 regulované vo všetkých kontrastoch (obrázok [S11B](#)). Príbuzné gény, ako sú OLIG1, GFAP, SOX2 a NKX2-2, boli pozitívne korelované s oblasťou amplitúdy EF v GSC923 (obrázok [S11A](#)). V GSC923 boli obohatené aj gény súvisiace s bunkovou adhéziou, bunkovým spojením a synapsiou, ustanovením bunkovej polarity, predĺžením axónu a axonogenezou, aktivitami neurónov a funkciami vývoja mozgu (obrázky 4E, 7D). Dva neuronálne markerové gény, MAPT - podieľajúci sa na vytváraní a udržiavaní neuronálnej polarity - a MAP2 - nevyhnutný pre neurogenézu - boli pozitívne korelované s oblasťou amplitúdy EF (obrázok [S11A](#)). Ďalšie gény súvisiace s neuronálnou aktivitou, ako napríklad DCLK1, NLGN3, DISC1, EPHB1, SLIT2 a NTRK2 boli tiež regulované v GSC923 (obrázok [S11A](#)).

*Iné cesty a globálne funkcie ovplyvnené liečbou*

Celkovo sa pri liečbe EMP s frekvenciou 200 kHz zvýšila expresia génov súvisiacich s bunkovou polaritou, synapsiou, 577

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

translácia, abnormálna glykozylácia a mezoenchýmové znaky (obrázok 4E). Pri pohľade na špecifickejšie dráhy (obrázok 7B) sa v oboch bunkových líniách do určitej miery posilnila signálna dráha NOTCH, signálna dráha BMP, signálna dráha PI3K a signálna dráha FOXO. Signálna dráha PDGFRA, dráha MAPK a TRK a nekanonické dráhy WNT boli posilnené v GSC923, ale nie v GSC827 (obrázok 7B). Signalizácia JNK NFkB bola zvýšená v GSC827, ale nie v GSC923 (obrázok 7B). Dráhy, ktoré boli v oboch bunkových líniách znížené, zahŕňajú dráhu TNF, dráhu integrín3, dráhu SHH, dráhu smrti a dráhu IL1R (obrázok 7B). Dráha MYC (obrázok 7F), signalizácia EGFR, dráha MTOR a dráha VEGFR1/2 boli downregulované v kontraste TS vs. TC a TS vs. TM, ale nie v kontraste TM vs. TC (obrázok 7B). Hladiny expresie vybraných DEG zapojených do týchto dráh - PDGFRA EGFR, MTOR, TERT, SHH, PIK3R1, FGF2, EPHA2, CXCR4, CD44 a IDH1 - sú znázornené na [obrázkoch S12A](#), [S12B](#).

Zistilo sa, že niektoré ďalšie zaujímavé gény majú rozdielnú expresiu. Hlavný vedúci gén H19, čo je dlhá nekódujúca RNA, ktorá funguje ako nádorový supresor [35], bol v stave TS pre GSC827 zvýšený ([obrázok S12C](#)). <sup>Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup></sup> transportér, NKCC1 (kódovaný SLC12A2) bol upregulovaný v kontraste TM vs. TC a TS vs. TC v GSC827, ale nie v GSC923. NKCC1 reguluje objem buniek; NKCC1 je hojne exprimovaný v gliómových vyššieho stupňa a predpokladá sa, že jeho nadmerná expresia poskytuje rezistenciu voči apoptóze vyvolanej TMZ [36].

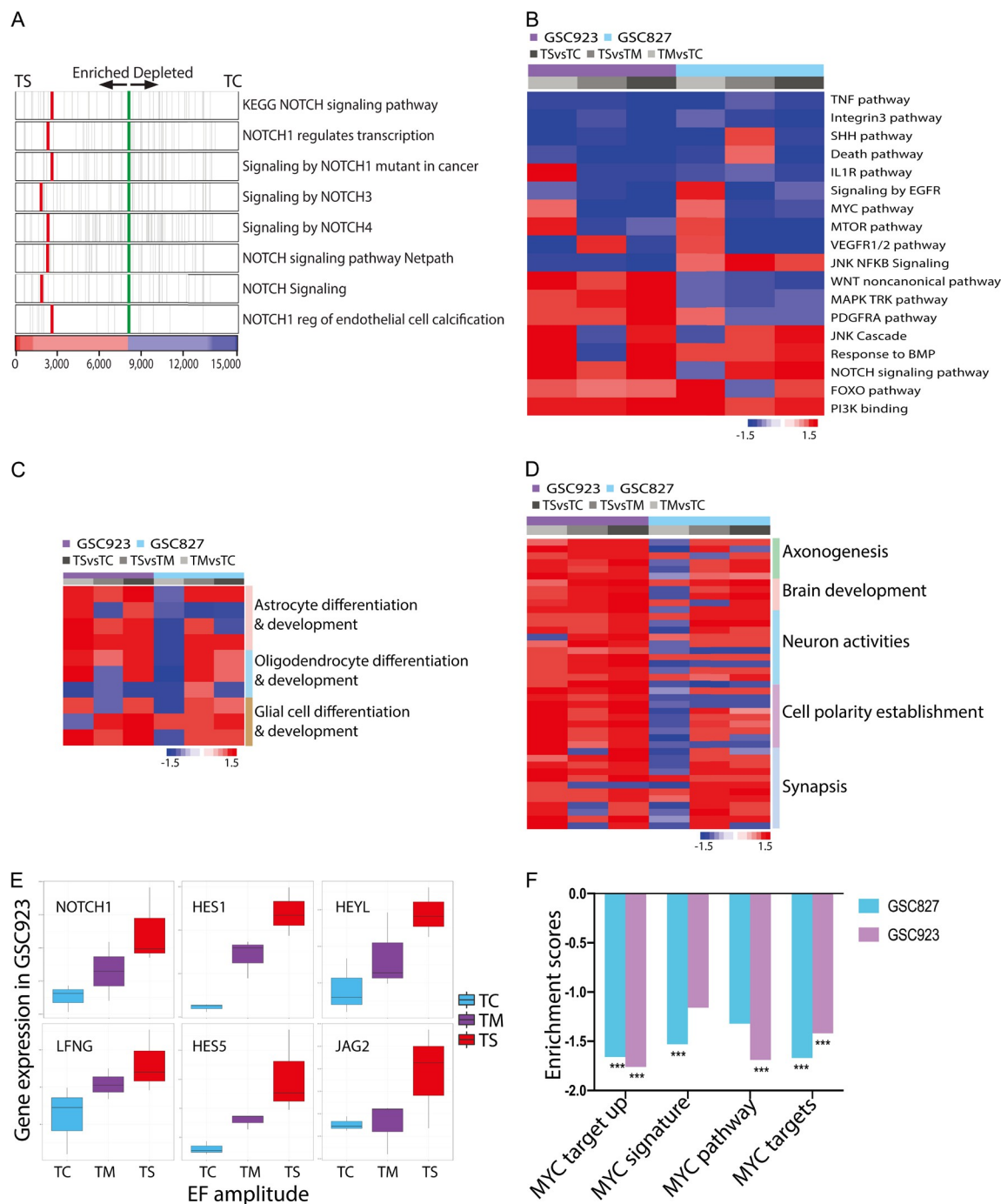
Súhrnne možno povedať, že hoci sa zistilo zvýšenie alebo zníženie regulácie viacerých skupín génov, čo môže podporovať určitý mechanizmus (mechanizmy) účinku, účinky neboli vždy konzistentné v rôznych bunkových líniách ani v rôznych kontrastoch (t. j. amplitúdach EF).

### Diskusia

V posledných 15 rokoch sa čoraz viac prác zaoberá tým, že TTFpole (100-300 kHz, 1-3 V/cm) má antiproliferačný účinok, ktorý inhibuje rýchlosť rastu ľudských a hlodavčích nádorových bunkových línií [4-7, 19]. Zistilo sa, že tento inhibičný účinok je závislý od frekvencie a zvyšuje sa s amplitúdou EF. Spoločnosť Novocure Ltd. tieto výsledky

pretavila do rôznych klinických aplikácií.

# Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok 7. Gény súvisiace so signalizáciou NOTCH, aktivitou neurónov a vývojom mozgu boli podporené liečbou GSC923. A. Analýza obohatenia súborov génov signalizácie NOTCH v kontraste TS a TC v GSC923. Zelená čiara označuje miesta, kde hodnoty korelácie expzieie menia znamienko. Červená čiara označuje miesto, kde začína súbor s vedúcim okrajom. Obrázkový pruh pod ním označuje zoradenú úroveň expzieie génov. B. Dráhy významne ovplyvnené liečbou v oboch bunkových líniách. C. Expresný vzorec súborov génov súvisiacich s diferenciáciou a vývojom mozgových buniek. D. Expresný vzorec súborov génov súvisiacich s činnosťou neurónov a vývojom mozgu. E. Úrovně expzieie vybraných génov v súboroch génov signalizácie NOTCH v GSC923. F. Skóre obohatenia (ES) pre súbory génov súvisiace so signálnou dráhou MYC.

v prvom rade pri liečbe GBM. Napriek tomu, že FDA schválila TTFIELDS v kombinácii s

s TMZ na liečbu novodiagnostikovaných GBM, prijatie medzi neuroonkolo-

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

gistov zostáva nízka [19], čo je možno spôsobené nedostatočným pochopením mechanizmu(ov) účinku TTFIELDS. V tejto práci sme vykonali štúdiu striedavého dodávania EF prostredníctvom elektromagnetickej indukcie v nádeji, že objasníme účinky EF/EMF *in vitro* v tomto frekvenčnom a amplitúdovom režime a zároveň zmiernime možné tepelné zmätky endemické pre predchádzajúce metódy dodávania EF. Dbalo sa na odstránenie tepelných a osmolárnych artefaktov.

Skúmali sa účinky 72 hodín neprerušovaného 200 kHz EMP s amplitúdami EF v rozsahu 0-6,5 V/cm na bunkové kultúry primárnych potkaních astrocytov a bunkové línie ľudských gliómov: U118, U87, GSC827, GSC923. Dôležité je, že

U87 a U118 boli použité aj v kľúčových predklinických štúdiách, ktoré poskytli prvé dôkazy o účinnosti TTFIELDS. V prípade bunkovej línie U87, ktorú skúmali Kirson *et al* [4], sme nezistili žiadny antiproliferačný účinok (obrázok 2E). Prekvapivo sme zistili, že zdanlivá denzita buniek sa v rámci ošetrovaných kultúr U87 zvýšila až o 30 % smerom k vyšším amplitúdam EF na periférii misky (> 4 V/cm). V prípade bunkovej línie U118, ktorú tiež použili Kirson *a kol*.

zistil malý alebo žiadny vplyv na rast buniek ( $\leq 5\%$ ).

Tieto výsledky sú v rozpore s predtým publikovanými a nepotvrdzujú tvrdenie, že 200 kHz EF vykazuje jednorazovú účinnosť pri znižovaní rýchlosti rastu týchto bunkových línií.

Čím možno vysvetliť tieto protichodné výsledky? Hoci by daný EF mal mať rovnaký biofyzikálny účinok (účinky) bez ohľadu na to, či je vytvorený kapacitne (t. j. časovo premenlivým prerozdelením náboja) alebo indukčne (t. j. časovo premenlivým magnetickým poľom), medzi našou metódou a metódou dodávania EF Inovitro™ sú dva hlavné mechanické rozdiely: (1) v systéme Inovitro™ dochádza k striedavej stimulácii medzi dvojicami ortogonálne umiestnených elektród a (2) EMF v našom systéme sprevádza vertikálne orientované, rovnomerné, striedavé magnetické pole s intenzitou približne 0,6 militesla.

Samotné tieto rozdiely však pravdepodobne nestačia na vysvetlenie rozdielov v experi-

mentálnych výsledkoch. Podľa Kirsona *a kol*. [5] striedanie orientácie EF medzi dvoma párami ortogonálnych elektród zvyšuje antiproliferačný účinok TTFIELDS len o 20 %, čo je menej ako tu zistené rozdiely: Kirson *a kol*. [4] uvádzajú inhibíciu rýchlosti rastu až do 50 % v U87, zatiaľ čo my sme

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

hlásia zvýšenie rastu až o 30 %. Okrem toho tieto predchádzajúce štúdie uvádzali zvýšenú účinnosť pri vyšších amplitúdach EF. Vyššie amplitúdy a nepretržitá prevádzka, ktoré sa tu dosiahli, by teda teoreticky mali do určitej miery kompenzovať akúkoľvek stratu účinnosti spôsobenú použitím jednej orientácie striedavého poľa. Pokiaľ ide o magnetické pole, nepredpokladá sa, že by takéto pole malo priamy vplyv na bunky, pretože (1) bunky majú diamagnetickú susceptibilitu takmer totožnú s vodou a (2) amplitúda magnetického poľa 0,6 militesla je rádovo menšia ako amplitúdy, ktoré preukázali biologické účinky [37]. Okrem toho sa predpokladá, že magnetické pole v cievke je priestorovo takmer rovnomerné, takže akýkoľvek účinok magnetického poľa by bol rovnomerný v celej miske, a preto by nebolo možné vysvetliť pozorované účinky, ktoré sa líšia v radiálnom smere.

Ďalšie príčiny rozdielov v experimentálnych výsledkoch môžu vyplývať z priameho kontaktu medzi elektródami a miskou v systéme Inovitro™, ktorý, ako bolo uvedené, komplikuje tepelnú a osmolárnu reguláciu a vyžaduje si prerušovanú prevádzku systému v chladenom prostredí [30]. Kritické je, že odparovanie média je pravdepodobne urýchlené ohrevom a chladeným prostredím. Spoločnosť Novocure Ltd. odporúča, aby používatelia systému Inovitro™ kompenzovali toto odparovanie výmenou médií každých 24 hodín [30], čo môže spôsobiť osmolárny šok pre kultúry. Samotný osmolárny šok alebo stres by mohol viesť k inhibícii rastu a apoptóze [38]. K určitému antiproliferačnému účinku môžu prispieť aj oscilačné zmeny teploty spôsobené prerušovanou prevádzkou zariadenia. Náš systém tieto problémy účinne zmierňuje, aj keď v porovnaní s kontrolným systémom zostávajú určité teplotné odchýlky v rámci misiek (< 1 °C) a určité dodatočné zvýšenie osmolarity v priebehu 72 hodín (≈ 10 %, pozri obrázky 4 a 5 v ref. [31]).

Prešli sme k ďalším výsledkom a zistili sme, že v prípade ľudských kmeňových bunkových línií GBM GSC827 a GSC923 sa pri amplitúdach EF vyšších ako 4 V/cm znížila zdanlivá hustota buniek v ošetrovaných miskách až o 10-20 %. V prípade

primárnych potkaních astrocytov nebol pozorovaný žiadny vplyv na rast buniek. Tieto výsledky dopĺňajú výsledky U87 a U118 tým, že poskytujú analogické zistenia pre normálne bunky centrálného nervového systému



## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

(astrocyty) a pre dobre overené línie kmeňových buniek, ktoré lepšie napodobňujú správanie GBM *in vivo* [32].

Hodnotili sme aj jeden z možných mechanizmov účinku TTFields, ktorý zahŕňa zásah do rezistencie GBM buniek voči viacerým liekom, čo je vlastnosť čiastočne daná ABC transportérmi. V prípade buniek GSC827 a GSC923 sa nepriamo skúmala aktivita čerpania ABCG2 a ABCB1 prostredníctvom vyplavovania CellTrackera a Hoechstu počas 2 hodín. Zistili sme, že v ošetrovaných bunkových kultúrach GSC827 a GSC923 došlo k malému zníženiu zjavného efluxu CellTrackera a Hoechstu (obrázok 3B), hoci okrajovo významné výsledky pozorované pri vyšších amplitúdach EF si môžu vyžadovať ďalšie skúmanie.

Prezentované výsledky jednoznačne naznačujú, že rôzne bunky z rôznych zdrojov môžu reagovať na EMP/EF s frekvenciou 200 kHz rôznym, dokonca opačným spôsobom, pokiaľ ide o rast buniek. V našej predchádzajúcej štúdii [31] sme skúmali ľudské bunky štítnej žľazy a pozorovali sme mierne zníženie hustoty buniek (< 10 %) pri nízkych amplitúdach EF (< 4 V/cm) a väčšie zníženie hustoty buniek až o 25 % pri vyšších amplitúdach (4 - 6,5 V/cm), čo predstavuje ďalší príklad bunkovej línie s odlišným profilom reakcie. Nie sme prví, ktorí uvádzajú takéto rozdielne zistenia medzi bunkovými líniami. Podobné výsledky prezentovali Neuhaus *et al.* [16], kde sa zistilo, že TTFields znižujú počet buniek T98G, ale majú opačný účinok na bunky U251, pričom ich počet zvyšujú (pozri obrázok 9 v ref. [16]). Naše výsledky tiež naznačujú, že amplitúdy EF, ktoré sa predtým považovali za účinné *in vitro* (1 - 3 V/cm), nemusia byť dostatočné na vyvolanie antiproliferačných účinkov pri kontrole termálnych a osmolárnych zmien. Pozitívna a negatívna miera rastu pozorovaná pri vyšších amplitúdach EF (> 4 V/cm) v rôznych bunkových líniah si zaslúži ďalšie štúdium.

Na ďalšie preskúmanie možného mechanizmu (mechanizmov) účinku sa vykonali analýzy RNA-Seq na kultúrach buniek GSC827 a GSC923. Zistili sme, že pri ošetrovaní EMP indukovaným frekvenciou 200 kHz sa zvýšila alebo znížila regulácia niekoľkých súborov génov, ktoré nás zaujímajú. Naše výsledky naznačujú, že

liečba vo veľkej miere modifikovala charakteristiky oboch bunkových línii z mezenchýmových (MES) obohatených vlastností na proneurálne (PN) obohatené vlastnosti (obr. 5A, 5B). U myší majú gliómové kmeňové bunky MES vyššiu mieru proliferácie

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

a sú odolnejšie voči ožarovaniu ako gliómové kmeňové bunky PN [39]; zistilo sa, že u myši, ktorým boli aplikované bunky MES, sa nádory mozgu vyvíjali oveľa rýchlejšie. Spomedzi štyroch podtypov molekúl GBM je podtyp MES najagresívnejší a silne spojený so zlou prognózou v porovnaní s podtypom PN [40]. Prechod z podtypu PN na podtyp MES sa môže vyvinúť u pacientov po ožarovaní alebo chemoterapii a nádor je často odolnejší voči liečbe [41]. Preto je prechod z podtypu MES na podtyp PN pozorovaný v našej štúdii jedným z možných mechanizmov účinku pre uvádzanú klinickú účinnosť TTFields nezávisle od priameho zníženia rastu buniek. Ďalším účinkom zisteným v oboch bunkových líniiach, ale významne len v GSC827, bola zvýšená expresia génov súvisiacich s bunkovou odpoveďou na kyslíkové radikály. Hoci je známe, že reaktívne kyslíkové formy sa podieľajú na pro- a protitumoróznej signalizácii [42, 43], v súčasnosti nie je jasné, ako a či vôbec to súvisí s účinkami TTFields v klinike.

Iné účinky na expresiu génov sa zistili len v jednej bunkovej línii alebo len pri niektorých amplitúdach EF. Zistili sme, že gény súvisiace s kontrolou a reguláciou bunkového cyklu boli regulované v bunkách GSC827, ale nie v bunkách GSC923 (obrázok 6). Okrem toho bol tento účinok prítomný len pri stredných amplitúdach EF (TM,  $E = 3,61 \text{ V/cm}$ ) a mizne pri vyšších amplitúdach EF (TS,  $E = 6,58 \text{ V/cm}$ ) v bunkovej línii GSC827. Účinky na mitotický proces a bunkový cyklus sú sľubnými kandidátmi na možné mechanizmus(y) účinku TTFields a pôvodne boli ako také navrhnuté [4, 5]. Preto je prekvapujúce, že naše analýzy RNA-Seq nezistili konzistentnú moduláciu expresie génov súvisiacich s reguláciou bunkového cyklu v rôznych bunkových líniiach, ani v rôznych amplitúdach EF. Zistilo sa, že súbory génov súvisiace so signatúrami anaplastického oligodendroglioma a pilocytárneho astrocytómu - čo sú nádory nižšieho stupňa v porovnaní s GBM - boli regulované v GSC827, ale nie významne v GSC923 (obrázok 5C).

Zistilo sa, že gény súvisiace so signalizáciou NOTCH a vývojom mozgových buniek sú regulované v

GSC923, ale nie v rovnakej miere v GSC827 (obrázok 7). Signalizácia NOTCH je základom pre udržiavanie neurálnych kmeňových buniek a pre reguláciu špecifikácie osudu buniek, proliferácie



## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

a apoptózu [44, 45]. Bolo zistené, že cesta NOTCH má kľúčovú úlohu v skorých štádiách neurogenézy a zohráva úlohu pri potláčaní nádorov [45-48]. Najmä NOTCH1 je nevyhnutná pre formáciu neurónov a glie a uľahčuje začiatok neurogenézy tým, že ponúka signál diferenciácie astroglie nezávisle od ciliárneho neurotrofického faktora [46, 48]. V súlade s týmito správami naša GSEA odhalila v GSC923 silné obohatené podpisy signalizácie NOTCH aj neurogliového vývinu, ktoré sa prejavujú ako diferenciácia astrocytových a oligodendrocytových buniek a vývin mozgu (obr. 7). V podskupine pacientov s GBM sa vysoká expresia špecifických cieľových génov NOTCH spája s lepšou prognózou. Na myšom modeli gliómu nadmerná expresia NOTCH2 inhibovala tvorbu gliómu [49]. Nedávny CRISPR skrining identifikoval NOTCH1 ako tumor supresor v GBM [50]. Vzhľadom na uvedené zistenia môže zvýšená signalizácia NOTCH predstavovať novú cestu účinku EF, ktorá by mohla byť prospešná pre pacientov tým, že obnoví kapacitu buniek prostredníctvom diferenciácie. Aj v tomto prípade bol tento účinok výraznejší u GSC923 ako u GSC827.

indukované EMP, pokiaľ ide o rast buniek a viac

Súhrnne sme ukázali, že vplyv TTF (Tumor Treating Fields) môže mať veľmi rôznorodé účinky na expresiu génov v rôznych líniiach kmeňových buniek GBM, konkrétne GSC827 a GSC923. Medzi líniami kmeňových buniek glioblastómu boli rozdiely, pokiaľ ide o to, ktoré molekulárne dráhy boli ovplyvnené, a absencia jasnej odpovede na dávku. Avšak všeobecná absencia významnej inhibície proliferácie buniek aj pri vysokej expozícii TTF naznačuje, že hoci dochádza k zmenám v expresii génov, tieto významne nemenia správanie nádorových buniek v našich *in vitro* kultúrach. Samozrejme, je zradné špecifikovať, aký terapeutický alebo klinický vplyv by mala táto "liečba", akosi extrapolovať naše výsledky *in vitro* na systémoch tkanivových kultúr na klinické výsledky. Na základe našich zistení sa dá predpokladať, že predtým navrhované biofyzikálne mechanizmy účinku TTF, ako je zasahovanie do polymerizácie tubulínu alebo blokovanie tvorby dvoch dcérskych buniek, sú neutrálne.

Záver

Odpoveď na liečbu frekvenciou 200 kHz  
584

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

sa zistilo, že pri dôkladnej kontrole teploty a osmolarity je expresia génov veľmi variabilná a špecifická pre bunkovú líniu aj pre amplitúdu EF. Nezistili sme, že by bol rast buniek významne inhibovaný v režime amplitúdy EF 1 - 3 V/cm u všetkých bunkových línií GBM, čo je v rozpore s kľúčovými predchádzajúcimi zisteniami. Pri vyšších amplitúdach EF bunky U87 skutočne reagovali na liečbu zvýšeným rastom buniek. Nemôžeme však vylúčiť, že účinky, ktoré nemajú za následok pozorovateľné zníženie rastu buniek, by mohli byť spôsobené takýmito EMF. Uvádzame predbežné analýzy RNA-Seq na líniách ľudských gliómových kmeňových buniek, ktoré odhaľujú niektoré účinky v tomto smere. Napríklad v líniách kmeňových buniek GBM GSC827 a GSC923 sa pozoroval prechod od mezenchymálnych buniek k proneurálnym. Celkovo rôznorodé reakcie na liečbu naznačujú, že je potrebné zdvojnásobiť naše úsilie o pochopenie akýchkoľvek možných účinkov striedavých elektrických polí na tkáň a bunky v tomto frekvenčnom režime a začať posudzovať takéto účinky na základe jednotlivých bunkových línií a v iných biologických a klinických kontextoch.

### Poďakovanie

Radi by sme poďakovali Dr. Phillipovi R. Leeovi a Dr. R. Douglasovi Fieldsovi, ktorí poskytli odborné znalosti o astrocytoch a prispeli do diskusie. Chceli by sme tiež poďakovať doktorke Raise Freidlinovej, ktorá sa podieľala na počiatkových činnostiach spojených so spracovaním obrazu. Táto práca bola podporená IRP NICHD a NCI.

### Zverejnenie konfliktu záujmov

Žiadne.

Adresujte korešpondenciu na: Peter J Basser, Sekcia kvantitatívneho zobrazovania a tkanivových vied, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, NIH, Bethesda, Maryland, USA. E-mail: peter.basser@nih.gov

### Odkazy

- [1] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U,

Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E a Mirmanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer In-

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných poľí na gliómové bunky

- stitute of Canada Clinical Trials Group. Rádioterapia plus konkomitantný a adjuvančný temo- zolomid pri glioblastóme. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-996.
- [2] Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ Jr a Mehta MP. Randomizovaná štúdia bevacizumabu pri novodiagnostikovanom glioblastóme. *N Engl J Med* 2014; 370: 699-708.
- [3] Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N a Schaffer M. Glioblastoma multiforme, diagnostika a liečba; prehľad najnovšej literatúry. *Curr Med Chem* 2017; 24: 3002-3009.
- [4] Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R a Palti Y. Narušenie replikácie rakovinových buniek striedavými elektrickými poľami. *Cancer Res* 2004; 64: 3288-3295.
- [5] Kirson ED, Dbaly V, Tovarys F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, Mordechovich D, Steinberg-Shapira S, Gurvich Z, Schneiderman R, Wasserman Y, Salzberg M, Ryffel B, Goldsher D, Dekel E a Palti Y. Striedavé elektrické polia zastavujú proliferáciu buniek v zvieracích nádorových modeloch a ľudských mozgových nádoroch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10152-10157.
- [6] Giladi M, Weinberg U, Schneiderman RS, Porat Y, Munster M, Voloshin T, Blatt R, Cahal S, Itzhaki A, Onn A, Kirson ED a Palti Y. Zmenou elektrických poľí (terapia nádorovými poľami) možno zlepšiť účinnosť chemoterapeutickej liečby nemalobunkového karcinómu pľúc in vitro aj in vivo. *Semin Oncol* 2014; 41 Suppl 6: S35-41.
- [7] Kirson ED, Giladi M, Gurvich Z, Itzhaki A, Mordechovich D, Schneiderman RS, Wasserman Y, Ryffel B, Goldsher D a Palti Y. Striedavé elektrické polia (TTFields) inhibujú metastatické šírenie solídnych nádorov do pľúc. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 633-640.
- [8] Gera N, Yang A, Holtzman TS, Lee SX, Wong ET a Swanson KD. Nádorové trecie polia narušujú lokalizáciu septínov a spôsobujú aberantný mitotický výstup. *PLoS One* 2015; 10: e0125269.
- [9] Giladi M, Schneiderman RS, Voloshin T, Porat Y, Munster M, Blatt R, Sherbo S, Bomzon Z, Urman N, Itzhaki A, Cahal S, Shteingauz A, Chaudhry A, Kirson ED, Weinberg U a Palti Y. Narušenie mitotického vretienka striedavými elektrickými poľami vedie k nesprávnej segregácii chromozómov a mitotickej katastrofe v rakovinových bunkách. *Sci Rep* 2015; 5: 18046.
- [10] Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, Kirson ED, Taillibert S, Liebermann F, Dbaly V, Ram Z, Villano JL,

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

- Rainov N, Weinberg U, Schiff D, Kunschner L, Raizer J, Honnorat J, Sloan A, Malkin M, Landolfi JC, Payer F, Mehdorn M, Weil RJ, Pannullo SC, Westphal M, Smrcka M, Chin L, Kostron H, Hofer S, Bruce J, Cosgrove R, Paleologous N, Palti Y a Gutin PH. NovoTTF-100A v porovnaní s chemoterapiou podľa výberu lekára pri rekurentnom glioblastóme: randomizovaná štúdia fázy III novej liečebnej metódy. *Eur J Cancer* 2012; 48: 2192-2202.
- [11] Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idbaih A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meco F, Lieberman F, Zhu JJ, Stragliotto G, Tran D, Brem S, Hottinger A, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim CY, Paek SH, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME a Ram Z. Účinok nádorových liečebných polí plus udržiavacieho temozolomidu oproti samotnému udržiavaciemu temozolomidu na prežívanie u pacientov s glioblastómom: randomizovaná klinická štúdia. *JAMA* 2017; 318: 2306-2316.
- [12] Tuszynski JA, Wenger C, Friesen DE a Preto J. Prehľad subcelulárnych mechanizmov, ktoré sa podieľajú na pôsobení ttfeldu. *Int J Environ Res Public Health* 2016; 13: 1128.
- [13] Wenger C, Miranda PC, Salvador R, Thielscher A, Bomzon Z, Giladi M, Mrugala MM a Korshoej AR. A review on tumor-treating fields (TT-Fields): clinical implications inferred from computational modeling (Prehľad nádorových polí (TT-polí): klinické dôsledky odvodené z počítačného modelovania). *IEEE Rev Biomed Eng* 2018; 11: 195-207.
- [14] Wenger C, Salvador R, Bassler PJ a Miranda PC. Distribúcia elektrického poľa v mozgu počas terapie TTFIELDS a jej závislosť od dielektrických vlastností a anatómie tkaniva: počítačová štúdia. *Phys Med Biol* 2015; 60: 7339-7357.
- [15] Li X, Yang F a Rubinsky B. Teoretická štúdia biofyzikálnych mechanizmov, ktorými tumor ošetrojúce polia ovplyvňujú nádorové bunky počas mitózy. *IEEE Trans Biomed Eng* 2020; 67: 2594-2602.
- [16] Neuhaus E, Zirjacks L, Ganser K, Klumpp L, Schuler U, Zips D, Eckert F a Huber SM. Aktivujúce elektrické polia (TTFIELDS) aktivujú Ca(v)1.2 kanály v ľudských glioblastómových bunkách. *Cancers (Basel)* 2019; 11: 110.
- [17] Chang E, Patel CB, Pohling C, Young C, Song J, Flores TA, Zeng Y, Joubert LM, Arami H, Natarajan A, Sinclair R a Gambhir SS. Liečebné polia pre nádory zvyšujú priepustnosť membrán v bunkách glioblastómu. *Cell Death Discov* 2018; 4: 113.
- [18] Berkelmann L, Bader A, Meshksar S, Dierks A, Hatipoglu Majernik G, Krauss JK, Schwabe K, Manteuffel D a Ngezhahayo A. Tumor-treating fields (TTFIELDS): investigations on the mechanism of action by electromagnetic expo-

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

- buniek v telofáze/cytokinéze. *Sci Rep* 2019; 9: 7362.
- [19] Rominiyi O, Vanderlinden A, Clenton SJ, Bridgewater C, Al-Tamimi Y a Collis SJ. Liečba glioblastómov pomocou nádorových polí: súčasné pokroky a budúce smery. *Br J Cancer* 2021; 124: 697-709.
- [20] Giladi M, Munster M, Schneiderman RS, Voloshin T, Porat Y, Blat R, Zielinska-Chomej K, Haag P, Bomzon Z, Kirson ED, Weinberg U, Viktorsson K, Lewensohn R a Palti Y. Nádorové liečebné polia (TTFields) spomaľujú opravu poškodenia DNA po rádioterapii gliómových buniek. *Radiat Oncol* 2017; 12: 206.
- [21] Karanam NK, Ding L, Aroumougame A a Story MD. Nádorové liečivé polia spôsobujú replikačný stres a zasahujú do udržiavania replikačnej vidlice DNA: dôsledky pre terapiu rakoviny. *Transl Res* 2020; 217: 33-46.
- [22] Kim EH, Jo Y, Sai S, Park MJ, Kim JY, Kim JS, Lee YJ, Cho JM, Kwak SY, Baek JH, Jeong YK, Song JY, Yoon M a Hwang SG. Nádorové liečebné polia indukujú autofágiu blokovaním osi Akt2/miR29b v bunkách glioblastómu. *Oncogene* 2019; 38: 6630-6646.
- [23] Kim EH, Song HS, Yoo SH a Yoon M. Nádorové liečivé polia inhibujú migráciu, inváziu a angiogénu glioblastómových buniek. *Oncotarget* 2016; 7: 65125-65136.
- [24] Silginer M, Weller M, Stupp R a Roth P. Biologická aktivita nádorových liečebných polí v predklinických modeloch gliómov. *Cell Death Dis* 2017; 8: e2753.
- [25] Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y a Fan D. Rezistencia na viaceré liečivá v chemoterapii rakoviny: mechanizmy a laboratórne prístupy. *Cancer Lett* 2014; 347: 159-166.
- [26] Branter J, Estevez-Cebrero M, Diksin M, Griffin M, Castellanos-Urbe M, May S, Rahman R, Grundy R, Basu S a Smith S. Genómová expresia a antiproliferačné účinky terapie elektrickým poľom na nádory mozgu u detí a dospelých. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 1982.
- [27] Lee YJ, Seo HW, Baek JH, Lim SH, Hwang SG a Kim EH. Profílovanie génovej expresie bunkových línií glioblastómu v závislosti od stavu TP53 po liečbe nádorovými poliami (TTFields). *Sci Rep* 2020; 10: 12272.
- [28] Wick W. TTFields: kde je všetka skeptika z čoho pochádza? *Neuro Oncol* 2016; 18: 303-305.
- [29] Patel CB, Beinat C, Xie Y, Chang E a Gambhir SS. Nádorové liečebné polia (TTFields) zhoršujú abychbnú glykolýzu v glioblastóme, ako sa hodnotí pomocou [(18)F]DASA-23, neinvazívnej sondy expresie pyruvát kinázy M2 (PKM2). *Neoplasia* 2021; 23: 58-67.
- [30] Porat Y, Giladi M, Schneiderman RS, Blat R, Shteingauz A, Zeevi E, Munster M, Voloshin T,

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

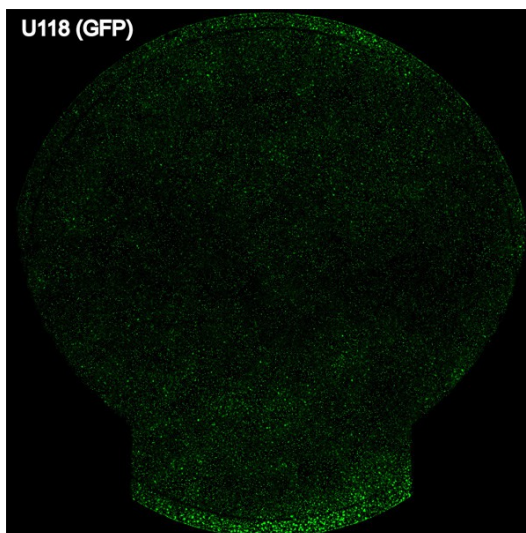
- Kaynan N, Tal O, Kirson ED, Weinberg U a Palti Y. Určenie optimálnej inhibičnej frekvencie pre rakovinové bunky pomocou liečebných polí (TTFields). *J Vis Exp* 2017; 55820.
- [31] Ravin R, Cai TX, Pursley RH, Garmendia-Cedillo M, Pohida T, Freidlin RZ, Wang H, Zhuang Z, Giles AJ, Williamson NH, Gilbert MR a Basser PJ. Nové zariadenie in vitro na dodávanie elektromagnetických polí do bunkových a tkanivových kultúr. *Biophys J* 2020; 119: 2378-2390.
- [32] Riddick G, Kotliarova S, Rodriguez V, Kim HS, Linkous A, Storaska AJ, Ahn S, Walling J, Belova G a Fine HA. Základný regulačný okruh v glioblastómových kmeňových bunkách spája aktiváciu MAPK s transkripčným programom identity neurálnych kmeňových buniek. *Sci Rep* 2017; 7: 43605.
- [33] Strouse JJ, Ivniński-Steele I, Waller A, Young SM, Perez D, Evangelisti AM, Ursu O, Bologna CG, Carter MB, Salas VM, Tegos G, Larson RS, Oprea TI, Edwards BS a Sklar LA. Fluorescenčné substráty na prietokové cytometrické hodnotenie inhibície efluxu v transportéroch ABCB1, ABCC1 a ABCG2. *Anal Biochem* 2013; 437: 77-87.
- [34] Parashar D, Geethadevi A, McAllister D, Ebben J, Peterson FC, Jensen DR, Bishop E, Pradeep S, Volkman BF, Dwinell MB, Chaluvally-Raghavan P a James MA. Cílená biologická inhibícia vnútornej aj medzibunkovej rezistencie nádorových buniek na chemoterapeutiká sprostredkovaná CLPTM1L/CRR9. *NPJ Precis Oncol* 2021; 5: 16.
- [35] Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E a Tycko B. Tumor-supresorová aktivita H19 RNA. *Nature* 1993; 365: 764-767.
- [36] Luo L, Guan X, Begum G, Ding D, Gayden J, Hasan MN, Fiesler VM, Dodelson J, Kohanbash G, Hu B, Amankulor NM, Jia W, Castro MG, Sun B a Sun D. Blokáda regulačného proteínu objemu buniek NKCC1 zvyšuje apoptózu gliómov vyvolanú TMZ a znižuje astroglíozu. *Mol Cancer Ther* 2020; 19: 1550-1561.
- [37] Zablotskii V, Polyakova T, Lunov O a Dejneka A. Ako môže vysokogradientné magnetické pole ovplyvniť život buniek. *Sci Rep* 2016; 6: 37407.
- [38] Dmitrieva NI, Michea LF, Rocha GM a Burg MB. Oneskorenie bunkového cyklu a apoptóza ako odpoveď na osmotický stres. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 130: 411-420.
- [39] Guardia GDA, Correa BR, Araujo PR, Qiao M, Burns S, Penalva LOF a Galante PAF. Pro-neurálne a mezenchýmové gliómové kmeňové bunky vykazujú veľké rozdiely v profiloch spájania a In-cRNA. *NPJ Genom Med* 2020; 5: 2.
- [40] Lin N, Yan W, Gao K, Wang Y, Zhang J a You Y. Prevalencia a klinicko-patologická charakteristika molekulárnych podtypov malígneho gliómu: multiinštitucionálna analýza 941 prípadov. *PLoS One* 2014; 9: e94871.



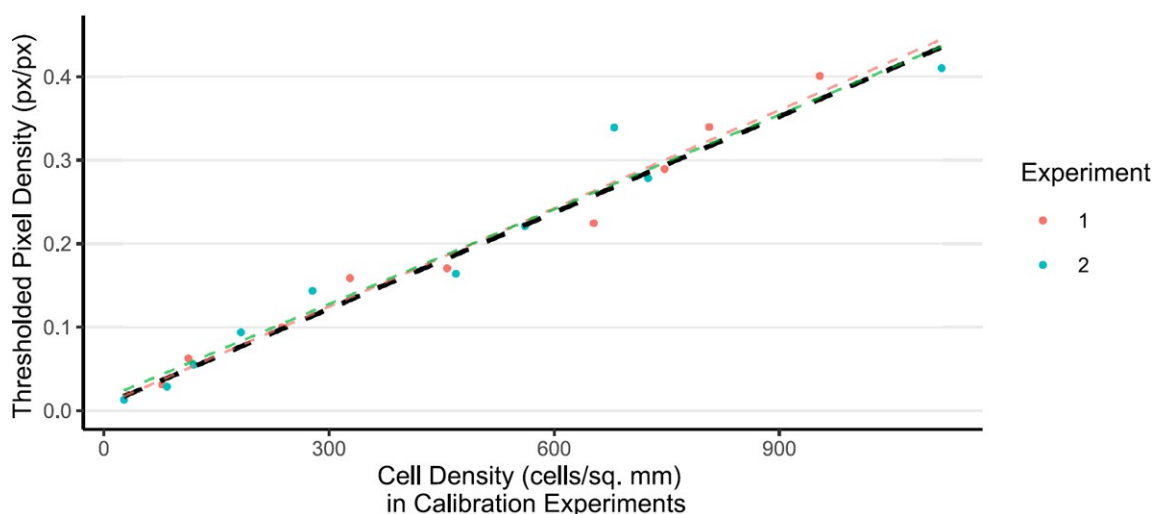
## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

- [41] Segerman A, Niklasson M, Haglund C, Bergstrom T, Jarvius M, Xie Y, Westermark A, Sonmez D, Hermansson A, Kastemar M, Naimaie-Ali Z, Nyberg F, Berglund M, Sundstrom M, Hesselager G, Uhrbom L, Gustafsson M, Larsson R, Fryknas M, Segerman B a Westermark B. Klonálna variabilita v odpovedi na lieky a žiarenie medzi bunkami iniciujúcimi glióm súvisí s proneurálno-mezenchymálnym prechodom. *Cell Rep* 2016; 17: 2994-3009.
- [42] Moloney JN a Cotter TG. Signalizácia ROS v biológii rakoviny. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 80: 50-64.
- [43] Prasad S, Gupta SC a Tyagi AK. Reaktívne oxýgéne formy (ROS) a rakovina: úloha antioxidantných nutraceutík. *Cancer Lett* 2017; 387: 95-105.
- [44] Lasky JL a Wu H. Signalizácia Notch, vývoj mozgu a ľudské choroby. *Pediatr Res* 2005; 57: 104R-109R.
- [45] Parmigiani E, Taylor V a Giachino C. Onkogénne a tumor-supresívne funkcie signalizácie NOTCH v glióme. *Cells* 2020; 9: 2304.
- [46] Lutolf S, Radtke F, Aguet M, Suter U a Taylor V. Notch1 je potrebný pre diferenciáciu neurónov a glií v mozočku. *Development* 2002; 129: 373-385.
- [47] Nye JS, Kopan R a Axel R. Aktivovaný Notch potláča neurogenézu a myogenézu, ale nie gliogenézu v bunkách cicavcov. *Development* 1994; 120: 2421-2430.
- [48] Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H a Honjo T. Notch1 a Notch3 inštruktívne obmedzujú bFGF-responzívne multipotentné neurálne progenitorové bunky na astrogliálny osud. *Neuron* 2001; 29: 45-55.
- [49] Giachino C, Boulay JL, Ivanek R, Alvarado A, Tostado C, Lugert S, Tchorz J, Coban M, Mariani L, Bettler B, Lathia J, Frank S, Pfister S, Kool M a Taylor V. A tumor suppressor function for Notch signaling in forebrain tumor subtypes. *Cancer Cell* 2015; 28: 730-742.
- [50] Chow RD, Guzman CD, Wang G, Schmidt F, Youngblood MW, Ye L, Errami Y, Dong MB, Martinez MA, Zhang S, Renauer P, Bilguvar K, Gunel M, Sharp PA, Zhang F, Platt RJ a Chen S. AAV-mediated direct in vivo CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nat Neurosci* 2017; 20: 1329-1341.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

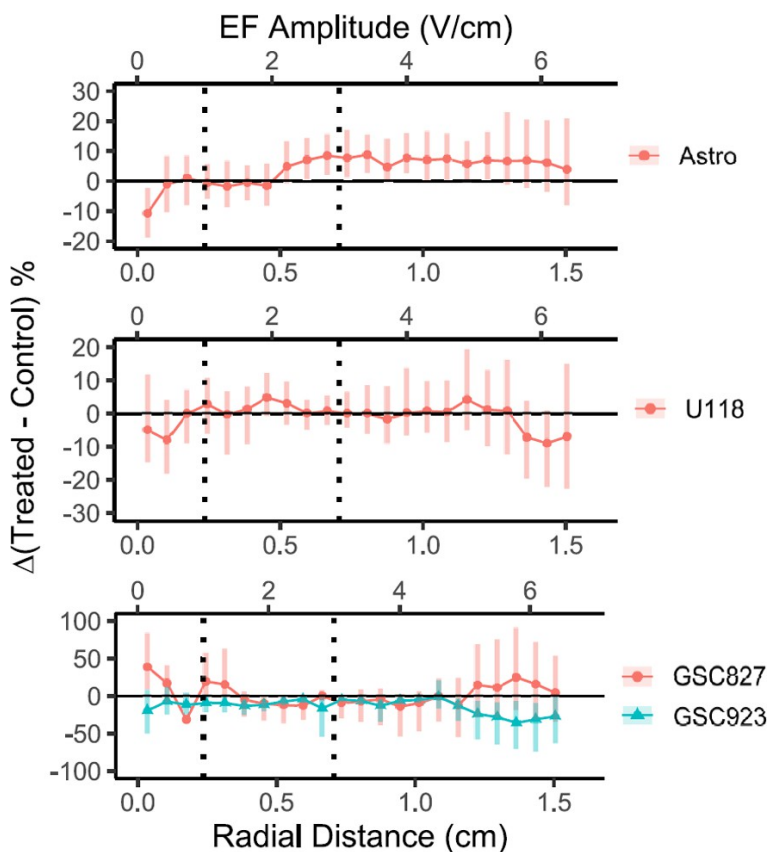


Obrázok S1. Vzorový obrázok celej misky z kontrolnej kultúry U118 (GFP). Všimnite si, že príslušenstvo zakrýva spodnú časť misky a že okraj z výroby misky zakrýva vonkajší okraj. Vylúčenie niektorých pásov, ako je znázornené na obrázku 2D, je odôvodnené týmito vlastnosťami misky.

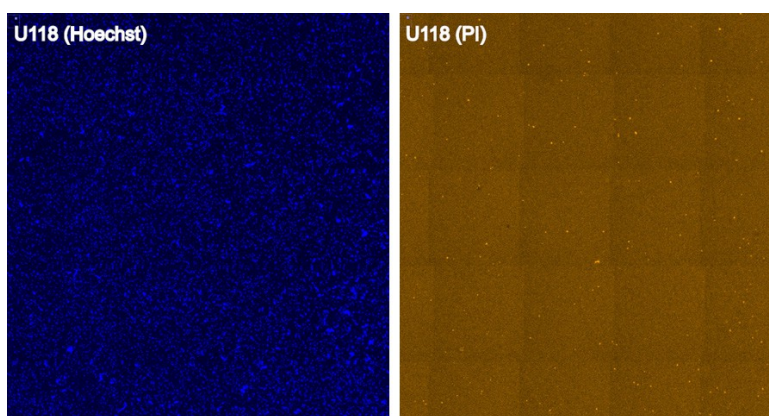


Obrázok S2. Kalibrácia počtu buniek U87 v porovnaní so segmentovanými px z expresie GFP. V samostatných kalibračných experimentoch sa použili rôzne počiatkové hustoty výsevu od  $1 \times 10^4$  do  $1 \times 10^5$  buniek na misku. Bunky sa oddelili pomocou Accutase, inkubovali sa 24 h a potom sa inkubovali ďalších 72 h. Na konci 72 h sa misky s bunkovou kultúrou skenovali pomocou konfokálneho zobrazovania, ako je opísané v hlavnom texte, a všetky bunky sa následne dvíhli a spočítali pomocou automatického počítadla buniek Countess™ II FL (Thermo Fisher). Konečná hustota buniek sa pohybovala od < 100 až 1200 buniek/m<sup>2</sup>. Vykonali sa dve série kalibračných experimentov s celkovým počtom 38 buniek a snímok. Na spracovanie obrázkov sa použil rovnaký postup ako v hlavnom texte, ale s pevnými prahovými hodnotami intenzity 0,06 a 0,51 (t. j. s udrжанím px medzi prahovými hodnotami) a bez binovania. Kombináciou týchto dvoch experimentov sa získala lineárna zhoda (čierna prerušovaná čiara) medzi hustotou buniek a prahovou hustotou px:  $[Hustota Px] = 3,84 \times 10^{-4} [Hustota buniek] + 1,1 \times 10^{-2}$ ,  $R^2 = 0,96$ . Jednotlivé prispôbenia pre každú sadu experimentov sú tiež zobrazené.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

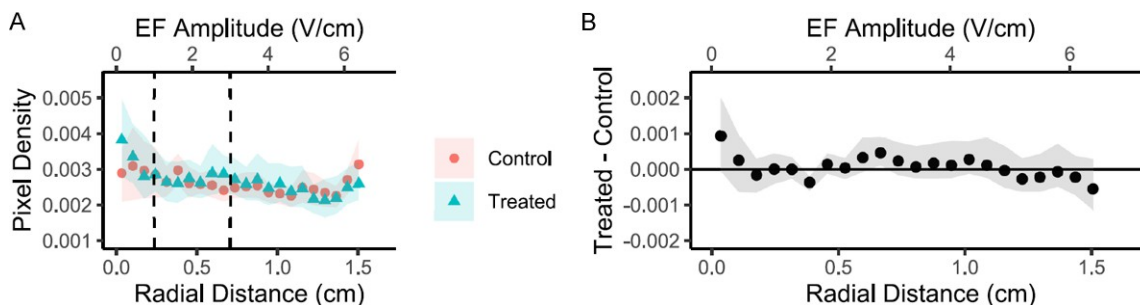


Obrázok S3. Zmeny hustoty buniek merané pomocou segmentovaných hustôt px získaných z farbenia Hoechst. Vykonal sa rovnaká zobrazovacia pipeline, ako je opísaná v hlavnom texte. Všimnite si, že účinok pozorovaný pre GSC827 v hlavnom texte mizne. Pre U87 sa farbenie Hoechstom nevykonalo.

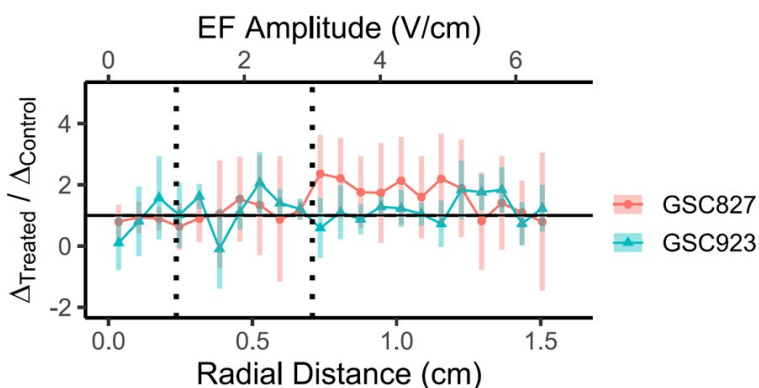


Obrázok S4. Príklady ROI z farbenia Hoechstom a jodidom propídia (PI) v ošetrenej bunkovej kultúre U118. Všimnite si riedke farbenie PI v porovnaní s farbením Hoechst. Farbenie PI (V13241; Thermo Fisher Scientific) sa vykonalo po zobrazení GFP. Na konci experimentov a 5 minút pred zobrazením pod mikroskopom sa z misiek odobralo 750  $\mu$ l DMEM a zmiešalo sa s 0,5  $\mu$ l zásobného roztoku 1 mg/ml a pridalo sa späť do misiek na konečnú koncentráciu  $2 \times 10^{-4}$  mg/ml. Farbenie PI sa vykonalo v  $N = 12$ , resp. 9 pároch kultúr U118 a U87. Vo všetkých takýchto prípadoch sa našlo len málo alebo žiadne mŕtve bunky a ďalšie štatistické analýzy sa nevykonávali.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

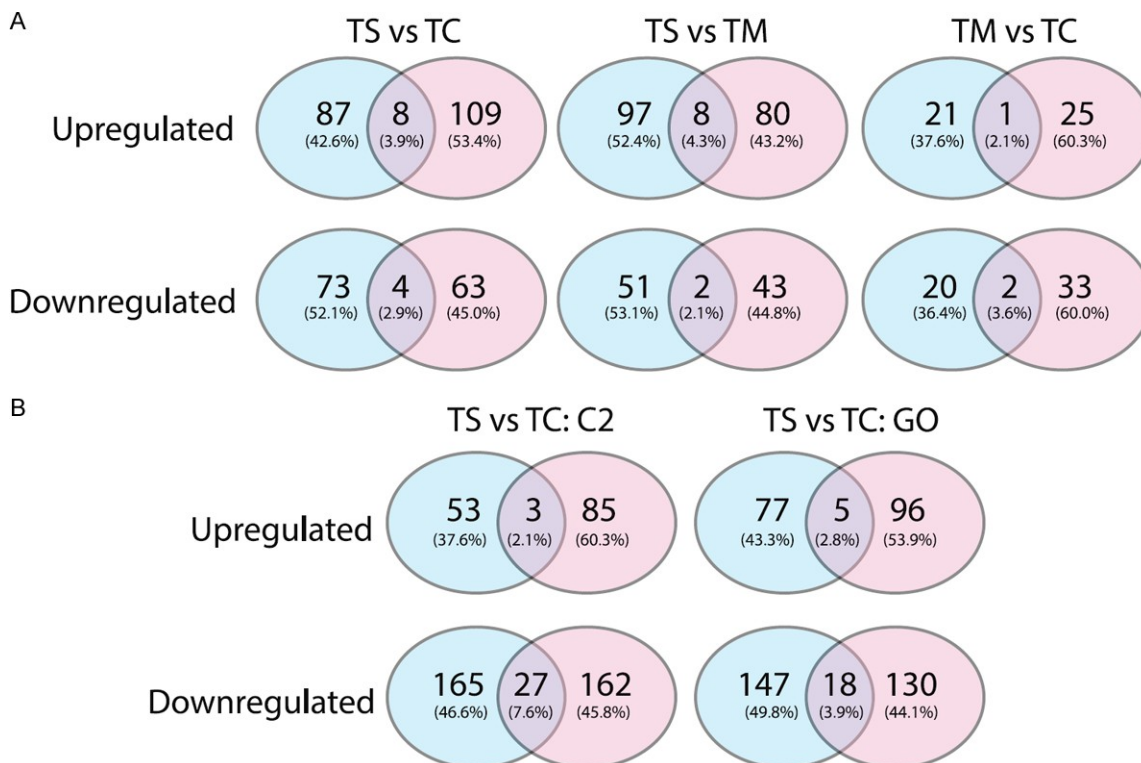


Obrázok S5. Výsledky farbenia aneXinom V v bunkových kultúrach U118. Farbenie Alexa Fluor™ 594 (A13203 Invitrogen) sa vykonalo s 10  $\mu$ l Annexinu V v 200  $\mu$ l DMEM počas 10 minút - pred zobrazením sa 2 $\times$  premylo 750  $\mu$ l DMEM. Vykonali sa štyri experimenty. Jeden experiment bol vylúčený z dôvodu veľkého množstva šumu na okraji misky, celkovo bolo vykonaných 9 porovnaní medzi miskami. A. Hustota segmentov px sa vypočítala pomocou rovnakého postupu spracovania obrazu, ako je opísané v hlavnom texte, s výnimkou toho, že otvorenie plochy sa vykonalo pre menšiu veľkosť 2 px. Chybové úsečky = 90 % intervaly spoľahlivosti z 1000 opakovaných vzorkovaní. Hodnoty hustoty px neboli pre túto analýzu normalizované. B. Rozdiel medzi ošetrovanými a kontrolnými kultúrami z hľadiska hrubej hustoty px. Chybové úsečky = 90 % intervaly spoľahlivosti z bootstrapovaných párových rozdielov s 1000 opakovanými vzorkovaniami.



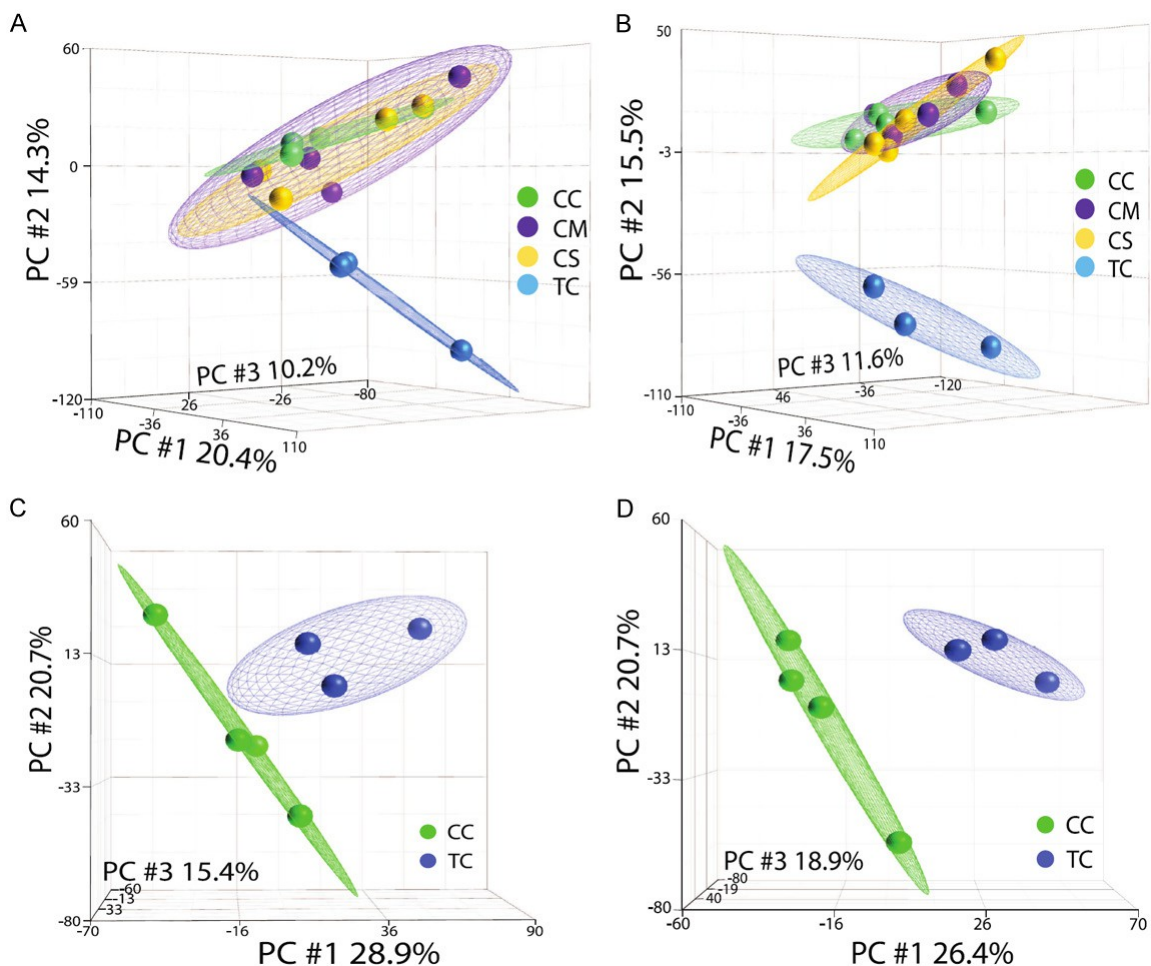
Obrázok S6. Analýza čerpania Hoechstu podľa opisu v hlavnom texte. Odľahlé hodnoty s pomerom presahujúcim absolútnu hodnotu 10 (vznikajúce v dôsledku malých hodnôt  $\Delta$ ) boli vylúčené pre celkové vylúčenie 31/638 dátových bodov ( $\approx$  5 %). V prípade oboch bunkových línií sa nepozoroval žiadny rozdiel v zjavnej aktivite čerpania.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

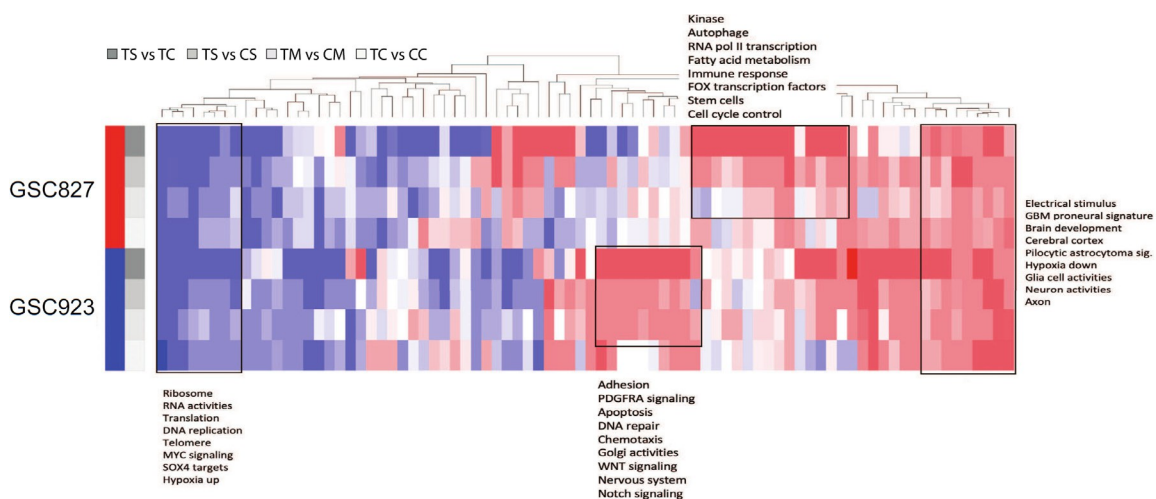


Obrázok S7. Dve línie gliómových kmeňových buniek, GSC827 a GSC923, sú transkriptomicky odlišné. A. Vennove diagramy hore/dole regulovaných génov vo všetkých troch kontrastoch: TS vs. TC, TS vs. TM a TM vs. TC. Azúrová farba predstavuje diferenciálne exprimované gény v GSC827 a ružová farba predstavuje GSC923. B. Vennov diagram súborov up/down regulovaných génov v GSEA s použitím databáz MSigDB C2 a C5.

## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

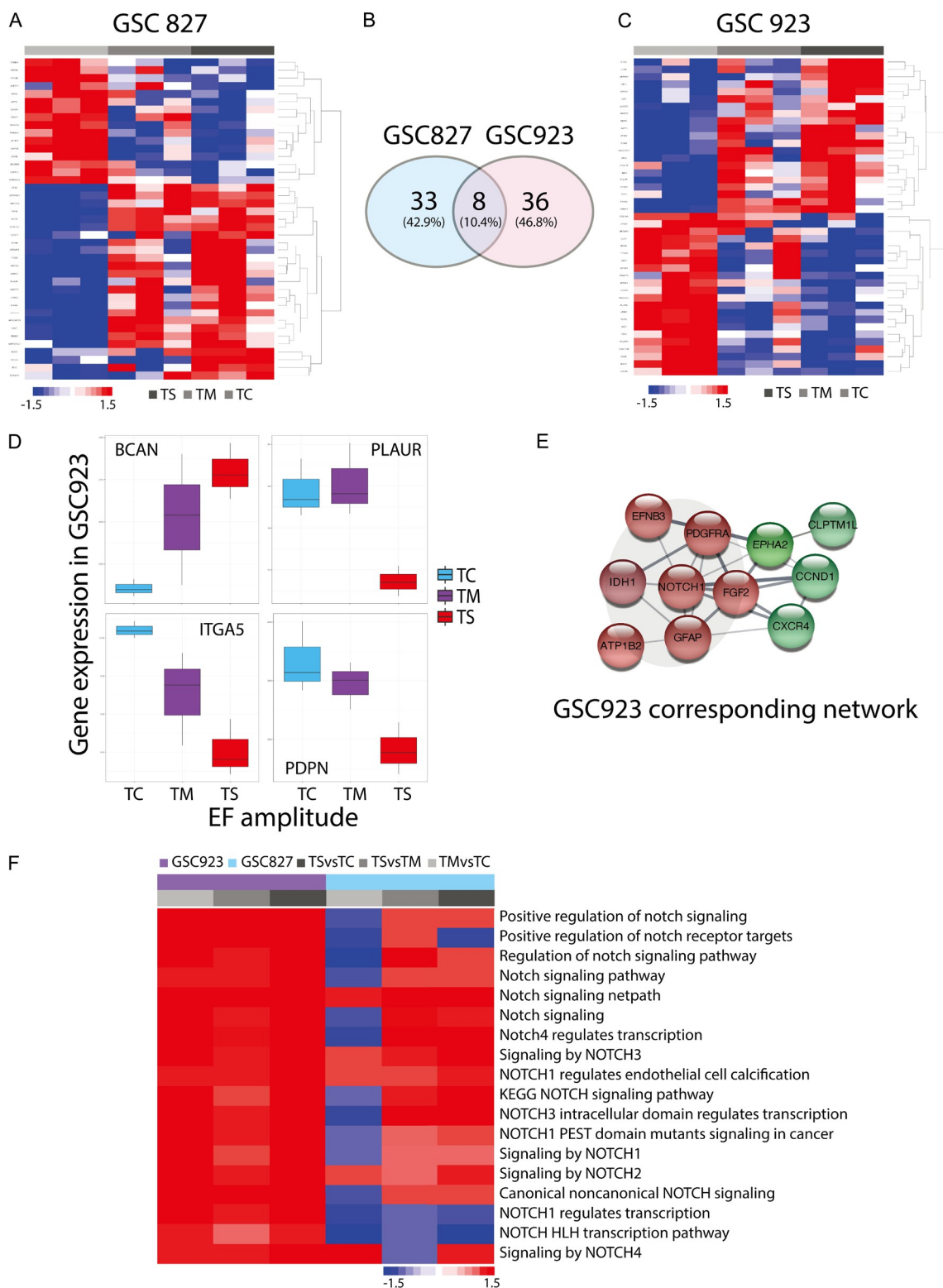


Obrázok S8. Rozdiely medzi ošetrovaným centrom (TC) a kontrolnými oblasťami misiek (CC, CM, CS). A, C. PCA bez dohľadu GSC827. B, D. PCA GSC923 bez dohľadu. Všimnite si rozdiel medzi TC a CC v oboch bunkových líniách.



Obrázok S9. Funkčné zhrnutie TS vs. TC, TS vs. CS, TM vs. CM a TC vs. CC v oboch bunkových líniách, GSC827 a GSC923.

# Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok S10. Expresia mezenchýmových a proneurálnych znakov a obohatenie génovej sady signalizácie NOTCH. A-C. PN a MES signatúra ovplyvnená amplitúdou EF v GSC827 (vľavo) a GSC923 (vpravo). D. Vybrané génové ex-pressie PN a MES signatúry v GSC923. E. Zodpovedajúca sieťová analýza pre GSC923. Červené uzly sa vzťahujú na regulované gény a zelené uzly sa vzťahujú na regulované gény. F. Obohatená expresia súborov génov signalizácie NOTCH v GSC827 a GSC923.

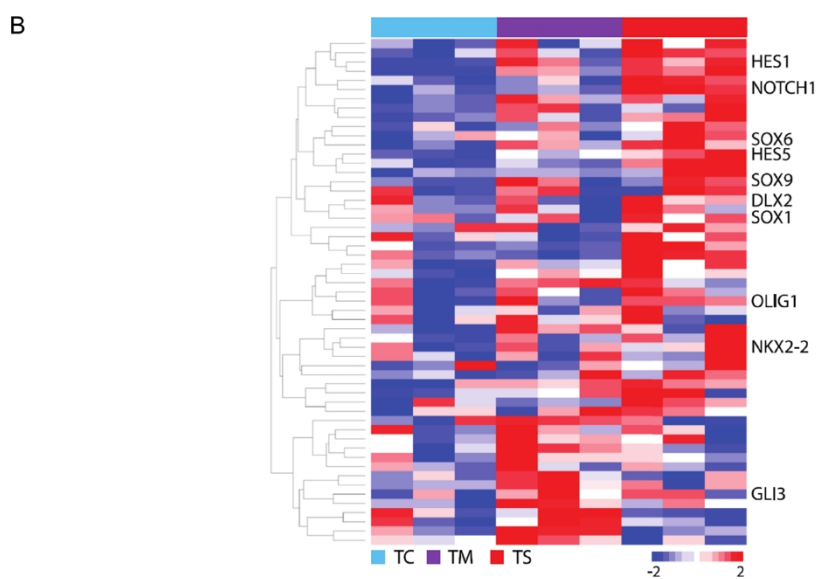
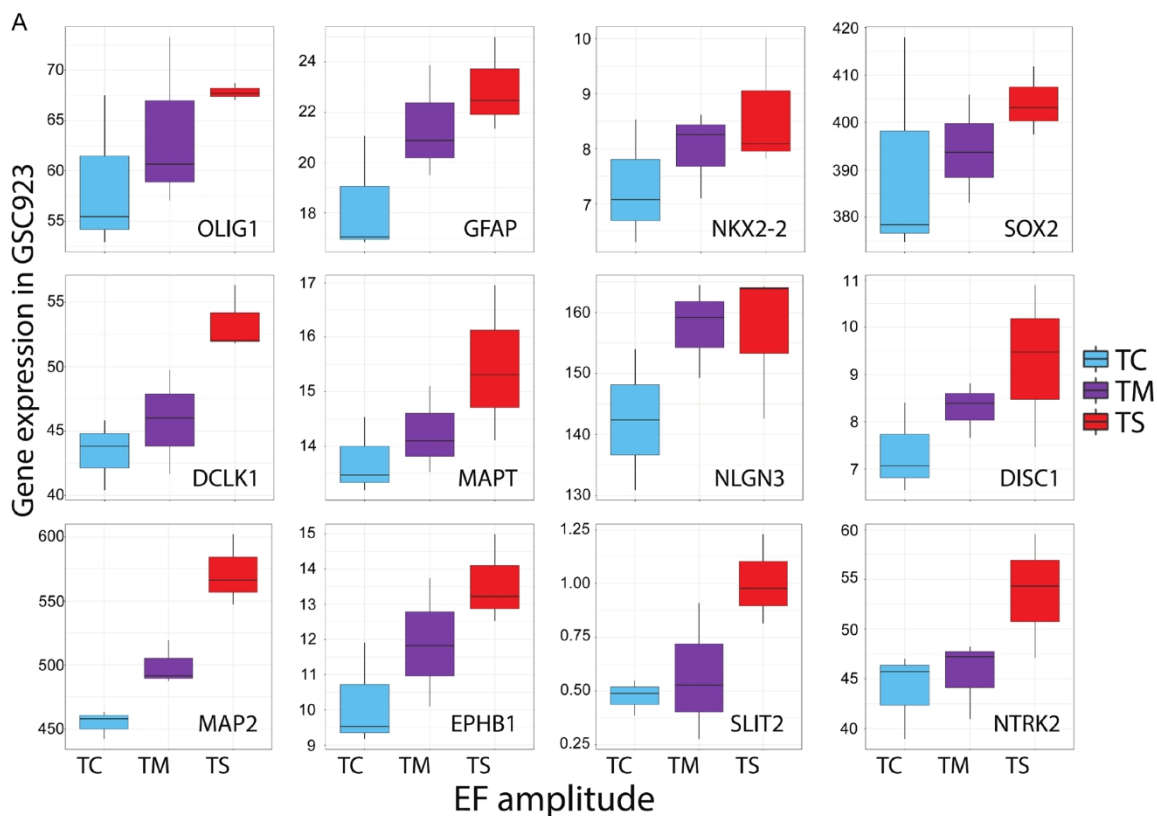
## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky

Tabuľka S1. Súbory génov bunkového cyklu ovplyvnené amplitúdou EF v GSC827

Súborgénov	TS vs. TC	p-val	TS vs. TM	p-val	TM vs. TC	p-val
POZITÍVNA_REGULÁCIA_ZASTAVENIA_CELKOVÉHO_CYKLU	1.42	< 0.01	1.15	0.19	1.40	< 0.01
RTM_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	-0.82	0.82	-1.30	< 0.01	1.57	< 0.01
RTM_G2_M_CHECKPOINTS	-0.89	0.63	-1.41	< 0.01	1.60	< 0.01
RTM_G1S_DNA_DAMAGE_CHECKPOINTS	1.11	0.26	-1.11	0.35	1.75	< 0.01
TP53_REGULUJE_GENE_TRANSCRIPTION_IN_G2_CELL_CYCLE_ARREST	1.20	0.34	-1.10	0.30	1.95	< 0.01
KEGG_CELL_CYCLE	-0.97	0.62	-1.49	< 0.01	1.32	0.05
FISCHER_G1_S_CELL_CYCLE	1.17	0.10	-0.98	0.31	1.36	< 0.01
RTM_MEIOSIS	0.76	0.77	-1.28	0.11	1.41	< 0.01
RTM_S_PHASE	-1.03	0.38	-1.37	< 0.01	1.48	< 0.01
RTM_MITOTIC_METAPHASE_AND_ANAPHASE	-0.10	0.53	-1.38	< 0.01	1.51	< 0.01
RTM_CYCLIN_A_CDK2_ASSOCIATED_EVENTS_AT_S_PHASE_ENTRY	0.46	0.90	-1.089	0.24	1.53	< 0.01
RTM_SEPARATION_OF_SISTER_CHROMATIDS	-0.91	0.74	-1.37	< 0.01	1.57	< 0.01
WHITFIELD_CELL_CYCLE_LITERATURE	-0.56	0.74	-1.00	0.40	1.72	< 0.01
GOCC_ANAPHASE_PROMOTING_COMPLEX	-0.68	0.91	-1.05	0.27	1.42	< 0.01
RTM_MEIOTIC_RECOMBINATION	1.10	0.3	-1.06	0.39	1.76	< 0.01
RTM_GTSE1_IN_G2_M_PROGRESSION_AFTER_G2_CHECKPOINT	-0.84	0.70	-1.27	0.31	1.61	< 0.01
RTM_APC_C_SPROSTREDKOVANÁ_DEGRADÁCIA_PROTEÍNOV_CELULÁRNE HO_CYKLU	-0.60	0.81	-1.24	0.21	1.68	< 0.01



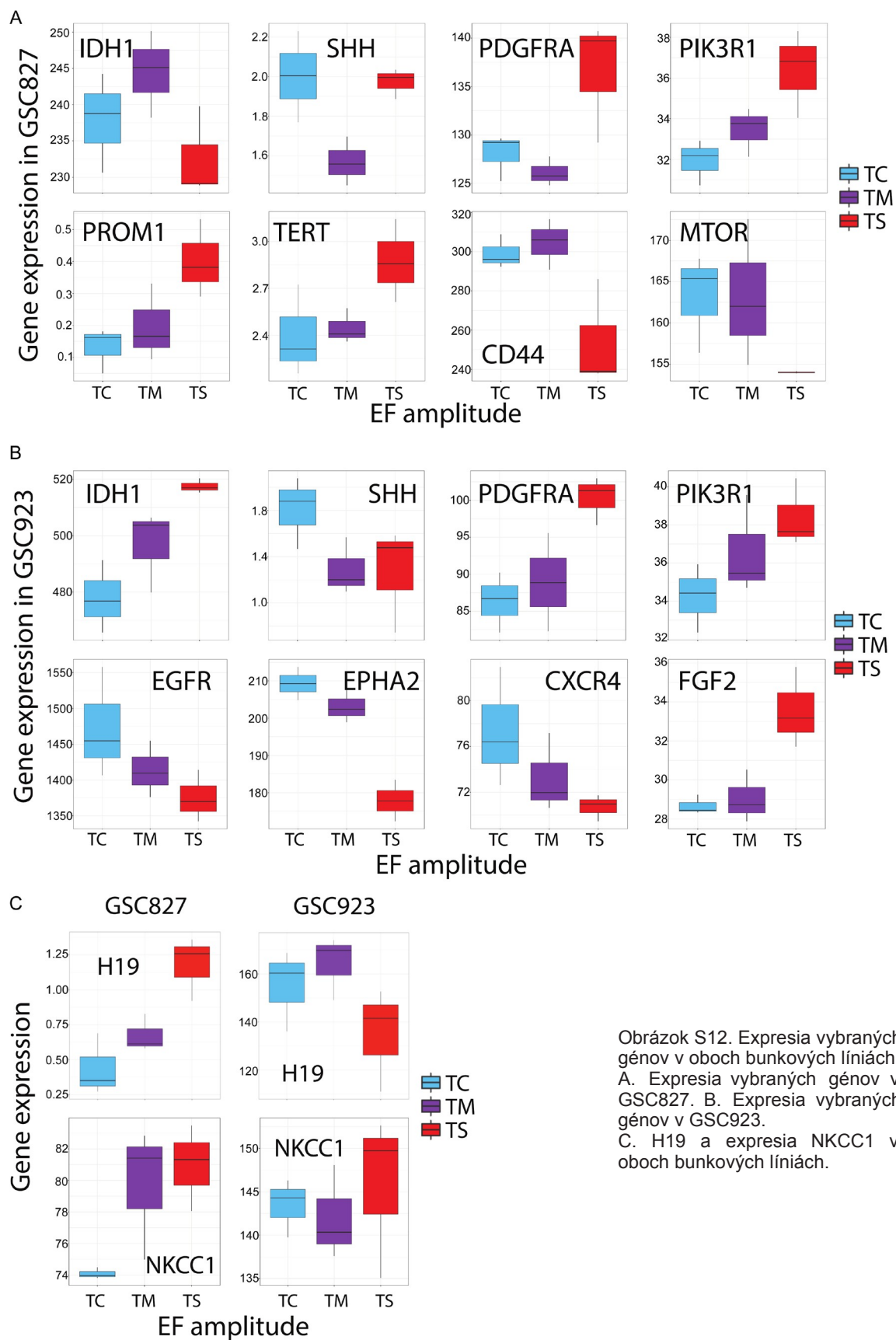
## Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok S11. Vybrané génové expresie súvisiace s diferenciáciou mozgových buniek, činnosťou neurónov a vývojom mozgu.

A. Expresia vybraných génov, ktoré sa podieľajú na činnosti neurónov a vývoji mozgu a ktoré pozitívne korelujú s amplitúdou EF (t. j. oblasti misiek: TS > TM > TC) v GSC923. B. Kontrolované hierarchické zoskupovanie génov zapojených do diferenciácie mozgových buniek v GSC923.

# Odhalenie heterogénnych účinkov liečebných polí na gliómové bunky



Obrázok S12. Expresia vybraných génov v oboch bunkových líniách. A. Expresia vybraných génov v GSC827. B. Expresia vybraných génov v GSC923. C. H19 a expresia NKCC1 v oboch bunkových líniách.