

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Rūta Skredėnienė

**VAISTINIŲ PREPARATŲ POVEIKIS
GLIOBLASTOMOS LĄSTELIŲ AUGIMUI,
INVAZIJAI IR MOLEKULINIAMS
ŽYMENIMS *IN VIVO* IR *IN VITRO***

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai,
biologijos mokslo kryptis (N 010)

Kaunas, 2026

Disertacija rengta 2019–2025 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Histologijos ir embriologijos katedroje.

Mokslinė vadovė

prof. dr. Ingrida Balnytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologijos mokslo kryptis – N 010).

Konsultantas

prof. habil. dr. Donatas Stakišaitis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. dr. Juozas Kupčinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologijos mokslo kryptis – N 010).

Nariai:

prof. dr. Dainius Haroldas Pauža (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologijos mokslo kryptis – N 010);

dr. Paulina Vaitkienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologijos mokslo kryptis – N 010);

doc. dr. Audrius Dulskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Mara Pilmane (Rygos Stradinio universitetas, gamtos mokslai, biologijos mokslo kryptis – N 010).

Disertacija bus ginama viešajame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2026 m. rugpjūčio mėn. 27 d. 14 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos centrinių rūmų prof. J. Žilinsko auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: A. Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Rūta Skredėnienė

**THE EFFECT OF MEDICINAL
PREPARATIONS ON GLIOBLASTOMA
CELL GROWTH, INVASION AND
MOLECULAR MARKERS
*IN VIVO AND IN VITRO***

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biology (N 010)

Kaunas, 2026

Dissertation has been prepared at the Department of Histology and Embryology of the Faculty of Medicine of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2019–2025.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Ingrida Balnytė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Consultant

Prof. Habil. Dr. Donatas Stakišaitis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation is defended at the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Juozas Kupčinskas (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Prof. Dr. Dainius Haroldas Pauža (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Dr. Paulina Vaitkienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Assoc. Prof. Dr. Audrius Dulskas (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Mara Pilmane (Riga Stradiņš University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences at 2 p. m. on the 27th of August, 2026, in the Auditorium of Prof. J. Žilinskas, Central Building, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences.

Address: A. Mickevičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
IVADAS.....	9
Darbo tikslas	10
Darbo uždaviniai.....	10
Darbo naujumas ir aktualumas.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Glioma.....	13
1.2. Glioblastoma	15
1.3. Glioblastomos imunohistocheminio tyrimo žymenys.....	19
1.3.1. Glijos fibrilinis rūgštis baltymas (GFRB).....	19
1.3.2. Proliferuojančių ląstelių branduolių antigenas (PLBA).....	20
1.3.3. p53	22
1.3.4. Zeste homologo 2 stipriklis (EZH2)	23
1.3.5. Vimentinas	24
1.4. Su GBM raida susijusių genų raiškos tyrimo žymenys.....	25
1.4.1. NKCC1 nešiklis	25
1.4.2. KCC2 nešiklis	27
1.4.3. SLC5A8 nešiklis	28
1.4.4. E-kadherinas ir N-kadherinas.....	29
1.5. Natrio dichloroacetato farmakologinis poveikis	31
1.6. Valpro rūgšties farmakologinis poveikis.....	33
1.7. DCA–VPA farmakologinis poveikis.....	34
1.8. DCA ir VPA farmakokinetinis poveikis	35
1.9. DCA ir VPA praėjimas pro hematoencefalinį barjerą: palyginimas su kitų GBM gydyti vaistų farmakokinetikos rodikliais.....	36
1.10. Glioblastomos patogenezės ryšys su uždegimu	39
1.11. DCA–VPA priešuždegiminis poveikis	41
1.12. Viščiuko embriono chorioalantojinės membranos (CAM) modelis	43
2. METODIKA	46
2.1. Glioblastomos ląstelių linijų tyrimai <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i>	47
2.1.1. Glioblastomos U87 ir T98G ląstelių <i>in vivo</i> tyrimo grupės ir atlikti tyrimai.....	47
2.1.2. Glioblastomos U87 ir T98G ląstelių <i>in vitro</i> tyrimo grupės ir atlikti tyrimai	47
2.2. GBM pacientų naviko pirminių ląstelių tyrimai <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i>	47
2.2.1. GBM pacientų klinikiniai duomenys	47
2.2.2. GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM tyrimo grupės ir atlikti tyrimai	48
2.2.3. GBM pacientų pirminių ląstelių genų raiškos tyrimo <i>in vitro</i> grupės ir atlikti tyrimai	49
2.2.4. Ependimomos paciento pirminių ląstelių <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> atlikti tyrimai	49
2.3. GBM ląstelių linijų ląstelių paruošimas tyrimui	49
2.4. Pirminių GBM naviko ląstelių paruošimas tyrimui	50
2.5. CAM modelio taikymas GBM ląstelių suformuotiems navikų tyrimams	50

2.6.	Histologinių ir imunohistocheminių preparatų paruošimas	52
2.7.	GBM ląstelių navikų invazijos į CAM, CAM storio, kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku ir žymenų imunohistocheminis vertinimas	53
2.8.	GBM ląstelių vaistinio preparato poveikio <i>in vitro</i> genų raiškos tyrimai	54
2.9.	Statistinė analizė.....	55
3.	TYRIMŲ REZULTATAI.....	56
3.1.	Skirtingų NaDCA dozių poveikio U87 ir T98G ląstelių navikams ant CAM tyrimų duomenys.....	56
3.1.1.	U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos duomenų vertinimas.....	56
3.1.2.	U87 ir T98G ląstelių navikų invazijos dažnumo į CAM ir CAM storio po naviku vertinimas	59
3.1.3.	U87 ir T98G ląstelių navikų neoangiogenezės ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku vertinimas.....	61
3.2.	NaDCA poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA, p53 ir EZH2 raiškai tyrimų duomenys.....	65
3.2.1.	U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM PLBA raiška.....	65
3.2.2.	U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM p53 raiška	66
3.2.3.	U87 ir T98G ląstelių navikų EZH2 raiška	69
3.3.	NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikams ant CAM palyginamųjų tyrimų duomenys.....	72
3.3.1.	U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos duomenų vertinimas.....	72
3.3.2.	U87 ir T98G ląstelių navikų invazijos dažnumo ir CAM storio duomenys	75
3.3.3.	U87 ir T98G ląstelių navikų neoangiogenezės ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku duomenys	78
3.4.	NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA, p53 ir EZH2 raiškai tyrimų duomenys.....	84
3.4.1.	NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA raiškai duomenys	84
3.4.2.	NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų p53 raiškai duomenys	87
3.4.3.	NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų EZH2 raiškai duomenys	90
3.5.	NaDCA, NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikis U87 ir T98G ląstelių genų raiškai: <i>in vitro</i> palyginamųjų tyrimų duomenys	93
3.5.1.	Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių <i>SLC12A2</i> raiškai	93
3.5.2.	Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių <i>SLC12A5</i> raiškai	96
3.5.3.	Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių <i>SLC5A8</i> raiškai	98
3.5.4.	Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių <i>CDH1</i> raiškai	99
3.5.5.	Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių <i>CDH2</i> raiškai	100
3.6.	NaVPA–NaDCA poveikio pacientų pirminių glioblastomos ląstelių navikams ant CAM tyrimų duomenys	102
3.6.1.	Pirminių glioblastomos ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos duomenų vertinimas	102
3.6.2.	Pirminių glioblastomos ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumo, CAM storio po naviku ir neoangiogenezės vertinimas	108

3.7. NaVPA–NaDCA poveikio pacientų pirminių glioblastomos ląstelių navikų GFRB, PLBA, p53, EZH2 ir vimentino raiškai tyrimų duomenys	111
3.7.1. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM GFRB raiška	111
3.7.2. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM PLBA raiška.....	114
3.7.3. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM p53 raiška	116
3.7.4. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM EZH2 raiška	118
3.7.5. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM vimentino raiška.....	120
3.8. NaVPA–NaDCA poveikio pacientų pirminių glioblastomos ląstelių genų raiškai: <i>in vitro</i> tyrimų duomenys.....	122
3.8.1. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių <i>SLC12A2</i> raiškai	122
3.8.2. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių <i>SLC12A5</i> raiškai	125
3.8.3. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių <i>SLC5A8</i> raiškai	126
3.8.4. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių <i>CDH1</i> raiškai.....	128
3.8.5. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių <i>CDH2</i> raiškai.....	130
3.9. NaVPA–NaDCA poveikio pirminių ependimomos ląstelių navikams ant CAM ir ląstelių genų raiškai tyrimų duomenys	132
3.9.1. NaVPA–NaDCA poveikis pirminių ependimomos ląstelių navikams ant CAM.....	132
3.9.2. NaVPA–NaDCA poveikis pirminių ependimomos ląstelių <i>SLC12A2</i> , <i>SLC12A5</i> , <i>SLC5A8</i> , <i>CDH1</i> ir <i>CDH2</i> raiškai	134
4. REZULTATŲ APTARIMAS	137
4.1. Tiriamųjų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G navikams ant CAM bei U87 ir T98G ląstelėms	139
4.2. NaVPA–NaDCA individualaus poveikio pacientų pirminių GBM ląstelių navikams ant CAM ir GBM pirminėms ląstelėms <i>in vitro</i> tyrimo duomenų palyginimas	144
IŠVADOS	152
SUMMARY	153
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS.....	170
PASKELBTOS PUBLIKACIJOS	205
STRAIPSNIAI, KURIUOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI	208
PRIEDAI.....	275
CURRICULUM VITAE	276
PADĖKA	277

SANTRUMPOS

CAM	– viščiuko embriono chorioalantojinė membrana
CDH1	– E-kadheriną koduojantis genas
CDH2	– N-kadheriną koduojantis genas
CT	– slenkstinis ciklas (angl. <i>threshold cycle</i>)
DCA	– dichloroacetatas
EMT	– epitelinė–mezenchiminė transformacija (angl. <i>the epithelial–mesenchymal transition</i>)
EP2-1M	– 62 m. paciento pirminės supratentorinės ependimomos ląstelės
EVP	– embriono vystymosi para
EZH2	– zeste homologo 2 stipriklis (angl. <i>enhancer of zeste homolog 2</i>)
GABA	– gama aminosviesto rūgštis (angl. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GAPDH	– glicerinaldehido-3-fosfato dehidrogenazės genas
GBM	– glioblastoma
GBM2-2F	– 48 m. pacientės pirminės glioblastomos ląstelės
GBM2-3F	– 82 m. pacientės pirminės glioblastomos ląstelės
GBM2-4M	– 46 m. paciento pirminės glioblastomos ląstelės
GBM2-5F	– 68 m. pacientės pirminės glioblastomos ląstelės
GBM2-6M	– 76 m. paciento pirminės glioblastomos ląstelės
GFRB	– glijos fibrilinis rūgštinis baltymas (angl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> ; GFAP)
HDAC	– histonų deacetilazė
H-E	– hematoksilinas ir eozinas
HIF1	– hipoksiją sukeliantis veiksnys 1
IDH	– izocitrato dehidrogenazė
IHC	– imunohistochemija
IL	– interleukinas
KCC2	– K-Cl nešiklis, kuris perneša K ⁺ ir Cl ⁻
MGMT	– metilguanino metiltransferazė (angl. <i>methylguanine methyltransferase</i>)
NaDCA	– natrio dichloroacetatas
NaVPA	– natrio valproatas
NKCC1	– Na-K-Cl nešiklis, kuris perneša Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻
OKSFOS	– oksidacinis fosforilinimas (angl. <i>oxidative phosphorylation</i> ; OXPHOS)
PDH	– piruvato dehidrogenazė
PDK	– piruvato dehidrogenazės kinazė
PLBA	– proliferuojančios ląstelės branduolio antigenas (angl. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
RTK	– tirozino kinazė
SLC12A2	– Na-K-Cl nešiklį (NKCC1) koduojantis genas
SLC12A5	– K-Cl nešiklį (KCC2) koduojantis genas
SLC5A8	– su Na ⁺ susijęs monokarboksilatų nešiklį (SLC5A8) koduojantis genas
T98G	– vyro glioblastomos ląstelių linija
TMZ	– temozolomidas
U87	– U-87 MG moters glioblastomos ląstelių linija
VEGF	– kraujagyslių endotelio augimo veiksnys
VPA	– valpro rūgštis
NaVPA–NaDCA	– natrio valproato ir natrio dichloroacetato darinys

IVADAS

Labiausiai paplitęs piktybinis smegenų navikas yra glioblastoma (GBM). GBM sudaro apie 50 proc. visų piktybinių centrinės nervų sistemos (CNS) navikų [1, 2] ir apie 2 proc. vaikų, sergančių visų tipų smegenų navikais [3]. GBM apima pirminius (*de novo*) ir antrinius navikus, išsivysčiusius iš žemo laipsnio astrocitomos arba oligodendrogliomos potipių. GBM gali atsirasti bet kuriuo amžiaus tarpsniu. Ši liga dažniau nustatoma vyresnio amžiaus žmonėms [4, 5], dažniau diagnozuojama vyrams [6]. Yra žinomi su lytimi susiję išgyvenamumo trukmės po GBM diagnozės skirtumai [7, 8]. Suaugusiųjų GBM sergamumas didžiausias yra 65–74 metų amžiaus grupėje, vidutinis amžius – 65 metai, o bendras išgyvenamumas po diagnozės nustatymo – 8–15 mėnesių [5, 9, 10]. Suaugusiųjų IV laipsnio (pagal PSO – Pasaulio sveikatos organizacija), IDH (izocitrato dehidrogenazė) laukinio tipo GBM, klasifikuojama kaip pirminė, dažniausia, agresyvi ir heterogeninė smegenų vėžio forma, lemianti blogą prognozę, nes iki šiol nėra sukurta veiksmingo GBM gydymo.

Dabartinis standartinis gydymo režimas apima maksimalų naviko chirurginį pašalinimą, papildomą gydymą temozolomidu (TMZ) ir radioterapiją [11–13]. TMZ 2005 m. registruotas naujai diagnozuotai GBM gydyti [14, 15]. Individualus TMZ veiksmingumas priklauso nuo atsparumo TMZ atsiradimo, kuris lemia GBM atkrytį ir blogą GBM prognozę [16]. Penkerių metų 55–64 amžiaus GBM pacientų išgyvenamumas yra apie 6 proc. [17]. Gydant GBM po operacijos, TMZ pridėjimas kartu su radioterapija padidino bendrą išgyvenamumą 2 mėnesiais [18], o išgyvenamumo be ligos progresavimo trukmė – 6 mėnesiai. Daugiau nei 50 proc. GBM sergančių pacientų TMZ gydymas yra neveiksmingas [19, 20]; 70 proc. pacientų liga po gydymo progresuoja per pirmuosius metus, o GBM 5 metų išgyvenamumas yra vienas iš trumpiausių tarp visų vėžio rūšių [15].

Individualizuoto GBM gydymo pažanga yra glaudžiai susijusi su standartiniu gydymu, tiriamos naujos gydymo strategijos, pavyzdžiui, chemoterapija, naudojant vaistus, pritaikytus naviko molekulinėms ir metabolinėms savybėms [21, 22]. Labai svarbu suprasti vaistų veikimo mechanizmą ir atsparumo gydymui priežastis, padidinti GBM gydymo veiksmingumą, vertinant vaistų poveikį vėžio prognozę žymenų pokyčiams [16, 23].

Būtina sukurti kuo veiksmingesnius ir individualizuotus ikiklinikinius modelius tiek standartiniams, tiek naujiems gydymo metodams taikyti dar iki chemoterapijos paskyrimo [15]. Vaistų, kuriais gydant GBM pagerėja pacientų išgyvenamumas, farmakologinis poveikis yra susijęs su naviko ląstelių proliferacijos slopinimu [24]. Uždegiminė GBM naviko mikroaplinka, kuriai

būdingas prouždegiminių citokinų ir chemokinų išsiskyrimas, taip pat uždegiminių kelių aktyvinimas, skatina naviko piktybinį augimą [25]. Uždegimas ir imuninis atsakas yra tiesiogiai susiję su GBM progresavimu, o jų reguliavimo sutrikimas susijęs su GBM didesniu atsparumu gydymui ir blogesniais rezultatais [26, 27]. NaVPA (natrio valproato) ir NaDCA (natrio dichloroacetato) derinys slopina uždegiminius ir imuninius procesus, susijusius su GBM atsiradimu [28, 29].

GBM ląstelėms būdinga nuslopinta apoptozė ir ląstelių mirtis [30]. Pagrindinis vaistų poveikis GBM yra susijęs su naviko ląstelių proliferacijos slopinimu ir apoptozės aktyvinimu [24]. Būtina rasti būdą, kaip sumažinti GBM ląstelių atsparumą gydymui. GBM ląstelėms būdingas oksidacinis fosforilinimas OKSFOS (angl. *oxidative phosphorylation*; OXPHOS), o OKSFOS dažnai yra vėžio kamieninių ląstelių ir chemoterapijai atsparių ląstelių požymis. OKSFOS funkcijos slopinimas (*in vitro* ir *in vivo* tyrimai) taip pat gali paveikti naviko ląstelių išgyvenamumą, naviko mikroaplinką, sumažinant hipoksiją, ir pagerinti priešnavikinį imuninį atsaką, o tai lemia veiksmingą GBM gydymą [31, 32]. Aktyvinti glikolitiniai procesai būdingi GBM ląstelėms [33]. GBM ląstelėms būdingas padidėjęs piruvato dehidrogenazės kinazės (PDK) raiškos lygis, didinantis glikolizės aktyvumą [33–35]. Vienas iš šių dienų GBM gydymo tikslų yra PDK aktyvumo slopinimas, mažinantis su kancerogeneze susijusį glikolizės aktyvumą [36].

Eksperimentinių NaVPA ir NaDCA derinio poveikio GBM raidai tyrimų tikslas – nustatyti, ar šis derinys turi sinerginį poveikį, ar leidžia sumažinti vaistų dozę, palyginti su TMZ poveikiu GBM ląstelėms bei jų navikams, suformuotus navikus tiriant CAM (viščiuko embriono chorioalantojinės membranos) modeliu.

Darbo tikslas

Nustatyti natrio dichloroacetato (NaDCA) ir natrio valproato–NaDCA derinio (NaVPA–NaDCA) poveikį glioblastomos (GBM) ląstelių linijų ir pacientų GBM pirminių ląstelių navikų raidai *in vivo* ir jų ląstelėms *in vitro*.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti NaVPA–NaDCA poveikį navikų, suformuotų iš GBM U87 ir T98G ląstelių, augimui ant viščiuko embriono chorioalantojinės membranos (CAM), jų invazijai į CAM mezenchimą, angiogenezei bei PLBA, p53 ir EZH2 raiškai navike, palyginti su NaDCA bei temozolomido (TMZ) poveikiu.

2. Nustatyti ir palyginti NaDCA, TMZ, NaVPA–NaDCA poveikį GBM U87 ir T98G ląstelių *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* ir *CDH2* raiškai *in vitro*.
3. Nustatyti NaVPA–NaDCA poveikį pacientų GBM pirminių ląstelių navikams ant CAM, jų invazijai į CAM, angiogenezei bei GFRB, PLBA, p53, EZH2 ir vimentino raiškai.
4. Nustatyti NaVPA–NaDCA poveikį paciento pirminių GBM ląstelių, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* ir *CDH2* raiškai *in vitro*.

Darbo naujumas ir aktualumas

Darbe pateikti ikiklinikinių NaVPA–NaDCA ir NaDCA poveikio tyrimų kancerogenezei duomenys, palyginamas tiriamųjų vaistinių preparatų poveikis suaugusiųjų GBM U-87 MG (U87) ir T98G ląstelių *SLC12A2* (Na-K-2Cl nešiklis; NKCC1), *SLC12A5* (K-Cl nešiklis; KCC2), *SLC5A8* (monokarboksilatų nešiklis; SLC5A8), *CDH1* (E-kadherinas) ir *CDH2* (N-kadherinas) raiškai *in vitro* ir ląstelių suformuotų navikų augimui, neoangiogenezei, invazijai, taikant CAM modelį ir PLBA, p53, EZH2 žymenų raiškai suformuoto naviko ant CAM audinyje. NaVPA–NaDCA poveikio duomenys yra palyginti su TMZ tyrimų duomenimis. Tyrimų duomenys rodo, kad NaVPA–NaDCA keisdamas NKCC1 ir KCC2 nešiklių genų raišką, gali veikti viduląstelinę Cl⁻ koncentraciją ([Cl⁻]_i), o šis poveikis yra individualus ir skiriasi gydant U87 ir T98G ląsteles. Derinio poveikis kai kuriais atvejais yra veiksmingesnis nei NaDCA ar TMZ. Tyrimas parodė, kad NaVPA–NaDCA komponentų – NaVPA ir NaDCA – poveikis U87 ir T98G navikų sukeltai neoangiogenezei, T98G navikų PLBA ir EZH2 raiškai buvo sinerginis. Sinerginis poveikis gali būti susijęs ir su tuo, kad U87 ląstelėse VPA aktyvina DCA pernašą į ląstelę per demetilintą *SLC5A8*, kuris yra DCA nešiklis į naviko ląstelę. Toks sinergizmas gali būti svarbus, nes leistų mažinti DCA dozę ir kartu – DCA nepageidaujamą poveikį. Nustatyti derinio poveikio pranašumai palyginant su TMZ poveikiu.

Pirmą kartą tirtas NaVPA–NaDCA poveikis pirminėms žmogaus GBM ląstelėms *in vitro* ir iš jų suformuotiems navikams ant CAM bei GFRB, PLBA, p53, EZH2, vimentino žymenų raiškai juose. Pirminių GBM navikų ląstelėse NaVPA–NaDCA slopina NKCC1 ir aktyvina KCC2 nešiklių genų raišką, slopina GBM piktybiškumo žymenų GFRB, PLBA, p53, EZH2 ir vimentino raišką – ir šis atsakas į gydymą yra individualus.

Atlikto ikiklinikinio tyrimo duomenimis, CAM modelis yra tinkamas metodas tiriamojo vaisto veiksmingumui vertinti. Vaisto veiksmingumo nustatymas, tiriant CAM modeliu ir nustatant poveikį GBM ląstelių genų raiškai, yra perspektyvus, nes gali padėti parinkti individualizuotą chemoterapiją bei palyginti TMZ poveikį su naujai kuriamų tiriamųjų vaistinių preparatų poveikiu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Glioma

Apibrėžimas. Glioma yra pirminis CNS navikas, kilęs iš neuroglijos ląstelių (astrocitai, oligodendrocitai ir ependimocitai). Jie sudaro apie 26–30 proc. visų smegenų navikų ir apie 80 proc. pirminių piktybinių CNS navikų [37–39]. Sergamumas Europos regionuose skiriasi [38, 40], Europos sąjungos (ES) gliomos sergamumo dažnumas yra nuo 5–6 atvejai 100 tūkst. gyventojų per metus [40, 41]. Glioma yra reta liga.

Etiologija. Tiksliai gliomos atsiradimo priežastis nežinoma. Žinomas aplinkos rizikos veiksnys, susijęs su naviko raida, yra jonizuojančios spinduliuotės poveikis [37, 42, 43]. Glioma gali pasireikšti žmonėms, turintiems tam tikrus genetinius sindromus, kaip Mendelio liga, tuberozinė sklerozė, neurofibromatozė, Li-Fraumeni sindromas. Žmogaus genomo tyrimais (angl. *Genome-wide association studies*; GWAS) nustatyti septyni genomo variantai, kurie didina gliomos riziką [37, 38]. Epidemiologiniai tyrimai rodo, kad tokios alerginės būklės kaip šienligė, astma, egzema ar maisto alergija gali būti susijusios su mažesne gliomos rizika [38].

Simptomai ir diagnozavimas. Gliomos gali suspausti smegenų sritis, sukelti simptomus kaip nuovargis, galvos skausmas, pykinimas, vėmimas, eisenos pusiausvyros sutrikimai, traukuliai, vienos kūno pusės tirpimą ar silpnumą, netikėtai atsiradusius pažinimo funkcijų susilpnėjimą ar židininis neurologinius sutrikimus, kalbos sutrikimus, regos pokyčius, dirglumą, šlapimo nelaikymą [37, 41, 42].

Diagnozei patvirtinti reikalinga magnetinio rezonanso tomografija (MRT). Šis tyrimas svarbus nustatant smegenų auglio savybes, parenkant chirurgijos strategiją ir gydymo veiksmingumo stebėjimui. Vaizdinės diagnostikos metodai yra patvirtinami histopatologine analize, kurią papildo molekuliniai tyrimai, siekiant parinkti tinkamesnį gydymą ir prognozuoti gydymo veiksmingumą [37, 44, 45]. Molekuliniai biožymenys yra svarbūs nustatant papildomą gliomų diagnostinę informaciją. Dėl to siekiant tiksliau klasifikuoti CNS navikus, 2021 m. PSO klasifikacijoje įtraukta daug klinikopatologijos molekulinės struktūros požymių [46]. Gliomos difuziniu būdu invazuoja į smegenis, todėl pilnai pašalinti naviką chirurginiu būdu be neurologinio deficito yra beveik neįmanoma. Gliomos dažnai būna atsparios spinduliniam gydymui ir chemoterapijai, todėl dažnai po gydymo ligos progresavimas išlieka, o veiksmingos chemoterapijos nėra [37].

Klasifikacija. Gliomos klasifikuojamos pagal glijos ląstelių tipą ir histologines bei genetines savybes, kurios leidžia prognozuoti ligos eigą ir

parinkti veiksmingiausią gydymą [37]. Glijos ląstelės yra astrocitai, oligodendrocitai, ependimocitai. Pagal tai gliomos klasifikuojamos į astrocitomas, oligodendrogliomas ar ependimomas; šios grupės turi navikų potipius, apibūdinamus skirtingu biologinio piktybiškumo laipsniu [47]. Gliomų klasifikacija keitėsi. Išskiriamos trys CNS navikų klasifikacijos: iki 2016 m., 2016 m. PSO klasifikacija ir 2021 m. PSO klasifikacija [48].

Iki 2016 m. gliomos buvo klasifikuojamos pagal *Bailey* ir *Cushing* sistemą, kuri pagrįsta histologiniais fenotipais. Vertinant morfologiškai, astroцитомos primena astroцитus, oligodendrogliomos – oligodendrocitus, o mišrios oligoastroцитомos – ląstelių derinį. Navikui piktybiškėjant, ląstelių morfologija keičiasi ir jos tampa mažiau diferencijuotos. Histopatologiniai požymiai, kaip mitozės aktyvumas, atipija, anaplazija, neoangiogenezė, nekrozė, nurodo difuzinės gliomos laipsnį (nuo II iki IV laipsnio), kai aukštesni laipsniai atitinka nepalankią prognozę ir trumpesnę išgyvenamumą [48].

PSO 2016 m. klasifikacija. Atradus difuzinių gliomų genetines mutacijas, 2016 m. parengta PSO CNS navikų klasifikacija, paremta fenotipiniais ir genotipiniais naviko rodikliais, pagal dviejų pagrindinių navikų žymenų buvimą: *IDH1* arba *IDH2* mutacijos (koduojančios citoplazminį ir mitochondrinį IDH potipius, vadinamos IDH mutacijos (IDHm)), kurios įprastai nustatomos imunohistocheminiu (IHC) būdu, surandant R132H mutaciją turintį baltymą (dažniausia IDH mutacija) arba naujos kartos genų sekoskaitos būdu [48]. Pagal tai skiriami du molekuliniai potipiai: IDH-mutaciją turinčios gliomas (įskaitant astroцитomas ir oligodendrogliomas), jos dažniausiai nustatomos jauniems suaugusiesiems; ir IDH-laukinio tipo gliomos, dažniausiai GBM (IV laipsnio), būdingos vyresnio amžiaus žmonėms [38]. Pagal 2016 m. PSO klasifikaciją, histopatologinė analizė visada turėtų būti atliekama kartu su genetiniu tyrimu [47].

Pagal 2016 m. PSO CNS navikų klasifikaciją, gliomos skirstomos į keturias kategorijas, vadinamas I–IV laipsniais, pagal histopatologiją ir molekulinį žymenį [47]:

I laipsnio navikai yra solidiniai, neinfiltruojantys (astroцитомos), progresuoja lėtai [38, 47, 49].

II laipsnio gliomos vadinamos žemo laipsnio, difuzinės infiltruojančios gliomos, progresuoja lėčiau nei III–IV laipsnio gliomos [38, 47, 49].

III laipsnio gliomos (aukšto laipsnio, difuzinio infiltruojančio tipo) greitai progresuoja, yra invazyvios, agresyvaus pobūdžio [47].

IV laipsnio gliomos (aukšto laipsnio, difuzinės, infiltruojančios), kitas jų terminas – GBM; tai dažniausiai pasitaikantys, blogos prognozės suaugusiųjų CNS navikai [38, 47, 49]. Apie 90 proc. IV laipsnio GBM greitai išsivysto *de novo* kaip pirminės GBM, labai agresyvūs navikai (dar vadinamos IDH-laukinio tipo GBM). Antrinės GBM (10 proc.) atsiranda iš buvusių žemo

laipsnio PSO II arba III laipsnio gliomų – iš difuzinių ar anaplastinių astrocitomų, ir jos dažniausiai būdingos jaunesniems pacientams (dar vadinamos IDHm GBM). Antrinės glioblastomos yra susijusios su skirtingais genetiniais ar epigenetiniais molekuliniiais keliais [47, 48]. Pirminės GBM yra dažnesnės nei antrinės GBM: jų santykis yra apie 9:1 [48].

2021 m. PSO CNS klasifikacija (5-toji laida). Šioje klasifikacijoje pateikiami svarbūs pakeitimai, kurie paremti molekulinės diagnostikos svarba CNS navikų klasifikacijoje. Joje išlieka pripažinti navikų diagnostikos metodai kaip histologija ir IHC. Įvesta naujų navikų tipų ir potipių, kai kurie pagrįsti naujomis diagnostikos technologijomis (DNR metilinimo profilavimas ir kt.), įtraukiant homozigotinę *CDKN2A/B* deleciją, *TERT* promotoriaus mutaciją, *EGFR* amplifikaciją, +7/–10 chromosomų kombinaciją. Nuo 2021 m. IDH mutantinio tipo GBM vadinama IDH mutantinio tipo astrocitoma, IV laipsnio pagal PSO, ir nebepriskiriama GBM [46].

1.2. Glioblastoma

GBM yra dažniausias ir agresyviausias, heterogeniškas CNS navikas, astrocitoma (IDH laukinio tipo glioma), kuriai būdinga greita progresuojanti piktybinė eiga, neoangiogeneze ir nekroze [46, 50, 51]. GBM sergamumas – 3–5 atvejai 100 000 gyventojų per metus [52], vidutinis išgyvenamumas – mažiau nei 2 metai [53], 5-erių metų išgyvenamumas – apie 6 proc. [5, 13, 54]. Po GBM diagnozavimo ir taikant gydymą GBM atkrytis pasireiškia 6–9 mėnesių laikotarpiu [55]. GBM dažniausiai susergera vyresnio amžiaus (vidutinis amžius – 64 metai) žmonės [3], liga 1,6 karto dažniau nustatoma vyrams [56], GBM sergančių moterų vidutinio išgyvenamumo trukmė ilgesnė nei vyrų [5].

Glioblastomos patogenezės mechanizmai. GBM raida dažniausiai yra susijusi su navikų žymenų raiška, tokių kaip, PLBA (proliferuojančios ląstelės branduolio antigenas), MGMT (metilguanino metiltransferazė), EZH2 (zeste homologo 2 stipriklis) NKCC1 (Na-K-Cl nešiklis), KCC2 (K-Cl nešiklis), GFRB (glijos fibrilinis rūgštinis baltymas), E- ir N-kadherinais, vimentinu, RTK (tirozino kinazės receptoriai), *TP53*, RB (retinoblastomos baltymas) bei su jų GBM patogeneziniais ryšiais ir susijusiais keliais.

PLBA baltymų kompleksai dalyvauja PI3K/AKT kelio reguliavime [57]. PLBA slopinimas sukelia PI3K/AKT kelio pokyčius, didina vėžinių ląstelių apoptozę [57, 58]. NKCC1 raiška teigiamai koreliuoja su vimentino ir N-kadherino raiška, skatina GBM ląstelių invaziją ir migravimą [59]. NKCC1 slopinimas mažina N-kadherino, vimentino raišką ir didina E-kadherino raišką. NKCC1 veikia RhoA ir Rac1 signalinius kelius ir skatina epitelinės–

mezenchiminės transformacijos (angl. *the epithelial–mesenchymal transition*; EMT) procesus [60]. GBM ląstelėse NKCC1 aktyvumas padidėjęs dėl kinazių WNK1 (angl. *with no lysine (K) kinase 1*) ir OSR1 (angl. *oxidative stress-responsive kinase 1*) [61]. NKCC1 skatina GBM ląstelių migravimą reguliuodamas ląstelės tūrį per WNK/SPAK ir Wnt/ β -katenino kelią ir skatina EMT [59, 62]. MGMT ir PLBA tarpusavio sąveika; p21, kuris turi PLBA jungimosi domeną, konkuravimo būdu mažina PLBA jungimąsi prie MGMT, skatina *MGMT* transkripciją ir baltymo raišką, taip didina gliomos atsparumą TMZ [63].

GBM raida dažniausiai susijusi su RTK, *TP53* ir RB veiksnių patogeneziniais keliais [64–66]. RTK šeimai priskiriami *EGFR*, *PDGFR*, *TGFR*, *FGFR*, *MET* ir *VEGR*. RTK aktyvinimas per PI3K/AKT/mTOR kelią skatina GBM ląstelių proliferaciją, migravimą ir jų išgyvenamumą [67, 68]. *TP53*/MDM2/*CDKN2A* signalinio kelio reguliavimas sutrikęs 84 proc. GBM pacientų [69]. *TP53* inaktyvinimas dėl mutacijų lemia geno naviko slopinimo funkcijų praradimą, skatina kancerogenezę. *MDM2* – p53 slopiklis, skatina p53 degradaciją, jo amplifikacija dažniausiai nustatoma kartu su *TP53* mutacija. *TP53* kelio inaktyvinimas susijusi su homozigotinio *CDKN2A* delecijos variantu, kuris nustatomas 22–35 proc. GBM ir susijęs su trumpesniu išgyvenamumu [64, 69]. *EZH2* reguliuoja *SLC12A5* raišką, aktyvina WNK1-OSR1-NKCC1 kelią, skatina gliomos ląstelių migravimą ir invaziją bei *SLC12A5* DNR metilinimą [70]. *SLC12A5* aktyvumas slopina JAK-STAT3, E2F ir MYC kelius, sumažėjęs *SLC12A5* aktyvumas koreliuoja su MMP9/STAT3 aktyvumu [71]. MMP9 skatina GBM invaziją ir augimą [72]. GABAerginis aktyvumas skatina naviko augimą per GABA-A receptorių depoliarizaciją, o tai susiję su mažesne *SLC12A5* raiška [73].

EZH2 sąveikauja su baltymu CDH4 (angl. *chromatin helicase DNA-binding protein 4*) ir slopina GFRB raišką [74]. *EZH2* skatina GBM kancerogenezę aktyvindamas glikolizę per EAF2-HIF1 α signalinę ašį [75], veikia naviką slopinančių genų ir onkogeninių molekulių STAT3 (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*), mutantinio p53, *c-Myc* reguliavimą [76, 77].

GBM būdingi EMT patogeneziniai mechanizmai, kurie susijęs su piktybiškumo raida ir GBM atsparumu chemoterapijai [78–80]. EMT metu slopinami epiteliniai žymenys (E-kadherinas, citokeratinai) ir padidėja mezenchiminių žymenų N-kadherino, vimentino, fibronektino raiška [81, 82]. Pagrindinių žymenų ryšys su GBM raida ir gydymu yra aptariami žemiau (1.3 ir 1.4 skyreliuose). Tyrimai, atlikti siekiant nustatyti atsparumo gydymui priežastis, leido giliau suprasti GBM patogenezės mechanizmus.

GBM gydymas temozolomidu; preparato neveiksmingumas ar gydymo TMZ atsparumo atsiradimo mechanizmai. Dabartiniu metu

suaugusiųjų GBM standartinis gydymas apima chirurginį maksimalų pašalinimą, papildomą gydymą spinduline terapija ir chemoterapiją TMZ [11–13].

TMZ Europoje buvo registruotas GBM gydymui 2000 m. [83], nuo 2005 m. naudojamas naujai diagnozuotai aukšto laipsnio GBM gydyti [14, 15]. TMZ praeina kraujo-smegenų barjerą ir gali būti skiriamas *per os*. Iš kraujo tik apie 20 proc. TMZ patenka į smegenis. TMZ metabolitas sukelia DNR pažaidas ir citotoksiškumą [83]; kaip alkilinis preparatas, veikia atskirų DNR grandinių metilinimą adenino N3, guanino N7, ir guanino O6 pozicijose [84], dėl to atsiranda mutacijų, viengrandžių ir dvigrandžių DNR lūžių, kurie sustabdo ląstelių ciklą G2/M fazėje ir lemia GBM ląstelių apoptozę [15]. Gydant TMZ apie 15–20 proc. pacientų patiria sunkią mielosupresiją arba infekcijas [85]. Nors šiandien TMZ tebėra pirmojo pasirinkimo gydymo būdas, šiai chemoterapijai būdingas didelis atsparumas gydymui TMZ ir labai dažnas ligos atsinaujinimas.

Gydymas TMZ kartu su spinduline terapija prailgino bendrą išgyvenamumą 2–2,5 mėnesio [15, 18], vidutinė bendro išgyvenamumo trukmė – 15 mėnesių, o išgyvenamumo be ligos progresavimo vidurkis – 6 mėnesiai, 70 proc. pacientų ligos eiga progresuoja per pirmuosius metus [19, 20]. Nuo gydymo pradžios TMZ yra neveiksmingas daugiau nei 50 proc. visų pacientų dėl rezistentiškumo gydymui [86]. GBM 5 metų išgyvenamumas yra mažesnis nei 5 proc. ir yra vienas mažiausių tarp visų vėžio rūšių [15]. Didelis GBM pacientų mirtingumas yra susijęs su naviko įgytu atsparumu chemoterapijai temozolomidu [15, 87].

Gydymo TMZ rezistentiškumas. GBM patogeneziniai mechanizmai yra išaiškinti gydant TMZ ir tyrinėjant gydymo atsparumo TMZ mechanizmus, nes norint pagerinti GBM gydymo veiksmingumą, būtina suprasti mechanizmus, lemiančius atsparumo TMZ gydymui atsiradimą. Atsparumas TMZ būna pirminis arba įgytas, atsirandantis po gydymo pradžios [87, 88]. Svarbu išaiškinti nuo ko priklauso atsparumo gydymui TMZ raida, kuri lemia GBM atsinaujinimą ir blogą GBM prognozę [16]. TMZ atsparumas pirmausia susijęs su GBM kamieninių ląstelių populiacijomis [89]. GBM kamieninės ląstelės yra atsparios gydymui TMZ ir manoma, kad šios ląstelės veikia kaip atkrytį sukeliančios ląstelės, kurios yra atsakingos už navikų atsinaujinimą po gydymo TMZ [88]. Pripažinti gliomos kamieninių ląstelių žymenys, susiję su GBM atsparumo TMZ molekuliniais mechanizmais, yra ALDH1A3, COX-2, CD15, CD44, CD70, CD133, S100A4, Nanog ir Nestin [90]. Chemoterapija taip pat turėtų būti nukreipta į GBM kamieninių ląstelių žymenis, siekiant sumažinti GBM atkryčio tikimybę [88]. GBM kamieninės ląstelės sudaro apie 1 proc. visų naviko ląstelių, tačiau jų gebėjimas sukelti naviko heterogeniškumą lemia naviko atsinaujinimą [91]. PI3K/Akt akty-

vinimas palaiko GBM kamieninių ląstelių atsinaujinimą, skatindama atsparumą chemoterapijai ir ligos atsinaujinimą [92]. PI3K/Akt signalinis kelias lemia įgytą GBM atsparumą gydant TMZ, o šio kelio slopinimas atkuria jautrumą chemoterapijai [93]. GBM būdingas PI3K/AKT signalinio kelio sutrikimas, o šio kelio RTK dažnai būna aktyvinta [94]. Viena iš labiausiai žinomų RTK mutacijų yra epidermio augimo veiksnio receptoriaus (angl. *epidermal growth factor receptor*; EGFR) amplifikacija, kuri nustatoma apie 60 proc. pacientų [95]. EGFR raiška yra susijusi su atsparumo TMZ mechanizmais.

GBM atsparumą TMZ dažniausiai lemia padidėjusi MGMT raiška, kuri keičia metilinimą ir padeda išlikti naviko ląstelėms [96]. GBM, kurių O6-MGMT nėra metilinta (padidėjęs *MGMT* aktyvumas), įprastai yra atsparūs gydymui TMZ. Taigi, *MGMT* epigenetinė būklė yra svarbus atsparumo TMZ žymuo [97]. MGMT raiškos sumažinimas yra pagrindinis gydymo poveikio siekis, leidžiantis panaikinti atsparumą TMZ. Taikant dideles TMZ dozes MGMT aktyvumui sumažinti, pasireiškia TMZ toksiškumo problema [96, 98]. *MGMT* geno slopinimas metiliniu pasitaiko apie 35–50 proc. GBM pacientų [99]. TMZ klinikinį veiksmingumą mažina trumpas preparato pusinės eliminacijos periodas, nepakankamas TMZ patekimas per kraujosmegečių barjerą į naviką [100]. *MGMT* promotoriaus būklė laikoma svarbiu prognozinio GBM žymeniu, nes didesnis *MGMT* promotoriaus metilinimo lygis ir mažesnė MGMT baltymo raiška yra susiję su geresniu atsaku į gydymą TMZ bei lemia ilgesnį pacientų išgyvenamumą [101]. JAK/STAT signaliniame kelyje padidėjęs STAT3 aktyvumas taip pat susijęs su MGMT raiškos padidėjimu, GBM U87 ląstelėse skatina atsparumą chemoterapijai TMZ [102].

Poli(ADP-ribozės) polimerazė 1 (*PARP1*) yra susijusi su atsparumu TMZ [103–105]. *PARP1* slopinimas padidina jautrumą TMZ [106]. GBM būdingas PI3K/AKT signalinio kelio sutrikimas, o šio kelio RTK dažnai būna aktyvinti [94]. AKT (serino/treonino kinazė) skatina GBM ląstelių atsparumą chemoterapijai [107]. NF-κB branduolio veiksnys (angl. *nuclear factor kappa B*) susijęs su atsparumu TMZ [108]. Survivinas, priklausantis apoptozės inhibitorių šeimai [109], blokuoja apoptozės poveikį, sukeltą TMZ, dėl to atsiranda atsparumas TMZ, o specifiskai slopinant survivino geną, didėja jautrumas TMZ [110].

Gydant TMZ, aktyvinamas signalas Wnt/β-katenino kelio grandinėje veikia GBM chemorezistentiškumą [111]. Wnt/β-katenino signalinio kelio blokavimas GBM ląstelėse padidino TMZ veiksmingumą [112]. Wnt/β-katenino kelias yra svarbus atsparumo chemoterapijai raidai ir GBM progresavimui [111], jis dalyvauja EMT procese [113], kuris susijęs su GBM

atsparumu radioterapijai ir chemoterapijai [114]. Įrodyta, kad Wnt signalo keitimas veikia EMT sukėlėjų raišką [113, 115].

JAK/STAT kelias dalyvauja GBM kamieninių ląstelių stimuliacijoje, o *STAT3* aktyvinimas lemia GBM perėjimą į mezenchiminį potipį [116]. *STAT3*, veikdamas kaip transkripcijos veiksnys, veikia onkogenų, įskaitant *COX2* ir *EZH2*, raišką [117].

Identifikuoti kai kurie genai, kurie gali lemti GBM ląstelių atsparumą gydymui TMZ: *KDMA5*, koduojantis histonų demetilazę, būdingas TMZ atsparioms GBM ląstelėms [118]. *HDAC6* skatina gliomos ląstelių proliferaciją ir suteikia joms atsparumą TMZ, daugiausia stabilizuodamas ir aktyvindamas *EGFR*. *HDAC6* slopinimas susijęs su padidėjusiu *MSH2* ir *MSH6* – pagrindinių DNR atstatymo baltymų kiekiu bei sumažėjusia *MGMT* raiška [119, 120]. Tyrimai, skirti prognoziniam atsakui į TMZ gydymą žymenims, yra aktualūs [83, 121]. Anksčiau pateikti duomenys rodo, kaip aktualu sukurti tiek standartinius, tiek naujus GBM gydymo vaistais ikiklinikinius modelius, vertinant tiriamųjų vaistinių preparatų veiksmingumą, kurie būtų kuo labiau pritaikyti individualiai terapijai [122]. Naujų tiriamųjų vaistų, slopinančių susijusius su atsparumu chemoterapijai mechanizmus, kūrimas yra esminis GBM farmakoterapijos iššūkis.

1.3. Glioblastomos imunohistocheminio tyrimo žymenys

1.3.1. Glijos fibrilinis rūgštinis baltymas (GFRB)

GFRB (angl. *glial fibrillary acidic protein*; GFAP) nustatomas žmogaus astrocituose, GBM kamieninėse ląstelėse ir GBM ląstelėse. GFRB naudojamas GBM histologiniam identifikavimui [123]. Jis taip pat randamas neturintiose mielino Švano ląstelėse, žarnyno glijoje (angl. *enteric glia*), kuri yra unikali periferinės neuroglijos rūšis, randama kartu su neuronais virškinimo trakto žarnyno nervų sistemoje [124]. GFRB yra pagrindinis III tipo glijos ląstelių tarpinis filamentinis baltymas, dalyvaujantis CNS ląstelių citoskeleto persitvarkyme, susijęs su GBM progresavimu. GFRB per ląstelių mitochondrijas dalyvauja reaguojant GBM ląstelėms į proapoptozinį skatinantį veiksnį [125, 126]. IHC tyrimai parodė, kad GFRB raiška GBM navikuose buvo susijusi su blogesniu išgyvenamumu: suaugusių GBM pacientų GFRB ≥ 75 proc. turėjo daug trumpesnę išgyvenamumą, nepriklausomai nuo O6-metilguanino-DNR metiltransferazės (angl. *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*; MGMT) promotoriaus metilinimo būklės ar IDH1 mutacijų; tyrimo duomenų pagrindu padaryta prielaida, kad kiekybinis IHC GFRB vertinimas galėtų būti naujas biologinis žymuo, leidžiantis prognozuoti GBM

pacientų išgyvenamumą [127]. Kiti tyrėjai teigia, kad nėra stiprios koreliacijos tarp GFRB ir astroцитomos piktybiškumo, kad GFRB-teigiamų ląstelių populiacijos yra labai heterogeniškos ir kad GFRB izoformų GFRB δ ir GFRB α diferencijavimas galėtų pagerinti naviko piktybinio progresavimo būklės įvertinimą [123]. GFRB δ/α santykinis pagausėjimas yra būdingas IV laipsnio astroцитomai ir yra astroцитų brendimo, palyginti su piktybinio naviko ląstelėmis, žymuo [124, 128]. Gliomos ląstelės rodo skirtingą migravimo dinamiką, priklausomai nuo GFRB δ ir GFRB α raiškos lygių [129]. GFRB kiekio padidėjimas ląstelėje yra aiškus reaktyvių astroцитų persitvarkymo požymis. Reaktyvūs astroцитai yra svarbūs uždegimo reguliatoriai gliomos raidos metu, formuojantys GBM mikroaplinką. GBM astroцитai aktyvinasi ir reguliuoja naviko mikroaplinkos ląsteles per ląstelių tarpusavio sąveiką arba prouždegiminių citokinų, chemokinų ir kitų aktyvių medžiagų sekreciją [130]. Stakišaitis ir kt. nustatė, kad NaVPA–NaDCA mažina uždegimą, slopindamas prouždegiminius citokinus ir chemokinus [28, 29], kurie gali neutralizuoti veikliųjų medžiagų poveikį GBM mikroaplinkoje ir pakeisti GFRB baltymų raišką naviko ląstelėse. Ezh2cKO pelių modelis rodo, kad EZH2 išsekimas (angl. *depletion*) astroцитuose labai padidina GFRB baltymo raišką [131]. GFRB-teigiamų ląstelių skaičių interpretuojant kaip astroцитų proliferacijos požymį, GFRB raiškos tyrimas turėtų būti vertinamas kartu su proliferacijos žymenimis, tokiais kaip PLBA, Ki-67 ar kitais [130].

Gečys ir kt. nustatė, kad pirminių GBM ląstelių *GFRB* raiška yra individuali: GBM5-1F ir GBM5-3F ląstelių raiška yra didesnė nei GBM5-2F. Gydydamas NaVPA–NaDCA reikšmingai padidino *GFRB* raišką GBM5-2F ląstelėse, ją labai sumažino GBM5-3F ląstelėse ir nesukėlė poveikio geno raiškai GBM5-1F ląstelėse, o TMZ nesukėlė jokio poveikio tirtų ląstelių *GFRB* raiškai [132]. Pastebėta trumpesnio GBM pacientų išgyvenamumo ir padidėjusios GFRB transkripcijos aktyvumo koreliacija. Panašiai, tikro laiko PGR (angl. *real-time polymerase chain reaction*; PCR) analizė atskleidė tendenciją, kad IV laipsnio astroцитomos pacientams, turintiems aukštesnius *GFRB* mRNA raiškos lygius, būdinga trumpesnis išgyvenamumo laikotarpis. REMBRANDT bazės duomenys taip pat patvirtino ilgesnio gliomos pacientų išgyvenamumo ir sumažėjusios *GFRB* mRNA raiškos ryšį. Taigi, GFRB raiška gali turėti klinikinę reikšmę, nes GFRB gali būti naudojamas kaip gliomos prognozinis žymuo [127, 133–135].

1.3.2. Proliferuojančių ląstelių branduolių antigenas (PLBA)

PLBA (angl. *proliferating cell nuclear antigen*; PCNA) yra klasikinis ląstelių proliferacijos žymuo, būtinas DNR replikacijai, ląstelių ciklo reguliavimui ir besidauginančių ląstelių atstatymui [136]. Didelė PLBA raiška yra

nustatoma įvairių piktybinių navikų audinyje, bet jos nėra sveikuose audiniuose [137–140]. PLBA įprastai vertinamas naudojant IHC metodą naviko audinyje ar ksenotransplantuose, siekiant kiekybiškai įvertinti naviko ląstelių proliferaciją ir nustatyti jos sąsają su agresyvumu ar reakcija į gydymą. Žymens raiška dažnai reikšmingai padidėja GBM naviko audinio ląstelėse [141]. PLBA iš pradžių buvo pripažintas kaip proliferuojančių ląstelių specifinis antigenas, nustatomas ląstelių branduoliuose ląstelių ciklo S fazės metu; vėlesni tyrimai ir sisteminė tyrimų apžvalga rodo, kad padidėjusi PLBA raiška naviko audinyje yra tiesiogiai susijusi su naviko piktybiškumu, vėlyva GBM stadija, blogu išgyvenamumu ir jo vėžinių ląstelių proliferacija. Todėl šis žymuo buvo pasiūlytas kaip naudingas diagnostinis ar prognozinis biologinis rodiklis vertinant gydymo veiksmingumą, t. y. kaip gliomos gydymo taikiny. Aukštas PLBA lygis koreliuoja su padidėjusia GBM proliferacija, atsparumu gydymui. Atspariam gydymui arba atkrantinčiam GBM navikui būdinga mezenchiminiai pokyčiai su nuolatine proliferacija (PLBA-teigiamos ląstelės) [141–144]. Vaikų ir suaugusiųjų metastazavusioms arba atkryčio GBM būdinga didesnė PLBA raiška [141, 145]. Uloza ir kt. nustatė, kad žymens raiška leidžia įvertinti vėžio gydymo veiksmingumą tiriant CAM modeliu [146]. Vertinant GBM pacientų klinikinės baigties ir GBM IHC raiškos bei apoptozės ryšį, buvo nustatyta, kad padidėjęs PLBA žymens indeksas ir sumažėjęs apoptozės indeksas buvo susiję tarpusavyje ir tiesiogiai koreliavo su trumpesniu pacientų išgyvenamumu [143]. PLBA susiję kompleksai yra glaudžiai susiję su p53 signaliniu keliu [147, 148].

Naujausi tyrimai parodė, kad GBM ląstelės paviršiuje gali būti nustatomas PLBA (angl. *cell-surface PCNA*; csPLBA), o tai nėra būdinga ląstelėms, kuriose PLBA yra daugiausia branduolyje. GBM pirminės iš pacientų gautos GBM ląstelės rodo csPLBA raišką, kuri kolokalizuoja arba koekspresuoja su GBM kamieninių ląstelių žymenimis (CD44, CD49f) ir imunosupresijos žymenimis (PD-L1, TGF-βRII). Tai rodo, kad csPLBA gali būti GBM kamieninių ląstelių ir imuninės sistemos slopinimo savybių žymuo. csPLBA yra galimas gydymo taikiny, ypač natūralių žudikų (angl. *natural killer cells*; NK) ląstelių imunoterapijai, nes ji gali atpažinti NK ląsteles [149, 150].

PLBA dažnai pasireiškia kartu su EMT požymiais agresyviose, proliferuojančiose, mezenchiminio GBM potipio naviko ląstelėse; aukštas PLBA lygis yra susijęs su mezenchiminio navikų ląstelių proliferacija, o gydymas, turintis įtakos EMT, gali paveikti PLBA raišką. GBM naviko ląstelių EMT metu ląstelės įgyja invaziškumo, migravimo, ir gydymui atsparias savybes. Šis pokytis susijęs su TGF-β, NF-κB, Wnt/βkatenino, PI3K/Akt keliais ir hipoksija, dėl kurių padidėja mezenchiminio žymenų vimentino, N-kadherino, FN1, SNAI1/2, TWIST ir sumažėja epitelinio žymens E-kadherino raiška GBM ląstelėse [151, 152].

Net po supramarginalinio naviko pašalinimo operacijos neišvengiamai lieka naviko ląstelių, kurios išlaiko tiek proliferacijos, tiek invaziškumo savybes, o tai pabrėžia veiksmingos chemoterapijos svarbą [153]. PLBA raiška gali būti GBM imunoterapijos taikiniu [136, 140]. Kitų tyrimai parodė, kad gydant U87 ląsteles didelėmis TMZ dozėmis ($IC_{50} > 200 \mu M$), preparatas nesukėlė antiproliferacinio poveikio [154]. Damanskienės ir kt. tyrimai parodė, kad 5 mM ir 10 mM NaDCA dozės reikšmingai slopino vaikų GBM PBT24 ir SF8628 ląstelių navikų ant CAM PLBA raišką [155]. GBM modeliuose kamieninių ląstelių EMT procesas sutampa su PLBA didele raiška, GBM piktybiškumu, migravimu ir invazija, neoangiogeneze [151, 152]. Poveikis EMT skatinantiems keliams ar molekulėms (pvz., NAT10 slopinimas) sumažina mezenchiminės ląstelės savybes ($\uparrow$ E-kadherinas, $\downarrow$ N-kadherinas/vimentinas) ir PLBA raišką, o tai rodo jų sąveiką [156].

1.3.3. p53

p53 yra *TP53* geno produktas, skatinantis apoptozę, reguliuojantis ląstelių ciklą ir ląstelių senėjimą [157]. Laukinio tipo p53 baltymas veikia kaip naviko slopiklis, skatindamas vėžinių ląstelių apoptozę [158, 159]. *TP53* disfunkcija sutrikdo naviko ląstelių apoptozės sukėlimą, palaiko naviko ląstelių gyvybingumą, skatina nekontroliuojamą naviko ląstelių proliferaciją ir imuninės sistemos slopinimą [69, 160]. Yra sąveika tarp mutuoto p53 ir laukinio tipo p53; mutavęs p53 baltymas gali įgyti onkogeninių funkcijų, genas gali veikti kaip dominuojantis prieš laukinio tipo p53, inhibuoti naviko slopinimo ir apoptozės kelius GBM ląstelėse [161]. Bendras p53 mutacijų dažnumas GBM yra 30–50 proc. [162]; *TP53* su *EGFR* ir *PTEN* yra dažniausiai mutuojantys genai GBM patogenezėje [163, 164]. Aprašytas naujas EGFR vaidmuo slopinant laukinio tipo p53 aktyvumą. EGFR signalai stiprina p53 jungimąsi prie DNR priklausomo proteinkinazės katalizinio subvieneto (angl. *DNA-dependant protein kinase catalytic subunit*; *DNA-PKcs*) ir slopina laukinio tipo p53 aktyvumą [165]; p53 mutacijos atsiranda gliomos ankstyvoje raidos stadijoje ir kaupiasi augant navikui [166]; p53 mutacijos sukelia disfunkcinio p53 baltymo kaupimąsi naviko audinyje, o natūralus p53 yra sunaudojamas ir nesikaupia naviko audiniuose [158, 159].

Manoma, kad p53 baltymas reguliuoja *MGMT* [168]. Sumažėjęs *MGMT* raiškos lygis GBM yra susijęs su laukinio tipo p53 aktyvinimu [86, 169]. Kuriant GBM gydymo metodus, vienas iš taikinių yra p53 [170], siekiant p53 funkcijos atkūrimo, t. y. reaktyvuoti p53 naviko slopinimo funkciją [166], ir kuris būtų nukreiptas į mutavusius p53 baltymus, tikslu slopinti šių baltymų gamybą [159, 170–172].

1.3.4. Zeste homologo 2 stipriklis (EZH2)

EZH2 (angl. *enhancer of zeste homolog 2*) yra fermentinis polikombinio represinio komplekso 2 subvienetas, histono N-metiltransferazė, metilinti H3 liziną žinduolių ląstelėse, slopinanti transkripciją [173, 174]. EZH2 gali keisti genų raišką, prisijungdamas prie jų promotorių ir paveikdamas metilini- nimo būklę. EZH2 sąveikauja su onkogenais (MYC, PTEN) ir veikia naviko piktybinį pobūdį, aktyvindamas EMT sukelia GBM ląstelių invaziją ir meta- stazes [175]. EZH2 slopina genus, atsakingus už karcinogenezės slopinimą, o EZH2 aktyvumo slopinimas gali sumažinti naviko augimą [176]. EZH2 slopinimas tiriamas kaip gydymo taikiny- s [175, 177, 178]. EZH2 yra galimas gliomos pacientų prognozės rodiklis [179]. EZH2 raiškos nustatymas navi- kuose naudojant CAM modelį gali būti informatyvus metodas [180, 181].

Šešių tyrimų metaanalizė parodė, kad padidinta EZH2 raiška yra susijusi su aukšto laipsnio vaikų ir suaugusiųjų gliomos bloga prognoze [182]. EZH2 aktyvumas yra susijęs su slopinimu GBM naviko supresorių ir tuo pačiu naviko progresavimu [183]. EZH2 sukelia TMZ atsparumą gliomai ir tai yra susiję su DNR pažeidimų atkūrimu [184, 185]. Gliomos kamieninės ląstelės stiprina EZH2 raišką, kad garantuotų savo progresavimą [186], o EZH2 slo- pinimas mažina GBM kamieninių ląstelių linijų proliferaciją [187]. Iki klini- kiniai tyrimai *in vivo* ir *in vitro* parodė, kad EZH2 inhibitorius GSK126 slopino pirminių GBM ląstelių ir GBM kamieninių ląstelių gyvybingumą, silpnino agresyvų piktybinį fenotipą, ląstelių migravimą ir invaziją [188]. Mažų molekulių EZH2 inhibitorių taikymas slopina gliomos progresavimą, didindamas p16, kaip naviko slopinančio veiksnio, raiškos lygį [189]. CCL2- teigiamų piktybinių ląstelių ir IL-10-teigiamų su naviku susijusių makrofagų sąveika naviko mikroaplinkoje, kurią lemia EZH2-FOSL2-CCL2 ašis, yra svarbi GBM mezenchiminės transformacijos EMT keliams [190]. Sergančių COVID-19 ir pneumonija pacientų T limfocitų tyrimai, atlikti Stakišaičio ir kt., parodė, kad NaVPA–NaDCA labai sumažina chemokino CCL2 ir inter- leukino IL-10 geno raišką T ląstelėse [29]. EZH2 inhibitorių naudos tyrimai GBM modeliuose reikalauja tolesnių tyrimų, nes EZH2 slopinimas taip pat gali turėti priešingą poveikį – ne tik slopinti kancerogenezę, bet ir paveikti naviko supresorių ir kitų signalinių kelių reguliavimą [191]; EZH2 inakty- vuojančios mutacijos mieloproliferacinių sutrikimų ar T ląstelių ūminės limfoblastinės leukemijos atveju rodo naviko slopinančias funkcijas [192– 195].

1.3.5. Vimentinas

Vimentinas yra 57 kDa III tipo tarpinis filamentas randamas mezenchiminėse ląstelėse. Smegenyse vimentinas yra randamas smegenų skilvelių kraujagysliniame rezginyje, ependimocituose, smegenų dangalų ląstelėse. Silpna vimentino raiška yra nustatoma endotelio ląstelėse [196, 197]. Didžioji dalis vimentino yra citoplazmoje, jis taip pat yra nustatomas ląstelės branduolyje, kur, manoma, reguliuoja genų, dalyvaujančių ląstelių migravime, raišką [198].

Palyginti su žemo laipsnio glioma ir nepažeistu smegenų audiniu, GBM audinyje vimentino raiška yra didesnė [199]. RNR sekoskaitos duomenys rodo, kad vimentinas yra nustatomas OXFOS atspariose vėžio ląstelėse, ypač GBM audinio ląstelėse. Vimentinas susijęs su vėžio progresavimu, imunoterapijos poveikio slopinimu, naviko kamieninių ląstelių atsparumu vaistams nuo vėžio [200]. Vimentinas yra pagrindinis EMT proceso žymuo, skatinantis mezenchimos naviko fenotipą [201], susijęs su naviko piktybiškumo progresavimu ir metastazavimu [202]. Vimentino tarpiniai filamentai apsaugo vėžines ląsteles nuo mechaninio streso jų migravimo metu, suteikdami joms joms viskoelastinį pagrindą ir palaikydami organelių padėtį bei jų vientisumą EMT metu [203]. Tačiau tikslus vimentino veikimo mechanizmas, leidžiantis jam atlikti šias funkcijas, nėra žinomas ir reikalauja tolesnių tyrimų [202]. EMT procesui būdinga padidėjusi vimentino raiška navike, tai susiję su ląstelių adhezijos praradimu [204]. Yra hipotezė, kad EMT gali transformuoti nekamienines ląsteles į vėžio kamienines ląsteles, kurios yra vimentinui-teigiamos ląstelės [205]. Vimentinas palaiko ląstelių migravimą ir ankstyvą vėžio invaziją, reguliuodamas įvairių genų transkripciją ir aktyvindamas signalinius kelius, kaip RAB25 baltymo veikiamą AKT/GSK-3 β /Snail, pro-migravimo fermento AXL veikiamą ERK, integrino β 4 veikiamą PI3K/AKT/MAPK signalus ir PLAU/ERK1/2/PI3K arba PLAU veikiamą TGF- β 1/MMPs genų transkripcijos reguliavimą [202]. Kai kurie tyrėjai nustatė TMZ atsparumo gydymui ir vimentino raiškos ryšį [206].

GBM patogenezės mechanizmai imituoja EMT ir yra susiję su padidėjusia ląstelių invazija [207], o EMT procesas ne tik lemia GBM atsparumą gydymui, bet ir palengvina naviko invaziją [208]. GBM invazija susijusi per naviko mikrotubulių formavimąsi, o vimentinas yra svarbus šiame procese. GBM pacientų mėginių GFRB ir vimentino imunofluorescencijos dažymas parodė, kad vimentino raiškos padidėjimas koreliuoja su aukštesnio laipsnio GBM. Vimentinui-teigiamos ląstelės buvo iš dalies kolokalizautos su GFRB-teigiamomis ląstelėmis, o tai rodo, kad GFRB-teigiamos ir vimentinui-teigiamos ląstelės yra susijusios su GBM progresavimu ir gali turėti įtakos naviko invazijai. GBM vimentino raiška yra atvirkščiai proporcinga ligos prognozei

[209]. Vimentinas yra įvairių vėžio rūšių prognozinis ir diagnostinis žymuo [196]. Aukštas vimentino kiekis kraujo serume koreliuoja su GBM pacientų trumpesniu vidutiniu išgyvenamumu [210]. Vimentinas laikomas perspektyviu GBM terapiniu taikiniu [200, 211].

1.4. Su GBM raida susijusių genų raiškos tyrimo žymenys

1.4.1. NKCC1 nešiklis

Na-K-2Cl nešiklis 1 (NKCC1), kurį koduoja *SLC12A2*, perneša Na^+ , K^+ ir Cl^- jonus į ląstelę [212, 213]. *SLC12A2* raiškos ryšys su GBM yra gerai dokumentuotas, visų pirma dėl jo įtakos jonų homeostazei, ląstelės tūrio reguliavimui, migravimui ir gydymo atsparumui [59]. Na^+ ir Cl^- naviko mikroadaplinkoje dalyvauja vėžio progresavime [214, 215]. Padidėjusi užląstelinė Na^+ koncentracija gali skatinti ląstelių NKCC1 aktyvumą [216]. Nustatyta, kad GBM ląstelėse Cl^- koncentracija yra daug didesnė, palyginti su žemo laipsnio gliomomis ir nepažeistomis smegenų žievės ląstelėmis [217]. GBM ląstelė kaupia Cl^- iki lygio, kuris yra apie 10 kartų didesnis nei neuronų [218]. GBM ląstelių viduląstelinės chlorido koncentracijos ($[\text{Cl}^-]_i$) homeostazės sutrikimas susijęs su padidėjusia NKCC1 raiška [219]. NKCC1 aktyvumas yra tiesiogiai susijęs su GBM ląstelių proliferacija [59, 215, 220]. Žmogaus gliomos NKCC1 raiška teigiamai koreliuoja su GBM laipsniu [218]. Didelis *SLC12A2*/NKCC1 raiškos lygis koreliuoja su blogesniu bendru GBM pacientų išgyvenamumu ir yra prognozinis žymuo [221, 222].

NKCC1 skatina GBM naviko ląstelių migravimą, reguliuodamas ląstelių tūrį per WNK/SPAK signalinį kelią, ir palengvina EMT procesą [62]. Kai ląstelės migravimas baigiasi, NKCC1 kaupia Cl^- ląstelėje; ląstelės tūris padidėja ir pasiekia savo dydį, buvusį prieš migravimą – šis procesas vadinamas reguliuojamuoju tūrio padidėjimu [223].

Farmakologinis NKCC1 slopinimas mažina gliomos ląstelių migravimą ir invaziją [218, 224]. Naviko ląstelių $[\text{Cl}^-]_i$ yra svarbus vėžio gydymo taikiny; NKCC1 slopinimas gali stabdyti naviko ląstelių proliferaciją ir skatinti apoptozę. NKCC1 slopinimas sumažina $[\text{Cl}^-]_i$; $[\text{Cl}^-]_i$ gali turėti įtakos vėžinių ląstelių proliferacijai ir apoptozei [225, 226]. NKCC1 reguliuoja $[\text{Cl}^-]_i$ ir ląstelių tūrį, veikdamas ląstelių migravimą ir invaziją per citoskeleto veikimą (aktino dinamiką sąveikaujant su kofilinu), EMT procesus (per RhoA/Rac1 signalinimą) bei ląstelių adhezijos pokyčius. Sutrikusi Cl^- homeostazė skatina peritumorinę edemą ir galimą epilepsiją [221, 227].

TMZ didina NKCC1 raišką gliomos ląstelėse ir reaktyviuose astroцитuose, prisidėdamas prie atsparumo gydymui atsiradimo. Naujausi tyrimai sieja NKCC1 disbalansą su pakitusiu GABAerginiu signalinimu (sužadina dėl

didelio viduląstelinio Cl^- kiekio), o tai gali skatinti ligos progresavimą ir atkrytį [221, 227]. Damanskienė ir kt. nustatė, kad TMZ *in vitro* labai padidino *SLC12A2* raišką vaikų GBM PBT24 ir SF8628 ląstelėse [228].

Pelių gliomos modeliai, kuriais tirtas dviejų gliomos ląstelių linijų intrakranijinis persodinimas, parodė, kad NKCC1 raiška padidėjo tiek gliomos naviko ląstelėse, tiek su naviku susijusiuose reaktyviuose astrocituose, reaguojant į monoterapiją TMZ. NKCC1 slopinimas galėtų sustiprinti gliomos ląstelių apoptozę ir sumažinti astroglizę, o tai parodė galimą NKCC1 inhibitorių terapinį poveikį [221]. *SLC12A2* aktyvinimas, kurį sukelia TMZ glioblastomoje, priklauso nuo WNK kinazės baltymo fosforilinimo [229]. Žmogaus GBM ląstelėse pastebimas padidėjęs NKCC1 ir dviejų kinazių – WNK1 ir OSR1 – aktyvumas. WNK1 arba OSR1 raiškos slopinimas sumažina ląstelės vidaus K^+ ir Cl^- koncentraciją. TMZ gali aktyvinti WNK1/OSR1/NKCC1 signalinį kelią ir sustiprinti gliomos ląstelių migravimą. Farmakologinis NKCC1 slopinimas labai sumažina gliomos ląstelių migravimą po TMZ gydymo vaistais, kurie slopina WNK1/OSR1/NKCC1 kelią [61]. Eksperimentiniai tyrimai parodė, kad nešiklio inhibitorius – bumetanidas, kuris beveik nepraeina kraujo-smegenų barjero, slopindamas NKCC1, stabdo gliomos ląstelių migravimą ir invaziją *in vitro* [230].

NKCC1 slopinimas mažina naviko proliferaciją, invaziją ir augimą pelių gliomos modeliuose (GL26, SB28); mažina reaktyviąją astroglizę, atkuria astrocitų glutamato nešiklių aktyvumą (GLT-1/GLAST) [221, 222].

Valpro rūgštis (VPA) gali reguliuoti *SLC12A2* raišką GBM ląstelių linijų ląstelėse (kai kada tai priklauso nuo lyties ar konkrečios linijos), o tai rodo individualizuoto gydymo galimybes. Damanskienė ir kt. nustatė, kad VPA *in vitro* labai padidino *SLC12A2* raišką vaikų GBM PBT24, bet ne SF8628 ląstelėse [231], o Juknevičienė ir kt. parodė, kad nesukėlė poveikio suaugusių GBM U87 ląstelėms ir padidino T98G ląstelių *SLC12A2* raišką [232]. Juknevičienė ir kt. nustatė, kad VPA sumažino *SLC12A2* raišką nekastruotų žiurkių patinėlių, bet ne patelių timocituose [233].

Stanevičiūtė ir kt. nustatė, kad NaDCA mažina NKCC1 raišką žiurkių timocituose [234, 235]. Damanskienė ir kt. parodė, kad NaDCA ar MgDCA nesukėlė poveikio vaikų GBM PBT24 ir SF8628 *SLC12A2* raiškai [155]. Gečys ir kt. nustatė, kad NaVPA–NaDCA, taip pat TMZ, *in vitro* nevienodai veikė *SLC12A2* raišką žmogaus pirminėse GBM ląstelėse (IDH-laukinio tipo navikuose): NaVPA–NaDCA reikšmingai padidino GBM5-1F, GBM5-2F ir sumažino GBM5-3F ląstelių *SLC12A2* raišką; TMZ sumažino GBM5-3F ląstelių *SLC12A2* raišką, bet nesukėlė poveikio GBM5-1F ir GBM5-2F ląstelėms [132].

Iki 2026 m. pradžios yra atlikti tik ikiklinikiniai tyrimai; nėra jokių specialių klinikinių tyrimų duomenų, taikant NKCC1 inhibitorius GBM gydyti.

1.4.2. KCC2 nešiklis

K-CI nešiklis (KCC2) yra nustatomas CNS ląstelėse, jo genas koduojamas *SLC12A5* [236, 237]. KCC2 išneša iš ląstelės K^+ ir Cl^- jonus [238]. Apoptozės metu ląstelės susitraukia, t. y. sumažėja jų tūris, dėl to, kad sumažėja ląstelės vidaus K^+ ($[K^+]_i$) ir Cl^- ($[Cl^-]_i$) koncentracijos [239, 240], ir tai susiję su kaspazių ir apoptozės nukleazių aktyvinimu [241].

KCC2 raiška GBM ląstelėse yra sumažėjusi, o padidėjusi KCC2 raiška GBM ląstelėse susijusi su GBM ląstelių proliferacijos slopinimu [242]; *SLC12A5* yra galimas gliomos progresavimo slopintojas [243]. *SLC12A5* raiška susijusi su gliomos U251 MG ląstelių proliferacijos slopinimu; šio nešiklio aktyvinimas yra ankstyvas gliomos ląstelių apoptozės požymis [242]. KCC2 rodiklis buvo teigiamai susijęs su naviką infiltruojančių makrofagų ir $CD4^+$ T ląstelių kiekiu [244]. *SLC12A5* susijęs su bloga GBM prognoze ir geno raiška GBM yra sumažėjusi. *SLC12A5* raiškos sumažėjimas koreliuoja su padidėjusiu smegenų tūriu dėl edemos ir aktyvintu MMP9/STAT3 signaliniu keliu [71]: MMP9 yra gelatinazė, kuri gali skaidyti IV tipo kolageną pamatinėje membranoje ir skatinti GBM ląstelių metastazavimą [245]; įrodyta, kad *STAT3* reguliuoja *MMP9* raišką [246].

Suaugusių GBM pacientų, sergančių epilepsija, naviko aplinkos histologiniuose mėginiuose nustatomas būdingas sumažėjęs KCC2 raiškos lygis [247, 248]. Sergantiesiems GBM, sutrikus NKCC1 ir KCC2 aktyvumo pusiausvyrai, gali susilpnėti gama aminosviesto rūgšties (GABA) hiperpoliarizuojamasis poveikis neuronams, o tai gali turėti reikšmės epilepsijos atsiradimui. Epilepsijos priepuoliai pablogina GBM ligos eigą [249]. Aktyvinant KCC2 GBM ląstelėse, vaistų poveikis gali garantuoti GABA A receptorių funkcionavimą postsinapsiniuose neuronuose [237] ir taip padėtų kontroliuoti priepuolių intensyvumą [249].

Damanskienė ir kt. bei Juknevičienė ir kt. nustatė, kad GBM U87, PBT24 ir SF8628 ląstelių gydymas VPA reikšmingai padidino *SLC12A5* raišką [231, 232]; parodė, kad gydymas TMZ reikšmingai padidino *SLC12A5* raišką vaikų GBM PBT24 ir SF8628 ląstelėse [228]; nustatė, kad 3 mM NaDCA arba 3 mM MgDCA nesukėlė poveikio *SLC12A5* PBT24 ir SF8628 ląstelių raiškai [155]. Gečys ir kt. parodė, kad NaVPA–NaDCA, taip pat TMZ, *in vitro* turėjo skirtingą poveikį *SLC12A5* raiškai žmogaus pirminėse GBM ląstelėse (IDH-laukinio tipo navikuose); tyrimas parodė, kad NaVPA–NaDCA gali turėti poveikį nešikliui, tačiau šis poveikis yra individualus: NaVPA–NaDCA reikšmingai padidino GBM5-1F, GBM5-2F ir sumažino GBM5-3F ląstelių *SLC12A5* raišką. TMZ nesukėlė poveikio GBM5-1F, GBM5-2F ir GBM5-3F ląstelių *SLC12A5* raiškai [132].

1.4.3. SLC5A8 nešiklis

SLC5A8 (taip pat žinomas kaip SMCT1 arba su natriu susijęs monokarboksilato nešiklis 1) yra su Na^+ ir Cl^- susijęs monokarboksilatų nešiklis, žmogaus ir eksperimentinių gliomų slopiklis, kurio genas koduojamas *SLC5A8*; nešiklio aktyvumas priklauso nuo Na^+ ir Cl^- koncentracijos ląstelėje [250–252]. SLC5A8 pirmą kartą buvo identifikuotas kaip galimas naviko supresorius storosios žarnos vėžio atveju, o šis nešiklio vaidmuo būdingas ir kitų lokalizacijų navikų tipams, įskaitant gliomas [253]. SLC5A8 perneša trumpagrandes riebiąsias rūgštis, acetatą, butiratą, valeratą, piruvatą, propionatą, nikotinatą, β -hidroksibutiratą, dichloroacetatą (DCA) [250, 254, 255]. Atlikti tyrimai su „laukinio-tipo“ c/ebp δ +/- ir c/ebp δ -/- suaugusiais pelių patinėliais parodė, kad SLC5A8 į ląstelę perneša daugiausia trumpų grandinių riebalų rūgštis [256, 257]. *SLC5A8* yra nustatomas daugelyje žmogaus audinių, tačiau pirminėse gliomose geno raiška yra sumažėjusi arba neišreikšta [251, 258]. *SLC5A8* raiškos reguliavimas dar nėra gerai išnagrinėtas, šio geno promotoriaus seka [259] ir transkripcijos veiksnys identifikuoti [256], tačiau trūksta išsamių tyrimų, apibūdinančių reguliavimo mechanizmus. Įrodyta, kad mikroRNR miR-181a-5p, miR-182-5p ir miR-494-3p tiesiogiai reguliuoja *SLC5A8* raišką [258].

SLC5A8 raiškos sumažėjimas yra būdingas kancerogenezės požymis [260], o mažas baltymo kiekis ląstelėje yra blogos naviko prognozės požymis [261]. *SLC5A8* raiškos padidėjimas gimdos kaklelio vėžio ląstelėse susijęs su slopinama proliferacija ir aktyvesne apoptoze, kuri susijusi su prislopintu Wnt signaliniu keliu [262]; *SLC5A8* yra naviko supresorius gimdos kaklelio vėžio atveju [263].

SLC5A8 sąveikauja su survivinu, perkelia pastarąjį į plazminę membraną ir sumažina survivino koncentraciją branduolyje; taip pat slopina survivino raišką transkripcijos lygmenyje, slopindamas *STAT3* fosforilinimą. Didelė survivino raiška yra naudinga vėžinėms ląstelėms, nes skatina mitozę ir slopina apoptozę. SLC5A8 sukeliami survivino lokalizacijos ir koncentracijos pokyčiai lemia ląstelių ciklo stabdymą, apoptozės sukėlimą ir didesnę jautrumą chemoterapijai [264]. Navikai, kuriuose *SLC5A8* raiška yra normali arba padidėjusi, geriau reaguoja į gydymą DCA [254], galbūt dėl padidėjusio DCA įsisavinimo per šį transporterį [265]. *SLC5A8* skatina apoptozę, palengvindamas programuotą naviko ląstelių mirtį, tuo pačiu slopindamas jų proliferaciją ir taip stabdydamas naviko progresavimą [266, 267]. SLC5A8 aktyvumas žiurkių patinų dvylikapirštės žarnos enterocituose priklauso nuo NKCC1 aktyvumo [268].

SLC5A8 raiškos slopinimas susijęs su DNR metiliniu ir bloga prognoze [252]; *SLC5A8* promotoriaus hipermetilinimas yra susijęs su agresyvia

papiline skyd liaukės karcinoma [269]. Vėžio ląstelių gydymas DNR demetilimo preparatais padidina *SLC5A8* raišką [254]. *SLC5A8* skatina ląstelių apoptozę slopindamas HDAC per piruvato priklausomą mechanizmą mitochondrijose [256]. VPA aktyvina genus, kurių veiklą reguliuoja DNR metilinimas [270, 271]; Juknevičienė ir kt. nustatė, kad VPA padidina *SLC5A8* raišką U87, bet ne T98G ląstelėse [232, 251]. Damanskienė ir kt. nustatė, kad VPA padidino *SLC5A8* raišką PBT24 ir SF8628 ląstelėse [231], tačiau NaDCA ar MgDCA nesukėlė poveikio šių ląstelių *SLC5A8* raiškai [155]. Juknevičienė ir kt. nustatė, kad keturių savaičių gydymas 300 mg/kg per dieną VPA sumažino Wistar kastruotų ir nekastruotų žiurkių patinėlių ir padidino nekastruotų žiurkių patelių timocitų *Slc5a8* raišką [272]. Stakišaitis ir kt. nustatė, kad dviejų savaičių gydymas 100 mg/kg per dieną NaDCA ir 150 mg/kg per dieną NaVPA deriniu padidino Balb/c pelių patinėlių timocitų *Slc5a8* raišką [28]. Juknevičienė nustatė, kad suaugusių GBM U87 ląstelių gydymas 2 mM NaVPA–1,5 mM MgDCA ir 0,75 mM NaVPA–1,5 mM MgDCA deriniais reikšmingai aktyvino *SLC5A8* raišką, kuri kontrolinių ląstelių buvo neišreikšta; tokio poveikio nenustatyta T98G ląstelėms [273]. Damanskienė nustatė, kad, palyginus su kontrole, gydymas 4 mM NaVPA–5 mM NaDCA reikšmingai padidino vaikų GBM PBT24 ir SF8628 ląstelių *SLC5A8* raišką [274].

1.4.4. E-kadherinas ir N-kadherinas

Kadherinai reguliuoja apoptozę, genų raišką, ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir migravimą [275]. Genas *CDH1* koduoja ląstelių adhezijos baltymą E-kadheriną, kuris yra naviko slopintojas [275], ir jo pokyčiai susiję su tam tikrų epitelinių navikų raida [276]. E-kadherinas yra nuo kalcio priklausomas I tipo transmembraninis glikoproteinas, kuris garantuoja su Ca^{2+} susijusių ląstelių tarpusavio adheziją [277], gali slopinti naviko ląstelių invaziją ir riboti ląstelių judrumą [278]. E-kadherinas svarbus palaikant ląstelių adheziją, stabilizuojant citoskeletą ir išsaugant normalią audinių bei organų morfologinę struktūrą [279]. E-kadherinas reguliuoja daugelį signalinių kelių: skatina p27 raišką, slopindamas CDK ciklinų aktyvumą, didina *Egr1* raišką, skatina *PTEN* transkripciją ir slopina PI3K/Akt signalinį kelią, taip stabdydamas piktybinę ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją [280, 281]. *CDH1* raiška yra susijusi su daugelio karcinomų, įskaitant storosios žarnos, skrandžio ir kiaušidžių karcinomas, raida ir progresavimu [282–284]. *CDH1* raiškos sumažėjimas gali skatinti invazyvumą ir piktybiškumą [285–288]. Transkripcijos slopinimas gali sumažinti *CDH1* raišką ir paskatinti naviko metastazavimą [289–291]. Kai kurie tyrimai rodo, kad tam tikrų vėžio formų ankstyvosiose stadijose gali įvykti kompensacinis *CDH1* raiškos padidėjimas

[292], galbūt kaip vėžinių ląstelių prisitaikymo reakcija, skirta išlaikyti tam tikrą ląstelių adhezijos lygį, būdingą naviko mikroaplinkai [293]. E-kadherino raiška GBM yra gana reta – dažniausiai neišreikšta [115]. Gliomose *CDH1* raiška yra žema arba visai nenustatoma dėl hipermetilavimo ir mažėja didėjant GBM stadijai [294–296].

N-kadherinas (koduojamas *CDH2*) dalyvauja CNS vystymosi procesuose [297], tačiau navikuose jis stiprina ląstelių gebėjimą migruoti ir įsiskverbti į aplinkinius audinius [298]. *CDH2* raiška GBM tiesiogiai koreliuoja su naviko laipsniu [59, 275, 299]. Iš GBM kilusiose ląstelėse buvo nustatytas padidėjęs *CDH2* raiškos lygis ir sumažėjusi *CDH1* raiška [300]. Išanalizavus *CDH2* raišką TCGA (angl. *The Cancer Genome Atlas*), CCGA (angl. *The Circulating Cell-free Genome Atlas*) ir REMBRANDT navikų duomenų bazėse, buvo nustatyta *CDH2* raiškos koreliacija su GBM laipsniu. Padidėjusi *CDH2* raiška taip pat buvo susijusi su trumpesniu išgyvenamumu, o tai rodo, kad *CDH2* gali būti agresyvaus naviko fenotipo požymis [301]. Šiuo metu N-kadherinas yra vienas iš galimų taikinių, nes mažesnis šio baltymo kiekis prailgina GBM pacientų išgyvenamumą [300].

GBM progresavimas ir atsparumas gydymui yra susiję su GBM EMT mechanizmais, kurių metu sumažėja E-kadherino raiška, o N-kadherino raiška padidėja [302], dėl to susidaro mezenchiminis potipis, kuris yra invazivesnis ir atsparesnis gydymui [275, 299]. Šis poveikis GBM kamieninėse ląstelėse (angl. *glioblastoma stem cells*; GCS) lemia GCS gydymui radiorezistentinį fenotipą, kurį išgyvenusiose ląstelėse sukelia γ -spinduliuotė, ir šis rezultatas buvo įrodytas *in vivo* modelias [303]. Didesnis N-kadherino raiškos lygis susijęs su GBM ląstelių antiapoptoziniu poveikiu. Wnt/ β -katenino kelio slopinimas lemia sulėtėjusią proliferaciją [303].

Juknevičienė ir kt. nustatė, kad GBM U87 ląstelių gydymas VPA nesukėlė poveikio *CDH1* raiškai; T98G kontrolinių ląstelių *CDH1* raiška buvo neišreikšta (nenustatyta), o T98G ląstelėse *CDH1* buvo nustatoma po gydymo 0,75 mM ir 1,5 mM VPA; 1,5 mM VPA padidino *CDH2* raišką U87 ląstelėse, o 1,5 mM, 0,75 mM ir 0,5 mM VPA padidino *CDH2* raišką T98G ląstelėse [232]. Damanskienės ir kt. tyrimai parodė, kad NaDCA arba MgDCA nesukėlė poveikio *CDH1* raiškai vaikų GBM PBT24 ląstelėse ir *CDH2* raiškai PBT24 bei SF8628 ląstelėse, tačiau 1,5 mM MgDCA padidino *CDH1* raišką SF8628 ląstelėse [155]; nustatė, kad gydymas 50 μ M TMZ, palyginti su kontroline grupe, nesukėlė poveikio *CDH1* ir *CDH2* raiškai vaikų GBM PBT24 ir SF8628 ląstelėse [228]. Juknevičienė ir kt. nustatė, kad suaugusių GBM U87 ir T98G kontrolinių ląstelių *CDH1* raiška buvo neišreikšta (nenustatyta), o gydymas 2 mM NaVPA–1,5 mM MgDCA suaktyvino U87 ląstelių *CDH1* raišką. Palyginus U87 ir T98G kontrolinių ląstelių

CDH2 raišką su NaVPA–MgDCA gydytų grupių raiška, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta [273]. Damanskienė ir kt. nustatė, kad vaikų GBM PBT24 ląstelių gydymas 4 mM NaVPA–5 mM NaDCA reikšmingai padidino *CDH1* ir *CDH2* raišką ir SF8628 ląstelių padidino tik *CDH1* raišką [274].

1.5. Natrio dichloroacetato farmakologinis poveikis

GBM ląstelių gyvybingumą palaiko OKSFOS, kuris yra būdingas vėžio kamieninių ląstelių ir chemoterapijai atsparių ląstelių požymis. *In vitro* ir *in vivo* tyrimai rodo, kad OKSFOS funkcijos slopinimas gali paveikti naviko mikroaplinką, mažinti hipoksiją audinyje ir stiprinti priešnavikinį imuninį atsaką, o tai svarbu ieškant GBM gydymo galimybių [31, 32, 35, 304]. GBM ląstelėse pastebimas padidėjęs PDK raiškos lygis, dėl kurio sustiprėja glikolizės procesai [33–35, 305]. PDK atrankiai slopina piruvato dehidrogenazės (PDH) kompleksą, kuris yra būtinas glikolizės ir oksidacijos procesams [33]. PDH inaktyvaciją skatina padidėjusi PDK1 raiška GBM ląstelėse [306], kuri susijusi su atsparumu chemoterapijai [305]. GBM turinčių pacientų, kurių *HK2* ir *PKM2* genų, susijusių su glikolize, raiška buvo didelė, būdingas trumpesnis bendras išgyvenamumo laikotarpis [307]. PDK slopinimas yra GBM gydymo taikinytis [36].

DCA yra specifinis PDK inhibitorius [308], taip aktyvina PDH [309], palaiko gliukozės oksidaciją mitochondrijose, padidėjusį reaktyviųjų deguonies junginių susidarymą navike ir jo mikroaplinkoje, slopina pieno rūgšties gamybą [310, 311] ir skatina naviko ląstelių apoptozę [304, 310–313].

NaDCA slopina GBM ląstelių sferoidų augimą, bet U87 ląstelių sferoidai pasirodė esantys atsparūs 10 mM NaDCA poveikiui [314]. NaDCA monoterapija *in vivo* reikšmingai slopino U87 ląstelių naviko po oda augimą, tiriant *nude* (imunodeficitinių) patinėlių Balb/c pelių modeliu [315]. Kiti nenustatė DCA monoterapijos poveikio U87 naviko augimui pelių smegenyse [316] ir poodinio U87 naviko ksenotransplantui, tiriant be užkrūčio liaukos *nude* pelių patelių modeliu [314]. Tyrimai, atlikti su imunodeficitinių pelių smegenyse įsodintais U87 navikais, parodė, kad NaDCA ir radioterapijos derinys pailgino pelių išgyvenamumą [316]. Iš pacientų paimitose pirminėse kamieninėse ląstelėse, panašiose GBM ląstelėms, DCA *in vitro* slopino jų proliferaciją ir invaziją, pieno rūgšties gamybą [33]. Tai, kad gliomos nevienodai reaguoja į DCA, greičiausiai lemia jų metabolinis nevienalytiškumas (gliomos kamieninėse ląstelėse GBM18, GBM27, GBM38, taip pat U87 ląstelėse) [317], ir tai gali paaiškinti skirtingą DCA veiksmingumą [265].

NaDCA veiksmingumo navikui *in vitro* ir *in vivo* tyrimų duomenų skirtumai kelia tam tikrų abejonių dėl *in vitro* tyrimams naudoto preparato dozės [318], nes kai kurių tyrėjų *in vitro* tyrimai buvo atlikti naudojant dideles NaDCA dozes, neatsižvelgiant į susidariusią Na^+ koncentraciją terpėje [319]; būtina įvertinti, ar NaDCA koncentracija tyrimo terpėje nesukels hipernatremijos; Na^+ koncentracija kraujo serume viršijanti 150 mM lemia hipernatremiją [320], o izotoninės komercinės terpės turi apie 136 mM Na^+ , kas riboja NaDCA dozės poveikio tyrimus (tokiomis sąlygomis galima tirti ne > 12 mM DCA poveikį). Tyrimai rodo, kad naviko mikroaplinkoje esantys Na^+ ir Cl^- veikia vėžio progresavimą [214].

DCA mažina pieno rūgšties susidarymą makrofaguose ir sudaro sąlygas įgimto imuninio atsako veikimui [321], neutralizuojant pieno rūgšties sukeliamą imuninės sistemos slopinimą ir pagerinant T ląstelių funkcijas [322]. DCA sukeltas PDK slopinimas lemia hipoksiją sukeliančio veiksnio 1 alfa (angl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*; HIF-1 α) aktyvumo slopinimą ir slopina neoangiogenezę nesmulkialąstelinio plaučių vėžio A549 ląstelių navikuose, tiriant pelių modeliu [323]. DCA teigiamai reguliuoja p53, taip stiprina naviko ląstelių apoptozę ir slopina ląstelių proliferaciją plaučių adenokarcinomos A549, H1975 ir B ląstelių leukemijos EHEB, JVM-2, JVM-3 ląstelėse [324, 325]. Damanskienės ir kt. tyrimai parodė, kad 10 mM MgDCA ir NaDCA preparatai reikšmingai sumažino vaikų GBM PBT24 ir SF8628 ląstelių navikų invaziją į CAM, o 5 mM NaDCA sumažino tik SF8628 navikų augimą, invaziją; 5 mM MgDCA slopino PBT24 navikų, o 5 mM ir 10 mM NaDCA – SF8628 navikų, neoangiogenezę, tiriant CAM modeliu [155]. Juknevičienės ir kt. tyrimai parodė, kad 5 mM ir 2,5 mM MgDCA dozės reikšmingai sumažino suaugusiųjų GBM U87 ir T98G navikų augimą, invazijos dažnumą į CAM ir kraujagyslių skaičių mezenchimoje [273].

NaDCA gali padidinti GBM ląstelių jautrumą TMZ [326, 327]. 22 dienų trukmės gydymas DCA doze 150 mg/kg/parai sumažino C57BL/6 pelių įsodintų GBM GL-261 ląstelių naviko tūrį, tačiau neturėjo įtakos pelių išgyvenamumui [328]. Ortotopiniuose GBM GL261 ir CT2A C57Bl/6 pelių modeliuose glikolizės ir riebiųjų rūgščių oksidacijos slopinimas DCA derinyje su ranolazinu prailgino gyvūnų išgyvenamumą [329]. DCA priešnavikinis poveikis GBM U251 ląstelėms labai sustiprėjo, kai DCA poveikis tirtas kartu su PX-478, HIF-1 α inhibitoriumi [330].

Yra vykdomi DCA veiksmingumo klinikiniai tyrimai, gydant GBM [265]: NCT051202 IIA fazės klinikinis tyrimas; tiriamieji gydomi *per os* DCA vieną savaitę iki chirurginės operacijos, o kontrolinė grupė – pacientai, kurie nebus gydyti DCA prieš operaciją; visiems pacientams tiriami naviko audinio biocheminiai GBM žymenys – vertinti DCA gydymo veiksmingumą po operacijos. NCT01111097 tyrimo metu 15-ka pacientų, kuriems

atsinaujino smegenų navikas (GBM ar kitų lokalizacijų navikų smegenų metastazės) buvo gydomi DCA 8-12, 5 mg/kg/ 2 k./d doze. Gydymas parodė, kad nebuvo nustatyta DCA toksinio poveikio ir nustatytas ligos stabilizavimas aštuoniems pacientams pirmomis keturiomis DCA gydymo savaitėmis [331, 332].

1.6. Valpro rūgšties farmakologinis poveikis

Jau daugiau nei septynis dešimtmečius VPA vartojamas kaip prieštraukulinis vaistas [333]. VPA būdinga palankus saugumo profilis ir maža vaistų sąveikos tikimybė vyresnio amžiaus pacientams, sergantiems epilepsija ir vartojantiems daug vaistų [334]. Pastaruoju metu vis daugiau ikiklinikinių tyrimų rodo, kad VPA gali slopinti gliomos raidos mechanizmus didindamas gliomos ląstelių jautrumą chemoterapijai ar radioterapijai [335, 336]. VPA atrankiai slopina histonų deacetilazių HDAC1 ir HDAC2 aktyvumą [88, 337]. GBM ląstelėms būdinga padidėjusi HDAC2 raiška. HDAC2 raiškos slopinimas sukėlė GBM U87, U118, A172, LN229, T98G, LN18, U343 ir U373 ląstelių žūtį bei, tiriant ortotopiniu U87 ląstelių naviko pelės modeliu, slopino naviko augimą, per miR-3189 raišką slopindamas GLUT3 mRNR transkripciją ir reguliuodamas gliukozės metabolizmą [338]. HDAC2 slopinimas stabdo GBM U87 ir A172 ląstelių proliferaciją ir invaziją [339], stebėta GBM U251, U87, YH13, AM38 ir T98G ląstelių proliferacijos slopinimas [340], ir tai susiję su glikogeno sintazės kinazės 3 β slopinimu [341]; VPA poveikis U87 ir U251 GBM ląstelėms pasireiškė padidėjusia proapoptozinių baltymų Bad ir Bax ir sumažėjusia antiapoptozinio baltymo Bcl-2 koncentracija, dėl to sumažėjo ląstelių gyvybingumas, proliferacija, padidėjo ląstelių apoptozės raiška [342]. VPA poveikis rodo, kad HDAC2 gali būti taikinyss gydant GBM [339].

VPA – epigenetinis reguliatorius, gali daryti įtaką genų raiškai, slopinti ląstelių proliferaciją ir ląstelių ciklą bei sukelti apoptozę per demetilavimo mechanizmus [343, 344]. Trijų HDAC inhibitorių – vorinostato, romidepsino ir VPA – poveikis GBM buvo tirtas ikiklinikinių ir klinikinių tyrimų metu [345, 346]. Be to, 1/2 fazės klinikiniai tyrimai parodė VPA sinerginį poveikį vartojant kartu su priešnavikiniais preparatais sergantiems storosios žarnos vėžiu ir atkryčio bei metastazine galvos ir kaklo plokščialąsteline karcinoma [347–349]. VPA didina spindulinės terapijos veiksmingumą, didina GBM ląstelių jautrumą [350] aktyvinant apoptozės reakciją į radioterapiją [351]. Netoksiškos VPA dozės didina U87 ir T98G ląstelių jautrumą gefitinibui ir slopina ląstelių augimą per autofagiją [352]. VPA slopina aerobinę glikolizę,

mažindamas E2F transkripcijos veiksnio 1 lygį, taip sumažindamas glikolizinių genų (gliukozės-6-fosfato izomerazės ir fosfoglicerato kinazės 1) raišką. Šis VPA poveikis glikolizei gali būti svarbus ieškant VPA poveikio naviko ląstelėms [353]. VPA slopino GBM U87 ir T98G ląstelių gyvybingumą ir sukėlė ląstelių ciklo stabdymą G0/G1 fazėje [354], sumažino GBM A172 ir U251 ląstelių gyvybingumą, sustabdydamas ląstelių ciklą G2/M fazėje [355, 356]. VPA sumažino U87 ląstelių gyvybingumą, sukėlė apoptozę ir sumažino su proliferacija bei migravimu susijusio geno *CTNNB1* raišką [357], sukėlė GBM SF763, SF767, A172, U87 ir U251 MG ląstelių apoptozę per JAK/STAT signalinį kelią [358], slopino U87 EMT procesą, per *Smad4* raiškos pokyčius [359].

Kavaliauskaitė ir kt. parodė, kad 4 mM ir 8 mM VPA sumažino suaugusių GBM U87 naviko invaziją į CAM bei p53 ir EZH2 raišką navike [181]. Stakišaitis ir kt. nustatė, kad abiejų lyčių BALB/c pelių gonadektomija kartu su VPA gydymu sumažino Ki-67 raišką pelių plaučių adenokarcinomose [360]. Diržiuvienė ir kt. nustatė, kad VPA sumažino NCI-H146, A549 ir Sk_Lu_1 plaučių navikų invaziją į CAM [361]. Šlekienė ir kt. parodė, kad priklausomai nuo dozės VPA sumažėjo p53 ir EZH2 raiška NCI-H146 plaučių navikuose ant CAM [362]. VPA buvo tiriamas kartu su chemoterapija ar radioterapija, pradedant gydymą prieš arba po chemoradioterapijos, siekiant padidinti chemoterapijos veiksmingumą GBM pacientams, prailginti pacientų vidutinį bendrą išgyvenamumą [350, 352, 363, 364].

1.7. DCA–VPA farmakologinis poveikis

VPA ir DCA derinio taikymo GBM gydymui pagrindimas. VPA gali pagerinti DCA pernašą į ląstelę per demetilintą *SLC5A8*, kuris yra DCA nešiklis į ląstelę [254, 271]. NaVPA–NaDCA padidino *SLC5A8* raišką tik kai kuriose naviko ląstelėse [365]. Toks sinergizmas gali būti svarbus, nes jis leistų sumažinti DCA dozę ir nepageidaujamo DCA poveikio riziką. Pacientų tyrimai parodė, kad *SLC5A8* raiška buvo neišreikšta ar silpna daugumoje prostatos vėžio atvejų, ir šis raiškos sumažėjimas buvo atstatytas gydant demetilinančiu preparatu [366]. Šis atradimas rodo, kad epigenetinis nutildymas yra pagrindinis *SLC5A8* inaktyvacijos mechanizmas navikuose. VPA taip pat į ląstelę pernešamas per *SLC5A8* [367, 368], tačiau preparato poveikis nešikliui susijęs ne kaip su substratu, o kaip išoriniu poveikiu nešikliui [367, 368]. VPA sukelia DNR demetilinimą, taip didindamas *SLC5A8* raišką [254, 270, 271]. *SLC5A8* veikia kaip naviko slopiklis, kurio genas nutildomas metiliniu [251].

LSMU Histologijos ir embriologijos katedroje atlikti tyrimai, taikant CAM modelį, parodė, kad 2 mM NaVPA–5 mM NaDCA, 4 mM NaVPA–5 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM MgDCA deriniai reikšmingai slopino vaikų GBM PBT24 naviko invazijos į CAM dažnumą, sumažino CAM storį ir kraujagyslių skaičių membranoje po PBT24 naviku. Vaikų GBM SF8628 navike tik 4 mM NaVPA–5 mM NaDCA reikšmingai sumažino invazijos dažnumą. NaVPA–DCA nesukėlė poveikio CAM storiui ir kraujagyslių skaičiui po SF8628 naviku. NaVPA–DCA preparatai sumažino PBT24 ir SF8628 navikų PLBA raišką, reikšmingai sumažino PBT24 navikų p53 ir survivino raišką, bet nesukėlė poveikio SF8628 navikų p53 raiškai. 2 mM NaVPA–5 mM NaDCA, 4 mM NaVPA–5 mM NaDCA reikšmingai sumažino SF8628 navikų survivino raišką. Derinys nesukėlė poveikio PBT24 naviko EZH2 raiškai, kurią SF8628 navike reikšmingai sumažino tik 4 mM NaVPA–5 mM NaDCA derinys [274]. NaVPA–MgDCA reikšmingai sumažino GBM U87, bet ne T98G ląstelių navikų invaziją į CAM, kraujagyslių skaičių mezenchimoje po naviku, PLBA, p53 ir EZH2 raišką navike [273]. *In vitro* tyrimai parodė, kad 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA turėjo reikšmingą poveikį GBM moterų pacienčių pirminių ląstelių *EZH2* raiškai: padidino GBM5-1F, GBM5-2F raišką, o GBM5-3F ląstelių *EZH2* raišką sumažino [132]. VPA ir DCA druskų derinio taikymas GBM gydymui LSMU mokslininkų yra patentuotas (Europos patentų biuro patentas – *Derivative of Valproic Acid and Dichloroacetate Used for the Treatment of Cancer*, paraiškos nr. 21168796.7, publikacijos nr. EP3895702, publikacijos data 2025-09-24, Int. Cl. A61K 31/19, A61K 45/06, A61P 35/00) [369].

1.8. DCA ir VPA farmakokinetinis poveikis

DCA farmakokinetika. Specifinio PDK inhibitoriaus [308] DCA molekulinė masė yra 150 Da; tai vandenyje tirpi maža molekulė, kuri greitai absorbuojama virškinimo trakte, vartojama per burną pasiekia 100 proc. biologinį prieinamumą [370], su šlapimu išsiskiria mažiau nei 1 proc. suvartotos dozės [371, 372]. DCA metabolizuojasi kepenyse ir atitinka paprastą vienos erdvės farmakokinetinį modelį (angl. *the one-compartment pharmacokinetic model*) [371, 372]. DCA koncentracija serume greitai didėja preparatą suvartojus ir būdingas trumpas pusinės eliminacijos laikotarpis: po vienkartinės 25 mg/kg dozės didžiausia DCA koncentracija buvo pasiekta vidutiniškai po 1 valandos (mediana – 333 µM), o pusinės eliminacijos laikas buvo 92 minutės. Palyginti su vienkartinė doze, vartojimas 8 dienas iš eilės lėmė 2 kartus didesnę maksimalią koncentraciją kraujo serume, kuri buvo pasiekta maždaug po 2 valandų. Mažiausia koncentracija po 8 dienų DCA vartojimo taip pat buvo

didesnė nei po vienkartinės dozės [373]. Tai rodo, kad pakartotinis vaisto vartojimas susijęs su lėtesniu DCA pasišalinimu iš organizmo [309, 374]. Vidutinės didžiausios koncentracijos po 15 dienų vartojimo buvo didesnės, palyginti su 1 dienos [375]. Nors didžiausios koncentracijos serume toliau didėja, kai vaistas vartojamas pastoviai, pasiekiamas dinamiškas stabilus lygis [376, 377]. Maisto poveikis DCA absorbcijai nėra žinomas [373]. DCA metabolizmą lemia glutationo transferazės zeta 1/ maleilacetoacetato izomerazės (*GSTZ1/MAAI*) genotipas. Asmenys, turintys bent vieną natūralaus tipo *GSTZ1* haplotipą, DCA metabolizuoja greičiau ir todėl gali toleruoti didesnes DCA dozes, o tai gali būti susiję su mažesne DCA šalutinio poveikio rizika: *GSTZ1*A* aleliui būdinga trumpesnis DCA pusinės eliminacijos periodas [373]. Genetinių DCA metabolizmo ryšio tyrimų rezultatai rodo, kad DCA dozę galima parinkti individualiai, remiantis genetiniu profiliavimu, nustatant *GSTZ1* genotipą [378].

VPA farmakokinetinės savybės. HDAC 1 ir HDAC 2 inhibitoriaus VPA [88, 337] veiklioji medžiaga iš skrandyje neirių minkštųjų kapsulių atpalaiduojama plonojoje žarnoje ir absorbuojama. Bioprieinamumas yra beveik 100 proc. Maksimali koncentracija kraujo plazmoje susidaro apytikriai per 2–3 valandas po vaistinio preparato pavartojimo. Maistas absorbcijai įtakos neturi. Pastovi koncentracija kraujo plazmoje pasiekama po 2–4 dienų, priklausomai nuo intervalų tarp dozių. Yra žinomas atskirų pacientų ir jų grupių didelis koncentracijos kraujo plazmoje svyravimas. Apie 80–95 proc. valpro rūgšties susijungia su kraujo plazmos baltymais. Valpro rūgštis metabolizuojama kepenyse, daugiausia sujungiant su gliukurono rūgštimi. Valproatas slopina citochromo P450 fermentų sistemą. Didžioji valpro rūgšties dalis išsiskiria su šlapimu gliukuronidų pavidalu. Pusinis eliminacijos laikas yra 10–15 val.; jis daug trumpesnis vaikams – 6–10 val. [379].

1.9. DCA ir VPA praėjimas pro hematoencefalinį barjerą: palyginimas su kitų GBM gydyti vaistų farmakokinetikos rodikliais

Europos vaistų kontrolės agentūra yra registravusi suaugusiųjų GBM gydymui temozolomidą, kuris taip pat skiriamas ir vaikų GBM gydymui. Kiti registruoti vaistai gliomai gydyti yra lomustinas, karmustinas, trametinibas, dabrafenibas.

Temozolomidas – skirtas gydyti suaugusiuosius, kuriems naujai diagnozuota GBM, kartu su spinduline terapija ir vėliau kaip monoterapija; vaikus nuo trejų metų amžiaus, paauglius, sergančius piktybinėmis gliomomis.

Lomustinas – gali būti vartojamas atskirai arba kartu su kitais vaistais gydyti smegenų navikus (pirminiai ir metastazės į smegenis). Skiriamas kaip

monoterapija paliatyviu arba adjuvantiniam gydymui, dažniausiai vartojamas kartu su spinduline terapija ir chirurginiu gydymu [380].

Karmustinas – terapinės indikacijos yra smegenų navikai (GBM, smegenų kamieno gliomos, meduloblastoma, astrocitoma ir ependimoma), metastazės į smegenis; skiriamas kaip paliatyvus gydymas, vartojamas atskirai arba kombinuotoje terapijoje kartu su kitais patvirtintais chemoterapiniais vaistais [381].

Trametinibas – kartu su dabrafenibu yra skirtas gydyti 1 metų ir vyresnius vaikus, sergančius žemo laipsnio glioma su *BRAF V600E* mutacija, kuriems reikalingas sisteminis gydymas; kartu su dabrafenibu, kuriems anksčiau buvo taikytas bent vienas spindulinis ir (arba) chemoterapinis gydymas [382].

Dabrafenibas, vartojamas kartu su trametinibu, yra skirtas gydyti 1 metų ir vyresnius vaikus, sergančius glioma su *BRAF V600E* mutacija, kuriems reikalingas sisteminis gydymas; kartu su trametinibu, kuriems anksčiau buvo taikytas bent vienas spindulinis ir (arba) chemoterapinis gydymas [382].

Vaistų kūrimo procesui būdingas didelis nesėkmių lygis, kurį gali lemti ir vaistinio preparato blogos farmakokinetinės savybės. Naujas pkCSM kompiuterinis metodas [383] gali padėti nustatyti tiriamųjų vaistinių preparatų farmakokinetinius profilius, apibūdinant jų absorbcijos, pasiskirstymo, metabolizmo, išsiskyrimo ir toksiškumo (angl. *ADMET – absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity*; APMIT) savybes, leidžiantis palyginti su kitais vaistais – pkCSM – prognozavimo modelis vaistų kūrimui, yra vienas iš geriausių dabartinių metodų, taikomų apskaičiuoti farmakokinetines preparato savybes (prieinamas: <http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsm>). Kuriamo vaisto optimalus prisijungimas prie terapinio taikinio yra itin svarbus, norint pradėti vaisto klinikinį taikymą, būtina garantuoti, kad jis pasiektų taikinio vietą pakankama koncentracija, kad saugiai sukeltų farmakologinį poveikį. Supratimas apie APMIT savybių svarbą paskatino jas įtraukti į ankstyvą vaistų kūrimo etapą, leidžiantį sumažinti junginių nesėkmingą taikymą klinikiniais tyrimams.

1.9.1 pav. pateikti registruotų preparatų praėjimo pro hematoencefalinį (kraujo-smegenų) barjerą ir į smegenis rodikliai, palyginti su DCA ir VPA praeinamumu, taikant pkCSM (rodiklių apskaičiavimai padaryti Gyvybės centro doktoranto Ernesto Urniežiaus).

Vaistinio preparato pavadinimas	Hematoencefalinio barjero pralaidumas (logBB) ¹	CNS pralaidumas (logPS) ²	Rangas (logBB)	Rangas (logPS)
VPA	0,232	-2,259	1	1
DCA	-0,313	-2,661	4	3
Lomustinas	-0,136	-3,009	2	4
Karmustinas	-0,310	-3,060	3	6
Trametinibas	-0,532	-2,423	5	2
Dabrafenibas	-1,314	-3,016	6	5
TMZ	-1,332	-3,211	7	7

1.9.1 pav. Registruotų vaistinių preparatų praeinamumo pro hematoencefalinį barjerą ir į smegenis prognozuojami rodikliai, palyginti juos su atitinkamais DCA ir VPA rodikliais. Prognozuojami GBM skirtų gydyti preparatų kraujo-smegenų barjero ir CNS pralaidumai apskaičiuoti panaudojant pkCSM metodą [383]

¹Hematoencefalinio barjero pralaidumas (logBB): $\log BB = \log_{10}(C_{\text{smegenys}}/C_{\text{kraujas}})$.

logBB yra apibrėžiamas kaip vaistinio preparato koncentracijų (C) smegenyse ir kraujyje santykio logaritmas. Jis apibūdina koku mastu junginys pasiskirsto smegenyse kraujo atžvilgiu, todėl labiau nusako bendrą prasiskverbimą į smegenis negu vien tik pernašos per kraujo-smegenų barjerą greitis. $\log BB > 0$ – didesnis pralaidumas į smegenis (didesnė koncentracija smegenyse nei kraujyje), $\log BB < 0$ – silpnė pralaidumas į smegenis (mažesnė koncentracija smegenyse nei kraujyje).

²CNS pralaidumas (logPS): $\log PS = \log_{10}(P \times S)$.

logPS yra pralaidumo ir paviršiaus ploto sandaugos logaritmas – farmakokinetinis parametras, apibūdinantis, kaip greitai junginys pereina per kraujo-smegenų barjerą. Jis atspindi pernašos per endotelio barjerą greitį, o ne galutinį junginio pasiskirstymą smegenų audinyje pusiausvyros sąlygomis. Tai vaistinio preparato pralaidumo (P, cm/s) ir paviršiaus ploto (S, cm²) sandaugos logaritmas. Aukštesnė vertė → didesnis prognozuojamas pralaidumas į CNS, žemesnė (labiau neigiama) vertė → mažesnis prognozuojamas pralaidumas į CNS.

Vaistinių preparatų logBB ir logPS stulpelių langeliai pateikti pagal spalvų gradientą: žalia – didesnis prognozuojamas pralaidumas; geltona ir oranžinė – vidutinis pralaidumas; raudona – mažesnis prognozuojamas pralaidumas.

Pagal prognozuotas vertes, VPA būdingas didžiausias hematoencefalinio barjero pralaidumas (logBB), o iš karto po jo seka lomustinas, karmustinas ir DCA; visiems šiems junginiams prognozuojamas tam tikro laipsnio prasiškerbimas į smegenis. TMZ turi mažiausią prognozuojamą logBB rodiklio vertę šiame rinkinyje, o tai rodo silpniausią prognozuojamą patekimą į smegenis. Vertinant CNS pralaidumą (logPS), VPA, trametinibui ir DCA būdinga palankiausi rodikliai, palyginti su kitais vaistiniais preparatais, tuo tarpu

TMZ vėl būdinga neigiamiausia prognozuojama logPS vertė. Tai rodo prasčiausią prognozuojamą CNS pralaidumą iš analizuotų vaistų. Apibendrinant, VPA ir DCA pagal pralaidumo rodiklių profilį yra panašūs į gerai žinomus GBM gydymui taikomus vaistus, tokius kaip lomustinas, trametinibas ir karmustinas, o dabrafenibui ir ypač TMZ, palyginus su VPA ir DCA, būdingi mažiau palankūs hematoencefalinio barjero ir CNS pralaidumo profiliai.

1.10. Glioblastomos patogenezės ryšys su uždegimu

Uždegimas yra svarbi gliomų raidos ir progresavimo procesų dalis, yra lemiamas veiksnys, formuojantis naviko mikroaplinką ir gydymo veiksmingumui [384–387]. Senstant lėtinis silpnas uždegimas pasireiškia padidėjusiu IL-6 ir audinių nekrozės veiksnio TNF-alfa kiekiu [388], o padidėję prouždegiminių citokinių kiekiai kraujyje susiję su vėžio raida [389–391]. Augantis navikas lemia nuolatinį uždegimo citokinių, kuriuos išskiria smegenų imuninės ląstelės, kaip mikroglija ir makrofagai, gamybą [392, 393]. Citokinai skatina neoangiogenezę, padidina kraujo-smegenų barjero pralaidumą ir tuo pačiu slopina imuninių ląstelių patekimą į smegenis [393]. Be to, citokinai skatina imuninę sistemą slopinančios naviko mikroaplinkos susidarymą, o tai slopina imuninės sistemos gebėjimą sukelti veiksmingą priešnavikinį atsaką [27]. Uždegimas naviko mikroaplinkoje yra aktyvesnės GBM kancerogenezės požymis, kuris yra susijęs ir su GBM audinio nekroze [394]. Be to, chemoterapiniai vaistai ir spindulinė terapija sukelia masinę nekrotinę ląstelių žūtį, o naviko ląstelių liekanos stimuliuoja imuninių ląstelių prouždegiminių citokinių gamybą, kas skatina angiogenezę, naviko augimą ir metastazavimą [389], tai gali lemti atsparumą gydymui ir naviko atsinaujinimui [395, 396]. Uždegimas veikia genetinius ir epigenetinius pokyčius GBM ląstelėse [397]. Uždegimo signaliniai keliai aktyvina GBM onkogenezę, lemia DNR pažeidimus bei mutacijas naviko ląstelėse, yra svarbūs naviko progresavimo mechanizmams [64, 94].

IL-1 ir IL-6 yra pagrindiniai GBM naviko ląstelių mediatoriai uždegiminėje mikroaplinkoje, kurie aktyvina uždegimines signalų kaskadas, tokias kaip HIF-1 α , RAS, Wnt-1, NF- κ B, NLRP3 ir STAT3 [397], t. y. naviko ląstelės imuninį atsaką paverčia lėtiniu uždegimu [384, 385]. NF- κ B yra nuolat aktyvus GBM ląstelių branduolyje, skatina proliferaciją, invaziją, uždegimą, imuninės sistemos slopinimą ir atsparumą gydymui [398]. NF- κ B branduolyje veikia kaip transkripcijos veiksnys genų, dalyvaujančių imuniniame ir uždegimo atsake [399]. Citokinai, kaip TNF α , su audinių nekrozės veiksmiu susijęs apoptozę sukeliantis ligandas (angl. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Ligand*; TRAIL), epidermio augimo veiksnys

(angl. *epidermal growth factor*; EGF) ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), gali aktyvinti NF- κ B [400]. Rūgštinė ir hipoksinė GBM uždegiminė mikroaplinka sukelia TNF- α sukeltą NF- κ B aktyvavimą, kuris skatina IL-6 gamybą [69, 400]. GBM U87 ląstelės išskiriamas IL-6 aktyvina STAT3 signalinį kelią astroci- tuose, o tai stimuliuoja naviko ląsteles; savo ruožtu šios ląstelės, priklausy- damos nuo STAT3, išskiria dar daugiau IL-6. Toks abipusis IL-6 ir STAT3 aktyvinimas sukelia lėtinį uždegimą, skatinantį naviko augimą [401]. IL-6 skatina GBM U87 ląstelių invaziją ir augimą [402]. IL-11 (gaminamas pelių GBM GL261 ir žmogaus GBM U87 ląstelių) skatina STAT3 priklausomą TRAIL raišką astroci- tuose. Astroci- tų signaliniai keliai per STAT3 ir TRAIL buvo susiję su trumpesniu laikotarpiu iki ligos atsinaujinimo ir GBM pacientų trumpesniu bendru išgyvenamumu [403]. GBM U87 ir U251 ląstelės išskiria IL-1, IL-8 ir IL-33, kurie skatina GBM ląstelių proliferaciją, migravimą ir invaziją [385, 397, 404]. IL-33 gali skatinti GBM naviko ląstelių proliferaciją [397, 404, 405]. Aneksinas A1 (AnxA1) slopina imuninį atsaką navike, aktyvindamas NF- κ B (p65) ir didindamas IL-8 raišką bei jo kiekį GBM U87 ir U251 ląstelėse, o tai susiję su blogesniais išgyvenamumo rodikliais [385]. IL-1 β ir TGF- β didina uždegimo veiksnių genų raišką ir skatina GBM kamieninių ląstelių prouždegiminio fenotipo raidą, skatina ląstelių prolife- raciją ir migravimą [406]. IFN- γ padeda naviko mikroaplinkoje slopinti imu- ninį atsaką: IFN- γ aktyvina JAK/STAT signalų perdavimo kelią; tai lemia IRF-1 aktyvinimą, kuris skatina PD-L1 raišką ortotopiniame pelių gliomos GL261 ląstelių modelyje, taip slopina T ląstelių priešnavikinį veikimą ir skatina jų žūtį [407].

Vaistinių preparatų ikiklinikiniuose modeliuose poveikis į uždegimo mediatorių CCL2/CCR2 ašį, CSF1R ar IL-1 β signalinius kelius rodo jų per- spektyvų priešnavikinį veiksmingumą [408, 409]. Su vėžiu susijusių makro- fagų (angl. *tumor-associated macrophages*; TAM) perprogramavimas iš naviką skatinančio M2 tipo fenotipo į naviką slopinančio M1 tipo fenotipą yra strategija, siekiant įveikti imuninę sistemą slopinančią naviko mikroaplin- ką [410]. Kolonijas stimuliuojančio veiksnio 1 receptorių (angl. *colony- stimulating factor 1 receptor*; CSF1R) skatina imuninę sistemą slopinančių makrofagų migravimą į naviką, taip prisidedamas prie imuninę sistemą slopinančios mikroaplinkos susidarymo, kuri palengvina GBM progresavimą ir atsparumą gydymui. CSF1R blokavimas yra GBM gydymo strategija, nes tai galėtų slopinti makrofagų migravimą, pakeisti imuninę aplinką ir poten- cialiai padidinti kitų gydymo būdų, pvz., imunoterapijos, veiksmingumą [409, 411]. Vaistiniais preparatais slopinant NF- κ B, JAK/STAT, MAPK, PI3K/Akt/mTOR ir TRAIL signalinius kelius, kurie aktyvinasi uždegimo

metu ir yra GBM onkogeniniai veiksniai, galima pasiekti geresnį priešnavikinį veiksmingumą [412].

1.11. DCA–VPA priešūždegiminis poveikis

NaDCA yra tiriamasis priešnavikinis vaistas, kuriam būdingas ir priešūždegiminis poveikis [27, 413]. Tyrimai rodo, kad NaVPA taip pat turi imunitetą veikiantį ir priešūždegiminį poveikį [414, 415]. Stakišaičio ir kt. NaVPA–NaDCA priešūždegiminio poveikio tyrimai parodė, kad derinys, veikdamas žiurkių čiobrialiaukę (*in vivo*) ir suaugusiųjų T limfocitus (*in vitro*), slopino uždegimo ir imuninius procesus [28, 29], kurie svarbūs GBM patogenezėi.

Užkrūčio liauka (lot. *Gl. thymus*) yra pagrindinis limfoidinis organas, kuriame bręsta ir diferencijuojasi T limfocitai [416]. Žmogaus ir pelės *Gl. thymus* gamina prouždegiminius mediatorius net ir fiziologinėmis sąlygomis [417, 418]. Dėl *Gl. Thymus* esančio pastovaus uždegiminio fono, vyraujančio organo audinių mikroaplinkoje, kuris yra būtinas T limfocitų gamybai ir išskyrimui į kraują, užkrūčio liauka gali būti naudojama kaip modelis tirti tiriamųjų vaistų, slopinančių uždegimą ir imuninį atsaką, poveikį, nustatant su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raiškos pokyčius timocituose [28]. NaVPA–NaDCA derinys 2,1 karto padidino pelių patinų timocitų *Slc5a8* raišką: sinerginis mechanizmas pasireiškia dėl NaVPA demetilančio poveikio, kuris pagerina *Slc5A8* raišką ir DCA pernašą į ląstelę, ir taip sustiprina DCA farmakologinį poveikį [28]. Tyrimai parodė reikšmingą NaVPA–NaDCA poveikį uždegimui svarbių veiksmių genų raiškai timocituose, kai Balb/s pelių patinėliams 2 savaites buvo skiriamas NaDCA (100 mg/kg/parą) ir NaVPA (150 mg/kg/parą) derinys; gydymas reikšmingai pakeitė su uždegimu susijusių genų raišką: citokinų aktyvumo signaliniame kelyje (angl. *cytokine activity signaling pathway*), uždegiminio atsako signaliniame kelyje (angl. *inflammation response signaling pathway*) ir interleukino-17 (angl. *interleukin-17 signaling pathway*; IL-17) signaliniame kelyje. NaVPA–NaDCA reikšmingai paveikė 25-ių genų, susijusių su citokinų aktyvumo keliu, raišką: 11 genų (*Ccl2*, *Ccl3*, *Csf3*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Il17f*, *Il6*, *Spp1*, *Tnfsf11*, *Vegfa*) raiška reikšmingai sumažėjo, o 14 genų (*Bmp4*, *Bmp7*, *Ccl19*, *Ccl25*, *Cx3cl1*, *Cxcl12*, *Cxcl13*, *Il2*, *Il7*, *Il21*, *Il23a*, *Il27*, *Il33*, *Kitl*) raiška po gydymo reikšmingai padidėjo. NaDCA–NaVPA gydymas reikšmingai pakeitė 25-ių genų, susijusių su uždegiminio atsako keliu, raišką: 13 genų sutapo su citokinų aktyvumo keliu, iš kurių 7 genų raiška sumažėjo (*Ccl2*, *Ccl3*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Il6*, *Il17f*), o 6 genų raiška padidėjo (*Ccl19*, *Ccl25*, *Cx3cl1*, *Cxcl13*, *Il23a*, *Il27*); taip pat sumažėjo

6 genų raiška (*Ccr5, Il1rl, Il18r1, Ptgs2, Rel, Thbs1*) ir padidėjo 6 genų (*C3, Ciita, Cmkrl1, Cxcl11, Nos2, Pparg*) raiška. NaDCA–NaVPA gydymas reikšmingai sumažino *Ccl2, Cebpb, Csf3, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl3, Il6, Il17f* ir *Ptgs2* genų, kurie dalyvauja IL-17 signaliniame kelyje, raišką. Šie duomenys rodo, kad NaVPA–NaDCA būdingas priešuždegiminis poveikis, patinų pelių timocituose slopina uždegimą skatinančius mechanizmus, t. y. slopina pro-uždegiminių genų raišką ir aktyvina genų raišką, susijusių su priešuždegiminių chemokinių ir citokinių gamyba [28]. Užkrūčio liaukos funkcija yra susijusi su imunoterapijos rezultatais sergant krūties, plaučių, inkstų vėžiu ir melanoma [419], o liaukos atrofija skatina imuninės sistemos senėjimą ir didina ligų riziką suaugusiesiems [420].

Stakišaičio ir kt. tyrimai parodė, kad sergančių SARS-CoV-2 ir plaučių uždegimu pacientų T limfocitų *in vitro* 24 valandų ekspozicija 2 mM NaVPA ir 5 mM NaDCA terpėje turėjo priešuždegiminį poveikį. NaVPA–NaDCA reikšmingai sumažino 40 genų, susijusių su uždegimu ir imuniniu atsaku, raišką: 22-jų genų, dalyvaujančių citokinių aktyvumo signaliniame kelyje (*CCL22, CCL24, CSF1, CSF2, CSF3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL13, EBI3, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL10, IL19, IL24, IL27, LIF* ir *OSM*); 17 – chemokinių reguliuojamų signalų kelyje (angl. *chemokine-mediated signaling pathway*) (*ACKR3, CCL4, CCL22, CCL24, CCR1, CCR2, CCRL2, CMKLR1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL13, CXCR2, CXCR3*), 11-kos – neutrofilų chemotaksio (angl. *neutrophil chemotaxis*) kelyje (*CL4, CCL22, CCL24, CSF3R, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL13, ITGB2*), 5-ių – limfocitų chemotaksio (angl. *lymphocyte chemotaxis*) kelyje (*CCL4, CCL22, CCL24, CXCL13, CXCR3*), ir 14-kos – T ląstelių proliferacijos reguliavime (angl. *regulation of T-cell proliferation*) (*CCR2, CD209, EBI3, IL1A, IL1B, IL2RA, IL6, IL10, IL12RB1, IL23A, IL27, IL27RA, JAK3, TNFRSF14*) [344].

Citokinių aktyvumo kelio mechanizmai glioblastomoje yra ne tik uždegiminiai – navikas juos naudoja, kad sukurtų naviką palaikomą, imunologiškai „šalto naviko“ nišą, kuri skatina GBM progresavimą. Gydymo poveikis šioms mechanizms, slopinant citokinių kelią (kartu su imunoterapija ar standartiniu gydymu) yra aktyvi mokslinių tyrimų sritis, žadanti perspektyvius rezultatus [421].

Uždegiminio atsako kelias GBM pasitelkiamas paverčiant ūminį uždegimą lėtiniu, siekiant palaikyti „užburta lėtinio uždegimo ratą“, kuris skatina naviko augimą, piktybiškumą ir progresavimą, todėl šio kelio slopinimas yra perspektyvus, kaip daugialypis taikinyss ieškant naujų gydymo metodų. Be to, chemoterapija ir spindulinė terapija aktyvina uždegimą dar labiau, ir gali prisidėti prie ligos atsinaujinimo [422].

IL-17 signalinis kelias turi įtakos GBM progresavimui, skatina naviko augimą, svarbus jo skatinantis ląstelių migravimą, invaziją, angiogenezę ir gliomos kamieninių ląstelių palaikymą poveikis, kuris pasireiškia veikiant uždegiminę naviko mikroaplinką [423].

Chemokinių reguliuojamas signalinis kelias GBM apima ląstelių migravimą, bet jis palaiko naviko ekosistemą, kuri glaudžiai susijusi su citokinių veikla ir lėtiniu uždegimu. Gydomo poveikis šiam keliui, nukreiptas į dominuojančias ašis CCL2/CCR2 ir CXCL12/CXCR4, leistų šiuos „užburtus ratus“ nutraukti [393, 424]. NaDCA-NaVPA poveikio uždegimui tyrimai rodo, kad derinys slopina anksčiau nurodytus kelius.

NaVPA–NaDCA gydymas T limfocitų SARS-CoV-2 infekcija ir pneumonija sergančių moterų labai slopino citokinių aktyvumo kelią, chemokinių signalinį kelią bei neutrofilų chemotaksio ir limfocitų chemotaksio kelius, tačiau NaVPA–NaDCA prieš uždegiminis poveikis buvo stipresnis sergančių SARS-CoV-2 infekcija ir pneumonija vyrų T limfocituose nei moterų [344]. Tolesnis GBM su lytimi susijusio dimorfizmo patogenezės tyrimas yra svarbus siekiant pagerinti GBM pacientų gydymą, bendrą išgyvenamumą, užtikrinant, kad gydymo planai būtų sudaromi taip, kad būtų vadovaujamasi ir su lytimi susijusių gydymo poveikio vertinimu, t. y. nustatant specifinius GBM navikų molekulinis mechanizmus ir taikant individualizuotą gydymą [425].

DCA-VPA derinio taikymas gydant infekcijas ir uždegimą yra LSMU mokslininkų patentuotas (LR valstybinis patentų biuras, paraiškos Nr. 2023 532, patento Nr. 7129, Int. Cl. Nr. A61K 31/19 [426]; ES patento paraiška *Combination of sodium dichloroacetate and valproic acid salts for the treatment of viral and bacterial infections and inflammatory diseases*, paraiškos Nr. 24172667, publikacijos Nr. EP4512393 A1, Int. Cl. Nr. A61K31/19 [427].

1.12. Viščiuko embriono chorioalantojinės membranos (CAM) modelis

CAM modelis taikomas *in vivo* naviko augimo, angiogenezės, metastazių, imuninio atsako, vaistų poveikio ir atsparumo vaistams tyrimams [428–434]. CAM modeliu tirti storosios žarnos, prostatos, plaučių, smegenų, skrandžio, kiaušidžių, kepenų, krūties, galvos ir kaklo ir kitų vėžio lokalizacijų navikai [435], tyrimui naudojant ląstelių linijų ląsteles [155, 228, 361, 435], pacientų naviko audinį ar pirmines naviko ląsteles [434, 436, 437], taip pat cirkuliuojančias naviko ląsteles (angl. *circulating tumor cells*) [438, 439].

Imuninė sistema pradeda funkcionuoti po 10–12 viščiuko embriono vystymosi paros (EVP) [440]. Dar nėra išsiaiškinta, kada viščiuko embriono imuninė sistema pilnai subręsta, kad galėtų veikti prieš ksenotransplantą nukreiptą imuninį atsaką [429], bet tyrimai rodo, kad imunitetas susiformuoja apie EVP18 [434, 441, 442]. Kadangi CAM modelis iki 10EVP yra imunodeficitinis, todėl naviko ląstelių suformuoti navikai iki tol gali būti transplantuojami ant CAM nesant atmetimo rizikos [443]. Viščiuko embriono imuninė sistema yra paprastesnė, bet funkciškai panaši į žmogaus [441].

Palyginamieji vaistų poveikio U87 ląstelių naviko ant CAM augimui ir U87 sferoidų tyrimai nustatė, kad sferoidų modelis neatspindi gydymo poveikio ar naviko progresavimo, stebimo tiriant CAM modeliu [444], nes sferoide nėra naviko mikroadaptacijos [445]. CAM modelis yra sėkmingesnis nustatant paciento naviko ksenotransplantų atsaką į gydymą, palyginus su imunodeficitinių graužikų modeliais [446]. Žinduolių modeliuose naviko augimas trunka iki 6 savaitių, o tiriant CAM metodu tyrimo duomenys gaunami greičiau: 2 dienos po GBM ląstelių naviko transplantavimo ant CAM, navikas yra vaskuliarizuojamas CAM kraujagyslių ir progresuoja priklausomai nuo angiogenezės [447, 448].

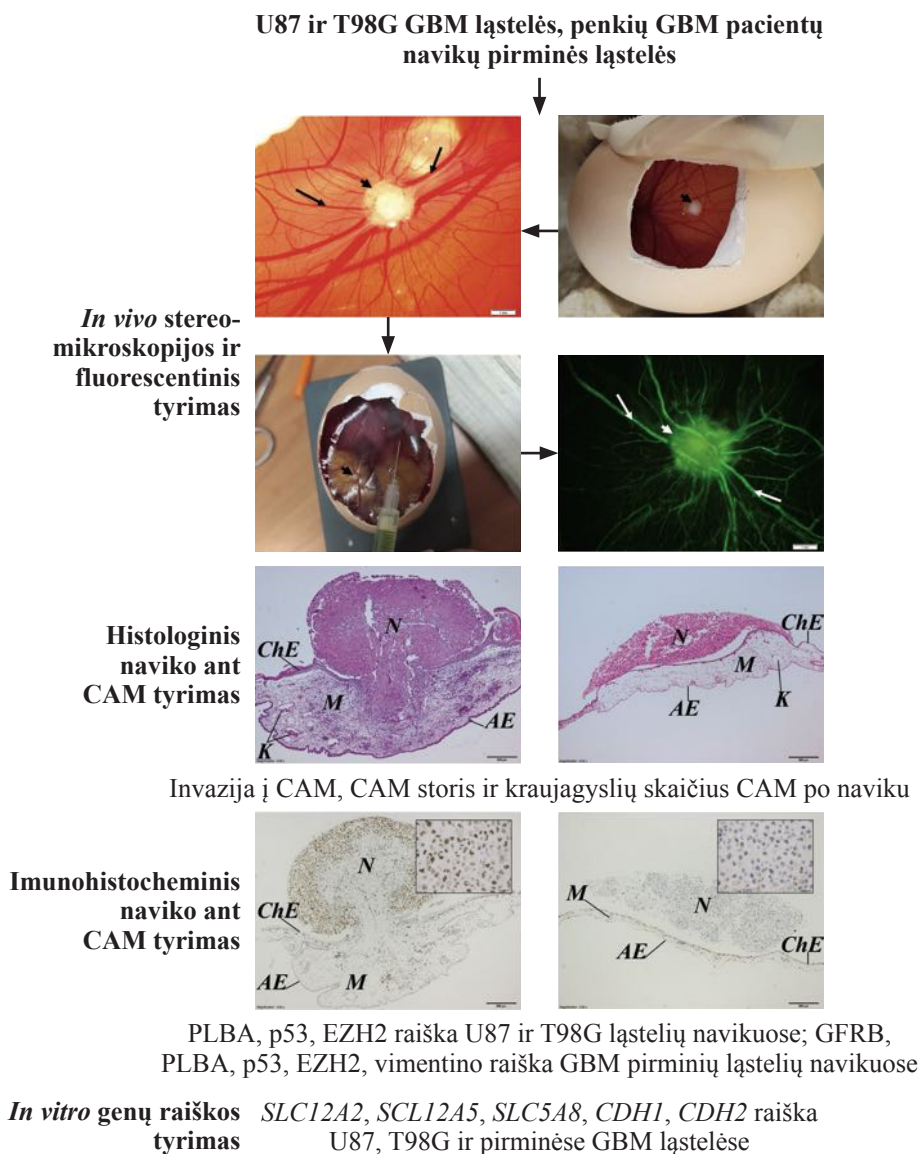
Palyginus su pelių modeliu, tiriant CAM modeliu naviko augimo stebėjimo laikotarpis yra trumpesnis, bet negalima vertinti remisijos ar naviko atkryčių [429]. Vaistinių preparatų skyrimas pelių ir CAM modeliuose yra skirtingas: pelėms vaistai gali būti skiriami intraveniniu (i.v.), intraperitoniniu (i.p.), *per os* būdais, o tiriant CAM modeliu, tiriamasis preparatas skiriamas lokaliai (angl. *topical*). CAM modeliu taip pat taikoma i.v./i.p vaistinių preparatų skyrimas, tačiau gali būti embriono pažeidimas dėl nukraujavimo tikimybės [428, 429, 449]. CAM modelyje dozės, sukeliančios farmakologinį atsaką, yra 2–10 kartų mažesnės, palyginus su pelių modeliu, ir neįmanoma tiksliai įvertinti jų atitiktis žmogaus dozėmis [450]; taip pat, naviko dydžio stebėjimas yra ribotas, nes navikas invazuoja giliai į CAM ir jo tūris didėja be reikšmingų matomų ant CAM paviršiaus skersmens pokyčių, naviko dydis gali būti vertinamas histologiškai baigus tyrimą [429]. Todėl tyrėjai siūlo apvaisinto kiaušinio turinį aseptinėmis sąlygomis perkelti į sterilų indą tolimesnei inkubacijai ir stebėjimui [451]. Elektros šoku sukulto skausmo tyrimas parodė, kad viščiuko embrionai iki EVP15 į skausmą nereaguoja [452], o jų elektroencefalogramoje iki EVP17 nestebima su skausmo suvokimu susijusi veikla [453].

Tiriant pelių modeliais, tyrimas gali būti stabdomas dėl greito naviko didėjimo: GBM U118 MG ląstelių ksenotransplantų Balb/c pelių modeliu gydymo stebėjimas buvo vykdomas tik 7 dienas, po to pelės turėjo būti eutanizuotos dėl etinių priežasčių [450]. Pelių modelyje naviko tūrio įvertinimas ir gydymo skyrimas graužikams sukelia diskomfortą ir stresą [454].

Iš GBM naviko audinio suformuoti pirminių ląstelių navikai ant CAM išlaiko genetinių ir histologinių žymenų raišką, kuri nesiskiria nuo išoperuoto naviko audinio raiškos [455], šiuo modeliu tiriami iš paciento GBM naviko ląstelių suformuoti ksenotransplantai atspindi pirminį naviko piktybiškumą ir morfologiją bei suteikia galimybę įvertinti galimą individualaus chemoterapinio gydymo veiksmingumą [434, 445]. CAM modelis gali būti naudojamas įvertinti priešnavikinių vaistų veiksmingumą iki skiriant chemoterapiją pacientui [23], vertinant GBM gydymo veiksmingumą ir atsaką į gydymą, analizuojant naviko augimą, vaskuliarizaciją, invaziją ir vėžio žymenų raišką histologiniu, IHC ir PGR metodais [456].

2. METODIKA

2.1 paveiksle yra pateikta atliktų tyrimų schema.



2.1 pav. Atliktų tyrimų schema

Trumpa rodyklė – navikas, ilga rodyklė – kraujagyslės, ChE – choriono epitelis, AE – alantojus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslės.

2.1. Glioblastomos ląstelių linijų tyrimai *in vivo* ir *in vitro*

2.1.1. Glioblastomos U87 ir T98G ląstelių *in vivo* tyrimo grupės ir atlikti tyrimai

2.1.1.1 lentelėje pateikti U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM grupių imtis ir atlikti tyrimai taikant CAM modelį: invazijos dažnumas į CAM, CAM storis po naviku, kraujagyslių skaičiaus mezenchimoje po naviku ir PLBA-, p53-, EZH2-teigiamų ląstelių raiškos IHC analizė.

2.1.1.1 lentelė. Kontrolinių ir tiriamaisiais vaistiniais preparatais gydytų U87 ir T98G navikų ant CAM grupės ir jų imtis

Tirtos grupės	Invazija, CAM storis, kraujagyslių skaičius		PLBA		p53		EZH2	
	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G
	Navikų ant CAM skaičius							
Kontrolė	20	12	13	9	15	9	17	9
10 mM NaDCA	24	12	13	11	12	10	13	10
5 mM NaDCA	25	16	14	8	13	8	12	8
3 mM NaDCA	20	12	18	10	20	11	19	11
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	10	12	10	8	10	8	10	9
100 μM TMZ	15	11	7	5	8	5	8	5
50 μM TMZ	15	16	8	6	7	7	8	7

2.1.2. Glioblastomos U87 ir T98G ląstelių *in vitro* tyrimo grupės ir atlikti tyrimai

Tirta *SLC12A2*, *SCL12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* ir *CDH2* raiška U87 ir T98G ląstelių kontrolinėje, 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 50 μM TMZ grupėse *in vitro* ($n = 6$ kiekvienoje grupėje).

2.2. GBM pacientų naviko pirminių ląstelių tyrimai *in vivo* ir *in vitro*

2.2.1. GBM pacientų klinikiniai duomenys

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas išdavė leidimą atlikti biomedicininį tyrimą 2020 m. rugpjūčio mėn. 8 d., leidimo Nr. BE-2-80. Visiems pacientams diagnozė buvo nustatyta pirmą kartą, o iki operacijos pacientai nebuvo gavę priešnavikinio gydymo. Pacientai operuoti Vilniaus

universiteto ligoninės Santaros klinikų Neurochirurgijos centre (Santariškių g. 2, LT-08410 Vilnius, Lietuva).

Tirti penkių GBM pacientų ir vieno supratentorinės ependimomos paciento išoperuoto naviko audiniai. Operacijos atliktos 2021–2022 m. Paciento kodas, amžius, lytis ir diagnozė nurodyti žemiau:

1. GBM2-2F, 48 m. moteris, glioblastoma (IV laipsnio pagal PSO) IDH-laukinio tipo; stipri citoplazminė GFRB žymens raiška audinyje;
2. GBM2-3F, 82 m. moteris, glioblastoma (IV laipsnio pagal PSO), IDH-laukinio tipo; stipri citoplazminė GFRB žymens raiška audinyje;
3. GBM2-4M, 46 m. vyras; glioblastoma (IV laipsnio pagal PSO), IDH-laukinio tipo; stipri citoplazminė GFRB žymens raiška audinyje;
4. GBM2-5F, 68 m. moteris, glioblastoma (IV laipsnio pagal PSO), IDH-laukinio tipo; stipri citoplazminė GFRB žymens raiška audinyje;
5. GBM2-6M, 76 m. vyras, glioblastoma (IV laipsnio pagal PSO), IDH-laukinio tipo; stipri citoplazminė GFRB žymens raiška audinyje;
6. EP2-1M, 62 m. vyras, supratentorinė ependimoma.

2.2.2. GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM tyrimo grupės ir atlikti tyrimai

2.2.2.1 lentelėje pateikti GBM pacientų navikų pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių imtys ir atlikti tyrimai taikant CAM modelį: invazijos dažnumas į CAM, CAM storis po naviku, kraujagyslių skaičiaus mezenchimoje po naviku ir GFRB-, PLBA-, p53-, EZH2-, vimentinui-teigiamų ląstelių raiškos IHC analizė.

2.2.2.1 lentelė. Kontrolinių ir tiriamuoju vaistiniu preparatu gydytų GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM tirtos grupės

Tirtos grupės	Invazija, CAM storis, kraujagyslių skaičius			GFRB, PLBA, p53, EZH2, vimentinas		
	GBM2-2F	GBM2-3F	GBM2-4M	GBM2-2F	GBM2-3F	GBM2-4M
	Navikų ant CAM skaičius					
Kontrolė	8	10	7	4	6	4
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	8	10	7	6	5	5

2.2.3. GBM pacientų pirminių ląstelių genų raiškos tyrimo *in vitro* grupės ir atlikti tyrimai

Tirta *SLC12A2*, *SCL12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* ir *CDH2* raiška GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M pirminių ląstelių kontrolinėje ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupėse *in vitro* ($n = 6$ kiekvienoje grupėje).

2.2.4. Ependimomos paciento pirminių ląstelių *in vivo* ir *in vitro* atlikti tyrimai

Ependimomos paciento EP2-1M pirminių ląstelių naviko ant CAM kontrolinės ($n = 8$) ir gydytos 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ($n = 7$) grupių atlikti tyrimai: invazijos dažnumas į CAM, CAM storis po naviku, kraujagyslių skaičiaus mezenchimoje po naviku. IHC tyrimas neatliktas, nes naviko ant CAM augimas netipiškas – ląstelės išsisklaidė CAM paviršiuje.

Tirta *SLC12A2*, *SCL12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* ir *CDH2* raiška EP2-1M pirminių ląstelių kontrolinės ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupėse *in vitro* ($n = 6$ kiekvienoje grupėje).

2.3. GBM ląstelių linijų ląstelių paruošimas tyrimui

Tirta glioblastomos U87 (U87-MG; EACC kat. Nr. 89081402; 44 m. amžiaus moters) adhezyvi ląstelių linija, padovanota LSMU MA MF Neuro-mokslų instituto, ir glioblastomos T98G (T98-G; ATCC kat. Nr. CRL-1690; 61 m. amžiaus vyro) adhezyvi linija, gauta iš Navaros universiteto (Ispanija, Pamplona). U87 ląstelės kultivuotos terpėje *Dulbecco's modified eagles medium* (DMEM; *Gibco*, JK) su 10 proc. jaučio vaisiaus serumu (FBS; *Gibco*, JAV), T98G kultivuotos *Advanced minimum essential medium* (AMEM; *Gibco*, JAV) terpėje su 5 proc. FBS ir 2 mM l-glutamino (Glutamax; *Gibco*, JK). DMEM ir AMEM terpės buvo papildytos 1 proc. penicilino (100 TV/ml) ir streptomicino (100 µg/ml) tirpalu (P/S; *Gibco*, JAV). Ląstelės augintos inkubatoriuje (*Hera cell vios 160i*; *Thermo Fisher Scientific*, Vokietija) 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂. Kultivuotos U87 ląstelės atlaisvintos nuo indo, kuriame jos augintos, dugno naudojant 2,5 proc. tripsino tirpalą (*Sigma Aldrich*, Vokietija), o T98G ląstelės –naudojant 0,25 proc. tripsino-EDTA tirpalą (*Gibco*, JK), esant 37 °C temperatūrai.

2.4. Pirminių GBM naviko ląstelių paruošimas tyrimui

Išoperuoto naviko medžiaga tyrimams paruošta pagal LSMU MA MF Histologijos ir embriologijos katedros pirminių GBM ląstelių paruošimo protokolą Nr. 2021-03-01. Po operacijos, iki audinio patekimo į laboratoriją pirminių ląstelių suspensijos paruošimui, GBM naviko audinys ne ilgiau 15 min. buvo laikomas DMEM terpėje, neturinčioje kalcio ir magnio jonų (*Gibco*, JAV) su 1 proc. penicilino (100 TV/ml) ir streptomicino (100 µg/ml) tirpalu (P/S; *Gibco*, JAV). Laboratorijoje dalis audinio perkelta į formaliną fiksacijai ir įliejimui į parafiną. Kita dalis perkelta į Petri lėkštelę (*Greiner Bio-One*, Vengrija) ir skalauta *Dulbecco's phosphate-buffered saline* tirpalu neturinčiu kalcio ir magnio jonų (DPBS; *Gibco*; JAV), naudojant 5 ml talpos pipetę siekiant sumažinti eritrocitų kiekį. Matomas jungiamasis audinys buvo pašalintas naudojant sterilų pincetą. Į Petri lėkštelę buvo įlašinta 5 ml DMEM be Ca^{2+} ir Mg^{2+} su P/S. Naviko audinys sterilioje aplinkoje laminarinėje traukos spintoje Petri lėkštelėje steriliais pincetais suardytas į smulkius gabalėlius. Susmulkinti GBM audinio gabalėliai pora minučių pipetuoti konusiniame 50 ml talpos mėgintuvėlyje (*Thermo Fisher Scientific*, JAV) 37 °C DMEM terpėje be Ca^{2+} ir Mg^{2+} su P/S ir taip gauta ląstelių suspensija. Ląstelių suspensija centrifuguota 3 min. $51 \times g$ (angl. *relative centrifugal force*; rcf), supernatantas nusiurbtas pipete ir ląstelės resuspenduotos 50 ml DMEM be Ca^{2+} ir Mg^{2+} su P/S ir 10 proc. jaučio vaisiaus serumo (FBS; *Gibco*, JAV). GBM sergančių pacientų ląstelėms suteikti kodai GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M, GBM2-5F, GBM2-6M ir EP2-1M. Trukmė nuo naviko audinio gavimo iki ląstelių suspensijos paruošimo – ne ilgiau 20 min. Ląstelių suspensija 37 °C temperatūroje iš Vilniaus transportuota į Kauną, LSMU MA MF Histologijos ir embriologijos katedros ląstelių kultūrų laboratoriją tolesniems *in vivo* ir *in vitro* tyrimams.

2.5. CAM modelio taikymas GBM ląstelių suformuotiems navikų tyrimams

Kiaušinio paruošimas tyrimams. Pagal ES ir Lietuvos teisės aktus, Bioetikos komiteto leidimas taikant CAM modelį tyrimams nereikalaujamas.

Tyrimui naudoti *Cobb 500* veislės vištų apvaisinti kiaušiniai, gauti iš Rumšiškų paukštyno (Dovainonys, Lietuva). Prieš tyrimą kiaušiniai buvo dezinfekuoti 70 proc. etanolio tirpalu ir patalpinti į *Mini Pro 147-200 DU* (Maino, Italija) inkubatorių, kuriame buvo palaikoma pastovi 37,7 °C temperatūra ir 60 proc. santykinė oro drėgmė. Pirmąsias 72 inkubacijos valandas buvo įjungtas automatinis kiaušinių vartymo režimas (1 kartas per valandą).

Po 72 valandų (3EVP) kiaušinių vartymo režimas išjungtas. Paruošiant kiaušinius langelių atidarymui lukšte, kiaušiniai dezinfekuoti etanolio tirpalu ir langelis buvo suformuojamas naudojant automatinį grąžtą (*Hobby Drill*, Vokietija): bukajame kiaušinio gale išgręžta apie 1 mm skersmens ertmė, pro ją steriliu 5 ml talpos švirkštu su adata (*Neomedic*, JK) ištraukta apie 2,5 ml kiaušinio baltymo, po to ertmė užklijuojama steriliu pleistru (*Mefix*, Švedija). Taip CAM buvo atkabinama nuo vidinės kiaušinio lukšto pusės. Po to kiaušinio lukšte grąžtu padaromas apie 1,2 cm² ploto langelis, pro kurį galima įvertinti embriono gyvybingumą (kraujagyslių tinklą, matoma pulsuojianti širdis). Langelis užklijuojamas sterilia *Parafilm* plėvele (*Bemis*, JAV), kad būtų palaikomas sterilumas ir drėgmė. Po to kiaušiniai patalpunami atgal į inkubatorių su išjungtu vartymo režimu iki EVP12.

GBM ląstelių navikų *in vivo* tyrimo eiga. 7-tąją embriono vystymosi parą (7EVP) buvo formuojami U87, T98G ar pirminių glioblastomos naviko ląstelių navikai ir uždedami ant CAM. 1×10^6 U87 ar T98G ląstelių; pirminių glioblastomos ląstelių sumaišyta su I tipo žiurkės uodegos kolagenu (*Gibco*, JAV) (kontrolinės grupės) ir tiriamųjų vaistinių preparatų grupės, pridėjus tiriamąjį vaistinį preparatą: NaDCA ar NaVPA–NaDCA (*Sigma Aldrich*, Vokietija) ar TMZ (*Sigma Aldrich*, JAV), bendras suspensijos tūris vienam atvejui – 20 µl. NaDCA; NaVPA buvo ištirpintas mitybinėje terpėje, TMZ – DMSO (*Sigma Aldrich*, JAV), galutinė DMSO koncentracija buvo mažesnė nei 0,1 proc. [457]. 20 µl suspensija buvo užlašinta ant $2 \times 2 \times 2$ mm dydžio želatininės *Surgispon* kempinėlės (*AegisLifesciences*, Indija) ir taip suformuotas navikas perkeltas ant CAM netoli stambiausių kraujagyslių (EVP7).

Struktūriniai navikų pasikeitimai buvo stebimi *in vivo* stereomikroskopu (*SZX2-RFA16*; *Olympus*, Japonija) ir fotografuojami fotokamera (*DP92*; *Olympus*, Japonija) $5\times$ padidiniu EVP9 ir EVP12 su kompiuterine programa *CellSens Dimension*, versija 1.9. 12-tąją embriono vystymosi parą į stambiausią CAM kraujagyslę insulininiu švirkštu (*Chirana*, Slovakija) sušvirkšta 0,2 ml 5 mg/ml fluoresceino izotiocianato dekstrano tirpalo (*PKH67*; *Sigma Aldrich*, Vokietija), po to ant CAM užlašinta 2 ml 10 proc. formalino tirpalo (*Sigma Aldrich*, Vokietija). CAM su naviku iškirpta ir patalpinta į Petri lėkštelę su 5 ml 10 proc. formalino tirpalo, nufotografuota $5\times$ padidiniu iš abiejų pusių stereomikroskopu su kamera dienos šviesoje ir naudojant GFP filtrą su UV apšvita (*120PC Q series*; *XCite*, JAV). CAM su naviku buvo fiksuotos 10 proc. formaline 24 val.

2.6. Histologinių ir imunohistocheminių preparatų paruošimas

Po 24 valandų fiksacijos formaline, CAM su naviku buvo įlieti į parafiną. Automatinio rotacinio mikrotomu (*Leica RM2155; Leica, Vokietija*) buvo nupjauti pjūviai, kurių storis – 3 µm. H-E dažymui pjūviai buvo uždėti ant objektinių stiklelių (*Biosigma, Italija*), o IHC dažymui – ant dengtų poli-L-lizinu stiklelių (*Thermo Fisher Scientific, JAV*). Pjūvių tiesinimui naudota vandens vonelė (*Leica HI 1210; Leica, Vokietija*). Preparatai buvo džiovinti 24 val. 37 °C temperatūroje termostate (*LSIS-B2V-EC55; Ecocell, Vokietija*), po to nudažyti H-E (*Sigma Aldrich, Vokietija*) ar IHC metodais.

IHC dažymo metu nustatyta GFRB, PLBA, p53, EZH2 ir vimentino žymenų raiška navikuose ant CAM. CAM preparatai buvo deparafinuoti ir rehidratuoti mažėjančios koncentracijos etanolio tirpaluose. Atliktas karščiu sužadinto antigeno išlaisvinimas – preparatai kaitinti slėginiame inde (*DC12-220-0121; Biocare Medical, JAV*) 20 min. 95 °C temp. GFRB, PLBA, p53 ir EZH2 žymenų nustatymui kaitinimo metu naudotas pH9 tirpalas (*EnVision FLEX Target Retrieval Solution K8004; Dako, Danija*), o vimentino – pH6 tirpalas (*Low pH EnVision FLEX Target Retrieval Solution K8005; Dako, Danija*). Dažymas atliktas naudojant rankinę *Shandon CoverPlate dažymo sistemą* (*Thermo Fisher Scientific, JAV*). Endogeninės peroksidazės aktyvumas užblokuotas preparatus inkubuojant 10 min. kambario temp. su peroksidazės blokavimo tirpalu (*EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent SM801; Dako, Danija*). PLBA, p53 ir EZH2 žymenų raiškai nustatyti preparatai buvo 30 min. inkubuoti su pirminiais antikūnais kambario temp., GFRB ir vimentino – 12 val. 4 °C temp. (skiedimo santykis – 1:100). Naudoti antikūnai: monokloninis anti-GFRB (klonas EPR1034Y; *ab68428; Abcam, JK*), monokloninis anti-PLBA (klonas PC10; *MA511355; Thermo Fisher Scientific, JAV*), monokloninis anti-p53 (aa 211-220, klona 240; *CBL404; Merck, Vokietija*) (atpažįsta ir mutantinį, ir laukinį denatūruotą p53) polikloninis anti-KMT6/EZH2 (fosfo S21; *ab84989, Abcam, JK*), ir monokloninis anti-vimentinas (klonas V9; *M0725; Dako, Danija*). Antikūnų skiedimui buvo naudotas skiedimo tirpalas (*S3022; Dako, Danija*). Kaip neigiama kontrolė naudotas CAM su naviku preparatas, kuriam nenaudotas pirminis antikūnas, teigiama kontrolė – kiekvieno IHC dažymo CAM su naviku preparatas. IHC reakcija išryškinta naudojant polimerą dekstraną, žymėtą krienų peroksidazės fermentu ir konjuguotą su antriniu pelės antikūnu su jungikliu (*SM802 ir SM804; Dako, Danija*) (inkubacijos trukmė – 30 min. kambario temp.). Teigiama IHC reakcija vizualizuota kaip chromogeną naudojant 3,3'-diaminobenzidină (DAB; *DM827; Dako, Danija*). Po kiekvieno etapo Tween-20 trisbuferinis tirpalas (*DM831; Dako, Danija*) naudotas plovimui (inkubacijos

trukmė – 5 min.). Mayer hematoksilinas (*Sigma Aldrich*, Vokietija) buvo naudotas kontrastiniam dažymui.

2.7. GBM ląstelių navikų invazijos į CAM, CAM storio, kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku ir žymenų imunohistocheminis vertinimas

H-E ar IHC dažyti preparatai buvo vertinami ir fotografuojami naudojant šviesinį mikroskopą (*BX40F4; Olympus*, Japonija) su skaitmenine kamera (*XC30; Olympus*, Japonija) ir kompiuterinę programą *CellSens Dimension, versija 1.9*.

Invazijos į CAM dažnumas vertintas H-E preparatuose 4×, 10× ir 40× padidinimais. Invazija apibūdinta kaip – buvo pažeistas choriono epitelio vientisumas, suardyta choriono epitelio pamatinė membrana, navikinės ląstelės lokalizuotos CAM mezenchimoje ir navike nustatytos kraujagyslės su viščiuko embriono eritrocitais. Navikas be invazijos į CAM – buvo lokalizuotas ant choriono epitelio ir choriono epitelio pažeidimas nenustatytas.

CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus vertinimas atliktas H-E preparatų 4× padidinimo 1792 μm pločio regėjimo lauko nuotraukose membranoje po naviku. Buvo pasirinkta dešimt atsitiktinių vietų ir jose išmatuotas CAM storis (μm), apskaičiuotas CAM storio vidurkis. Suskaičiuotos didesnės nei 10 μm skersmens kraujagyslės regėjimo lauke; kraujagyslės įvertintos pagal matomas kraujagyslių endotelio ląsteles arba eritrocitus kraujagyslės spindyje.

Vertinant IHC žymenų raišką navike, PLBA, p53 ir EZH2 raiška nustatyta ląstelės branduoliuose, GFRB ir vimentino – citoplazmoje (ruda spalva). Kiekviename navike buvo pasirinkti du atsitiktiniai 40× padidinimo regėjimo laukai (plotas – 23 863,74 μm²) ir juose suskaičiuotos visos ir žymeniui-teigiamos ląstelės. Apskaičiuota procentinė žymeniui-teigiamų ląstelių dalis navike.

U87 ir TG98 ląstelių linijų grupėse histomorfometriniai matavimai (CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus po naviku) H-E preparatuose ir žymenų vertinimas (p53, PLBA ir EZH2) buvo atlikti viename H-E ar IHC preparato pjūvyje. Pirminių GBM ląstelių grupėse histomorfometriniai matavimai ir žymenų (GFRB, PLBA, p53, EZH2 ir vimentino) vertinimas buvo atlikti dviejuose H-E ir IHC pjūviuose.

2.8. GBM ląstelių vaistinio preparato poveikio *in vitro* genų raiškos tyrimai

U87 ir T98G ląstelės tiriamuoju vaistiniu preparatu buvo veikiamos 24 valandas mitybinėje terpėje (U87 – DMEM turinčioje 1 proc. P/S ir 10 proc. FBS terpėje; T98G – AMEM turinčioje 1 proc. P/S, 5 proc. FBS ir 2 mM l-glutamino terpėje). Kontrolinės grupės ląstelės kultivuotos atitinkamai mitybinėje terpėje be vaistinio preparato. Po 24 valandų inkubacijos iš $0,5 \times 10^6$ U87 ląstelių ir $0,7 \times 10^6$ T98G ląstelių išskirta bendroji (angl. *total*) RNR, naudojant *TRIzol Plus* RNR išskyrimo rinkinį (*Life Technologies*, JAV).

Pirminės GBM naviko ląstelės tiriamuoju vaistiniu preparatu buvo veikiamos 48 valandas DMEM be Ca^{2+} ir Mg^{2+} turinčioje 1 proc. P/S ir 10 proc. FBS terpėje. RNR išgryninta naudojant *miRNeasyMicro* gryninimo rinkinį (*Qiagen*, Vokietija) veikiant *Pure Link* DNzių reagentu (*Invitrogen*, JAV).

Bekiuvetis spektrofotometras (*NanoDrop2000*; *Thermo Fisher Scientific*, JAV) buvo naudotas nustatyti GBM ląstelių RNR mėginių RNR koncentracijai ir švarumui. RNR kokybė ir kiekybė nustatyti naudojant bioanalizatorių (*Agilent 2100*; *Agilent Technologies*, Vokietija) ir reagentų rinkinį *RNA 6000 Nano Kit* (*Agilent Technologies*, Vokietija) pagal gamintojo rekomendacijas. Naudotas integralumo rodiklis RIN (angl. *RNA integrity number*) buvo ≥ 8 . Vadovaujantis išmatuotomis RNR mėginių koncentracijomis buvo pagaminti darbiniai tirpalai, kurių koncentracijos atitinka gamintojo metodikų rekomendacijas.

Atlikta atvirkštinės transkripcijos reakcija termocikleryje (*Biometra T Advanced*; *Analytik Jena AG*, Vokietija) 20 μl tūrio – 100 μg RNR, naudojant reagentų rinkinį *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and RNase Inhibitor* (*Applied Biosystems*, Lietuva).

Tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu (*Fast Real-Time PCR System 7900*; *Applied Biosystems*, JAV) ir *TaqMan* zondais (*Applied Biosystems*, JAV) tirta genų raiška: *SLC12A2* (Hs00169032_m1), *SLC12A5* (Hs00221168_m1), *SLC5A8* (Hs00377618_m1), *CDH1* (Hs01023894_m1), *CDH2* (Hs00983056_m1), *GAPDH* (Hs02786624_g1). Reakcijos atliktos kiekvieno mėginio tyrimą kartojant tris kartus pagal gamintojo rekomendacijas. Tikro laiko PGR reakcijos sąlygos: 95 °C temperatūroje 10 minučių, 40 ciklų 95 °C temperatūroje 15 sekundžių ir 60 °C temperatūroje 1 minutę. Santykinė genų raiška įvertinta pagal *Livak* $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodą [458]. Slenkstinė ≥ 35 ciklo CT reikšmė (angl. *threshold cycle*) vertinta kaip žymens raiškos nebuvimas.

2.9. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti su *GraphPad Prism* programos 10-ąja versija ir statistinio programinio paketo *IBM SPSS* 23-iaja versija. Normalumo hipotezė patikrinta su *Shapiro-Wilk* testu. Kokybiniai duomenys pateikti procentine dalimi grupėje, o kiekybiniai – mediana, didžiausia ir mažiausia reikšmėmis arba vidurkiu ir standartinio nuokrypiu. Dviejų grupių duomenų palyginimui kiekybinė duomenų analizė vertinta naudojant *Mann-Whitney U* kriterijų. Kokybinių duomenų ryšio stiprumas įvertintas pagal chi kvadrato (χ^2) kriterijų. Duomenys vertinti statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Skirtingų NaDCA dozių poveikio U87 ir T98G ląstelių navikams ant CAM tyrimų duomenys

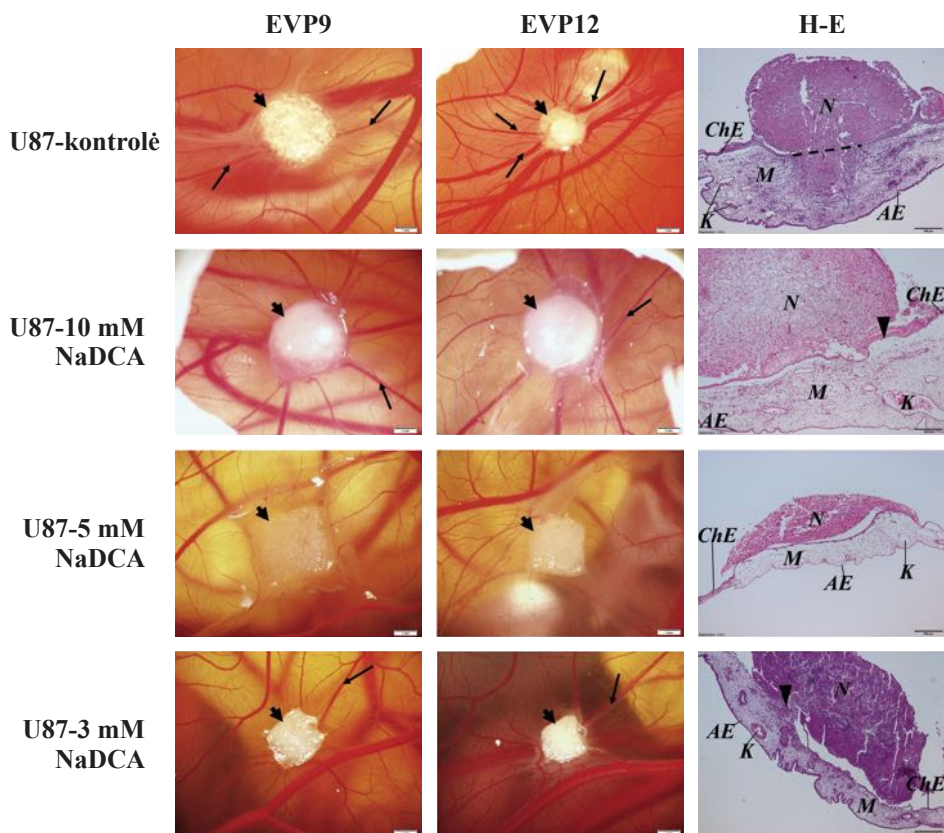
3.1.1. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos duomenų vertinimas

Tirtų U87 ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos tirtose grupėse pateiktos 3.1.1.1 pav. EVP9 navikas matomas po dviejų parų nuo transplantacijos ant CAM, EVP12 – po penkių. Tirtos U87 ląstelių navikų grupės: kontrolinė ir gydytų 10 mM NaDCA, 5 mM NaDCA ir 3 mM NaDCA.

EVP12 U87-kontrolinės grupės navikas yra be aiškių ribų ir vizualiai mažesnis nei EVP9, nes EVP12 ant CAM matoma tik jo dalis – navikas invazavęs į CAM mezenchimą. EVP12 aplink U87-kontrolinį naviką matoma kraujagyslių tinklas („stipininis ratas“), kuris EVP9 nėra susiformavęs. Invaizija matoma H-E tyrimo nuotraukoje – suardytas choriono epitelis, navike matoma kraujagyslės.

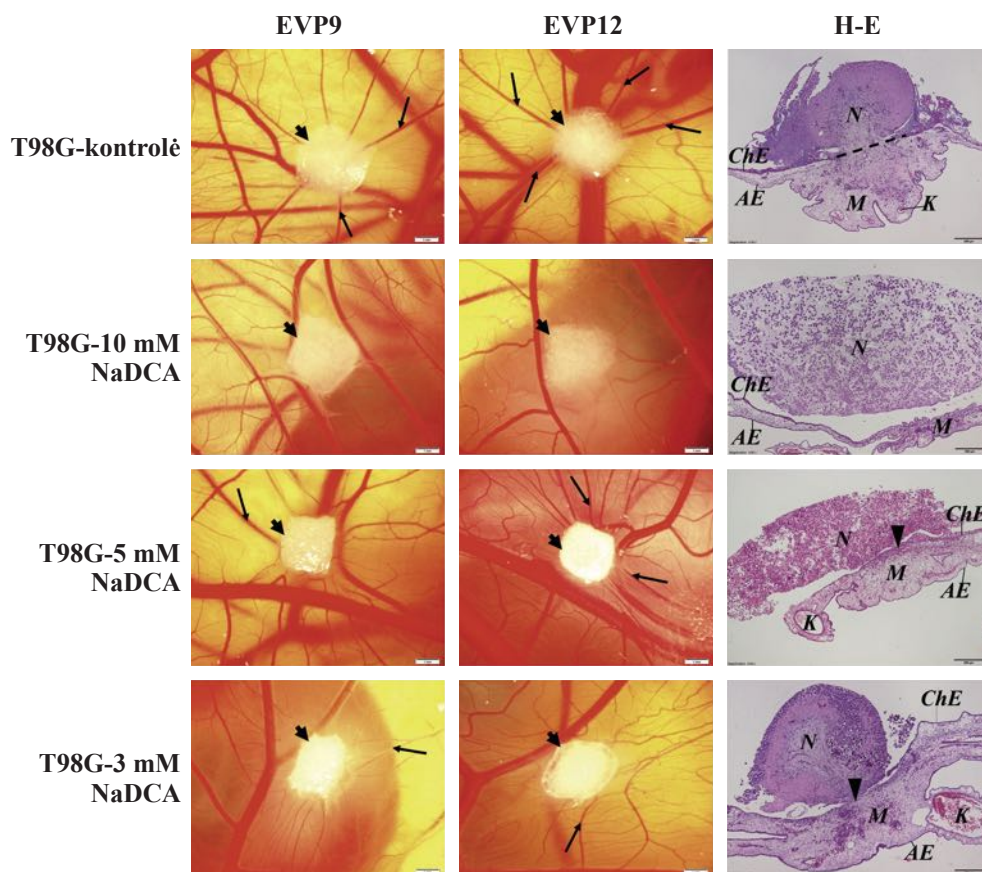
EVP9 ir EVP12 U87-10 mM NaDCA ir U87-3 mM NaDCA grupėse naviko dydis nepakitęs, H-E preparate matomas pažeistas choriono epitelio vientisumas. U87-5 mM NaDCA navikas auga ant CAM paviršiaus, H-E preparate – nepažeistas choriono epitelio vientisumas.

Tirtų T98G ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos pateiktos 3.1.1.2 paveiksle. EVP9 navikas – po dviejų parų nuo transplantacijos ant CAM, EVP12 – po penkių parų. T98G navikai tirti grupėse: kontrolinė, gydyti 10 mM NaDCA, 5 mM NaDCA ir 3 mM NaDCA dozėmis.



3.1.1.1 pav. Tirtų U87 ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę, punktyrinė linija – choriono epitelio suardymą, rodyklės smaigalys – pažeistą choriono epitelį. ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslė. EVP9, EVP12 skalė – 1 mm, H-E – 200 μ m.



3.1.1.2 pav. Tirtų T98G ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę, punktyrinė linija – choriono epitelio suardymą, rodyklės smaigalys – pažeistą choriono epitelį. ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslė. EVP9, EVP12 skalė – 1 mm, H-E – 200 μ m.

T98G-kontrolinės grupės navikas EVP9 ant CAM turi aiškias ribas, neinvazavęs į CAM mezenchimą, EVP12 navikas turi kraujagyslių tinklą ir yra be aiškių ribų – invazavęs į CAM. EVP9 ir EVP12 T98G-5 mM NaDCA ir T98G-3 mM NaDCA navikų kontūrai aiškūs, EVP12 nuotraukose aplink navikus matoma kraujagyslių tinklas, H-E nuotraukose – matyti choriono epitelio vientisumo pažeidimas. T98G-kontrolino ir T98G-3 mM NaDCA navikų H-E nuotraukose matomos kraujagyslės navike. T98G-10 mM NaDCA EVP9 ir EVP12 navikų kontūrai aiškūs, H-E nuotraukoje – navikas ant membranos paviršiaus, nėra choriono epitelio vientisumo pažeidimo.

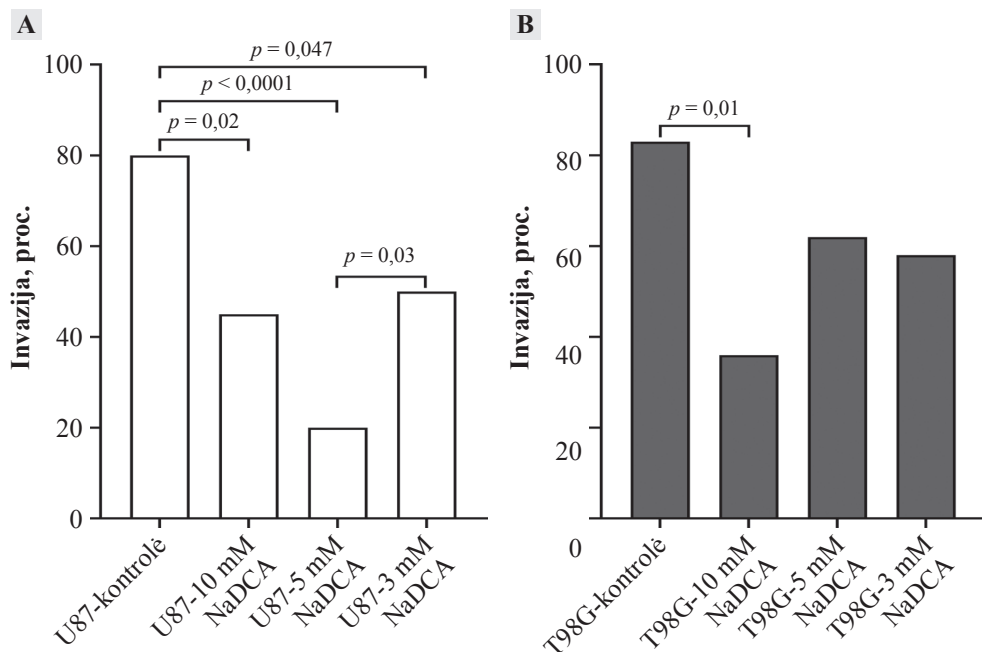
3.1.2. U87 ir T98G ląstelių navikų invazijos dažnumo į CAM ir CAM storio po naviku vertinimas

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų grupių invazijos į CAM dažnumo ir CAM storio po naviku duomenys pateikti 3.1.2.1 lentelėje; 3.1.2.1 paveiksle pateiktas tirtų navikų invazijos dažnumas į mezenchimą.

3.1.2.1 lentelė. *U87 ir T98G ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumas ir CAM storio po naviku duomenys tirtose grupėse*

Tirtos grupės	<i>n</i>	Invazijos dažnumas, proc.	CAM storis, μm (mediana (ribos))
U87-kontrolė	20	80,00	197,80 (65,21–387,90)
U87-10 mM NaDCA	24	45,83 ^a	219,20 (65,41–1139,45) ^{g, h}
U87-5 mM NaDCA	25	20,00 ^{b, c}	149,20 (49,99–452,50)
U87-3 mM NaDCA	20	50,00 ^d	115,00 (46,61–276,30) ^a
T98G-kontrolė	12	83,00	248,10 (60,11–968,20)
T98G-10 mM NaDCA	22	36,36 ^e	200,40 (1958–456,30) ⁱ
T98G-5 mM NaDCA	16	62,50 ^f	144,30 (50,99–349,50) ^j
T98G-3 mM NaDCA	12	58,33	292,00 (52,46–508,60)

^a $p = 0,02$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p < 0,0001$, palyginus su U87-kontrolė; ^c $p = 0,03$, palyginus su U87-3 mM NaDCA; ^d $p = 0,047$, palyginus su U87-kontrolė; ^e $p = 0,01$, palyginus su T98G-kontrolė; ^f $p = 0,02$, palyginus su T98G-100 μM TMZ; ^g $p = 0,02$, palyginus su U87-5 mM NaDCA; ^h $p = 0,003$, palyginus su U87-3 mM NaDCA; ⁱ $p = 0,007$, palyginus su T98G-kontrolė; ^j $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė.



3.1.2.1 pav. U87 (A) ir T98G (B) ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumas tirtose grupėse

Gydymas 10 mM NaDCA, 5 mM NaDCA ir 3 mM NaDCA dozėmis reikšmingai sumažino U87 ląstelių navikų invazijos į chorioalantojinę membraną dažnumą. U87-5 mM NaDCA navikų invazijos dažnumas buvo reikšmingai mažesnis nei U87-3 mM NaDCA navikų. U87-10 mM NaDCA navikų invazijos dažnumas į CAM nesiskyrė nuo gydytų 5 mM ar 3 mM NaDCA U87 navikų.

CAM storis po U87-kontroliniais bei gydytais 10 mM ir 5 mM NaDCA navikais nesiskyrė. Palyginus su U87-kontroline grupe, gydymas 3 mM NaDCA doze reikšmingai sumažino CAM storį po naviku. U87-10 mM NaDCA navikų CAM storis buvo didžiausias, ir reikšmingas skirtumas nustatytas palyginus su membranos storio po U87-5 mM NaDCA ir U87-3 mM NaDCA navikais. Palyginus U87-5 mM NaDCA ir U87-3 mM NaDCA grupių CAM storį po naviku, reikšmingo CAM storio pokyčių skirtumo nenustatyta.

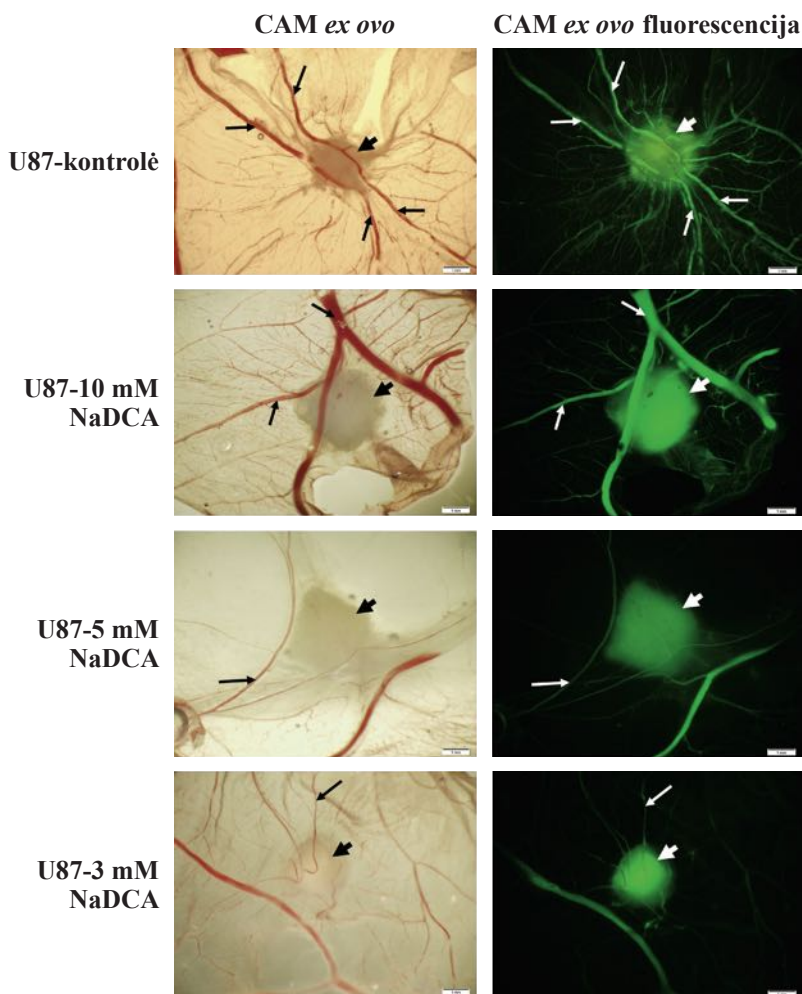
Palyginus T98G-kontrolinius su NaDCA gydytais navikais, 10 mM NaDCA reikšmingai sumažino invazijos į CAM dažnumą. Palyginus su kontroline grupe, gydymas mažesnėmis NaDCA dozėmis nesukėlė reikšmingo poveikio T98G navikų invazijos į CAM dažnumui. Palyginus skirtingomis NaDCA dozėmis gydytas navikų grupes, reikšmingų invazijos dažnumo skirtumų nenustatėme.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, CAM storis po naviku buvo reikšmingai mažesnis T98G-10 mM NaDCA ir T98G-5 mM NaDCA grupių. Gydytų skirtingomis NaDCA dozėmis navikų grupių CAM storis po naviku nesiskyrė.

Palyginus skirtingų NaDCA dozių poveikį U87 ir T98G navikų invazijai, nustatyta, kad U87 navikuose invaziją sumažino 10 mM, 5 mM ir 3 mM NaDCA dozės, o T98G navikų grupėse reikšmingą poveikį naviko invazijai į CAM turėjo tik 10 mM NaDCA dozė. CAM storį po U87 naviku reikšmingai sumažino 3 mM NaDCA dozė, o po T98G naviku – 10 mM ir 5 mM NaDCA dozės.

3.1.3. U87 ir T98G ląstelių navikų neoangiogenezės ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku vertinimas

Tirtų U87 ląstelių navikų grupių EVP12 iškirptos membranos su naviku *ex ovo* ir kraujagyslių nuotraukos, į CAM kraujagyslę sušvirkštus fluorescencinio dekstrano, pateiktos 3.1.3.1 paveiksle. CAM *ex ovo* nuotraukos rodo apatinę iškirptos membranos pusę su naviku. Tirti U87 ląstelių navikai: kontrolinė, gydytų 10 mM NaDCA, 5 mM NaDCA ar 3 mM NaDCA grupės.

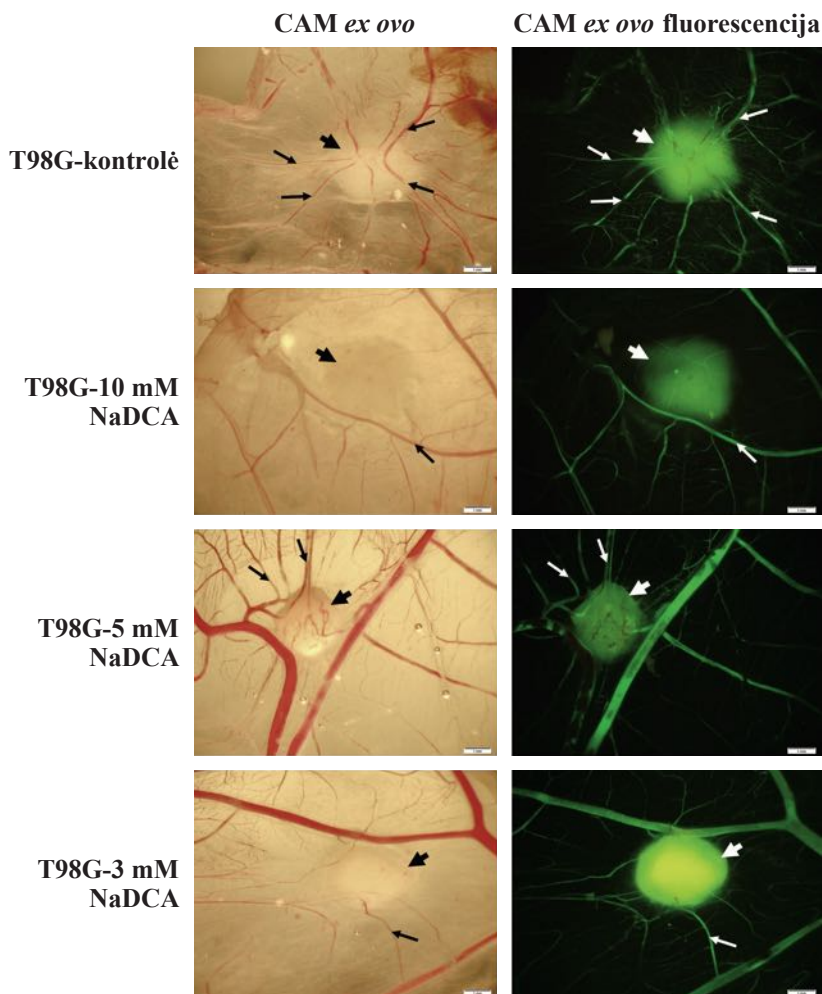


3.1.3.1 pav. U87 ląstelių navikų neoangiogenežė EVP12 tirtose grupėse (*ex ovo* CAM su naviku ir fluorescencijos nuotraukos)

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę. Skalė – 1 mm.

U87-kontrolinio ant CAM *ex ovo* ir naviko fluorescencijos nuotraukose matomas navikas, apsuptas radialiai susiformavusio kraujagyslių tinklo – „stipininio rato“. Palyginus su kontroline grupe, 10 mM NaDCA ir 3 mM NaDCA U87 navikų nuotraukose kraujagyslių tinklas silpniau susiformavęs, 5 mM NaDCA – silpniausiai. Tai rodo, kad gydymas tiriamaisiais vaistais slopino neoangiogenezę.

Tirtų T98G ląstelių navikų grupių EVP12 iškirptos membranos su naviku *ex ovo* ir kraujagyslių nuotraukos, po fluorescencinio dekstrano sušvirkštimo į CAM kraujagyslę, pateiktos 3.1.3.2 paveiksle. Tirtos T98G ląstelių navikų grupės: kontrolinė, gydytų 10 mM NaDCA, 5 mM NaDCA ar 3 mM NaDCA navikai.



3.1.3.2 pav. T98G ląstelių navikų neoangiogeneze EVP12 tirtose grupėse (*ex ovo* CAM su naviku ir fluorescencijos nuotraukos)

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę. Skalė – 1 mm.

T98G-kontrolinių, T98-5 mM NaDCA ir T98G-3 mM NaDCA navikų ant CAM *ex ovo* ir jų fluorescencijos nuotraukose matomas kraujagyslių tinklas, aplink naviką pritrauktos kraujagyslės. Gydomas 10 mM NaDCA slopino neoangiogenezę – kraujagyslių tinklas, palyginus su T98G-kontroline grupe, silpniau susiformavęs.

3.1.3.1 lentelėje pateiktas kraujagyslių skaičius chorioalantojinėje membranoje po tirtais U87 ir T98G ląstelių navikais.

3.1.3.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų grupių kraujagyslių skaičius CAM po naviku

Tirtos grupės	Kraujagyslių skaičius (mediana (ribos))			
	<i>n</i>	U87	<i>n</i>	T98G
Kontrolė	20	23,5 (9–63) ^a	12	28 (3–45)
10 mM NaDCA	24	22 (4–61)	22	19,5 (5–43)
5 mM NaDCA	25	10 (2–40)	16	31 (10–70)
3 mM NaDCA	20	16,5 (4–44) ^b	12	31 (8–63) ^c

^a $p = 0,0006$, palyginus su U87-5 mM NaDCA; ^b $p = 0,02$, palyginus su U87-kontrolė;

^c $p = 0,04$, palyginus su T98G-10 mM NaDCA.

Palyginus su U87-kontroline grupe, kraujagyslių skaičius chorioalantojinėje membranoje po naviku buvo reikšmingai mažesnis U87-5 mM NaDCA ir U87-3 mM NaDCA grupėse. Palyginus U87-kontrolinės ir U87-10 mM NaDCA grupių kraujagyslių skaičių po naviku, reikšmingo kraujagyslių skaičiaus pokyčio nenustatyta. Palyginus skirtingomis NaDCA dozėmis gydytus navikus reikšmingų kraujagyslių skaičiaus skirtumų nenustatėme.

T98G-kontrolinių ir skirtingomis NaDCA dozėmis gydytų T98G navikų grupių kraujagyslių skaičius chorioalantojinėje membranoje po naviku nesiskyrė. Kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-3 mM NaDCA grupės nei T98G-10 mM NaDCA. Palyginus su T98G-5 mM NaDCA, T98G-10 mM NaDCA ir T98G-3 mM NaDCA navikų grupės kraujagyslių skaičiaus skirtumo membranoje po naviku nenustatyta.

Nustatyta skirtingų NaDCA dozių poveikio U87 ir T98G navikų neoangiogenezei skirtumai: U87 navikų CAM kraujagyslių tinklo raišką po naviku slopino 3 mM ir 5 mM NaDCA dozės, o T98G navikų grupėse reikšmingą poveikį neoangiogenezei turėjo tik 10 mM NaDCA dozė.

3.2. NaDCA poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA, p53 ir EZH2 raiškai tyrimų duomenys

3.2.1. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM PLBA raiška

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM grupių PLBA-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.2.1.1 lentelėje ir 3.2.1.1 paveiksle.

3.2.1.1 lentelė. *U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA-teigiamų ląstelių raiškos duomenys tirtose grupėse*

Tirtos grupės	PLBA-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	<i>n</i>	U87	<i>n</i>	T98G
Kontrolė	13	72,12 (15,44–92,73)	9	68,95 (16,41–98,04)
10 mM NaDCA	13	24,70 (1,55–53,89) ^{a, b}	11	41,29 (0,98–98,51)
5 mM NaDCA	14	17,43 (7,63–30,99) ^{c, d}	8	61,25 (15,38–91,32)
3 mM NaDCA	18	51,95 (6,67–91,67)	10	66,03 (35,43–100,0)

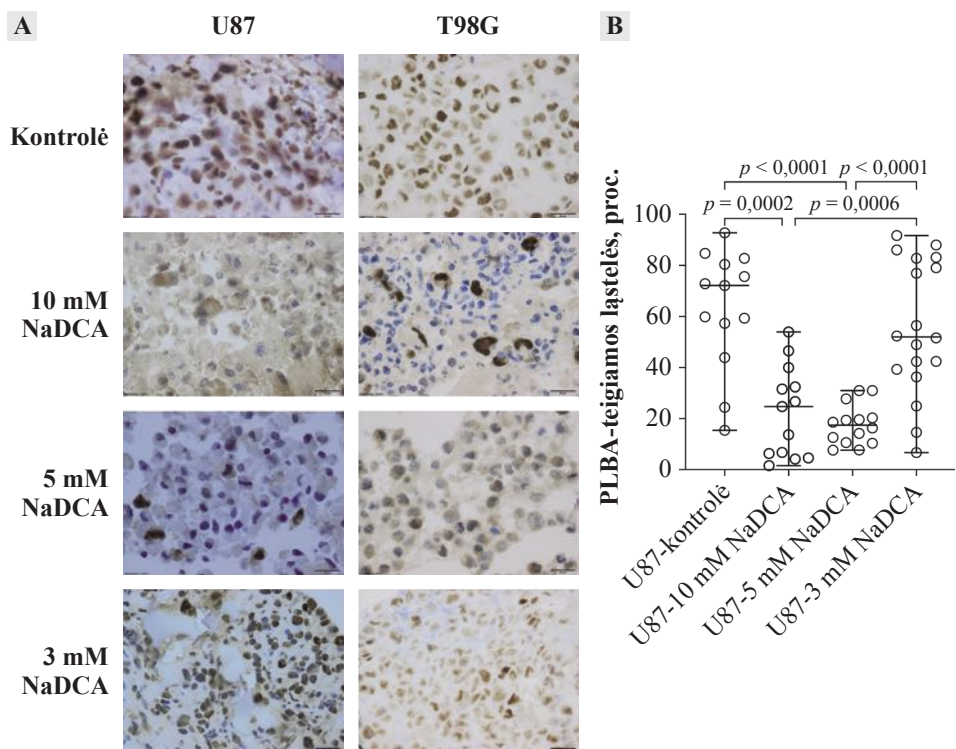
^a $p = 0,0002$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p = 0,0006$, palyginus su U87-3 mM NaDCA;

^c $p < 0,0001$, palyginus su U87-kontrolė; ^d $p < 0,0001$, palyginus su U87-3 mM NaDCA.

Palyginus su U87-kontroline grupe, gydymas 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų ląstelių skaičių U87 navikuose. Palyginus U87-kontrolinius ir U87-3 mM NaDCA navikus, PLBA-teigiamų ląstelių skaičiaus skirtumų nenustatyta. U87-10 mM NaDCA ir U87-5 mM NaDCA navikų grupių PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei U87-3 mM NaDCA. U87-10 mM NaDCA ir U87-5 mM NaDCA navikų PLBA raiška nesiskyrė.

T98G-kontrolinių, T98G-10 mM NaDCA, T98G-5 mM NaDCA ir T98G-3 mM NaDCA navikų grupių PLBA-teigiamų ląstelių raiška nesiskyrė.

Palyginus skirtingų NaDCA dozių poveikį U87 ir T98G navikų PLBA raiškai nustatyta, kad U87 navikų PLBA-teigiamų ląstelių skaičių sumažino 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA dozės, o gydymas skirtingomis NaDCA dozėmis reikšmingo poveikio T98G navikų PLBA raiškai nesukėlė.



3.2.1.1 pav. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM PLBA raiška tirtose grupėse

A – rudos spalvos branduoliai rodo PLBA-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μ m; **B** – procentinė PLBA-teigiamų ląstelių raiška U87 navikuose.

3.2.2. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM p53 raiška

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų grupių p53-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.2.2.1 lentelėje, 3.2.2.1 ir 3.2.2.2 paveiksluose.

3.2.2.1 lentelė. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM p53-teigiamų ląstelių raiškos duomenys tirtose grupėse

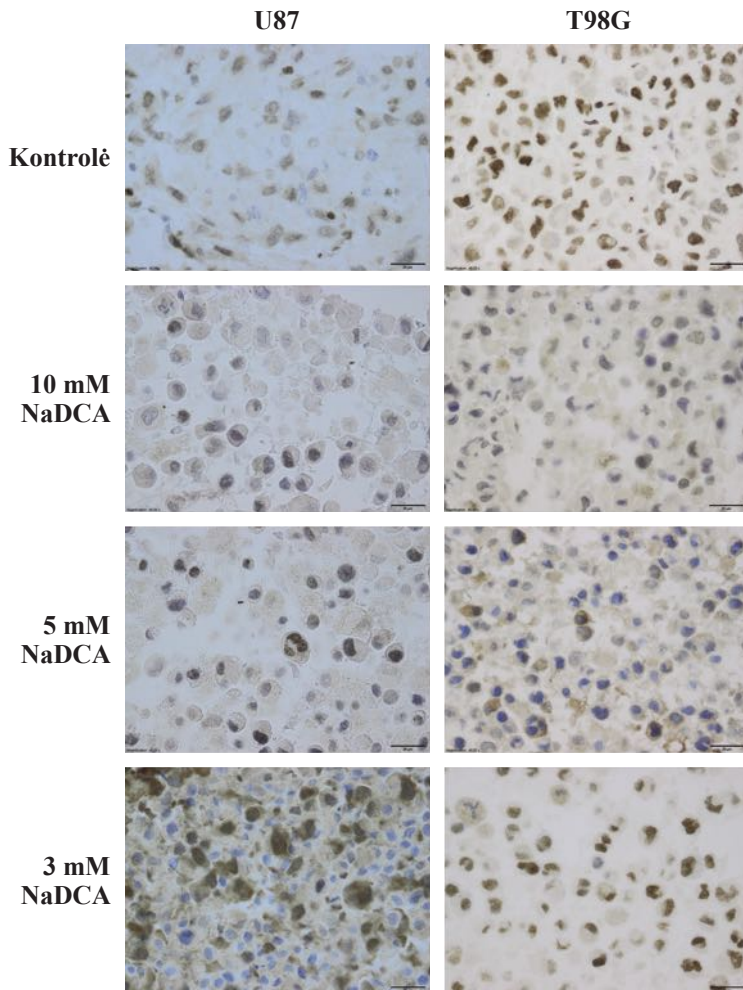
Tirtos grupės	p53-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	n	U87	n	T98G
Kontrolė	15	63,58 (1,81–83,44)	9	84,52 (47,57–94,23)
10 mM NaDCA	12	9,73 (0,93–44,19) ^{b, c}	10	18,19 (2,77–55,29) ^{l, m}
5 mM NaDCA	13	11,73 (2,54–25,23) ^{e, f}	8	38,10 (7,74–75,27) ^p
3 mM NaDCA	20	57,04 (27,48–84,39)	11	82,42 (12,75–95,21)

^b $p = 0,0008$, palyginus su U87-kontrolė; ^c $p < 0,0001$, palyginus su U87-3 mM NaDCA;

^e $p = 0,0004$, palyginus su U87-kontrolė; ^f $p < 0,0001$, palyginus su U87-3 mM NaDCA;

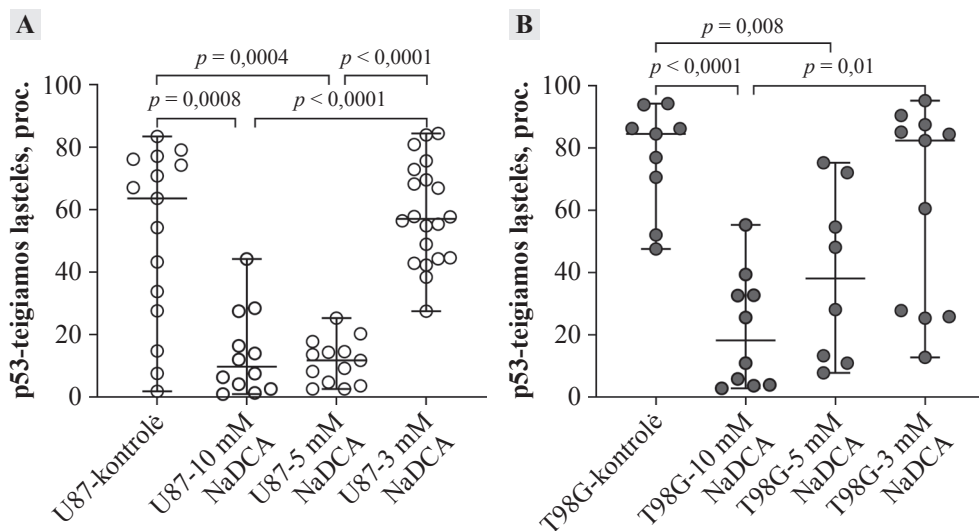
^l $p < 0,0001$, palyginus su T98G-kontrolė; ^m $p = 0,01$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA;

^p $p = 0,008$, palyginus su T98G-kontrolė.



3.2.2.1 pav. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM p53 raiška tirtose grupėse

Rudos spalvos branduoliai nurodo p53-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 µm.



3.2.2.2 pav. U87(A) ir T98G (B) ląstelių navikų procentinė p53-teigiamų ląstelių raiška tirtose grupėse

Palyginus su U87-kontroline grupe, gydymas 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA reikšmingai sumažino U87 navikų p53-teigiamų ląstelių skaičių, o gydymas 3 mM NaDCA poveikio raiškai nesukėlė. U87-10 mM NaDCA ir U87-5 mM NaDCA navikų grupių p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei U87-3 mM NaDCA. U87-10 mM NaDCA ir U87-5 mM NaDCA navikų p53 raiška nesiskyrė.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, gydymas 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA reikšmingai sumažino p53-teigiamų ląstelių skaičių T98G ląstelių navikuose, o gydymas 3 mM NaDCA poveikio raiškai nesukėlė. T98G-10 mM NaDCA navikų p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei T98G-3 mM NaDCA. Palyginus navikų T98G-5 mM NaDCA ir T98G-3 mM NaDCA grupes, p53 raiškos skirtumų nenustatyta.

Palyginus skirtingų NaDCA dozių poveikį U87 ir T98G navikų p53 raiškai nustatyta, kad U87 ir T98G navikų p53-teigiamų ląstelių skaičių sumažino 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA dozės, o 3 mM NaDCA reikšmingo poveikio p53 raiškai nesukėlė.

3.2.3. U87 ir T98G ląstelių navikų EZH2 raiška

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM grupių EZH2-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.2.3.1 lentelėje, 3.2.3.1 ir 3.2.3.2 paveiksluose.

3.2.3.1 lentelė. *U87 ir T98G ląstelių navikų EZH2-teigiamų ląstelių raiškos duomenys tirtose grupėse*

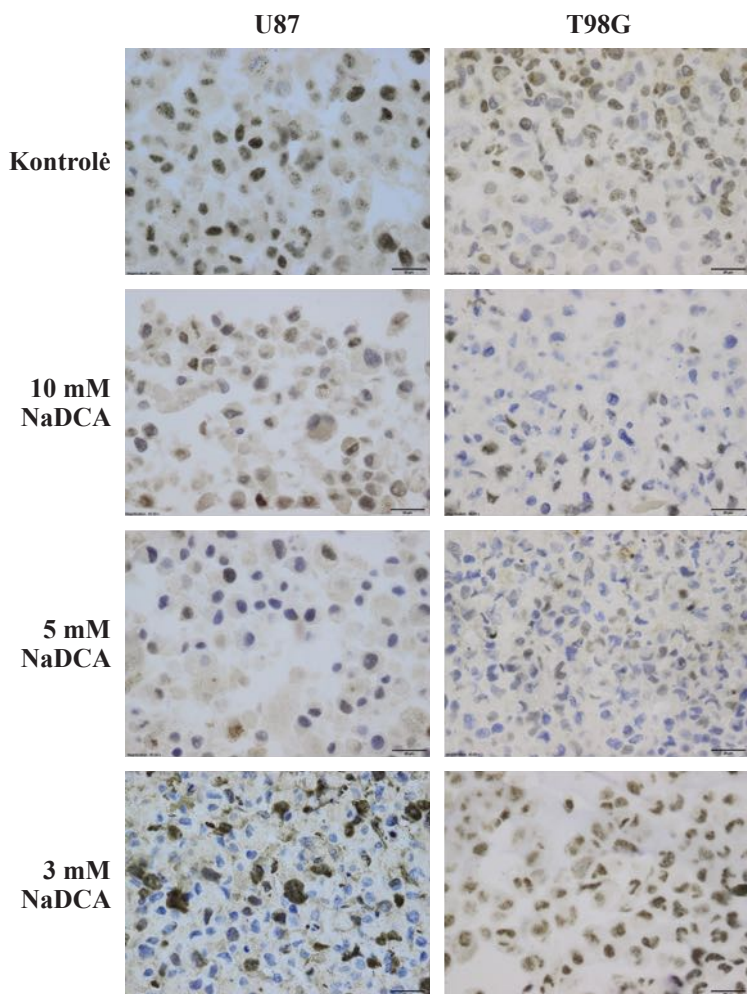
Tirtos grupės	EZH2-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	<i>n</i>	U87	<i>n</i>	T98G
Kontrolė	17	69,57 (5,34–94,06)	9	66,47 (25,74–97,65)
10 mM NaDCA	13	26,49 (1,88–74,11) ^{b, c}	10	15,16 (4,73–30,94) ^{m, n}
5 mM NaDCA	12	8,40 (2,15–92,17) ^{f, g}	8	16,79 (4,73–88,34) ^o
3 mM NaDCA	19	47,23 (26,98–85,05)	11	73,59 (18,90–97,35) ^s

^b $p = 0,002$, palyginus su U87-kontrolė; ^c $p = 0,02$, palyginus su U87-3 mM NaDCA;

^f $p = 0,0004$, palyginus su U87-kontrolė; ^g $p = 0,0003$, palyginus su U87-3 mM NaDCA;

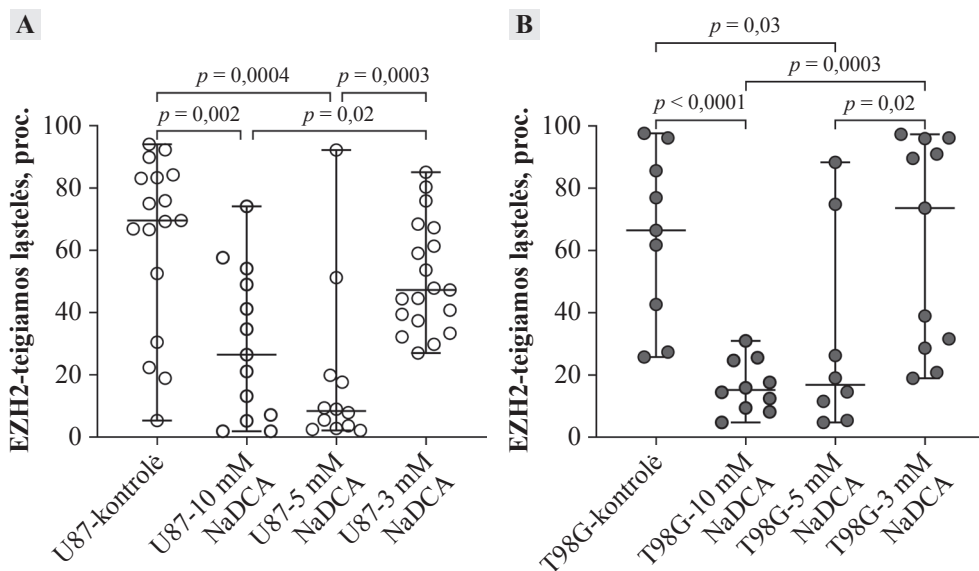
^m $p < 0,0001$, palyginus su T98G-kontrolė; ⁿ $p = 0,0003$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA;

^o $p = 0,03$, palyginus su T98G-kontrolė; ^s $p = 0,02$, palyginus su T98G-5 mM NaDCA.



3.2.3.1 pav. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM EZH2 raiška tirtose grupėse

Rudos spalvos branduoliai nurodo EZH2-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 µm.



3.2.3.2 pav. U87 (A) ir T98G (B) ląstelių navikų procentinė EZH2-teigiamų ląstelių raiška tirtose grupėse

Palyginus su U87-kontroline grupe, gydymas 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA reikšmingai sumažino U87 navikų EZH2-teigiamų ląstelių skaičių, o gydymas 3 mM NaDCA poveikio EZH2 raiškai nesukėlė. U87-10 mM NaDCA ir U87-5 mM NaDCA navikų grupių EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei U87-3 mM NaDCA. U87-10 mM NaDCA ir U87-5 mM NaDCA navikų EZH2 raiška nesiskyrė.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, gydymas 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA reikšmingai sumažino EZH2-teigiamų ląstelių skaičių T98G ląstelių navikuose. T98G-10 mM NaDCA ir T98G-5 mM NaDCA navikų EZH2 raiška nesiskyrė. T98G-kontrolinių ir T98G-3 mM NaDCA navikų EZH2 raiška nesiskyrė. T98G-10 mM NaDCA ir T98G-5 mM NaDCA navikų EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei T98G-3 mM NaDCA.

Palyginus skirtingų NaDCA dozių poveikį U87 ir T98G navikų EZH2 raiškai, nustatyta, kad U87 ir T98G navikų atsakas į gydymą skirtingomis NaDCA dozėmis buvo panašus.

3.3. NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikams ant CAM palyginamųjų tyrimų duomenys

3.3.1. U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos duomenų vertinimas

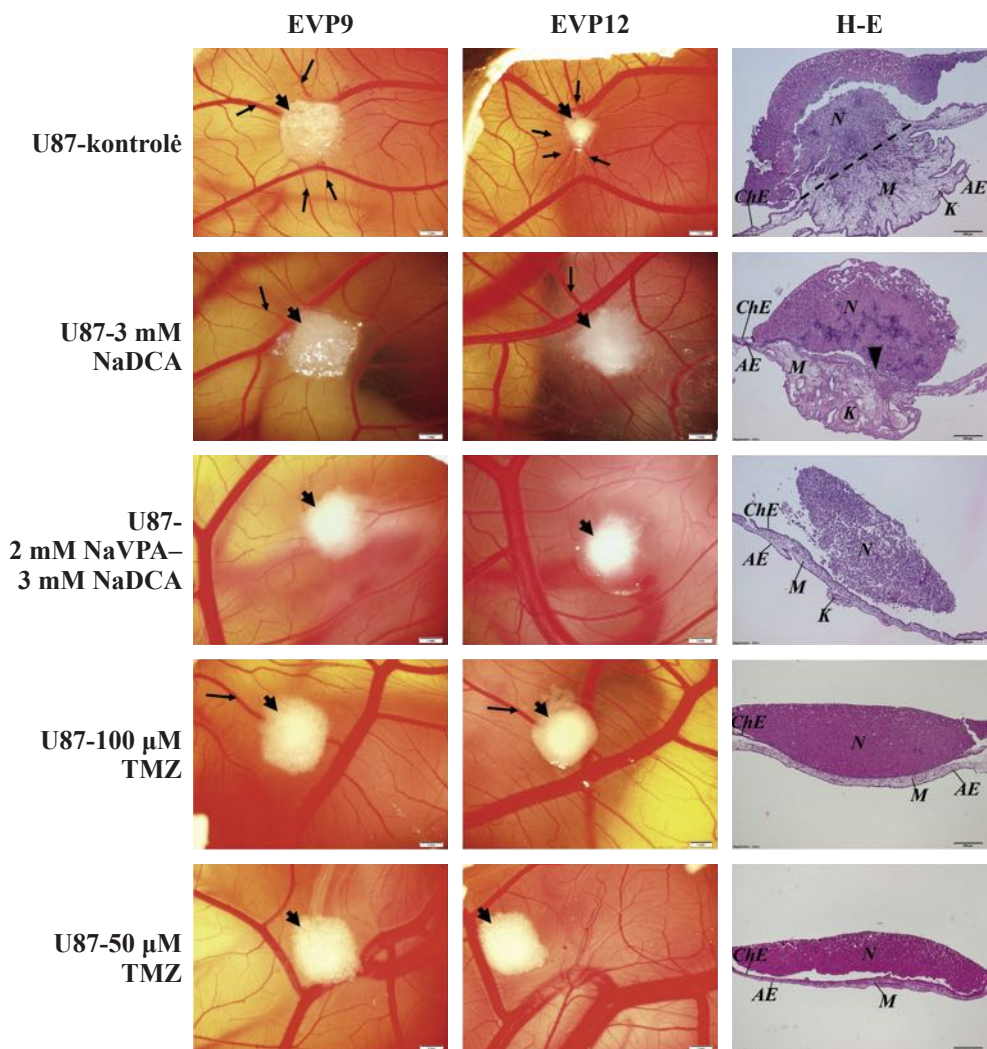
Tirtų U87 ląstelių navikų ant CAM kontrolinės ir gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos pateiktos 3.3.1.1 paveiksle. EVP9 navikas matomas po dviejų parų nuo transplantacijos ant CAM, EVP12 – po penkių, o H-E tyrimas atliktas po 5 parų (EVP12) nuo transplantacijos.

U87-kontrolinės grupės naviko stereomikroskopijos nuotraukos rodo invazyvų naviko augimą – EVP12 navikas vizualiai mažesnis nei EVP9, invazavęs į CAM mezenchimą, aplink naviką susiformavęs kraujagyslių „stipininis ratas“; H-E nuotraukoje matoma suardytas choriono epitelio vientisumas ir kraujagyslės navike.

EVP9 ir EVP12 U87-3 mM NaDCA naviko dydis nepakitęs, H-E nuotraukoje matomas choriono epitelio vientisumo pažeidimas. U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupėje navikas auga ant CAM paviršiaus, H-E preparate – choriono epitelis nepažeistas.

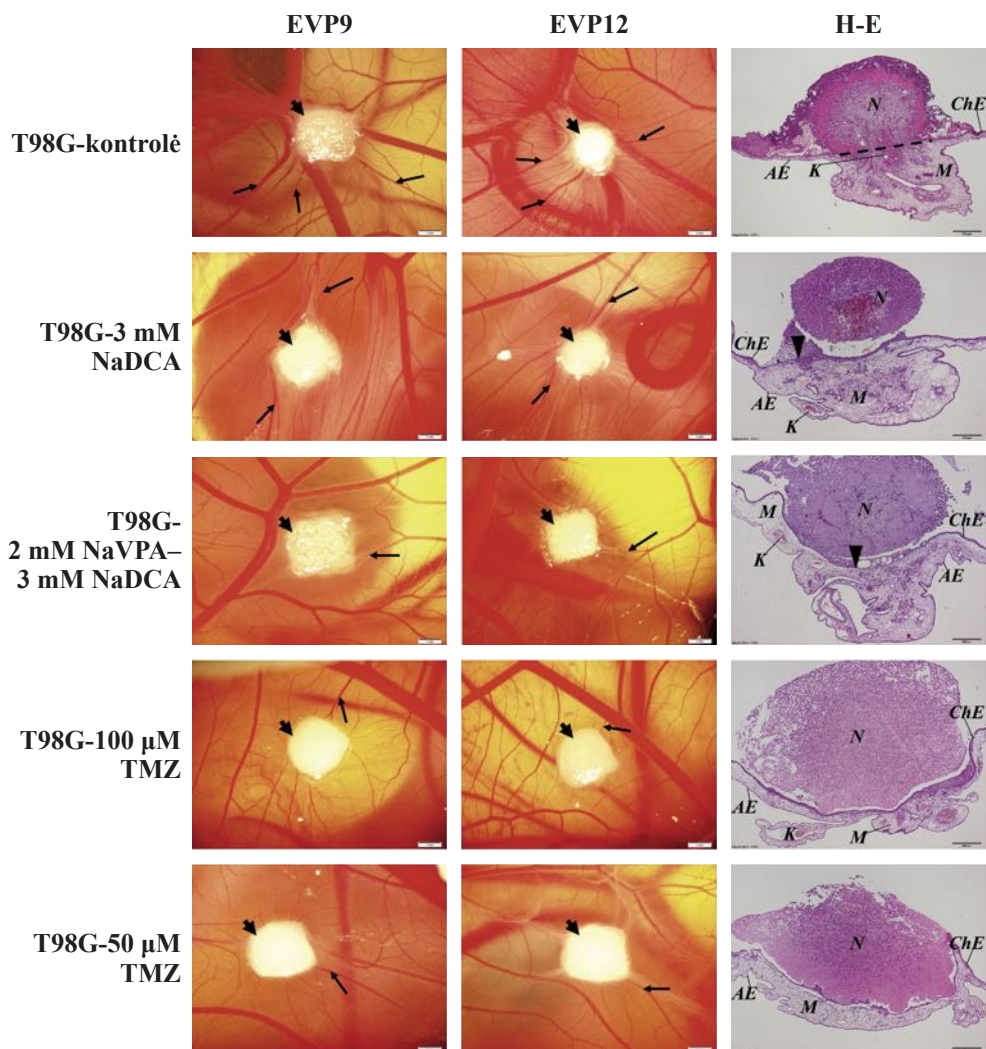
EVP9 ir EVP12 nuotraukose U87-100 μ M TMZ ir U87-50 μ M TMZ grupių navikų dydis panašus, nėra choriono epitelio vientisumo pažeidimo.

T98G navikų ant CAM kontrolinės ir gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos pateiktos 3.3.1.2 paveiksle.



3.3.1.1 pav. Tirtų U87 ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę, punktyrinė linija – choriono epitelio suardymą, rodyklės smaigalys – pažeistą choriono epitelį. ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslė. EVP9, EVP12 skalė – 1 mm, H-E – 200 μm.



3.3.1.2 pav. Tirtų T98G ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12) ir H-E histologijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę, punktyrinė linija – choriono epitelio suardymą, rodyklės smaigalys – pažeistą choriono epitelį. ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslė. EVP9, EVP12 skalė – 1 mm, H-E – 200 μm.

Palyginus T98G-kontrolinės grupės EVP9 ir EVP12 naviką, EVP12 navikas ant CAM paviršiaus mažesnis, dalis jo invazavusi į CAM mezenchimą, matomas kraujagyslių tinklas, H-E nuotraukoje – matomos kraujagyslės navike ir suardytas choriono epitelis.

EVP9–EVP12 laikotarpiu T98G-3 mM NaDCA ir T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių navikų dydis nekito, EVP12 matoma apie navikus radialiai susiformavęs kraujagyslių tinklas, H-E nuotraukose – choriono epitelio vientisumo pažeidimas ir kraujagyslės navike.

100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ dozės slopino T98G naviko ant chorioalantojinės membranos augimą: EVP9 ir EVP12 stereomikroskopijos nuotraukose naviko dydis nekito, H-E nuotraukose navikai matomi ant CAM paviršiaus, choriono epitelis nepažeistas.

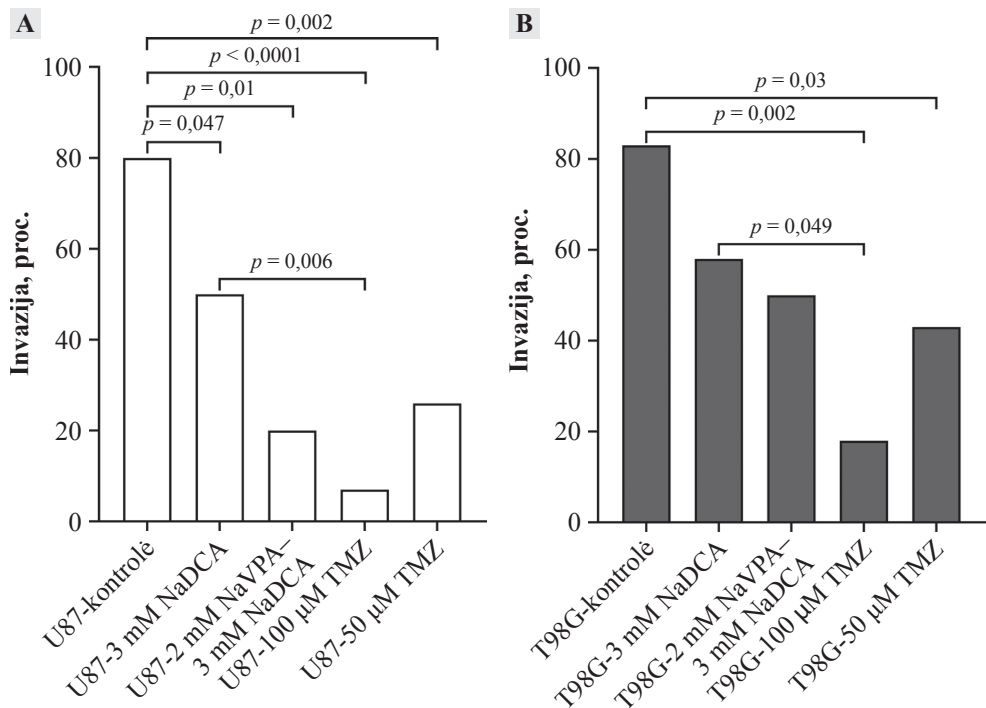
3.3.2. U87 ir T98G ląstelių navikų invazijos dažnumo ir CAM storio duomenys

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ grupių invazijos į CAM dažnumo ir CAM storio po naviku duomenys pateikti 3.3.2.1 lentelėje; 3.3.2.1 paveiksle pateikti tirtų ląstelių navikų grupių invazijos į CAM duomenys.

3.3.2.1 lentelė. Tirtų grupių U87 ir T98G ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumas ir CAM storio po naviku duomenys

Tirtos grupės	<i>n</i>	Invazijos dažnumas, proc.	CAM storis, μ m (mediana (ribos))
U87-kontrolė	20	80,00	197,80 (65,21–387,90)
U87-3 mM NaDCA	20	50,00 ^a	115,00 (46,61–276,30) ⁱ
U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	20,00 ^b	113,10 (64,25–317,10)
U87-100 μ M TMZ	15	6,67 ^{c, d}	71,18 (46,99–243,80) ^j
U87-50 μ M TMZ	15	26,67 ^e	120,20 (44,47–393,90)
T98G-kontrolė	12	83,00	248,10 (60,11–968,20)
T98G-3 mM NaDCA	12	58,33	292,00 (52,46–508,60)
T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	12	50,00	171,70 (48,26–518,70) ^k
T98G-100 μ M TMZ	11	18,18 ^{f, g}	168,60 (57,74–359,90) ^l
T98G-50 μ M TMZ	16	43,75 ^h	219,60 (48,73–776,00)

^a $p = 0,047$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p = 0,01$, palyginus su U87-kontrolė; ^c $p < 0,0001$, palyginus su U87-kontrolė; ^d $p = 0,006$, palyginus su U87-3 mM NaDCA; ^e $p = 0,002$, palyginus su U87-kontrolė; ^f $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė; ^g $p = 0,049$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA; ^h $p = 0,03$, palyginus su T98G-kontrolė; ⁱ $p = 0,02$, palyginus su U87-kontrolė; ^j $p = 0,0002$, palyginus su U87-kontrolė; ^k $p = 0,04$, palyginus su T98G-kontrolė; ^l $p = 0,02$, palyginus su T98G-kontrolė.



3.3.2.1 pav. U87 (A) ir T98G (B) ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumas tirtose grupėse

Gydymas 3 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA reikšmingai sumažino U87 navikų invazijos į chorioalantojinę membraną dažnumą. U87-3 mM NaDCA navikų invazijos dažnumas į CAM nesiskyrė nuo gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikų.

Mažiausias U87 navikų invazijos dažnumas (6,67 proc.) buvo 100 μ M TMZ gydytoje grupėje; jis buvo reikšmingai mažesnis nei kontrolinių ir gydytų 3 mM NaDCA U87 navikų. Gydymas 50 μ M TMZ doze reikšmingai sumažino U87 naviko invazijos į CAM dažnumą. U87-50 μ M TMZ navikų invazijos dažnumas į CAM nesiskyrė nuo gydytų 3 mM NaDCA U87 navikų invazijos. TMZ gydytų U87 navikų invazijos dažnumas nesiskyrė nuo gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikų. Gydytų skirtingomis TMZ dozėmis U87 navikų invazijos dažnumas nesiskyrė.

Gydymas 3 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nesukėlė reikšmingo poveikio T98G navikų invazijos dažnumui. T98G-3 mM NaDCA navikų invazijos dažnumas į CAM nesiskyrė nuo T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikų.

Gydymas 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ dozėmis reikšmingai sumažino T98G navikų invazijos į CAM dažnumą. T98G-50 μ M TMZ navikų invazijos dažnumas į CAM nesiskyrė nuo gydytų 3 mM NaDCA T98G navikų. Palyginus T98G-3 mM NaDCA grupę su gydytų 100 μ M TMZ doze T98G navikų grupe, invazijos į CAM dažnumas buvo reikšmingai mažesnis gydytų TMZ grupėje. TMZ gydytų T98G navikų invazijos dažnumas nesiskyrė nuo gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikų. Palyginę gydytas skirtingomis TMZ dozėmis T98G navikų grupes, reikšmingų invazijos dažnumo skirtumų nenustatėme.

Palyginus NaVPA–NaDCA ir skirtingų TMZ dozių poveikį U87 ir T98G navikų invazijai, nustatyta, kad U87 navikų invaziją sumažino 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ dozės, o T98G navikų grupėse reikšmingą poveikį naviko invazijai į CAM turėjo tik 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ dozės.

Palyginus su U87-kontroline grupe, gydymas 3 mM NaDCA doze reikšmingai sumažino CAM storį po naviku. CAM storis po U87-kontroliniais ir gydytais 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikais nesiskyrė. Palyginus U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių CAM storį po naviku, CAM storio pokyčių skirtumo nenustatyta.

Gydymas 100 μ M TMZ doze reikšmingai sumažino CAM storį po U87 navikais, o CAM storis po U87-kontroliniais ir gydytais 50 μ M TMZ navikais nesiskyrė. Palyginus su U87-kontroline grupe, TMZ gydytų U87 navikų CAM storis nesiskyrė nuo 3 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų navikų membranos storio. Palyginus U87-100 μ M TMZ ir U87-50 μ M TMZ grupių CAM storį po naviku, reikšmingo pokyčių skirtumo nenustatyta.

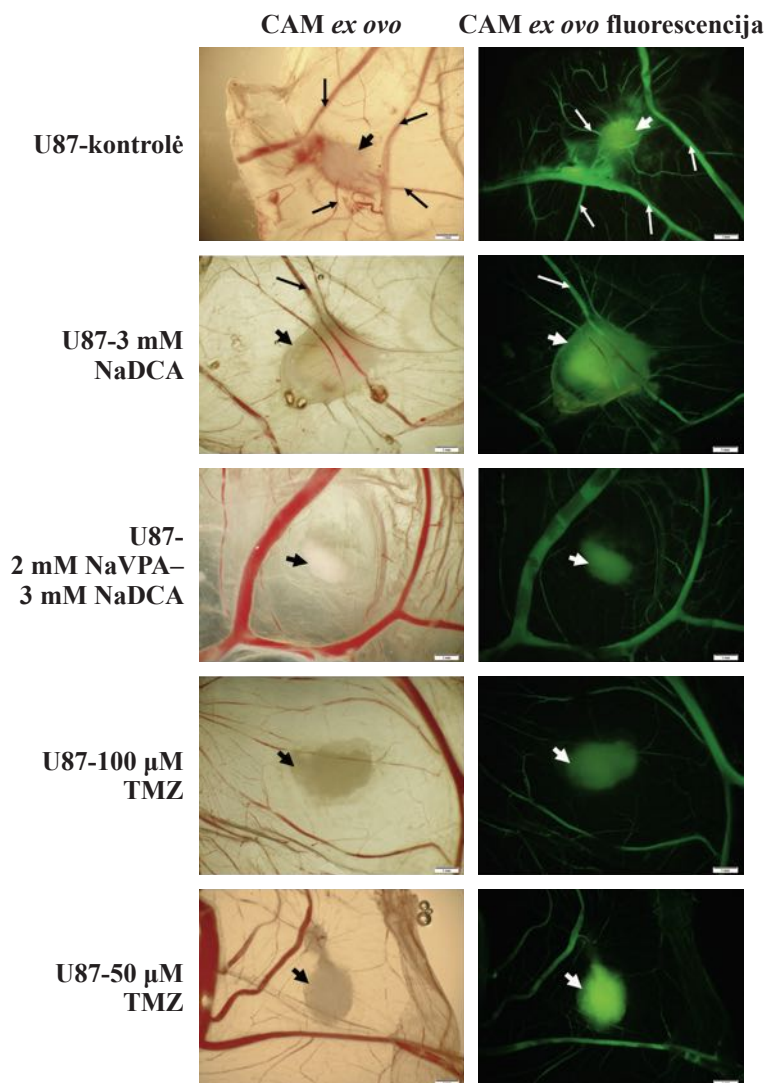
CAM storis po T98G-kontroliniais ir gydytais 3 mM NaDCA navikais nesiskyrė. Gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA reikšmingai sumažino CAM storį po T98G navikais. Palyginus T98G-3 mM NaDCA ir T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių CAM storį po naviku, reikšmingo pokyčių skirtumo nenustatyta.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, CAM storis po naviku buvo reikšmingai mažesnis T98G-100 μ M TMZ navikų grupės. CAM storis po T98G-kontroliniais ir gydytais 50 μ M TMZ navikais nesiskyrė. Skirtingomis TMZ dozėmis gydytų T98G navikų CAM storis nesiskyrė nuo CAM storio po 3 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytais navikais. Palyginus TMZ gydytas T98G navikų grupes reikšmingų CAM storio po naviku skirtumų nenustatyta.

CAM storį po U87 naviku reikšmingai sumažino 100 μ M TMZ dozė, o po T98G naviku – gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 100 μ M TMZ.

3.3.3. U87 ir T98G ląstelių navikų neoangiogenezės ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku duomenys

Tirtų U87 ląstelių navikų kontrolinės, gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ grupių *ex ovo* iškirptos membranos su naviku apatinės pusės ir kraujagyslių tinklo apie naviką nuotraukos (EVP12), ar į CAM kraujagyslę sušvirkštus fluorescencinio dekstrano kraujagyslių tinklo nuotraukos, pateiktos 3.3.3.1 paveiksle.



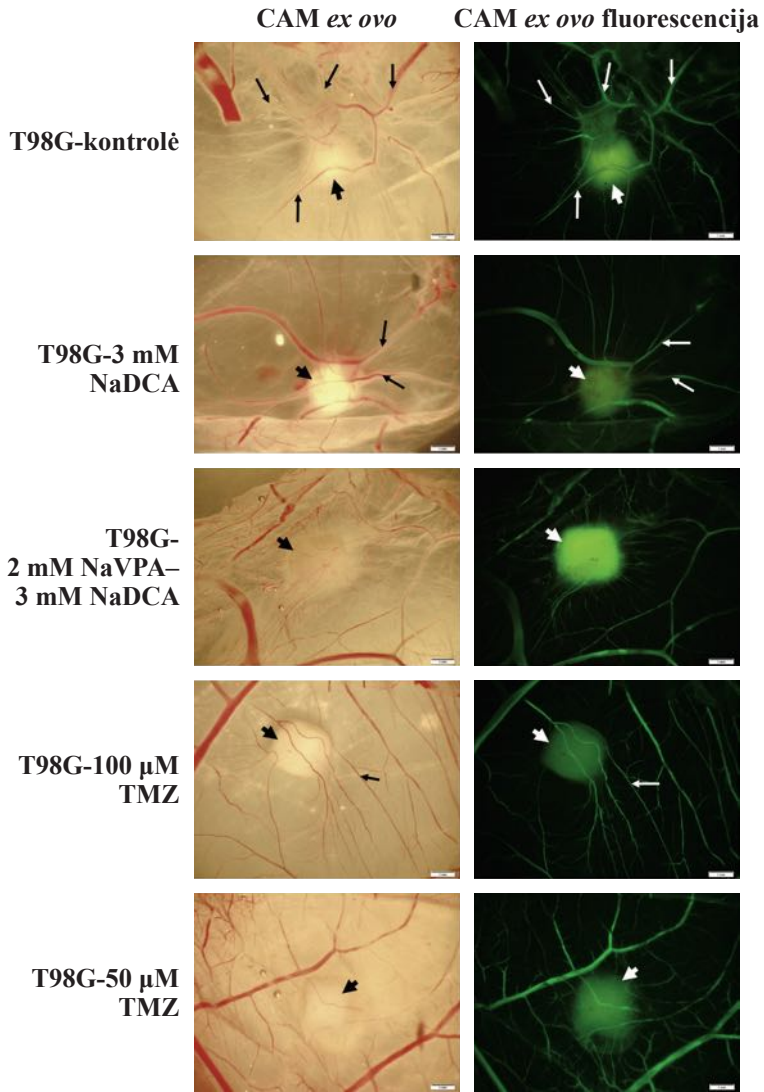
3.3.3.1 pav. U87 ląstelių navikų neoangiogenezė EVP12 tirtose grupėse (*ex ovo* CAM su naviku ir fluorescencijos nuotraukos)

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę. Skalė – 1 mm.

Ex ovo U87-kontrolinio naviko ant CAM ir fluorescencijos nuotraukose matomas navikas apsuptas radialiai susiformavusio kraujagyslių tinklo. Palyginus su kontroline grupe, U87-3 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių navikų nuotraukose kraujagyslių tinklas susiformavęs silpniau.

Palyginus su kontroline grupe, *ex ovo* U87-100 μ M TMZ ir U87-50 μ M TMZ navikų ir fluorescencijos nuotraukose kraujagyslių tinklas yra susiformavęs silpnai, tai rodo, kad gydymas TMZ slopino kraujagyslių tinklo aplink U87 navikus formavimąsi.

Tirtų T98G ląstelių navikų kontrolinės, gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ grupių EVP12 *ex ovo* apatinės membranos pusės ir kraujagyslių nuotraukos ir po fluorescencinio dekstrano sušvirkštimo į CAM kraujagyslę pateiktos 3.3.3.2 paveiksle.



3.3.3.2 pav. T98G ląstelių navikų neoangiogeneze EVP12 tirtose grupėse (ex ovo CAM su naviku ir fluorescencijos nuotraukos)

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę. Skalė – 1 mm.

Ex ovo T98G-kontrolinio ir T98G-3 mM NaDCA navikų ant CAM ir fluorescencijos nuotraukose matomas aplink naviką susiformavęs kraujagyslių tinklas, kuris T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupėje susiformavęs silpniau.

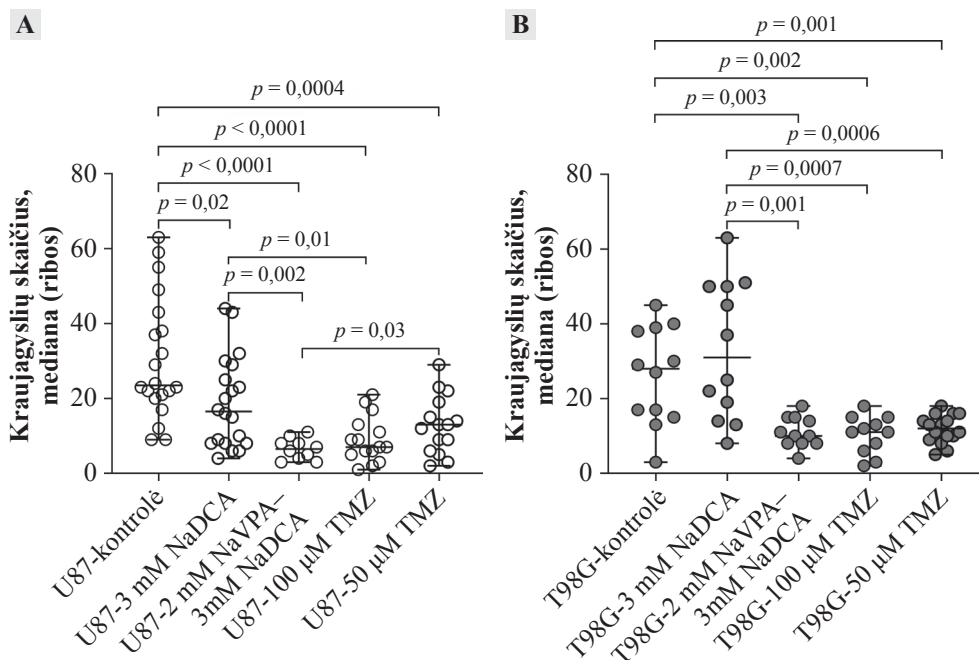
Palyginus su T98G-kontroline grupe, temozolomidu gydytų navikų *ex ovo* ir fluorescencijos nuotraukose nėra link navikų pritrauktų kraujagyslių ir radialiai besiformuojančio kraujagyslių tinklo. Tai rodo, kad T98G ląstelių gydymas 100 μ M ir 50 μ M TMZ dozėmis slopino neoangiogenezę.

3.3.3.1 lentelėje ir 3.3.3.3 paveiksle pateiktas kraujagyslių skaičius CAM po tirtais U87 ir T98G ląstelių navikais.

3.3.3.1 lentelė. U87 ir T98G ląstelių navikų kraujagyslių skaičius CAM po naviku tirtose grupėse

Tirtos grupės	Kraujagyslių skaičius (mediana (ribos))			
	<i>n</i>	U87	<i>n</i>	T98G
Kontrolė	20	23,5 (9–63) ^a	12	28 (3–45) ^g
3 mM NaDCA	20	16,5 (4–44) ^{b, c}	12	31 (8–63) ^{h, i}
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	6,5 (3–11) ^d	12	10 (4–18) ^j
100 μ M TMZ	15	7 (1–21) ^{d, e}	11	11 (2–18) ^{k, l}
50 μ M TMZ	15	13 (2–29) ^f	16	12 (5–18)

^a $p = 0,0004$, palyginus su U87-50 μ M TMZ; ^b $p = 0,02$, palyginus su U87-kontrolė; ^c $p = 0,002$, palyginus su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^d $p < 0,0001$, palyginus su U87-kontrolė; ^e $p = 0,01$, palyginus su U87-3 mM NaDCA; ^f $p = 0,03$, palyginus su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^g $p = 0,001$, palyginus su T98G-50 μ M TMZ; ^h $p = 0,0006$, palyginus su T98G-50 μ M TMZ; ⁱ $p = 0,001$, palyginus su T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^j $p = 0,003$, palyginus su T98G-kontrolė; ^k $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė; ^l $p = 0,0007$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA.



3.3.3.3 pav. U87 (A) ir T98G (B) ląstelių navikų kraujagyslių skaičius CAM po naviku tirtose grupėse

Palyginus su U87-kontroline grupe, U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupių kraujagyslių skaičius chorioalantojinėje membranoje po naviku buvo reikšmingai mažesnis. Kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupės nei U87-3 mM NaDCA – tai rodo sinerginį NaVPA ir NaDCA poveikį.

Palyginus su U87-kontroline grupe, U87-100 μM TMZ ir U87-50 μM TMZ grupių kraujagyslių skaičius CAM po naviku buvo reikšmingai mažesnis. U87-3 mM NaDCA grupės kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei U87-100 μM TMZ grupės. Palyginus U87-3 mM NaDCA ir U87-50 μM TMZ grupes, nenustatyta kraujagyslių skaičiaus pokyčių. Kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupės nei U87-50 μM TMZ, o U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA ir U87-100 μM TMZ kraujagyslių skaičius nesiskyrė. U87-100 μM TMZ ir U87-50 μM TMZ navikų grupių kraujagyslių skaičius CAM po naviku nesiskyrė.

T98G-kontrolinės ir T98G-3 mM NaDCA navikų grupių kraujagyslių skaičius CAM po naviku nesiskyrė. Kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės nei T98G-kontrolinės. Kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nei T98G-3 mM NaDCA grupės – tai rodo sinerginį NaVPA ir NaDCA poveikį.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, kraujagyslių skaičius CAM po naviku buvo reikšmingai mažesnis T98G-100 μ M ir T98G-50 μ M TMZ grupėse. Palyginus su T98G-3 mM NaDCA, kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-100 μ M ir T98G-50 μ M TMZ grupėse. 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir TMZ gydytų T98G ląstelių grupių kraujagyslių skaičius membranoje po naviku nesiskyrė. Palyginus skirtingomis TMZ dozėmis gydytas T98G navikų grupes, reikšmingų kraujagyslių skaičius CAM po naviku skirtumų nenustatyta.

Nustatytas NaVPA–NaDCA ir skirtingų TMZ dozių poveikio U87 ir T98G navikų neoangiogenezei panašumas: U87 ir T98G grupių kraujagyslių tinklo raišką CAM po naviku slopino 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M dozės. U87 ir T98G navikų gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA deriniu reikšmingai sumažino kraujagyslių skaičių CAM po naviku, bet tokio poveikio nesukėlė 3 mM NaDCA – tai rodo sinerginį NaVPA ir NaDCA poveikį. Skirtingų TMZ dozių poveikis kraujagyslių tinklo raiškai po U87 ir T98G navikais nesiskyrė. TMZ poveikis kraujagyslių skaičiui CAM po U87 ir T98G navikais nesiskyrė nuo NaVPA–NaDCA poveikio. Kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nei U87-50 μ M TMZ, tai rodo derinio geresnį veiksmingumą nei TMZ, gydant U87 navikus ant CAM.

3.4. NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA, p53 ir EZH2 raiškai tyrimų duomenys

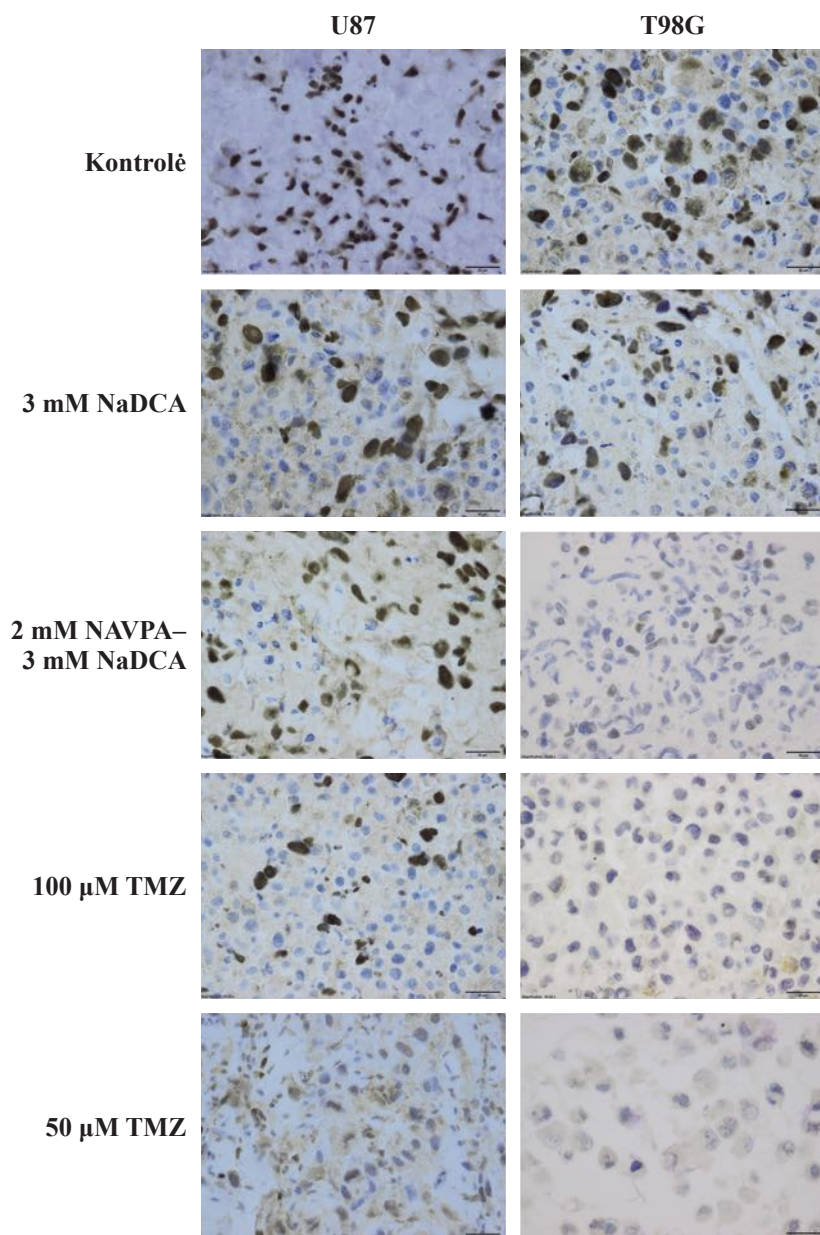
3.4.1. NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA raiškai duomenys

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ grupių PLBA-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.4.1.1 lentelėje, 3.4.1.1 ir 3.4.1.2 paveiksluose.

3.4.1.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų grupių PLBA-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

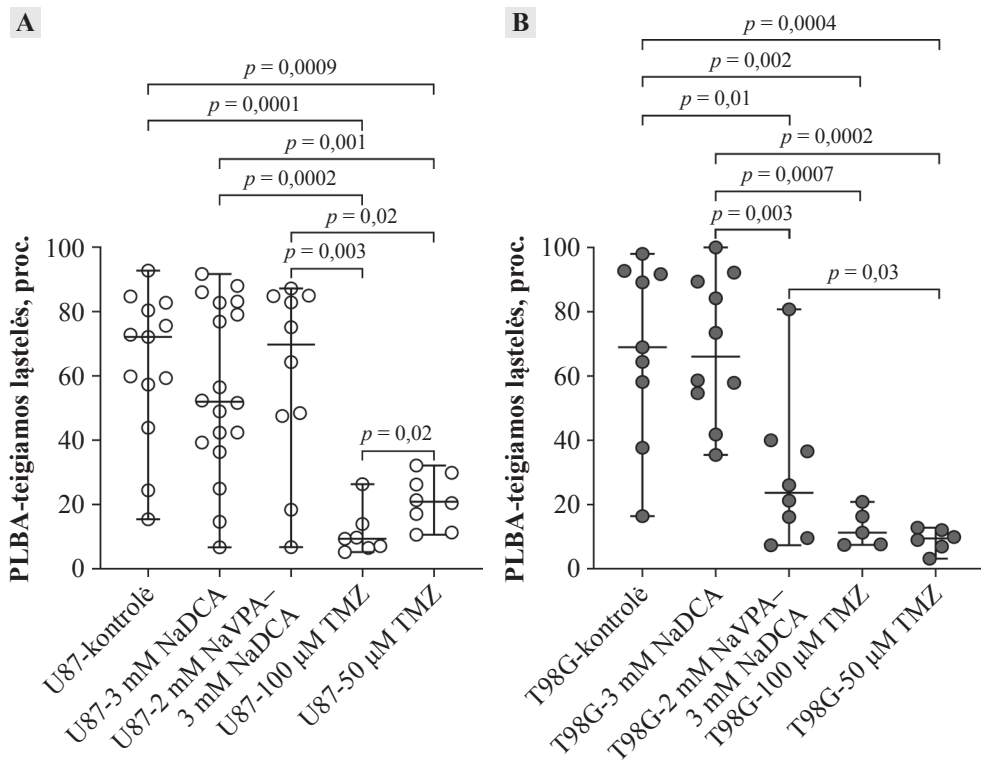
Tirtos grupės	PLBA-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	<i>n</i>	U87	<i>n</i>	T98G
Kontrolė	13	72,12 (15,44–92,73)	9	68,95 (16,41–98,04)
3 mM NaDCA	18	51,95 (6,67–91,67)	10	66,03 (35,43–100,0)
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	10	69,71 (6,73–87,18) ^a	8	23,63 (7,34–80,75) ^{g, h}
100 μ M TMZ	7	9,33 (5,22–26,32) ^{a, b, c, d}	5	11,22 (7,44–20,83) ^{i, j}
50 μ M TMZ	8	20,89 (10,59–32,13) ^{e, f}	6	9,43 (3,17–12,77) ^{k, l, m}

^a $p = 0,02$, palyginus su U87-50 μ M TMZ; ^b $p = 0,003$, palyginus su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^c $p = 0,0001$, palyginus su U87-kontrolė; ^d $p = 0,0002$, palyginus su U87-3 mM NaDCA; ^e $p = 0,0009$, palyginus su U87-kontrolė; ^f $p = 0,001$, palyginus su U87-3 mM NaDCA; ^g $p = 0,01$, palyginus su T98G-kontrolė; ^h $p = 0,003$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA; ⁱ $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė; ^j $p = 0,0007$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA; ^k $p = 0,0004$, palyginus su T98G-kontrolė; ^l $p = 0,0002$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA; ^m $p = 0,03$, palyginus su T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.4.1.1 pav. U87 ir T98G ląstelių navikų PLBA raiška tirtose grupėse

Rudos spalvos branduoliai nurodo PLBA-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μm.



3.4.1.2 pav. U87 (A) ir T98G (B) ląstelių navikų ant CAM procentinė PLBA-teigiamų ląstelių raiška tirtose grupėse

U87-kontrolinės, U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupių navikų PLBA-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė.

Palyginus su U87-kontroline grupe, PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87-100 µM TMZ ir U87-50 µM TMZ grupėse; ir žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė 100 µM ir 50 µM TMZ gydytų navikų nei U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA. Palyginus U87-100 µM TMZ ir U87-50 µM TMZ navikus, nustatyta, kad PLBA-teigiamų ląstelių raiška buvo reikšmingai mažesnė navikų, gydytų 100 µM TMZ.

T98G-kontrolinių ir T98G-3 mM NaDCA navikų PLBA-teigiamų ląstelių raiška nesiskyrė. PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupės nei T98G-kontrolinės. PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA nei T98G-3 mM NaDCA.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-100 μM ir T98G-50 μM TMZ navikuose. Palyginus su T98G-3 mM NaDCA, PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-100 μM ir T98G-50 μM TMZ grupėse. T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikuose nustatyta reikšmingai didesnė PLBA raiška nei T98G-50 μM TMZ. T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir T98G-100 μM TMZ navikų PLBA raiška nesiskyrė. Palyginus skirtingomis TMZ dozėmis gydytas T98G navikų grupes, reikšmingų PLBA raiškos skirtumų nenustatyta.

Nustatyti NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G navikų PLBA raiškai skirtumai: U87 navikų PLBA-teigiamų ląstelių skaičių slopino abi tirtos TMZ dozės, T98G navikų – 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μM TMZ ir 50 μM TMZ. T98G navikų gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA deriniu reikšmingai sumažino PLBA raišką, bet tokio poveikio nesukėlė 3 mM NaDCA – tai rodo sinerginį NaVPA ir NaDCA poveikį. Skirtingų TMZ dozių poveikis PLBA-teigiamų ląstelių skaičiui T98G navikuose nesiskyrė.

3.4.2. NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų p53 raiškai duomenys

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μM TMZ ir 50 μM TMZ grupių p53-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.4.2.1 lentelėje, 3.4.2.1 ir 3.4.2.2 paveiksluose.

3.4.2.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų grupių p53-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

Tirtos grupės	p53-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	<i>n</i>	U87	<i>n</i>	T98G
Kontrolė	15	63,58 (1,81–83,44) ^a	9	84,52 (47,57–94,23) ^f
3 mM NaDCA	20	57,04 (27,48–84,39) ^b	11	82,42 (12,75–95,21) ^g
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	10	50,70 (11,41–88,89) ^{a, c}	8	64,21 (25,29–94,59) ^h
100 μM TMZ	8	8,29 (1,14–40,00)	5	22,90 (12,64–34,10) ⁱ
50 μM TMZ	7	13,07 (10,40–23,17) ^{d, e}	7	50,53 (34,09–83,38) ^j

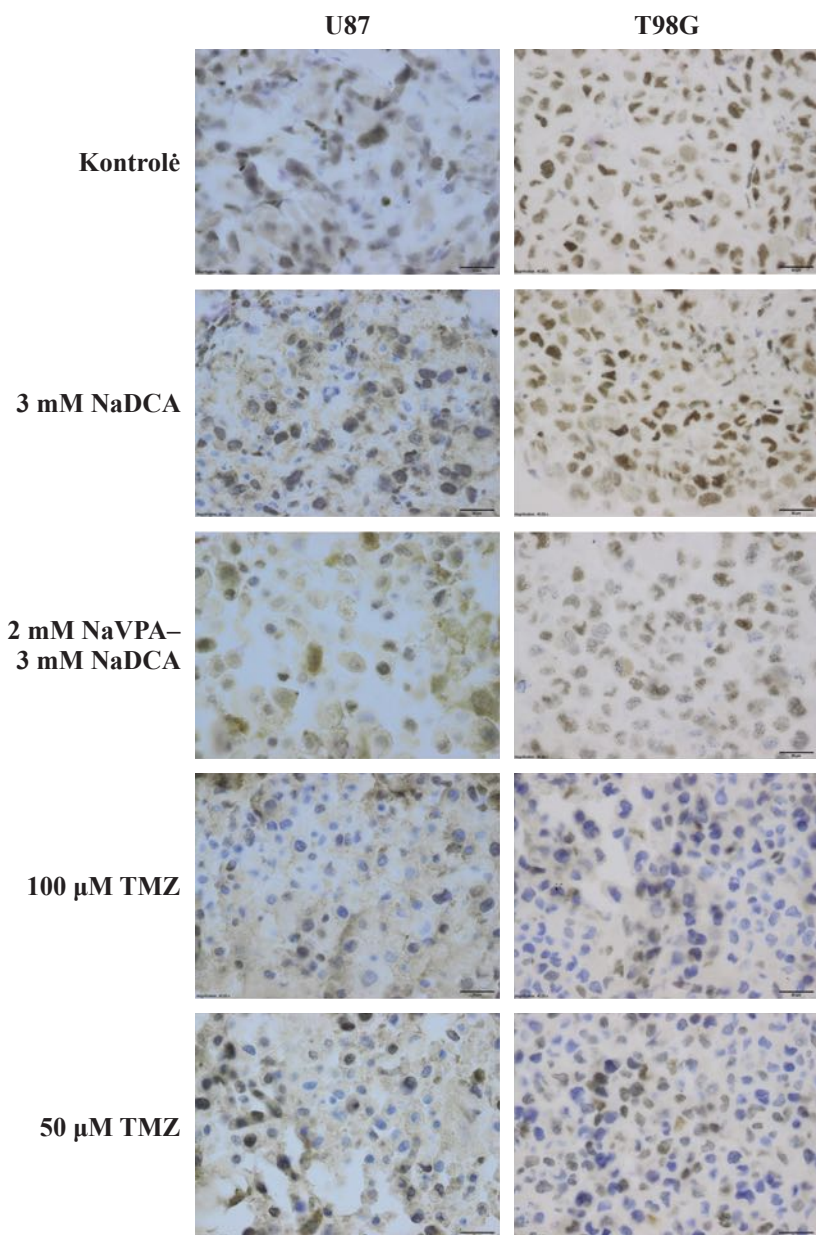
^a $p = 0,003$, palyginus su U87-100 μM TMZ; ^b $p < 0,0001$, palyginus su U87-100 μM TMZ;

^c $p = 0,01$, palyginus su U87-50 μM TMZ; ^d $p < 0,0001$, palyginus su U87-3 mM NaDCA;

^e $p = 0,009$, palyginus su U87-kontrolė; ^f $p = 0,0004$, palyginus su T98G-100 μM TMZ;

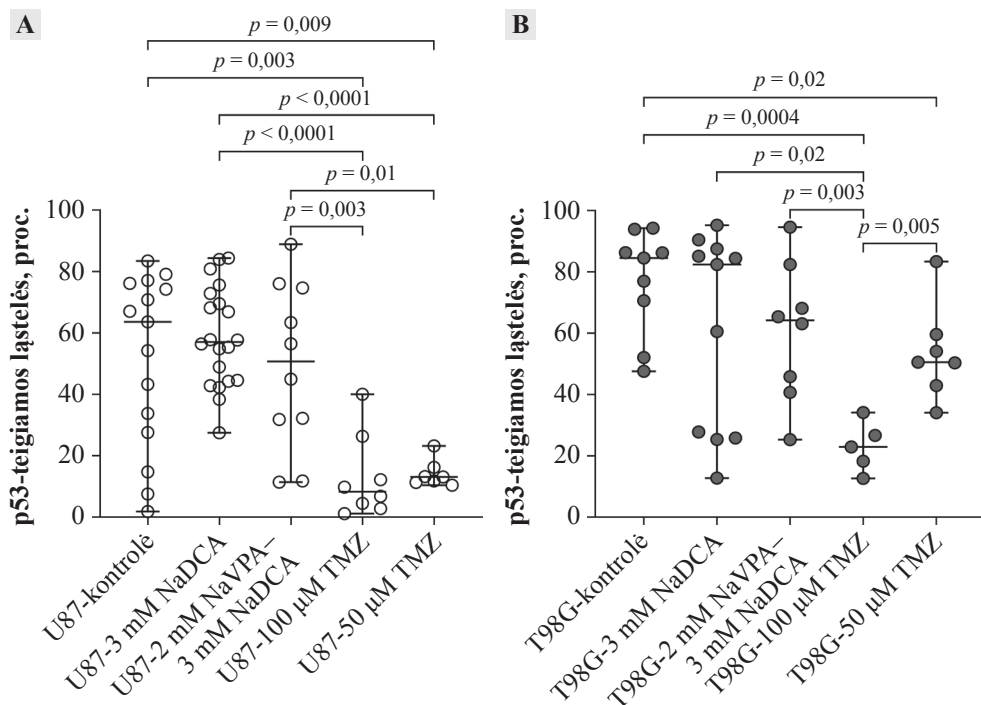
^g $p = 0,02$, palyginus su T98G-100 μM TMZ; ^h $p = 0,003$, palyginus su T98G-100 μM TMZ;

ⁱ $p = 0,005$, palyginus su T98G-50 μM TMZ; ^j $p = 0,02$, palyginus su T98G-kontrolė.



3.4.2.1 pav. U87 ir T98G ląstelių navikų p53 raiška tirtose grupėse

Rudos spalvos branduoliai nurodo p53-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μm.



3.4.2.2 pav. U87 (**A**) ir T98G (**B**) ląstelių navikų ant CAM procentinė p53-teigiamų ląstelių raiška tirtose grupėse

U87-kontrolinės, U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupių p53-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė.

Palyginus su U87-kontroline grupe, p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87-100 µM TMZ ir U87-50 µM TMZ navikų grupių; žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė 100 µM ir 50 µM TMZ gydytų U87 navikų nei U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA. Palyginus skirtingomis TMZ dozėmis gydytas U87 navikų grupes, reikšmingų p53 raiškos skirtumų nenustatyta.

T98G-kontrolinės, T98G-3 mM NaDCA ir T98G-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupių p53-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87-100 µM TMZ ir U87-50 µM TMZ grupėse; žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė 100 µM gydytų T98G navikų nei T98G-3 mM NaDCA ir T98G-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA. Palyginus T98G-100 µM TMZ ir T98G-50 µM TMZ navikus, nustatyta, kad p53-teigiamų ląstelių raiška buvo reikšmingai mažesnė navikų, gydytų 100 µM TMZ.

Palyginus U87 ir T98G navikų ant CAM p53 raišką po gydymo tiriamaisiais preparatais, nustatyta gydymo poveikio priklausomybė nuo ląstelių linijos: U87 ir T98G navikų raišką slopino abi tirtos TMZ dozės, bet 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA tokio poveikio U87 navikams nesukėlė, o T98G navikų gydymo poveikis 50 µM TMZ p53-teigiamų ląstelių skaičiui nesiskyrė nuo gydytų NaVPA–NaDCA deriniu.

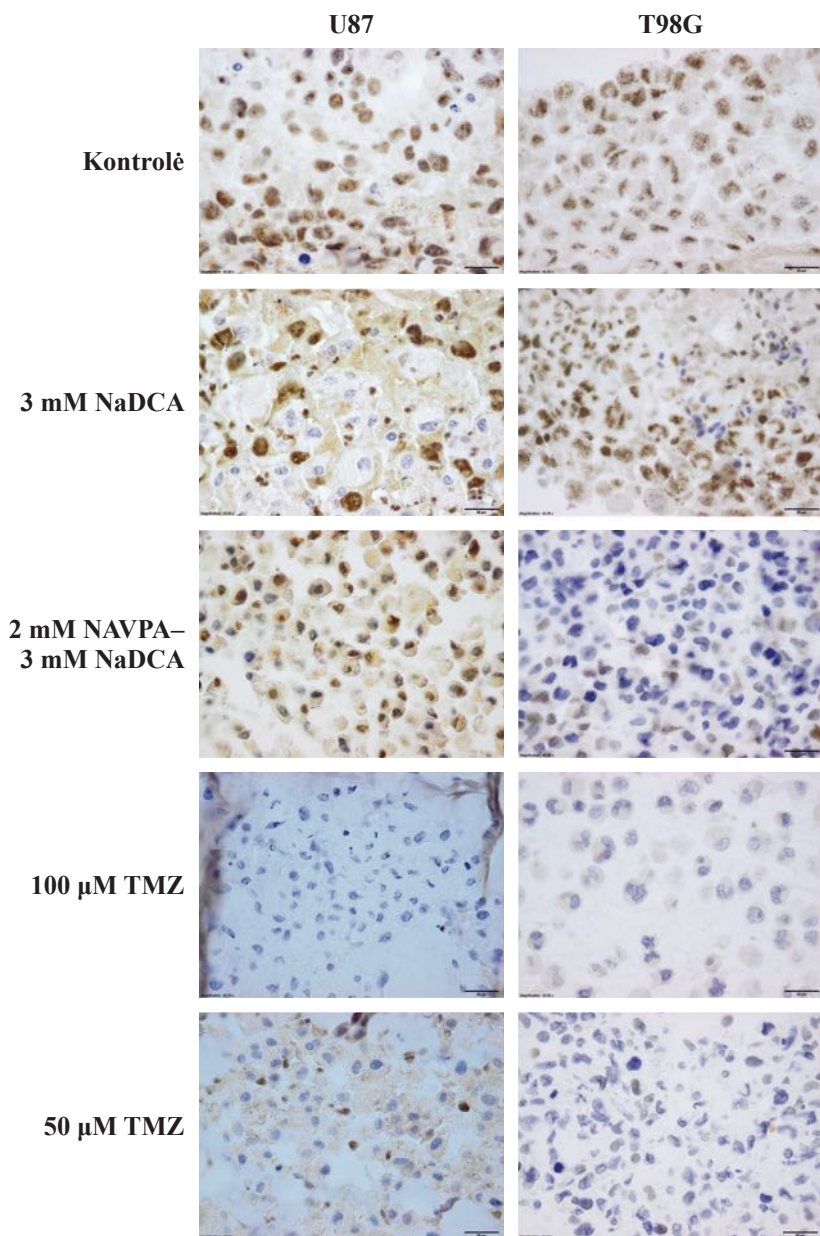
3.4.3. NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų EZH2 raiškai duomenys

Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų ant CAM kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 µM TMZ ir 50 µM TMZ grupių EZH2-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.4.3.1 lentelėje, 3.4.3.1 ir 3.4.3.2 paveiksluose.

3.4.3.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių navikų grupių EZH2-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

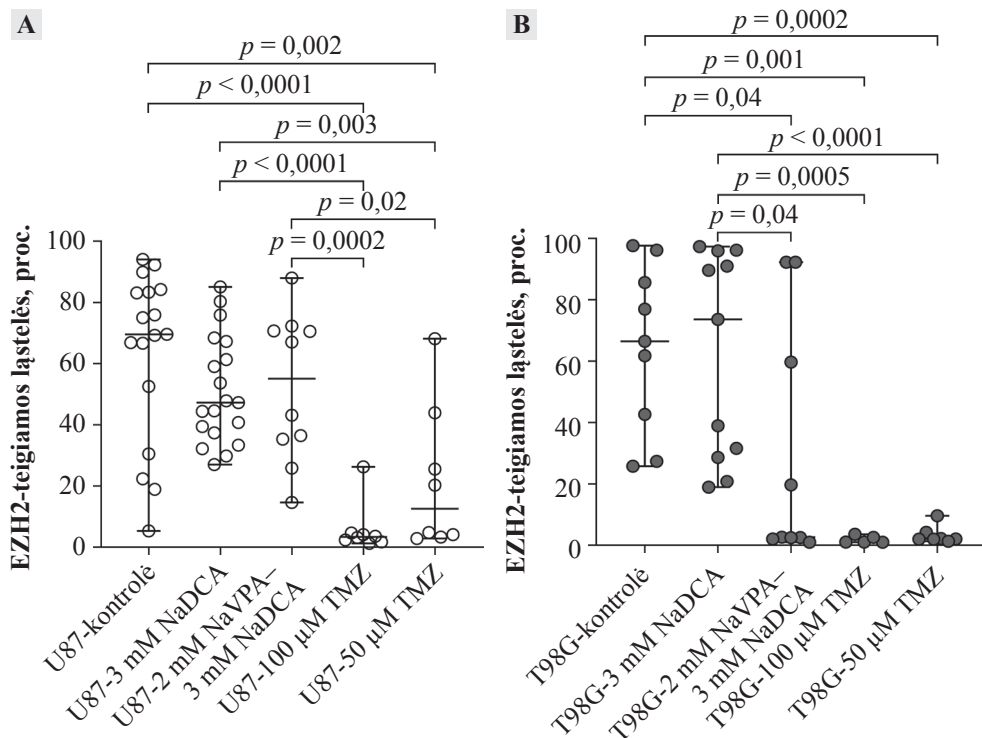
Tirtos grupės	EZH2-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	<i>n</i>	U87	<i>n</i>	T98G
Kontrolė	17	69,57 (5,34–94,06) ^a	9	66,47 (25,74–97,65) ^f
3 mM NaDCA	19	47,23 (26,98–85,05) ^a	11	73,59 (18,90–97,35) ^{f, g}
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	10	55,07 (14,62–87,96) ^b	9	2,60 (0,98–92,23)
100 µM TMZ	8	3,36 (1,23–26,26) ^c	5	1,04 (0,99–3,59) ^{h, i}
50 µM TMZ	8	12,55 (2,84–68,12) ^{d, e}	7	2,02 (1,31–9,59) ^j

^a $p < 0,0001$, palyginus su U87-100 µM TMZ; ^b $p = 0,02$, palyginus su U87-50 µM TMZ; ^c $p = 0,0002$, palyginus su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^d $p = 0,002$, palyginus su U87-kontrolė; ^e $p = 0,003$, palyginus su U87-3 mM NaDCA; ^f $p = 0,04$, palyginus su T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^g $p < 0,0001$, palyginus su T98G-50 µM TMZ; ^h $p = 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė; ⁱ $p = 0,0005$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA; ^j $p = 0,0002$, palyginus su T98G-kontrolė.



3.4.3.1 pav. U87 ir T98G ląstelių navikų EZH2 raiška tirtose grupėse

Rudos spalvos branduoliai nurodo EZH2-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μm.



3.4.3.2 pav. U87 (A) ir T98G (B) ląstelių navikų ant CAM procentinė EZH2-teigiamų ląstelių raiška tirtose grupėse

U87-kontrolinių, U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA navikų EZH2-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė.

Palyginus su U87-kontroline grupe, U87-100 μM TMZ ir U87-50 μM TMZ navikų grupių EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis; žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė 100 μM ir 50 μM TMZ gydytų U87 navikų nei U87-3 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA navikų grupių. Palyginus skirtingomis TMZ dozėmis gydytas U87 ląstelių navikų grupes, reikšmingų EZH2 raiškos skirtumų nenustatyta.

T98G-kontrolinių ir T98G-3 mM NaDCA navikų EZH2-teigiamų ląstelių raiška nesiskyrė. EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA grupės nei T98G-kontrolinės. EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA nei T98G-3 mM NaDCA.

Palyginus su T98G-kontroline grupe, EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-100 μM ir T98G-50 μM TMZ grupėse; žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė 100 μM ir 50 μM TMZ gydytų T98G navikų nei T98G-3 mM NaDCA. TMZ gydytų T98G navikų ir T98G-

2 mM NaVPA–3 mM NaDCA EZH2 raiška nesiskyrė. Palyginus skirtingomis TMZ dozėmis gydytas T98G navikų grupes, reikšmingų EZH2 raiškos skirtumų nenustatyta.

Nustatyti NaVPA–NaDCA ir tirtų TMZ dozių poveikio U87 ir T98G ląstelių navikų EZH2 raiškai skirtumai: U87 navikų EZH2-teigiamų ląstelių skaičių slopino abi TMZ dozės, T98G navikų – 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ. T98G navikų gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA deriniu reikšmingai sumažino EZH2 raišką, bet tokio poveikio nesukėlė 3 mM NaDCA – tai rodo sinerginį NaVPA ir NaDCA poveikį. Skirtingų TMZ dozių poveikis EZH2-teigiamų ląstelių skaičiui T98G ir U87 navikuose nesiskyrė.

3.5. NaDCA, NaVPA–NaDCA ir TMZ poveikis U87 ir T98G ląstelių genų raiškai: *in vitro* palyginamųjų tyrimų duomenys

3.5.1. Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių *SLC12A2* raiškai

Tirtų U87 ir T98G ląstelių kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 50 μ M TMZ grupių *SLC12A2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.1.1 lentelėje ir 3.5.1.1 paveiksle.

3.5.1.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių grupių *SLC12A2* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{−ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		SLC12A2	GAPDH			
U87-kontrolė	6	22,07 ± 1,23	18,14 ± 1,41	3,93 ± 0,64		
U87-3 mM NaDCA	6	23,13 ± 0,33	18,92 ± 1,51	4,21 ± 1,22 ^a	0,29	0,82
U87-1,5 mM NaDCA	6	22,12 ± 0,68	17,58 ± 1,57	4,54 ± 1,92	0,61	0,66
U87-2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	22,71 ± 0,31	18,85 ± 0,20	3,86 ± 0,27	−0,07	1,05
U87-50 μM TMZ	6	21,67 ± 0,18	17,21 ± 0,19	4,46 ± 0,30	0,53	0,69

3.5.1.1 lentelės tęsinys

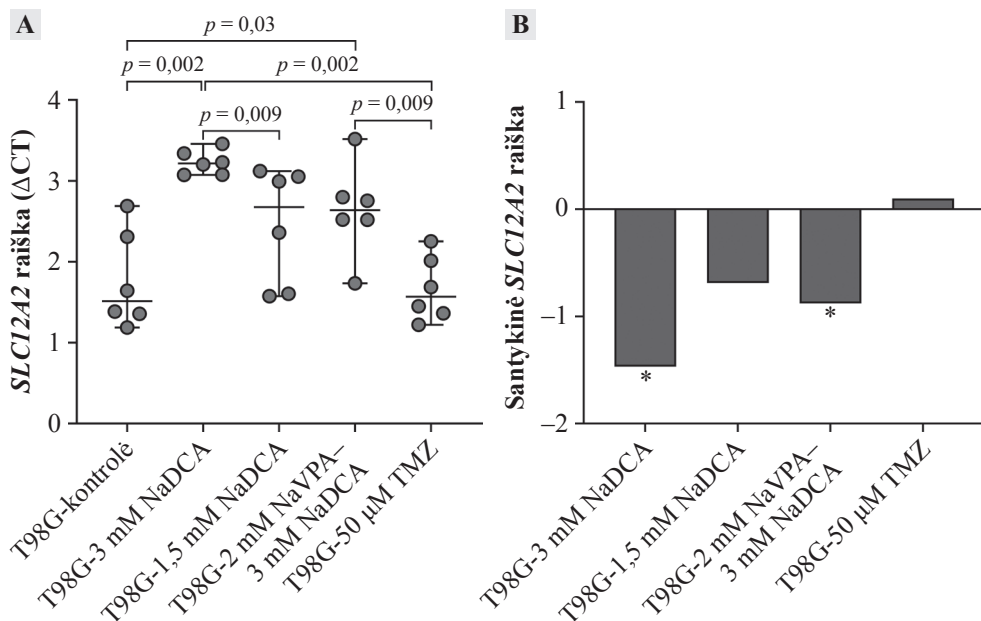
Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{−ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
T98G-kontrolė	6	21,63 ± 0,60	19,87 ± 0,23	1,76 ± 0,60 ^b		
T98G-3 mM NaDCA	6	22,01 ± 0,65	18,78 ± 0,63	3,23 ± 0,15 ^{c,d}	1,47	0,36
T98G-1,5 mM NaDCA	6	21,72 ± 0,35	19,27 ± 0,74	2,45 ± 0,72 ^e	0,69	0,62
T98G-2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	20,99 ± 0,49	18,35 ± 0,24	2,64 ± 0,58 ^{f,g}	0,88	0,54
T98G-50 μM TMZ	6	22,84 ± 0,80	21,18 ± 1,16	1,66 ± 0,40 ^{h,i,j}	−0,10	1,07

^a $p = 0,03$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA; ^b $p = 0,002$, palyginus su U87-kontrolė; ^c $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė; ^d $p = 0,009$, palyginus su T98G-1,5 mM NaDCA; ^e $p = 0,03$, palyginus su U87-1,5 mM NaDCA; ^f $p = 0,004$, palyginus su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^g $p = 0,03$, palyginus su T98G-kontrolė; ^h $p = 0,002$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA; ⁱ $p = 0,009$, palyginus su T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^j $p = 0,002$, palyginus su U87-50 μ M TMZ.

U87 ląstelių kontrolinės grupės *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai mažesnė nei T98G ląstelių kontrolinės.

U87-kontrolinės, U87-3 mM NaDCA, U87-1,5 mM NaDCA ir U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių *SLC12A2* raiška nesiskyrė.

U87-kontrolinės ir U87-50 μ M TMZ grupių *SLC12A2* raiška nesiskyrė.



3.5.1.1 pav. Tirtų T98G ląstelių grupių $SLC12A2$ raiška

A – tirtų T98G ląstelių $SLC12A2$ raiška, **B** – gydytų T98G ląstelių grupių santykinė $SLC12A2$ raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$); ilgas horizontalus brūkšnys – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

$SLC12A2$ raiška buvo reikšmingai mažesnė T98G-3 mM NaDCA ir T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių nei T98G-kontrolinės. T98G-3 mM NaDCA ir T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių $SLC12A2$ raiška nesiskyrė. Palyginus T98G-3 mM NaDCA ir T98G-1,5 mM NaDCA grupes, nustatyta, kad $SLC12A2$ raiška buvo reikšmingai mažesnė ląstelių, gydytų 3 mM NaDCA.

T98G-kontrolinės ir T98G-50 μM TMZ grupių $SLC12A2$ raiška nesiskyrė; žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė 3 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM gydytų T98G ląstelių nei T98G-50 μM TMZ.

Palyginus U87 ir T98G ląstelių $SLC12A2$ raišką po gydymo tiriamaisiais preparatais, nustatyta gydymo poveikio priklausomybė nuo ląstelių linijos. Tirtų U87 ląstelių grupių $SLC12A2$ raiška buvo reikšmingai mažesnė nei atitinkamų T98G ląstelių grupių: T98G-3 mM NaDCA, T98G-1,5 mM NaDCA, T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir T98G-50 μM TMZ.

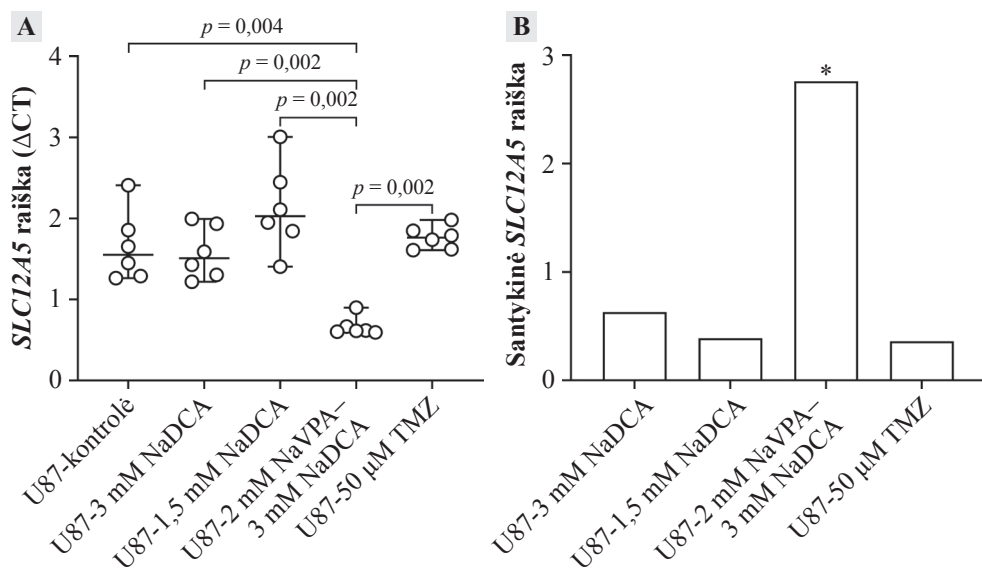
3.5.2. Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių *SLC12A5* raiškai

Tirtų U87 ir T98G ląstelių kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 50 µM TMZ grupių *SLC12A5* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.2.1 lentelėje ir 3.5.2.1 paveiksle.

3.5.2.1 lentelė. Tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A5* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		<i>SLC12A5</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-kontrolė	6	33,79 ± 1,21	16,25 ± 0,26	17,54 ± 1,07 ^a		
U87-3 mM NaDCA	6	33,93 ± 1,55	16,70 ± 0,66	17,23 ± 0,98 ^a	-0,31	1,55
U87-1,5 mM NaDCA	6	34,02 ± 1,09	15,92 ± 1,04	18,10 ± 1,82 ^a	0,57	1,31
U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	31,42 ± 0,22	16,31 ± 0,89	15,12 ± 0,87	-2,42	6,79
U87-50 μM TMZ	6	32,41 ± 0,15	15,21 ± 0,16	17,20 ± 0,25 ^b	-0,33	1,28
T98G-kontrolė	6	37,31 ± 0,46	17,41 ± 0,22	–		
T98G-3 mM NaDCA	6	37,14 ± 0,24	16,63 ± 0,63	–	–	–
T98G-1,5 mM NaDCA	6	37,59 ± 0,87	16,90 ± 0,71	–	–	–
T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	33,50 ± 0,36	16,80 ± 2,00	16,70 ± 2,12	–	–
T98G-50 μM TMZ	6	37,53 ± 0,05	19,16 ± 2,39	–	–	–

^a $p = 0,004$, palyginus su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^b $p = 0,002$, palyginus su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.5.2.1 pav. Tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A5* raiška

A – tirtų U87 ląstelių *SLC12A5* raiška, **B** – gydytų U87 ląstelių grupių santykinė *SLC12A5* raiška ($\log_2(2^{-\Delta CT})$); ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

U87-kontrolinės, U87-3 mM NaDCA ir U87-1,5 mM NaDCA grupių *SLC12A5* raiška nesiskyrė. *SLC12A5* raiška buvo reikšmingai didesnė U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės nei U87-kontrolinės. Palyginus gydytų NaDCA U87 ląstelių grupes su U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ląstelėmis, nustatyta, kad *SLC12A5* raiška buvo reikšmingai didesnė ląstelių, gydytų deriniu.

U87-kontrolinės ir U87-50 μM TMZ grupių *SLC12A5* raiška nesiskyrė; žymens geno raiška buvo reikšmingai didesnė 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų U87 ląstelių nei U87-50 μM TMZ.

Tirtų T98G-kontrolinių, gydytų skirtingomis NaDCA dozėmis ir 50 μM TMZ ląstelių *SLC12A5* raiškos nenustatyta. *SLC12A5* raiška nustatyta tik T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės ląstelėse – gydymas deriniu aktyvino geno raišką.

Palyginus U87 ir T98G ląstelių *SLC12A5* raišką po gydymo tiriamaisiais preparatais, nustatyta gydymo poveikio priklausomybė nuo ląstelių linijos. *SLC12A5* raiška buvo nustatyta U87-kontrolinių, U87-3 mM NaDCA, U87-1,5 mM NaDCA ir U87-50 μM TMZ ląstelių grupių, o atitinkamos T98G ląstelių grupės *SLC12A5* raiškos buvo nenustatyta (raiška neišreikšta). Palyginus gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA U87 ląstelių raišką su atitinkama T98G ląstelių grupe, *SLC12A5* raiška buvo didesnė U87 ląstelių.

3.5.3. Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių *SLC5A8* raiškai

Tirtų U87 ir T98G ląstelių kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 50 μ M TMZ grupių *SLC5A8* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.3.1 lentelėje.

3.5.3.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių grupių *SLC5A8* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	Rodiklis, vidurkis $\pm$ SN					
	CT			Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
	<i>n</i>	<i>SLC5A8</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-kontrolė	6	raiškos nėra	16,25 $\pm$ 0,26	–		
U87-3 mM NaDCA	6	raiškos nėra	16,70 $\pm$ 0,66	–	–	–
U87-1,5 mM NaDCA	6	raiškos nėra	15,92 $\pm$ 1,04	–	–	–
U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	33,39 $\pm$ 0,36	16,31 $\pm$ 0,89	17,09 $\pm$ 0,95	–	–
U87-50 μ M TMZ	6	raiškos nėra	15,21 $\pm$ 0,16	–	–	–
T98G-kontrolė	6	raiškos nėra	17,41 $\pm$ 0,22	–		
T98G-3 mM NaDCA	6	raiškos nėra	16,63 $\pm$ 0,63	–	–	–
T98G-1,5 mM NaDCA	6	raiškos nėra	16,90 $\pm$ 0,71	–	–	–
T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	35,99 $\pm$ 0,76	16,80 $\pm$ 2,00	–	–	–
T98G-50 μ M TMZ	6	raiškos nėra	19,16 $\pm$ 2,39	–	–	–

U87-kontrolinių, U87-3 mM NaDCA, U87-1,5 mM NaDCA ir U87-50 μ M TMZ ląstelių *SLC5A8* raiška buvo neišreikšta (buvo nenustatyta). *SLC5A8* raiška nustatyta tik U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės ląstelėse – gydymas deriniu aktyvino geno raišką.

T98G-kontrolinių ir gydytų NaDCA, NaVPA–NaDCA ar TMZ ląstelių *SLC5A8* geno raiškos nebuvo – genas buvo neaktyvus.

3.5.4. Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių *CDH1* raiškai

Tirtų U87 ir T98G ląstelių kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 50 μ M TMZ grupių *CDH1* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.4.1 lentelėje.

3.5.4.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių grupių *CDH1* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	Rodiklis, vidurkis $\pm$ SN					
	CT			Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
	<i>n</i>	<i>CDH1</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-kontrolė	6	36,21 $\pm$ 0,49	16,25 $\pm$ 0,26	–		
U87-3 mM NaDCA	6	36,99 $\pm$ 0,04	16,70 $\pm$ 0,66	–	–	–
U87-1,5 mM NaDCA	6	37,90 $\pm$ 0,72	15,92 $\pm$ 1,04	–	–	–
U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	35,37 $\pm$ 0,79	16,31 $\pm$ 0,89	–	–	–
U87-50 μ M TMZ	6	35,93 $\pm$ 0,60	15,21 $\pm$ 0,16	–	–	–
T98G-kontrolė	6	raiškos nėra	17,41 $\pm$ 0,22	–		
T98G-3 mM NaDCA	6	35,04 $\pm$ 0,27	16,63 $\pm$ 0,63	–	–	–
T98G-1,5 mM NaDCA	6	35,31 $\pm$ 0,35	16,90 $\pm$ 0,71	–	–	–
T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	34,27 $\pm$ 0,43	16,80 $\pm$ 2,00	17,04 $\pm$ 2,49	–	–
T98G-50 μ M TMZ	6	raiškos nėra	19,16 $\pm$ 2,39	–	–	–

Tirtų U87-kontrolinių, gydytų skirtingomis NaDCA dozėmis ir 50 μ M TMZ ląstelių *CDH1* raiškos nenustatyta. Po gydymo deriniu, daliai U87 ląstelių nustatyta *CDH1* raiška: iš šešių tirtų atvejų, keturiais atvejais CT > 35 (raiškos nėra), o dviejų mėginių raiška buvo nustatoma – CT < 35 (CT = 34,23 ir CT = 34,39) – tai rodo tendenciją, kad gydymas deriniu gali aktyvinti geną.

Tirtų T98G-kontrolinių, gydytų 50 μ M TMZ ląstelių *CDH1* raiškos nenustatyta. T98G ląsteles paveikus 3 mM NaDCA, nustatytas poveikis *CDH1* raiškai: iš šešių tirtų atvejų, trijų atvejų CT > 35 (nėra raiškos), o trijų

raiška nustatoma – $CT < 35$ ($CT = 34,68$, $CT = 34,80$ ir $CT = 34,92$); T98G ląstelės paveikus 1,5 mM NaDCA, iš šešių tirtų atvejų, penkių atvejų $CT > 35$ (nėra raiškos), o vieno mėginio raiška buvo nustatoma – $CT < 35$ ($CT = 34,80$). *CDH1* raiška nustatyta T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės ląstelėse – gydymas deriniu aktyvino geno raišką.

3.5.5. Tirtų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G ląstelių *CDH2* raiškai

Tirtų U87 ir T98G ląstelių kontrolinių, gydytų 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 50 μ M TMZ grupių *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.5.1 lentelėje ir 3.5.5.1 paveiksle.

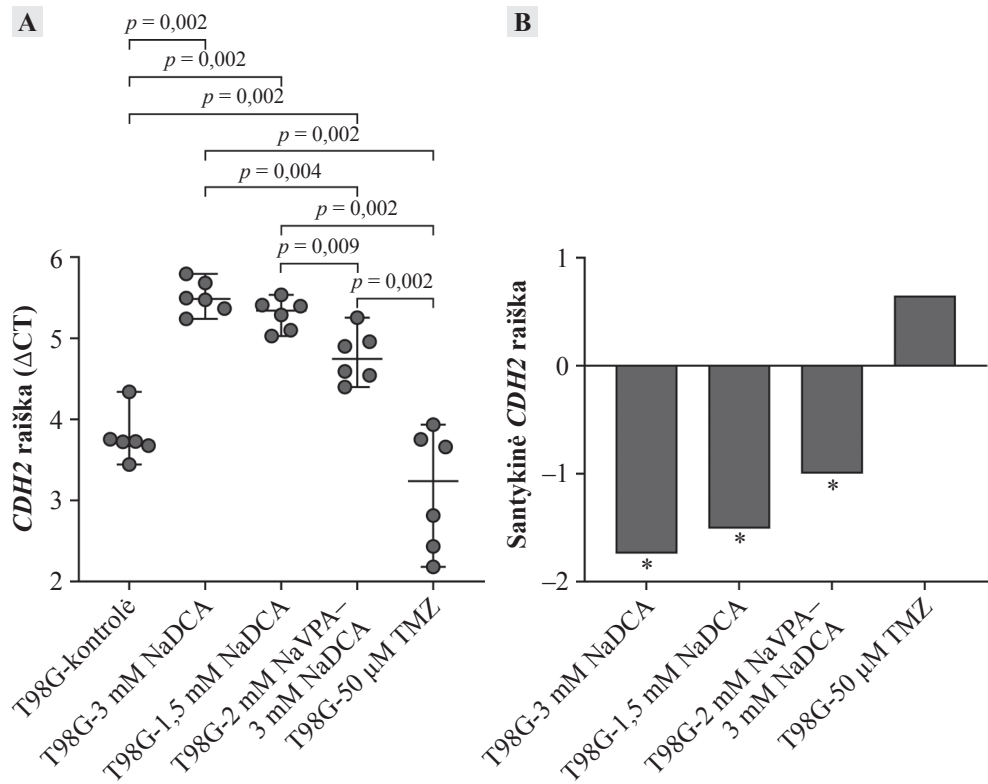
3.5.5.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G ląstelių grupių *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{−ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		CDH2	GAPDH			
U87-kontrolė	6	23,83 ± 0,72	18,14 ± 1,41	5,68 ± 1,26 ^a		
U87-3 mM NaDCA	6	23,53 ± 0,82	18,92 ± 1,51	4,62 ± 0,71	−1,07	2,09
U87-1,5 mM NaDCA	6	23,74 ± 1,37	17,58 ± 1,57	6,16 ± 1,46	0,47	0,72
U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	23,88 ± 0,28	18,85 ± 0,20	5,03 ± 0,31	−0,66	1,58
U87-50 μM TMZ	6	22,52 ± 0,13	17,21 ± 0,19	5,32 ± 0,28 ^b	−0,37	1,29
T98G-kontrolė	6	23,64 ± 0,22	19,87 ± 0,23	3,78 ± 0,30		
T98G-3 mM NaDCA	6	24,29 ± 0,59	18,78 ± 0,63	5,51 ± 0,20 ^{a, b}	1,73	0,30
T98G-1,5 mM NaDCA	6	24,57 ± 0,57	19,27 ± 0,74	5,29 ± 0,20 ^{a, b, c}	1,51	0,35
T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	6	23,13 ± 0,45	18,35 ± 0,24	4,77 ± 0,32 ^{a, b, d}	1,00	0,50
T98G-50 μM TMZ	6	24,31 ± 0,46	21,18 ± 1,16	3,13 ± 0,75	−0,65	1,57

^a $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė; ^b $p = 0,002$, palyginus su T98G-50 μ M TMZ; ^c $p = 0,009$, palyginus su T98G-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^d $p = 0,004$, palyginus su T98G-3 mM NaDCA.

U87 ląstelių kontrolinės grupės *CDH2* raiška buvo reikšmingai mažesnė nei T98G ląstelių kontrolinės.

U87-kontrolinės, U87-3 mM NaDCA, U87-1,5 mM NaDCA, U87-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir U87-50 μ M TMZ grupių *CDH2* raiška nesiskyrė, t. y. gydymas tiriamaisiais preparatais nesukėlė poveikio U87 ląstelių *CDH2* raiškai.



3.5.5.1 pav. Tirtų T98G ląstelių grupių *CDH2* raiška

A – tirtų T98G ląstelių *CDH2* raiška, **B** – gydytų T98G ląstelių grupių santykinė *CDH2* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta\text{CT}})$); ilgas horizontalus brūkšnys – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

CDH2 raiška buvo reikšmingai mažesnė T98G-3 mM NaDCA, T98G-1,5 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA gydytų grupių nei T98G-kontrolinės grupės ląstelių. T98G-3 mM NaDCA ir T98G-1,5 mM NaDCA grupių *CDH2* raiška nesiskyrė. Palyginus T98G NaDCA gydytas ir T98G-2 mM NaVPA-3 mM NaDCA ląsteles, nustatyta, kad *CDH2* raiška buvo reikšmingai didesnė ląstelių, gydytų 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA.

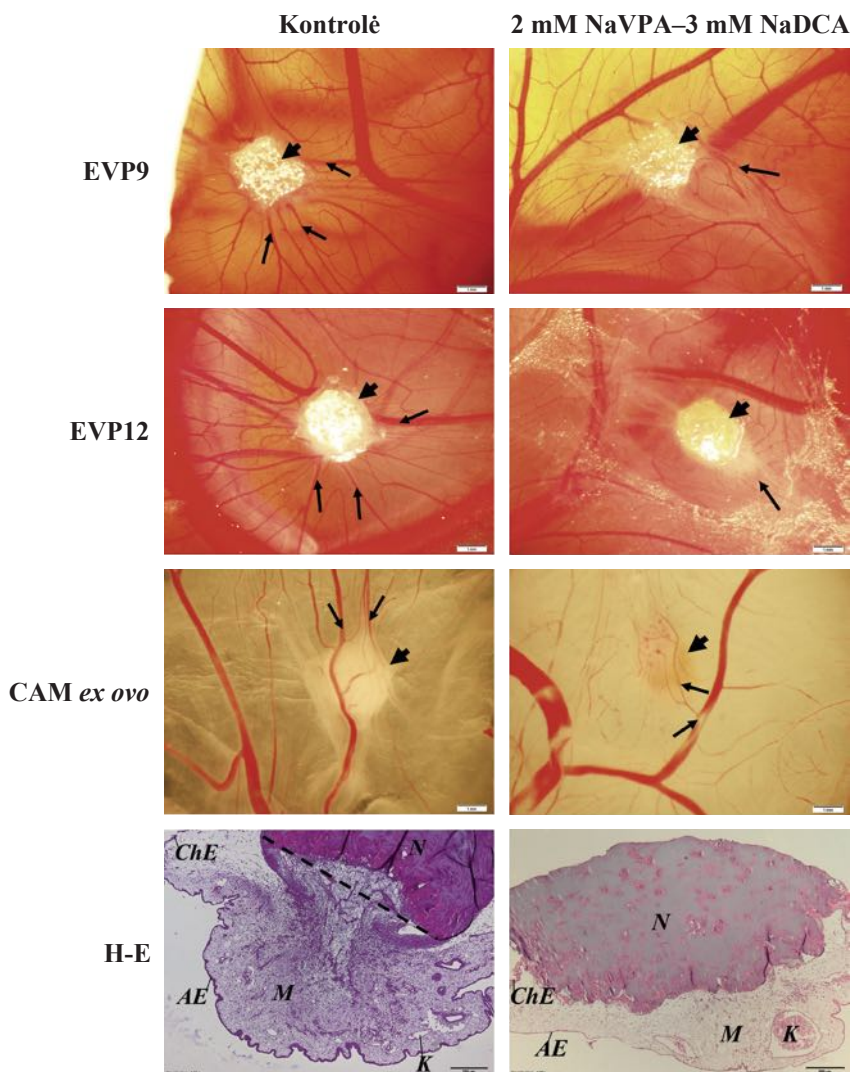
T98G-kontrolinės ir T98G-50 μ M TMZ grupių *CDH2* raiška nesiskyrė; žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA gydytų T98G ląstelių nei T98G-50 μ M TMZ.

Palyginus U87 ir T98G ląstelių *CDH2* raišką po gydymo tiriamaisiais vaistiniais preparatais, nustatyta, kad U87-50 μ M TMZ grupės *CDH2* raiška buvo reikšmingai mažesnė nei T98G-50 μ M TMZ grupės. U87 ląstelėse gydymas tiriamaisiais preparatais nesukėlė poveikio *CDH2* raiškai, o T98G ląstelėse *CDH2* raišką sumažino abi tirtos NaDCA dozės ir NaVPA-NaDCA derinys.

3.6. NaVPA-NaDCA poveikio pacientų pirminių glioblastomos ląstelių navikams ant CAM tyrimų duomenys

3.6.1. Pirminių glioblastomos ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos duomenų vertinimas

GBM2-2F glioblastomos paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12), iškirptos membranos su naviku *ex ovo* ir H-E histologijos nuotraukos tirtose grupėse pateiktos 3.6.1.1 paveiksle. EVP9 navikas matomas po dviejų parų, EVP12 – po penkių parų nuo transplantacijos ant CAM. Tirtos GBM2-2F paciento ląstelių navikų grupės: kontrolinė ir gydytų 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA.



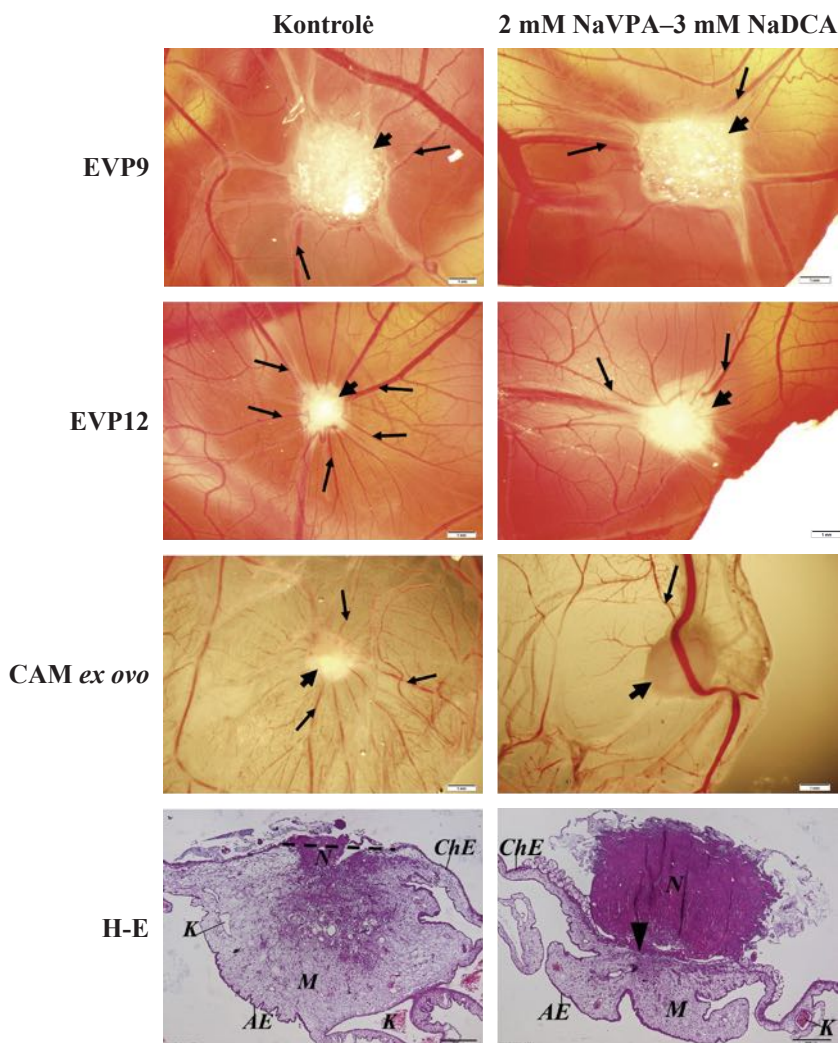
3.6.1.1 pav. Tirtų GBM2-2F paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12), *ex ovo* CAM su naviku ir H-E histologijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę, punktyrinė linija – choriono epitelio suardymą. ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslė. EVP9, EVP12, CAM *ex ovo* skalė – 1 mm, H-E – 200 μ m.

Palyginus GBM2-2F paciento pirminių ląstelių kontrolinį EVP9 ir EVP12 naviką, EVP12 navikas ant CAM paviršiaus vizualiai mažesnis (paviršiuje yra tik neinvazavusi naviko dalis), invazavęs į CAM mezenchimą, matomas kraujagyslių tinklas („stipininis ratas“). Invazija matoma H-E nuotraukoje – pažeistas choriono epitelio vientisumas, CAM po naviku sustorėjusi, joje gausu kraujagyslių.

2 mM NaVPA–3 mM NaDCA slopino GBM2-2F naviko ant CAM augimą: EVP9 ir EVP12 nuotraukose naviko dydis nekito, kraujagyslių tinklas nesusiformavęs, H-E nuotraukoje navikas matomas ant CAM paviršiaus, choriono epitelis nepažeistas.

GBM2-3F glioblastomos paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12), iškirptos membranos su naviku *ex ovo* ir H-E histologijos nuotraukos tirtose grupėse pateiktos 3.6.1.2 paveiksle. EVP9 navikas (po dviejų parų nuo transplantacijos ant CAM), o EVP12 – po penkių parų. GBM2-3F navikai tirti grupėse: kontrolinė ir gydyti 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



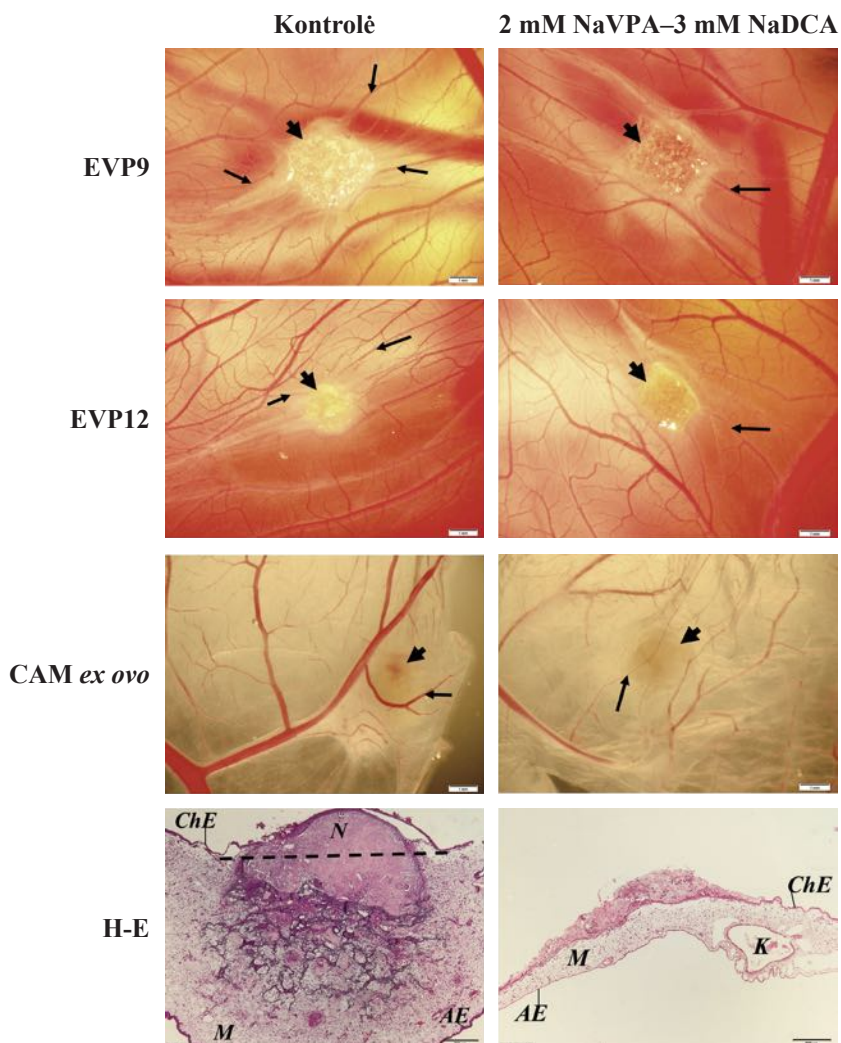
3.6.1.2 pav. Tirtų GBM2-3F paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12), *ex ovo* CAM su naviku ir H-E histologijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę, punktyrinė linija – choriono epitelio suardymą, rodyklės smaigalys – pažeistą choriono epitelį. ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslė. EVP9, EVP12, CAM *ex ovo* skalė – 1 mm, H-E – 200 μ m.

GBM2-3F paciento kontrolinio pirminių ląstelių naviko stereomikroskopijos nuotraukose matomas invazyvus naviko augimas – EVP12 navikas vizualiai mažesnis nei EVP9, aplink naviką – „stipininis ratas“. H-E nuotraukoje CAM po naviku sustorėjusi, navikas invazavęs į CAM mezenchimą.

EVP9 GBM2-3F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikas turi aiškias ribas, kurios sumažėję EVP12, H-E nuotraukoje matoma choriono epitelio sustorėjimas ir pažeistas vientisumas.

GBM2-4M glioblastomos paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12), iškirptos membranos su naviku *ex ovo* ir H-E histologijos nuotraukos tirtose grupėse pateiktos 3.6.1.3 paveiksle. EVP9 navikas matomas po dviejų parų nuo transplantacijos ant CAM, EVP12 – po penkių. Tirtos GBM2-4M paciento ląstelių navikų grupės: kontrolinė ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.6.1.3 pav. Tirtų GBM2-4M paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos (EVP9 ir EVP12), *ex ovo* CAM su naviku ir H-E histologijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę, punktyrinė linija – choriono epitelio suardymą, ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas, K – kraujagyslė. EVP9, EVP12, CAM *ex ovo* skalė – 1 mm, H-E – 200 μ m.

EVP9 GBM2-4M paciento pirminių ląstelių kontrolinis navikas vizualiai didesnis nei EVP12, nes 12-tą parą invazavęs į CAM mezenchimą, tik dalis naviko matoma ant CAM paviršiaus, aplink naviką – kraujagyslių tinklas. H-E nuotraukoje matoma naviko invazija, navikas apsuptas CAM mezenchimos.

2 mM NaVPA–3 mM NaDCA slopino GBM2-4M naviko invaziją: navikas matomas ant CAM paviršiaus, kraujagyslių tinklas nesusiformavęs; H-E nuotraukoje – choriono epitelis vientisas.

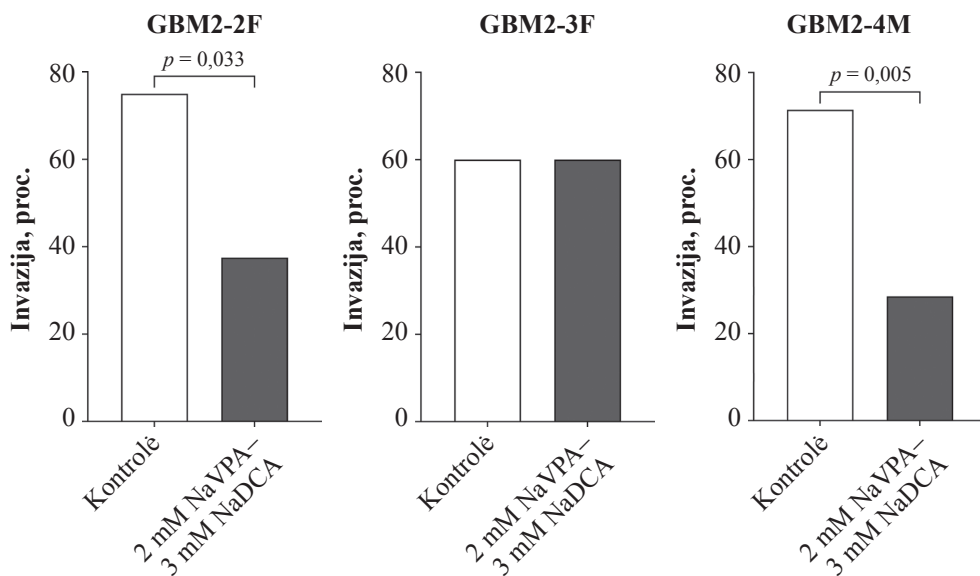
3.6.2. Pirminių glioblastomos ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumo, CAM storio po naviku ir neoangiogenezės vertinimas

Tirtų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių navikų grupių invazijos į CAM dažnumo, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku duomenys pateikti 3.6.2.1 lentelėje; 3.6.2.1 paveikslas rodo tirtų navikų invazijos dažnumą į mezenchimą.

3.6.2.1 lentelė. GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumas, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus po naviku duomenys tirtose grupėse

Tirtos grupės	<i>n</i>	Invazijos dažnumas, proc.	CAM storis, μm	Kraujagyslių skaičius
			mediana (ribos)	
GBM2-2F				
Kontrolė	16	75,00	201,8 (47,32–677,70)	21,5 (7–65)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	16	37,50 ^a	403,10 (150,30–672,20)	16,5 (4–33)
GBM2-3F				
Kontrolė	20	60,00	398,6 (98,00–675,60)	34 (8–68)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	20	60,00	422,70 (100,05–782,40)	16,5 (10–29)
GBM2-4M				
Kontrolė	14	71,43	201,3 (44,77–350,10) ^c	14 (5–17)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	14	28,57 ^b	171,4 (120,1–356,5) ^{d, e, f}	8 (2–21) ^g

^a $p = 0,033$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^b $p = 0,005$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^c $p = 0,003$, palyginus su GBM2-3F kontrole; ^d $p = 0,037$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^e $p = 0,0003$, palyginus su GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^f $p = 0,005$, palyginus su GBM2-3F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^g $p = 0,0002$, palyginus su GBM2-3F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.6.2.1 pav. GBM pirminių ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumas tirtose grupėse

GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M kontrolinių grupių invazijos į CAM dažnumas nesiskyrė.

Gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA reikšmingai sumažino GBM2-2F ir GBM2-4M pirminių ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumą. Gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nesukėlė poveikio GBM2-3F navikų invazijai į CAM.

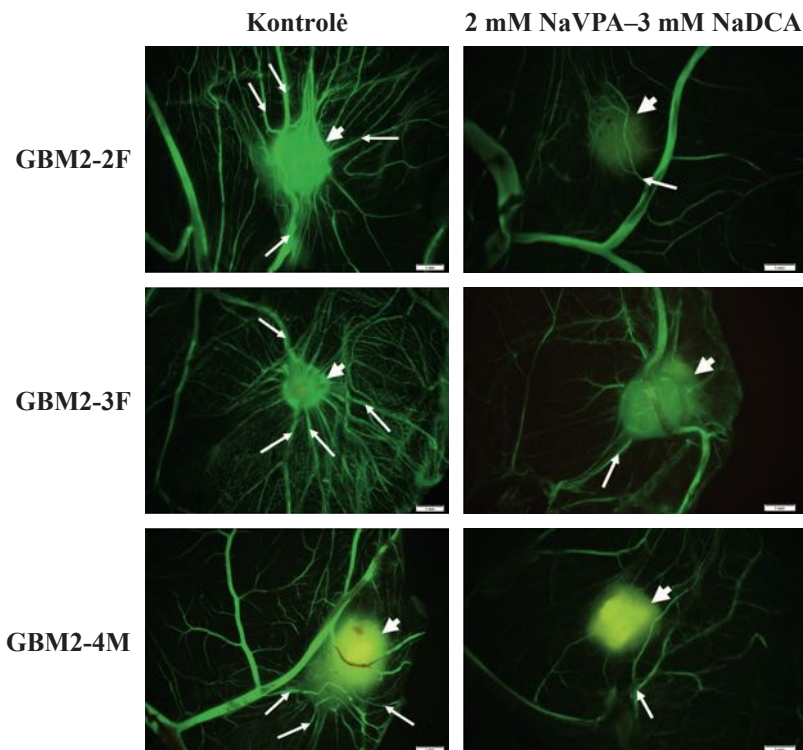
CAM storis GBM2-4M paciento pirminių ląstelių kontrolinių navikų buvo reikšmingai mažesnis nei GBM2-3F-kontrolinių. Palyginus NaVPA–NaDCA gydytas grupes, CAM storis po naviku GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikų buvo reikšmingai mažesnis nei deriniu gydytų GBM2-2F ir GBM2-3F navikų.

CAM storis po kontroliniais ir gydytais NaVPA–NaDCA deriniu GBM2-2F ir GBM2-3F navikais nesiskyrė. Palyginus su GBM2-4M kontroline grupe, gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA reikšmingai sumažino CAM storį po naviku.

Kraujagyslių skaičius kontrolinių GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikų grupių nesiskyrė. Kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės nei GBM2-3F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.

Kontrolinių ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA deriniu gydytų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M grupių kraujagyslių skaičius chorioalantojinėje membranoje po naviku nesiskyrė, skaičiuojant kraujagysles, kurių skersmuo 10 μ m ir didesnis.

Tirtų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių navikų grupių EVP12 kraujagyslių nuotraukos, po fluorescencinio dekstrano sušvirkštimo į CAM kraujagyslę, pateiktos 3.6.2.2 paveiksle. Tirtos GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių navikų grupės: kontrolinių ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.6.2.2 pav. Tirtų grupių GBM pirminių ląstelių navikų kraujagyslių neoangiogenežės EVP12 fluorescencijos nuotraukos

Trumpa rodyklė nurodo naviką ant CAM, ilga rodyklė – kraujagyslę. Skalė – 1 mm.

Kontrolinių ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M grupių fluorescencijos nuotraukose dekstranas išryškino naviką ir jį supantį kraujagyslių tinklą. Palyginus su atitinkama kontroline grupe, gydymas NaVPA–NaDCA deriniu slopino angiogenezę – kraujagyslių tinklas po gydymo buvo silpniau susiformavęs.

3.7. NaVPA–NaDCA poveikio pacientų pirminių glioblastomos ląstelių navikų GFRB, PLBA, p53, EZH2 ir vimentino raiškai tyrimų duomenys

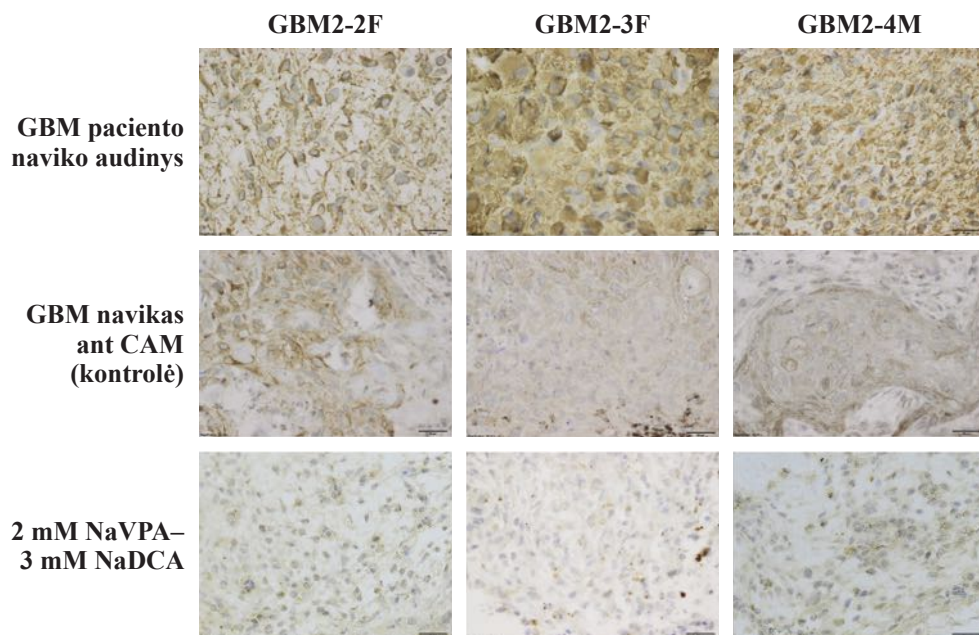
3.7.1. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM GFRB raiška

Tirtų GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M pacientų poopreacinio naviko audinio ir pirminių ląstelių suformuotų navikų ant CAM GFRB-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.7.1.1 lentelėje, 3.7.1.1 ir 3.7.1.2 paveiksluose.

3.7.1.1 lentelė. GBM naviko audinio (paciento naviko audinys) ir tirtų GBM pirminių ląstelių GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M navikų ant CAM grupių (kontrolinių ir gydytų deriniu) GFRB-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

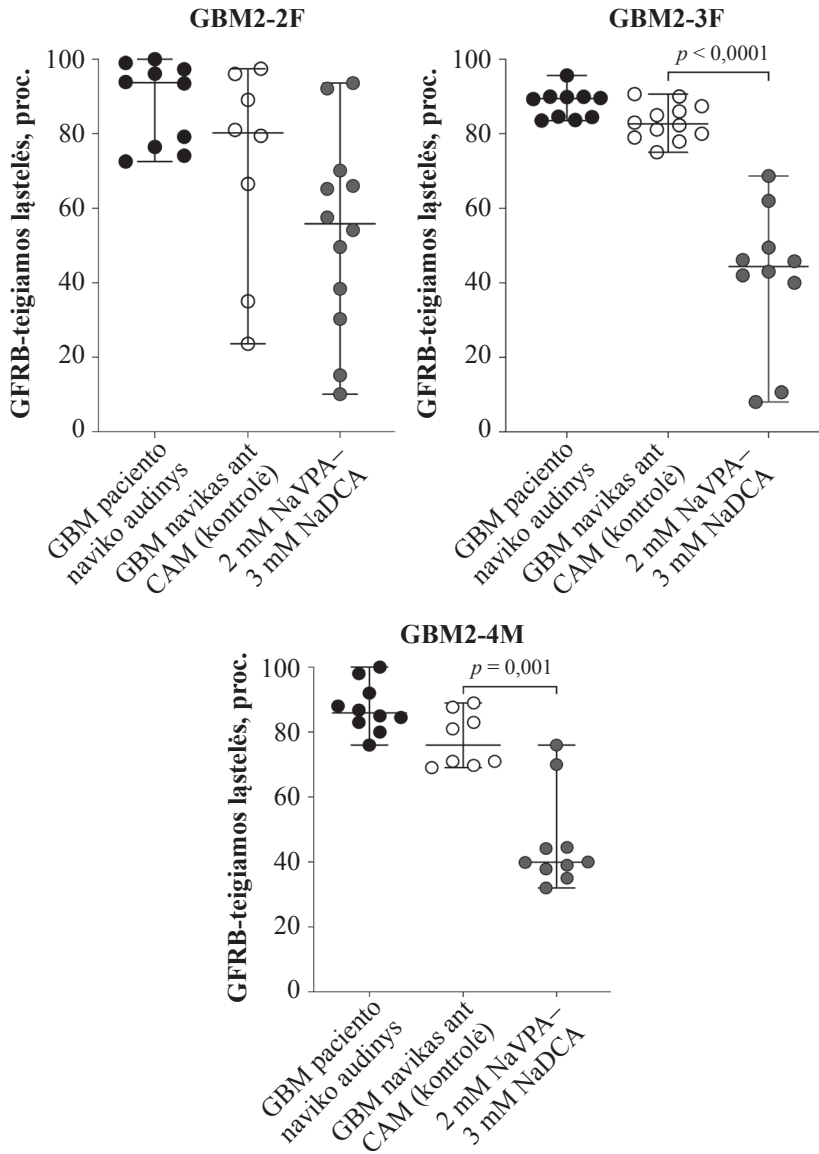
Tirtos grupės	<i>n</i>	GFRB-teigiamos ląstelės, proc. mediana (ribos)
GBM2-2F		
GBM naviko audinys	10	93,89 (72,56–100,00)
Kontrolė	8	80,24 (23,61–97,45)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	12	55,83 (10,10–93,60)
GBM2-3F		
GBM naviko audinys	10	89,44 (83,56–95,65)
Kontrolė	12	82,63 (75,05–90,63)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	44,38 (8,00–68,65) ^a
GBM2-4M		
GBM naviko audinys	10	85,88 (76,00–100,00)
Kontrolė	8	76,00 (69,06–89,00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	39,92 (32,00–76,00) ^b

^a $p < 0,0001$, palyginus su GBM2-3F kontrole; ^b $p = 0,001$, palyginus su GBM2-4M kontrole.



3.7.1.1 pav. *GBM naviko audinio ir tirtų grupių GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM GFRB raiška*

Rudos spalvos citoplazma nurodo GFRB-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μ m.



3.7.1.2 pav. GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M naviko audinio ir tirtų grupių pirminių ląstelių navikų procentinė GFRB-teigiamų ląstelių raiška

Histologinės analizė neparodė išoperuoto GBM naviko audinio ir iš to pačio GBM audinio suformuotų navikų ant CAM GFRB raiškos skirtumų. Imunohistocheminė analizė parodė, kad GFRB-teigiamų ląstelių dažnumas išoperuoto GBM naviko audinyje ir iš to pačio GBM audinio suformuotame navike ant CAM nesiskyrė ($p > 0,05$). Tai rodo, kad pirminių ląstelių navikų ant CAM histologinės savybės atspindi GBM pacientų navikų, iš kurių buvo suformuoti navikai, savybes ir patvirtina CAM tyrimo metodikos patikimumą.

Navikų ant CAM GFRB-teigiamų ląstelių dažnumas kontrolinės GBM2-2F grupės buvo 80,24 proc., GBM2-3F – 82,63 proc., GBM2-4M – 76,00 proc. Palyginus su kontroline grupe, gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA deriniu reikšmingai sumažino GBM2-3F ir GBM2-4M navikų GFRB-teigiamų ląstelių skaičių. NaVPA–NaDCA nesukėlė reikšmingo poveikio GBM2-2F navikų GFRB raiškai.

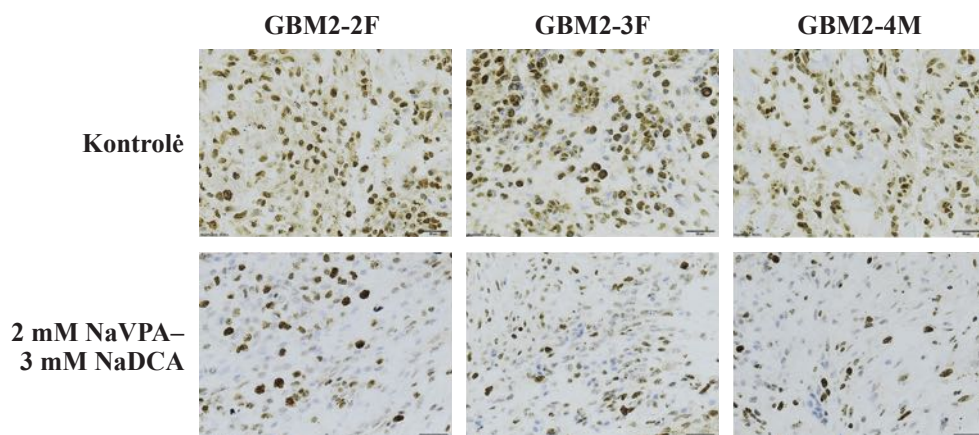
3.7.2. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM PLBA raiška

Tirtų GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių suformuotų navikų ant CAM grupių PLBA-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.7.2.1 lentelėje, 3.7.2.1 ir 3.7.2.2 paveiksluose.

3.7.2.1 lentelė. Tirtų GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių PLBA-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

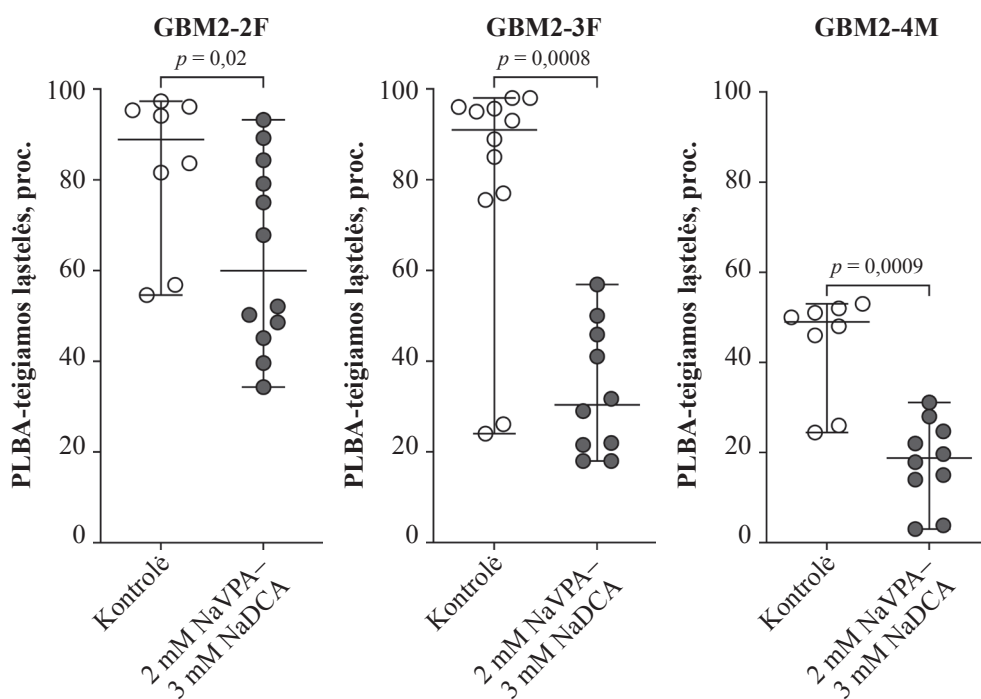
Tirtos grupės	<i>n</i>	PLBA-teigiamos ląstelės, proc. mediana (ribos)
GBM2-2F		
Kontrolė	8	88,88 (54,60–97,30)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	12	59,95 (34,31–93,20) ^a
GBM2-3F		
Kontrolė	12	90,95 (24,00–98,00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	30,35 (18,00–56,91) ^{b, c}
GBM2-4M		
Kontrolė	8	49,00 (24,43–53,00) ^{d, e}
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	18,79 (3,00–31,10) ^{f, g, h}

^a $p = 0,02$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^b $p = 0,0008$, palyginus su GBM2-3F kontrole; ^c $p = 0,002$, palyginus su GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^d $p = 0,0002$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^e $p = 0,007$, palyginus su GBM2-3F kontrole; ^f $p = 0,0009$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^g $p < 0,0001$, palyginus su GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^h $p = 0,02$, palyginus su GBM2-3F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.7.2.1 pav. Tirtų grupių GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM PLBA raiška

Rudos spalvos branduoliai nurodo PLBA-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μ m.



3.7.2.2 pav. GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M tirtų grupių pirminių ląstelių navikų ant CAM procentinė PLBA-teigiamų ląstelių raiška

Navikų ant CAM PLBA-teigiamų ląstelių dažnumas kontrolinės GBM2-2F grupės buvo 88,88 proc., GBM2-3F – 90,95 proc., GBM2-4M – 49 proc. Palyginus su atitinkama kontroline grupe, PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikų.

GBM2-4M-kontrolinės grupės PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei GBM2-2F- ar GBM2-3F-kontrolinės. GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės PLBA-teigiamų ląstelių raiška buvo didžiausia, palyginus su deriniu gydytų GBM2-3F ir GBM2-4M navikų. GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA navikų PLBA raiška buvo reikšmingai mažesnė nei deriniu gydytų GBM2-3F navikų.

3.7.3. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM p53 raiška

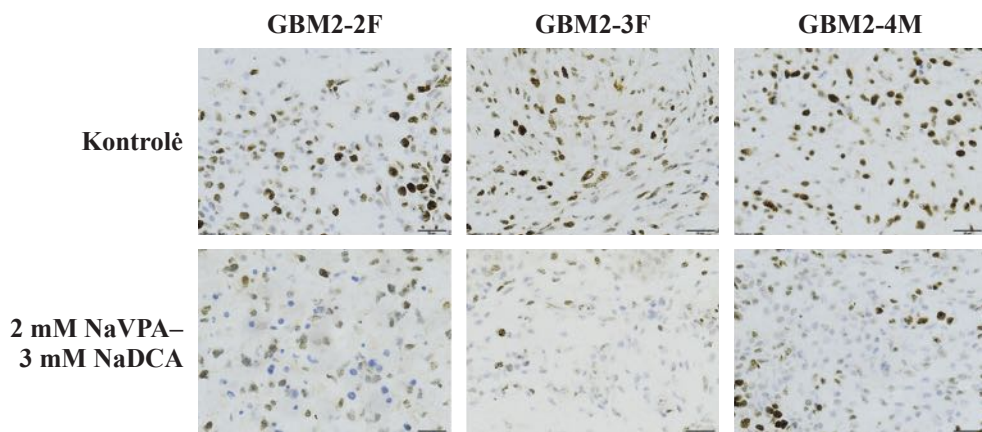
Tirtų GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių suformuotų navikų ant CAM grupių p53-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.7.3.1 lentelėje, 3.7.3.1 ir 3.7.3.2 paveiksluose.

3.7.3.1 lentelė. Tirtų GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių p53-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

Tirtos grupės	<i>n</i>	p53-teigiamos ląstelės, proc. mediana (ribos)
GBM2-2F		
Kontrolė	8	50,13 (18,23–94,54)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	12	29,54 (2,01–60,32) ^a
GBM2-3F		
Kontrolė	12	62,34 (8,60–93,33)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	23,93 (1,73–43,05) ^b
GBM2-4M		
Kontrolė	8	56,58 (22,19–66,00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	24,00 (3,00–32,19) ^c

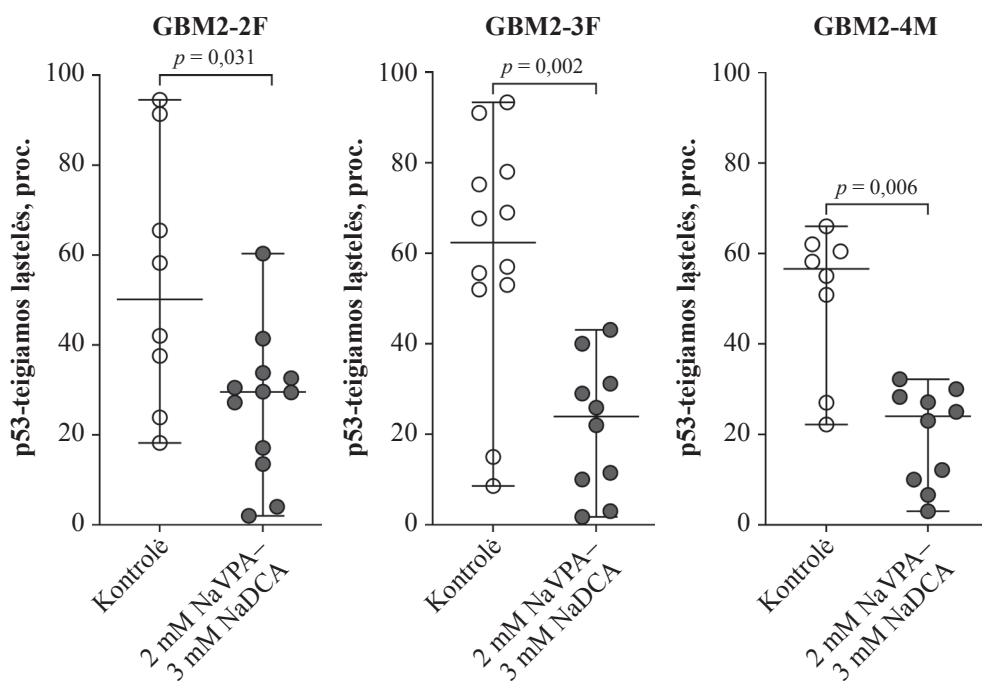
^a $p = 0,031$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^b $p = 0,002$, palyginus su GBM2-3F kontrole;

^c $p = 0,006$, palyginus su GBM2-4M kontrole.



3.7.3.1 pav. Tirtų grupių GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM p53 raiška

Rudos spalvos branduoliai nurodo p53-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μ m.



3.7.3.2 pav. GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M tirtų grupių pirminių ląstelių navikų ant CAM procentinė p53-teigiamų ląstelių raiška

Navikų ant CAM p53-teigiamų ląstelių dažnumas kontrolinės GBM2-2F grupės buvo 50,13 proc., GBM2-3F – 62,34 proc., GBM2-4M – 56,58 proc. Kontrolinių GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių navikų p53 raiška nesiskyrė. Palyginus su atitinkama kontroline grupe, p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikų. 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M grupių p53 raiška nesiskyrė.

3.7.4. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM EZH2 raiška

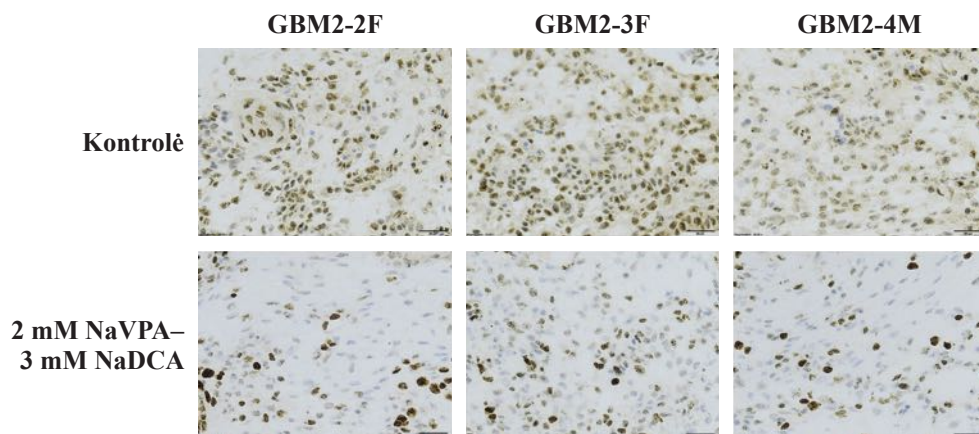
Tirtų GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių EZH2-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.7.4.1 lentelėje, 3.7.4.1 ir 3.7.4.2 paveiksluose.

3.7.4.1 lentelė. Tirtų GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių EZH2-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

Tirtos grupės	<i>n</i>	EZH2-teigiamos ląstelės, proc. mediana (ribos)
GBM2-2F		
Kontrolė	8	73,48 (54,52–96,08)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	12	48,73 (15,21–96,40) ^a
GBM2-3F		
Kontrolė	12	91,11 (79,90–96,22) ^{b, c}
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	62,50 (2,00–92,17) ^d
GBM2-4M		
Kontrolė	8	58,11 (39,00–65,00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	36,00 (16,00–43,36) ^{e, f, g}

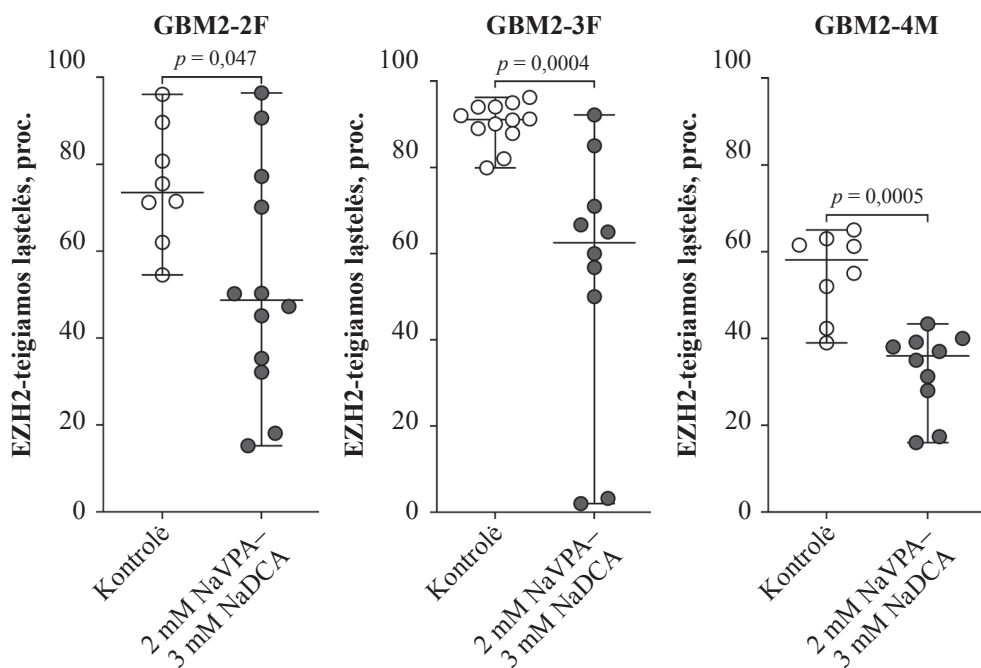
^a $p = 0,047$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^b $p = 0,01$, palyginus su GBM2-2F kontrole;

^c $p < 0,0001$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^d $p = 0,0004$, palyginus su GBM2-3F kontrole; ^e $p = 0,0005$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^f $p = 0,04$, palyginus su GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^g $p = 0,02$, palyginus su GBM2-3F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.7.4.1 pav. Tirtų grupių GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM EZH2 raiška

Rudos spalvos branduoliai nurodo EZH2-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μ m.



3.7.4.2 pav. GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M tirtų grupių pirminių ląstelių navikų ant CAM procentinė EZH2-teigiamų ląstelių raiška

Kontrolinių GBM2-2F navikų EZH2-teigiamų ląstelių dažnumas buvo 73,48 proc., GBM2-3F – 91,11 proc., GBM2-4M – 58,11 proc. GBM2-3F kontrolinės grupės EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai didesnis nei GBM2-2F- ar GBM2-4M-kontrolinės. Palyginus su atitinkama kontroline grupe, EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikų. GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei deriniu gydytų GBM2-2F ar GBM2-3F navikų.

3.7.5. GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM vimentino raiška

Tirtų GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M pacientų pirminių ląstelių suformuotų navikų ant CAM grupių vimentinui-teigiamų ląstelių raiškos duomenys pateikti 3.7.5.1 lentelėje, 3.7.5.1 ir 3.7.5.2 paveiksluose.

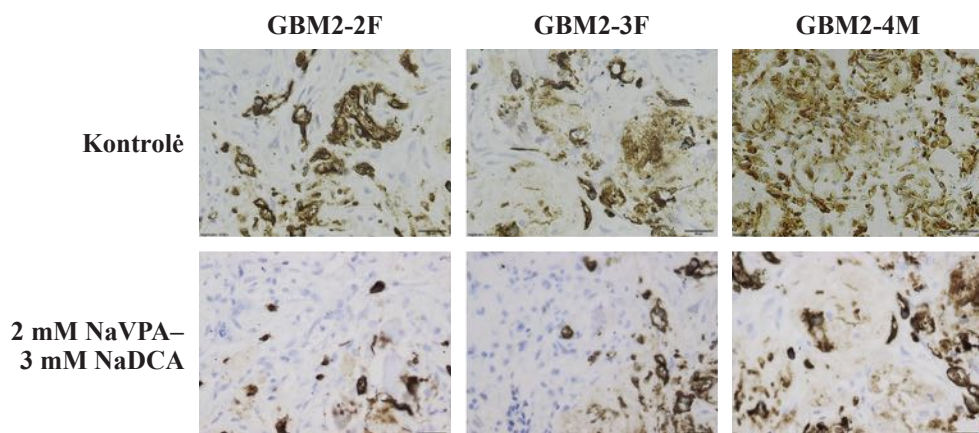
3.7.5.1 lentelė. Tirtų GBM pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių vimentinui-teigiamų ląstelių raiškos duomenys

Tirtos grupės	<i>n</i>	Vimentinui-teigiamos ląstelės, proc. mediana (ribos)
GBM2-2F		
Kontrolė	8	45,85 (19,20–76,45)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	12	13,94 (2,02–56,02) ^a
GBM2-3F		
Kontrolė	12	26,91 (2,15–91,00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	5,14 (1,18–31,25) ^b
GBM2-4M		
Kontrolė	8	79,00 (35,38–89,00) ^{c, d}
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	10	49,50 (29,00–70,72) ^{e, f, g}

^a $p = 0,002$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^b $p = 0,043$, palyginus su GBM2-3F kontrole;

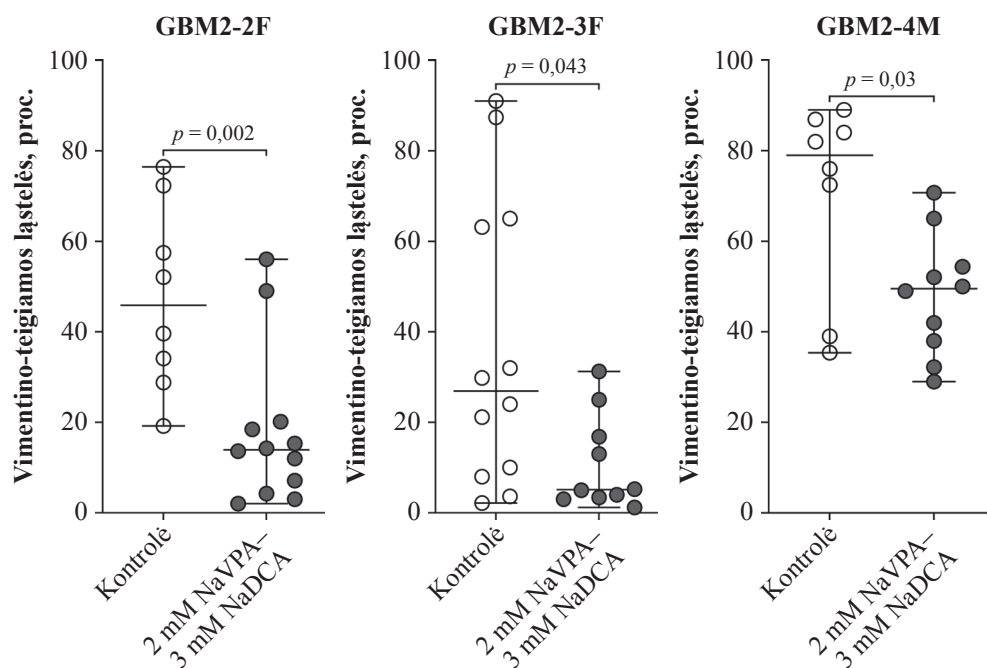
^c $p = 0,04$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^d $p = 0,03$, palyginus su GBM2-3F kontrole;

^e $p = 0,03$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^f $p = 0,001$, palyginus su GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^g $p < 0,0001$, palyginus su GBM2-3F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.7.5.1 pav. Tirtų grupių GBM pacientų pirminių ląstelių navikų ant CAM vimentino raiška

Rudos spalvos citoplazma nurodo vimentinui-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μ m.



3.7.5.2 pav. GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M tirtų grupių pirminių ląstelių navikų ant CAM procentinė vimentinui-teigiamų ląstelių raiška

Kontrolinių GBM2-2F navikų ant CAM vimentinui-teigiamų ląstelių dažnumas buvo 48,45 proc., GBM2-3F – 26,91 proc., GBM2-4M – 79,00 proc. GBM2-4M-kontrolinės grupės vimentinui-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai didesnis nei GBM2-2F- ar GBM2-3F-kontrolinės. Palyginus su atitinkama kontroline grupe, vimentinui-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikų. GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės vimentinui-teigiamų ląstelių raiška buvo didžiausia, palyginus su deriniu gydytų GBM2-2F ir GBM2-3F navikų.

3.8. NaVPA–NaDCA poveikio pacientų pirminių glioblastomos ląstelių genų raiškai: *in vitro* tyrimų duomenys

3.8.1. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių *SLC12A2* raiškai

Tirtų GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M pacientų pirminių ląstelių kontrolinių ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių *SLC12A2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.8.1.1 lentelėje ir 3.8.1.1 paveiksle.

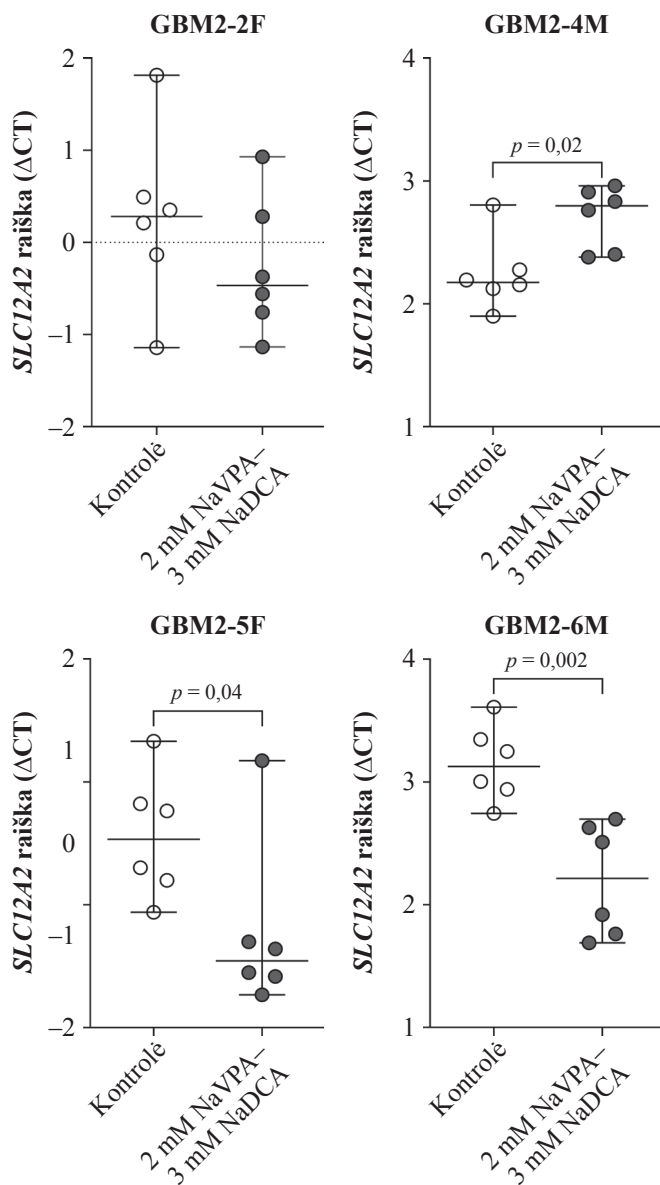
3.8.1.1 lentelė. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių grupių *SLC12A2* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, viduris ± SN			ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		SLC12A2	GAPDH			
GBM2-2F						
Kontrolė	6	27,42 ± 0,73	27,15 ± 0,47	0,27 ± 0,96		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	28,46 ± 0,92	28,72 ± 1,47	–0,27 ± 0,75	0,54	1,45
GBM2-4M						
Kontrolė	6	24,45 ± 0,47	22,21 ± 0,33	2,24 ± 0,30 ^a		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	24,99 ± 0,19	22,28 ± 0,26	2,71 ± 0,25 ^{b, c}	0,47	0,72

3.8.1.1 lentelės tęsinys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, viduris ± SN			ΔΔCT	2 ^{−ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		SLC12A2	GAPDH			
GBM2-5F						
Kontrolė	6	21,73 ± 0,29	19,17 ± 0,31	2,56 ± 0,51 ^a		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	21,94 ± 0,73	20,17 ± 0,18	1,77 ± 0,70 ^{c, d}	−0,79	1,72
GBM2-6M						
Kontrolė	6	24,76 ± 0,30	21,61 ± 0,54	3,15 ± 0,31 ^{a, c}		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	25,06 ± 0,24	22,86 ± 0,24	2,20 ± 0,46 ^{c, f}	−0,95	1,93

^a $p = 0,002$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^b $p = 0,02$, palyginus su GBM2-4M kontrole;
^c $p = 0,002$, palyginus su GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^d $p = 0,04$, palyginus su GBM2-5F kontrole; ^e $p = 0,004$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^f $p = 0,002$, palyginus su GBM2-6M kontrole.



3.8.1.1 pav. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių kontrolinių ir gydytų NaVPA–NaDCA deriniu grupių SLC12A2 raiška: GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M

Horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus su atitinkama kontroline grupe, *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai mažesnė 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-4M ląstelių; *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai didesnė GBM2-5F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir GBM2-6M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ląstelių nei atitinkamos kontrolinės grupės. NaVPA–NaDCA nesukėlė reikšmingo poveikio GBM2-2F paciento ląstelių *SLC12A2* raiškai.

SLC12A2 raiška buvo reikšmingai didesnė GBM2-2F kontrolinių ląstelių nei GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M kontrolinių. *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai mažesnė GBM2-6M kontrolinių ląstelių nei GBM2-4M kontrolinių. Deriniu gydytų ląstelių grupių geno raiška buvo nustatyta tokia: GBM2-2F > GBM2-5F = GBM2-6M = GBM2-4M (> – skirtumai reikšmingi).

3.8.2. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių *SLC12A5* raiškai

Tirtų GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M pacientų pirminių ląstelių kontrolinių ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių *SLC12A5* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.8.2.1 lentelėje.

3.8.2.1 lentelė. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių grupių *SLC12A5* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{−ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		<i>SLC12A5</i>	<i>GAPDH</i>			
GBM2-2F						
Kontrolė	6	37,61 ± 0,32	27,15 ± 0,47	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	39,07 ± 1,07	28,72 ± 1,47	–	–	–
GBM2-4M						
Kontrolė	6	37,09 ± 0,56	22,21 ± 0,33	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	34,66 ± 0,24	22,28 ± 0,26	12,38 ± 0,22	–	–

3.8.2.1 lentelės tęsinys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{−ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		<i>SLC12A5</i>	<i>GAPDH</i>			
GBM2-5F						
Kontrolė	6	30,85 ± 0,07	19,17 ± 0,31	11,68 ± 0,30		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	29,74 ± 0,18	20,17 ± 0,18	9,58 ± 0,15 ^{a, b}	−2,10	4,29
GBM2-6M						
Kontrolė	6	36,25 ± 0,52	21,61 ± 0,54	—		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	33,48 ± 0,32	22,86 ± 0,24	10,62 ± 0,52 ^{b, c}	−4,02	16,23

^a $p = 0,002$, palyginus su GBM2-5F kontrole; ^b $p = 0,002$, palyginus su GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^c $p = 0,002$, palyginus su GBM2-5F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.

GBM2-2F, GBM2-4M ir GBM2-6M kontrolinių ir GBM2-2F-2 mM-NaVPA–3 mM NaDCA ląstelių *SLC12A5* raiška buvo neišreikšta (raiškos nėra). *SLC12A5* raiška nustatyta GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir GBM2-6M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ląstelėse – gydymas deriniu aktyvino geno raišką. *SLC12A5* raiška buvo reikšmingai didesnė 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-5F ląstelių nei GBM2-5F kontrolinių.

Palyginus deriniu gydytų ląstelių *SLC12A5* raišką, nustatyti jos skirtumai grupėse: GBM2-5F > GBM2-6M > GBM2-4M (skirtumai buvo reikšmingi).

3.8.3. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių *SLC5A8* raiškai

Tirtų GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M pacientų pirminių ląstelių kontrolinių ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių *SLC5A8* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.8.3.1 lentelėje.

3.8.3.1 lentelė. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių grupių *SLC5A8* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		SLC5A8	GAPDH			
GBM2-2F						
Kontrolė	6	raiškos nėra	27,15 ± 0,47	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	raiškos nėra	28,72 ± 1,47	–	–	–
GBM2-4M						
Kontrolė	6	raiškos nėra	22,21 ± 0,33	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	39,26 ± 0,55	22,28 ± 0,26	–	–	–
GBM2-5F						
Kontrolė	6	39,67 ± 0,43	19,17 ± 0,31	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	38,08 ± 0,91	20,17 ± 0,18	–	–	–
GBM2-6M						
Kontrolė	6	39,49 ± 0,10	21,61 ± 0,54	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	38,61 ± 1,13	22,86 ± 0,24	–	–	–

GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M kontrolinėse ir gydytose 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ląstelėse *SLC5A8* raiškos nebuvo (ląstelėse raiška nenustatyta).

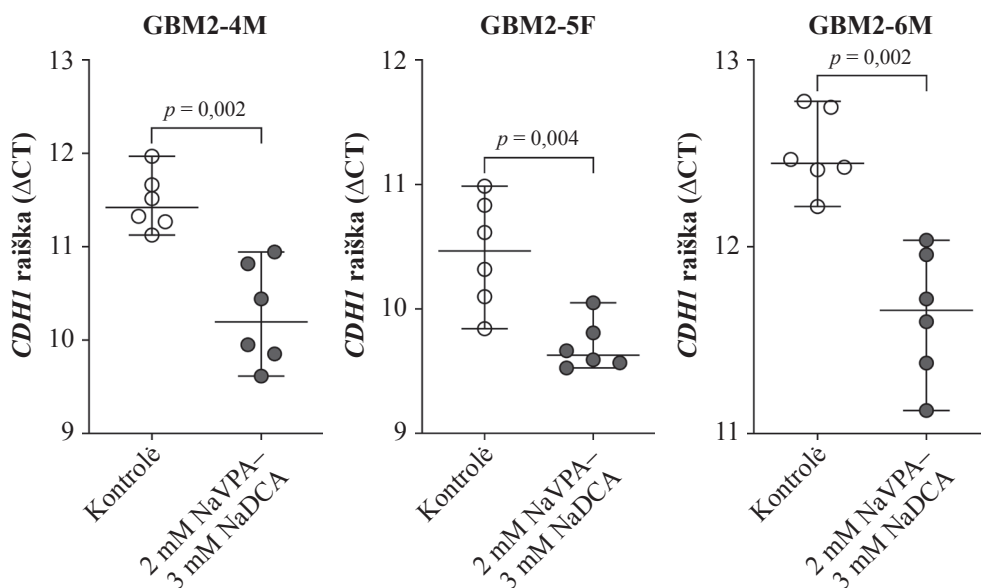
3.8.4. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių *CDH1* raiškai

Tirtų GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M pacientų pirminių ląstelių kontrolinių ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių *CDH1* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.8.4.1 lentelėje ir 3.8.4.1 paveiksle.

3.8.4.1 lentelė. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių grupių *CDH1* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		CDH1	GAPDH			
GBM2-2F						
Kontrolė	6	37,09 ± 0,72	27,15 ± 0,47	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	38,06 ± 0,88	28,72 ± 1,47	–	–	–
GBM2-4M						
Kontrolė	6	33,69 ± 0,41	22,21 ± 0,33	11,48 ± 0,31		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	32,55 ± 0,32	22,28 ± 0,26	10,27 ± 0,55 ^{a, b}	–1,21	2,31
GBM2-5F						
Kontrolė	6	29,62 ± 0,21	19,17 ± 0,31	10,45 ± 0,44 ^{a, c}		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	29,87 ± 0,13	20,17 ± 0,18	9,70 ± 0,20 ^{b, d, e}	–0,75	1,68
GBM2-6M						
Kontrolė	6	34,12 ± 0,42	21,61 ± 0,54	12,51 ± 0,22 ^a		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	34,50 ± 0,23	22,86 ± 0,24	11,64 ± 0,35 ^c	–0,87	1,83

^a $p = 0,002$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^b $p = 0,002$, palyginus su GBM2-6M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^c $p = 0,002$, palyginus su GBM2-6M kontrole; ^d $p = 0,004$, palyginus su GBM2-5F kontrole; ^e $p = 0,04$, palyginus su GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.8.4.1 pav. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių kontrolinių ir gydytų NaVPA–NaDCA deriniu grupių *CDH1* raiška: GBM2-2F, GBM2-5F ir GBM2-6M

Horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

GBM2-2F-kontrolinių ląstelių *CDH1* raiška buvo neišreikšta (buvo nenustatyta), gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nesukėlė poveikio geno raiškai (*CDH1* raiška nenustatyta). Kontrolinių GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelių *CDH1* raiška buvo nustatoma, kuri po gydymo 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA buvo reikšmingai didesnė gydytų GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelių.

CDH1 raiška buvo reikšmingai didesnė GBM2-5F-kontrolinių ląstelių nei kontrolinių GBM2-4M ir GBM2-6M. *CDH1* raiška buvo reikšmingai didesnė GBM2-4M-kontrolinių ląstelių nei GBM2-6M-kontrolinių. Palyginus deriniu gydytų ląstelių *CDH1* raišką, jos dydis pasiskirstė: GBM2-5F > GBM2-4M > GBM2-6M (skirtumai buvo reikšmingi).

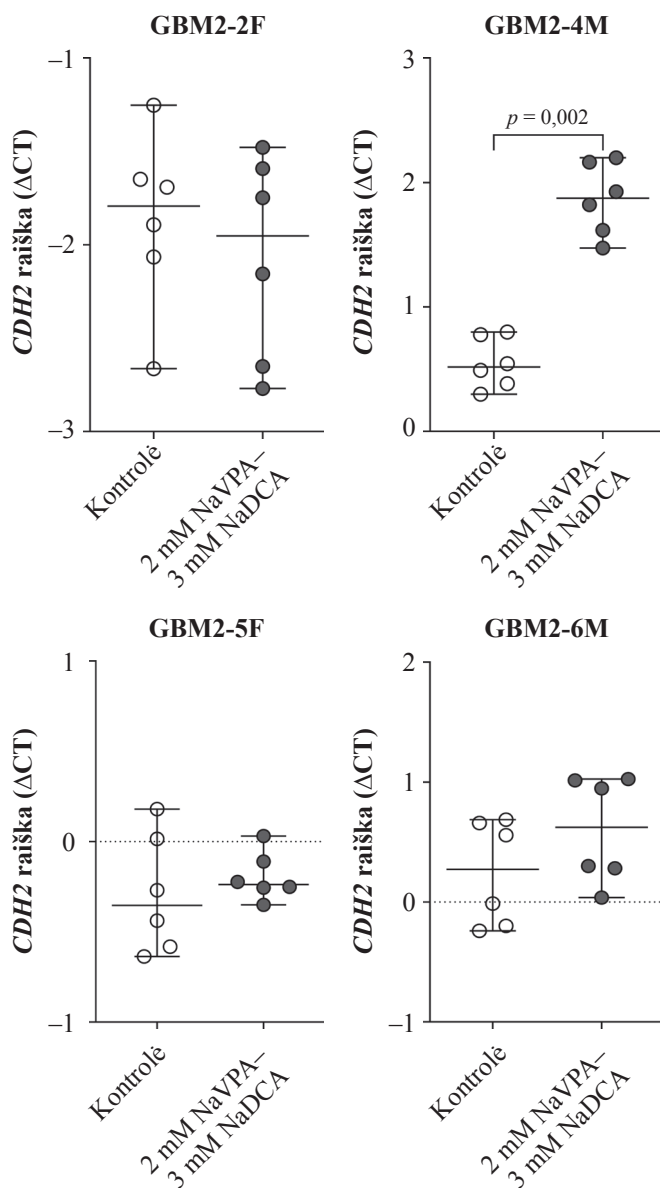
3.8.5. NaVPA–NaDCA poveikis pacientų pirminių glioblastomos ląstelių *CDH2* raiškai

Tirtų GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M pacientų pirminių ląstelių kontrolinių ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.8.5.1 lentelėje ir 3.8.5.1 paveiksle.

3.8.5.1 lentelė. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių grupių *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			ΔΔCT	2 ^{−ΔΔCT}
		CT		ΔCT		
		CDH2	GAPDH			
GBM2-2F						
Kontrolė	6	25,28 ± 0,22	27,15 ± 0,47	−1,87 ± 0,48 ^a		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	26,66 ± 1,10	28,72 ± 1,47	−2,07 ± 0,55 ^b	−0,20	1,15
GBM2-4M						
Kontrolė	6	22,76 ± 0,39	22,21 ± 0,33	0,55 ± 0,20		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	24,15 ± 0,15	22,28 ± 0,26	1,87 ± 0,29 ^a	1,32	0,40
GBM2-5F						
Kontrolė	6	19,25 ± 0,07	19,17 ± 0,31	0,07 ± 0,33 ^{a, c}		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	19,97 ± 0,10	20,17 ± 0,18	−0,19 ± 0,13 ^{b, d}	−0,27	1,20
GBM2-6M						
Kontrolė	6	21,85 ± 0,10	21,61 ± 0,54	0,24 ± 0,44 ^c		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	23,46 ± 0,21	22,86 ± 0,24	0,60 ± 0,44 ^{b, d, e}	0,36	0,78

^a $p = 0,002$, palyginus su GBM2-4M kontrole; ^b $p = 0,002$, palyginus su GBM2-4M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^c $p = 0,002$, palyginus su GBM2-2F kontrole; ^d $p = 0,002$, palyginus su GBM2-2F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA; ^e $p = 0,002$, palyginus su GBM2-5F-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.



3.8.5.1 pav. Tirtų pacientų pirminių glioblastomos ląstelių kontrolinių ir gydytų NaVPA–NaDCA deriniu grupių CDH2 raiška: GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M

Horizontalus brūkšnys – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

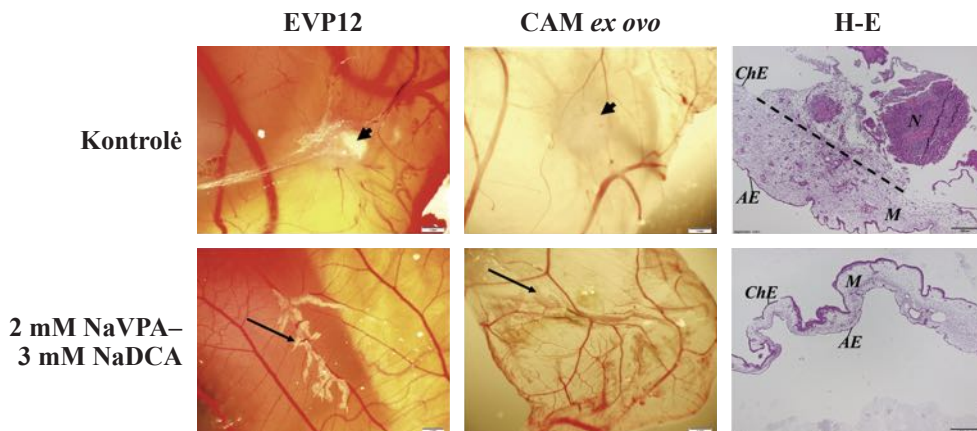
Palyginus su kontroline grupe, *CDH2* raiška buvo reikšmingai mažesnė 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų GBM2-4M ląstelių. NaVPA–NaDCA nesukėlė reikšmingo poveikio GBM2-2F, GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelių *CDH2* raiškai.

CDH2 raiška buvo reikšmingai didesnė GBM2-2F-kontrolinių ląstelių nei kontrolinių GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M. *CDH2* raiška buvo reikšmingai mažesnė GBM2-4M-kontrolinių ląstelių nei GBM2-5F-kontrolinių. Palyginus tirtų derinių gydytų ląstelių grupių *CDH2* raiškos dydį, raiška pasiskirstė: GBM2-2F > GBM2-5F > GBM2-6M > GBM2-4M (skirtumai buvo reikšmingi).

3.9. NaVPA–NaDCA poveikio pirminių endodimomos ląstelių navikams ant CAM ir ląstelių genų raiškai tyrimų duomenys

3.9.1. NaVPA–NaDCA poveikis pirminių endodimomos ląstelių navikams ant CAM

Tirto EP2-1M endodimomos paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos EVP12, iškirptos membranos su naviku *ex ovo* ir H-E histologijos nuotraukos pateiktos 3.9.1.1 paveiksle. EVP12 navikas matomas po penkių parų nuo transplantacijos ant CAM. Tirtos EP2-1M paciento ląstelių navikų kontrolinės ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupės.



3.9.1.1 pav. EP2-1M paciento pirminių ląstelių navikų ant CAM grupių stereomikroskopijos, *ex ovo* CAM su naviku ir H-E histologijos EVP12 nuotraukos

Trumpa rodyklė – navikas, ilga rodyklė – apie kraujagyslę išsisklaidęs navikas, punktyrinė linija – suardytas choriono epitelis, ChE – choriono epitelis, AE – alantojaus epitelis, M – mezenchima, N – navikas. EVP12, CAM *ex ovo* skalė – 1 mm, H-E – 200 μ m.

Ant CAM transplantuoti aštuoni EP2-1M kontroliniai ir septyni NaVPA–NaDCA gydyti navikai neprigijo ir išsisklaidė CAM paviršiuje. Susiformavo tik vienas iš aštuonių kontrolinių navikų (kontrolė, EVP12 ir H-E nuotraukos). EP2-1M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ependimomos paciento pirminių ląstelių navikas EVP12 nuotraukoje matomas išsisklaidęs CAM paviršiuje pagal kraujagysles (rodyklė). H-E preparatuose naviko vieta buvo nustatyta pagal CAM sustorėjimą ir naviko ląsteles ant choriono epitelio (2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, H-E).

Tirto EP2-1M naviko grupių invazijos į CAM dažnumo, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku duomenys pateikti 3.9.1.1 lentelėje.

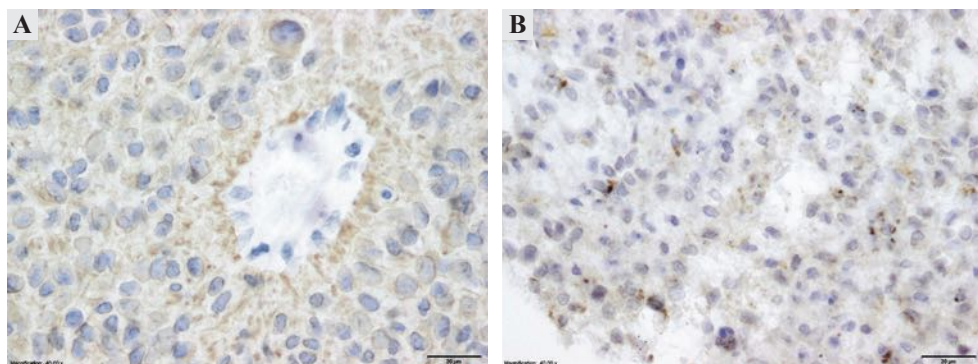
3.9.1.1 lentelė. EP2-1M pirminių ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumas, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus po naviku duomenys

Tirtos grupės	n	Invazijos dažnumas, proc.	CAM storis, μm	Kraujagyslių skaičius
			mediana (ribos)	
Kontrolė	16	22,22	251,40 (176,50–503,00)	9,5 (6–19)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	14	14,29	202,90 (110,60–244,60) ^a	4,5 (1–25) ^b

^a $p = 0,01$, palyginus su EP2-1M kontrole; ^b $p = 0,001$, palyginus su EP2-1M kontrole.

Navikų ant CAM invazijos dažnumas kontrolinės EP2-1M grupės buvo 22,22 proc., EP2-1M-2 mM NaVPA–3 mM NaDCA – 14,29 proc. Gydytas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nesukėlė reikšmingo poveikio EP2-1M naviko invazijai į CAM. Palyginus su EP2-1M kontroline grupe, gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA reikšmingai sumažino CAM storį ir kraujagyslių skaičių po naviku.

Tirto EP2-1M paciento poopreacinio naviko audinio ir pirminių ląstelių suformuoto naviko ant CAM GFRB-teigiamų ląstelių raiškos paveikslai pateikti 3.9.1.2 paveiksle.



3.9.1.2 pav. Ependimomos naviko audinio (A) ir ependimomos pirminių ląstelių kontrolinio naviko ant CAM (B) GFRB raiška

Rudos spalvos citoplazma nurodo GFRB-teigiamas ląsteles. Skalė – 20 μ m.

Imunohistocheminės analizės metu nustatyta EP2-1M naviko audinio ir iš to pačio ependimomos audinio suformuoto kontrolinio naviko ant CAM silpnai teigiama citoplazminė GFRB raiška. EP2-1M naviko audinio ($n = 10$) GFRB-teigiamų ląstelių kiekio mediana – 59,23 proc., ribos 51,45–79,01 proc., kontrolinio naviko ant CAM ($n = 1$) – 47,27 proc. (48,21–52,32). Ant CAM transplantuoti ependimomos audinio navikai nesusiformavo, išsi-skaidė CAM paviršiuje, dėl to imunohistocheminis tyrimas neatliktas.

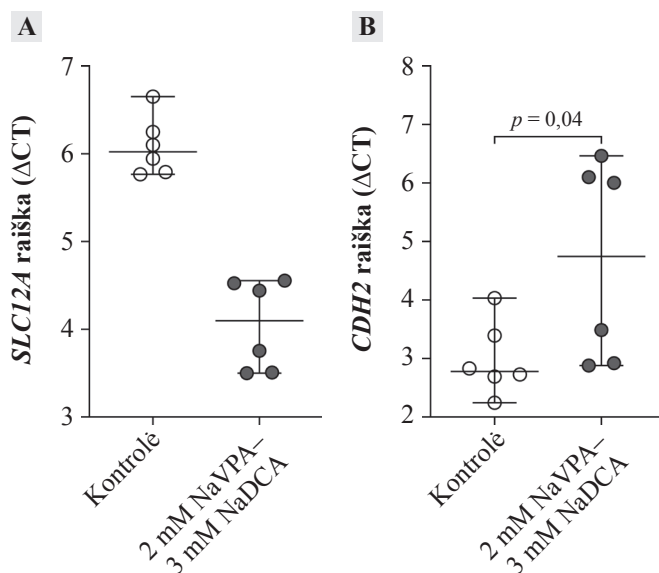
3.9.2. NaVPA–NaDCA poveikis pirminių ependimomos ląstelių *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* ir *CDH2* raiškai

EP2-1M paciento pirminių ependimomos ląstelių kontrolinės ir gydytų 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA grupių *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.9.2.1 lentelėje ir 3.9.2.1 paveiksle.

3.9.2.1 lentelė. EP2-1M paciento pirminių ependimomos ląstelių grupių *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SCL5A8*, *CDH1*, *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN			$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
		CT		ΔCT		
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
Kontrolė	6	27,37 ± 1,43	21,29 ± 1,29	6,08 ± 0,33		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	26,78 ± 1,07	20,73 ± 0,66	6,05 ± 1,69	–0,04	1,03
		<i>SLC12A5</i>	<i>GAPDH</i>			
Kontrolė	6	37,50 ± 1,24	21,29 ± 1,29	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	36,76 ± 1,08	20,73 ± 0,66	–	–	–
		<i>SLC5A8</i>	<i>GAPDH</i>			
Kontrolė	6	36,65 ± 1,21	21,29 ± 1,29	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	36,51 ± 0,89	20,73 ± 0,66	–	–	–
		<i>CDH1</i>	<i>GAPDH</i>			
Kontrolė	6	38,01 ± 0,74	21,29 ± 1,29	–		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	37,68 ± 0,46	20,73 ± 0,66	–	–	–
		<i>CDH2</i>	<i>GAPDH</i>			
Kontrolė	6	24,27 ± 0,86	21,29 ± 1,29	2,99 ± 0,63		
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	6	25,37 ± 1,08	20,73 ± 0,66	4,64 ± 0,56 ^a	1,66	0,32

^a $p = 0,04$, palyginus su EP2-1M kontrole.



3.9.2.2 pav. EP2-1M pirminių ependimomos ląstelių kontrolinės ir gydytų NaVPA–NaDCA deriniu grupių *SLC12A2* (**A**) ir *CDH2* (**B**) raiška

Horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

NaVPA–NaDCA nesukėlė reikšmingo poveikio EP2-1M paciento ląstelių *SLC12A2* raiškai. EP2-1M kontrolinių ląstelių *SLC12A5*, *SLC5A8* ir *CDH1* genų raiškos nenustatyta (raiškos nėra). Gydytas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nesukėlė poveikio *SLC12A5*, *SLC5A8* ir *CDH1* raiškai (raiška nenustatyta). Palyginus su kontroline grupe, *CDH2* raiška buvo reikšmingai mažesnė 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų EP2-1M ląstelių.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

GBM sergančių pacientų didelis mirtingumas yra susijęs su TMZ neveiksmingumu arba naviko įgytu atsparumu chemoterapijai [15, 87], lemiančio atkryčius ir blogą prognozę [16]. Tad svarbu ieškoti veiksmingesnių GBM gydymo būdų. Taikant GBM terapiją reikalingas individualizuotas požiūris – naviko jautrumas gydymui nustatomas ikiklinikiniais tyrimais dar prieš paskiriant chemoterapiją [459, 460]. GBM ląstelių pobūdis arba su gydymu susijęs poveikis ląstelių glikolizės pokyčiams gali būti vienas iš vėžio gydymo metodų [35, 304, 461]. *In vivo*, kombinuotas eksperimentinis gydymas DCA ir radioterapija pagerino pelių, sergančių ortotopine glioblastoma, išgyvenamumą, parodė, kad DCA gali padidinti GBM ląstelių jautrumą radioterapijai, veikdamas naviko ląstelių metabolizmą [316]. Pažanga individualizuoto GBM gydymo srityje yra glaudžiai susijusi su standartiniu gydymu. Todėl tiriamos naujos gydymo strategijos, įskaitant chemoterapiją vaistais, kurie veikia naviko metabolines ir molekulinės savybes. Poveikio naviko mitochondrinio metabolizmo mechanizmams taikymas yra galima vėžio gydymo strategija.

NaDCA yra specifinis PDK inhibitorius, slopinantis pieno rūgšties gamybą [310, 311] ir skatinantis naviko ląstelių apoptozę [312]. PDK atrankiai slopina PDH kompleksą, kuris reguliuoja glikolizės ir oksidacijos mechanizmus [33]. PDH inaktyvaciją palaiko GBM ląstelių padidėjęs PDK1 aktyvumas [306], kuris yra susijęs su atsparumu chemoterapijai [305]. *In vivo* eksperimentinių modelių NaDCA poveikio tyrimai rodo priešnavikinį preparato poveikį [319]. Taikant Balb/c neturinčių užkrūčio liaukos *nude* pelių patinėlių modelį, NaDCA labai slopino U87 ląstelių poodinių navikų augimą [315]. Kiti tyrėjai nenustatė DCA poveikio U87 naviko, implantuoto neturinčių užkrūčio liaukų *nude* patelių pelių smegenyse, augimui [316] ar neturinčių užkrūčio liaukos *nude* pelėms poodyje implantuoto U87 ląstelių ksenotransplanto augimui [314]. U87 ląstelių sferoidai buvo atsparūs 10 mM NaDCA gydymui [314].

Priešnavikinis VPA poveikis yra susijęs su I ir II klasių HDAC slopinimu [337]. VPA poveikis buvo tiriamas kartu su chemoterapija ir radioterapija [350, 352], chemoradioterapijos pradžioje arba po jos, siekiant padidinti chemoterapijos veiksmingumą GBM pacientams ir pagerinti jų bendrą vidutinį išgyvenamumą [363, 364]. VPA gerina radioterapijos veiksmingumą, didindamas GBM ląstelių jautrumą [350], ir aktyvina apoptozinį atsaką į radioterapiją [351]. Ikiklinikiniai tyrimai rodo NaDCA sinerginį poveikį kartu su chemoterapija gydant įvairias vėžio formas [319]. NaDCA derinio su kitais vaistais ikiklininis terapijos metodas suteikia galimybę daryti prielaidą, kad

jį galima būtų taikyti klinikiniam tyrimams [312, 314, 315]. Chemoterapijos ir HDAC inhibitoriaus VPA sinerginis poveikis yra perspektyvus GBM gydymo ir chemoterapijos atsparumo prevencijai metodas [88, 462].

Disertacinio darbo hipotezė – VPA gali sustiprinti DCA pernašą į ląstelę per demetilintą *SLC5A8* – VPA aktyvinant DCA nešiklio *SLC5A8* [254, 271]. Toks sinergizmas gali būti svarbus, nes jis leidžia sumažinti DCA dozę ir DCA dažniausiai sukeliančio nepageidaujamo poveikio – periferinės neuropatijos – riziką, kuri, gydant suaugusiuosius, susijusi su didesnėmis NaDCA dozėmis. Grįžtamosios neuropatijos, kaip nepageidaujamo vaisto poveikio pasireiškimas, priklauso nuo amžiaus (dėl su amžiumi susijusio lėtesnio DCA metabolizmo), ir priešingai – NaDCA dozę galima didinti vaikams be reikšmingo šalutinio poveikio rizikos [35, 463].

Norint patvirtinti GBM gydymo veiksmingumą, būtina suprasti vaistų veikimo ir atsparumo vaistams raidos mechanizmus, taip pat įvertinti vaistų poveikį vėžio prognozinių žymenų pokyčiams [464, 465].

Disertaciniame darbe NaVPA–NaDCA priešnavikinis poveikis patvirtintas neklinikiniais duomenimis, gautais taikant CAM modelio tyrimus, kuriais buvo vertinamas vaisto poveikis naviko augimui, neoangiogenezei, naviko invazijai ir naviko audinio žymenų raiškai. Šie duomenys palyginti su NaDCA ar TMZ poveikiu, atliekant histologinę ir IHC GBM analizę. Disertacinio darbo tyrimo duomenys rodo, kad CAM modelis yra vertinga priemonė tiriamojo vaisto *in vivo* veiksmingumui vertinti. Taikant CAM modelį, sėkmingas transplantuoto suformuoto naviko įsitvirtinimas garantuojamas neovaskuliarizacija, kuri garantuoja ksenotransplanto išgyvenimą [466–469]. Tyrimais įrodėme, kad papildomi kriterijai, leidžiantys įvertinti ksenotransplanto piktybinį pobūdį, yra naviko invazija į CAM, CAM sustorėjimas. Šie pokyčiai yra tiesiogiai susiję su suaktyvėjusia neoangiogeneze CAM mezenchimoje, taip pat su kancerogeneze susijusių žymenų pokyčiais naviko audinyje, taikant gydymą ne tik *in vivo* (vertinant su GBM susijusių žymenų raišką), bet kartu vertinant tiriamųjų vaistų poveikį navikinėms ląstelėms *in vitro* tyrimais. Ikiklinikinių tyrimų duomenys gali būti svarbūs parenkant individualizuotą chemoterapiją ir vertinant galimą jos veiksmingumą gydant GBM, palyginant tiriamųjų vaistų poveikį su TMZ poveikiu [132, 365, 455].

4.1. Tiriamųjų vaistinių preparatų poveikis U87 ir T98G navikams ant CAM bei U87 ir T98G ląstelėms

U87 ir T98G kontrolinių navikų bei kontrolinių (negydytų) ląstelių palyginimas. U87 ir T98G kontrolinių grupių navikų invazijos į CAM dažnumas, CAM storis ir neoangiogenezės raiška CAM mezenchimoje po naviku ar navikų PLBA ir EZH2 raiška nesiskyrė. U87-kontrolinės grupės navikų p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei T98G navikų ant CAM. Negydyti U87 ir T98G navikai lėmė reikšmingą CAM sustorėjimą.

SLC5A8 ir *CDH1* (genas, koduojantis E-kadherino baltymą) raiška U87 ir T98G-kontrolinėse ląstelėse buvo nepamatuojami (geno raiškos nėra). T98G ląstelės gali būti piktybiškesnės nei U87 ląstelės, nes *SLC12A2* (genas, koduojantis Na-K-2Cl nešiklį (NKCC1)) raiška buvo reikšmingai didesnė T98G nei U87 ląstelių, o *SLC12A5* (genas, koduojantis K-Cl nešiklį (KCC2)) raiška buvo išreikšta U87 ląstelėse; bet jos nebuvo galima aptikti T98G ląstelėse. *CDH2* (genas, koduojantis N-kadherino baltymą) raiška buvo reikšmingai didesnė T98G-kontrolinių ląstelių nei U87 ląstelių [365].

Tiriamųjų vaistinių preparatų poveikio U87 ir T98G navikams palyginimas. Gydyimo NaDCA, NaVPA–NaDCA arba TMZ poveikis priklausė nuo tiriamojo vaisto ir ląstelių linijos. Tai leido mums stebėti galimus skirtumus arba panašumus ir palyginti tiriamųjų vaistinių medžiagų poveikį U87 ir T98G ląstelių navikų karcinogenezei.

U87 navikų tyrimas rodo, kad gydymas NaDCA (10 mM, 5 mM ar 3 mM dozė) reikšmingai sumažino U87 naviko invazijos į CAM dažnumą [308, 310], kaip ir gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA (toliau – NaVPA–NaDCA), 100 μM TMZ arba 50 μM TMZ. 5 mM NaDCA ir 100 μM TMZ gydymo poveikis U87 navikų invazijai buvo reikšmingai didesnis nei 3 mM NaDCA. T98G naviko invaziją į CAM reikšmingai sumažino tik 10 mM NaDCA, 100 μM TMZ arba 50 μM TMZ. 100 μM TMZ gydymo poveikis T98G navikų invazijai buvo reikšmingai didesnis nei 3 mM NaDCA.

Ksenotransplantas sukelia uždegiminį atsaką CAM mezenchimoje [471–473]. Kontrolei naudojamas PBS tirpalas neaktyvino membranos, tačiau hiperosmoliariniai tirpalai lėmė CAM sustorėjimą [474]. U87-kontrolinių CAM storis nesiskyrė nuo gydytų 10 mM NaDCA membranos storio po naviku. CAM storį po U87 naviku reikšmingai sumažino 3 mM NaDCA ir 100 μM TMZ dozės. CAM storį po T98G naviku reikšmingai sumažino gydymas 10 mM ir 5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA ir 100 μM TMZ [365]. LSMU Histologijos ir embriologijos katedros mokslininkų tyrimas rodo, kad 10 mM dichloracetato aniono koncentracijos poveikis CAM sustorėjimui priklauso nuo preparato katijono (10 mM NaDCA ir 5 mM MgDCA): U87 navikų CAM storį reikšmingai daugiau sumažino 5 mM

MgDCA dozė [470]. CAM sustorėjimas yra neatsiejamas nuo neoangiogenezės [475]: navikas ant CAM skatina angiogenezę, kurios aktyvumas tiesiogiai susijęs su membranos mezenchimos storiu [471, 474].

Po 5 dienų, kai U87 ar T98G navikas buvo persodintas ant CAM, aplink ksenotransplantą susiformavo kraujagyslių tinklas. CAM angiogeneze apibūdinama kaip padidėjęs kraujo kapiliarų tankumas aplink transplantuotą naviką; neoplazinės ląstelės išskiria specifinius endotelio augimo veiksnius, citokinus ir chemokinus, skatinančius naujų kraujagyslių susiformavimą [466–468, 476–478]. U87 navikų tyrimas rodo, kad gydymas 5 mM NaDCA, 3 mM NaDCA, NaVPA–NaDCA, 100 μ M TMZ arba 50 μ M TMZ reikšmingai sumažino kraujagyslių skaičių CAM mezenchimoje. Kiti tyrėjai taip pat nurodo, kad NaDCA slopino angiogenezę *in vivo* [312]. NaVPA–NaDCA gydymo poveikis U87 navikų sukeltai neoangiogenezei buvo reikšmingai didesnis nei 3 mM NaDCA ir 50 μ M TMZ, o 100 μ M TMZ poveikis neoangiogenezei mezenchimoje nesiskyrė nuo NaVPA–NaDCA poveikio ir buvo reikšmingai didesnis nei 3 mM NaDCA. NaDCA monoterapija nesukėlė poveikio neoangiogenezei gydant T98G navikus. Neoangiogeneze buvo vienodai reikšmingai slopinama gydant T98G navikus 100 μ M TMZ, 50 μ M TMZ arba NaVPA–NaDCA [365].

Sinerginis derinio poveikis nustatytas U87 ir T98G ląstelių navikuose: kraujagyslių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87–NaVPA–NaDCA grupės nei U87–3 mM NaDCA grupės ir T98G–NaVPA–NaDCA grupės nei T98G–3 mM NaDCA grupės – tai rodo sinerginį NaVPA ir NaDCA poveikį.

PLBA iš pradžių buvo pripažintas kaip proliferuojančių ląstelių specifinis antigenas, nustatomas ląstelių branduoliuose ląstelių ciklo S fazės metu. Vėlesni tyrimai ir sisteminė apžvalga rodo, kad padidėjusi PLBA raiška yra tiesiogiai susijusi su naviko piktybiškumu, vėlyva GBM stadija, trumpu išgyvenamumu. Todėl šis žymuo buvo pasiūlytas kaip naudingas diagnostikos ar prognozės rodiklis, vertinant GBM gydymo veiksmingumą [141]. 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA, bet ne 3 mM NaDCA gydymas, sumažino U87 navikų PLBA raišką. 10 mM NaDCA ir 5 mM NaDCA gydymo poveikis U87 navikų PLBA raiškai buvo daug didesnis nei 3 mM NaDCA. Daman-skienė ir kt. nustatė, kad 10 mM ir 5 mM NaDCA dozės labai slopino PLBA raišką pediatriinių GBM PBT24 ir SF8628 ląstelių navikuose ant CAM [155]. Disertaciniame darbe pateikti tyrimai rodo, kad tik 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ gydymas reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų ląstelių skaičių U87 navike ant CAM. U87 navikų TMZ gydymo poveikis PLBA raiškai buvo daug didesnis nei 3 mM NaDCA ar NaVPA–NaDCA. Kiti tyrėjai nurodo, kad TMZ, vartojamas didelėmis dozėmis ($IC_{50} > 200 \mu$ M), nesukėlė U87 ląstelėms antiproliferacinio poveikio [154]. NaDCA monoterapija nesukėlė

poveikio T98G navikų PLBA raiškai. Vertinant gydymo poveikį PLBA raiškai, NaVPA–NaDCA poveikis T98G navikui ant CAM yra apibūdinamas sinerginiu kombinuotų komponentų poveikiu: NaVPA–NaDCA poveikis PLBA raiškai buvo daug didesnis nei 3 mM NaDCA. PLBA-teigiamų ląstelių dažnumas buvo reikšmingai mažesnis tuose T98G navikuose, kurie buvo gydyti 100 μ M TMZ, 50 μ M TMZ arba NaVPA–NaDCA, o 3 mM NaDCA nesukėlė poveikio T98G navikų PLBA raiškai. T98G navikų TMZ gydymo poveikis PLBA raiškai buvo daug didesnis nei 3 mM NaDCA.

TMZ chemoterapijos neveiksmingumas yra susijęs su daugiau nei 50 proc. GBM sergančių pacientų atsparumu TMZ [86], dažniausiai dėl MGMT aktyvumo, kuris susijęs su metiliniu ir apsaugo naviko ląsteles [96, 167]. MGMT raiškos mažinimas yra pagrindinis veiksnys, padedantis panaikinti gydymo TMZ atsparumą. Didelės TMZ dozės, skirtos MGMT aktyvumui mažinti, yra susijusios su dozę ribojančiu preparato toksiškumu [96, 98]. Įrodyta, kad MGMT reguliavimas apima *TP53* geno koduojamą p53 baltymą (p53), kuris yra vienas iš išsamiausiai ištirtų GBM taikinių [168]. Sumažėjusi MGMT raiška yra susijusi su p53 aktyvinimu [86, 169]. Palyginti su U87-kontrolinės grupės navikais, 10 mM ir 5 mM NaDCA, 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ gydymas reikšmingai sumažino p53-teigiamų ląstelių skaičių U87 navikuose, bet poveikio nesukėlė 3 mM NaDCA. U87 navikų TMZ gydymo poveikis p53 raiškai buvo reikšmingai didesnis nei 3 mM NaDCA ar NaVPA–NaDCA. Gydymas 10 mM ir 5 mM NaDCA reikšmingai sumažino p53-teigiamų ląstelių raišką T98G navikuose, o 3 mM NaDCA nesukėlė poveikio. T98G-100 μ M TMZ ir T98G-50 μ M TMZ navikuose buvo reikšmingai sumažėjęs p53-teigiamų ląstelių skaičius. Palyginti gydytos NaVPA–NaDCA ir kontrolinės grupės duomenys – T98G-p53-teigiamų ląstelių dažnumas navikuose nesiskyrė. T98G navikų 100 μ M TMZ gydymo poveikis p53 raiškai buvo daug didesnis nei 3 mM NaDCA ar NaVPA–NaDCA.

EZH2 yra polikombinio represinio komplekso 2 subvienetas, histono N-metiltransferazė, metilinti H3 liziną žinduolių ląstelėse ir slopinanti transkripciją [173, 174]. EZH2 slopina genus, atsakingus už karcinogenezės slopinimą, o EZH2 aktyvumo slopinimas gali sumažinti naviko augimą [176]. EZH2 yra priešnavikinių vaistų taikinytis [178]. EZH2 raiškos nustatymas navikuose, naudojant CAM modelį, yra informatyvus metodas [180, 181]. Gydymas 10 mM ir 5 mM NaDCA reikšmingai sumažino U87 navikų EZH2 raišką, o 3 mM NaDCA poveikio raiškai nesukėlė. Mūsų tyrimo duomenimis, gydymas 100 μ M TMZ ir 50 μ M TMZ reikšmingai sumažino EZH2-teigiamų ląstelių skaičių U87 navike, o gydymas 3 mM NaDCA arba NaVPA–NaDCA nesukėlė poveikio EZH2 raiškai. Kita vertus, EZH2-teigiamų ląstelių skaičius T98G navikuose buvo reikšmingai panašiai sumažėjęs po gydymo 100 μ M TMZ, 50 μ M TMZ arba NaVPA–NaDCA. NaVPA–NaDCA

ir TMZ gydymo poveikis T98G navikų EZH2 raiškai buvo daug didesnis nei 3 mM NaDCA.

PLBA- ir EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis T98G-NaVPA-NaDCA grupės nei T98G-3 mM NaDCA – tai rodo sinerginį NaVPA ir NaDCA poveikį, gydant T98G navikus ant CAM.

Tiriamųjų vaistinių preparatų poveikio U87 ir T98G ląstelių tirtų genų raiškai palyginimas. Na-K-Cl nešiklis (NKCC1) perneša Na^+ , K^+ ir Cl^- į ląstelę; NKCC1 koduoja *SLC12A2* genas [212, 213]. NKCC1 aktyvumas yra tiesiogiai susijęs su GBM ląstelių proliferacija, kuri yra tiesiogiai susijusi su NKCC1 baltymo raiška žmogaus GBM audinyje [59, 215, 220]. Gydant vėžį, naviko viduląstelinė Cl^- koncentracija ($[\text{Cl}^-]_i$) yra gydymo taikiny: NKCC1 slopinimas, t. y. $[\text{Cl}^-]_i$ mažėjimas, gali slopinti naviko ląstelių proliferaciją ir skatinti apoptozę [225, 226]. Tiriamieji vaistiniai preparatai nesukėlė poveikio *SLC12A2* raiškai tirtose U87 ląstelių grupėse. Gydymas 3 mM NaDCA ir NaVPA-NaDCA labai sumažino T98G ląstelių *SLC12A2* raišką, o 1,5 mM NaDCA ir 50 μM TMZ nesukėlė poveikio geno raiškai. T98G ląstelių 3 mM NaDCA gydymo poveikis *SLC12A2* raiškai buvo reikšmingai didesnis nei 1,5 mM NaDCA.

GBM ląstelių $[\text{Cl}^-]_i$ homeostazės sutrikimas yra susijęs su padidėjusiu NKCC1 aktyvumu [219]. Galima NKCC1 funkcija yra dalyvavimas gliomos ląstelių proliferacijoje, kai yra didelė NKCC1 raiška [215]. Padidėjusi Na^+ koncentracija kraujyje gali aktyvinti NKCC1 [216]. Na^+ ir Cl^- jonai naviko mikroaplinkoje susiję su vėžio progresavimu [214, 215].

KCC2 yra nustatomas CNS ląstelėse; jo genas koduojamas *SLC12A5* [236, 237]. KCC2 išneša K^+ ir Cl^- jonus iš ląstelės [238]. KCC2 raiška yra sumažėjusi GBM ląstelėse; padidėjusi KCC2 raiška GBM ląstelėse slopina GBM ląstelių proliferaciją. KCC2 yra gliomos slopintojas [242]. Mūsų tyrimai parodė, kad NaVPA-NaDCA gydymas padidino *SLC12A5* raišką U87 ir T98G ląstelėse, o 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA arba 50 μM TMZ neturėjo įtakos *SLC12A5* raiškai tirtose ląstelėse. Tai rodo NaVPA-NaDCA pranašumą prieš TMZ [232]. *SLC12A5* raiška susijusi su gliomos U251 MG ląstelių proliferacijos slopinimu, o genas yra galimas GBM prognozinis žymuo; *SLC12A5* aktyvinimas yra ankstyvas ląstelių apoptozės požymis [242].

Monokarboksilatų nešiklis (SLC5A8) yra žmogaus ir eksperimentinių gliomų slopintojas, koduojamas *SLC5A8*, jo aktyvumas priklauso nuo viduląstelinės Na^+ ir Cl^- koncentracijos [250, 251]. Žiurkių patinų dvylikapirštės žarnos enterocitų *SLC5A8* aktyvinimas yra susijęs su NKCC1 aktyvumu [268]. *SLC5A8* aktyvina žmogaus gaubtinės žarnos vėžio SW620 ląstelių apoptozę per piruvato priklausomą HDAC slopinimą [254]. Tyrimai su suaugusių pelių patinėlių laukinio tipo *c/ebpδ*^{+/+} ir *c/ebpδ*^{-/-} parodė, kad *SLC5A8* perneša trumpųjų grandinių riebalų rūgštis į inkstų proksimalinių

vingiuotųjų kanalėlių epitelio ląstelę [256, 257]. Nešiklis perneša pieno rūgštį, piruvatą, acetatą, propionatą, valeratą, butiratą ir DCA į ląsteles [250, 254]. Mūsų tyrimai parodė, kad *SLC5A8* raiška neišreikšta (nenustatyta) kontrolinėse U87 ir T98G ląstelėse. 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA arba 50 μM TMZ neturėjo įtakos geno raiškai šiose ląstelėse. Gydydas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA padidino *SLC5A8* raišką U87 ląstelėse, bet nesukėlė poveikio T98G ląstelių geno raiškai. *SLC5A8* slopinimas yra susijęs su DNR metiliniu [252]; navikų ląstelių gydymas DNR demetilinimo preparatais padidina *SLC5A8* raišką [254]. VPA aktyvina genus, reguliuojamus DNR metiliniu [270, 271]; VPA padidino *SLC5A8* raišką U87, bet ne T98G ląstelėse [232, 251].

Kadherinai reguliuoja apoptozę, ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir migravimą [275]. *CDH1* nebuvo nustatytas (raiška neišreikšta) U87 ir T98G ląstelėse [365]. *CDH1* koduoja ląstelių adhezijos baltymą E-kadheriną, kuris yra naviko slopintojas [275], jo pokyčiai susiję su specifinių epitelinių navikų raida [276]. Gliomose *CDH1* raiška yra maža arba raiška dažniausiai nenustatoma dėl hipermetilavimo ir mažėja didėjant GBM stadijai [295, 296]. N-kadherino genas (*CDH2*) yra nustatomas GBM ir tiesiogiai koreliuoja su naviko laipsniu [59, 275, 299]. Disertaciniame darbe pateikta, kad gydymo poveikis tirtais vaistiniais preparatais turėjo skirtingą poveikį genų raiškai, kuris priklausė nuo ląstelių linijos: nesukėlė poveikio U87 ląstelių *CDH1* ir *CDH2* raiškai. Gydydas NaVPA–NaDCA padidino *CDH1* raišką T98G ląstelėse, o NaDCA ir 50 μM TMZ neturėjo įtakos geno raiškai. Gydydas 3 mM NaDCA, 1,5 mM NaDCA ir NaVPA–NaDCA labai sumažino T98G ląstelių *CDH2* raišką; T98G ląstelių, gydytų NaVPA–NaDCA, *CDH2* raiška buvo reikšmingai mažesnė nei TMZ gydytų ląstelių.

Disertacinio darbo ląstelių linijų tyrimo ribotumas – tirtos tik dviejų GBM ląstelių linijų ląstelės. Tačiau duomenys rodo, kad tiriamųjų vaistinių preparatų poveikis tirtoms U87 ir T98G ląstelėms skiriasi. Vaisto veiksmingumo nustatymas, naudojant ląstelių linijų ksenotransplantus ant CAM, yra ribotas, nes komercinės GBM ląstelės tiksliai neatspindi GBM genetinio ir biologinio heterogeniškumo [302]. Literatūroje nurodoma, kad GBM ant CAM modeliu tirtos pirminės GBM ląstelės išlaiko pacientų naviko histologines ir genetines savybes, o CAM modelis gali leisti prognozuoti pacientų gydymo klinikinius rezultatus [456] – tai skatina tirti tiriamųjų vaistų poveikį, naudojant pirmines paciento GBM ląsteles.

4.2. NaVPA–NaDCA individualaus poveikio pacientų pirminių GBM ląstelių navikams ant CAM ir GBM pirminėms ląstelėms *in vitro* tyrimo duomenų palyginimas

Tirtų GBM pacientų pirminių ląstelių kontrolinių navikų ant CAM ir pirminių GBM ląstelių (negydytų) palyginimas. Iš viso tirti 5 GBM sergantys pacientai: GBM2-2F (48 m. moteris), GBM2-3F (82 m. moteris) ir GBM2-4M (46 m. vyras), GBM2-5F (68 m. moteris) ir GBM2-6M (76 m. vyras). Visų pacientų GBM pagal PSO klasifikaciją buvo IV laipsnio, IDH-laukinio tipo, visais atvejais buvo stipri naviko audinio citoplazminė GFRB raiška. Visiems pacientams diagnozė buvo nustatyta pirmą kartą, o iki operacijos pacientai nebuvo gavę priešnavikinio gydymo. GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M ląstelės (trijų GBM pacientų) tirtos CAM modeliu; GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M (keturių pacientų) pirminių ląstelių *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* ir *CDH2* raiška tirta *in vitro*.

Tirtų kontrolinių grupių navikų ant CAM histologinės ir IHC analizės duomenimis, nustatyti suformuotų navikų kai kurie morfologiniai skirtumai: GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M kontrolinių navikų grupių invazijos į CAM dažnumas ir neoangiogenezės raiška CAM mezenchimoje po naviku bei GFRB ir p53 raiška nesiskyrė, o GBM2-3F kontrolinės grupės CAM storis, PLBA ir EZH2 raiška buvo reikšmingai didesnė nei GBM2-4M kontrolinės – tai galėtų rodyti GBM2-3F didesnę piktybiškumą.

Pagal tirtų genų raišką, GBM2-2F ląstelės gali pasižymėti didesniu piktybiškumo potencialu nei GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelės, nes *SLC12A2* ir *CDH2* raiška buvo reikšmingai didesnė GBM2-2F ląstelių nei GBM2-4M, GBM2-5F ar GBM2-6M ląstelių, o GBM2-2F ląstelių *SLC12A5*, *SLC5A8* ir *CDH1* raiška buvo neišreikšta (nenustatyta). GBM2-6M ląstelės gali būti piktybiškesnės nei GBM2-5F ląstelės, nes GBM2-6M ląstelių *SLC12A5* raiška buvo nenustatyta, o *CDH1* raiška buvo reikšmingai didesnė GBM2-5F ląstelių. Kaip nurodyta aukščiau ir Literatūros apžvalgos 1.4 skyriuje, padidėjusi *SLC12A2* ir *CDH2* raiška susijusi su naviko ląstelių proliferacija, migracija, o padidėjusi *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* raiška – su naviko augimo slopinimu ir apoptoze.

NaVPA–NaDCA poveikio pacientų pirminių GBM ląstelių navikams palyginimas. Tiriamas NaVPA–NaDCA poveikis pacientų GBM pirminių ląstelių formuotų navikų augimui ant CAM, naviko audinio GFRB, PLBA, p53, EZH2, vimentino raiškai, naviko ląstelių *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, *CDH2* raiškai buvo individualus [455].

Gydymas NaVPA–NaDCA reikšmingai sumažino GBM2-2F ir GBM2-4M pirminių ląstelių navikų invazijos į CAM dažnumą, bet nesukėlė poveikio GBM2-3F navikų invazijai į CAM.

Gydymas NaVPA–NaDCA nesukėlė poveikio GBM2-2F ir GBM2-3F navikų CAM storiui, bet reikšmingai sumažino GBM2-4M membranos storį.

Gydymas NaVPA–NaDCA nesukėlė poveikio GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikų kraujagyslių skaičiui CAM po naviku, skaičiuojant kraujagysles, kurių skersmuo 10 μm ir didesnis. Tačiau neoangiogenezę slopinantis derinio poveikis stebėtas visais atvejais, tiriant kraujagyslių tinklo raišką CAM aplink naviką fluorescenciniu dekstranu.

GFRB yra nustatomas žmogaus GBM ląstelėse ir GBM kamieninėse ląstelėse, ir vertinamas kaip GBM histologinio identifikavimo žymuo [123]. Palyginta GFRB-teigiamų ląstelių procentinė dalis paciento GBM naviko audinyje ir navike, suformuotame iš to paties paciento naviko ląstelių ant CAM. Nenustatyta žymens raiškos skirtumo. GFRB teigiamų ląstelių dažnumas nesiskyrė palyginus GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM-4M naviko audinių GFRB raišką. Tai rodo, kad GBM kontroliniai navikai, suformuoti iš pacientų pirminių GBM ląstelių ant CAM, išlaiko naviko imunohistocheminę GFRB raišką, kuri būdinga paciento naviko audiniui.

GFRB baltymas dalyvauja citoskeleto pertvarkymo procesuose, jo vaidmuo svarbus GBM ląstelių mitochondrijoms reaguojant į proapoptozinį signalą, susijęs su GBM progresavimu [126]. IHC tyrimai parodė, kad GFRB raiškos lygis GBM navikuose buvo susijęs su blogesniu išgyvenamumu: suaugusių GBM sergančių pacientų tyrimų duomenimis, GFRB ≥ 75 proc. lėmė daug blogesnę išgyvenamumą, neatsižvelgiant į *MGMT* promotoriaus (pradininko) metilinimo būklę ar *IDH1* mutacijas. Todėl buvo padaryta prielaida, kad kiekybinis IHC GFRB vertinimas galėtų būti naujas biologinis žymuo, leidžiantis prognozuoti GBM pacientų išgyvenamumą [127]. Kiti tyrėjai teigia: nėra stiprios koreliacijos tarp GFRB ir astrocitomos auglio piktybiškumo; GFRB-teigiamos naviko populiacijos yra labai heterogeniškos ir GFRB izoformų GFRB δ ir GFRB α diferencijavimas galėtų pagerinti piktybinio naviko būklės vertinimą [123].

GFRB kiekio padidėjimas yra aiškus reaktyviųjų astrocitų persitvarkymo požymis. Reaktyvieji astrocitai yra pagrindiniai uždegimo reguliatoriai gliomos raidos metu, formuojantys GBM mikroaplinką. GBM astrocitai aktyvinasi ir reguliuoja naviko mikroaplinkos ląsteles per ląstelių tarpusavio sąveiką arba prouždegiminių citokinų, chemokinų ir kitų aktyvių medžiagų sekreciją [130]. NaVPA–NaDCA mažina uždegimą, slopindamas prouždegiminius citokinus ir chemokinus [28, 29], gali neutralizuoti veikliųjų medžiagų poveikį GBM mikroaplinkoje ir pakeisti GFRB baltymo raišką naviko ląstelėse. 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydymas labai sumažino GFRB-teigiamų ląstelių skaičių GBM2-3F ir GBM2-4M navikuose ant CAM, tačiau nesukėlė poveikio GBM2-2F naviko žymens raiškai. Naudojant *Ezh2cKO* pelių modelį nustatyta, kad *EZH2* išsekimas (angl. *depletion*) astrocituose

reikšmingai padidina GFRB raišką [131]. GFRB-teigiamų ląstelių skaičių vertinant kaip astrocitų proliferacijos požymį, GFRB raiškos tyrimas turėtų būti vertinamas kartu su proliferacijos žymenimis, tokiais kaip PLBA, Ki-67 ar kitais [130].

LSMU Histologijos ir embriologijos katedros ir Kardiologijos instituto tyrėjų duomenimis, GFRB geno raiška skiriasi palyginus pirmines GBM ląsteles: GBM5-1F ir GBM5-3F rodo didesnę *GFRB* raišką nei GBM5-2F. Gydytas NaVPA–NaDCA labai padidino GFRB geno raišką GBM5-2F ląstelėse, ją labai sumažino GBM5-3F ląstelėse ir nesukėlė poveikio geno raiškai GBM5-1F ląstelėse, o TMZ neturėjo poveikio visų tirtų ląstelių *GFRB* raiškai [132]. Kiti tyrėjai nurodo pacientų, sergančių IV laipsnio GBM, trumpesnio išgyvenamumo koreliaciją su padidėjusios GFRB transkripcijos aktyvumu. Panašiai PGR analizė parodė tendenciją, kad pacientų, sergančių IV laipsnio astrocitoma, trumpesnis išgyvenamumas yra susijęs su didesne GFRB mRNA raiška. REMBRANDT duomenų bazė taip pat patvirtino ryšį tarp ilgesnio gliomos pacientų išgyvenamumo ir sumažėjusios GFRB mRNA raiškos. Taigi GFRB raiškos tyrimai gali turėti klinikinę reikšmę, nes GFRB gali būti naudojamas kaip gliomos prognozinis žymuo [127, 133].

PLBA tyrimai rodo, kad padidėjusi PLBA raiška yra susijusi su piktybinių navikų savybėmis, didesniu GBM laipsniu ir bloga prognoze. Be to, PLBA pokyčiai naviko gydymo metu gali rodyti gydymo veiksmingumą [141–143]. Po naviko operacijos, net supramarginalinės rezekcijos atveju, neišvengiamai lieka naviko ląstelių. Likusios GBM ląstelės išlaiko proliferacijos, invazines savybes, o tai rodo veiksmingos chemoterapijos svarbą slopinant naviko progresavimą [153]. Kontrolinių grupių palyginimas parodė, kad GBM2-4M turi daug mažesnę PLBA-teigiamų ląstelių raišką nei GBM2-2F ir GBM2-3F. Gydytas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA labai sumažino PLBA-teigiamų ląstelių skaičių visuose tirtuose GBM pirminių ląstelių ant CAM navikuose. Po gydymo deriniu PLBA-teigiamų ląstelių dažnumas buvo daug didesnis GBM2-2F navikuose nei GBM2-3F ir GBM2-4M navikuose, o žymens raiška buvo daug mažesnė GBM2-4M navikų, palyginti su GBM2-3F navikais.

PLBA nustatomas tik besidauginančiose ląstelėse, o žymens raiška didėja kartu su GBM laipsniu [141]. Mokslininkai nustatė, kad suaugusių pacientų gliomose PLBA yra nepriklausomas prognozinis požymis, o padidėjusi jo raiška navike koreliavo su sumažėjusiu pacientų išgyvenamumu [141]. Vaikų ir suaugusiųjų metastazinėms arba recidyvuojančioms aukšto laipsnio gliomoms būdinga didesnė PLBA raiška [141, 145], kurios nustatymas leidžia įvertinti vėžio gydymo veiksmingumą, tiriant CAM modeliu [146].

Kaip pateikta anksčiau, NaVPA–NaDCA poveikis PLBA raiškai T98G ląstelių navikuose ant CAM yra sinerginis: PLBA-teigiamų ląstelių kiekis

buvo labai sumažėjęs navikuose, gydytuose NaVPA–NaDCA, o 3 mM NaDCA neturėjo įtakos žymens raiškai; NaVPA–NaDCA ir 50 μ M TMZ poveikis T98G navikams buvo panašus [365]. PLBA susiję kompleksai ir p53 aktyvumo reguliavimas yra glaudžiai susiję per p53 signalinį kelią [147, 148].

p53 mutacijos sukelia disfunkcinio p53 baltymo kaupimąsi GBM audinyje, o natūralus (laukinis) p53 yra sunaudojamas ir nesikaupia naviko audiniuose [158, 159]. IHC metodas atskleidė p53-teigiamas ląsteles GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M kontroliniuose navikuose, tačiau, palyginus jų žymens raišką, nenustatyta skirtumų. Mutavęs p53 baltymas gali įgyti onkogeninių savybių ir veikti kaip dominuojantis natūralaus tipo p53 naviko slopiklis ir apoptozės kelių inhibitorius GBM ląstelėse [161]. Rengiant vėžio gydymo strategijas, svarbu apsvarstyti terapijas, nukreiptas į mutavusius p53 baltymus naviko audinyje [159, 170–172]. 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA labai sumažino p53-teigiamų ląstelių dažnumą GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikuose ant CAM, be jokio skirtumo palyginus gydytų navikų grupes. Remiantis ankščiau aprašytų mūsų tyrimų duomenimis, 3 mM NaDCA ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA nesukėlė poveikio p53 raiškai U87 ir T98G ląstelių navikuose ant CAM; gydymas 50 μ M TMZ labai sumažino p53-teigiamų ląstelių skaičių tirtose navikų grupėse, o p53 raiška T98G ląstelėse nesiskyrė palyginus 50 μ M TMZ ir 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA gydytų grupių [365].

EZH2 raiška GBM ląstelėse koreliuoja su aukšto laipsnio GBM, kuri susijusi su blogesniu paciento išgyvenamumu [179, 479]. EZH2 aktyvumas susijęs su GBM naviko supresorių slopinimu ir naviko progresavimu [183]. EZH2-teigiamų ląstelių dažnumas tirtų GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M kontrolinėse navikų grupėse svyravo tarp 58,11 proc.–91,11 proc. Gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA labai sumažino EZH2-teigiamų ląstelių skaičių GBM2-2F, GBM2-3F ir GBM2-4M navikuose ant CAM. EZH2 slopinimas tiriamas kaip gydymo taikinyss [177]. Ikiklinikiniais tyrimais *in vivo* ir *in vitro* nustatyta, kad EZH2 inhibitorius GSK126 slopino pirminių ir kamieninių GBM ląstelių gyvybingumą, silpnino agresyvų piktybinį fenotipą, ląstelių migravimą ir invaziją [188]. CCL2⁺ piktybinių ląstelių ir IL-10⁺ su naviku susijusių makrofagų sąveika naviko mikroaplinkoje per EZH2-FOSL2-CCL2 ašį, yra svarbi GBM mezenchiminės transformacijos keliams [190]. LSMU Histologijos ir embriologijos katedra ir Kardiologijos institutas atliko SARS-CoV-19 ir pneumonija sergančių pacientų T limfocitų tyrimus. Nustatyta, kad NaVPA–NaDCA labai sumažina chemokino CCL2 ir IL-10 geno raišką T ląstelėse [29]. EZH2 inhibitorių taikymą GBM modeliams būtina toliau tirti, nes EZH2 slopinimas taip pat gali paveikti naviko slopiklių ir kitų

signalinių kelių reguliavimą [191]. EZH2 sąveikauja su MYC, PTEN onkogenais ir veikia piktybinį naviko pobūdį – aktyvina ląstelių EMT procesą, sukelia GBM ląstelių invaziją ir metastazes [175].

CAM modelis yra tinkamas tiriamųjų vaistų, skirtų slopinti EZH2 vėžio raidos molekulinės grandis, tyrimams [180, 181]. EZH2 slopina genus, sukeliančius navikus, o EZH2 aktyvumo slopinimas gali sumažinti naviko augimą [176]. EZH2 raiškos slopinimas buvo didžiausias U87 naviko, gydyto 5 mM MgDCA. Vertinant pagal EZH2 raišką, suaugusiųjų U87 ląstelių navikas yra jautresnis gydymui MgDCA nei vaikų PBT24 ląstelių navikas [470]. Šešių tyrimų metaanalizė parodė, kad EZH2 padidėjusi raiška yra susijusi su bloga aukšto laipsnio vaikų ir suaugusiųjų gliomos prognoze [182].

RNR sekoskaitos duomenimis, vimentino raiška OKSFOS atspariose GBM ląstelėse yra didelė ir vimentinas svarbus naviko progresavimui, dalyvauja imunoterapijos slopinimo procesuose, reguliuoja vėžio kamieninių ląstelių savybes ir susijęs su atsparumo vaistams raida [200]. Vimentino raiškos GBM navikų ant CAM duomenimis, nustatytas didelis kintamumas: vimentinui-teigiamų ląstelių dažnumas – 45,85 proc. GBM2-2F, 26,91 proc. GBM2-3F ir 79,00 proc. GBM2-4M kontroliniuose navikuose. 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA reikšmingai sumažino vimentinui-teigiamų ląstelių skaičių tirtuose navikuose ant CAM. Vimentinas yra pagrindinis EMT proceso žymuo, skatinantis mezenchiminį naviko fenotipą [201]. Vimentino raiškos padidėjimas navikuose yra susijęs su EMT, kuriam būdingas ląstelių adhezijos praradimas [204]. Kai kuriais tyrimais nustatytas gydymo TMZ atsparumo ir vimentino raiškos ryšys [206]. EMT procesas ne tik sukelia GBM atsparumą vaistams, bet ir didina naviko invaziją [208]. GBM sergančių pacientų GFRB ir vimentino imunofluorescencijos tyrimas parodė progresyvų vimentino raiškos padidėjimą, kuris koreliuoja su aukštesniu naviko laipsniu. Vimentinui-teigiamos ląstelės buvo iš dalies kolokalizautos su GFRB-teigiamomis ląstelėmis. Vadinasi, GFRB-teigiamos ir vimentinui-teigiamos ląstelės yra susijusios su GBM progresavimu ir gali turėti įtakos naviko invazijai. Vimentino raiška yra atvirkščiai proporcinga glioma sergančių pacientų būklės prognozei [209]. Gydant GBM, vimentinas laikomas perspektyviu terapiniu taikiniu [200, 211].

NaVPA–NaDCA poveikio pacientų pirminių GBM ląstelių tirtų genų raiškai *in vitro* palyginimas. Tirtų GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M pacientų pirminių ląstelių kontrolinių grupių *SLC12A2* geno raiškos lygis skyrėsi. Palyginus tirtų ląstelių grupių *SLC12A2* reikšmės nustatyti skirtumai: GBM2-2F > GBM2-5F = GBM2-4M > GBM2-6M (> – skirtumas reikšmingas).

Gydymas 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA reikšmingai sumažino *SLC12A2* raišką tik GBM2-4M ląstelių, o gydymas deriniu reikšmingai padidino

GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelių *SLC12A2* raišką. NaVPA–NaDCA nesukėlė poveikio GBM2-2F ląstelių *SLC12A2* raiškai. Palyginus tirtas ląsteles, deriniu gydytų ląstelių *SLC12A2* raiška skyrėsi: GBM2-2F > GBM2-5F = GBM2-6M = GBM2-4M (> – skirtumas reikšmingas).

Damanskienė ir kt. *in vitro* tyrimais nustatė, kad TMZ labai padidino pediatriinių PBT24 ir SF8628 GBM ląstelių *SLC12A2* raišką [228]. TMZ gali aktyvinti GBM ląstelių *SLC12A2* raišką, kuri susijusi su WNK kinazės baltymo fosforiliniu, ir tai yra individualus poveikis [229]. Žmogaus GBM ląstelėms būdingas padidėjęs NKCC1 ir nešiklį reguliuojančių dviejų kinazų – WNK1 ir OSR1 – aktyvumas. WNK1 arba OSR1 slopinimas sumažina viduląstelinę K^+ ir Cl^- koncentraciją. TMZ gali aktyvinti WNK1/OSR1/NKCC1 kelią ir taip sustiprinti gliomos ląstelių migravimą. Farmakologinis NKCC1 nešiklio slopinimas inhibitoriais, slopinant WNK1/OSR1/NKCC1 signalinį kelią, labai sumažina gliomos ląstelių migravimą gydant TMZ [61, 218, 224]; specifinis NKCC1 inhibitorius bumetanidas slopina gliomos ląstelių migravimą ir invaziją [230].

NaDCA mažina NKCC1 geno raišką žiurkių timocituose [234]. Žmogaus GBM ląstelės kaupia Cl^- anijonus: $[Cl^-]$; koncentracija yra apie 10 kartų didesnė už vidutinę anijono koncentraciją neuronų ląstelėse. Žmogaus gliomos ląstelių NKCC1 baltymo raiška tiesiogiai koreliuoja su naviko laipsniu [218].

Kontrolinių GBM2-2F, GBM2-4M ir GBM2-6M grupių ląstelių *SLC12A5* raiška buvo neišreikšta (nenustatyta), o GBM2-5F ląstelėse geno raiška buvo nustatoma. Gydymas deriniu aktyvino GBM2-4M, GBM2-5F, GBM2-6M ląstelių geno raišką, o GBM2-2F ląstelių geno raiškai poveikio neturėjo. Po gydymo deriniu tirtų ląstelių grupių geno raiška reikšmingai skyrėsi: GBM2-5F > GBM2-6M > GBM2-4M.

Kaip buvo rašyta, KCC2 nešiklio aktyvumas tiesiogiai yra susijęs su ląstelių apoptoze. Be to, suaugusių GBM pacientų, sergančių epilepsija, histologiniuose mėginiuose naviko aplinkoje yra sumažėjęs KCC2 raiškos lygis [247, 248]. NKCC1 ir KCC2 aktyvumo pusiausvyros sutrikimai gali sumažinti GABA hiperpoliarizuojamąjį poveikį. Tai gali būti susiję su GBM pacientų epilepsijos židinių aktyvinimu: epilepsijos priepuoliai blogina GBM ligos eigą [480]. Vaistai, aktyvinantys GBM ląstelių KCC2, gali didinti GABA A receptorių funkcinį aktyvumą [237] ir taip padėti kontroliuoti traukulių priepuolius, jų intensyvumą [249].

SLC5A8 raiška GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M kontrolinėse ląstelėse nebuvo nustatoma. Gydymas deriniu nesukėlė poveikio tirtų ląstelių *SLC5A8* raiškai.

GBM2-2F kontrolinių ląstelių *CDH1* raiška buvo neišreikšta (nenustatyta), o palyginus tarpusavyje GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F ir

GBM2-6M kontrolinių grupių ląstelių *CDH1* raiškos lygį, jis skyrėsi reikšmingai: GBM2-5F > GBM2-4M > GBM2-6M.

Gydymas deriniu reikšmingai padidino *CDH1* raišką GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelių, o GBM2-2F ląstelių geno raiškai poveikio neturėjo (išliko neišreikšta). Palyginus deriniu gydytas ląsteles, tirtų ląstelių grupių geno raiška reikšmingai skyrėsi: GBM2-5F > GBM2-4M > GBM2-6M.

GBM progresavimas ir atsparumas gydymui yra susiję su GBM ląstelių EMT mechanizmais, kur E-kadherino raiška yra sumažėjusi, o N-kadherino raiška yra padidėjusi [302], todėl įgyjamas mezenchiminis naviko potipis, kuris yra labiau invaziškesnis ir atsparesnis gydymui [275, 299]. Mūsų tyrimo duomenimis, NaVPA–NaDCA reikšmingai padidino *CDH1* raišką GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelėse, t. y. didino naviko slopiklio *CDH1* aktyvumą, ir toks poveikis susijęs su EMT progresavimo slopinu.

Visų tirtų GBM pacientų kontrolinių ląstelių *CDH2* raiška buvo nustatoma; ji skyrėsi lyginant tirtas kontrolines grupes: GBM2-2F > GBM2-6M = GBM2-4M > GBM2-5F (> – skirtumas reikšmingas).

Gydymas deriniu reikšmingai sumažino *CDH2* raišką GBM2-4M ląstelių, bet nesukėlė poveikio GBM2-2F, GBM2-5F ir GBM2-6M pacientų ląstelių *CDH2* raiškai. Deriniu gydytų ląstelių *CDH2* raiška, palyginus tirtas grupes, rodė reikšmingus skirtumus: GBM2-2F > GBM2-5F > GBM2-6M > GBM2-4M.

Svarbu aptarti CAM modelio pranašumus, palyginti su tradiciniais paciento naviko ksenotransplanto PNK (angl. *patient-derived xenograft*; PDX) modeliais, kuriuose pacientų naviko ląstelės ar naviko fragmentai implantuojami imunodeficitą turinčioms pelėms. Pastarieji modeliai yra pagrindinis ikiklinikinio ir klinikinio vaistų vertinimo būdas, nes geriau nei ląstelių linijos ar genetiškai modifikuotos pelės išsaugo pagrindines pirminio naviko histopatologines ir genetines savybes [481]. Svarbi tyrimų kliūtis yra ribotas graužikų modelių naudojimas persodinant PNK, nes iš pacientų paimtos pirminės naviko ląstelės dažnai neauga šiuose gyvūnuose [122]. Be techniškai sudėtingo ortotopinio smegenų auglių modelio, žmogaus gliomos fragmentų prigijimas pelėms yra labai mažas. Pakartotiniai audinių perkėlimai į peles gali pakeisti žmogaus auglio mikroaplinką pelės komponentais, o tai gali pakeisti reakciją į vaistus [482, 483]. Pažymėtina, kad vimentino raiška neatitinka pacientų mėginių su pelėms persodintais navikais [209]. Sėkmingas GBM implantacijos ant CAM rodiklis buvo 98,3 proc. [456], o heterotopiniuose pelių PNK gliomos modeliuose sėkmės rodikliai svyravo tarp 38–69 proc. [302, 484]. Ortotopinio smegenų naviko modelio sėkmės rodiklis buvo 76–90 proc. [485, 486]. Tačiau ilgalaikė problema – GBM-PNK modelių kūrimas, nes jie yra beveik visiškai nesėkmingi implantuojant

IDH1 mutacijų turinčius mėginius pelėms [484, 487]. Priešingai, PNK-CAM metodas beveik visada yra tinkamas, neatsižvelgiant į gliomos *IDH* statuso būklę [456, 466]; pacientų ksenotransplantai beveik visada gerai prigyja ant CAM [456]. PNK-CAM rezultatai gaunami per savaitę, o PNK tyrimai su graužikais trunka kelis kartus ilgiau. Tyrimai rodo CAM modelio pranašumus, palyginti su graužikų modeliais. LSMU Histologijos ir embriologijos katedroje atlikti tyrimai rodo, kad CAM modelio ir tiriamųjų vaistų poveikio GBM ląstelių genų raiškai tyrimų derinimas yra tinkamas būdas vertinti vaisto veiksmingumą. Tyrimo rezultatai rodo individualizuoto vaistų poveikio vertinimo svarbą ir būtinybę atlikti tolesnius tyrimus su GBM pacientų pirminėmis ląstelėmis, vykdant individualizuotus tyrimus, siekiant veiksmingo GBM gydymo.

Pažanga individualizuoto GBM gydymo srityje yra glaudžiai susijusi su standartiniu gydymu. Todėl tiriamos naujos gydymo strategijos, įskaitant chemoterapiją vaistais, kurie veikia naviko metabolines ir molekulinės savybes. Norint patvirtinti GBM gydymo veiksmingumą, būtina suprasti vaistų veikimo mechanizmus ir atsparumą vaistams, taip pat įvertinti vaistų poveikį vėžio prognozinį žymenų pokyčiams [464, 465].

NaVPA–NaDCA priešnavikinis poveikis patvirtintas neklinikiniais duomenimis, gautais iš *in vivo* CAM modelio tyrimų. Jų metu, atliekant histologinę ir IHC analizę, buvo vertinamas vaisto poveikis naviko augimui, vaskuliarizacijai, invazijai ir naviko audinio žymenų raiškai. Disertacijos duomenys rodo, kad CAM modelis yra vertinga priemonė tiriamojo vaisto *in vivo* veiksmingumui vertinti.

Chemoterapijos ir HDAC inhibitoriaus VPA sinerginis poveikis yra perspektyvus gydant GBM ir chemoterapijos atsparumo prevencijai [88, 462]. Šio tyrimo naujumas – VPA gali sustiprinti NaDCA poveikį ar DCA pernašą į ląstelę per demetilintą *SLC5A8*, DCA nešiklį [254, 271]. Toks sinergizmas gali būti svarbus, nes jis gali leisti sumažinti DCA dozę ir nepageidaujamo poveikio riziką.

Tyrimo ribotumas yra – tirti tik trys GBM sergantys pacientai ir jų pirminių ląstelių navikai ant CAM. Tačiau navikų ant CAM tyrimai ir naviko ląstelių genų raiškos tyrimai parodė, kad NaVPA–NaDCA derinys slopina GBM karcinogenezę. Kitas svarbus aspektas – reikia atlikti tolesnius GBM pirminių ląstelių tyrimus, siekiant nustatyti šio derinio poveikį imuniniams ir uždegiminiams procesams, kurie yra svarbūs GBM progresavimui.

IŠVADOS

1. Nustatytas NaVPA–NaDCA slopinantis poveikis U87 naviko invazijai, neoangiogenezei, o T98G naviko – neoangiogenezei, PLBA ir EZH2 raiškai. Derinys neturėjo poveikio tirtų navikų p53 raiškai. Derinio poveikis neoangiogenezei bei T98G naviko PLBA ir EZH2 raiškai nustatytas stipresnis nei NaDCA – tai rodo VPA ir DCA sinerginį poveikį.
 - 1.1. Nustatytas NaDCA slopinantis poveikis U87 ir T98G navikų invazijai, p53 ir EZH2 raiškai, ir U87 naviko neoangiogenezei bei PLBA raiškai.
 - 1.2. Nustatytas stipresnis TMZ poveikis nei derinio U87 ir T98G navikų PLBA ir p53 raiškai, ir U87 naviko neoangiogenezei bei EZH2 raiškai.
2. Nustatytas NaVPA–NaDCA poveikis T98G ląstelių genų raiškai: sumažėjo *SLC12A2* ir *CDH2* ir padidėjo *CDH1* raiška; nustatytas U87 ir T98G ląstelių *SLC12A5* raiškos padidėjimas. Derinys padidino tik U87 ląstelių *SLC5A8* raišką.
 - 2.1. Nustatytas NaDCA slopinantis poveikis T98G ląstelių *SLC12A2* ir *CDH2* raiškai ir sinerginis derinio poveikis U87 ląstelių *SLC12A5* raiškai; NaDCA neturėjo poveikio U87 ląstelių tirtų genų raiškai.
 - 2.2. TMZ neturėjo poveikio U87 ir T98G ląstelių tirtų genų raiškai, o derinio poveikis genų raiškai yra pranašesnis nei TMZ.
3. Nustatytas NaVPA–NaDCA slopinantis poveikis GBM2-2F ir GBM2-4M navikų invazijai, GFRB raiškai GBM2-3F ir GBM2-4M navikuose, ir visų tirtų navikų PLBA, p53, EZH2 ir vimentino raiškai. Derinys neturėjo poveikio GBM2-3F naviko invazijai ir GFRB raiškai GBM2-2F navike.
4. NaVPA–NaDCA poveikis GBM pirminių ląstelių tirtų genų raiškai buvo individualus: nustatytas NaVPA–NaDCA lemtas GBM2-4M ląstelių *SLC12A2* raiškos sumažėjimas, o GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelėse – jos padidėjimas; *SLC12A5* ir *CDH1* raiškos padidėjimas nustatytas GBM2-4M, GBM2-5F ir GBM2-6M ląstelėse ir *CDH2* raiškos sumažėjimas GBM2-4M ląstelėse. Tirtos kontrolinės ir gydytos GBM pirminės ląstelės *SLC5A8* raiškos neturėjo – derinio poveikio geno raiškai nenustatyta. Derinys neturėjo poveikio GBM2-2F ląstelių *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1* ir *CDH2*, GBM-5F ir GBM2-6M ląstelių *CDH2* raiškai.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

CAM	– chick embryo chorioallantoic membrane
<i>CDH1</i>	– E-cadherin-coding gene
<i>CDH2</i>	– N-cadherin-coding gene
DCA	– dichloroacetate
EZH2	– enhancer of zeste homolog 2
EP2-1M	– supratentorial ependymoma primary cells of a 62-year-old male patient
<i>GAPDH</i>	– glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene
GBM	– glioblastoma
GBM2-2F	– glioblastoma primary cells of a 48-year-old female patient
GBM2-3F	– glioblastoma primary cells of an 82-year-old female patient
GBM2-4M	– glioblastoma primary cells of a 46-year-old male patient
GBM2-5F	– glioblastoma primary cells of a 68-year-old female patient
GBM2-6M	– glioblastoma primary cells of a 76-year-old male patient
GFAP	– glial fibrillary acidic protein
H-E	– hematoxylin and eosin
IHC	– immunohistochemistry
NaDCA	– sodium dichloroacetate
NaVPA	– sodium valproate
OXPHOS	– oxidative phosphorylation
PCNA	– proliferating cell nuclear antigen
PDK	– pyruvate dehydrogenase kinase
<i>SLC12A2</i>	– Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1)-coding gene
<i>SLC12A5</i>	– K-Cl cotransporter (KCC2)-coding gene
<i>SLC5A8</i>	– Na ⁺ coupled monocarboxylate transporter (SLC5A8)-coding gene
T98G	– male glioblastoma cell line
TMZ	– temozolomide
U87	– U-87 MG female glioblastoma cell line
VPA	– valproic acid
NaVPA–NaDCA	– combination of valproic acid and dichloroacetate

1. INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most common malignant brain tumor, accounting for approximately 50% of all malignant central nervous system (CNS) tumors [1, 2] and about 2% of brain tumors of all types in children [3]. GBM includes both primary (*de novo*) tumors and secondary tumors that arise from lower-grade astrocytoma or oligodendroglioma subtypes. GBM may occur at any age; however, it is more frequent among older individuals [4, 5]. It is diagnosed more often in men [6], and sex-related differences in survival

following GBM diagnosis have been reported [7, 8]. In adults, the highest morbidity of GBM is in the 65–74-year age group, with a median age of 65 years, and overall survival after diagnosis ranges from 8 to 15 months [5, 9, 10]. Adult GBM is classified as primary grade IV according to the World Health Organization classification (WHO), isocitrate dehydrogenase (IDH) wild-type and represents the most common, highly aggressive, and heterogeneous form of brain cancer with poor prognosis. Despite extensive multidisciplinary research efforts, effective treatment for GBM has not been developed yet.

The current standard treatment consists of maximal surgical tumor resection followed by adjuvant temozolomide (TMZ) chemotherapy and radiotherapy [11–13]. TMZ was approved for the treatment of newly diagnosed GBM in 2005 [14, 15]. The individual therapeutic efficacy of TMZ largely depends on the development of TMZ resistance, which contributes to tumor recurrence and poor outcomes [16]. The five-year survival rate among GBM patients aged 55–64 years is approximately 6% [17]. In postoperative GBM treatment, the addition of TMZ with radiotherapy increased overall survival by approximately two months [18], and progression-free survival by about six months. However, TMZ treatment is ineffective in more than 50% of GBM patients [19, 20]; in approximately 70% of patients, disease progression occurs within the first year after treatment, and the five-year survival rate for GBM remains among the lowest of all cancer types [15].

Advances in personalized GBM treatment are closely linked to the standard therapies and the novel treatment strategies are being explored, including chemotherapy using agents tailored to the molecular and metabolic characteristics of tumors [21, 22]. Understanding the mechanisms of drug action and the development of resistance to treatment is important for improving the effectiveness of GBM therapy and evaluating drug-induced changes in cancer prognostic markers [16, 23].

The development of effective and individualized preclinical models is essential to the application both for standard and novel therapeutic approaches prior to the initiation of chemotherapy [15]. The pharmacological effect of drugs that improve GBM patient survival are primarily associated with the inhibition of tumor cell proliferation [24]. The inflammatory tumor microenvironment in GBM promotes malignant tumor growth and is characterized by the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines as well as the activation of inflammatory signaling pathways [25]. Inflammation and immune responses are directly associated with GBM progression, and dysregulation of these processes is linked to increased resistance to therapy and poor treatment effect [26, 27]. The combination of sodium valproate (NaVPA) and sodium dichloroacetate (NaDCA) has been shown to

suppress inflammatory and immune processes associated with GBM development [28, 29].

GBM cells are characterized by suppressed apoptosis and cell death [30]. The therapeutic effect of anticancer drugs in GBM is mainly associated with the inhibition of tumor cell proliferation and the activation of apoptotic pathways [24]. It is important to identify the strategies that reduce the GBM cell resistance to therapy. GBM cells exhibit oxidative phosphorylation (OXPHOS), which is often a characteristic feature of cancer stem cells and chemotherapy-resistant cells. Inhibition of OXPHOS function may influence tumor cell survival and the tumor microenvironment by reducing hypoxia and enhancing antitumor immune responses, demonstrating considerable potential for both *in vitro* and *in vivo* GBM studies [31, 32]. Activated glycolytic processes are also characteristic of GBM cells [33]. GBM cells exhibit increased expression of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK), which contributes to enhanced glycolytic activity [33–35]. One of the current therapeutic GBM strategies is the inhibition of PDK activity, which reduces glycolysis associated with carcinogenesis [36].

The aim of our experimental studies investigating the effects of the NaVPA and NaDCA combination (NaVPA–NaDCA) on GBM development was to determine whether this combination had a synergistic effect or allowed dose reduction compared with the effect of TMZ on GBM cells and their tumors formed using the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model.

2. THE AIM AND OBJECTIVES OF THE WORK

Aim

To determine the effect of NaDCA and NaVPA–NaDCA combination on the growth of tumors formed from GBM cell lines and patients' GBM primary cells *in vivo*, as well as on these cells *in vitro*.

Objectives

1. To determine the effect of NaVPA–NaDCA on the growth of GBM U87 and T98G cell tumors on the CAM, their invasion into the CAM mesenchyme, angiogenesis, and expression of PCNA, p53, and EZH2, in comparison with NaDCA and TMZ.
2. To determine the effect of NaDCA, TMZ, and NaVPA–NaDCA on *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* expression in GBM U87 and T98G cells.

3. To determine the effect of NaVPA–NaDCA on patients' GBM primary cell tumors on the CAM, their invasion into the CAM, angiogenesis, and expression of GFAP, PCNA, p53, EZH2, and vimentin.
4. To determine the effect of NaVPA–NaDCA on *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* expression in patients' GBM primary cells *in vitro*.

Novelty and relevance of the work

The study presents preclinical data on the effects of NaVPA–NaDCA and NaDCA on carcinogenesis, comparing the effect of investigated drugs on the *SLC12A2* (Na-K-2Cl transporter; NKCC1), *SLC12A5* (K-Cl transporter; KCC2), *SLC5A8* (monocarboxylate transporter; SLC5A8), *CDH1* (E-cadherin), and *CDH2* (N-cadherin) expression in adult GBM U-87 MG (U87) and T98G cells *in vitro*, as well as on the tumor growth, neoangiogenesis, and invasion using the CAM model, along with the expression of PCNA, p53, and EZH2 markers in the tissues of tumor on the CAM. The effects of NaVPA–NaDCA were compared with those of TMZ. The data indicate that NaVPA–NaDCA altered the expression of NKCC1 and KCC2 carrier genes and may influence intracellular Cl[−] concentration ([Cl[−]]_i), and this effect is individual and varies between U87 and T98G cells. The effect of combination is stronger than that of NaDCA and TMZ alone. The study demonstrated that the effects of NaVPA–NaDCA components – NaVPA and NaDCA – on U87- and T98G-induced neoangiogenesis, T98G tumor PCNA and EZH2 expression were synergistic. Synergistic effect may also be related to the activation by VPA in U87 of DCA transport into the cell via demethylated *SLC5A8*, which serves as a DCA carrier into the tumor cell. Such synergy may be important as it allows for reducing the DCA dose and its adverse effects. The advantages of the combination compared with TMZ were demonstrated.

For the first time, the effects of NaVPA–NaDCA were investigated on primary human GBM cells *in vitro* and on tumors formed from these cells on the CAM, including the expression of GFAP, PCNA, p53, EZH2, and vimentin markers in the tumor on the CAM. In primary GBM tumor cells, NaVPA–NaDCA suppressed NKCC1 and activated KCC2 carrier gene expression, inhibited the expression of GBM malignancy markers such as GFAP, PCNA, p53, EZH2, and vimentin, and the response to the treatment was individual.

Preclinical data from this study have demonstrated that the CAM model is a suitable method for evaluating the efficacy of the investigated drug. Assessing drug efficacy using the CAM model and determining its impact on

GBM cell gene expression is promising as it may help in selecting individualized chemotherapy and in comparing the effects of TMZ with those of newly developed investigational drugs.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Materials and methods used in GBM cell line studies *in vivo* and *in vitro*

The U87 and T98G tumor groups specified in Table 3.1.1 were investigated *in vivo* for tumor growth, invasion into the CAM, number of blood vessels in the CAM, sub-tumoral thickening of the CAM, and the expression of IHC markers PCNA, p53, and EZH2.

Table 3.1.1. *The study groups of control and treated tumors on the CAM and their sample sizes*

Study groups	Invasion, CAM thickness, number of blood vessels		PCNA		p53		EZH2	
	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G
	Number of tumors on CAM							
Control	20	12	13	9	15	9	17	9
10 mM NaDCA	24	12	13	11	12	10	13	10
5 mM NaDCA	25	16	14	8	13	8	12	8
3 mM NaDCA	20	12	18	10	20	11	19	11
2 mM NaVPA– 3 mM NaDCA	10	12	10	8	10	8	10	9
100 μ M TMZ	15	11	7	5	8	5	8	5
50 μ M TMZ	15	16	8	6	7	7	8	7

U87 and T98G cells were investigated *in vitro* for *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* genes in the control group and groups treated with 3 mM NaDCA, 1.5 mM NaDCA, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, and 50 μ M TMZ for 24 h ($n = 6$ per group).

3.2. Materials and methods used in GBM primary cell studies *in vivo* and *in vitro*

Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee granted authorization to conduct biomedical research on 8 August 2020 (permit No. BE-2-80). All the patients were diagnosed for the first time, and no prior anticancer treatment was administered before surgery. They underwent surgery at the Neurosurgery Clinic of Vilnius University Santaros Hospital (Santariškių 2, LT-08410 Vilnius, Lithuania).

Tissue samples were obtained from five GBM patients and one supratentorial ependymoma patient who underwent surgery, and their details are provided below: GBM2-2F, a 48-year-old female; GBM2-3F, an 82-year-old female; GBM2-4M, a 46-year-old male; GBM2-5F, a 68-year-old female; GBM2-6M, a 76-year-old male, glioblastoma WHO Grade IV, IDH wild-type, strong positive cytoplasmic reaction in GFAP tumor cells. EP2-1M, 62-year-old male, supratentorial ependymoma. All surgeries were performed in 2021–2022.

In the GBM tumor groups, tumor growth, frequency of invasion into the CAM, number of blood vessels in the CAM, CAM thickening, GFAP, PCNA, p53, EZH2, and vimentin IHC markers were studied. Cells were treated with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA, and the group sample sizes are presented in Table 3.2.1.

Table 3.2.1. *The study groups of GBM tumors on the CAM and their sample sizes*

Study groups	Invasion, CAM thickness, number of blood vessels			GFAP, PCNA, p53, EZH2, vimentin		
	GBM2-2F	GBM2-3F	GBM2-4M	GBM2-2F	GBM2-3F	GBM2-4M
	Number of tumors on CAM					
Control	8	10	7	4	6	4
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA	8	10	7	6	5	5

GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M primary cells were investigated *in vitro* for *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* genes in the control group and the groups treated with 2 NaVPA–3 mM NaDCA for 48 h ($n = 6$ per group).

CAM studies were also performed on supratentory ependymoma patient EP2-1M primary cells in control ($n = 8$) and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated ($n = 7$) groups. The following parameters were evaluated: tumor growth, invasion into the CAM, number of blood vessels in the CAM, and

sub-tumoral thickening of the CAM. IHC was not performed due to atypical tumor growth on the CAM, as the cells were dispersed across the CAM surface. EP2-1M primary cells were investigated *in vitro* for *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* genes in the control group and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated groups for 48 h ($n = 6$ per group).

3.3. Cell lines, culture conditions, and preparation of GBM primary cell suspension

U87 (U87-MG; EACC 89081402; a 44-year-old female) and T98G (T98-G; ATCC CRL-1690; a 61-year-old male) adhesive cell lines were used for the study and cultured as described by us previously [365, 470].

Patients' GBM2-2F, GBM2-3F, GBM2-4M, GBM2-5F, GBM2-6M, and EP2-1M primary cell suspension was acquired as described by us previously [455].

3.4. Application of the CAM model for GBM cell lines and GBM primary cell studies

In compliance with the European Union and Lithuanian legal frameworks, the use of the CAM model in research does not necessitate prior approval from an ethics committee. Freshly fertilized chicken eggs (breed *Cobb-500*) were acquired from Rumšiškės hatchery (Dovainonys, Lithuania). Preparation of eggs for the study, tumor formation from U87, T98G, and GBM primary cells and transplantation onto the CAM, and biomicroscopy *in vivo* for the assessment of the tested drug effect on tumor growth and neoangiogenesis were performed as described by us previously [365, 455, 470].

3.5. Histological and immunohistochemical study of the tumor

Histological examination (invasion into the CAM, number of blood vessels in the CAM, and sub-tumoral thickening of the CAM) of U87 and T98G tumor [365, 470] and GBM primary cell tumor [455] was performed in H-E slides as reported by us previously.

The expression of GFAP, PCNA, p53, EZH2, and vimentin was determined by IHC as described by us previously [365, 455].

3.6. Gene expression analysis

U87 and T98G cells were treated with 3 mM NaDCA, 1.5 mM NaDCA, 50 μ M TMZ, and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA for 24 h *in vitro* as reported by us previously [365]. Cells of control groups were grown in a cell culture medium based on the cell line.

GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M primary cells were treated with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA for 48 h *in vitro*.

The determination of relative *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* gene expression is described in [365].

3.7. Statistical analysis

Statistical analysis and visualization of data were performed using IBM SPSS Statistics version 23 and GraphPad Prism version 9. The Shapiro-Wilk test was applied to test the normality of data distribution. The frequency of tumor invasion into the CAM is presented as a percentage (%), and comparisons between study groups were performed using the chi-square test. Histomorphometric data (number of blood vessels, CAM sub-tumoral thickness) and IHC marker expression are presented as medians with corresponding minimum and maximum values. The nonparametric Mann-Whitney U test was used to assess differences between the two independent groups. The CT threshold cycle value was normalized to the control house-keeping GAPDH gene for gene expression analysis, and the Δ CT value was calculated accordingly. The Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method [458] was used to calculate the expression ratio between the control and treated groups of the tested *GAPDH*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SCL5A8*, *CDH1*, and *CDH2* genes. CT values ≥ 35 were not used for calculations. A *p* value of < 0.05 was considered statistically significant.

4. RESULTS

4.1. The effect of investigated drugs on U87 and T98G tumors on the CAM and U87 and T98G cells

Comparison of U87 and T98G control tumors on the CAM and U87 and T98G cells. The study of U87 and T98G control tumors did not reveal any differences in the frequency of invasion into the CAM, CAM thickness and the expression of neoangiogenesis in the CAM mesenchyme under the tumor, or the expression of PCNA and EZH2 in the tumor. The number of p53-positive cells was significantly lower in U87 control tumors than T98G

control. The non-treated U87 and T98G xenografts induced the CAM thickening similarly.

SLC5A8 and *CDH1* expression in U87 and T98G control cells was muted (not expressed). T98G cells may be more malignant than U87 cells because *SLC12A2* expression was significantly higher in T98G cells than U87 cells, and *SLC12A5* expression was expressed in U87 cells; it was undetectable in T98G cells, and *CDH2* expression was significantly higher in T98G control cells than in U87 cells.

Comparison of the effect of investigational medicines on U87 and T98G tumors on CAM. This study showed that the effect of treatment with NaDCA, NaVPA–NaDCA or TMZ depended on the test drug and the cell line. The study allowed us to see possible differences or similarities in the effects of the investigated agents on the carcinogenesis of the investigated cell tumors.

The study of U87 tumors on the CAM showed that treatment with NaDCA (at a dose of 10 mM, 5 mM, or 3 mM) monotherapy, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA (hereinafter referred to as NaVPA–NaDCA), 100 μ M TMZ, or 50 μ M TMZ significantly reduced the incidence of U87 tumor invasion into the CAM. The effect of treatment with 5 mM NaDCA and 100 μ M TMZ on invasion was significantly greater than that of 3 mM NaDCA. In T98G tumor treatment with 10 mM NaDCA, 100 μ M TMZ and 50 μ M TMZ significantly reduced tumor invasion into the CAM. The effect of 100 μ M TMZ treatment on T98G tumor invasion was significantly greater than that of 3 mM NaDCA.

The CAM thickness under U87 control tumors and 10 mM NaDCA-treated tumors did not differ. Treatment with 3 mM NaDCA and 100 μ M TMZ significantly reduced the thickness of CAM under U87 tumors. Treatment with 10 mM and 5 mM NaDCA, NaVPA–NaDCA, and 100 μ M TMZ significantly reduced the CAM thickness under T98G tumors.

Treatment with 5 mM NaDCA, 3 mM NaDCA, NaVPA–NaDCA, 100 μ M TMZ, or 50 μ M TMZ significantly reduced the number of blood vessels in the CAM under the tumor. The effect of NaVPA–NaDCA treatment on U87 tumor-induced neoangiogenesis was significantly greater than that of 3 mM NaDCA and 50 μ M TMZ, while the effect of 100 μ M TMZ on neoangiogenesis in the mesenchyme did not differ from that of NaVPA–NaDCA and was significantly greater than that of 3 mM NaDCA. NaDCA monotherapy had no effect on neoangiogenesis when treating T98G tumors. Neoangiogenesis was suppressed similarly when T98G tumors were treated with 100 μ M TMZ, 50 μ M TMZ, or NaVPA–NaDCA.

A synergistic effect of combination components was observed in U87 and T98G cell tumors: the number of blood vessels was significantly lower

in the U87-NaVPA-NaDCA group than in the U87-3 mM NaDCA group, and in the T98G-NaVPA-NaDCA group than in the T98G-3 mM NaDCA group, indicating a synergistic effect of NaVPA and NaDCA.

Compared to U87-control, treatment with 10 mM or 5 mM NaDCA, but not 3 mM NaDCA, significantly reduced the expression of PCNA-positive cells in U87 tumors. The effect of 10 mM NaDCA and 5 mM NaDCA treatment on PCNA expression in U87 tumors was significantly greater than that of 3 mM NaDCA. The results presented in the doctoral dissertation show that only treatment with 100 μ M TMZ and 50 μ M TMZ significantly reduced the number of PCNA-positive cells in U87 tumors on the CAM. The effect of TMZ treatment on PCNA expression in U87 tumors was significantly greater than that of 3 mM NaDCA or NaVPA-NaDCA.

NaDCA monotherapy had no effect on PCNA expression in T98G tumors. When evaluating treatment effects on PCNA expression, the effect of NaVPA-NaDCA on T98G tumors on the CAM was characterized by a synergistic effect of the combination components: the effect of NaVPA-NaDCA on PCNA expression was significantly greater than that of 3 mM NaDCA. The frequency of PCNA-positive cells was significantly lower in T98G tumors treated with 100 μ M TMZ, 50 μ M TMZ, or NaVPA-NaDCA, whereas 3 mM NaDCA had no effect on PCNA expression in T98G tumors. The effect of TMZ treatment on PCNA expression in T98G tumors was significantly greater than that of 3 mM NaDCA.

Treatment with 10 mM and 5 mM NaDCA, as well as 100 μ M TMZ and 50 μ M TMZ, significantly reduced the number of p53-positive cells in U87 tumors as compared with U87 control tumors, whereas 3 mM NaDCA had no effect. The effect of TMZ treatment on p53 expression in U87 tumors was significantly greater than that of 3 mM NaDCA or NaVPA-NaDCA. Treatment with 10 mM and 5 mM NaDCA significantly decreased the expression of p53-positive cells in T98G tumors, while 3 mM NaDCA had no effect. A significant reduction in the number of p53-positive cells was also observed in T98G tumors treated with 100 μ M TMZ and 50 μ M TMZ. No difference in the frequency of p53-positive cells in T98G tumors was observed between the NaVPA-NaDCA-treated and control groups. The effect of 100 μ M TMZ treatment on p53 expression in T98G tumors was significantly greater than that of 3 mM NaDCA or NaVPA-NaDCA.

Treatment with 10 mM and 5 mM NaDCA significantly reduced EZH2 expression in U87 tumors, whereas 3 mM NaDCA had no effect on expression. Our data showed that treatment with 100 μ M TMZ and 50 μ M TMZ significantly decreased the number of EZH2-positive cells in U87 tumors, while treatment with 3 mM NaDCA or NaVPA-NaDCA had no effect on EZH2 expression. In contrast, the number of EZH2-positive cells in T98G

tumors was significantly and similarly reduced following treatment with 100 μ M TMZ, 50 μ M TMZ, or NaVPA–NaDCA. The effects of treatment with NaVPA–NaDCA and TMZ on EZH2 expression in T98G tumors were significantly greater than those of 3 mM NaDCA.

The numbers of PCNA- and EZH2-positive cells were significantly lower in the T98G–NaVPA–NaDCA group compared with the T98G–3 mM NaDCA group, indicating a synergistic effect of NaVPA and NaDCA in the treatment of T98G tumors on the CAM.

Comparison of the effect of investigated drugs on gene expression in U87 and T98G cells. The investigated medicinal preparations had no effect on *SLC12A2* expression in the U87 cell groups. Treatment with 3 mM NaDCA and NaVPA–NaDCA significantly reduced *SLC12A2* expression in T98G cells, whereas 1.5 mM NaDCA and 50 μ M TMZ had no effect on gene expression. The effect of treatment with 3 mM NaDCA on *SLC12A2* expression in T98G cells was significantly greater than that of 1.5 mM NaDCA.

Our results showed that NaVPA–NaDCA treatment increased *SLC12A5* expression in both U87 and T98G cells, whereas 3 mM NaDCA, 1.5 mM NaDCA, or 50 μ M TMZ had no effect on *SLC12A5* expression in the examined cells. These findings indicate an advantage of NaVPA–NaDCA over TMZ.

Our study also demonstrated that *SLC5A8* expression was undetectable in control U87 and T98G cells. Treatment with 3 mM NaDCA, 1.5 mM NaDCA, or 50 μ M TMZ had no effect on gene expression in these cells. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA increased *SLC5A8* expression in U87 cells but had no effect on gene expression in T98G cells.

CDH1 was not detected in U87 and T98G cells. It was demonstrated that treatment with the investigated drugs had different effects on gene expression depending on the cell line. No effect was observed on *CDH1* and *CDH2* expression in U87 cells. NaVPA–NaDCA treatment increased *CDH1* expression in T98G cells, whereas 3 mM NaDCA, 1.5 mM NaDCA, and 50 μ M TMZ had no effect on gene expression. Treatment with 3 mM NaDCA, 1.5 mM NaDCA, and NaVPA–NaDCA significantly reduced *CDH2* expression in T98G cells; *CDH2* expression in T98G cells treated with NaVPA–NaDCA was significantly lower than in TMZ-treated cells.

4.2. The individual effect of NaVPA–NaDCA on patients' primary GBM cell tumors on the CAM and GBM primary cells *in vitro*

Comparison of patients' primary GBM cell control tumors on the CAM and GBM primary cells (untreated). In total, five GBM patients were investigated: GBM2-2F (a 48-year-old female), GBM2-3F (an 82-year-old female), GBM2-4M (a 46-year-old male), GBM2-5F (a 68-year-old female), and GBM2-6M (a 76-year-old male). According to the WHO classification, all tumors were grade IV, IDH wild-type, and in all cases strong cytoplasmic GFAP expression was detected in tumor tissues. All patients were newly diagnosed, and none had received anticancer treatment prior to surgery. Cells from GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M (three GBM patients) were analyzed using the CAM model; the expression of *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* in GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M (four patients) primary cells was determined *in vitro*.

The histological and immunohistochemical analysis of control tumors on the CAM revealed certain morphological differences among the formed GBM tumors: the frequency of invasion into the CAM and the expression of neoangiogenesis in the CAM mesenchyme beneath the tumor as well as GFAP and p53 expression did not differ among the GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M control tumor groups. However, CAM thickness, PCNA, and EZH2 expression was significantly higher in the GBM2-3F control tumors compared to the GBM2-4M controls, which may indicate a greater malignancy of GBM2-3F.

Based on the expression of the investigated genes, GBM2-2F cells may be more malignant than GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M cells, as *SLC12A2* and *CDH2* expression was significantly higher in GBM2-2F cells than GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M cells, while GBM2-2F cells showed no expression of *SLC12A5*, *SLC5A8*, or *CDH1*. GBM2-6M cells may be more malignant than GBM2-5F cells, as GBM2-6M cells did not have *SLC12A5* expression, whereas *CDH1* expression was significantly higher in GBM2-5F cells. As reported by us previously, increased expression of *SLC12A2* and *CDH2* is associated with tumor cell proliferation and migration, whereas increased expression of *SLC12A5*, *SLC5A8*, and *CDH1* is associated with suppression of tumor growth and apoptosis [365].

Comparison of NaVPA–NaDCA effect on patients' GBM primary cell tumors on the CAM. The effect of NaVPA–NaDCA on the growth of tumors formed by patients' GBM primary cells on the CAM as well as on the expression of GFAP, PCNA, p53, EZH2, and vimentin in tumors on the CAM

and *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* in tumor cells, was individual.

Treatment with NaVPA–NaDCA significantly reduced the frequency of GBM2-2F and GBM2-4M primary cell tumor invasion into the CAM but had no effect on GBM2-3F tumor invasion into the CAM.

Treatment with NaVPA–NaDCA had no effect on CAM thickness in GBM2-2F and GBM2-3F tumors but significantly reduced membrane thickness in GBM2-4M.

Treatment with NaVPA–NaDCA had no effect on the number of blood vessels in the CAM beneath GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors when vessels with a diameter of 10 μ m or greater were counted; however, an anti-neoangiogenic effect of NaVPA–NaDCA was observed in all cases when vascular network expression in the CAM surrounding the tumor was assessed using fluorescent dextran.

No difference in marker expression was observed when comparing the percentage of GFAP-positive cells in a patient's GBM tumor tissue and in the tumor formed on the CAM from the same patient's tumor cells. The frequency of GFAP-positive cells did not differ when comparing GFAP expression in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors on the CAM. This indicates that control GBM tumors formed from patients' GBM primary cells on the CAM retained the immunohistochemical GFAP expression characteristic of the patient's original tumor tissue. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of GFAP-positive cells in GBM2-3F and GBM2-4M tumors on the CAM but had no effect on marker expression in GBM2-2F tumors.

Comparison of the control groups showed that GBM2-4M exhibited significantly lower expression of PCNA-positive cells than GBM2-2F and GBM2-3F. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of PCNA-positive cells in all examined tumors on the CAM formed from GBM primary cells. After combination treatment, the frequency of PCNA-positive cells was significantly higher in GBM2-2F tumors than GBM2-3F and GBM2-4M tumors, while marker expression was significantly lower in GBM2-4M tumors compared with GBM2-3F tumors.

Immunohistochemical analysis revealed p53-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M control tumors, but the comparison of marker expression among control tumors showed no differences. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the frequency of p53-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors on the CAM, with no differences observed when comparing the treated tumor groups.

The frequency of EZH2-positive cells in the control tumor groups of GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M ranged from 58.11% to 91.11%.

Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of EZH2-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors on the CAM.

Data on vimentin expression in GBM tumors on the CAM showed high variability: the frequency of vimentin-positive cells was 45.85% in GBM2-2F; 26.91%, in GBM2-3F; and 79.00%, in GBM2-4M control tumors. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of vimentin-positive cells in the examined tumors on the CAM.

Comparison of the effect of NaVPA–NaDCA on gene expression in patients' GBM primary cells. The expression level of the *SLC12A2* gene in the GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M patients' primary cell control groups differed, with the following significant differences observed in the groups: GBM2-2F > GBM2-5F = GBM2-4M > GBM2-6M (> indicates a significant difference).

Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced *SLC12A2* expression only in GBM2-4M cells and significantly increased *SLC12A2* expression in GBM2-5F and GBM2-6M cells. NaVPA–NaDCA had no effect on *SLC12A2* expression in GBM2-2F cells. Comparison of the examined cells showed differences in *SLC12A2* expression in the combination-treated cells: GBM2-2F > GBM2-5F = GBM2-6M = GBM2-4M (> indicates a significant difference).

GBM2-2F, GBM2-4M, and GBM2-6M control cells showed no *SLC12A5* expression, while the gene was expressed in GBM2-5F cells. Combination treatment activated *SLC12A5* expression in GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M cells, but had no effect on GBM2-2F cells. After combination treatment, gene expression differed significantly in the examined cell groups: GBM2-5F > GBM2-6M > GBM2-4M.

SLC5A8 expression was not detected (not expressed) in GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M control cells. Combination treatment had no effect on *SLC5A8* expression in the examined cells.

Control GBM2-2F cells showed no active *CDH1* gene, and comparison of *CDH1* expression levels among control GBM2-2F, GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M cells revealed significant differences: GBM2-5F > GBM2-4M > GBM2-6M.

Treatment with the combination significantly increased *CDH1* expression in GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M cells, but it had no effect on *CDH1* expression in GBM2-2F cells (remained undetectable). Among the treatment groups, gene expression levels differed significantly as follows: GBM2-5F > GBM2-4M > GBM2-6M.

CDH2 expression was detected in control cells from all investigated patients' GBM samples, and it also differed among the control groups:

GBM2-2F > GBM2-6M = GBM2-4M > GBM2-5F (> indicates a significant difference).

Treatment with the combination significantly decreased *CDH2* expression in GBM2-4M cells but had no effect on *CDH2* expression in GBM2-2F, GBM2-5F, and GBM2-6M cells. Based on gene expression levels, *CDH2* expression in combination-treated cells showed significant differences among groups as follows: GBM2-2F > GBM2-5F > GBM2-6M > GBM2-4M.

4.3. The effect of NaVPA–NaDCA on patients' primary ependymoma cell tumors on the CAM and ependymoma primary cells *in vitro*

The effect of NaVPA–NaDCA on primary ependymoma cell tumors on the CAM. Transplanted onto the CAM, EP2-1M control ($n = 8$) and NaVPA–NaDCA-treated ($n = 7$) tumors did not form and dispersed across the CAM surface. Only one out of eight control tumors formed. In H-E sections the tumor site was identified by thickening of the CAM and the presence of tumor cells on the chorionic epithelium.

NaVPA–NaDCA treatment did not have a significant effect on EP2-1M tumor invasion into the CAM. Compared with EP2-1M control, treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced CAM thickness and the number of blood vessels beneath the tumor. IHC analysis revealed weakly positive cytoplasmic GFAP expression in EP2-1M tumor tissue ($n = 10$) and in control tumor ($n = 1$) formed on the CAM from the same ependymoma tissue. As the EP2-1M primary cell tumors did not form when transplanted onto the CAM, IHC analysis was not performed.

The effect of NaVPA–NaDCA on gene expression in primary ependymoma cells. NaVPA–NaDCA did not have a significant effect on *SLC12A2* expression in EP2-1M primary cells. The expression of *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1* was not detected in control and NaDCA–NaVPA-treated cells. Compared with control, *CDH2* expression was significantly lower in EP2-1M cells treated with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA.

CONCLUSIONS

1. NaVPA–NaDCA combination inhibited U87 tumor invasion and neoangiogenesis, and T98G tumor neoangiogenesis, PCNA and EZH2 expression. The combination had no effect on p53 expression in the studied tumors. The effect of NaVPA–NaDCA on neoangiogenesis in the studied tumors and on PCNA and EZH2 expression in the T98G tumor was significantly greater than that of NaDCA – this indicates a synergistic effect of DCA and VPA.
 - 1.1. An inhibitory effect of NaDCA on invasion, p53 and EZH2 expression in U87 and T98G tumors was observed, as well as on neoangiogenesis and PCNA expression in the U87 tumor.
 - 1.2. TMZ had a stronger effect than the combination on PCNA and p53 expression in U87 and T98G tumors as well as on neoangiogenesis and EZH2 expression in the U87 tumor.
2. The effect of NaVPA–NaDCA on gene expression in T98G cells was observed: it reduced *SLC12A2*, *CDH2* expression and increased *CDH1* expression; *SLC12A5* expression was increased in U87 and T98G cells. The combination increased *SLC5A8* expression only in U87 cells.
 - 2.1. An inhibitory effect of NaDCA on *SLC12A2* and *CDH2* expression in T98G cells, and a synergistic effect of the combination on *SLC12A5* expression in U87 cells, were observed; NaDCA had no effect on gene expression in U87 cells.
 - 2.2. TMZ treatment of U87 and T98G cells had no effect on gene expression. The effect of the combination on gene expression indicates its superiority over TMZ.
3. An inhibitory effect of NaVPA–NaDCA on invasion in GBM2-2F and GBM2-4M tumors as well as on GFAP expression in GBM2-3F and GBM2-4M tumors, and on PCNA, p53, EZH2, and vimentin expression in all tumors was observed. The combination had no effect on invasion in the GBM2-3F tumor and on GFAP expression in the GBM2-2F tumor.

4. The effect of NaVPA–NaDCA on gene expression in GBM primary cells was individual: NaVPA–NaDCA reduced *SLC12A2* expression in GBM2-4M cells, while it increased gene expression in GBM2-5F and GBM2-6M cells; the combination increased *SLC12A5* and *CDH1* expression in GBM2-4M, GBM2-5F, and GBM2-6M cells; the reduced *CDH2* expression was observed in GBM2-4M cells. The studied control and treated GBM primary cells showed no *SLC5A8* expression – no effect of the combination on gene expression was observed. The combination had no effect on *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* expression in GBM2-2F cells as well as on *CDH2* expression in GBM2-5F and GBM2-6M cells.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers (Basel)* 2022,14(10):2412.
2. Sun T, Warrington NM, Luo J, Brooks MD, Dahiya S, Snyder SC, et al. Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males. *J Clin Invest* 2014, 124(9):4123–33.
3. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016–2020. *Neuro Oncol* 2023, 25(S12):iv1–99.
4. Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Moon SI, Yoo DH, Lee HC, et al. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. *Int J Oncol* 2006, 28(1):119–25.
5. Price M, Ballard C, Benedetti J, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2017–2021. *Neuro Oncol* 2024, 26(S6):v1–v85.
6. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro Oncol* 2022, 24(S5):v1–95.
7. Goldman DA, Hovinga K, Reiner AS, Esquenazi Y, Tabar V, Panageas KS. The relationship between repeat resection and overall survival in patients with glioblastoma: a time-dependent analysis. *J Neurosurg* 2018, 129(5):1231–39.
8. Gittleman H, Ostrom QT, Stetson LC, Waite K, Hodges TR, Wright CH, et al. Sex is an important prognostic factor for glioblastoma but not for nonglioblastoma. *Neurooncol Pract* 2019, 6(6):451–62.
9. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro Oncol* 2021, 23(12S2):iii1–105.
10. Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, et al. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* 2012, 107(1):207–12.
11. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009, 10(5):459–66.
12. Yalamarty SSK, Filipczak N, Li X, Subhan MA, Parveen F, Ataide JA, et al. Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). *Cancers (Basel)* 2023, 15(7):2116.

13. Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin* 2020, 70(4):299–312.
14. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: Standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 2007, 25(26):4127–36.
15. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352(10):987–96.
16. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis* 2016, 3(3):198–210.
17. American Cancer Society. Survival Rates for Selected Adult Brain and Spinal Cord Tumors. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/types/brain-spinal-cord-tumors-adults/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>
18. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G. High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014, 25(S3):iii90–101.
19. Krex D, Klink B, Hartmann C, Von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 2007, 130(10):2596–606.
20. Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol* 2012, 107(2):359–64.
21. Gaca-Tabaszewska M, Bogusiewicz J, Bojko B. Metabolomic and Lipidomic Profiling of Gliomas—A New Direction in Personalized Therapies. *Cancers (Basel)* 2022, 14(20):5041.
22. Medikonda R, Dunn G, Rahman M, Fecci P, Lim M. A review of glioblastoma immunotherapy. *J Neurooncol* 2021, 151(1):41–53.
23. Kohl C, Aung T, Haerteis S, Ignatov A, Ortmann O, Papatthemelis T. The 3D in vivo chorioallantoic membrane model and its role in breast cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 2022, 148(5):1033–43.
24. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics* 2017, 14(2):284–97.
25. Nóbrega AHL, Pimentel RS, Prado AP, Garcia J, Frozza RL, Bernardi A. Neuroinflammation in Glioblastoma: The Role of the Microenvironment in Tumour Progression. *Curr Cancer Drug Targets* 2024, 24(6):579–94.
26. Alghamri MS, McClellan BL, Hartlage MS, Haase S, Faisal SM, Thalla R, et al. Targeting Neuroinflammation in Brain Cancer: Uncovering Mechanisms, Pharmacological Targets, and Neuropharmaceutical Developments. *Front Pharmacol* 2021, 12:680021.
27. DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK, et al. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immun* 2020, 11:1402.
28. Stakišaitis D, Kapočius L, Kilimaitė E, Gečys D, Šlekienė L, Balnytė I, et al. Preclinical Study in Mouse Thymus and Thymocytes: Effects of Treatment with a

- Combination of Sodium Dichloroacetate and Sodium Valproate on Infectious Inflammation Pathways. *Pharmaceutics* 2023, 15(12):2715.
29. Stakišaitis D, Kapočius L, Tatarūnas V, Gečys D, Mickienė A, Tamošaitis T, et al. Effects of Combined Treatment with Sodium Dichloroacetate and Sodium Valproate on the Genes in Inflammation- and Immune-Related Pathways in T Lymphocytes from Patients with SARS-CoV-2 Infection with Pneumonia: Sex-Related Differences. *Pharmaceutics* 2024, 16(3):409.
 30. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi M. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg* 2016, 7(1):17–20.
 31. Xu Y, Xue D, Bankhead A, Neamati N. Why All the Fuss about Oxidative Phosphorylation (OXPHOS)? *J Med Chem* 2020, 63(23):14276–307.
 32. Wu Z, Ho WS, Lu R. Targeting Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Glioblastoma Therapy. *Neuromolecular Med* 2022, 24(1):18–22.
 33. Larrieu CM, Storevik S, Guyon J, Pagano Zottola AC, Bouchez CL, Derieppe MA, et al. Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development. *Cancers (Basel)* 2022, 14(15):3769.
 34. Chinopoulos C, Seyfried TN. Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN Neuro* 2018, 10:1759091418818261.
 35. Shen H, Yu M, Tsoli M, Chang C, Joshi S, Liu J, et al. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2020, 22(1):139–51.
 36. Sutendra G, Michelakis ED. Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol* 2013, 3:38.
 37. Bozzao A, Weber D, Crompton S, Braz G, Csaba D, Dhermain F, et al. European Cancer Organisation Essential Requirements for Quality Cancer Care: Adult glioma. *J Cancer Policy* 2023, 38:100438.
 38. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro Oncol* 2014, 16(7):896–913.
 39. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013, 15(S2):ii1–56.
 40. Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffietti R, Jaal J, et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer* 2012, 48(10):1532–42.
 41. Boele FW, Klein M, Reijneveld JC, Verdonck-de Leeuw IM, Heimans JJ. Symptom management and quality of life in glioma patients. *CNS Oncol* 2014, 3(1):37–47.
 42. Salari N, Ghasemi H, Fatahian R, Mansouri K, Dokaneheifard S, Shiri MH, et al. The global prevalence of primary central nervous system tumors: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Med Res* 2023, 28(1):39.
 43. Glioma – Symptoms, Causes, Treatment. Available at: <https://rarediseases.org/rare-diseases/glioma/>.

44. Brown NF, Ottaviani D, Tazare J, Gregson J, Kitchen N, Brandner S, et al. Survival Outcomes and Prognostic Factors in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2022, 14(13):3161.
45. Sojka C, Sloan SA. Gliomas: a reflection of temporal gliogenic principles. *Commun Biol* 2024, 7(1):56.
46. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol* 2021, 23(8):1231–51.
47. Arcella A, Limanaqi F, Ferese R, Biagioni F, Oliva MA, Storto M, et al. Dissecting molecular features of gliomas: Genetic loci and validated biomarkers. *Int J Mol Sci* 2020, 21(2):685.
48. Currie S, Fatania K, Matthew R, Wurdak H, Chakrabarty A, Murray L, et al. A Comprehensive Clinical Review of Adult-Type Diffuse Glioma Incorporating the 2021 World Health Organization Classification. *Neurographics* 2022, 12(2):43–70.
49. Jiang H, Cui Y, Wang J, Lin S. Impact of epidemiological characteristics of supratentorial gliomas in adults brought about by the 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system. *Oncotarget* 2017, 8(12):20354–61.
50. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021, 18(3):170–86.
51. Gonzalez Castro LN. The cIMPACT-NOW updates and their significance to current neuro-oncology practice. *Neurooncol Pract* 2021, 8(1):4–10.
52. McKinnon C, Nandhabalan M, Murray SA, Plaha P. Glioblastoma: Clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ* 2021, 374:n1560.
53. Cantrell JN, Waddle MR, Rotman M, Peterson JL, Ruiz-Garcia H, Heckman MG, et al. Progress Toward Long-Term Survivors of Glioblastoma. *Mayo Clin Proc* 2019, 94(7):1278–86.
54. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014, 23(10):1985–86.
55. Marengo-Hillebrand L, Wijesekera O, Suarez-Meade P, Mampre D, Jackson C, Peterson J, et al. Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. *J Neurooncol* 2020, 147(2):297–307.
56. Carrano A, Juarez JJ, Incontri D, Ibarra A, Cazares HG. Sex-specific differences in glioblastoma. *Cells* 2021, 10(7):1783.
57. Olaisen C, Müller R, Nedal A, Otterlei M. PCNA-interacting peptides reduce Akt phosphorylation and TLR-mediated cytokine secretion suggesting a role of PCNA in cellular signaling. *Cell Signal* 2015, 27(7):1478–87.
58. Gravina GL, Colapietro A, Mancini A, Rossetti A, Martellucci S, Ventura L, et al. ATX-101, a Peptide Targeting PCNA, Has Antitumor Efficacy Alone or in

- Combination with Radiotherapy in Murine Models of Human Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2022, 14(2):289.
59. Sun H, Long S, Wu B, Liu J, Li G. NKCC1 involvement in the epithelial-to-mesenchymal transition is a prognostic biomarker in gliomas. *PeerJ* 2020, 8:e8787.
 60. Ma H, Li T, Tao Z, Hai L, Tong L, Yi L, et al. NKCC1 promotes EMT-like process in GBM via RhoA and Rac1 signaling pathways. *J Cell Physiol* 2019, 234(2):1630–42.
 61. Zhu W, Begum G, Pointer K, Clark PA, Yang S Sen, Lin SH, et al. WNK1-OSR1 kinase-mediated phospho-activation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter facilitates glioma migration. *Mol Cancer* 2014, 13(1):31.
 62. Lee SH, Yousafzai MS, Mohler K, Yadav V, Amiri S, Szuszkiewicz J, et al. SPAK-dependent cotransporter activity mediates capillary adhesion and pressure during glioblastoma migration in confined spaces. *Mol Biol Cell* 2023, 34(12):ar122.
 63. Mostofa AGM, Punganuru SR, Madala HR, Srivenugopal KS. S-phase Specific Downregulation of Human O6-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) and its Serendipitous Interactions with PCNA and p21cip1 Proteins in Glioma Cells. *Neoplasia* 2018, 20(4):305–23.
 64. Khabibov M, Garifullin A, Boumber Y, Khaddour K, Fernandez M, Khamitov F, et al. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). *Int J Oncol* 2022, 60(6):69.
 65. Esemien Y, Awan M, Parwez R, Baig A, Rahman S, Masala I, et al. Molecular Pathogenesis of Glioblastoma in Adults and Future Perspectives: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 2022, 23(5):2607.
 66. Verdugo E, Puerto I, Medina MÁ. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment. *Cancer Commun (Lond)* 2022, 42(11):1083–111.
 67. Alexandru O, Horescu C, Sevastre AS, Cioc CE, Baloi C, Oprita A, et al. Receptor tyrosine kinase targeting in glioblastoma: Performance, limitations and future approaches. *Contemp Oncol (Pozn)* 2020, 24(1):55–66.
 68. Dewdney B, Jenkins MR, Best SA, Freytag S, Prasad K, Holst J, et al. From signalling pathways to targeted therapies: unravelling glioblastoma's secrets and harnessing two decades of progress. *Signal Transduct Target Ther* 2023, 8(1):400.
 69. Zhang Y, Dube C, Gibert M, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2018, 10(9):297.
 70. Zhang H, Wang Z, Qiao X, Peng N, Wu J, Chen Y, et al. Unveiling the therapeutic potential of IHMT-337 in glioma treatment: targeting the EZH2-SLC12A5 axis. *Mol Med* 2024, 30(1):91.
 71. Zhong R, Kou Z, Wang H, Li Q, Xiao Y, Li Z, et al. Downregulation of SLC12A5 in glioblastoma multiforme: a novel prognostic biomarker associated with brain edema and radiomic features. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2026. Available from: URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-026-05012-6>

72. Liu Y, Xu X, Tang H, Pan Y, Hu B, Huang G. Rosmarinic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in human glioma cells. *Int J Mol Med* 2021, 47(5):67.
73. Barron T, Yalçın B, Su M, Byun YG, Gavish A, Shamardani K, et al. GABAergic neuron-to-glioma synapses in diffuse midline gliomas. *Nature* 2025, 639(8056):1060–8.
74. Sparmann A, Xie Y, Verhoeven E, Vermeulen M, Lancini C, Gargiulo G, et al. The chromodomain helicase Chd4 is required for Polycomb-mediated inhibition of astroglial differentiation. *EMBO J* 2013, 32(11):1598–612.
75. Pang B, Zheng XR, Tian JX, Gao TH, Gu GY, Zhang R, et al. EZH2 promotes metabolic reprogramming in glioblastomas through epigenetic repression of EAF2-HIF1 α signaling. *Oncotarget* 2016, 7(29):45134–43.
76. Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, et al. Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell* 2013, 23(6):839–52.
77. Gilardini Montani MS, Benedetti R, Cirone M. Targeting EZH2 in Cancer: Mechanisms, Pathways, and Therapeutic Potential. *Molecules* 2024, 29(24):5817.
78. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15(3):178–96.
79. Huang M, Zhang D, Wu JY, Xing K, Yeo E, Li C, et al. Wnt-mediated endothelial transformation into mesenchymal stem cell-like cells induces chemoresistance in glioblastoma. *Sci Transl Med* 2020, 12(532):eaay7522.
80. Zhang M, Atkinson RL, Rosen JM. Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(8):3522–7.
81. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med* 2018, 12(4):361–73.
82. Gao L, Liu J, Li Y, Yang J, Cai J, Wang L, et al. TMBIM1 promotes epithelial mesenchymal transition by accelerating autophagic degradation of E-cadherin in glioblastoma. *Sci Rep* 2025, 15(1):17488.
83. Arora A, Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biol Ther* 2019, 20(8):1083–90.
84. Ortiz R, Perazzoli G, Cabeza L, Jiménez-Luna C, Luque R, Prados J, et al. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Curr Neuropharmacol* 2021, 19(4):513–37.
85. Chamberlain MC. Temozolomide: Therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas. *Expert Rev Neurother* 2010, 10(10):1537–44.
86. Tsai CY, Ko HJ, Chiou SJ, Lai YL, Hou CC, Javaria T, et al. NBM-BMX, an HDAC8 inhibitor, overcomes temozolomide resistance in glioblastoma multiforme by downregulating the β -catenin/c-myc/SOX2 pathway and upregulating p53-mediated MGMT inhibition. *Int J Mol Sci* 2021, 22(11):5907.
87. Wick W, Platten M. Understanding and targeting alkylator resistance in glioblastoma. *Cancer Discov* 2014, 4(10):1120–2.

88. Singh N, Miner A, Hennis L, Mittal S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma – a comprehensive review. *Cancer Drug Resist* 2021, 4(1):17–43.
89. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002, 39(3):193–206.
90. Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: An overview of proliferation and invasion. *Neuro Oncol* 2014, 16(12):1575–84.
91. Corder R, Black KL, Wheeler CJ. Exploitation of adaptive evolution in glioma treatment. *CNS oncology*. 2013, 16(12):1575–84.
92. Wang H, Yao L, Chen J, Li Y, Su Z, Liu Y, et al. The dual role of POSTN in maintaining glioblastoma stem cells and the immunosuppressive phenotype of microglia in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2024, 43(1):252.
93. Yin HT, Lu H, Yang JH, Li Q, Li M, Zhao QQ, et al. Daurisoline suppress glioma progression by inhibiting autophagy through PI3K/AKT/mTOR pathway and increases TMZ sensitivity. *Biochem Pharmacol* 2024, 223:116113.
94. Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduct Target Ther* 2017, 2:17040.
95. Westphal M, Maire CL, Lamszus K. EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. *CNS Drugs* 2017, 31(9):723–35.
96. AghaAmiri S, Ghosh SC, Hernandez Vargas S, Halperin DM, Azhdarinia A. Somatostatin Receptor Subtype-2 Targeting System for Specific Delivery of Temozolomide. *J Med Chem* 2024, 67(4):2425–37.
97. Feldheim J, Kessler AF, Monoranu CM, Ernestus RI, Löhner M, Hagemann C. Changes of O6-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse—A Meta-Analysis Type Literature Review. *Cancers (Basel)* 2019, 11(12):1837.
98. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: A randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol* 2013, 31(32):4085–91.
99. Pinson H, Hallaert G, Van der Meulen J, Dedeurwaerdere F, Vanhauwaert D, Van den Broecke C, et al. Weak MGMT gene promoter methylation confers a clinically significant survival benefit in patients with newly diagnosed glioblastoma: a retrospective cohort study. *J Neurooncol* 2020, 146(1):55–62.
100. Iturrioz-Rodríguez N, Samprón N, Matheu A. Current advances in temozolomide encapsulation for the enhancement of glioblastoma treatment. *Theranostics* 2023, 13(9):2734–56.
101. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperrière NJ, Xia D, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: Refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol* 2019, 21(2):167–78.

102. Kohsaka S, Wang L, Yachi K, Mahabir R, Narita T, Itoh T, et al. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. *Mol Cancer Ther* 2012, 11(6):1289–99.
103. Tang JB, Svilar D, Trivedi RN, Wang XH, Goellner EM, Moore B, et al. N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase β modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. *Neuro Oncol* 2011, 13(5):471–86.
104. Parsons JL, Dianova II, Allinson SL, Dianov GL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *FEBS J* 2005, 272(8):2012–21.
105. Woodhouse BC, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2008, 7(6):932–40.
106. Azuaje F, Tiemann K, Niclou SP. Therapeutic control and resistance of the EGFR-driven signaling network in glioblastoma. *Cell Commun Signal* 2015, 13:23.
107. Zheng SH, Huang JL, Chen M, Wang BL, Ou QS, Huang SY. Diagnostic value of preoperative inflammatory markers in patients with glioma: A multicenter cohort study. *J Neurosurg* 2018, 129(3):583–92.
108. Nogueira L, Ruiz-Ontañón P, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, Berciano MT, Aldaz B, et al. Blockade of the NF κ B pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both in vitro and in vivo. *Oncogene* 2011, 30(32):3537–48.
109. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3(6):401–10.
110. Song Z, Pan Y, Ling G, Wang S, Huang M, Jiang X, et al. Escape of U251 glioma cells from temozolomide-induced senescence was modulated by CDK1/survivin signaling. *Am J Transl Res* 2017, 9(5):2163–80.
111. Tompa M, Kalovits F, Nagy A, Kalman B. Contribution of the Wnt Pathway to Defining Biology of Glioblastoma. *Neuromolecular Med* 2018, 20(4):437–51.
112. Yun EJ, Kim S, Hsieh JT, Baek ST. Wnt/ β -catenin signaling pathway induces autophagy-mediated temozolomide-resistance in human glioblastoma. *Cell Death Dis* 2020, 11(9):771.
113. Huang BR, Liu YS, Lai SW, Lin HJ, Shen CK, Yang LY, et al. CAIX Regulates GBM Motility and TAM Adhesion and Polarization through EGFR/STAT3 under Hypoxic Conditions. *Int J Mol Sci* 2020, 21(16):5838.
114. Zhang J, Stevens MFG, Laughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: Molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology* 2010, 78(2):103–14.
115. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr BA, Simons B, Bogiel T, et al. Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett* 2012, 325(1):42–53.

116. Segerman A, Niklasson M, Haglund C, Bergström T, Jarvius M, Xie Y, et al. Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Rep* 2016, 17(11):2994–3009.
117. Swiatek-Machado K, Kaminska B. STAT Signaling in Glioma Cells. In: Baranska J, editor. *Glioma Signaling. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2nd ed. Switzerland: Springer, Cham; 2020. p. 203–16.
118. Banelli B, Carra E, Barbieri F, Würth R, Parodi F, Pattarozzi A, et al. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle* 2015, 14(21):3418–29.
119. Kim GW, Lee DH, Yeon SK, Jeon YH, Yoo J, Lee SW, et al. Temozolomide-resistant glioblastoma depends on HDAC6 activity through regulation of DNA mismatch repair. *Anticancer Res* 2019, 39(12):6731–41.
120. Wang Z, Hu P, Tang F, Lian H, Chen X, Zhang Y, et al. HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cancer Lett* 2016, 379(1):134–42.
121. Lee S, Kim M. Analysis of Patients with Glioblastoma Treated with Standard 6-Week Chemoradiation Followed by Temozolomide: Treatment Outcomes and Prognostic Factors. *Medicina (Kaunas)* 2025, 61(3):376.
122. Thomas G, Rahman R. Evolution of Preclinical Models for Glioblastoma Modelling and Drug Screening. *Curr Oncol Rep* 2025, 27(5):601–24.
123. van Bodegraven EJ, van Asperen JV., Robe PAJ, Hol EM. Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. *Glia* 2019, 67(8):1417–33.
124. Radu R, Petrescu GED, Gorgan RM, Brehar FM. GFAP δ : A Promising Biomarker and Therapeutic Target in Glioblastoma. *Front Oncol* 2022, 12:859247.
125. Messing A, Brenner M. GFAP at 50. *ASN Neuro* 2020, 12:1759091420949680.
126. Simone L, Capobianco DL, Di Palma F, Binda E, Legnani FG, Vescovi AL, et al. GFAP serves as a structural element of tunneling nanotubes between glioblastoma cells and could play a role in the intercellular transfer of mitochondria. *Front Cell Dev Biol* 2023, 11:1221671.
127. Ahmadipour Y, Gembruch O, Pierscianek D, Sure U, Jabbarli R. Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival? *Neurochirurgie* 2020, 66(3):150–4.
128. Stassen OMJA, van Bodegraven EJ, Giuliani F, Moeton M, Kanski R, Sluijs JA, et al. GFAP δ /GFAP α ratio directs astrocytoma gene expression towards a more malignant profile. *Oncotarget* 2017, 8(50):88104–21.
129. Uceda-Castro R, van Asperen JV., Vennin C, Sluijs JA, van Bodegraven EJ, Margarido AS, et al. GFAP splice variants fine-tune glioma cell invasion and tumour dynamics by modulating migration persistence. *Sci Rep* 2022, 12(1):424.
130. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O’Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 2021, 24(3):312–25.

131. Zhao X, Zhang M, Zou WZ, Li C, Zhang S, Lv Y, et al. Ezh2 Regulates Early Astrocyte Morphogenesis and Influences the Coverage of Astrocytic Endfeet on the Vasculature. *Cell Prolif* 2025, 58(8):e70015.
132. Gečys D, Akramas L, Preikšaitis A, Balnytė I, Vaitkevičius A, Šimienė J, et al. Comparison of the Effect of the Combination of Sodium Valproate and Sodium Dichloroacetate on the Expression of SLC12A2, SLC12A5, CDH1, CDH2, EZH2, and GFAP in Primary Female Glioblastoma Cells with That of Temozolomide. *Pharmaceutics* 2025, 17(9):1161.
133. Sereika M, Urbanaviciute R, Tamasauskas A, Skiriute D, Vaitkiene P. GFAP expression is influenced by astrocytoma grade and rs2070935 polymorphism. *J Cancer* 2018, 9(23):4496–502.
134. Blums K, Kalra LP, Nerntengian N, Zylyftari S, Luger S, Wehinger J, et al. Prospective evaluation of GFAP point-of-care testing for rapid diagnosis of glioblastoma. *J Neurooncol* 2026, 177(1):22.
135. Abu-Rumeileh S, Barba L, Bache M, Halbgebauer S, Oeckl P, Steinacker P, et al. Plasma β -synuclein, GFAP, and neurofilaments in patients with malignant gliomas undergoing surgical and adjuvant therapy. *Ann Clin Transl Neurol* 2023, 10(10):1924–30.
136. Cooksey LC, Friesen DC, Mangan ED, Mathew PA. Prospective Molecular Targets for Natural Killer Cell Immunotherapy against Glioblastoma Multiforme. *Cells* 2024, 13(18):1567.
137. Malaer JD, Mathew PA. Role of LLT1 and PCNA as Natural Killer Cell Immune Evasion Strategies of HCT 116 Cells. *Anticancer Res* 2020, 40(12):6613–21.
138. Marrufo AM, Mathew SO, Chaudhary P, Malaer JD, Ahmed N, Vishwanatha JK, et al. Blocking PCNA interaction with NKp44 enhances primary natural killer cell-mediated lysis of triple-negative breast cancer cells. *Am J Cancer Res* 2023, 13(3):1082–90.
139. Iraqi M, Edri A, Greenshpan Y, Goldstein O, Ofir N, Bolel P, et al. Blocking the PCNA/NKp44 Checkpoint to Stimulate NK Cell Responses to Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci* 2022, 23(9):4717.
140. Kundu K, Ghosh S, Sarkar R, Edri A, Brusilovsky M, Gershoni-Yahalom O, et al. Inhibition of the NKp44-PCNA immune checkpoint using a MAb to PCNA. *Cancer Immunol Res* 2019, 7(7):1120–34.
141. Lv Q, Zhang J, Yi Y, Huang Y, Wang Y, Wang Y, et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen Has an Association with Prognosis and Risks Factors of Cancer Patients: a Systematic Review. *Mol Neurobiol* 2016, 53(9):6209–17.
142. Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemona A, Czyżewska J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009, 29(8):3049–52.
143. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Pronin I. Prognostic value of tumour associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: An analysis of 168 cases. *J Clin Pathol* 1999, 52(8):574–80.

144. Bourmeau G, Anezo O, Raymond J, Ballestín A, Pichol-Thievend C, Reveilles J, et al. Proneural-mesenchymal hybrid glioblastoma cells are resistant to therapy and dependent on nuclear import. *Neuro Oncol* 2025, 27(11):2876–93.
145. Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Funase M, Murayama T, Osawa M, et al. Shared molecular targets in pediatric gliomas and ependymomas. *Pediatr Blood Cancer* 2011, 57(7):1117–23.
146. Uloza V, Kuzminienė A, Palubinskienė J, Balnytė I, Ulozienė I, Valančiūtė A. Model of human recurrent respiratory papilloma on chicken embryo chorioallantoic membrane for tumor angiogenesis research. *Histol Histopathol* 2017, 32(7):699–710.
147. Xu J, Morris GF. p53-Mediated Regulation of Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cells Exposed to Ionizing Radiation. *Mol Cell Biol* 1999, 19(1):12–20.
148. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2023, 8(1):92.
149. Cooksey LC, Hoteit T, Mathew E, Sabnis NA, Dickerman RD, Chaudhary P, et al. Cell-Surface PCNA Is Co-Expressed with Biomarkers of Stemness and Immunosuppression in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2025, 17(24):3093.
150. Cooksey LC, Mathew PA. Glioblastoma multiforme expresses cell surface PCNA, a potential target for NK cell-mediated immunotherapy. *J Immunol* 2022, 208(S1):62.02.
151. Xia P. The significance of epithelial–mesenchymal transition (EMT) in the initiation, plasticity, and treatment of glioblastoma. *Genes Dis* 2026, 13(1):101711.
152. Wei Y, Chen D, Zhang Q, You F, Fu YL, Zheng L, et al. ECM-based molecular subtypes define prognostic, EMT status, and therapeutic diversity in IDH-mutant gliomas. *NPJ Precis Oncol* 2025, 9(1):301.
153. Ratliff M, Karimian-Jazi K, Hoffmann DC, Rauschenbach L, Simon M, Hai L, et al. Individual glioblastoma cells harbor both proliferative and invasive capabilities during tumor progression. *Neuro Oncol* 2023, 25(12):2150–62.
154. Li Z, Guo M, Gu M, Cai Z, Wu Q, Yu J, et al. Design and Synthesis of 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane-2, 3-dicarboxylic Acid Derivatives as PP5 Inhibitors To Reverse Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme. *J Med Chem* 2024, 67(17):15691–710.
155. Damanskienė E, Balnytė I, Valančiūtė A, Lesauskaitė V, Alonso MM, Stakišaitis D. The Comparative Experimental Study of Sodium and Magnesium Dichloroacetate Effects on Pediatric PBT24 and SF8628 Cell Glioblastoma Tumors Using a Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model and on Cells In Vitro. *Int J Mol Sci* 2022, 23(18):10455.
156. Lin L, Xiong Y, Guo Y, Tu Z, Luo P, Fang Z, et al. NAT10-mediated ac4C modifications regulate glioblastoma progression. *Cell Death Dis* 2026, 17(1):181.
157. Tsutsumi K, Kawahara K, Kojima M, Yuasa A, Imazato M, Kidachi J, et al. Involvement of neuropilin-1 in radiation-induced cell death via modulation of DNA double-strand break repair in glioblastoma T98G cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2026, 1870(4):130906.

158. Kanapathipillai M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer. *Cancers (Basel)* 2018, 10(6):154.
159. Babamohamadi M, Babaei E, Ahmed SB, Babamohammadi M, Jalal AH, Othman G. Recent findings on the role of wild-type and mutant p53 in cancer development and therapy. *Front Mol Biosci* 2022, 9:903075.
160. Sala C, Schiebel E. When the Clock Is Ticking: The Role of Mitotic Duration in Cell Fate Determination. *BioEssays* 2025, 41(11):e70061.
161. Kennedy MC, Lowe SW. Mutant p53: it's not all one and the same. *Cell Death Differ* 2022, 29(5):983–87.
162. Chen X, Zhang T, Su W, Dou Z, Zhao D, Jin X, et al. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death Dis* 2022, 13(11):974.
163. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013, 155(2):462–77.
164. Pouyan A, Ghorbanlo M, Eslami M, Jahanshahi M, Ziaei E, Salami A, et al. Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies. *Mol Cancer* 2025, 24(1):58.
165. Ding J, Li X, Khan S, Zhang C, Gao F, Sen S, et al. EGFR suppresses p53 function by promoting p53 binding to DNA-PKcs: a noncanonical regulatory axis between EGFR and wild-type p53 in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2022, 24(10):1712–25.
166. Singh S, Dey D, Barik D, Mohapatra I, Kim S, Sharma M, et al. Glioblastoma at the crossroads: current understanding and future therapeutic horizons. *Signal Transduct Target Ther* 2025, 10(1):213.
167. Yang H, Cao Y, Zhao W, Wen YF, Wu Y, Wang T, et al. Chloroethylnitrosourea analogue HJ03 overcomes temozolomide resistance of glioblastoma in mice through induction of ferroptosis and apoptosis. *Acta Pharmacol Sin* 2026. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41401-025-01744-y>
168. Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev* 2019, 80:101896.
169. Osanai T, Takagi Y, Toriya Y, Nakagawa T, Aruga T, Iida S, et al. Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005, 35(3):121–5.
170. Zhang S, Carlsen L, Hernandez Borrero L, Seyhan AA, Tian X, El-Deiry WS. Advanced Strategies for Therapeutic Targeting of Wild-Type and Mutant p53 in Cancer. *Biomolecules* 2022, 12(4):548.
171. Issaeva N. p53 signaling in cancers. *Cancers (Basel)* 2019, 11(3):332.
172. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer* 2017, 83:258–65.
173. Yamagishi M, Uchamaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2017, 29(5):375–81.
174. El Baba R, Pasquereau S, Haidar Ahmad S, Monnier F, Abad M, Bibeau F, et al. EZH2-Myc driven glioblastoma elicited by cytomegalovirus infection of human astrocytes. *Oncogene* 2023, 42(24):2031–45.

175. Paskeh MDA, Mehrabi A, Gholami MH, Zabolian A, Ranjbar E, Saleki H, et al. EZH2 as a new therapeutic target in brain tumors: Molecular landscape, therapeutic targeting and future prospects. *Biomed Pharmacother* 2022, 146:112532.
176. Kim KH, Roberts CWM. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med* 2016, 22(2):128–34.
177. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 2008, 647(1–2):21–9.
178. Helin K, Dhanak D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* 2013, 502(7472):480–8.
179. Chen Y nan, Hou S qiang, Jiang R, Sun J long, Cheng C dong, Qian Z run. EZH2 is a potential prognostic predictor of glioma. *J Cell Mol Med* 2021, 25(2):925–36.
180. Böhm J, Muenzner JK, Caliskan A, Ndreshkjana B, Erlenbach-Wünsch K, Merkel S, et al. Loss of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) at tumor invasion front is correlated with higher aggressiveness in colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019, 145(9):2227–40.
181. Kavaliauskaite D, Stakišaitis D, Martinkute J, Šlekiene L, Kazlauskas A, Balnyte I, et al. The Effect of Sodium Valproate on the Glioblastoma U87 Cell Line Tumor Development on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and on EZH2 and p53 Expression. *Biomed Res Int* 2017, 2017:6326053.
182. Zhang Y, Yu X, Chen L, Zhang Z, Feng S. EZH2 overexpression is associated with poor prognosis in patients with glioma. *Oncotarget* 2017, 8(1):565–73.
183. Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression. *Br J Cancer* 2012, 106(2):243–7.
184. Xin L, Tan Y, Zhu Y, Cui X, Wang Q, Zhao J, et al. EPIC-0307-mediated selective disruption of PRADX–EZH2 interaction and enhancement of temozolomide sensitivity to glioblastoma via inhibiting DNA repair and MGMT. *Neuro Oncol* 2023, 25(11):1976–88.
185. Fan TY, Wang H, Xiang P, Liu YW, Li HZ, Lei BX, et al. Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in Glioblastoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(10):6662–70.
186. Mohammad F, Weissmann S, Leblanc B, Pandey DP, Højfeldt JW, Comet I, et al. EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat Med* 2017, 23(4):483–92.
187. Kader BA, Distefano R, West KL, West AG. EZH2 inhibition in glioblastoma stem cells increases the expression of neuronal genes and the neuronal developmental regulators ZIC2, ZNF423 and MAFB. *bioRxiv* 2021. Available from: URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.22.469535v1>
188. Zhao G, Deng Z, Li X, Wang H, Chen G, Feng M, et al. Targeting EZH2 regulates the biological characteristics of glioma stem cells via the Notch1 pathway. *Exp Brain Res* 2023, 241(10):2409–18.
189. Han B, Meng X, Wu P, Li Z, Li S, Zhang Y, et al. ATRX/EZH2 complex epigenetically regulates FADD/PARP1 axis, contributing to TMZ resistance in glioma. *Theranostics* 2020, 10(7):3351–65.

190. Chen X, Lin S, You H, Chen J, Wu Q, Yin K, et al. Integrating Metabolic RNA Labeling-Based Time-Resolved Single-Cell RNA Sequencing with Spatial Transcriptomics for Spatiotemporal Transcriptomic Analysis. *Small Methods* 2025, 9(3):e2401297.
191. Stitzlein LM, Adams JT, Stitzlein EN, Dudley RW, Chandra J. Current and future therapeutic strategies for high-grade gliomas leveraging the interplay between epigenetic regulators and kinase signaling networks. *J Exp Clin Cancer Res* 2024, 41(1):12.
192. Vo BHT, Li C, Morgan MA, Theurillat I, Finkelstein D, Wright S, et al. Inactivation of *Ezh2* Upregulates *Gfi1* and Drives Aggressive Myc-Driven Group 3 Medulloblastoma. *Cell Rep* 2017, 18(12):2907–17.
193. Kim H, Kim EH, Kwak G, Chi SG, Kim SH, Yang Y. Exosomes: Cell-derived nanoplateforms for the delivery of cancer therapeutics. *Int J Mol Sci* 2020, 22(1):14.
194. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones A V., et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010, 42(8):722–6.
195. Ntziachristos P, Tsirigos A, Vlierberghe P Van, Nedjic J, Trimarchi T, Flaherty MS, et al. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2012, 18(2):298–301.
196. Keller M, Blom M, Conze LL, Guo M, Hägerstrand D, Aspenström P. Altered cytoskeletal status in the transition from proneural to mesenchymal glioblastoma subtypes. *Sci Rep* 2022, 12(1):9838.
197. Zhao J, Zhang L, Dong X, Liu L, Huo L, Chen H. High Expression of Vimentin is Associated with Progression and a Poor Outcome in Glioblastoma. *Immunohistochemistry Mol Morphol* 2018, 26(5):337–44.
198. Ceschi S, Berselli M, Cozzaglio M, Giantin M, Toppo S, Spolaore B, et al. Vimentin binds to G-quadruplex repeats found at telomeres and gene promoters. *Nucleic Acids Res* 2022, 50(3):1370–81.
199. Zottel A, Novak M, Šamec N, Majc B, Colja S, Katrašnik M, et al. Anti-Vimentin Nanobody Decreases Glioblastoma Cell Invasion In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel)* 2023, 15(3):573.
200. Liu Y, Zhao S, Chen Y, Ma W, Lu S, He L, et al. Vimentin promotes glioma progression and maintains glioma cell resistance to oxidative phosphorylation inhibition. *Cell Oncol (Dordr)* 2023, 46(6):1791–1806.
201. Virtakoivu R, Mai A, Mattila E, De Franceschi N, Imanishi SY, Corthals G, et al. Vimentin-ERK signaling uncouples slug gene regulatory function. *Cancer Res* 2015, 75(11):2349–62.
202. Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, Mohsin S, Jamal A, Teh MT, et al. Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (EMT) mediated metastasis. *Cancers (Basel)* 2021, 13(19):4985.

203. Patteson AE, Vahabikashi A, Pogoda K, Adam SA, Mandal K, Kittisopikul M, et al. Vimentin protects cells against nuclear rupture and DNA damage during migration. *J Cell Biol* 2019, 218(12):4079–92.
204. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009, 119(6):1429–37.
205. Thankamony AP, Saxena K, Murali R, Jolly MK, Nair R. Cancer Stem Cell Plasticity – A Deadly Deal. *Front Mol Biosci* 2020, 7:79.
206. Lai SW, Huang BR, Liu YS, Lin HY, Chen CC, Tsai CF, et al. Differential characterization of temozolomide-resistant human glioma cells. *Int J Mol Sci* 2018, 19(1):127.
207. Majc B, Sever T, Zarić M, Breznik B, Turk B, Lah TT. Epithelial-to-mesenchymal transition as the driver of changing carcinoma and glioblastoma microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020, 1867(10):118782.
208. Iser IC, Pereira MB, Lenz G, Wink MR. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *Med Res Rev* 2017, 37(2):271–313.
209. Kyritsi K, Ye J, Douglass E, Pacholczyk R, Tsuboi N, Otani Y, et al. Brain CD73 modulates interferon signaling to regulate glioblastoma invasion. *Neurooncol Adv* 2025, 7(1):vdaf080.
210. Saito T, Muragaki Y, Komori A, Nitta M, Tsuzuki S, Koriyama S, et al. Increase in serum vimentin levels in patients with glioma and its correlation with prognosis of patients with glioblastoma. *Neurosurg Rev* 2023, 46(1):202.
211. Zottel A, Jovčevska I, Šamec N, Komel R. Cytoskeletal proteins as glioblastoma biomarkers and targets for therapy: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2021, 160:103283.
212. Yang X, Wang Q, Cao E. Structure of the human cation–chloride cotransporter NKCC1 determined by single-particle electron cryo-microscopy. *Nat Commun* 2020, 11(1):2359.
213. Gong Y, Wu M, Shen J, Tang J, Li J, Xu J, et al. Inhibition of the NKCC1/NF-κB Signaling Pathway Decreases Inflammation and Improves Brain Edema and Nerve Cell Apoptosis in an SBI Rat Model. *Front Mol Neurosci* 2021, 14:641993.
214. Amara S, Tiriveedhi V. Inflammatory role of high salt level in tumor microenvironment (Review). *Int J Oncol* 2017, 50(5):1477–81.
215. Cong D, Zhu W, S. Kuo J, Hu S, Sun D. Ion Transporters in Brain Tumors. *Curr Med Chem* 2015, 22(10):1171–81.
216. Capó-Aponte JE, Wang Z, Bildin VN, Pokorny KS, Reinach PS. Fate of hypertonicity-stressed corneal epithelial cells depends on differential MAPK activation and p38MAPK/Na-K-2Cl cotransporter1 interaction. *Exp Eye Res* 2007, 84(2):361–72.
217. Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell* 2021, 12(8):599-620.

218. Garzon-Muvdi T, Schiapparelli P, ap Rhys C, Guerrero-Cazares H, Smith C, Kim DH, et al. Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. *PLoS Biol* 2012, 10(5):e1001320.
219. Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, et al. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med* 2014, 6(244):244ra89.
220. Sun PL, Jin Y, Park SY, Kim H, Park E, Jheon S, et al. Expression of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoform 1 (NKCC1) predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma and EGFR-mutated adenocarcinoma patients. *QJM* 2016, 109(4):237–44.
221. Luo L, Guan X, Begum G, Ding D, Gayden J, Hasan MN, et al. Blockade of cell volume regulatory protein NKCC1 increases TMZ-induced glioma apoptosis and reduces astrogliosis. *Mol Cancer Ther* 2020, 19(7):1550–61.
222. Luo L, Wang J, Ding D, Hasan MN, Yang S Sen, Lin SH, et al. Role of NKCC1 Activity in Glioma K⁺ Homeostasis and Cell Growth: New Insights With the Bumetanide-Derivative STS66. *Front Physiol* 2020, 11:911.
223. Ernest NJ, Sontheimer H. Extracellular glutamine is a critical modulator for regulatory volume increase in human glioma cells. *Brain Res* 2007, 1144(1):231–8.
224. Haas BR, Cuddapah VA, Watkins S, Rohn KJ, Dy TE, Sontheimer H. With-no-lysine kinase 3 (WNK3) stimulates glioma invasion by regulating cell volume. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, 301(5):C1150–60.
225. Tanaka S, Miyazaki H, Shiozaki A, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. Cytosolic Cl⁻ affects the anticancer activity of paclitaxel in the gastric cancer cell line, MKN28 Cell. *Cell Physiol Biochem* 2017, 42(1):68–80.
226. Hiraoka K, Miyazaki H, Niisato N, Iwasaki Y, Kawauchi A, Miki T, et al. Chloride ion modulates cell proliferation of human androgen-independent prostatic cancer cell. *Cell Physiol Biochem* 2010, 25(4–5):379–88.
227. Schiapparelli P, Guerrero-Cazares H, Magaña-Maldonado R, Hamilla SM, Ganaha S, Goulin Lippi Fernandes E, et al. NKCC1 Regulates Migration Ability of Glioblastoma Cells by Modulation of Actin Dynamics and Interacting with Cofilin. *EBioMedicine* 2017, 21:94–103.
228. Damanskienė E, Balnytė I, Valančiūtė A, Alonso MM, Preikšaitis A, Stakišaitis D. The Different Temozolomide Effects on Tumorigenesis Mechanisms of Pediatric Glioblastoma PBT24 and SF8628 Cell Tumor in CAM Model and on Cells In Vitro. *Int J Mol Sci* 2022, 23(4):2001.
229. East MP, Laitinen T, Asquith CRM. WNK kinases: an untapped opportunity to modulate ion transport. *Nat Rev Drug Discov* 2020, 19(12):828.
230. Haas BR, Sontheimer H. Inhibition of the sodium-potassium-chloride cotransporter isoform-1 reduces glioma invasion. *Cancer Res* 2010, 70(13):5597–606.
231. Damanskienė E, Balnytė I, Valančiūtė A, Alonso MM, Stakišaitis D. Different Effects of Valproic Acid on SLC12A2, SLC12A5 and SLC5A8 Gene Expression in Pediatric Glioblastoma Cells as an Approach to Personalised Therapy. *Biomedicines* 2022, 10(5):968.

232. Juknevičienė M, Balnytė I, Valančiūtė A, Alonso MM, Preikšaitis A, Sužiedėlis K, et al. Differential Impact of Valproic Acid on SLC5A8, SLC12A2, SLC12A5, CDH1, and CDH2 Expression in Adult Glioblastoma Cells. *Biomedicines* 2024, 12(7):1416.
233. Juknevičienė M, Balnytė I, Valančiūtė A, Lesauskaitė V, Stanevičiūtė J, Čurkūnavičiūtė R, et al. Valproic Acid Inhibits NA-K-2CL Cotransporter RNA Expression in Male But Not in Female Rat Thymocytes. *Dose Response* 2019, 17(2):1559325819852444.
234. Stanevičiūtė J, Juknevičienė M, Palubinskienė J, Balnytė I, Valančiūtė A, Vosyliūtė R, et al. Sodium Dichloroacetate Pharmacological Effect as Related to Na–K–2Cl Cotransporter Inhibition in Rats. *Dose Response* 2018, 16(4):1559325818811522.
235. Stanevičiūtė J, Juknevičienė M, Balnytė I, Valančiūtė A, Lesauskaitė V, Fadejeva J, et al. Gender-Related Effect of Sodium Dichloroacetate on the Number of Hassall's Corpuscles and RNA NKCC1 Expression in Rat Thymus. *Biomed Res Int* 2019, 2019:1602895.
236. Pozzi D, Chini B. Quest for pharmacological regulators of KCC2. In: Tang X, editor. *Neuronal Chloride Transporters in Health and Disease*. UK: Academic Press; 2020. p. 709–27.
237. McMoneagle E, Zhou J, Zhang S, Huang W, Josiah SS, Ding K, et al. Neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 as a promising drug target for epilepsy treatment. *Acta Pharmacol Sin* 2024, 45(1):1–22.
238. Liu JY, Dai YB, Li X, Cao K, Xie D, Tong ZT, et al. Solute carrier family 12 member 5 promotes tumor invasion/metastasis of bladder urothelial carcinoma by enhancing NF-κB/MMP-7 signaling pathway. *Cell Death Dis* 2017, 8(3):e2691.
239. Bortner CD, Sifre MI, Cidlowski JA. Cationic gradient reversal and cytoskeleton-independent volume regulatory pathways define an early stage of apoptosis. *J Biol Chem* 2008, 283(11):7219–29.
240. Okada Y, Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001, 130(3):377–83.
241. Bortner CD, Cidlowski JA. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2007, 462(2):176–88.
242. Chen J, Wang H, Deng C, Fei M. SLC12A5 as a novel potential biomarker of glioblastoma multiforme. *Mol Biol Rep* 2023, 50(5):4285–99.
243. Liu H, Pan Z, Lin X, Chen L, Yang Q, Zhang W, et al. A potassium-chloride cotransporter with altered genome architecture functions as a suppressor in glioma. *J Cell Mol Med* 2024, 28(9):e18352.
244. Wang J, Liu W, Xu W, Yang B, Cui M, Li Z, et al. Comprehensive Analysis of the Oncogenic, Genomic Alteration, and Immunological Landscape of Cation-Chloride Cotransporters in Pan-Cancer. *Front Oncol* 2022, 12:819688.
245. Thanh HD, Lee S, Nguyen TT, Huu TN, Ahn EJ, Cho SH, et al. Temozolomide promotes matrix metalloproteinase 9 expression through p38 MAPK and JNK pathways in glioblastoma cells. *Sci Rep* 2024, 14(1):14341.

246. Sun L, Yan Y, Lv H, Li J, Wang Z, Wang K, et al. Rapamycin targets STAT3 and impacts c-Myc to suppress tumor growth. *Cell Chem Biol* 2022, 29(3):373–85.
247. Aronica E, Boer K, Redeker S, Spliet WGM, van Rijen PC, Troost D, et al. Differential expression patterns of chloride transporters, Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter and K⁺-Cl⁻-cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuroscience* 2007, 145(1):185–96.
248. Di Cristo G, Awad PN, Hamidi S, Avoli M. KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. *Prog Neurobiol* 2018, 162:1–16.
249. MacKenzie G, O'Toole KK, Maguire J. Compromised GABAergic inhibition contributes to tumor-associated epilepsy. *Epilepsy Res* 2016, 126:185–96.
250. Gyimesi G, Pujol-Giménez J, Kanai Y, Hediger MA. Sodium-coupled glucose transport, the SLC5 family, and therapeutically relevant inhibitors: from molecular discovery to clinical application. *Pflugers Arch* 2020, 472(9):1177–206.
251. Hong C, Maunakea A, Jun P, Bollen AW, Hodgson JG, Goldenberg DD, et al. Shared epigenetic mechanisms in human and mouse gliomas inactivate expression of the growth suppressor SLC5A8. *Cancer Res* 2005, 65(9):3617–23.
252. Ikeda K, Shiraishi K, Koga T, Motooka Y, Fujino K, Shibata H, et al. Prognostic significance of aberrant methylation of solute carrier gene family 5A8 in lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 2015, 99(5):1755–9.
253. SLC5A8 and its role in tumorigenesis. Available at: <https://atlasgeneticsoncology.org/deep-insight/20107/slc5a8-and-its-role-in-tumorigenesis>
254. Babu E, Ramachandran S, Coothankandaswamy V, Elangovan S, Prasad PD, Ganapathy V, et al. Role of SLC5A8, a plasma membrane transporter and a tumor suppressor, in the antitumor activity of dichloroacetate. *Oncogene* 2011, 30(38):4026–37.
255. Ha SY, Song HS, Kim JY, Choi YH, Choi JH. Effect of SLC5A8 Missense Variants on Its Tumor-Suppressive Function. *J Korean Med Sci* 2025, 40(27):e146.
256. Thangaraju M, Ananth S, Martin PM, Roon P, Smith SB, Sterneck E, et al. c/ebpdelta Null mouse as a model for the double knock-out of slc5a8 and slc5a12 in kidney. *J Biol Chem* 2006, 281(37):26769–73.
257. Frank H, Gröger N, Diener M, Becker C, Braun T, Boettger T. Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *J Biol Chem* 2008, 283(36):24729–37.
258. Gierlikowski W, Grzędzicka J, Konieczek K, Kotlarek-Łysakowska M. MicroRNAs and Their Inhibition in Modulating SLC5A8 Expression in the Context of Papillary Thyroid Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2025, 26(16):7889.
259. Zhang Y, Bao YL, Wu Y, Yu CL, Sun Y, Li YX. Identification and characterization of the human SLC5A8 gene promoter. *Cancer Genet Cytogenet* 2010, 196(2):124–32.
260. Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim KM. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol* 2005, 18(2):170–8.

261. Paroder V, Spencer SR, Paroder M, Arango D, Schwartz S, Mariadason JM, et al. Na⁺/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: Molecular characterization of SMCT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(19):7270–5.
262. Zhang XM, Meng QH, Kong FF, Wang K, Du LJ. SLC5A8 regulates the biological behaviors of cervical cancer cells through mediating the Wnt signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020, 24(9):4679–86.
263. Vargas-Sierra O, Hernández-Juárez J, Uc-Uc PY, Herrera LA, Domínguez-Gómez G, Gariglio P, et al. Role of SLC5A8 as a Tumor Suppressor in Cervical Cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2024, 29(1):16.
264. Coothankandaswamy V, Elangovan S, Singh N, Prasad PD, Thangaraju M, Ganapathy V. The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumour progression through depletion of survivin without involving its transport function. *Biochem J* 2013, 450(1):169–78.
265. Koltai T, Fliegel L. Dichloroacetate for Cancer Treatment: Some Facts and Many Doubts. *Pharmaceuticals (Basel)* 2024, 17(6):744.
266. Yang Y, Liao C, Yang Q, Li Y, Tang Y, Xu B. Role of hypermethylated SLC5A8 in follicular thyroid cancer diagnosis and prognosis prediction. *World J Surg Oncol* 2023, 21(1):367.
267. Fan C, Huang Z, Xu H, Zhang T, Wei H, Gao J, et al. Machine learning-based identification of co-expressed genes in prostate cancer and CRPC and construction of prognostic models. *Sci Rep* 2025, 15(1):5679.
268. Kaji I, Iwanaga T, Watanabe M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD, et al. SCFA transport in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015, 308(3):G188–97.
269. Sheikholeslami S, Azizi F, Ghasemi A, Alibakhshi A, Parsa H, Shivaee S, et al. The Epigenetic Modification of SLC5A8 in Papillary Thyroid Carcinoma and Its Effects on Clinic-Pathological Features. *Iran J Public Health* 2022, 51(3):634–42.
270. Milutinovic S, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 2007, 28(3):560–71.
271. Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MS V., Mello MLS, De Vidal BC. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. *PLoS One* 2017, 12(1):e0170740.
272. Juknevičienė M, Balnytė I, Valančiūtė A, Stanevičiūtė J, Sužiedėlis K, Stakišaitis D. The effect of valproic acid on SLC5A8 expression in gonad-intact and gonadectomized rat thymocytes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2022, 36:20587384211051954.
273. Juknevičienė M. Dichloroacetato, valpro rūgšties ir jų derinio farmakologinis poveikis žiurkių timocitams bei suaugusio žmogaus glioblastomos raidai: daktaro disertacija: gamtos mokslai, biologijos mokslo kryptis (N 010). Kaunas: LSMU Akademinė leidyba; 2024.

274. Damanskienė E. Eksperimentiniai dichloroacetato ir jo derinio su valpro rūgštimi farmakologinio poveikio vaikų glioblastomai tyrimai: daktaro disertacija: medicinos ir sveikatos mokslai, medicina (M 001). Kaunas: LSMU Akademine leidyba; 2023.
275. Noronha C, Ribeiro AS, Taipa R, Castro DS, Reis J, Faria C, et al. Cadherin expression and EMT: A focus on gliomas. *Biomedicine* 2021, 9(10):1328.
276. Förster A, Brand F, Banan R, Hüneburg R, Weber CAM, Ewert W, et al. Rare germline variants in the E-cadherin gene CDH1 are associated with the risk of brain tumors of neuroepithelial and epithelial origin. *Acta Neuropathol* 2021, 142(1):191–210.
277. Bückler L, Lehmann U. CDH1 (E-cadherin) Gene Methylation in Human Breast Cancer: Critical Appraisal of a Long and Twisted Story. *Cancers (Basel)* 2022, 14(18):4377.
278. Rätze MAK, Koorman T, Sijnesael T, Bassey-Archibong B, van de Ven R, Enserink L, et al. Loss of E-cadherin leads to Id2-dependent inhibition of cell cycle progression in metastatic lobular breast cancer. *Oncogene* 2022, 41(21):2932–44.
279. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6(8):622–34.
280. Lau MT, Klausen C, Leung PCK. E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via B-catenin-Egr1-mediated PTEN expression. *Oncogene* 2011, 30(24):2753–66.
281. St. Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM, Kerbel RS. E-cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin- dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol* 1998, 142(2):557–71.
282. O'Brien SJ, Fiechter C, Burton J, Hallion J, Paas M, Patel A, et al. Long non-coding RNA ZFAS1 is a major regulator of epithelial-mesenchymal transition through miR-200/ZEB1/E-cadherin, vimentin signaling in colon adenocarcinoma. *Cell Death Discov* 2021, 7(1):61.
283. Li M, Rao X, Cui Y, Zhang L, Li X, Wang B, et al. The keratin 17/YAP/IL6 axis contributes to E-cadherin loss and aggressiveness of diffuse gastric cancer. *Oncogene* 2022, 41(6):770–81.
284. Kielbik M, Szulc-Kielbik I, Klink M. E-Cadherin Expression in Relation to Clinicopathological Parameters and Survival of Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* 2022, 23(22):14383.
285. Luo M, Li J, Yang Q, Xu S, Zhang K, Chen J, et al. N4BP3 promotes breast cancer metastasis via NEDD4-mediated E-cadherin ubiquitination and degradation. *Cancer Lett* 2022, 550:215926.
286. Wijshake T, Zou Z, Chen B, Zhong L, Xiao G, Xie Y, et al. Tumor-suppressor function of Beclin 1 in breast cancer cells requires E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021, 118(5):e2020478118.
287. Bai X, Jiang X, Liu Y, Wang Y, Jiang X, Song G, et al. Krüppel-like factor 9 upregulates E-cadherin transcription and represses breast cancer invasion and metastasis. *Am J Cancer Res* 2021, 11(7):3660–73.

288. Bruun J, Eide PW, Bergsland CH, Bruck O, Svindland A, Arjama M, et al. E-cadherin is a robust prognostic biomarker in colorectal cancer and low expression is associated with sensitivity to inhibitors of topoisomerase, aurora, and HSP90 in preclinical models. *Mol Oncol* 2022, 16(12):2312–29.
289. Karsten N, Kolben T, Mahner S, Beyer S, Meister S, Kuhn C, et al. The role of E-Cadherin expression in primary site of breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2022, 305(4):913–20.
290. Wang Y, Sun Y, Shang C, Chen L, Chen H, Wang D, et al. Distinct Ring1b complexes defined by DEAD-box helicases and EMT transcription factors synergistically enhance E-cadherin silencing in breast cancer. *Cell Death Dis* 2021, 12(2):202.
291. Varešlija D, Ward E, Purcell SP, Cosgrove NS, Cocchiglia S, O'Halloran PJ, et al. Comparative analysis of the AIB1 interactome in breast cancer reveals MTA2 as a repressive partner which silences E-Cadherin to promote EMT and associates with a pro-metastatic phenotype. *Oncogene* 2021, 40(7):1318–31.
292. Xie D, Chen Y, Wan X, Li J, Pei Q, Luo Y, et al. The Potential Role of CDH1 as an Oncogene Combined With Related miRNAs and Their Diagnostic Value in Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022, 13:916469.
293. Wu Y, Zhang Y, Dai Y, Luo Q, Lan S, Chen X, et al. Role of CDH1 gene variants and E-cadherin localization in gastric mucosal cancerization. *Front Oncol* 2025, 15:1590680.
294. Zhang H, Gao M, Zhao W, Yu L. The chromatin architectural regulator SND1 mediates metastasis in triple-negative breast cancer by promoting CDH1 gene methylation. *Breast Cancer Res* 2023, 25(1):129.
295. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Giannini C, Bryant SC, Jenkins RB. Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastoma and gliosarcoma: A comparative morphologic and molecular genetic study. *Cancer* 2008, 113(10):2779–89.
296. Belut DR, Lima EDO, Zanini MA, Galvani AF, Furtado FB, Ferrasi AC. CDH1 hypermethylation: A potential molecular pathway for invasiveness in glioblastoma. *Eur J Cancer Prev* 2024, 33(1):73–5.
297. de Agustín-Durán D, Mateos-White I, Fabra-Beser J, Gil-Sanz C. Stick around: Cell–cell adhesion molecules during neocortical development. *Cells* 2021, 10(1):118.
298. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019, 20(2):69–84.
299. Lewis-Tuffin LJ, Rodriguez F, Giannini C, Scheithauer B, Necela BM, Sarkaria JN, et al. Misregulated E-Cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS One* 2010, 5(10):e13665.
300. Ciechomska IA, Wojnicki K, Wojtas B, Szadkowska P, Poleszak K, Kaza B, et al. Exploring Novel Therapeutic Opportunities for Glioblastoma Using Patient-Derived Cell Cultures. *Cancers (Basel)* 2023, 15(5):1562.

301. Kim JM, Potez M, She C, Huang P, Wu Q, Bao S, et al. Glioblastoma Stem Cell Targeting Peptide Isolated Through Phage Display Binds Cadherin 2. *Stem Cells* 2023, 41(8):762–74.
302. Ji X, Chen S, Guo Y, Li W, Qi X, Yang H, et al. Establishment and evaluation of four different types of patient-derived xenograft models. *Cancer Cell Int* 2017, 17(1):122.
303. Osuka S, Zhu D, Zhang Z, Li C, Stackhouse CT, Sampetrean O, et al. N-cadherin upregulation mediates adaptive radioresistance in glioblastoma. *J Clin Invest* 2021, 131(6):e136098.
304. Jha MK, Suk K. Pyruvate Dehydrogenase Kinase as a Potential Therapeutic Target for Malignant Gliomas. *Brain Tumor Res Treat* 2013, 1(2):57–63.
305. Velpula KK, Guda MR, Sahu K, Tuszyński J, Asuthkar S, Bach SE, et al. Metabolic targeting of EGFRvIII/PDK1 axis in temozolomide resistant glioblastoma. *Oncotarget* 2017, 8(22):35639–55.
306. Velpula KK, Tsung AJ. PDK1: a new therapeutic target for glioblastoma? *CNS Oncol* 2014, 3(3):177–9.
307. Stanke KM, Wilson C, Kidambi S. High Expression of Glycolytic Genes in Clinical Glioblastoma Patients Correlates With Lower Survival. *Front Mol Biosci* 2021, 8:752404.
308. Kankotia S, Stacpoole PW. Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? *Biochim Biophys Acta* 2014, 1846(2):617–29.
309. Stacpoole PW, Nagaraja N V., Hutson AD. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol* 2003, 43(7):683–91.
310. Stacpoole PW. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017, 109(11).
311. Niewisch MR, Kuçi Z, Wolburg H, Sautter M, Krampen L, Deubzer B, et al. Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: Is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy? *Cell Physiol Biochem* 2012, 29(3–4):373–80.
312. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med* 2010, 2(31):31ra34.
313. Ward NP, Poff AM, Koutnik AP, D’Agostino DP. Complex I inhibition augments dichloroacetate cytotoxicity through enhancing oxidative stress in VM-M3 glioblastoma cells. *PLoS One* 2017, 12(6):e0180061.
314. Kumar K, Wigfield S, Gee HE, Devlin CM, Singleton D, Li JL, et al. Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts. *J Mol Med* 2013, 91(6):749–58.
315. Li C, Meng G, Su L, Chen A, Xia M, Xu C, et al. Dichloroacetate blocks aerobic glycolytic adaptation to attenuated measles virus and promotes viral replication leading to enhanced oncolysis in glioblastoma. *Oncotarget* 2015, 6(3):1544–55.

316. Shen H, Hau E, Joshi S, Dilda PJ, McDonald KL. Sensitization of glioblastoma cells to irradiation by modulating the glucose metabolism. *Mol Cancer Ther* 2015, 14(8):1794–804.
317. Duraj T, García-Romero N, Carrión-Navarro J, Madurga R, de Mendivil AO, Pratacin R, et al. Beyond the warburg effect: Oxidative and glycolytic phenotypes coexist within the metabolic heterogeneity of glioblastoma. *Cells* 2021, 10(2):202.
318. Papandreou I, Goliaeva T, Denko NC. Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer* 2011, 128(5):1001–8.
319. Stakišaitis D, Juknevičienė M, Damanskienė E, Valančiūtė A, Balnytė I, Alonso MM. The importance of gender-related anticancer research on mitochondrial regulator sodium dichloroacetate in preclinical studies in vivo. *Cancers (Basel)* 2019, 11(8):1210.
320. Joergensen D, Tazmini K, Jacobsen D. Acute Dysnatremias - A dangerous and overlooked clinical problem. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2019, 27(1):58.
321. Ohashi T, Akazawa T, Aoki M, Kuze B, Mizuta K, Ito Y, et al. Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity. *Int J Cancer* 2013, 133(5):1107–18.
322. Rostamian H, Khakpoor-Koosheh M, Jafarzadeh L, Masoumi E, Fallah-Mehrjardi K, Tavassolifar MJ, et al. Restricting tumor lactic acid metabolism using dichloroacetate improves T cell functions. *BMC Cancer* 2022, 22(1):39.
323. Sutendra G, Dromparis P, Kinnaird A, Stenson TH, Haromy A, Parker JMR, et al. Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer. *Oncogene* 2013, 32(13):1638–50.
324. Lu X, Zhou D, Hou B, Liu QX, Chen Q, Deng XF, et al. Dichloroacetate enhances the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents via inhibiting autophagy in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 2018, 10:1231–41.
325. Agnoletto C, Melloni E, Casciano F, Rigolin GM, Rimondi E, Celeghini C, et al. Sodium dichloroacetate exhibits anti-leukemic activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and synergizes with the p53 activator Nutlin-3. *Oncotarget* 2014, 5(12):4347–60.
326. Cardoso AMS, Sousa M, Morais CM, Oancea-Castillo LR, Régnier-Vigouroux A, Rebelo O, et al. MiR-144 overexpression as a promising therapeutic strategy to overcome glioblastoma cell invasiveness and resistance to chemotherapy. *Hum Mol Genet* 2019, 28(16):2738–51.
327. Wicks RT, Azadi J, Mangraviti A, Zhang I, Hwang L, Joshi A, et al. Local delivery of cancer-cell glycolytic inhibitors in high-grade glioma. *Neuro Oncol* 2015, 17(1):70–80.
328. Korsakova L, Krasko JA, Stankevicius E. Metabolic-targeted combination therapy with dichloroacetate and metformin suppresses glioblastoma cell line growth in vitro and in vivo. *In Vivo (Brooklyn)* 2021, 35(1):341–8.

329. McKelvey KJ, Wilson EB, Short S, Melcher AA, Biggs M, Diakos CI, et al. Glycolysis and Fatty Acid Oxidation Inhibition Improves Survival in Glioblastoma. *Front Oncol* 2021, 11:633210.
330. Parczyk J, Ruhnau J, Pelz C, Schilling M, Wu H, Piaskowski NN, et al. Dichloroacetate and PX-478 exhibit strong synergistic effects in a various number of cancer cell lines. *BMC Cancer* 2021, 21(1):481.
331. NCT01111097 Trial of Dichloroacetate (DCA) in Glioblastoma Multiforme (GBM). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05120284>
332. Dunbar EM, Coats BS, Shroads AL, Langae T, Lew A, Forder JR, et al. Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest New Drugs* 2014, 32(3):452–64.
333. Liu J, Dai K, Saliu MA, Salisu MD, Gan J, Afolabi LO, et al. Sodium valproate enhances efficacy of NKG2D CAR-T cells against glioblastoma. *Front Immunol* 2025, 15:1519777.
334. Wen J, Chen Y, Yang J, Dai C, Yu S, Zhong W, et al. Valproic acid increases CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer* 2023, 11(7):e006857.
335. You F, Zhang C, Liu X, Ji D, Zhang T, Yu R, et al. Drug repositioning: Using psychotropic drugs for the treatment of glioma. *Cancer Lett* 2022, 527:140–9.
336. Cucchiara F, Pasqualetti F, Giorgi FS, Danesi R, Bocci G. Epileptogenesis and oncogenesis: An antineoplastic role for antiepileptic drugs in brain tumours? *Pharmacol Res* 2020, 156:104786.
337. Bennett RL, Licht JD. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2018, 58:187–207.
338. Kwak S, Park SH, Kim SH, Sung GJ, Song JH, Jeong JH, et al. miR-3189-targeted GLUT3 repression by HDAC2 knockdown inhibits glioblastoma tumorigenesis through regulating glucose metabolism and proliferation. *J Exp Clin Cancer Res* 2022, 41(1):87.
339. Zhang Z, Wang Y, Chen J, Tan Q, Xie C, Li C, et al. Silencing of histone deacetylase 2 suppresses malignancy for proliferation, migration, and invasion of glioblastoma cells and enhances temozolomide sensitivity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016, 78(6):1289–96.
340. Yagi C, Tatsuoka J, Sano E, Hanashima Y, Ozawa Y, Yoshimura S, et al. Anti tumor effects of anti epileptic drugs in malignant glioma cells. *Oncol Rep* 2022, 48(6):216.
341. Han W, Guan W. Valproic Acid: A Promising Therapeutic Agent in Glioma Treatment. *Front Oncol* 2021, 11:687362.
342. Pająk B, Siwiak-Niedbalska E, Jaśkiewicz A, Sołtyka M, Zieliński R, Domoradzki T, et al. Synergistic anticancer effect of glycolysis and histone deacetylases inhibitors in a glioblastoma model. *Biomedicines* 2021, 9(12):1749.
343. Santoro F, Botrugno OA, Dal Zuffo R, Pallavicini I, Matthews GM, Cluse L, et al. A dual role for Hdac1: oncosuppressor in tumorigenesis, oncogene in tumor maintenance. *Blood* 2013, 121(17):3459–68.

344. Stakišaitis D, Kapočius L, Valančiūtė A, Balnytė I, Tamošaitis T, Vaitkevičius A, et al. SARS-CoV-2 Infection, Sex-Related Differences, and a Possible Personalized Treatment Approach with Valproic Acid: A Review. *Biomedicines* 2022, 10(5):962.
345. Bezecny P. Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: Pre-clinical and clinical experience. *Med Oncol* 2014, 31(6):985.
346. Yelton CJ, Ray SK. Histone deacetylase enzymes and selective histone deacetylase inhibitors for antitumor effects and enhancement of antitumor immunity in glioblastoma. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 2018, 5:46.
347. Terranova-Barberio M, Pecori B, Roca MS, Imbimbo S, Bruzzese F, Leone A, et al. Synergistic antitumor interaction between valproic acid, capecitabine and radiotherapy in colorectal cancer: Critical role of p53. *J Exp Clin Cancer Res* 2017, 36(1):177.
348. Caponigro F, Di Gennaro E, Ionna F, Longo F, Aversa C, Pavone E, et al. Phase II clinical study of valproic acid plus cisplatin and cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of Head and Neck-V-CHANCE trial. *BMC Cancer* 2016, 16(1):918.
349. Roca MS, Lombardi R, Testa C, Iannelli F, Grumetti L, Moccia T, et al. Valproic acid improves the efficacy of oxaliplatin/fluoropyrimidine-based chemotherapy by targeting cancer stem cell via β -Catenin modulation in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2025, 16(1):583.
350. Thotala D, Karvas RM, Engelbach JA, Garbow JR, Hallahan AN, DeWees TA, et al. Valproic acid enhances the efficacy of radiation therapy by protecting normal hippocampal neurons and sensitizing malignant glioblastoma cells. *Oncotarget* 2015, 6(33):35004–22.
351. Zhou Y, Xu Y, Wang H, Niu J, Hou H, Jiang Y. Histone deacetylase inhibitor, valproic acid, radiosensitizes the C6 glioma cell line in vitro. *Oncol Lett* 2014, 7(1):203–8.
352. Chang CY, Li JR, Wu CC, Ou YC, Chen WY, Kuan YH, et al. Valproic acid sensitizes human glioma cells to gefitinib-induced autophagy. *IUBMB Life* 2015, 67(11):869–79.
353. Fang E, Wang J, Hong M, Zheng L, Tong Q. Valproic acid suppresses Warburg effect and tumor progression in neuroblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2019, 508(1):9–16.
354. Giordano F, Forestiero M, Leonetti AE, Naimo GD, Marrone A, De Amicis F, et al. Valproic Acid Reduces Invasiveness and Cellular Growth in 2D and 3D Glioblastoma Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2025, 26(14):6600.
355. Băraian AI, Raduly L, Zănoagă O, Iacob BC, Berindan-Neagoe I, Bodoki E. Enhancing local glioblastoma treatment via in vitro synergistic pairing of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 inhibitor with antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2026, 393(1):103767.

356. Vatankhah A, Moghaddam SH, Afshari S, Afshari AR, Kesharwani P, Sahebkar A. Recent update on anti-tumor mechanisms of valproic acid in glioblastoma multiforme. *Pathol Res Pract* 2024, 263:155636.
357. Tehrani GA, Kubick RN, Zarodniuk M, Datta M. Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma models to temozolomide and reprogram immunosuppressive myeloid cells. *Sci Rep* 2025, 15(1):36804.
358. Sanaei M, Kavooosi F. The effect of valproic acid on intrinsic, extrinsic, and JAK/STAT pathways in neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *Res Pharm Sci* 2022, 17(4):392-409.
359. Yang ZY, Wang XH. Valproic Acid Inhibits Glioma and Its Mechanisms. *J Healthc Eng* 2022, 2022:4985781.
360. Stakišaitis D, Mozūraitė R, Kavaliauskaitė D, Šlekienė L, Balnytė I, Juodžiukynienė N, et al. Sex-related differences of urethane and sodium valproate effects on Ki-67 expression in urethane-induced lung tumors of mice. *Exp Ther Med* 2017, 13(6):2741–50.
361. Diržiuviienė R, Šlekienė L, Palubinskienė J, Balnytė I, Lasienė K, Stakišaitis D, et al. Tumors derived from lung cancer cells respond differently to treatment with sodium valproate (a HDAC inhibitor) in a chicken embryo chorioallantoic membrane model. *Histol Histopathol* 2022, 37(12):1201–12.
362. Šlekienė L, Stakišaitis D, Balnytė I, Valančiūtė A. Sodium Valproate Inhibits Small Cell Lung Cancer Tumor Growth on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and Reduces the p53 and EZH2 Expression. *Dose Response* 2018, 16(2): 1559325818772486.
363. Lu VM, Texakalidis P, McDonald KL, Mekary RA, Smith TR. The survival effect of valproic acid in glioblastoma and its current trend: a systematic review and meta-analysis. *Clin Neurol Neurosurg* 2018, 174:149–55.
364. Kresbach C, Bronsema A, Guerreiro H, Rutkowski S, Schüller U, Winkler B. Long-term survival of an adolescent glioblastoma patient under treatment with vinblastine and valproic acid illustrates importance of methylation profiling. *Childs Nerv Syst* 2022, 38(2):479–83.
365. Skredėnienė R, Stakišaitis D, Valančiūtė A, Balnytė I. In Vivo and In Vitro Experimental Study Comparing the Effect of a Combination of Sodium Dichloroacetate and Valproic Acid with That of Temozolomide on Adult Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 2025, 26(14):6784.
366. Park JY, Zheng W, Kim D, Cheng JQ, Kumar N, Ahmad N, et al. Candidate tumor suppressor gene SLC5A8 is frequently down-regulated by promoter hypermethylation in prostate tumor. *Cancer Detect Prev* 2007, 31(5):359–65.
367. Gyawali A, Latif S, Choi SH, Hyeon SJ, Ryu H, Kang YS. Monocarboxylate transporter functions and neuroprotective effects of valproic acid in experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biomed Sci* 2022, 29(1):2.

368. Fischer W, Praetor K, Metzner L, Neubert RHH, Brandsch M. Transport of valproate at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells: Mechanism and substrate specificity. *Eur J Pharm Biopharm* 2008, 70(2):486–92.
369. Derivative of valproic acid and dichloroacetate used for the treatment of cancer: Patent EP3895702. Available at: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/112449>
370. Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer* 2008, 99(7):989–994.
371. Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z, Cornett R, James MO. Pharmacokinetics, metabolism, and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metab Rev* 1998, 30(3):499–539.
372. Curry SH, Lorenz A, Henderson GN, Mars DR, Stacpoole PW. Haemodialysis studies with dichloroacetate. *Eur J Clin Pharmacol* 1991, 40(6):613–7.
373. Tian DD, Bennett SK, Coupland LA, Forwood K, Lwin Y, Pooryousef N, et al. GSTZ1 genotypes correlate with dichloroacetate pharmacokinetics and chronic side effects in multiple myeloma patients in a pilot phase 2 clinical trial. *Pharmacol Res Perspect* 2019, 7(6):e00526.
374. Li T, Schultz I, Keys DA, Campbell JL, Fisher JW. Quantitative evaluation of dichloroacetic acid kinetics in human-a physiologically based pharmacokinetic modeling investigation. *Toxicology* 2008, 245(1–2):35–48.
375. Chu QSC, Sangha R, Spratlin J, Vos LJ, Mackey JR, McEwan AJB, et al. A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2015, 33(3):603–10.
376. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell* 2007, 11(1):37–51.
377. Li TW, Yang YC, Cheng CM, Wang DC, Lu AJ, Zhao YF. Multi-substituted N-phenyl-2, 2-dichloroacetamide analogues as anti-cancer drugs: Design, synthesis and biological evaluation. 2012, 47(3):354–63.
378. James MO, Jahn SC, Zhong G, Smeltz MG, Hu Z, Stacpoole PW. Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1. *Pharmacol Ther* 2017, 170:166–80.
379. Vaistinis preparatas Convulex. Available at: <https://vapris.vvkt.lt/vvkt-web/public/medications/view/15119>.
380. Lomustine characteristics. Available at: https://www.medac.eu/fileadmin/user_upload/medac-eu/SPCs/common_SPCs/Lomustine_medac-spc-common.pdf.
381. Carmustine characteristics. Available at: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/12179/smpc>.
382. Bouffet E, Hansford JR, Garrè ML, Hara J, Plant-Fox A, Aerts I, et al. Dabrafenib plus Trametinib in Pediatric Glioma with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med* 2023, 389(12):1108–20.

383. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem* 2015, 58(9):4066–72.
384. Pedrote MM, Motta MF, Ferretti GDS, Norberto DR, Spohr TCLS, Lima FRS, et al. Oncogenic Gain of Function in Glioblastoma Is Linked to Mutant p53 Amyloid Oligomers. *iScience* 2020, 23(2):100820.
385. Chen R, Chen C, Han N, Guo W, Deng H, Wang Y, et al. Annexin-1 is an oncogene in glioblastoma and causes tumour immune escape through the indirect upregulation of interleukin-8. *J Cell Mol Med* 2022, 26(15):4343–56.
386. Wang L, Jung J, Babikir H, Shamardani K, Jain S, Feng X, et al. A single-cell atlas of glioblastoma evolution under therapy reveals cell-intrinsic and cell-extrinsic therapeutic targets. *Nat Cancer* 2022, 3(12):1534–52.
387. Bazan NG, Reid MM, Flores VAC, Gallo JE, Lewis W, Belayev L. Multiprong control of glioblastoma multiforme invasiveness: blockade of pro-inflammatory signaling, anti-angiogenesis, and homeostasis restoration. *Cancer Metastasis Rev* 2021, 40(3):643–47.
388. Zhao Y, Simon M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA damage and repair in age-related inflammation. *Nat Rev Immunol* 2023, 23(2):75–89.
389. Hibino S, Kawazoe T, Kasahara H, Itoh S, Ishimoto T, Sakata-Yanagimoto M, et al. Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis. *Int J Mol Sci* 2021, 22(11):5421.
390. Tylutka A, Walas Ł, Zembron-Lacny A. Level of IL-6, TNF, and IL-1 β and age-related diseases: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol* 2024, 15:1330386.
391. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 2007, 128(1):83–91.
392. Poon CC, Sarkar S, Yong VW, Kelly JJP. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: Targets for therapies to improve prognosis. *Brain* 2017, 140(6):1548–60.
393. Yeo ECF, Brown MP, Gargett T, Ebert LM. The role of cytokines and chemokines in shaping the immune microenvironment of glioblastoma: Implications for immunotherapy. *Cells* 2021, 10(3):607.
394. Ramos-Fresnedo A, Domingo RA, Perez-Vega C, Pullen MW, Akinduro OO, Almeida JP, et al. The early infiltrative phase of GBM hypothesis: are molecular glioblastomas histological glioblastomas in the making? A preliminary multicenter study. *J Neurooncol* 2022, 158(3):497–506.
395. Vyas D, Laput G, Vyas AK. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *Onco Targets Ther* 2014, 7:1015–23.
396. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021, 6(1):263.

397. Chen N, Peng C, Li D. Epigenetic Underpinnings of Inflammation: A Key to Unlock the Tumor Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immunol* 2022, 13:869307.
398. Ramar V, Guo S, Wang G, Liu M. The Pivotal Role of NF- κ B in Glioblastoma: Mechanisms of Activation and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* 2025, 26(16): 7883.
399. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017, 2(1):17023.
400. Singh N, Baby D, Rajguru J, Patil P, Thakkannavar S, Pujari V. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med* 2019, 18(3):121–6.
401. Chen Z, Yuan SJ, Li K, Zhang Q, Li TF, An HC, et al. Doxorubicin-polyglycerol-nanodiamond conjugates disrupt STAT3/IL-6-mediated reciprocal activation loop between glioblastoma cells and astrocytes. *J Control Release* 2020, 320:469–83.
402. Jiang Y, Han S, Cheng W, Wang Z, Wu A. NFAT1-regulated IL6 signalling contributes to aggressive phenotypes of glioma. *Cell Commun Signal* 2017, 15(1):54.
403. Faust Akl C, Andersen BM, Li Z, Giovannoni F, Diebold M, Sanmarco LM, et al. Glioblastoma-instructed astrocytes suppress tumour-specific T cell immunity. *Nature* 2025, 643(8070):219–29.
404. De Boeck A, Ahn BY, D’Mello C, Lun X, Menon S V., Alshehri MM, et al. Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression. *Nat Commun* 2020, 11(1):4997.
405. Angel I, Pilo Kerman O, Rouso-Noori L, Friedmann-Morvinski D. Tenascin C promotes cancer cell plasticity in mesenchymal glioblastoma. *Oncogene* 2020, 39(46):6990–7004.
406. Wang L, Liu Z, Balivada S, Shrestha T, Bossmann S, Pyle M, et al. Interleukin-1 β and transforming growth factor- cooperate to induce neurosphere formation and increase tumorigenicity of adherent LN-229 glioma cells. *Stem Cell Res Ther* 2012, 3(1):5.
407. Qian J, Wang C, Wang B, Yang J, Wang Y, Luo F, et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: Hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. *J Neuroinflammation* 2018, 15(1):290.
408. Takacs GP, Kreiger CJ, Luo D, Tian G, Garcia JS, Deleyrolle LP, et al. Glioma-derived CCL2 and CCL7 mediate migration of immune suppressive CCR2+/CX3CR1+ M-MDSCs into the tumor microenvironment in a redundant manner. *Front Immunol* 2023, 13:993444.
409. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* 2013, 19(10):1264–72.
410. Chryplewicz A, Scotton J, Tichet M, Zomer A, Shchors K, Joyce JA, et al. Cancer cell autophagy, reprogrammed macrophages, and remodeled vasculature in glioblastoma triggers tumor immunity. *Cancer Cell* 2022, 40(10):1111–1127.

411. Quail DF, Bowman RL, Akkari L, Quick ML, Schuhmacher AJ, Huse JT, et al. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science* 2016, 352(6288):aad3018.
412. Basheer AS, Abas F, Othman I, Naidu R. Role of inflammatory mediators, macrophages, and neutrophils in glioma maintenance and progression: Mechanistic understanding and potential therapeutic applications. *Cancers (Basel)* 2021, 13(16):4226.
413. Mainali R, Zabalawi M, Long D, Buechler N, Quillen E, Key CC, et al. Dichloroacetate reverses sepsis-induced hepatic metabolic dysfunction. *Elife* 2021, 10:e64611.
414. Amirzargar MA, Yaghubi F, Hosseinipناه M, Jafari M, Pourjafar M, Rezaeepoor M, et al. Anti-inflammatory Effects of Valproic Acid in a Rat Model of Renal Ischemia/Reperfusion Injury: Alteration in Cytokine Profile. *Inflammation* 2017, 40(4):1310–8.
415. Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruiter JPN, IJlst L, Duran M, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *J Inherit Metab Dis* 2008, 31(2):205–216.
416. Savino W, Durães J, Maldonado-Galdeano C, Perdigon G, Mendes-da-Cruz DA, Cuervo P. Thymus, undernutrition, and infection: Approaching cellular and molecular interactions. *Front Nutr* 2022, 9:948488.
417. Colantonio AD, Epeldegui M, Jesiak M, Jachimowski L, Blom B, Uittenbogaart CH. IFN- α is constitutively expressed in the human thymus, but not in peripheral lymphoid organs. *PLoS One* 2011, 6(8):e24252.
418. Lienenklaus S, Cornitescu M, Ziętara N, Łyszkiewicz M, Gekara N, Jabłońska J, et al. Novel Reporter Mouse Reveals Constitutive and Inflammatory Expression of IFN- β In Vivo. *J Immunol* 2009, 183(5):3229–36.
419. Bernatz S, Pai S, Prudente V, Kjær A, Di Federico A, Dyrskjot L, et al. Thymic health is associated with immunotherapy outcomes in patients with cancer. *Nature* 2026. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41586-026-10243-x>
420. Thomas R, Wang W, Su DM. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun Ageing* 2020, 17:2.
421. Soreshjani M, Tripathi S, Dussold C, Najem H, de Groot J, Lukas R V., et al. The Use of Targeted Cytokines as Cancer Therapeutics in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2023, 15(14):3739.
422. Li X, Gou W, Zhang X. Neuroinflammation in Glioblastoma: Progress and Perspectives. *Brain Sci* 2024, 14(7):687.
423. Zheng Q, Diao S, Wang Q, Zhu C, Sun X, Yin B, et al. IL-17A promotes cell migration and invasion of glioblastoma cells via activation of PI3K/AKT signalling pathway. *J Cell Mol Med* 2019, 23(1):357–69.
424. Urbantat RM, Vajkoczy P, Brandenburg S. Advances in chemokine signaling pathways as therapeutic targets in glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2021, 13(12):2983.

425. Jovanovich N, Habib A, Chilukuri A, Hameed NUF, Deng H, Shanahan R, et al. Sex-specific molecular differences in glioblastoma: assessing the clinical significance of genetic variants. *Front Oncol* 2024, 13:1340386.
426. Natrio dichloroacetato ir valpro rūgšties druskų derinys, skirtas virusinėms ir bakterinėms infekcijoms, ir uždegiminėms ligoms gydyti (LT 2023532 A). Available at: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/250901>
427. Combination of Sodium Dichloroacetate and Valproic Acid Salts for the Treatment of Viral and Bacterial Infections and Inflammatory Diseases (EP 4512393 A1). Available at: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/250903>
428. Vu BT, Shahin SA, Croissant J, Fatieiev Y, Matsumoto K, Le-Hoang Doan T, et al. Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. *Sci Rep* 2018, 8(1):8524.
429. Fischer D, Fluegen G, Garcia P, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Gribaldo L, Huang RYJ, et al. The CAM Model–Q&A with Experts. *Cancers (Basel)* 2022, 15(1):191.
430. Weber J, Weber M, Steinle H, Schlensak C, Wendel HP, Avci-Adali M. An Alternative In Vivo Model to Evaluate Pluripotency of Patient-Specific hiPSCs. *ALTEX* 2021, 38(3):442–50.
431. Miebach L, Berner J, Bekeschus S. In ovo model in cancer research and tumor immunology. *Front Immunol* 2022, 13:1006064.
432. Pion E, Karnosky J, Boscheck S, Wagner BJ, Schmidt KM, Brunner SM, et al. 3D In Vivo Models for Translational Research on Pancreatic Cancer: The Chorioallantoic Membrane (CAM) Model. *Cancers (Basel)* 2022, 14(15):3733.
433. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev* 2016, 141:70–77.
434. DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu HC, Harrington DA, Yu W, et al. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res* 2018, 8(8):1642–60.
435. Komatsu A, Higashi Y, Matsumoto K. Various CAM tumor models. *Enzymes* 2019, 46:37–57.
436. Uloza V, Kuzminienė A, Palubinskienė J, Balnytė I, Ulozienė I, Valančiūtė A. Laryngeal carcinoma experimental model suggests the possibility of tumor seeding to gastrostomy site. *Med Hypotheses* 2021, 150:110573.
437. Uloza V, Kuzminienė A, Palubinskienė J, Balnytė I, Ulozienė I, Valančiūtė A. An Experimental Model of Human Recurrent Respiratory Papillomatosis: A Bridge to Clinical Insights. *Laryngoscope* 2021, 131(3):E914–20.
438. Pizon M, Schott D, Pachmann U, Schobert R, Pizon M, Wozniak M, et al. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assays as a Model of Patient-Derived Xenografts from Circulating Cancer Stem Cells (cCSCs) in Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)* 2022, 14(6):1476.
439. Rousset X, Maillet D, Grolleau E, Barthelemy D, Calattini S, Brevet M, et al. Embryonated Chicken Tumor Xenografts Derived from Circulating Tumor Cells as a

- Relevant Model to Study Metastatic Dissemination: A Proof of Concept. *Cancers (Basel)* 2022, 14(17):4085.
440. Gil M, Ramil F, Agís JA. Hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from Mauritanian coral mounds. *Zootaxa* 2020, 4878(3):zootaxa.4878.3.2.
 441. Garcia P, Wang Y, Viallet J, Macek Jilkova Z. The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies. *Front Immunol* 2021, 12:791081.
 442. Ribatti D, Tamma R. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo experimental model to study multiple myeloma. *Enzymes* 2019, 46:23–35.
 443. Chen L, Wang S, Feng Y, Zhang J, Du Y, Zhang J, et al. Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imaging-navigated biomedical research. *Cells* 2021, 10(2):463.
 444. Valiulytė I, Curkūnavičiūtė R, Ribokaitė L, Kazlauskas A, Vaitkevičiūtė M, Skauminas K, et al. The anti-tumorigenic activity of sema3C in the chick embryo chorioallantoic membrane model. *Int J Mol Sci* 2019, 20(22):5672.
 445. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an experimental model to study lung cancer. *Front Oncol* 2026, 16:1758487.
 446. Zhao Z, Bauer N, Aleksandrowicz E, Yin L, Gladkich J, Gross W, et al. Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas rapidly xenografts in chicken eggs and predicts aggressiveness. *Int J Cancer* 2018, 142(7):1440–52.
 447. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res* 2014, 328(2):314–324.
 448. Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, Bloch W, Kurz H, Javerzat S, et al. VEGF Coordinates Interaction of Pericytes and Endothelial Cells During Vasculogenesis and Experimental Angiogenesis. *Dev Dyn* 2004, 230(1):23–33.
 449. Zosen D, Hadera MG, Lumor JS, Andersen JM, Paulsen RE. Chicken embryo as animal model to study drug distribution to the developing brain. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2021, 112:107105.
 450. Rupp T, Legrand C, Hunault M, Genest L, Babin D, Froget G, et al. A Face-To-Face Comparison of Tumor Chicken Chorioallantoic Membrane (TCAM) In Ovo with Murine Models for Early Evaluation of Cancer Therapy and Early Drug Toxicity. *Cancers (Basel)* 2022, 14(14):3548.
 451. Green T, Iekiene L, Gunhaga L. CAM-Delam Assay to Score Metastatic Properties by Quantifying Delamination and Invasion Capacity of Cancer Cells. *J Vis Exp* 2022, 2022(184):e64025.
 452. Zumbrink L, Brenig B, Foerster A, Hurlin J, von Wenzlawowicz M. Electrical anaesthesia of male chicken embryos in the second third of the incubation period in compliance with animal welfare. *Poul Sci* 2020, 84:1–11.
 453. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Available at: <https://olaw.nih.gov/policies-laws/avma-guidelines-2020.htm>
 454. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010, 102:1555–77.

455. Skredėnienė R, Stakišaitis D, Preikšaitis A, Valančiūtė A, Lesauskaitė V, Balnytė I. Effect of Treatment with a Combination of Dichloroacetate and Valproic Acid on Adult Glioblastoma Patient-Derived Primary Cells Xenografts on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *Pharmaceutics* 2025, 18(1):52.
456. Charbonneau M, Harper K, Brochu-Gaudreau K, Perreault A, Roy LO, Lucien F, et al. The development of a rapid patient-derived xenograft model to predict chemotherapeutic drug sensitivity/resistance in malignant glial tumors. *Neuro Oncol* 2023, 25(9):1605–16.
457. Herbener VJ, Burster T, Goreth A, Pruss M, Bandemer H von, Baisch T, et al. Considering the experimental use of Temozolomide in glioblastoma research. *Biomedicines* 2020, 8(6):151.
458. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001, 25(4):402–8.
459. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol* 2017, 134(3):541–49.
460. Uhm JH, Porter AB. Treatment of Glioma in the 21st Century: An Exciting Decade of Postsurgical Treatment Advances in the Molecular Era. *Mayo Clin Proc* 2017, 92(6):995–1004.
461. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang XL, et al. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab* 2012, 15(6):827–37.
462. Chen R, Zhang M, Zhou Y, Guo W, Yi M, Zhang Z, et al. The application of histone deacetylases inhibitors in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2020, 39(1):138.
463. Abdelmalak M, Lew A, Ramezani R, Shroads AL, Coats BS, Langae T, et al. Long-term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis. *Mol Genet Metab* 2013, 109(2):139–43.
464. Angom RS, Nakka NMR, Bhattacharya S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sci* 2023, 13(11):1536.
465. Rončević A, Koruga N, Soldo Koruga A, Rončević R, Rotim T, Šimundić T, et al. Personalized Treatment of Glioblastoma: Current State and Future Perspective. *Biomedicines* 2023, 11(6):1579.
466. Chu PY, Koh APF, Antony J, Huang RYJ. Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies. *Cells Tissues Organs* 2022, 211(2):222–237.
467. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis. Available at: <https://content.e-bookshelf.de/media/reading/L-72982-130aca445e.pdf>
468. Kaufman N, Kinney TD, Mason EH, Prieto LC Jr. Maintenance of human neoplasm on the chick chorioallantoic membrane. *Am J Pathol* 1956, 32(2):271–85.

469. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Pathol* 1975, 79(3):597–628.
470. Stakišaitis D, Damanskienė E, Curkūnavičiūtė R, Juknevičienė M, Alonso MM, Valančiūtė A, et al. The Effectiveness of Dichloroacetate on Human Glioblastoma Xenograft Growth Depends on Na⁺ and Mg²⁺ Cations. *Dose Response* 2021, 19(1): 1559325821990166.
471. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec* 2001, 264(4):317–24.
472. Lee MS, Moon EJ, Lee SW, Kim MS, Kim KW, Kim YJ. Angiogenic activity of pyruvic acid in in vivo and in vitro angiogenesis models. *Cancer Res* 2001, 61(8):3290–3.
473. Ribatti D, Crivellato E, Candussio L, Nico B, Vacca A, Roncali L, et al. Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Clin Exp Allergy* 2001, 31(4):602–8.
474. Rema RB, Rajendran K, Ragunathan M. Angiogenic efficacy of Heparin on chick chorioallantoic membrane. *Vasc Cell* 2012, 4(1):8.
475. Yang L, Moses HL. Transforming growth factor β : Tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Res* 2008, 68(22):9107–11.
476. Uloza V, Kuzminienė A, Šalomskaitytė-Davalgienė S, Palubinskienė J, Balnytė I, Ulozienė I, et al. Effect of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Tissue Implantation on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: Morphometric Measurements and Vascularity. *Biomed Res Int* 2015, 2015:629754.
477. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 1996, 40(6):1189–97.
478. Balčiūnienė N, Tamašauskas A, Valančiūtė A, Deltuva V, Vaitiekaitis G, Gudiniavičienė I, et al. Histology of human glioblastoma transplanted on chicken chorioallantoic membrane. *Medicina (Kaunas)* 2009, 45(2):123–31.
479. Zhang J, Chen L, Han L, Shi Z, Zhang J, Pu P, et al. EZH2 is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in glioblastoma. *Cancer Lett* 2015, 356(2PtB):929–36.
480. Conti L, Palma E, Roseti C, Lauro C, Cipriani R, De Groot M, et al. Anomalous levels of Cl⁻ transporters cause a decrease of GABAergic inhibition in human peritumoral epileptic cortex. *Epilepsia* 2011, 52(9):1635–44.
481. Williams JA. Using pdx for preclinical cancer drug discovery: The evolving field. *J Clin Med* 2018, 7(3):41.
482. Ben-David U, Ha G, Tseng YY, Greenwald NF, Oh C, Shih J, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet* 2017, 49(11):1567–75.

- 483. Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol* 2020, 13(1):4.
- 484. Zeng W, Tang Z, Li Y, Yin G, Liu Z, Gao J, et al. Patient-derived xenografts of different grade gliomas retain the heterogeneous histological and genetic features of human gliomas. *Cancer Cell Int* 2020, 20(1):1.
- 485. Joo KM, Kim J, Jin J, Kim M, Seol HJ, Muradov J, et al. Patient-Specific Orthotopic Glioblastoma Xenograft Models Recapitulate the Histopathology and Biology of Human Glioblastomas In Situ. *Cell Rep* 2013, 3(1):260–73.
- 486. Fei XF, Zhang QB, Dong J, Diao Y, Wang ZM, Li RJ, et al. Development of clinically relevant orthotopic xenograft mouse model of metastatic lung cancer and glioblastoma through surgical tumor tissues injection with trocar. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, 29(1):84.
- 487. William D, Mullins CS, Schneider B, Orthmann A, Lamp N, Krohn M, et al. Optimized creation of glioblastoma patient derived xenografts for use in preclinical studies. *J Transl Med* 2017, 15(1):27.

PASKELBTOS PUBLIKACIJOS

Publikacijos disertacijos darbo tema:

1. **Skredėnienė, Rūta**; Stakišaitis, Donatas; Preikšaitis, Aidanas; Valančiūtė, Angelija; Lesauskaitė, Vaiva; Balnytė, Ingrida. Effect of Treatment with a Combination of Dichloroacetate and Valproic Acid on Adult Glioblastoma Patient-Derived Primary Cells Xenografts on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane // *Pharmaceutics*, 2026, t. 18, nr. 1, p. 1-25, ISSN 1999-4923. doi:10.3390/pharmaceutics18010052. [Citav. rodiklis: 5.5, bendr. citav. rod.: 4.264, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
2. **Skredėnienė, Rūta**; Stakišaitis, Donatas; Valančiūtė, Angelija; Balnytė, Ingrida. In Vivo and In Vitro Experimental Study Comparing the Effect of a Combination of Sodium Dichloroacetate and Valproic Acid with That of Temozolomide on Adult Glioblastoma // *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, t. 26, nr. 14, p. 1-28, ISSN 1422-0067, 1661-6596. doi:10.3390/ijms26146784. [Citav. rodiklis: 4.9, bendr. citav. rod.: 5.946, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)].
3. Stakišaitis, Donatas; Damanskienė, Eligija; **Skredėnienė, Rūta**; Juknevičienė, Milda; Alonso, Marta Maria; Valančiūtė, Angelija; Ročka, Saulius; Balnytė, Ingrida. The Effectiveness of Dichloroacetate on Human Glioblastoma Xenograft Growth Depends on Na⁺ and Mg²⁺ Cations // *Dose-Response*. Thousand Oaks, CA : Sage Publications, 2021, vol 19, no. 1, p. 1-14, ISSN 1559-3258. doi:10.1177/1559325821990166. [Citav. rodiklis: 2.623, bendr. citav. rod.: 4.813, kvartilis: Q3 (2021. InCites JCR SCIE)].

Su disertacijos darbo tema susijusios publikacijos:

1. Gečys, Dovydas; **Skredėnienė, Rūta**; Gečytė, Emilija; Kazlauskas, Arūnas; Balnytė, Ingrida; Jekabsone, Aistė. Adipose Tissue-Derived Stem Cell Extracellular Vesicles Suppress Glioblastoma Proliferation, Invasiveness and Angiogenesis // *Cells*. Basel : MDPI, 2023, vol. 12, no. 9, p. 1-15, ISSN 2073-4409, 2073-4409. doi:10.3390/cells12091247. [Citav. rodiklis: 5.1, bendr. citav. rod.: 6.694, kvartilis: Q2 (2023. InCites JCR SCIE)].
2. Valiulytė, Indrė; **Skredėnienė, Rūta**; Ribokaitė, Laura; Kazlauskas, Arūnas; Vaitkevičiūtė, Monika; Skauminas, Kęstutis; Valančiūtė, Angelija. The Anti-tumorigenic activity of Sema3C in the chick embryo chorioallantoic membrane model // *International journal of molecular*

sciences. Basel : MDPI, 2019, vol. 20, no. 22, p. 1-14, ISSN 1422-0067, 1422-0067. doi:10.3390/ijms20225672. [Citav. rod.: 4.556, bendr. citav. rod.: 5.426, kvartilis: Q1 (2019. InCites JCR SCIE)]

Pranešimai disertacijos darbo tema:

1. **Skredėnienė, Rūta**; Stakišaitis, Donatas; Valančiūtė, Angelija; Balnytė, Ingrida. A comparative study of effectiveness of sodium dichloroacetate and temozolomide on glioblastoma xenograft growth // Baltic Morphology 11th Meeting [November 13–15, 2024] : Abstract Book, p. 91–91, ISBN 9789934618598, 9789934618581. doi:10.25143/rsu-balt-morf-11-meeting. [T1e] [M.kr.: N010]
2. **Skredėnienė, Rūta**; Stakišaitis, Donatas; Valančiūtė, Angelija; Balnytė, Ingrida. An Experimental Study of the Effect of Sodium Dichloroacetate on the Growth of Glioblastoma Xenograft // 11th Brain Tumor Meeting 2022 : May 19–20, 2022, Berlin, Germany : program and abstracts (plenaries, orals and posters) / Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC). Charité – University Medicine. Berlin : Verein zur Förderung der Neurowissenschaften am MDC e.V., 2022, p. 77–77. [T2] [M.kr.: M001]
3. **Skredėnienė, Rūta**; Juknevičienė, Milda; Stakišaitis, Donatas; Valančiūtė, Angelija; Balnytė, Ingrida. The Effectiveness of dichloroacetate on adult human glioblastoma xenograft growth // International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice” : abstracts : 24–26 March, 2021, Riga, Latvia / Rīga Stradiņš University. Rīga: RSU, 2021. ISBN 9789934563805, p. 426–426, ISBN 9789934563805. doi:10.25143/rw2021.kup.abstracts-book. [T1e] [M.kr.: N010].
4. Damanskienė, Eligija; **Skredėnienė, Rūta**; Valančiūtė, Angelija; Stakišaitis, Donatas; Balnytė, Ingrida. Experimental study of sodium dichloroacetate efficacy on pediatric and adult glioblastoma tumor in vivo // International Lithuanian-Polish Conference on Histology : 28 February 2020, Kaunas, Lithuania. Kaunas : Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2020. ISBN 9789955156512, p. 16–17, ISBN 9789955156512. [T1e] [M.kr.: M001].
5. **Skredėnienė, Rūta**; Stakišaitis, Donatas; Valančiūtė, Angelija; Balnytė, Ingrida. Experimental study of sodium dichloroacetate effect on glioblastoma xenograft progression in vivo // Health for All: 2020 – International Students’, Doctoral and Residents’ Conference: Science for Health: abstract book : [19–20 November, 2020, Kaunas, Lithuania] / [organised: Student’s Scientific Society of Lithuanian University of Health Sciences;

Edited by Monika Jasinskaitė, Karolina Slapšytė, Gvidas Mikalauskas]. Kaunas : Student's Scientific Society of Lithuanian University of Health Sciences, 2020, p. 40–41. [T1d] [M.kr.: M001].

6. **Skredėnienė, Rūta**; Valančiūtė, Angelija; Ribokaitė, Laura; Stakišaitis, Donatas; Balnytė, Ingrida. Sodium dichloroacetate effect on glioblastoma U87 MG tumor growth and invasion into chicken embryo chorioallantoic membrane // Medicina : Abstracts of the 10th Scientific Conference BALTIC MORPHOLOGY : October 24–25, 2019, Kaunas, Lithuania / Editor-in-chief Edgaras Stankevičius. Kaunas; Basel : LSMU; MDPI, 2019, vol. 55, suppl. 2, p. 248-248, ISSN 1648-9233. [T1e] [M. kr.: M001].

STRAIPSNIAI, KURIUOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI

Reprinted with permission from the journal *Dose-Response (Sage Journals)*, ticket number RP-15722.

Original Article

The Effectiveness of Dichloroacetate on Human Glioblastoma Xenograft Growth Depends on Na⁺ and Mg²⁺ Cations

Dose-Response:
An International Journal
January-March 2021:1-14
© The Author(s) 2021
DOI: 10.1177/1559325821990166
journals.sagepub.com/home/dos



Donatas Stakišaitis^{1,2} , Eligija Damanskienė¹, Rūta Curkūnavičiūtė¹,
Milda Juknevičienė¹, Marta Maria Alonso³, Angelija Valančiūtė¹,
Saulius Ročka⁴, and Ingrida Balnytė¹

Abstract

The study's aim was to investigate the effectiveness of sodium dichloroacetate (NaDCA) or magnesium dichloroacetate (MgDCA) on adult U87 MG and pediatric PBT24 cell lines glioblastoma (GB) xenografts in a chicken chorioallantoic membrane (CAM) model. The study groups were: treated with 10 mM, 5 mM of NaDCA, and 5 mM, 2.5 mM of MgDCA, and controls. The U87 MG and PBT24 xenografts growth, frequency of tumor invasion into CAM, CAM thickening, and the number of blood vessels in CAM differed depending on the dichloroacetate salt treatment. NaDCA impact on U87 MG and PBT24 tumor on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression in the tumor was different, depending on the NaDCA dose. The 5 mM MgDCA impact was more potent and had similar effects on U87 MG and PBT24 tumors, and its impact was also reflected in changes in PCNA and EZH2 expression in tumor cells. The U87 MG and PBT24 tumor response variations to treatment with different NaDCA concentration on tumor growth or a contrast between NaDCA and MgDCA effectiveness may reflect some differences in U87 MG and PBT24 cell biology.

Keywords

glioblastoma, dichloroacetate, magnesium, sodium, PCNA, EZH2, chicken embryo chorioallantoic membrane model

Introduction

The most widespread brain tumor is glioblastoma (GB); this tumor accounts for 80 % of all primary malignant central nervous system tumors.^{1,2} GB includes primary (*de novo*) and secondary tumors developed from lower-grade astrocytoma or oligodendroglioma subtypes. Primary GB accounts for 80 % of all GB adult patients, and about 3 % among children with all brain tumors.³

The impact of therapy on high-grade GB is limited, as the overall outcome remains unaffected, with an adult patient median survival of 12–15 months.⁴ Five-year survival in pediatric GB patients is less than 20 %, and the survival in patients aged 55–64 is 6 %.⁶ The pharmacological effects of medicines with which GB treatment improves patient survival are related to the inhibition of tumor cell proliferation.⁷ The standard therapy for GB in adults is surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy with temozolomide (TMZ).⁸ No standard GB chemotherapy approach has been developed for pediatric patients. Following the progress of TMZ in adults, the treatment has similarly exercised the use of TMZ with radiotherapy for GB

pediatric patients.⁵ Individual TMZ effectiveness depends on the development of resistance to TMZ, and this would lead to GB recurrence and a worse GB prognosis.⁹

The usage of sodium dichloroacetate (NaDCA) for sensitizing TMZ-resistant cells has been proposed.^{10,11} The pharmacological

¹ Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

² Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania

³ Department of Pediatrics, Clínica Universidad de Navarra, University of Navarra, Pamplona, Spain

⁴ Centre of Neurosurgery, Clinic of Neurology and Neurosurgery, Faculty of Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

Received 03 December 2020; received revised 02 January 2021; accepted 05 January 2021

Corresponding Author:

Donatas Stakišaitis, Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Mickėvičiaus Str. 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania.
Email: donatas.stakisaitis@ismuni.lt



Creative Commons CC BY: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits any use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

NaDCA mechanisms include the inhibition of pyruvate dehydrogenase kinases maintaining the mitochondrial oxidation of glucose, and reduction of lactic acid generation,^{12,13} and a rise in reactive oxygen species generation in the tumor and microenvironment.¹⁴ Glycolytic processes are upregulated,¹⁵⁻¹⁷ and expression of pyruvate dehydrogenase kinase is increased in glioma cells.^{17,18} NaDCA treatment enhances cancer cell apoptosis.¹⁹ A recent study reported that NaDCA works as a $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC1) inhibitor, and induces NKCC1 RNA expression suppression.²⁰ The NKCC1 inhibition reduces the intracellular chloride level ($[\text{Cl}^-]_i$); a $[\text{Cl}^-]_i$ could have an impact on cancer cell proliferation and apoptosis.^{21,22}

The unequal anticancer efficacy of NaDCA in *in vitro* and *in vivo* studies raises some questions about the effectiveness of the medicine used in the research.²³ The NaDCA effectiveness problem may arise as some investigators do not consider the Na^+ concentration state using high NaDCA doses in *in vitro* studies²⁴; it is essential to assess whether the NaDCA concentration in the assay medium will not result in a hypernatraemic state. In humans, a level higher than the 150 mM level of Na^+ in the blood serum represents hypernatraemia.²⁵ Furthermore, researchers have shown that sodium and chloride ions in a tumor microenvironment are involved in cancer progression.²⁶ Thus, different concentrations of Na^+ in the environment of cancer cells under investigation may also modify cancerogenesis.

The chicken chorioallantoic membrane (CAM) model is an alternative model for studying cancer treatment approaches for tumor growth, invasion, angiogenesis, and is one which helps elucidate target medicines for human cancer treatment.^{27,28} The formed human cancer cell tumor on CAM reflects the primary tumor malignancy. DeBord *et al.* show that the CAM model is a helpful tool providing a biologically efficient patient-derived xenograft platform to achieve practical personal potential chemotherapy goals.²⁹ A CAM model is more successful in predicting patients-derived xenografted tumor treatment prognosis as compared with rodent immunodeficient models.³⁰ A study comparing the effect of the drug on U87 MG tumor growth on CAM with data on medicine exposure to U87 MG spheroids showed that the spheroid model did not reflect the tumor progression or treatment effect on the tumor observed in the CAM model.³¹

The present study aimed to examine differences between a 44-year-old woman high-grade U87 MG cell line³² xenograft (U87) and a 13-year-old boy high-grade PBT24 cell line³³ xenograft (PBT24) studied *in vivo* using the CAM model; to examine these tumors' response to treatment with NaDCA or magnesium dichloroacetate (MgDCA) preparations as well as their effect on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression in tumor cells.

Material and Methods

Cell Lines and Cell Culturing

A Caucasian adult female's high-grade glioblastoma U87 MG cell line cells, provided by Dr. Arūnas Kazlauskas (Laboratory

of Neuro-Oncology and Genetics, Neuroscience Institute, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50009 Kaunas, Lithuania) and a pediatric Caucasian 13-year-old boy's high-grade glioblastoma PBT24 cell line cells, donated by Prof. Marta M. Alonso (University of Navarra, Spain), were studied. The U87 MG cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medium (Sigma Aldrich, USA), while the PBT24 cells were cultivated in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) medium (Sigma Aldrich, USA). The media were supplemented with a 10 % fetal bovine serum (FBS; Sigma Aldrich, USA) containing 100 IU/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (P/S; Sigma Aldrich, USA). Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 atmosphere.

The CAM Model

According to the legislation in force in the EU and Lithuania, no approval for studies using the CAM model is needed from the Ethics Committee. Cobb 500 fertilized chicken eggs were obtained from a local hatchery (Rumsiškės, Lithuania), kept in the incubator (Maino incubators, Italy) at 37 °C temperature and 60 % relative air humidity. The eggs were rolled automatically once per hour until the third embryo development day (EDD3).

The CAM was detached from the shell of the egg at EDD3; eggshells were cleaned with 70 % ethanol, a small round hole was drilled in the location of the air chamber, and approximately 2 ml of the egg white was aspirated. A window of about 1 cm² in the eggshell was drilled and sealed with sterile transparent plastic tape. The eggs were kept in the incubator without rotation until GB cell tumor grafting on CAM at the EDD7.

The Tumor Study Design

Justification for selection of the NaDCA and MgDCA dose. The molecular formula of NaDCA [$\text{Cl}_2\text{CHCOONa}$] indicates that in the solution of 10 mM of NaDCA, there is 10 mM of the 2,2-dichloroacetate anion (DCA) and in the solution of 5 mM of MgDCA [$(\text{Cl}_2\text{CHCOO})_2\text{Mg}$], there is also 10 mM of the DCA.^{34,35} Respectively, 5 mM concentrations of active substance will be achieved with 5 mM NaDCA and 2.5 mM MgDCA solutions. The concentration of 10 mM NaDCA will not form a hypernatremic state in the used media; the Na^+ concentration in DMEM medium is 146.4 mM/l and for the RPMI-1640 it is 147.98 mM/l. Other investigators have used a 10 mM of NaDCA dose for cancer cell studies *in vitro*.^{36,37}

The U87 and PBT24 tumor study groups. The growth and invasion into CAM of formatted U87 MG cell, as well as of PBT24 cell lines xenografts, were investigated in the 10 groups. The study groups were as follows: the U87-control (the non-treated group, n = 20), the U87 tumors treated with 10 mM of NaDCA (U87-10 mM NaDCA; n = 24), U87-5 mM NaDCA (n = 25), U87-5 mM MgDCA (n = 14), and U87-2.5 mM MgDCA (n = 11). The studied PBT24 tumor groups were the following:

PBT24-control (n = 13), PBT24-10 mM NaDCA (n = 12), PBT24-5 mM NaDCA (n = 13), PBT24-5 mM MgDCA group (n = 11), and PBT24-2.5 mM MgDCA (n = 11). When U87 tumors were found to be more sensitive to 5 mM NaDCA than to 10 mM NaDCA, larger groups were tested accordingly to ensure that this was not a random phenomenon.

Biomicroscopy *in vivo* and histological analysis of invasion, the thickness of CAM, and the number of vessels in CAM under the tumor were performed.

The immunohistochemical (IHC) expression of PCNA in the tumor was studied in the following groups: U87-control (n = 8), U87-10 mM NaDCA (n = 8), U87-5 mM NaDCA (n = 8), U87-5 mM MgDCA (n = 8), U87-2.5 mM MgDCA (n = 8); PBT24-control (n = 9), PBT24-10 mM NaDCA (n = 8), PBT24-5 mM NaDCA (n = 6), PBT24-5 mM MgDCA (n = 6), and PBT24-2.5 mM MgDCA (n = 7).

The expression of EZH2 was investigated in the following: U87 tumors control (n = 12), U87-10 mM NaDCA (n = 13), U87-5 mM NaDCA (n = 12), U87-5 mM MgDCA (n = 7), and U87-2.5 mM MgDCA (n = 8); PBT24-control (n = 6), PBT24-10 mM NaDCA (n = 7), PBT24-5 mM NaDCA (n = 6), PBT24-5 mM MgDCA (n = 7), and PBT24-2.5 mM MgDCA (n = 7).

Biomicroscopy Data to Assess Tumor Growth and Drug Efficacy

The biomicroscopy of xenografts on CAM at embryo development from 9 to 12 days (EDD9–12) *in vivo* is suitable to evaluate the tumor growth characteristics, its malignancy, and to detect the disparities among different cell line tumors and the sensitivity to treatment. One kind of tumor malignancy and growth progression signs is a relatively rapid formation of vasculature around the tumor—a “spoked-wheel” consisting of tumor-attracted small blood vessels, and formed by neoangiogenesis new blood vessels. The tumor size, its border clarity, and changes of the “spoked-wheel” expression may serve as features of the drug effect on tumorigenesis.

Tumor Grafting on CAM *In Vivo*

An absorbable gelatin surgical sponge (Surgispon, Aegis Life-sciences, India) was cut manually with a blade into pieces of 9 mm³ (3 × 3 × 1 mm). The 1 × 10⁶ cells were resuspended in 20 µl of the rat tail collagen, type I (Gibco, USA) (in the control group), and MgDCA or NaDCA salt (Sigma-Aldrich GmbH, Germany) dissolved in a medium (investigational medicine-treated groups). A 20 µl liquid mixture of tumor cells was pipetted onto a piece of a sponge. The NaDCA- or MgDCA-treated tumor groups and their controls were formed. At the EDD7, the tumor was grafted onto CAM among significant blood vessels. Its structural changes were observed with a stereomicroscope (SZX2-RFA16, Olympus, Japan) *in vivo* during the EDD9–12 period. The tumor images were acquired using a digital camera (DP92, Olympus, Japan) and CellSens Dimension 1.9 Digital Imaging Software.

Histological Study of the Tumor

At EDD12, the specimens were harvested, fixed in a buffered 10 % formalin solution for 24 hours and embedded into the paraffin wax. The tumor sample was cut with a microtome (Leica, Germany) into 3 µm thickness sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H-E) and by IHC methods. Visualization and photographing of H-E and IHC stained tumor slides were performed using a light microscope (BX40F4, Olympus, Japan) and a digital camera (XC30, Olympus, Japan) equipped with CellSens Dimension 1.9 software.

H-E stained tumors were divided into 2 types: invasive and non-invasive. The tumor invasion into CAM was categorized as the destruction of the chorionic epithelium (ChE) or/and tumor cell invasion into the CAM mesenchyme. The tumor not invaded into mesenchyme was located on the surface of the CAM, and the integrity of the chorionic epithelium was not disrupted. The tumor invasion was examined in H-E slides at 20 × and 40 × magnifications.

Assessment of the CAM Thickness and the Number of Blood Vessels in CAM

The CAM thickness (width) was evaluated by photographing H-E stained CAM at 4 × magnification directly under the tumor. The thickness of CAM was measured (µm) in 10 areas. The median CAM thickness was calculated in the area under the tumor. In the CAM without tumor group, 3 random places of CAM were selected and measured accordingly.

The number of blood vessels was assessed by photographing the H-E stained CAM at 4 × magnification directly under the tumor. In the CAM without tumor group, one random vision field was selected. Blood vessels bigger than 10 µm were counted in the same length of the CAM (1792 µm).

Immunohistochemical Study

The expression of the PCNA and EZH2 markers was determined in tumor cells by immunohistochemistry. Primary antibodies to the PCNA (PC10, Thermo Fisher Scientific, USA) and the KMT6/EZH2 (phospho S21, ab84989, Abcam, UK) were used to detect PCNA- and EZH2-positively stained tumor cells. Thin CAM sections of 3 µm were mounted onto adhesion slides (Thermo Fisher Scientific, USA), deparaffinized, and rehydrated by standard techniques. The heat-induced antigen retrieval was performed using a Tris/EDTA buffer at pH 9 (K8002, Dako, Denmark) and a pressure cooker at 95 °C for 20 minutes (Thermo Fisher Scientific, USA). The Shandon CoverPlate System (Thermo Fisher Scientific, USA) was used for staining. Endogenous peroxidase was blocked with the Peroxidase Blocking Reagent (SM801, Dako, Denmark). The slides were treated with primary antibodies (1:100) for 30 minutes at room temperature. The primary antibody and antigen complex was determined using the horseradish peroxidase-labeled polymer dextran conjugated with a secondary mouse antibody and a linker (SM802 and SM804, respectively; Dako, Denmark) for

30 min. at room temperature. Positive reactions were visualized using the 3,3'-diaminobenzidine-containing chromogen (DAB, DM827, Dako, Denmark), which gives the brown color to the site of the target antigen recognized by the primary antibody. After each step, a tris-buffered saline solution containing Tween 20 (DM831, Dako, Denmark) was used as a wash buffer. Slides were counterstained with the Mayer hematoxylin solution (Sigma Aldrich, Germany), dehydrated, cleared, and mounted.

For assessment of the tumor PCNA and EZH2 protein expression, 2 random vision fields (plot area $23863.74 \mu\text{m}^2$) of the immunohistochemically stained tumor were photographed at $40\times$ magnification. All cells, and the PCNA-, EZH2-positively stained cells were calculated in selected vision fields, and the percentages of PCNA- and EZH2-positive cells were counted in each tumor.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences, version 23.0 for Windows (IBM SPSS Statistics V23.0). The frequency of invasion into CAM is expressed as a percentage (%), and the chi-square test was used to compare tumor invasion into CAM frequency between the study groups. The Shapiro-Wilk test was used to verify the normality assumption. Data of PCNA- and EZH2-positive stained cells, the number of blood vessels, and the thickness of the CAM are expressed as median and range (minimum and maximum values). The difference between the 2 independent groups was evaluated using the nonparametric Mann-Whitney U test. The Spearman rank correlation coefficient (r) was used to assess the relationship between the CAM thickness and the number of blood vessels. Differences at the value of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

The Biomicroscopy of U87 Xenograft on CAM

Figure 1 shows the biomicroscopy data dynamics of U87-control and tumor treated with 10 mM, 5 mM of NaDCA, and with 5 mM or 2.5 mM of MgDCA doses, from EDD9 to EDD12, and the harvested CAM with tumor at EDD12. The U87-control tumor has distinct edges at EDD9; its size diminishes at EDD12; the smaller size of the non-treated tumor at EDD12 is associated with its invasion into CAM mesenchyme (Figure 1-A), the vessels plexus is weakly expressed at EDD9; a dense vessels network is formed in the direction of the tumor at EDD12: a manifested "spoked-wheel" pattern is seen 5 days after tumor grafting on CAM. The apparent network of vessels around the non-treated tumor is displayed in harvested CAM with a tumor at EDD12 (Figure 1-A).

Figure 1-B shows U87-10 mM NaDCA tumor growth during EDD9-12; the tumor visually appears to be larger *in vivo* and *ex ovo* compared with the U87-control at EDD9 and EDD12 because the tumor grows more on the CAM surface;

a "spoked-wheel" at EDD12 is less expressed as compared with the control. The effect of 10 mM dichloroacetate anion of different salts on U87 tumor (Figure 1-B, and C) was different; it can be seen that MgDCA salt inhibits tumor growth significantly more: both tumors grow on the CAM surface, but treated with 5 mM MgDCA, the tumor is smaller with no visible vascular network around the tumor. U87 tumor growth was more strongly affected by 5 mM of NaDCA than by 10 mM of NaDCA (Figure 1-B, and D). The "spoked-wheel" development around the U87-2.5 mM MgDCA tumor (Figure 1-E, EDD12, and CAM *ex ovo*) indicates that tumor growth suppression is limited.

The Biomicroscopy of PBT24 Xenograft on CAM

Figure 2 shows the data dynamics of PBT24-control and treated tumor studied groups from EDD9 to EDD12 as well as the harvested CAM preparation with a tumor at EDD12. The control xenograft has precise contours on EDD9, but they are less clear on EDD12 and the tumor size is slightly reduced (Figure 2-A) because the tumor has partially invaded into the mesenchyme; its apex is visible on the surface of a chorionic epithelium, and around the tumor is the expressed "spoked-wheel" (Figure 2-A, EDD12, and CAM *ex ovo*).

Compared with the control, the PBT24 treatment with 10 mM of NaDCA and with 5 mM of MgDCA suppresses the tumor growth and vascular network development, with tumor edges visible, indicating tumor growth on the CAM surface (Figure 2-B, and C). The PBT24-5 mM NaDCA tumor growth is poorly inhibited, the tumor grows more on the CAM surface, and the "spoked-wheel" is visible (Figure 2-D). Compared with the control, the xenograft-treated with 2.5 mM of MgDCA was partially invasive (its edges unclear) with only partially inhibited development of the vascular network at EDD12 (Figure 2-E).

The Biomicroscopically Determined Differences Among U87 and PBT24 Tumors

The data indicate that U87 and PBT24 tumors show different sensitivity to treatment with the sodium salt of dichloroacetate (Figures 1 and 2). A 10 mM dose of NaDCA was less effective in the treatment of the U87 tumor as compared with 5 mM of NaDCA, but a 10 mM dose was effective in treating the PBT24 tumor. The PBT24 tumor was quite insensitive to treatment with 5 mM NaDCA (Figure 2). The 5 mM MgDCA dose (10 mM of dichloroacetate anion) was similarly effective in U87 and PBT24 tumor treatment.

Histological Tumor Data in Evaluating the Effectiveness of the Treatment

The histological examination provides a more detailed explanation of the response of U87 and PBT24 to the treatment applied, assessing the tumor growth, tumor invasion into CAM

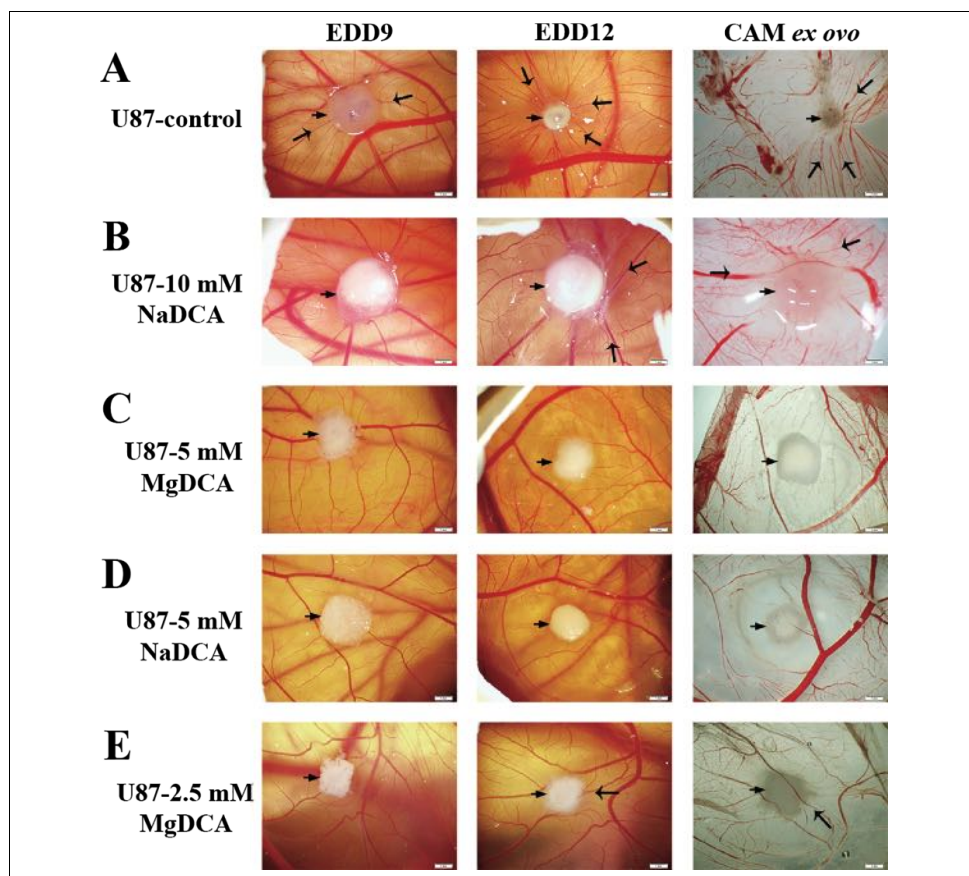


Figure 1. Biomicroscopy of U87 tumor on CAM *in vivo* and the chorioallantoic membrane with tumor *ex ovo* of the study groups (A, B, C, D, E). The EDD9 pictures represent the tumor 2 days after the xenograft transplantation, and EDD12—after 5 days of transplantation on CAM. The *ex ovo* photos represent the harvested CAM with a tumor on EDD12. A short arrow shows the tumor, a longer arrow—the vessel of the “spoked-wheel” in the U87-control (A, EDD12, and CAM *ex ovo*); it is a reduced expression in the treated tumor (B, E, EDD12, and CAM *ex ovo*) or suppressed the development of vascular network (C, D, EDD12, and CAM *ex ovo*). Scale bar—1 mm.

mesenchyme frequency, and a thickening of the CAM beneath the xenograft in the study groups (Figure 3). The CAM thickness is related to the activation of neoangiogenesis, assessed by the number of blood vessels in CAM under the tumor (Figure 3; Tables 1 and 2). Immunohistochemical study of the PCNA and EZH2 expression in the xenograft cells at EDD12 enabled the evaluation of the features of tumorigenesis, as well as differences in the treatment effect with dichloroacetate salts among U87 MG and PBT24 cell line tumors (Figure 4; Tables 3 and 4).

The U87 Growth, Invasion Into CAM Frequency, the CAM Thickness and the Number of Blood Vessels in CAM Under the Tumor of the Study Groups

Figure 3 shows the treatment efficacy in the inhibition of tumor growth, and the effect of the research medicine on inhibiting tumor adhesion to CAM (Figure 3, U87 tumors, D, and E). Histomorphometric data show that the U87 tumor invasion into CAM frequency was found to depend on the dichloroacetate anion concentration, as well as on the dichloroacetate salt. Tumor

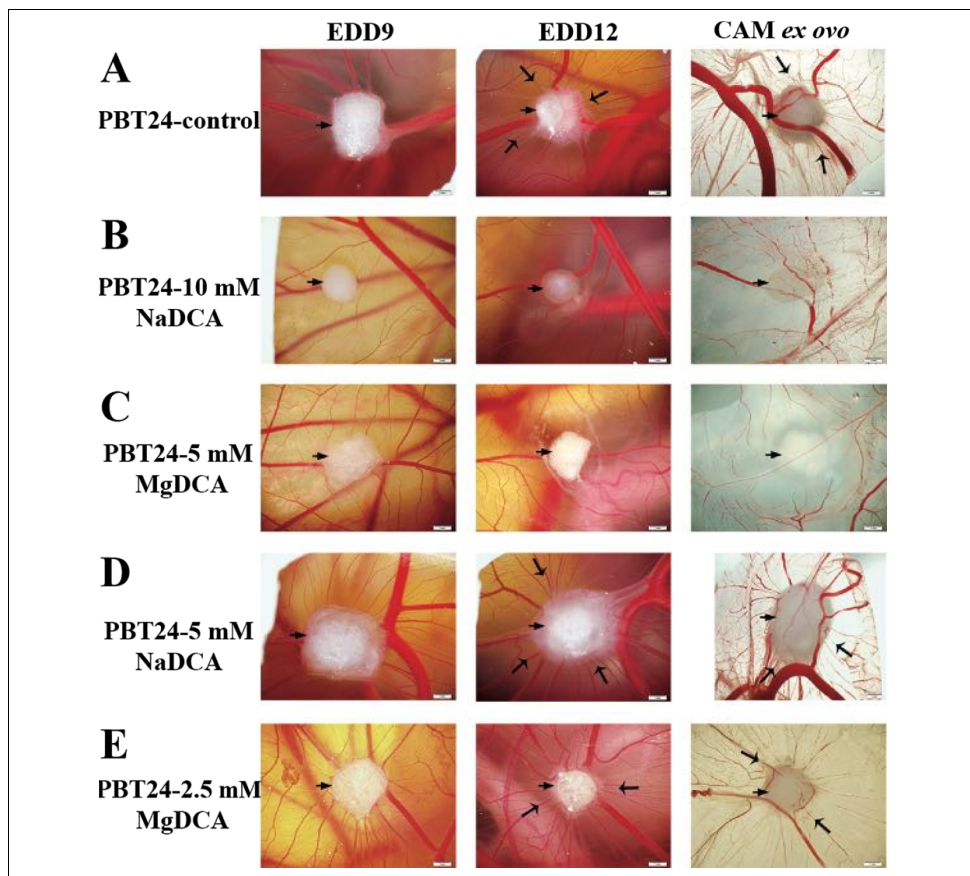


Figure 2. Biomicroscopy of PBT24 tumor in vivo and chorioallantoic membrane with tumor ex ovo of the study groups (A, B, C, D, E). The EDD9 pictures show the tumor 2 days after, and the EDD12—5 days after its transplantation on CAM. Ex ovo pictures represent the harvested tumor with CAM at EDD12. A short arrow shows the tumor, a more extended indicator—a “spoked-wheel” around the tumor at EDD12 and in respectively ex ovo preparations (A, D, and E). Scale bar—1 mm.

invasion frequency in the study groups was as follows: U87-control was 80.0 %, U87-10 mM NaDCA—45.83 %, U87-5 mM MgDCA—14.29 %, U87-5 mM NaDCA—20.0 %, and U87-2.5 mM MgDCA—36.36 % (-Table 1). Compared with the U87-control, the applied treatment significantly reduced the tumor invasion in all study groups ($P < 0.05$). Comparing the frequency of invasion into CAM of U87-10 mM NaDCA, the inhibition of tumor invasion was found significantly higher in U87-5 mM MgDCA ($P = 0.048$) and U87-5 mM NaDCA ($P = 0.044$) groups (-Table 1). No difference in invasion frequency was found between U87-5 mM NaDCA and U87-5 mM MgDCA groups ($P > 0.05$).

The CAM thickness of the matched control without a grafted tumor was $42.57 \mu\text{m}$ with the range being from 35.68 to $51.19 \mu\text{m}$ ($n = 10$). In the U87-control group, it was 4.7-times more than the CAM thickness without a grafted tumor ($P < 0.001$). Significantly increased CAM thickness of the U87-10 mM NaDCA was found when compared with U87-5 mM MgDCA ($P = 0.02$). CAM thickness was significantly different between U87-control and U87-5 mM MgDCA ($P = 0.047$), and between the U87-5 mM NaDCA and U87-10 mM NaDCA ($P = 0.02$) groups (Table 1).

The number of blood vessels in the CAM under the tumor did not differ between the U87-control and U87-10 mM

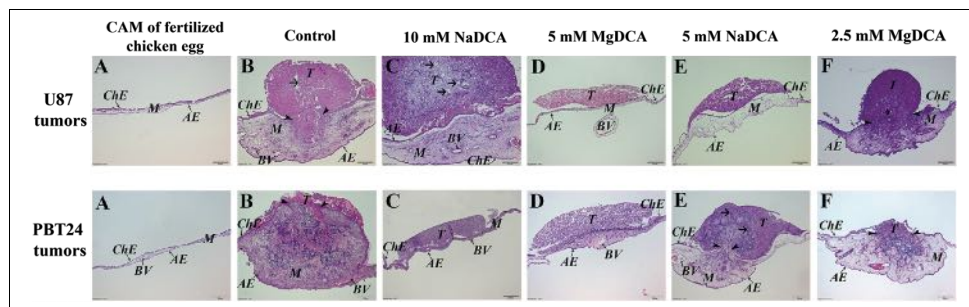


Figure 3. The histologic images of CAM, tumor growth, and its invasion into the CAM frequency in the U87 and PBT24 study groups. A—CAM of a fertilized chicken egg without tumor, B—control tumor, C—10 mM NaDCA, D—5 mM MgDCA, E—5 mM NaDCA tumor, F—2.5 mM MgDCA. Arrowhead indicates the destruction of the chorionic epithelium; shorter arrow shows blood vessels formed around the tumor. ChE—chorionic epithelium, AE—allantoic epithelium, M—mesenchyme, BV—blood vessel, T—tumor. Scale bar—200 μ m.

NaDCA group ($P > 0.05$), but it was significantly decreased in U87-5 mM NaDCA ($P = 0.0006$), when treated with 5 mM of MgDCA ($P = 0.009$), and when treated with 2.5 mM of MgDCA ($P = 0.036$) groups (Table 1).

The significant correlation (r) between CAM thickness and the number of blood vessels in CAM was determined in the following U87 study groups: 0.80 in U87-10 mM NaDCA ($P < 0.0001$), 0.45 in U87-5 mM NaDCA ($P = 0.02$), and no such significant correlation was found in other groups.

The PBT24 Growth, Its Invasion Into CAM Frequency, the Thickness of CAM and the Number of Blood Vessels in CAM Under the Tumor of the Study Groups

Figure 3 gives images of H-E-stained slides of CAM, and the characteristic changes of the PBT24 tumor's size, formed blood vessels in the CAM under the tumor, and the CAM thickness changes in the PBT24-control and PBT24-treated groups. The chorionic epithelium under the xenograft is destroyed, and the tumor invasion into the CAM mesenchyme is evident in the PBT24-control and PBT24-5 mM NaDCA (Figure 3, PBT24 tumors, B, and E). The chorionic epithelium is intact in 10 mM NaDCA and 5 mM MgDCA, and the tumor is distributed on the CAM surface (Figure 3, PBT24 tumors, C, and D).

In PBT24-control the incidence of tumor invasion to CAM was 76.92 %, in the PBT24-10 mM NaDCA—16.67 %, PBT24-5 mM MgDCA—18.18 %, PBT24-5 mM NaDCA—53.85 %, and in PBT24-2.5 mM MgDCA—45.45 % (Table 2). Comparing the incidence of tumor invasion into CAM of the PBT24-control with treated groups, significantly suppressed invasion frequency was found in treatment with 10 mM of NaDCA ($P = 0.003$) and 5 mM of MgDCA groups ($P = 0.004$). In the PBT24-10 mM NaDCA, the incidence of invasion was statistically less frequent than in the PBT24-5 mM NaDCA group ($P = 0.04$). Treatment with 5 mM of MgDCA effectively inhibited the invasion more than therapy with 5 mM of NaDCA ($P = 0.049$).

The non-treated PBT24 xenograft induces the thickening of CAM mesenchyme (Table 2). The CAM thickness in the PBT24-control was 7-times more than the width of control without a grafted tumor ($P < 0.001$). Comparing the CAM thickness of PBT24-control with that of treated study groups shows a significant CAM thickness decrease only in the PBT24-5 mM MgDCA group ($P = 0.013$), and in the PBT24-2.5 mM MgDCA group ($P = 0.041$).

The PBT24-control and PBT24-5 mM NaDCA tumors are vascularized; blood vessels are visible (Figure 3, PBT24 tumors, B, and E). PBT24 tumors treated with 10 mM NaDCA and 5 mM MgDCA are not vascularized (Figure 3, PBT24 tumors, C, and D). Compared to the PBT24-control, the number of blood vessels in CAM was significantly reduced only in the PBT24-5 mM MgDCA group ($P = 0.018$).

The significant correlation (r) between CAM thickness and the number of blood vessels in CAM of PBT24 study groups was as follows: 0.69 ($P = 0.01$) in the PBT24-control, 0.69 ($P = 0.01$) in PBT24-5 mM NaDCA, 0.74 in PBT24-5 mM MgDCA group ($P = 0.009$), and 0.77 ($P = 0.005$) in PBT24-2.5 mM MgDCA group.

The PCNA Expression in U87 Tumor

The PCNA protein expression was observed in the nucleus of the GB cell, in the nucleus of chorionic, and in the allantoic epithelium and CAM mesenchyme cells. The PCNA expression in tumor tissue is shown in the images, which represent the mean expression of the marker in the studied group (Figure 4-a). The highest expression of PCNA was found in the U87-control, where PCNA-positive cells percentage comprises 67.73 %. The rate of PCNA-positive cells among treated groups was found to depend on the applied treatment: it comprises 25.70 % in U87-10 mM NaDCA, 28.53 % in U87-5 mM MgDCA, 15.25 % in U87-5 mM NaDCA, and 44.18 % in U87-2.5-MgDCA group (Table 3). Compared with the U87-control, PCNA expression was significantly lower in U87-10 mM NaDCA ($P = 0.04$), U87-5 mM

Table 1. The U87 Tumor Invasion Into CAM Frequency, the Thickness of CAM and the Number of a Blood Vessel in CAM Under the Tumor of the Study Groups.

Study group	n	Invasion (%)	CAM thickness (μm)	Number of blood vessels
			median (range)	median (range)
U87-control	20	80.00	197.80 (65.20–387.94)	23.50 (9–63)
U87-10 mM NaDCA	24	45.83 ^a	219.20 (65.41–1139.45) ^g	22.0 (4–61)
U87-5 mM MgDCA	14	14.29 ^{b,c}	105.16 (35.87–579.59) ^h	18.0 (6–35) ^j
U87-5 mM NaDCA	25	20.00 ^{d,e}	149.20 (49.99–452.53) ⁱ	10.0 (2–40) ^k
U87-2.5 mM MgDCA	11	36.36 ^f	142.51 (49.44–378.32)	20.0 (6–32) ^l

^a $P = 0.02$, compared with U87-control.^b $P = 0.0008$, compared with U87-control.^c $P = 0.048$, compared with U87-10 mM NaDCA.^d $P < 0.0001$, compared with U87-control.^e $P = 0.044$, compared with U87-10 mM NaDCA.^f $P = 0.015$, compared with U87-control.^g $P = 0.02$, compared with U87-5 mM MgDCA.^h $P = 0.047$, compared with U87-control.ⁱ $P = 0.02$, compared with U87-10 mM NaDCA.^j $P = 0.009$, compared with U87-control.^k $P = 0.0006$, compared with U87-control.^l $P = 0.036$, compared with U87-control.

CAM: chorioallantoic membrane; NaDCA: sodium dichloroacetate; MgDCA: magnesium dichloroacetate.

Table 2. The Frequency of PBT24 Tumor Invasion Into CAM, the CAM Thickness, and Blood Vessel Number in CAM Under the Tumor in the Study Groups.

Study group	N	Invasion (%)	CAM thickness (μm)	Number of blood vessels
			median (range)	median (range)
PBT24-control	13	76.92	300.88 (65.23–700.87)	15 (6–28)
PBT24-10 mM NaDCA	12	16.67 ^a	199.23 (54.44–627.55)	11.5 (3–25)
PBT24-5 mM MgDCA	11	18.18 ^b	96.53 (36.28–591.91) ^c	7 (2–27) ^d
PBT24-5 mM NaDCA	13	53.85 ^{e,d}	236.02 (31.27–484.44)	12 (5–29)
PBT24-2.5 mM MgDCA	11	45.45	138.60 (21.34–384.022) ^f	9 (2–23)

^a $P = 0.003$, compared with PBT24-control.^b $P = 0.004$, compared with PBT24-control.^c $P = 0.04$, compared with PBT24-10 mM NaDCA.^d $P = 0.049$, compared with PBT24-5 mM MgDCA.^e $P = 0.013$, compared with PBT24-control.^f $P = 0.041$, compared with PBT24-control.^g $P = 0.018$, compared with PBT24-control.

CAM: chorioallantoic membrane; NaDCA: sodium dichloroacetate; MgDCA: magnesium dichloroacetate.

MgDCA ($P = 0.049$), U87-5 mM NaDCA ($P = 0.047$). No significant difference in PCNA expression was found among those treated with 10 mM of NaDCA, 5 mM MgDCA and 5 mM of NaDCA groups ($P > 0.05$). There was a significant difference between U87-5 mM NaDCA and U87-2.5 mM MgDCA groups ($P = 0.01$).

The EZH2 Expression in U87 Tumor

EZH2 protein is expressed in tumor cell nuclei. The appearance of the marker in the tumor is shown in the images, which corresponds to the mean of the EZH2-positive cells of the study group (Figure 4-b). The highest EZH2 expression was in the U87-control where it comprises 69.42 %; 26.49 % in U87-10

mM NaDCA, 3.39 % in U87-5 mM MgDCA, 8.4 % in U87-5 mM NaDCA, and 43.99 % in U87-2.5 mM MgDCA (Table 3). Compared with the control, EZH2 expression was significantly reduced in all treated groups ($P < 0.05$), with the exception of the U87-2.5 mM MgDCA group ($P > 0.05$). When comparing the treated groups, the difference in marker expression was significant between the U87-5 mM MgDCA and U87-5 mM NaDCA ($P = 0.009$), and between U87-2.5 mM MgDCA and U87-5 mM NaDCA groups ($P = 0.007$).

The PCNA Expression in PBT24 Tumor

Figure 4-a presents images of the PCNA expression in tumor tissue of the PBT24 studied groups. The percentage of

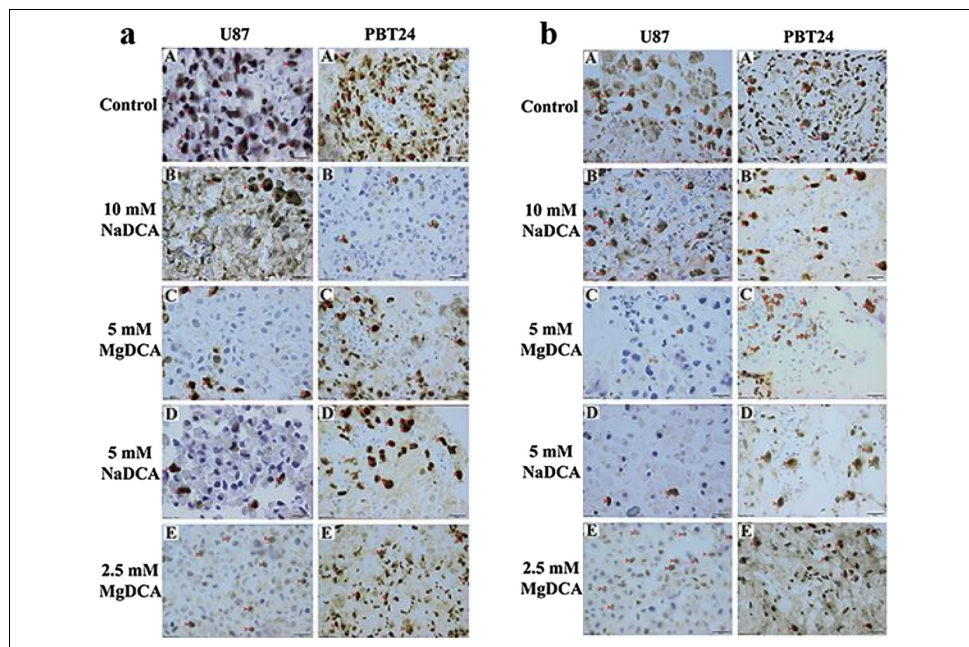


Figure 4. PCNA- and EZH2-positive stained tumor of the U87 and PBT24 study groups. **a.** PCNA-positive stained tumor of the U87 and PBT24 study groups. A—control, B—10 mM NaDCA, C—5 mM MgDCA, D—5 mM NaDCA, and E—2.5 mM MgDCA treated tumors. Red arrowhead indicates positively stained cells. Scale bar—20 μ m. **b.** EZH2-stained cells in the U87 and PBT24 study groups. A—control, B—10 mM NaDCA, C—5 mM MgDCA, D—5 mM NaDCA, and E—2.5 mM MgDCA tumor. Red arrowhead indicates EZH2-positive cells. Scale bar—20 μ m.

PCNA-positive cells was as follows: 63.78 % in the PBT24-control, 10.46 % in PBT24-10 mM NaDCA, 20.70 % in PBT24-5 mM MgDCA, 14.97 % in PBT24-5 mM NaDCA, and 43.12 % in PBT24-2.5 mM MgDCA group (Table 4). Compared to the PBT24-control, the PCNA expression was significantly reduced in the PBT24-10 mM NaDCA group ($P < 0.0001$), PBT24-5 mM NaDCA ($P = 0.0004$), PBT24-5 mM MgDCA ($P = 0.0004$), and no significant treatment effect was found in the PBT24-2.5 mM MgDCA group ($P > 0.05$). The treatment effect of 5 mM of NaDCA was higher than that of 2.5 mM MgDCA treatment ($P = 0.0047$). The effectiveness of 2.5 mM MgDCA treatment was significantly lower than that of 5 mM MgDCA ($P = 0.022$), and of 10 mM NaDCA ($P = 0.0006$) (Table 4).

The EZH2 Expression in PBT24 Tumor

The EZH2-positive cells percentage in PBT24-control comprises 71.0 % (Table 4). Compared with the control, a significant diminishing of the EZH2-positive cells when treated with the dichloroacetate preparation groups was determined: in PBT24-10 mM NaDCA 19.59 % ($P = 0.002$), PBT24-5 mM

MgDCA 17.93 % ($P = 0.002$), PBT24-5 mM NaDCA 18.83 % ($P = 0.04$), and in PBT24-2.5 mM MgDCA 44.7 % ($P > 0.05$). No significant difference in EZH2 expression was found among those treated with 10 mM of NaDCA, 5 mM MgDCA and 5 mM of NaDCA ($P > 0.05$), but there was a significant difference when comparing the expression in PBT24-2.5 mM MgDCA with PBT24-10 mM NaDCA ($P = 0.0262$) and with PBT24-5 mM NaDCA ($P = 0.022$). The treatment with 5 mM MgDCA significantly reduced EZH2 expression more than treatment with 2.5 mM MgDCA dose ($P = 0.007$) (Table 4).

Histological Differences Among U87 and PBT24 Tumors

There was no difference in the incidence of tumor invasion into CAM in U87- and PBT24-controls. The treatment of tumors with 5 mM of NaDCA significantly reduced the U87 tumor invasion into CAM but had no apparent effect on the PBT24 tumor (Tables 1 and 2). Significant differences in CAM width as the effect of different doses of NaDCA were found on U87, but no such difference was found in the PBT24-treated groups (Tables 1 and 2). No difference in the number of blood vessels in the U87- and PBT24-control was found, but MgDCA with a

Table 3. The Percentage of PCNA- and EZH2-Positive Cells in U87 Tumor of the Study Groups.

Study group	PCNA-positive cells (%)		EZH2-positive cells (%)	
	n	median (range)	n	median (range)
U87-control	8	67.73 (15.44–92.73)	12	69.42 (5.34–94.06)
U87-10 mM NaDCA	8	25.70 (1.55–53.89) ^a	13	26.49 (1.88–74.11) ^e
U87-5 mM MgDCA	8	28.53 (3.12–74.99) ^b	7	3.39 (1.14–57.02) ^{f,g}
U87-5 mM NaDCA	8	15.25 (7.69–30.97) ^{c,d}	12	8.40 (2.15–92.17) ^{h,i}
U87-2.5 mM MgDCA	8	44.18 (17.14–87.98)	8	43.99 (14.59–94.77)

^a*P* = 0.04, compared with U87-control.^b*P* = 0.049, compared with U87-control.^c*P* = 0.047, compared with U87-control.^d*P* = 0.01, compared with U87-2.5 mM MgDCA.^e*P* = 0.02, compared with U87-control.^f*P* = 0.04, compared with U87-control.^g*P* = 0.009, compared with U87-5 mM NaDCA.^h*P* = 0.003, compared with U87-control.ⁱ*P* = 0.007, compared with U87-2.5 mM MgDCA.

PCNA: proliferating cell nuclear antigen; EZH2: enhancer of zeste homolog 2; NaDCA: sodium dichloroacetate; MgDCA: magnesium dichloroacetate.

Table 4. The Percentage of PCNA- and EZH2-Positive Cells in PBT24 Tumor of the Study Groups.

Study group	PCNA-positive cells (%)		EZH2-positive cells (%)	
	n	median (range)	n	median (range)
PBT24-control	9	63.78 (34.87–80.95)	6	71.00 (42.63–78.70)
PBT24-10 mM NaDCA	8	10.46 (2.38–24.34) ^{a,b}	7	19.59 (14.89–44.58) ^{g,h}
PBT24-5 mM MgDCA	6	20.70 (16.40–31.68) ^{c,d}	7	17.93 (2.78–44.44) ^{i,j}
PBT24-5 mM NaDCA	6	14.97 (9.99–31.06) ^{e,f}	6	18.83 (9.84–78.70) ^{k,l}
PBT24-2.5 mM MgDCA	7	43.12 (19.47–93.54)	7	44.70 (21.51–94.76)

^a*P* < 0.0001, compared with PBT24-control.^b*P* = 0.0006, compared with PBT24-2.5 mM MgDCA.^c*P* = 0.0004, compared with PBT24-control.^d*P* = 0.0221, compared with PBT24-2.5 mM MgDCA.^e*P* = 0.0004, compared with PBT24-control.^f*P* = 0.0047, compared with PBT24-2.5 mM MgDCA.^g*P* = 0.002, compared with PBT24-control.^h*P* = 0.0262, compared with PBT24-2.5 mM MgDCA.ⁱ*P* = 0.002, compared with PBT24-control.^j*P* = 0.007, compared with PBT24-2.5 mM MgDCA.^k*P* = 0.0221, compared with PBT24-2.5 mM MgDCA.^l*P* = 0.04, compared with PBT24-control.

PCNA: proliferating cell nuclear antigen; EZH2: enhancer of zeste homolog 2; NaDCA: sodium dichloroacetate; MgDCA: magnesium dichloroacetate.

dose-dependent effect significantly reduced their number only in the U87 tumor groups. Compared with the corresponding controls, PCNA expression in U87 tumors was mainly reduced by 5 mM NaDCA (4.4-fold) and in PBT24 by 10 mM NaDCA (6.1-fold). The EZH2-positive cell number in the U87 tumor decreased the most with 5 mM NaDCA and 5 mM MgDCA treatment by 8.3- and 20.5-fold, respectively, while in the PBT24 tumor by 3.8- and 4.0-fold, respectively.

Discussion

Pediatric high-grade GB is less common in the general population when compared to just adults. The genomic data has improved our knowledge and showed that the nature of

pediatric GB is distinct from that seen in adults.^{33,38} The search for more effective adult and pediatric GB treatment has met with unsatisfactory progress for decades.^{38,39} GB therapy requires a personalized approach with determining tumor treatment sensitivity in the preclinical stage.^{39,40} The nature of the GB cells or treatment-related effects on cell glycolytic track changes, can be one approach for cancer therapy.^{17,18,41} The monotherapy with NaDCA, as a mitochondrial regulator, illustrates antitumor effects in *in vivo* models.²⁴

The study of U87 and PBT24 tumors control peculiarities indicate their similar malignancy. The biomicroscopic, histomorphological analysis revealed that U87 and PBT24 tumors exhibit different sensitivity between treatment with NaDCA and MgDCA; that the efficacy of investigational medicines for

xenograft growth, invasion into CAM, angiogenesis depends not only on the dichloroacetate anion concentration but also on the cation in the salt.

NaDCA monotherapy *in vivo* significantly inhibited U87 MG cells subcutaneous tumor growth in the male Balb/c nude mouse model.⁴² Others did not find a monotherapy effect on the U87 MG tumor in mouse brain growth in the athymic nude female mice model,⁴³ and in the subcutaneous U87 MG-derived xenograft in the athymic nude female mice.³⁶ U87 MG cell spheroids showed resistance to 10 mM of NaDCA treatment.³⁶ No studies of NaDCA anticancer efficacy on pediatric PBT24 cell line tumors were found in the literature. The pediatric U373 and U373vIII cell line GB tumors, formed by being intracranially injected into female athymic nude mice, are sensitive to NaDCA treatment, and it decreased the pyruvate dehydrogenase kinase 1 expression in the tumors.¹⁶ NaDCA significantly inhibited several pediatric high-grade gliomas cells' viability.¹⁷

The pharmacological effect of the difference between NaDCA and MgDCA in cancer treatment was not previously studied. Differences between the effect of NaDCA and MgDCA on tumor growth indicate that the impact of dichloroacetate depends on interference with the Na^+ or Mg^{2+} effect; on the other hand, these characteristics may indirectly reflect some variations in U87 MG and PBT24 cells biology.

NaDCA decreases NKCC1 expression in rat thymocytes.²⁰ GB cell accumulates $[\text{Cl}^-]_i$ to levels ~10-fold higher than average.⁴⁴ GB cell $[\text{Cl}^-]_i$ homeostasis disruption is related to upregulated NKCC1.⁴⁵ A potential NKCC1 role is a participation in cell proliferation in tumors with high NKCC1 expression, such as glioma.⁴⁶ In human glioma, NKCC1 protein expression positively correlates with tumor grade.⁴⁴ Pharmacological inhibition of NKCC1 reduces glioma cell migration and invasion.^{44,47} Differences in the effect of 10 mM and 5 mM NaDCA on U87 MG and PBT24 cells may be due to the force of Na^+ ions. Increased Na^+ concentration may induce activation of NKCC1 as well as cause metabolic changes in U87 MG and PBT24 tumor cells differently. Increased extracellular Na^+ concentration can stimulate cell NKCC1 activity.⁴⁸ That would be consistent with the Na^+ replacement with Mg^{2+} in the dichloroacetate salt; MgDCA acts equally on U87 and PBT24 tumor growth. Na^+ and Cl^- ions in a tumor microenvironment are involved in cancer progression.^{26,46}

This study indicates that an additional criterion for assessing malignancy of xenograft is the thickening of the CAM, and these changes are directly related to an increased number of blood vessels in CAM mesenchyme. The non-treated U87 and PBT24 xenografts induced the CAM thickening similarly. Others reported that xenograft induces an inflammatory response in the CAM region.^{49,51} The PBS solution used as a control does not activate, but hyperosmolar solutions enable membrane thickening.⁵² CAM membrane thickening is inseparable from neoangiogenesis.⁵³ A tumor on CAM induces angiogenesis with the increased thickness of membrane mesenchyme.^{49,52} The vessel plexus was manifested around the xenograft after 5 days of U87 or PBT24 tumor grafted on

CAM. The CAM thickness was insignificantly increased in the U87 tumor that was treated with 10 mM of NaDCA compared to the control. The opposite effect of 10 mM NaDCA was found in the PBT24 tumor compared to the control, with a suppression of the CAM thickness and vascular number. Others reported that NaDCA therapy suppressed angiogenesis *in vivo*.¹⁹ This study shows that the effect of 10 mM dichloroacetate anion concentration on CAM thickening is dependent on the cation in the preparation (10 mM NaDCA and 5 mM MgDCA).

Patients with GB are defined by hypomagnesemia.⁵⁴ Mg^{2+} is required in mitochondrial function and glycolysis processes.⁵⁵ The relevance of intracellular and extracellular Mg^{2+} concentration to tumorigenesis has been shown to be associated with contradictory data.^{56,57} Elucidation of the relationship between Mg^{2+} and tumorigenesis by preclinical data could be significant in the clarification of Mg^{2+} homeostasis disorders.⁵⁶

This study shows that the PCNA-positive cells percentage in U87 and PBT24 control tumors were comparable. PCNA is a nuclear marker of cell proliferation occurring only in proliferating cells, and its expression increases with GB grade.⁵⁸ Both 5 mM of NaDCA and 5 mM of MgDCA treatment decreased PCNA expression in U87 and PBT24 tumors similarly. Researchers have reported that PCNA in the glioma of adult patients showed PCNA as an independent prognostic indicator, and its increased expression correlated with decreased patient survival.⁵⁸ Pediatric and adult metastatic or relapsed high-grade gliomas have a higher PCNA appearance.^{58,59} Its expression permits evaluation of the efficacy of cancer treatment in a CAM model.⁶⁰

A CAM model is relevant in testing investigational medicine designed to interfere with EZH2 molecular pathways in cancer.^{28,61} EZH2 inhibits genes accountable for suppressing tumorigenesis, and inhibiting EZH2 activity may reduce tumor growth.⁶² This study shows that EZH2 expression in U87 and PBT24 control tumors were similar. The treatment with NaDCA, as well as MgDCA preparation, significantly decreased EZH2 appearance in the U87 and PBT24 tumors. The EZH2 appearance suppression was highest in the U87 tumor treated with 5 mM of NaDCA and 5 mM of MgDCA, sequentially 8.3- and 20.5-times, while in the PBT24 tumor the preparations reduced EZH2 expression by 3.8- and 4.0-times, respectively. This would mean that the cancer of the adult U87 cell line in terms of EZH2 appearance is more sensitive to the treatment with MgDCA than the pediatric PBT24 cell line tumor. A meta-analysis of 6 studies showed that EZH2 overexpression is associated with poor prognosis of high-grade pediatric and adult glioma.⁶³ EZH2 is an anticancer drug target.⁶⁴

Furthermore, preclinical studies show a synergistic effect of NaDCA with the chemotherapy applied in various cancers.²⁴ The preclinical therapeutic approach of NaDCA combination with other medications suggested it could be incorporated into clinical trials.^{19,36,42} The risk of peripheral neuropathy restricts the treatment with NaDCA in adults. This adverse drug reaction

is age-dependent, and the NaDCA dose can be escalated in pediatric patients without significant side effects.^{17,65}

The targeting of tumor mitochondrial metabolism is a potential cancer treatment strategy. The U87 MG and PBT24 cell line tumors study shows the effect the U87 and PBT24 tumor differences have on the impact of varying NaDCA concentrations on tumor growth, and on the PCNA and EZH2 expression in the tumor cell. The variations between NaDCA and MgDCA efficacy on tumorigenesis may reflect differences in some U87 MG and PBT24 cell biology.

Conclusion

The human glioblastoma U87 MG and PBT24 cell line tumors response variations to treatment with different sodium dichloroacetate concentration on tumor growth or a contrast between sodium dichloroacetate and magnesium dichloroacetate effectiveness may reflect some differences in U87 MG and PBT24 cell biology.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The research was funded by the Research Council of Lithuania, grant number P-MIP-20-36.

ORCID iD

Donatas Stakišaitis  <https://orcid.org/0000-0002-1547-7050>

References

- Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res*. 2015;163:1-14. doi:10.1007/978-3-319-12048-5_1
- Sun T, Warrington NM, Luo J, et al. Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males. *J Clin Invest*. 2014;124(9):4123-4133. doi:10.1172/JCI171048
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013;15(2):iii1-56. doi:10.1093/neuonc/not151
- Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, et al. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol*. 2012;107(1):207-212. doi:10.1007/s11060-011-0738-7
- Coleman C, Stoller S, Grotzer M, et al. Pediatric hemispheric high-grade glioma: targeting the future. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(1):245-260. doi:10.1007/s10555-020-09850-5
- Society AC. Survival rates for selected adult brain and spinal cord tumors 2020. Accessed July 10, 2020. <http://www.cancer.org/cancer/braincns tumors in adults/detailedguide/brain-and-spinal-cord-tumors-in-adults-survival-rates>
- Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma subclassifications and their clinical significance. *Neurotherapeutics*. 2017;14(2):284-297. doi:10.1007/s13311-017-0519-x
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459-466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis*. 2016;3(3):198-210. doi:10.1016/j.gendis.2016.04.007
- Wicks RT, Azadi J, Mangraviti A, et al. Local delivery of cancer-cell glycolytic inhibitors in high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 2015;17(1):70-80. doi:10.1093/neuonc/nou143
- Cardoso AMS, Sousa M, Morais CM, et al. MiR-144 overexpression as a promising therapeutic strategy to overcome glioblastoma cell invasiveness and resistance to chemotherapy. *Hum Mol Genet*. 2019;28(16):2738-2751. doi:10.1093/hmg/ddz099
- Stacpoole PW. Therapeutic targeting of the pyruvate dehydrogenase complex/pyruvate dehydrogenase kinase (PDC/PDK) axis in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(11). doi:10.1093/jnci/djx071
- Niewisch MR, Kuçi Z, Wolburg H, et al. Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy? *Cell Physiol Biochem*. 2012;29(3-4):373-380. doi:10.1159/000338492
- Ward NP, Poff AM, Koutnik AP, D'Agostino DP. Complex I inhibition augments dichloroacetate cytotoxicity through enhancing oxidative stress in VM-M3 glioblastoma cells. *PLoS One*. 2017;12(6):e0180061. doi:10.1371/journal.pone.0180061
- Chinopoulos C, Seyfried TN. Mitochondrial substrate-level phosphorylation as energy source for glioblastoma: review and hypothesis. *ASN Neuro*. 2018;10:1759091418818261. doi:10.1177/1759091418818261
- Velpula KK, Guda MR, Sahu K, et al. Metabolic targeting of EGFRvIII/PDK1 axis in temozolomide resistant glioblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(22):35639-35655. doi:10.18632/oncotarget.16767
- Shen H, Yu M, Tsoli M, et al. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol*. 2020;22(1):139-151. doi:10.1093/neuonc/noz140
- Jha MK, Suk K. Pyruvate dehydrogenase kinase as a potential therapeutic target for malignant gliomas. *Brain Tumor Res Treat*. 2013;1(2):57-63. doi:10.14791/btrt.2013.1.2.57
- Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med*. 2010;2(31):31ra34. doi:10.1126/scitranslmed.3000677
- Stanevičiūtė J, Juknevičienė M, Palubinskienė J, et al. Sodium dichloroacetate pharmacological effect as related to Na-K-2Cl cotransporter inhibition in rats. *Dose Response*. 2018;16(4):1559325818811522. doi:10.1177/1559325818811522
- Hiraoka K, Miyazaki H, Niisato N, et al. Chloride ion modulates cell proliferation of human androgen-independent prostatic cancer cell. *Cell Physiol Biochem*. 2010;25(4-5):379-388. doi:10.1159/000303042

22. Tanaka S, Miyazaki H, Shiozaki A, Ichikawa D, Otsuji E, Marunaka Y. Cytosolic Cl⁻ affects the anticancer activity of paclitaxel in the gastric cancer cell line, MKN28 cell. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(1):68-80. doi:10.1159/000477116
23. Papandreou I, Goliasova T, Denko NC. Anticancer drugs that target metabolism: is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer*. 2011;128(5):1001-1008. doi:10.1002/ijc.25728
24. Stakišaitis D, Juknevičienė M, Damanskienė E, Valančiūtė A, Balnytė I, Alonso MM. The importance of gender-related anticancer research on mitochondrial regulator sodium dichloroacetate in preclinical studies in vivo. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1210. doi:10.3390/cancers11081210
25. Joergensen D, Tazmini K, Jacobsen D. Acute dysnatremias—a dangerous and overlooked clinical problem. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2019;27(1):58. doi:10.1186/s13049-019-0633-3
26. Amara S, Tiriveedhi V. Inflammatory role of high salt level in tumor microenvironment (Review). *Int J Oncol*. 2017;50(5):1477-1481. doi:10.3892/ijo.2017.3936
27. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*. 2016;141:70-77. doi:10.1016/j.mod.2016.05.003
28. Kavaliauskaitė D, Stakišaitis D, Martinkute J, et al. The effect of sodium valproate on the glioblastoma U87 cell line tumor development on the chicken embryo chorioallantoic membrane and on EZH2 and p53 expression. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6326053. doi:10.1155/2017/6326053
29. DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, et al. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res*. 2018;8(8):1642-1660.
30. Zhao Z, Bauer N, Aleksandrowicz E, et al. Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas rapidly xenografts in chicken eggs and predicts aggressiveness. *Int J Cancer*. 2018;142(7):1440-1452. doi:10.1002/ijc.31160
31. Valiulytė I, Čurkūnavičiūtė R, Ribokaitė L, et al. The anti-tumorigenic activity of Sema3C in the chick embryo chorioallantoic membrane model. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22):5672. doi:10.3390/ijms20225672
32. Allen M, Bjerke M, Edlund H, et al. Origin of the U87MG glioma cell line: good news and bad news. *Sci Transl Med*. 2016;8(354):354re353. doi:10.1126/scitranslmed.aaf6853
33. Martinez-Velez N, Garcia-Moure M, Marigil M, et al. The oncolytic virus delta-24-RGD elicits an antitumor effect in pediatric glioma and DIPG mouse models. *Nat Commun*. 2019;10(1):2235. doi:10.1038/s41467-019-10043-0
34. Sodium dichloroacetate CHCl₂COOH – PubChem. Accessed September 10, 2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/517326>
35. Magnesium;2,2-dichloroacetate C₄H₂Cl₄MgO₄ – PubChem. Accessed September 10, 2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20552560>
36. Kumar K, Wigfield S, Gee HE, et al. Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(6):749-758. doi:10.1007/s00109-013-0996-2
37. Tataranni T, Agriesti F, Pacelli C, et al. Dichloroacetate affects mitochondrial function and stemness-associated properties in pancreatic cancer cell lines. *Cells*. 2019;8(5):478. doi:10.3390/cells8050478
38. Kline C, Felton E, Allen IE, Tahir P, Mueller S. Survival outcomes in pediatric recurrent high-grade glioma: results of a 20-year systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol*. 2018;137(1):103-110. doi:10.1007/s11060-017-2701-8
39. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol*. 2017;134(3):541-549. doi:10.1007/s11060-017-2393-0
40. Uhm JH, Porter AB. Treatment of glioma in the 21st century: an exciting decade of postsurgical treatment advances in the molecular era. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(6):995-1004. doi:10.1016/j.mayocp.2017.01.010
41. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, et al. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab*. 2012;15(6):827-837. doi:10.1016/j.cmet.2012.05.001
42. Li C, Meng G, Su L, et al. Dichloroacetate blocks aerobic glycolytic adaptation to attenuated measles virus and promotes viral replication leading to enhanced oncolysis in glioblastoma. *Oncotarget*. 2012;3(6):1544-1555. doi:10.18632/oncotarget.2838
43. Shen H, Hau E, Joshi S, Dilda PJ, McDonald KL. Sensitization of glioblastoma cells to irradiation by modulating the glucose metabolism. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(8):1794-1804. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0247
44. Garzon-Muvdi T, Schiapparelli P, ap Rhys C, et al. Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. *PLoS Biol*. 2012;10(5):e1001320. doi:10.1371/journal.pbio.1001320
45. Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, et al. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med*. 2014;6(244):244ra289. doi:10.1126/scitranslmed.3008065
46. Cong D, Zhu W, S Kuo J, Hu S, Sun D. Ion transporters in brain tumors. *Curr Med Chem*. 2015;22(10):1171-1181. doi:10.2174/0929867322666150114151946
47. Haas BR, Cuddapah VA, Watkins S, Rohn KJ, Dy TE, Sontheimer H. With-no-lysine kinase 3 (Wnk3) stimulates glioma invasion by regulating cell volume. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(5):C1150-1160. doi:10.1152/ajpcell.00203.2011
48. Capó-Aponte JE, Wang Z, Bildin VN, Pokorny KS, Reinach PS. Fate of hypertonicity-stressed corneal epithelial cells depends on differential MAPK activation and p38MAPK/Na-K-2Cl cotransporter1 interaction. *Exp Eye Res*. 2007;84(2):361-372. doi:10.1016/j.exer.2006.10.011
49. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec*. 2001;264(4):317-324. doi:10.1002/ar.10021
50. Lee MS, Moon EJ, Lee SW, Kim MS, Kim KW, Kim YJ. Angiogenic activity of pyruvic acid in vivo and in vitro angiogenesis models. *Cancer Res*. 2001;61(8):3290-3293.

51. Ribatti D, Crivellato E, Candussio L, et al. Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(4):602-608. doi:10.1046/j.1365-2222.2001.00986.x
52. Rema RB, Rajendran K, Ragunathan M. Angiogenic efficacy of heparin on chick chorioallantoic membrane. *Vasc Cell*. 2012; 4(1):8. doi:10.1186/2045-824X-4-8
53. Yang L, Moses HL. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Res*. 2008;68(22):9107-9111. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2556
54. Kurup RK, Kurup PA. Cerebral chemical dominance and neural regulation of cell division, cell proliferation, neoplastic transformation, and genomic function. *Int J Neurosci*. 2003;113(5): 703-720. doi:10.1080/00207450390200071
55. Rubin H. The paradox of the contrasting roles of chronic magnesium deficiency in metabolic disorders and field cancerization. *Magnes Res*. 2014;27(3):94-102. doi:10.1684/mrh.2014.0366
56. Castiglioni S, Maier JA. Magnesium and cancer: a dangerous liason. *Magnes Res*. 2011;24(3):S92-100. doi:10.1684/mrh.2011.0285
57. Wolf FI, Maier JA, Nasulewicz A, et al. Magnesium and neoplasia: from carcinogenesis to tumor growth and progression or treatment. *Arch Biochem Biophys*. 2007;458(1):24-32. doi:10.1016/j.abb.2006.02.016
58. Lv Q, Zhang J, Yi Y, Huang Y, Wang Y, Wang Y, Zhang W. Proliferating cell nuclear antigen has an association with prognosis and risks factors of cancer patients: a systematic review. *Mol Neurobiol*. 2016;53(9):6209-6217. doi:10.1007/s12035-015-9525-3.
59. Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, et al. Shared molecular targets in pediatric gliomas and ependymomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(7):1117-1123. doi:10.1002/pbc.23009
60. Uloza V, Kuzminiene A, Palubinskiene J, Balnyte I, Uloziene I, Valanciute A. Model of human recurrent respiratory papilloma on chicken embryo chorioallantoic membrane for tumor angiogenesis research. *Histol Histopathol*. 2017;32(7):699-710. doi:10.14670/HH-11-831
61. Bohm J, Muenzner JK, Caliskan A, et al. Loss of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) at tumor invasion front is correlated with higher aggressiveness in colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(9):2227-2240. doi:10.1007/s00432-019-02977-1
62. Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med*. 2016; 22(2):128-134. doi:10.1038/nm.4036
63. Zhang Y, Yu X, Chen L, Zhang Z, Feng S. EZH2 overexpression is associated with poor prognosis in patients with glioma. *Oncotarget*. 2017;8(1):565-573. doi:10.18632/oncotarget.13478
64. Helin K, Dhanak D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature*. 2013;502(7472):480-488. doi:10.1038/nature12751
65. Abdelmalak M, Lew A, Ramezani R, et al. Long-term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis. *Mol Genet Metab*. 2013;109(2):139-143. doi:10.1016/j.ymgme.2013.03.019

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including table and figures. Furthermore, no special permission is required for authors to submit their work to external repositories (MDPI | Open Access Information).



Article

In Vivo and In Vitro Experimental Study Comparing the Effect of a Combination of Sodium Dichloroacetate and Valproic Acid with That of Temozolomide on Adult Glioblastoma

Rūta Skredėnienė ¹ , Donatas Stakišaitis ^{1,2,*} , Angelija Valančiūtė ¹ and Ingrida Balnytė ¹

¹ Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, 44307 Kaunas, Lithuania; ruta.skredenieniene@lsmu.lt (R.S.); angelija.valanciate@lsmu.lt (A.V.); ingrida.balnyte@lsmu.lt (I.B.)

² Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute, 08660 Vilnius, Lithuania

* Correspondence: donatas.stakisaitis@lsmuni.lt

Abstract

To date, there is no effective treatment for glioblastoma (GBM). This study aimed to compare the effectiveness of sodium dichloroacetate (NaDCA), a valproic acid and NaDCA combination (VPA–NaDCA), or temozolomide (TMZ) on U87 and T98G cell tumors on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), and on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2 (EZH2), and *TP53* gene-encoded p53 protein (p53) in tumors on the CAM, and *SLC12A2* (gene encoding $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC1) co-transporter), *SLC12A5* (gene encoding K^+/Cl^- (KCC2) co-transporter), *SLC5A8* (gene encoding Na^+ -dependent monocarboxylate transporter) and *CDH1* (gene encoding the E-cadherin protein) and *CDH2* (gene encoding the N-cadherin protein) in cells. VPA–NaDCA and TMZ reduced the invasion of U87 and T98G tumors, as well as the expression of PCNA and EZH2 in the tumor. TMZ reduced p53 expression in tumors from both cell lines, whereas VPA–NaDCA did not affect the expression of this marker. VPA–NaDCA, but not TMZ, reduced *SLC12A2* expression in T98G cells. However, VPA–NaDCA and TMZ did not affect *SLC12A2* expression in U87 cells. VPA–NaDCA increased *SLC5A8* expression only in U87 cells, and TMZ did not affect gene expression in either cell line. Only VPA–NaDCA increased *CDH1* expression and decreased *CDH2* expression in T98G cells, whereas TMZ had no effect on gene expression in the study cells. This study demonstrated that VPA–NaDCA exhibits a more effective anticancer effect than NaDCA. The data suggest that VPA–NaDCA has a more effective impact than TMZ; however, the effect of investigational medicines on carcinogenesis varies depending on the cell line. The study of the efficacy of drugs used to treat tumors on the CAM and cells demonstrates that it is essential to assess the effectiveness of treatment, which should be personalized, before administering chemotherapy.

Keywords: glioblastoma; dichloroacetate-valproic acid combination; temozolomide; cancer markers; chicken embryo chorioallantoic membrane model



Academic Editor: Kota V. Ramana

Received: 12 June 2025

Revised: 9 July 2025

Accepted: 13 July 2025

Published: 15 July 2025

Citation: Skredėnienė, R.; Stakišaitis, D.; Valančiūtė, A.; Balnytė, I. In Vivo and In Vitro Experimental Study Comparing the Effect of a Combination of Sodium Dichloroacetate and Valproic Acid with That of Temozolomide on Adult Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 6784. <https://doi.org/10.3390/ijms26146784>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) can occur at any age. The disease is more common in the elderly [1,2], is more frequently diagnosed in men [3], and there are known sex-related differences in survival time after GBM diagnosis [4,5].

Temozolomide (TMZ) has been used to treat newly diagnosed GBM since 2005 [6,7]. In treating GBM after surgery, the addition of TMZ to radiotherapy has increased overall survival (OS) by 2 months [8], with a median OS of 15 months and a progression-free survival of 6 months [9,10]. In over 50% of GBM patients, TMZ treatment is ineffective.

GBM cells are characterized by suppressed apoptosis and cell death [11]. The main effect of drugs on GBM is associated with inhibiting tumor cell proliferation and activating apoptosis [12]. Activated glycolytic processes characterize GBM cells [13]. One of today's targets for treating GBM is the inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) activity, which results in reduced glycolytic activity associated with carcinogenesis [14]. PDK expression is activated in tumor cells [15,16].

It is essential to find ways to reduce the resistance of GBM cells to treatment. Sodium dichloroacetate (NaDCA) may increase the sensitivity of GBM cells to TMZ [17,18]. Studies in the Balb/c nude mouse model showed that NaDCA monotherapy inhibited tumor growth of GBM U87 cells in the subcutaneous tissue [19]. Research on the U87 tumor in the brain of immunodeficient mice showed that the combination of NaDCA and radiotherapy increased the survival of mice [20]. NaDCA has an inhibitory effect on the growth of GBM cell spheroids [21].

One of the most common adverse reactions to NaDCAs in patients is reversible neuropathy [22]. Research findings support the view that sodium valproate (VPA) can be used to treat neuropathies in cancer patients [23,24]. VPA is a histone deacetylase (HDAC) inhibitor that inhibits the development of chemotherapy-related neuropathy. HDAC inhibition increases neuronal survival through mitophagy and autophagy mechanisms, while maintaining neuronal metabolism intact [25,26]. VPA, an epigenetic modulator, can affect gene expression, inhibit cell proliferation and the cell cycle, and induce apoptosis via demethylation mechanisms [27,28]. Three specific HDAC inhibitor drugs, vorinostat, romidepsin, and VPA, have been investigated in pre-clinical and clinical trials to elucidate their effects on GBM [29,30]. VPA may improve the intracellular delivery of dichloroacetate anions via mitochondrial mechanisms [31,32]. The synergistic effect of chemotherapy and HDAC inhibitors is promising for treating GBM to avoid chemotherapy resistance [33]. VPA alone or combined with other therapies inhibits glioma growth in vivo and in vitro [34]. Non-toxic doses of VPA increase the sensitivity of U87 and T98G cells to gefitinib by inhibiting cell growth through the activation of autophagy [35]. VPA acts by binding E2F transcription factor 1 to the glycosylated GPI and PGK1 promoter. This effect of VPA on glycolysis suggests a new therapeutic strategy in the search for VPA effects on tumor cells [36].

The inflammatory microenvironment of the GBM tumor, characterized by the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, as well as the activation of inflammatory pathways, promotes tumor malignancy [37]. The tissue microenvironments of cancer and inflammatory diseases share similarities: they are characterized by tissue hypoxia, accompanied by elevated lactic acid levels [38]. A common feature of GBM is tissue necrosis accompanied by inflammatory changes in the tumor microenvironment. In combination with necrosis, immunosuppressive inflammation is associated with higher resistance of GBM to treatment [39]. NaDCA is an investigational anti-tumor drug and, due to its properties, also has an anti-inflammatory effect [40]. VPA's immunomodulatory and anti-inflammatory effects are also known [41,42]. A valproic acid and NaDCA combination (VPA–NaDCA) treatment increased the expression of *Slc5a8* in mice thymocytes, indicating an effect of VPA on the dichloroacetate anion carrier, and significantly affected the expression of genes related to inflammation and the immune response, suggesting that VPA–NaDCA exerts an anti-inflammatory effect by inhibiting the pro-inflammatory mechanisms in the thymocytes of male mice, i.e., by suppressing the expression of genes

involved in the inflammation and by inducing the expression of genes for the production of anti-inflammatory chemokines and cytokines [43].

The progress of individualized GBM treatment is closely tied to standard treatment, with new treatment strategies being explored, such as chemotherapy using drugs tailored to the molecular and metabolic characteristics of the tumor [44,45]. Understanding the mechanisms of drugs and the development of treatment resistance is crucial for enhancing the efficacy of GBM treatment by evaluating the impact of medications on changes in cancer prognostic markers [46,47].

Researchers point to the chick chorioallantoic membrane (CAM) model as a promising approach for *in vivo* efficacy studies. It can be used as a 3D tumor treatment model to evaluate anticancer drugs before administering them to the patient [48]. Xenografts formed from GBM cells in the CAM model provide an opportunity to assess the potential efficacy of individual chemotherapy treatment [49].

The purpose of studying the VPA and NaDCA combination is to determine whether it has a synergistic effect or results in a reduction in the dose of the medicines. The experimental studies were designed to determine differences in the impact of treatment with the investigational drugs; determine differences in the response of GBM U87 and T98G cells and their tumors on the CAM; evaluate the effect of NaDCA or the VPA–NaDCA combination on the cancer markers proliferating cell nuclear antigen (PCNA), polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2 (EZH2), and *TP53* gene-encoded p53 protein (p53) expression in tumors on the CAM; evaluate the expression of the carcinogenesis-associated co-transporters NKCC1, KCC2, SLC5A8, and E-cadherin and N-cadherin genes; and compare the data with the effects of TMZ.

2. Results

2.1. Stereomicroscopic and Histologic Images of U87 and T98G Tumors *In Vivo* on the CAM, the Tumor *Ex Ovo*, and H-E Histological Images

Figure 1 shows the biomicroscopy images of the U87 and T98G tumors on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) in the tested groups at the day 9 of embryo development (EDD9) and EDD12, the *ex ovo* excised tumor with the CAM, and the tumors' hematoxylin and eosin (H-E) histological images.

In the stereomicroscope image, the control U87 tumor is visually smaller at EDD12 than at EDD9, as the tumor had invaded the CAM mesenchyme by day 12, and part of the tumor is located on the CAM. In the *ex ovo* image of the control tumor, the vascular network (a “spoked wheel”) is visible. Compared to the control, treatment with 3 mM NaDCA, 50 μ M TMZ, and 2 mM VPA–3 mM NaDCA inhibited tumor growth and the formation of a vascular network around the tumor. Compared to U87-control EDD12 *in vivo* and *ex ovo*, the respective tumors of U87-3 mM NaDCA, U87-50 μ M TMZ, and U87-2 VPA–3 mM NaDCA are visually larger as they are located on the surface of the CAM, the “spoked wheel” is not expressed, and H-E histology shows that the membrane chorionic epithelium is intact.

The stereomicroscopy image of the T98G control tumor shows precise contours in EDD9, while in EDD12, the tumor is reduced in size and expression due to partial invasion into the CAM, the *ex ovo* image shows a prominent “spoked wheel”, and the H-E preparation shows disrupted chorionic epithelial integrity and invasion of the tumor into the CAM. *In vivo* and *ex ovo* images of T98G-3 mM NaDCA and T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA tumors show a vascular network forming around the tumor; the H-E slides show disrupted integrity of the membrane chorionic epithelium and the CAM is thickened under the tumor. Treatment with 50 μ M temozolomide (TMZ) inhibited the growth of the T98G tumor: in EDD9 and EDD12, the tumor grows on the CAM; *ex ovo*, the vascular network

around the tumor is absent, and the H-E image shows that the TMZ-treated tumor did not damage the membrane chorionic epithelium integrity.

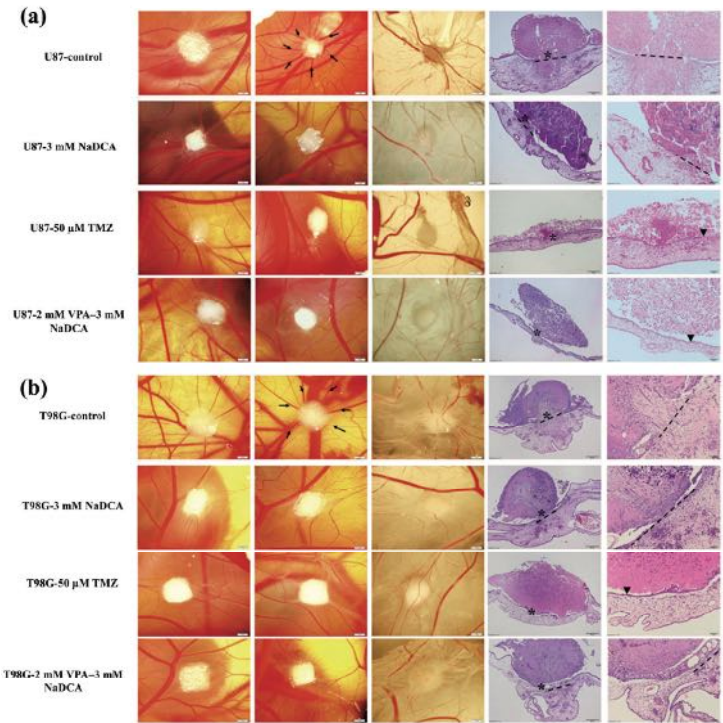


Figure 1. Stereomicroscopic U87 (a) and T98G (b) tumors on the CAM, the ex ovo tumor with the CAM, and the tumor histologic images stained with H-E at 4× and 10× magnifications. Arrows indicate the “spoked wheel”; dotted line—disruption of chorionic epithelium; asterisk—the enlarged region in H-E 10× pictures; arrowhead—intact chorionic epithelium. CAM—chick embryo chorioallantoic membrane; EDD—day of embryo development; H-E—hematoxylin and eosin. EDD9, EDD12, CAM ex ovo scale bar is 1 mm; H-E 4× preparation scale bar is 200 μm, 10× magnification—50 μm.

2.2. U87 and T98G Tumor Growth, Rate of Tumor Invasion into the CAM

Table A1 and Figure 2 show the invasion rates of U87 and T98G tumors on the CAM in the study groups.

Compared to the U87-control, treatment with 3 mM NaDCA, 50 μM TMZ, or 2 mM VPA-3 mM NaDCA significantly reduced the incidence of the U87 tumor’s invasion into the CAM. Compared to the T98G tumor control, only treatment with 50 μM TMZ significantly reduced the incidence of invasion. No effect on T98G tumor invasion was found in treatment with 3 mM NaDCA or 2 mM VPA-3 mM NaDCA.

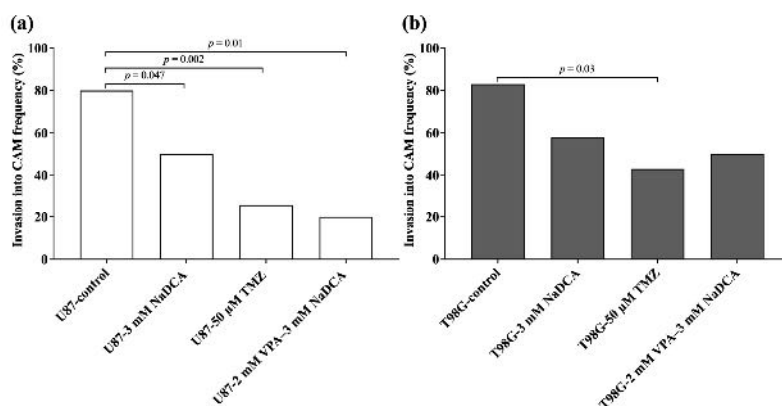


Figure 2. Invasion rate of U87 (a) and T98G (b) tumors into the CAM.

2.3. The IMP Impact on Neo-Angiogenesis in the CAM and on CAM Thickness Under the Tumor

Figure 3 shows the fluorescent stereomicroscopic images of U87 and T98G tumors on the CAM in the tested groups at EDD12.

Dextran highlighted the vascular network formed around U87 and T98G tumors. Compared to the U87-control, images of U87-3 mM NaDCA, U87-50 μM TMZ, and U87-2 mM VPA-3 mM NaDCA tumors showed a reduced vascular network (blunted neo-angiogenesis). Compared to the T98G-control, the vascular network around the tumor is reduced in T98G-3 mM NaDCA, T98G-50 μM TMZ, and T98G-2 mM VPA-3 mM NaDCA tumor images.

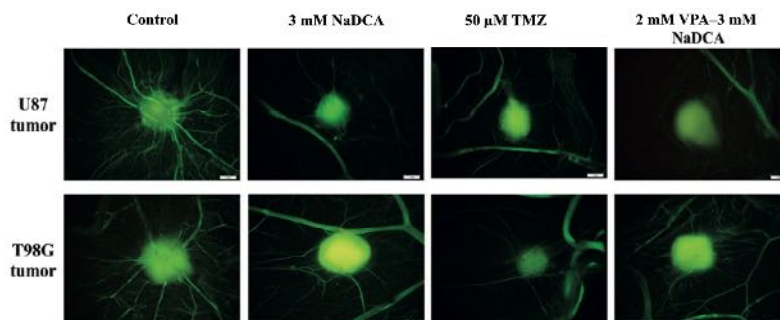


Figure 3. Fluorescent stereomicroscopic images of U87 and T98G tumors. The scale bar—1 mm.

Table A2 and Figure 4 show the histomorphometric data for the number of vessels in the CAM under the studied U87 and T98G tumors.

Compared to the U87-control, 3 mM NaDCA or 50 μM TMZ and 2 mM VPA-3 mM NaDCA significantly reduced the number of blood vessels in the CAM. The effect of 2 mM VPA-3 mM NaDCA treatment on neo-angiogenesis was considerably more significant than that of 3 mM NaDCA and 50 μM TMZ in the U87 tumor. Treatment with 3 mM NaDCA did not affect the number of blood vessels in the CAM under the T98G tumor. Neo-angiogenesis was significantly blunted by treatment in the T98G-50 μM TMZ and

T98G-2 mM VPA-3 mM NaDCA groups. Compared to T98G-3 mM NaDCA, treatment with 50 μ M TMZ or T98G-2 mM VPA-3 mM NaDCA significantly reduced the number of vessels in the CAM, with an equal effect on the latter.

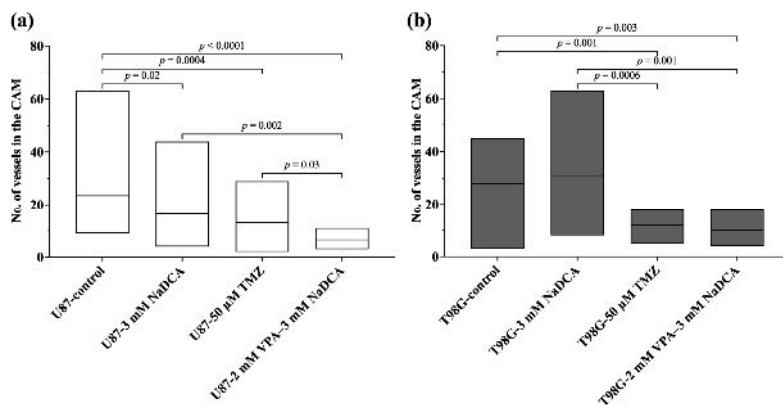


Figure 4. The number of blood vessels in the CAM under the U87 (a) and T98G (b) study tumors.

Table A3 and Figure 5 show the histomorphometric data on the sub-tumor CAM thickness in the U87 and T98G tumors.

Treatment with 3 mM NaDCA significantly reduced the CAM thickness under the U87 tumor. The CAM thickness under the tumor was significantly lower in the T98G-2 mM VPA-3 mM NaDCA group than in the T98G-control.

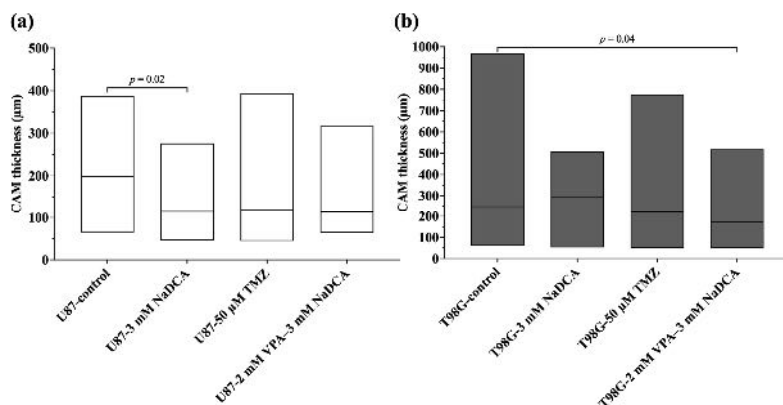


Figure 5. The CAM thickness under the U87 (a) and T98G (b) control and treated groups.

2.4. The Data of Immunohistochemical Examination of PCNA, p53, and EZH2 Marker Expression in the Tumors

The data for the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), TP53 gene-encoded p53 protein (p53), and polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2 (EZH2) markers tested in the tumor are presented in Tables A4–A6 in Appendix A.

2.4.1. The PCNA Expression of U87 and T98G in Control and Treated Tumors

Table A4 and Figure 6 show the PCNA expression data for the U87 and T98G tumor groups.

The frequency of PCNA-positive cells was similar to that of U87 and T98G control tumors. Compared to U87-control, U87-3 mM NaDCA, and U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA tumors, there were no significant differences in PCNA expression, and treatment with 50 μ M TMZ significantly reduced the number of PCNA-positive cells in the U87 tumor.

The frequency of PCNA-positive cells was significantly lower in T98G tumors treated with 50 μ M TMZ or 2 mM VPA–3 mM NaDCA compared to the T98G-control, and treatment with 3 mM NaDCA did not affect PCNA expression.

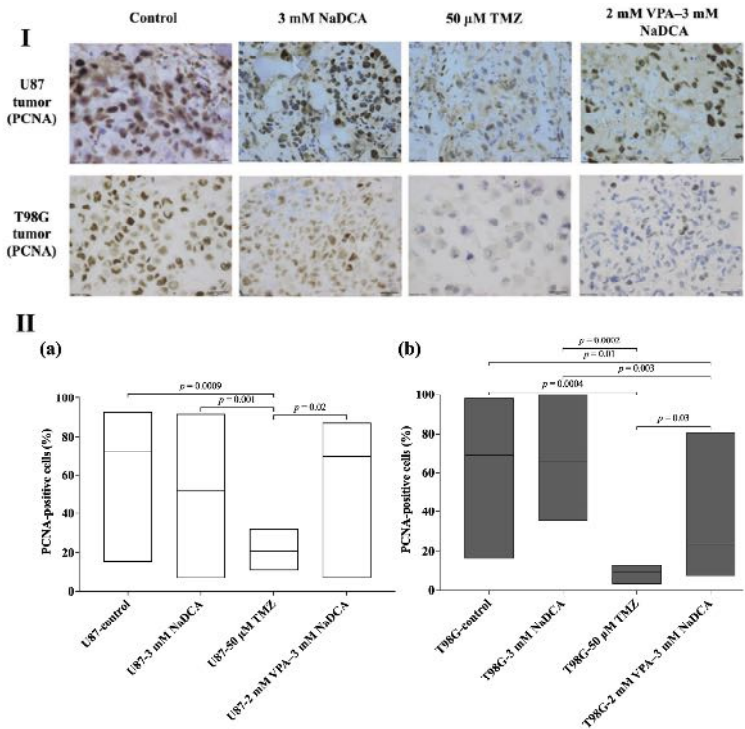


Figure 6. The PCNA expression in the groups of U87 and T98G control and treated tumors. (I) Dark brown nuclei indicate a PCNA-positive cell. Scale bar—20 μ m. (II) The percentage of PCNA-positive cells in U87 (a) and T98G (b) tumors. PCNA—proliferating cell nuclear antigen.

2.4.2. The p53 Expression of U87 and T98G in Control and Treated Tumors

Table A5 and Figure 7 show the p53 expression data for the U87 and T98G tumor groups.

No significant differences in p53 expression were found when comparing the U87-control, U87-3 mM NaDCA, and U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA groups. However, treatment with 50 μ M TMZ significantly reduced the number of p53-positive cells in

the U87 tumor, and this number was considerably lower than in the U87-2 mM VPA-3 mM NaDCA group.

The number of p53-positive cells was significantly lower in the tumors treated with 50 μ M TMZ compared with the T98G-control, and treatment with 3 mM NaDCA or 2 mM VPA-3 mM NaDCA did not affect the expression of p53 in the T98G tumor compared to the control. The expression of p53-positive T98G cells in the tumor did not differ between the TMZ-treated and 2 mM VPA-3 mM NaDCA groups.

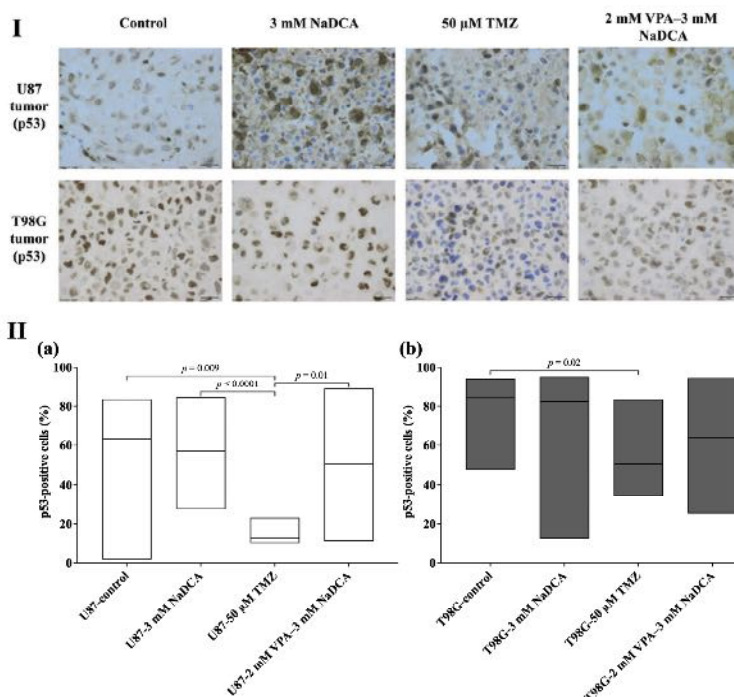


Figure 7. The p53 expression in the U87 and T98G control and treated tumors. (I) Dark brown nuclei indicate a p53-positive cell. Scale bar—20 μ m. (II) The percentage of p53-positive cells in U87 (a) and T98G (b) tumors. p53—TP53 gene-encoded p53 protein.

2.4.3. The EZH2 Expression in Studied U87 and T98G Tumors

Table A6 and Figure 8 show the EZH2 expression data for the U87 and T98G tumor groups.

No significant differences in EZH2 expression were found between the U87-control, U87-3 mM NaDCA, and U87-2 mM VPA-3 mM NaDCA groups. Treatment with 50 μ M TMZ significantly reduced the number of EZH2-positive cells in the U87 tumor, and this effect was substantially more significant than that of the combination.

Compared to the T98G-control, the number of EZH2-positive cells was significantly lower in tumors treated with 50 μ M TMZ or 2 mM VPA-3 mM NaDCA (no significant difference was found when comparing the latter groups). The treatment with 3 mM NaDCA did not affect EZH2 expression in the T98G tumor.

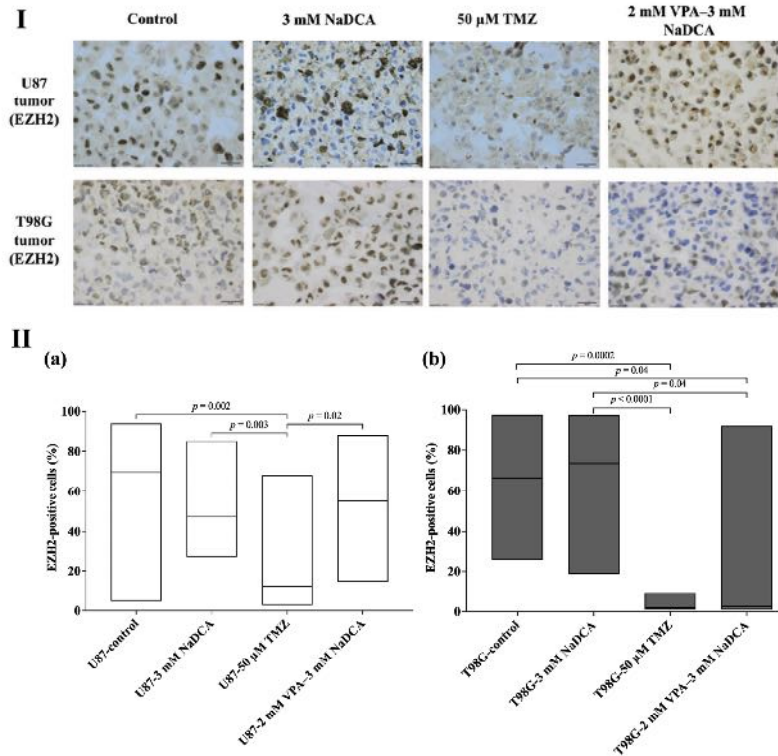


Figure 8. The EZH2 expression in the U87 and T98G control and treated tumors. (I) Dark brown nuclei indicate an EZH2-positive cell. Scale bar—20 μ m. (II) The percentage of EZH2-positive cells in U87 (a) and T98G (b) tumors. EZH2—polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2.

2.5. The Data of *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CHD1*, and *CHD2* Expression in Tested U87 and T98G Cell Groups

Expression data for *SLC12A2* (gene encoding $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC1) co-transporter), *SLC12A5* (gene encoding $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC2) co-transporter), and *CHD2* (gene encoding the N-cadherin protein) in the U87 and T98G control and treatment groups are shown in Tables A7–A9 of Appendix A.

2.5.1. *SLC12A2* Expression in U87 and T98G Cells

Table A7 and Figure 9 show the *SLC12A2* expression data for the U87- and T98G-control and treatment cells.

T98G cells expressed significantly higher *SLC12A2* expression than U87 cells. No significant differences in *SLC12A2* expression were found when comparing the U87-control, U87-3 mM NaDCA, U87-50 μ M TMZ, and U87-2 mM VPA-3 mM NaDCA groups with the U87-control. Compared to the T98G-control, treatment with 3 mM NaDCA and 2 mM VPA-3 mM NaDCA significantly reduced *SLC12A2* expression, whereas 50 μ M TMZ did not affect gene expression.

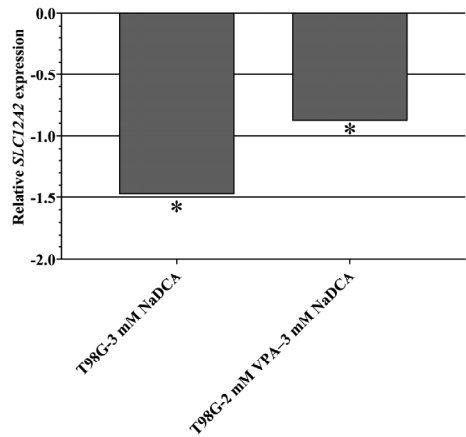


Figure 9. The *SLC12A2* expression in the T98G cells tested: relative *SLC12A2* expression ($\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta\text{CT}})$) of the T98G cell groups tested. *SLC12A2*—gene encoding $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC1) co-transporter. * $p < 0.05$, compared to the control.

2.5.2. *SLC12A5* Expression in U87 and T98G Cells

Table A8 and Figure 10 show the *SLC12A5* expression data for the U87- and T98G-control and treated cell groups.

Compared to the U87-control, treatment with 2 mM VPA-3 mM NaDCA significantly increased *SLC12A5* expression in U87 cells. Compared to the U87-control, treatment with 3 mM NaDCA or 50 μM TMZ did not affect the expression of *SLC12A5* in U87 cells. No expression of *SLC12A5* was detected in the T98G-control, T98G-3 mM NaDCA, and T98G-50 μM TMZ groups. Treatment with 2 mM VPA-3 mM NaDCA upregulated *SLC12A5* expression in T98G cells.

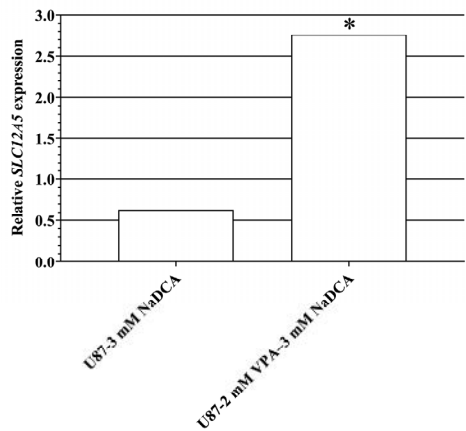


Figure 10. The *SLC12A5* expression in the U87 cells tested: relative *SLC12A5* expression ($\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta\text{CT}})$) of the U87 cell groups. *SLC12A5*—gene encoding $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC2) co-transporter. * $p < 0.05$, compared to the control.

2.5.3. *SLC5A8* Expression in U87 and T98G Cells

SLC5A8 (gene encoding Na^+ -dependent monocarboxylate transporter) expression was not detected in U87- ($n = 6$) and T98G-control cells ($n = 6$ in each group). Treatment with 3 mM NaDCA and 50 μM TMZ did not affect *SLC5A8* expression in U87 cells, while 2 mM VPA–3 mM NaDCA upregulated gene expression in U87 cells (CT of *SLC5A8*— 33.39 ± 0.56 , CT of *GAPDH*— 16.31 ± 0.89 ; ΔCT 17.09 ± 0.95). Treatment with 3 mM NaDCA, 50 μM TMZ, and 2 mM VPA–3 mM NaDCA did not affect *SLC5A8* expression in T98G cells.

2.5.4. *CDH1* and *CDH2* Expression in U87 and T98G Cells

CDH1 (gene encoding the E-cadherin protein) was undetectable (silencing) in U87 and T98G cells ($n = 6$ in each group). Treatment with 3 mM NaDCA, 50 μM TMZ, and 2 mM VPA–3 mM NaDCA did not affect *CDH1* expression in U87 cells. Treatment with 3 mM NaDCA and 50 μM TMZ did not affect *CDH1* expression in T98G cells. Treatment with 2 mM VPA–3 mM NaDCA upregulated *CDH1* expression in T98G cells (CT of *CDH1*— 34.27 ± 0.43 , CT of *GAPDH*— 16.80 ± 2.00 ; ΔCT 17.04 ± 2.49).

Table A9 and Figure 11 show the *CDH2* expression data for the U87- and T98G-control and treated cell groups. The *CDH2* expression of U87 cells was lower than T98G cells. No significant differences in *CDH2* expression were found when comparing the U87-control, U87-3 mM NaDCA, U87-50 μM TMZ, and U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA groups. Compared to the T98G-control, treatment with 3 mM NaDCA and 2 mM VPA–3 mM NaDCA significantly reduced *CDH2* expression in T98G cells. T98G cells treated with 2 mM VPA–3 mM NaDCA showed significantly higher *CDH2* expression than those treated with 3 mM NaDCA.

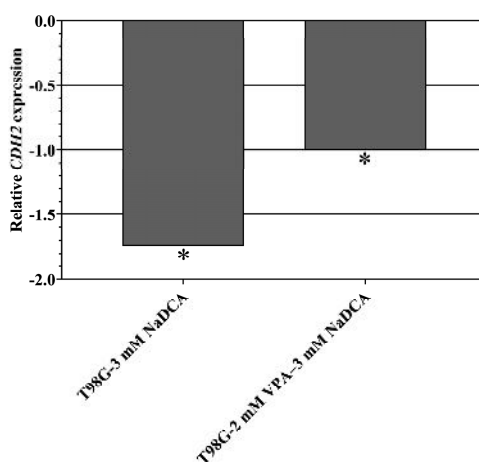


Figure 11. The *CDH2* expression in the T98G cells tested: relative *CDH2* expression ($\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta\text{CT}})$) of the tested T98G cells. *CDH2*—gene encoding the N-cadherin protein. * $p < 0.05$, compared to the control.

3. Discussion

The high mortality in glioblastoma (GBM) patients is related to the tumor's acquired resistance to chemotherapy with temozolomide (TMZ) [7,50], which results in recurrence and poor prognosis [46], thus highlighting the importance of finding more effective treatments for GBM.

Sodium dichloroacetate (NaDCA) is a specific pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) inhibitor that inhibits lactic acid production [51,52] and promotes tumor cell apoptosis [53]. PDKs selectively inhibit the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, which is essential for glycolysis and oxidation mechanisms [13]. PDH inactivation is supported by increased PDK1 expression in GBM cells [54], which is associated with chemotherapy resistance [55].

The anticancer effect of valproic acid (VPA) is associated with inhibition of class I and II histone deacetylases (HDAC) [56]. VPA has been investigated in combination with chemotherapy and radiotherapy [35,57], either at the beginning or after chemoradiotherapy, aiming to increase the efficacy of chemotherapy in GBM patients and improve median overall survival (OS) [58,59]. VPA enhances the efficacy of radiotherapy by increasing the sensitivity of GBM cells [57] and activating the apoptotic response to radiotherapy [60].

The study of U87 and T98G control tumors did not reveal any differences in the frequency of invasion into the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), the expression of neo-angiogenesis in the CAM mesenchyme beneath the tumor, or the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2 (EZH2) in the tumor. *SLC5A8* (gene encoding Na⁺-dependent monocarboxylate transporter) and *CDH1* (gene encoding the E-cadherin protein) expression in U87 and T98G control cells was muted (not expressed). T98G cells may be more malignant than U87 cells because *SLC12A2* (gene encoding Na⁺-K⁺-2Cl[−] (NKCC1) co-transporter) expression was significantly higher in T98G cells than in U87 cells, and *SLC12A5* (gene encoding K⁺-Cl[−] (KCC2) co-transporter) expression was expressed in U87 cells; it was undetectable in T98G cells, and *CDH2* (gene encoding the N-cadherin protein) expression was significantly higher in T98G control cells than in U87 cells. This study showed that the effect of treatment with NaDCA, valproic acid and NaDCA combination (VPA–NaDCA), or TMZ depended on the test drug and the cell line; this study allowed us to see possible differences or similarities in the effects of the investigated agents on the carcinogenesis of the investigated cell tumors.

The study of U87 tumors on the CAM shows that treatment with 3 mM NaDCA, 2 mM VPA–3 mM NaDCA (hereinafter referred to as VPA–NaDCA), or 50 µM TMZ significantly reduced the incidence of the U87 tumor's invasion into the CAM and reduced the number of blood vessels in CAM mesenchyme, and the effect of VPA–NaDCA treatment on neo-angiogenesis was significantly greater than that of 3 mM NaDCA and 50 µM TMZ. However, only T98G tumor treatment with 50 µM TMZ significantly reduced the tumor invasion into the CAM. At the same time, neo-angiogenesis was equally blunted by treatment with 50 µM TMZ or VPA–NaDCA of the T98G tumor.

PCNA was initially recognized as a proliferating cell-specific antigen expressed in cell nuclei during the S phase of the cell cycle; later studies and a systematic review show that increased PCNA expression is directly associated with malignancy, poor survival, and advanced GBM stage, and the marker has been proposed as a useful diagnostic or prognostic biomarker or an effective therapeutic target in glioma [61]. Only 50 µM TMZ treatment significantly reduced the number of PCNA-positive cells in the U87 tumor on the CAM. Others reported that TMZ in U87 MG cells at doses (IC₅₀ > 200 µM) administered alone exhibited no antiproliferative activity [62]. Regarding the effect of the treatment on PCNA expression, the impact of VPA–NaDCA on the T98G tumor on the CAM is characterized by a synergistic effect of the combination components: the frequency of PCNA-positive cells was lowered considerably in those treated with 50 µM TMZ or VPA–NaDCA tumors, while 3 mM NaDCA did not affect PCNA expression in T98G tumors. Higher doses of 5 mM and 10 mM NaDCA significantly inhibited the PCNA expression in GBM pediatric PBT24 and SF8628 cell tumors on CAM [63].

The unsatisfactory chemotherapeutic effect of TMZ is due to more than 50% of GBM patients being resistant to TMZ [64], mainly due to the high expression of O-6-methylguanine-

DNA methyltransferase (MGMT), which alters methylation and preserves tumor cells [65]. Reducing MGMT expression is a key factor in reversing TMZ resistance. The use of high doses of TMZ to reduce MGMT activity still raises the problem of dose-limiting toxicity [65,66]. MGMT regulation has been shown to involve *TP53* gene-encoded p53 protein (p53), which is one of the most comprehensively studied GBM targets [67]. Reduced MGMT expression is associated with p53 activation [64,68]. Compared to the U87 control tumors, only 50 μ M TMZ significantly reduced the number of p53-positive cells in the U87 tumor; T98G-50 μ M TMZ tumors expressed a significantly decreased p53-positive cell number, while the frequency of p53-positive T98G cells in the tumor did not differ between 2 mM VPA–3 mM NaDCA-treated and control groups.

EZH2 is the enzymatic subunit of polycomb repressive complex 2, a histone N-methyltransferase methylating H3 lysine in mammalian cells, inhibiting transcription [69,70]. EZH2 inhibits genes responsible for suppressing carcinogenesis, and inhibition of EZH2 activity can reduce tumor growth [71]. EZH2 is a target for anticancer drugs [72]; detecting EZH2 expression in tumors using a CAM model is an informative approach [73,74]. Our data showed that treatment with 50 μ M TMZ significantly reduced the number of EZH2-positive cells in the U87 tumor, while 3 mM NaDCA or VPA–NaDCA treatment had no effect on EZH2 expression. Otherwise, the number of EZH2-positive cells in tumors was significantly similarly lowered with 50 μ M TMZ or VPA–NaDCA treatment, while 3 mM NaDCA did not affect EZH2 expression in the T98G tumor. A meta-analysis of six studies showed that increased EZH2 expression is associated with a poor prognosis in GBM [75]. EZH2 interacts with oncogenes (MYC, PTEN) to influence tumor malignancy by activating the EMT mechanism, initiating GBM cell invasion and metastasis [76].

The Na-K-2Cl co-transporter (NKCC1) carries Na^+ , K^+ , and Cl^- into the cell; NKCC1 is encoded by the *SLC12A2* gene [77,78]. The activity of NKCC1 is directly related to GBM cell proliferation [79], which is directly related to the NKCC1 protein expression in human GBM [79–81]. Tumor intracellular Cl^- concentration is an essential target for anticancer therapy; NKCC1 inhibition can suppress tumor cell proliferation and promote apoptosis [82,83]. The tested IMPs did not change the *SLC12A2* expression in the U87 investigated groups. At the same time, the treatment with 3 mM NaDCA and VPA–NaDCA significantly reduced *SLC12A2* expression in T98G cells, whereas 50 μ M TMZ did not affect gene expression. Damanskienė et al. found that TMZ significantly increased the expression of *SLC12A2* in the pediatric GBM cells PBT24 and SF8628 in vitro [84]. Activation of *SLC12A2* by TMZ in GBM is dependent on phosphorylation of the WNK kinase protein [85]. Human GBM cells exhibit increased activation of NKCC1 and its two upstream regulatory kinases, WNK1 and OSR1. Knockdown of WNK1 or OSR1 decreases intracellular K^+ and Cl^- levels. TMZ may activate the WNK1/OSR1/NKCC1 signaling pathway and enhance glioma cell migration. Pharmacological inhibition of NKCC1 significantly reduces glioma cell migration after TMZ treatment with drugs that inhibit elements of the WNK1/OSR1/NKCC1 signaling pathway [86]. Inhibition of NKCC1 by bumetanide suppresses glioma cell migration and invasion [87].

A K-Cl co-transporter (KCC2) is identified in central nervous system cells, encoded by *SLC12A5* [88,89]. KCC2 carries K^+ and Cl^- out of the cell [90]. KCC2 expression is reduced in GBM cells; increased KCC2 expression in GBM cells inhibits GBM cell proliferation, i.e., KCC2 is a glioma suppressor [91] and is a prognostic marker for GBM. We showed that VPA–NaDCA treatment increased *SLC12A5* expression in U87 and T98G cells, while 3 mM NaDCA or 50 μ M TMZ did not affect *SLC12A5* expression in the cells studied. This indicates the superiority of VPA–NaDCA over TMZ. The effect may be due to the synergistic action of VPA, since VPA upregulated the expression of the gene in U87 but not in T98G cells [92]. *SLC12A5* expression inhibits the proliferation of glioma U251 MG cells,

and the gene is a potential prognostic marker for GBM; activation of the co-transporter is an early sign of cell apoptosis [91]. Adult GBM patients with epilepsy have reduced KCC2 expression in histological specimens in the tumor environment [93,94]. Disturbances in the balance between NKCC1 and KCC2 activity may reduce the hyperpolarizing effects of gamma-aminobutyric acid (GABA), which may influence the occurrence of epilepsy in GBM patients. Seizures worsen the course of GBM disease [95]. By activating KCC2 in GBM cells, the effect of drugs may ensure the functioning of GABA A receptors in postsynaptic neurons [89] and could thus help control the intensity of seizures [96].

The monocarboxylate co-transporter (SLC5A8) is an oncosuppressor of human and experimental gliomas, encoded by *SLC5A8*, and its activity depends on the intracellular Na^+ and Cl^- content [97,98]. SLC5A8 activity in male rat duodenal enterocytes depends on NKCC1 activity [99]. SLC5A8 activates cell apoptosis via pyruvate-dependent HDAC suppression [31]. Studies in adult male wild-type *c/ebpδ*^{+/−} and *c/ebpδ*^{−/−} mice have shown that SLC5A8 mainly transports short fatty acid chains into the cell [100,101]. The co-transporter carries lactic acid, pyruvate, acetate, propionate, valerate, butyrate, and dichloroacetate (DCA) into the cell [31,97]. We show that *SLC5A8* expression was not detected in U87- and T98G-control cells, and 3 mM NaDCA or 50 μM TMZ did not affect gene expression in these cells. Treatment with 2 mM VPA–3 mM NaDCA upregulated *SLC5A8* expression in U87 cells but not T98G cells. Silencing of *SLC5A8* is associated with DNA methylation [102]; treating tumor cells with DNA demethylating agents increases *SLC5A8* expression [31]. VPA activates genes regulated by DNA methylation [32,103]; VPA increases *SLC5A8* expression in U87 but not T98G cells [92,98].

Cadherins regulate apoptosis, gene expression, cell proliferation, differentiation, and migration [104]. *CDH1* was undetectable (silencing) in U87 and T98G cells. *CDH1* encodes the cell adhesion protein E-cadherin, which is a tumor suppressor [104], and its alterations have been linked to the development of specific epithelial tumors [105]. The N-cadherin gene (*CDH2*) is expressed in GBM and directly correlates with tumor grade [80,104,106]. In gliomas, *CDH1* expression is low or unexpressed due to hypermethylation and decreases with increasing GBM stage [107,108]. This study's treatment with IMPs did not affect *CDH1* and *CDH2* expression in U87 cells. Treatment with VPA–NaDCA upregulated *CDH1* expression in T98G cells, while 50 μM TMZ did not affect gene expression. The treatment with 3 mM NaDCA and VPA–NaDCA significantly reduced T98G cell's *CDH2* expression; T98G cells treated with VPA–NaDCA showed significantly lower *CDH2* expression than those treated with TMZ. GBM progression and treatment resistance are linked to the GBM cellular epithelial–mesenchymal transition (EMT) mechanisms, where E-cadherin expression is reduced and N-cadherin expression is increased [109], resulting in the acquisition of a mesenchymal subtype that is more invasive and treatment resistant [104,106].

The limitation of this study is that it only tests cells from two GBM cell lines. Still, data have shown differences in the effects of the investigational medicinal products between the different cell lines. Determining drug efficacy using cell line xenografts on the CAM is limited because commercial GBM cell lines do not accurately represent the genetic and biological heterogeneity of the GBM [109]. It was reported that GBM on the CAM is a model that replicates the histological and genetic features of the patients' tumor, and the CAM model may enable the prediction of patient clinical outcomes [110]. Therefore, it is essential to research investigational medicines using primary GBM cells. Research shows the advantages of the CAM model. The success rate of GBM on CAM engraftment was 98.3% [110], 38–69% in heterotopic mouse models of patient-derived xenograft gliomas [109,111], and 76–90% in an orthotopic mouse model of a brain tumor [109,112]; however, the problem is that IDH1-mutated transplanted specimens almost entirely fail in mice [111,113,114], and in contrast, patient-derived xenografts on the CAM are practically always successful [110].

Our study suggests that combining the CAM model with the effects of the study drugs on the gene expression of GBM cells would be an approach to evaluating the effectiveness of a drug. The study’s findings underscore the importance of individualized assessment of drug effects and the need for further studies on primary cells from GBM patients to personalize research for effective GBM treatment.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines and Culture Conditions

Adult high-grade glioblastoma (GBM) cell lines were investigated: (1) female Caucasian 44-year-old U87 (U-87 MG; ECACC number 89081402), donated by Dr. Arūnas Kazlauskas (Neuro-Oncology and Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania), and (2) male Caucasian 61-year-old T98G (T98G; ATTC CRL-1690), donated by Prof. M. M. Alonso (University of Navarra, Pamplona, Spain). The U87 cells were maintained using Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, UK), as reported [115]. T98G cells were grown in Advanced Minimum Essential Medium (AMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine (Glutamax; Gibco, Paisley, UK) and 5% FBS, as described in the product sheet [116]. Media were supplemented with penicillin (1% 100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (P/S; Gibco, Grand Island, NY, USA). Cells were cultured at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO₂.

4.2. U87 and T98G Tumors in the CAM Study Groups

In the U87 and T98G tumor groups, tumor growth and invasion into the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), the number of blood vessels in the CAM, sub-tumoral thickening of the CAM, and the expression of immunohistochemical markers PCNA (proliferating cell nuclear antigen), p53 (TP53 gene-encoded p53 protein), and EZH2 (polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2) were investigated. Cells were treated with 3 mM NaDCA, 50 µM TMZ, or 2 mM VPA–3 mM NaDCA. The group sample sizes are shown in Table 1.

Table 1. Sample size of U87 and T98G tumors on the CAM and tumor IHC marker expression in the groups studied.

Control and Treated Study Group	Invasion, No. of Vessels, CAM Thickness		PCNA		p53		EZH2	
			n					
	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G
Control	20	12	13	9	15	9	17	9
3 mM NaDCA	20	12	18	10	20	11	19	11
50 µM TMZ	15	16	8	6	7	7	8	7
2 mM VPA–3 mM NaDCA	10	12	10	8	10	8	10	9

U87 and T98G cells were investigated for *SLC12A2* (gene encoding Na⁺-K⁺-2Cl[−] (NKCC1) co-transporter), *SLC12A5* (gene encoding K⁺-Cl[−] (KCC2) co-transporter), *SLC5A8* (gene encoding Na⁺-dependent monocarboxylate transporter), *CDH1* (gene encoding the E-cadherin protein), and *CDH2* (gene encoding the N-cadherin protein) genes in the control group and groups treated with 3 mM NaDCA, 50 µM TMZ, and 2 mM VPA–3 mM NaDCA for 24 h (n = 6 per group).

4.3. The CAM Model

According to Lithuanian and EU legislation, no approval from the Ethics Committee is required for studies using the CAM model. Fertilized chicken eggs Cobb 500 (Rumšiškės hatchery, Rumšiškės, Lithuania) were incubated for 3 days at 37 °C and 60% air humidity in an egg incubator (Maino Incubators, Oltrona di San Mamette, Como, Italy). Eggs were rolled every hour until day 3 of the embryo development (EDD3). At EDD3, the developing CAM was separated from the eggshell; 2 mL of egg white was aspirated from the blunt end of the egg. A 1 cm² window was drilled in the shell and covered with sterile parafilm. The eggs were re-incubated until GBM cell tumor transplantation on the CAM at EDD7.

U87 or T98G cells were resuspended in 20 µL of type I rat tail collagen (Gibco, New York, NY, USA) (in the control group), and sodium dichloroacetate (NaDCA), combination of valproic acid and NaDCA (VPA–NaDCA), or temozolomide (TMZ) solutions (investigational medicine-treated groups) per 1×10^6 cells. Pieces of an absorbable hemostatic gelatin sponge (Surgispon, Aegis Lifesciences, Gujarat, India) having a size of 9 mm³ (3 × 3 × 1 mm) were formed using a blade. A quantity of 20 µL of cell suspension mixture was pipetted onto each piece of sponge. As stated by Ribatti, the gelatin sponge is suitable for the delivery of tumor cell suspensions onto a CAM surface [117]. At the EDD7, the formed tumors were transplanted on the CAM near the largest blood vessels. The tumor's structural changes were monitored in vivo using a stereomicroscope (SZX2-RFA16, Olympus, Tokyo, Japan) during the period of EDD9–12. Images of the tumors were captured with a digital camera (DP 92, Olympus, Tokyo, Japan) and CellSens Dimension 1.9 Imaging Software. At EDD12, the CAM blood vessel was injected with 0.2 mL of fluorescein isothiocyanate-dextran (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 5 mg/mL. The tumors with the CAM were harvested and photographed in daylight and with a green fluorescent protein (GFP) filter exposed to UV light using the software.

4.4. Investigational Medicinal Products

The investigational medicinal preparations used for the study were sodium dichloroacetate (NaDCA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), sodium valproate (VPA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and temozolomide (TMZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The investigational medicinal product combines NaDCA and VPA. The combination of these products is our filed patent that covers VPA–NaDCA as a novel medicinal product for treating cancer (Official bulletin of the State Patent Bureau of the Republic of Lithuania, number 6874, filed on 17 April 2020) [118]; a European patent application was submitted (European patent application number 21168796.7, filed on 16 April 2021) [119]. The doses of NaDCA or VPA were chosen as previously reported, using investigational drugs for monotherapy [73,115,120]. A 50 µM TMZ dose correlates with the mean TMZ plasma concentration in TMZ-treated patients [121].

4.5. Histological and Immunohistochemical Examination of the Tumor

At EDD12, the tumors with the CAM were harvested, fixed in 10% neutral-buffered formalin for 24 h, and embedded in paraffin. The Obtained 3 µm sections were stained using the hematoxylin and eosin (H-E) method (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and immunohistochemically (IHC) for PCNA, p53, and EZH2 markers. Sections were mounted on glass slides coated with poly-L-lysine (Thermo Fisher Scientific, Branchburg, NJ, USA). Deparaffinization of sections in xylene and rehydration in progressive alcohol concentrations were followed by heat-induced antigen retrieval with EnVision FLEX Target Retrieval Solution (K8002, Dako, Glostrup, Denmark) (95 °C, 20 min, pH 9). The Shandon Coverplate Technology (Thermo Fisher Scientific, Branchburg, NJ, USA) was used for the staining. Endogenous peroxidase blocking was performed using EnVision FLEX Peroxidase

Blocking Reagent (SM 801, Dako, Glostrup, Denmark) for 10 min. The preparations were incubated with primary antibodies (dilution 1:100) for 30 min at room temperature. Primary antibodies to PCNA (PC10, Thermo Fisher Scientific, Branchburg, NJ, USA), p53 (aa 211–220, clone 240, CBL 404, Merck, Darmstadt, Germany), and KMT6/EZH2 (phospho S21, ab 84989, Abcam, Cambridge, UK) were applied to detect PCNA-, p53-, and EZH2-positive cells in the tumor tissue. Each array of slides was used as the positive control; the primary antibody was omitted to achieve a negative control. The IHC reaction was revealed using polymer dextran labeled with horseradish peroxidase and conjugated to a secondary antibody (mouse) and a linker (SM 802 and SM 804, respectively; Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min at room temperature. Positive reactions were visualized using 3,3'-diaminobenzidine-containing chromogen (DAB, DM827, Dako, Glostrup, Denmark). After each stage, Tween 20 containing tris-buffered saline (DM 831, Dako, Glostrup, Denmark) was used as a wash buffer. Slides were counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany).

H-E-stained and IHC-stained slides were visualized and captured by a light microscope (BX 40F4, Olympus, Tokyo, Japan) and a digital camera (XC 30, Olympus, Tokyo, Japan) with Cell Sens Dimension 1.9 software.

Tumors stained with H-E were divided into invasive and non-invasive. The tumor invasion into the CAM was classified as destroying the chorionic epithelium (ChE) or/and the migration of tumor cells into the mesenchyme of the CAM. The non-invasive tumor was located on top of the CAM, and the integrity of the CAM chorionic epithelium was intact. The tumor invasion was studied using H-E slides at 10× and 40× magnifications.

The CAM thickening and the number of vessels were assessed by capturing the CAM stained with H-E at 4× magnification in the location under the tumor. The thickness of the CAM was measured in ten areas (μm), and the mean thickness of the CAM was calculated; blood vessels with a larger diameter than 10 μm were counted. All calculations were performed in the same length of CAM (1792 μm).

To assess the PCNA, p53, and EZH2 expression in the tumor, 2 vision fields were selected randomly (plot area—23,863.74 μm²) in the IHC-stained tumor and were captured at 40× magnification. All cells and cells positive with the studied marker were counted, and the percentage (%) of marker-positive cells in each tumor was calculated.

4.6. Gene Expression Analysis

U87 and T98G cells were treated with 3 mM NaDCA, 50 μM TMZ, and 2 mM VPA—3 mM NaDCA for 24 h. Control cell groups were cultivated in cell culture medium according to the cell line. A TRIzol Plus RNA Purification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used for total RNA extraction. Purity of total RNA and concentration were measured with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Branchburg, NJ, USA). The integrity of total RNA (RIN) was evaluated with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RNA expression was investigated for genes *SLC12A2* (Hs00169032_m1; 97 bp), *SLC12A5* (Hs00221168_m1; 80 bp), *SLC5A8* (Hs00377618_m1; 88 bp), *CDH1* (Hs01023894_m1; 61 bp), and *CDH2* (Hs00983056_m1; 66 bp). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene was used (Hs02786624_g1; 157 bp) as a reference gene. The CT cut-off value was set at 35. Following the manufacturer's instructions, total RNA reverse transcription was performed using 100 ng of RNA in a 20 μL reaction volume on a Biometra T Advanced thermal cycler (Analytik Jena AG, Jena, Germany) with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on an Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) with TaqMan assays (Applied Biosys-

tems, Pleasanton, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The reactions were run in triplicate with 4 µL of cDNA template in a reaction volume of 20 µL (TaqMan Universal Master Mix II—10 µL, no UNG (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania), TaqMan Gene Expression Assay 20x—1 µL (Applied Biosystems, Pleasanton, CA, USA), and nuclease-free water—5 µL (Invitrogen, Paisley, UK); the program was set at 95 °C for 10 min, then 45 cycles of 95 °C for 15 s, followed by 60 °C for 1 min.

4.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted and graphs generated using Graph Pad Prism 9 software (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The CT threshold cycle value was normalized to the control GAPDH for gene expression analysis, and the ΔCT value was calculated accordingly. The Livak ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) method [122] was used to calculate the expression ratio between the control and treated groups of the tested genes. The frequency of tumor invasion into the CAM is expressed as a percentage (%), and the chi-square test was used to compare the frequency of tumor invasion into the CAM between the tested groups. The Shapiro–Wilk test was used to verify the assumption of normality. Data on immunohistochemical markers, the number of vessels in the CAM, and sub-tumoral thickening of the CAM are presented as median and range (values of minimum and maximum). The difference between the two groups was evaluated using the nonparametric Mann–Whitney U test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

5. Conclusions

This study showed similarities and differences in the effects of NaDCA, VPA–NaDCA, and TMZ on growth, neo-angiogenesis, and PCNA, EZH2, and p53 expression in the tumor tissue of U87 and T98G tumors on the CAM, and that these effects were cell line dependent. The combined VPA and NaDCA components act synergistically. The effects of VPA–NaDCA and TMZ on the expression of *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* in U87 and T98G cells were cell line dependent, and the efficacy data indicate a superior effect of VPA–NaDCA compared to TMZ.

6. Patents

The combination of VPA and NaDCA products is for the treatment of cancer (Official Bulletin of the State Patent Bureau of the Republic of Lithuania, No. 6874, filing date: 17 April 2020). A European patent application has been submitted (European Patent Application No. 21168796.7, filing date: 16 April 2021).

Author Contributions: Conceptualization, D.S. and I.B.; methodology, R.S., A.V. and I.B.; software, R.S.; validation, R.S. and I.B.; formal analysis, R.S.; investigation, R.S.; resources, D.S. and I.B.; data curation, R.S.; writing—original draft preparation, R.S., D.S. and I.B.; writing—review and editing, R.S., D.S., A.V. and I.B.; visualization, R.S.; supervision, I.B.; project administration, D.S. and I.B.; funding acquisition, D.S. and I.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Research Council of Lithuania, grant number P-MIP-20-36.

Institutional Review Board Statement: No approval is required from the Ethics Committee for studies using the CAM model.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data will be made available upon request.

Acknowledgments: The authors acknowledge the Lithuanian Research Council, grant number P-MIP-20-36. The authors thank M. M. Alonso (University of Navarra, Pamplona, Spain) for her help in donating the T98G cells.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AMEM	Advanced Minimum Essential Medium for cell culture
CAM	Chick embryo chorioallantoic membrane
<i>CDH1</i>	Gene encoding the E-cadherin protein
<i>CDH2</i>	Gene encoding the N-cadherin protein
CT	Threshold cycle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium for cell culture
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDD	Day of embryo development
EZH2	Polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2
FBS	Fetal bovine serum
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GAPDH	Gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein
GBM	Glioblastoma
HDAC	Histone deacetylase
H-E	Hematoxylin and eosin
IHC	Immunohistochemistry
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
NaDCA	Sodium dichloroacetate
OS	Overall survival
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDH	Pyruvate dehydrogenase
PDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
p53	<i>TP53</i> gene-encoded p53 protein
P/S	Penicillin and streptomycin
<i>SLC12A2</i>	Gene encoding $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC1) co-transporter
<i>SLC12A5</i>	Gene encoding $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC2) co-transporter
<i>SLC5A8</i>	Gene encoding Na^+ -dependent monocarboxylate transporter
TMZ	Temozolomide
T98G	Male glioblastoma cell line
U87	U87-MG female glioblastoma cell line
VPA	Valproic acid
VPA–NaDCA	Combination of valproic acid and dichloroacetate

Appendix A

Table A1. The frequency of invasion into the CAM of U87 and T98G tumors. CAM—chick embryo chorioallantoic membrane.

Study Group	<i>n</i>	Invasion Frequency (%)
U87-control	20	80.00
U87-3 mM NaDCA	20	50.00 ^a
U87-50 μM TMZ	15	26.67 ^b
U87-2 mM VPA-3 mM NaDCA	10	20.00 ^c
T98G-control	12	83.33
T98G-3 mM NaDCA	12	58.33
T98G-50 μM TMZ	16	43.75 ^d
T98G-2 mM VPA-3 mM NaDCA	12	50.00

^a $p = 0.047$, compared with U87-control; ^b $p = 0.002$, compared with U87-control; ^c $p = 0.01$, compared with U87-control; ^d $p = 0.03$, compared with T98G-control.

Table A2. The number of blood vessels in the CAM of U87 and T98G tumors.

Study Group	<i>n</i>	No. of Vessels, Median (Range)
U87-control	20	23.5 (9–63) ^a
U87-3 mM NaDCA	20	16.5 (4–44) ^{b,c}
U87-50 µM TMZ	15	13 (2–29) ^d
U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA	10	6.5 (3–11) ^e
T98G-control	12	28 (3–45) ^f
T98G-3 mM NaDCA	12	31 (8–63) ^{g,h}
T98G-50 µM TMZ	16	12 (5–18)
T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA	12	10 (4–18) ⁱ

^a *p* = 0.0004, compared with U87-50 µM TMZ; ^b *p* = 0.02, compared with U87-control; ^c *p* = 0.002, compared with U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ^d *p* = 0.03, compared with U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ^e *p* < 0.0001, compared with U87-control; ^f *p* = 0.001, compared with T98G-50 µM TMZ; ^g *p* = 0.0006, compared with T98G-50 µM TMZ; ^h *p* = 0.001, compared with T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ⁱ *p* = 0.003, compared with T98G-control.

Table A3. The thickness of the CAM under the U87 and T98G tumors.

Study Group	<i>n</i>	CAM Thickness (µm), Median (Range)
U87-control	20	197.80 (65.21–387.90)
U87-3 mM NaDCA	20	115.00 (46.61–276.30) ^a
U87-50 µM TMZ	15	120.20 (44.47–393.90)
U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA	10	113.10 (64.25–317.10)
T98G-control	12	248.10 (60.11–968.20)
T98G-3 mM NaDCA	12	292.00 (52.46–508.60)
T98G-50 µM TMZ	16	219.60 (48.73–776.00)
T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA	12	171.70 (48.26–518.70) ^b

^a *p* = 0.02, compared with U87-control; ^b *p* = 0.04, compared with T98G-control.

Table A4. The PCNA-positive cell percentage in U87 and T98G tumors. PCNA—proliferating cell nuclear antigen.

Study Group	<i>n</i>	PCNA-Positive Cells (%), Median (Range)
U87-control	13	72.12 (15.44–92.73)
U87-3 mM NaDCA	18	51.95 (6.67–91.67)
U87-50 µM TMZ	8	20.89 (10.59–32.13) ^{a,b}
U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA	10	69.71 (6.73–87.18) ^c
T98G-control	9	68.95 (16.41–98.04)
T98G-3 mM NaDCA	10	66.03 (35.43–100.0)
T98G-50 µM TMZ	6	9.43 (3.17–12.77) ^{d,e,f}
T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA	8	23.63 (7.34–80.75) ^{g,h}

^a *p* = 0.001, compared with U87-3 mM NaDCA; ^b *p* = 0.0009, compared with U87-control; ^c *p* = 0.02, compared with U87-50 µM TMZ; ^d *p* = 0.0004, compared with T98G-control; ^e *p* = 0.0002, compared with T98G-3 mM NaDCA; ^f *p* = 0.03, compared with T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ^g *p* = 0.01, compared with T98G-control; ^h *p* = 0.003, compared with T98G-3 mM NaDCA.

Table A5. The percentage of p53-positive cells in U87 and T98G tumors. p53—TP53 gene-encoded p53 protein.

Study Group	<i>n</i>	p53-Positive Cells (%), MEDIAN (Range)
U87-control	15	63.58 (1.81–83.44)
U87-3 mM NaDCA	20	57.04 (27.48–84.39)
U87-50 µM TMZ	7	13.07 (10.40–23.17) ^{a,b}
U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA	10	50.70 (11.41–88.89) ^c
T98G-control	9	84.52 (47.57–94.23)
T98G-3 mM NaDCA	11	82.42 (12.75–95.21)
T98G-50 µM TMZ	7	50.53 (34.09–83.38) ^d
T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA	8	64.21 (25.29–94.59)

^a *p* < 0.0001, compared with U87-3 mM NaDCA; ^b *p* = 0.009, compared with U87-control; ^c *p* = 0.01, compared with U87-50 µM TMZ; ^d *p* = 0.02, compared with T98G-control.

Table A6. The percentage of EZH2-positive cells in U87 and T98G tumors. EZH2—polycomb Inhibitory Complex Catalytic Subunit 2.

Study Group	<i>n</i>	EZH2-Positive Cells (%), Median (Range)
U87-control	17	69.57 (5.34–94.06)
U87-3 mM NaDCA	19	47.23 (26.98–85.05)
U87-50 μM TMZ	8	12.55 (2.84–68.12) ^{a,b}
U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA	10	55.07 (14.62–87.96) ^c
T98G-control	9	66.47 (25.74–97.65) ^d
T98G-3 mM NaDCA	11	73.59 (18.90–97.35) ^{d,e}
T98G-50 μM TMZ	7	2.02 (1.31–9.59) ^f
T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA	9	2.60 (0.98–92.23)

^a *p* = 0.002, compared with U87-control; ^b *p* = 0.003, compared with U87-3 mM NaDCA; ^c *p* = 0.02, compared with U87-50 μM TMZ; ^d *p* = 0.04, compared with T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ^e *p* < 0.0001, compared with T98G-50 μM TMZ; ^f *p* = 0.0002, compared with T98G-control.

Table A7. The *SLC12A2* and *GAPDH* expression data from U87 and T98G tested cells. *SLC12A2*—gene encoding Na⁺-K⁺-2Cl[−] (NKCC1) co-transporter; *GAPDH*—gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein.

Study Groups	<i>n</i>	Indicator, Mean ± SD				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 [−] ΔΔCT
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-control	6	22.07 ± 1.23	18.14 ± 1.41	3.93 ± 0.64		
U87-3 mM NaDCA	6	23.13 ± 0.33	18.92 ± 1.51	4.21 ± 1.22	0.29	0.82
U87-50 μM TMZ	6	21.67 ± 0.18	17.21 ± 0.19	4.46 ± 0.30 ^a	0.53	0.69
U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA	6	22.71 ± 0.31	18.85 ± 0.20	3.86 ± 0.27	−0.07	1.05
T98G-control	6	21.63 ± 0.60	19.87 ± 0.23	1.76 ± 0.60 ^b		
T98G-3 mM NaDCA	6	22.01 ± 0.65	18.78 ± 0.63	3.23 ± 0.15 ^c	1.47	0.36
T98G-50 μM TMZ	6	22.84 ± 0.80	21.18 ± 1.16	1.66 ± 0.40 ^{d,e}	−0.10	1.07
T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA	6	20.99 ± 0.49	18.35 ± 0.24	2.64 ± 0.58 ^f	0.88	0.54

^a *p* = 0.004, compared with U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ^b *p* = 0.002, compared with U87-control; ^c *p* = 0.002, compared with T98G-control; ^d *p* = 0.002, compared with T98G-3 mM NaDCA; ^e *p* = 0.009, compared with T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ^f *p* = 0.03, compared with T98G-control.

Table A8. *SLC12A5* and *GAPDH* expression data from U87 and T98G cell control and treated groups. *SLC12A5*—gene encoding K⁺-Cl[−] (KCC2) co-transporter.

Study Groups	<i>n</i>	Indicator, Mean ± SD				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 [−] ΔΔCT
		<i>SLC12A5</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-control	6	33.79 ± 1.21	16.25 ± 0.26	17.54 ± 1.07 ^a		
U87-3 mM NaDCA	6	33.93 ± 1.55	16.70 ± 0.66	17.23 ± 0.98 ^a	−0.31	1.55
U87-50 μM TMZ	6	32.41 ± 0.15	15.21 ± 0.16	17.20 ± 0.25 ^b	−0.33	1.28
U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA	6	31.42 ± 0.22	16.31 ± 0.89	15.12 ± 0.87	−2.42	6.79
T98G-control	6	37.31 ± 0.46	17.41 ± 0.22	−		
T98G-3 mM NaDCA	6	37.14 ± 0.24	16.63 ± 0.63	−	−	−
T98G-50 μM TMZ	6	37.53 ± 0.05	19.16 ± 2.39	−	−	−
T98G-2 mM VPA–3 mM NaDCA	6	33.50 ± 0.36	16.80 ± 2.00	16.70 ± 2.12	−	−

^a *p* = 0.004, compared with U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA; ^b *p* = 0.002, compared with U87-2 mM VPA–3 mM NaDCA.

Table A9. *CDH2* and *GAPDH* expression data from U87 and T98G cell control and treated groups. *CDH2*—gene encoding the N-cadherin protein.

Study Groups	n	Indicator, Mean $\pm$ SD				
		CT		Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2-\Delta\Delta$ CT
		<i>CDH2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-control	6	23.83 $\pm$ 0.72	18.14 $\pm$ 1.41	5.68 $\pm$ 1.26 ^a		
U87-3 mM NaDCA	6	23.53 $\pm$ 0.82	18.92 $\pm$ 1.51	4.62 $\pm$ 0.71	−1.07	2.09
U87-50 μ M TMZ	6	22.52 $\pm$ 0.13	17.21 $\pm$ 0.19	5.32 $\pm$ 0.28	−0.37	1.29
U87-2 mM VPA-3 mM NaDCA	6	23.88 $\pm$ 0.28	18.85 $\pm$ 0.20	5.03 $\pm$ 0.31	−0.66	1.58
T98G-control	6	23.64 $\pm$ 0.22	19.87 $\pm$ 0.23	3.78 $\pm$ 0.30		
T98G-3 mM NaDCA	6	24.29 $\pm$ 0.59	18.78 $\pm$ 0.63	5.51 $\pm$ 0.20 ^{a,b}	1.73	0.30
T98G-50 μ M TMZ	6	24.31 $\pm$ 0.46	21.18 $\pm$ 1.16	3.13 $\pm$ 0.75	−0.65	1.57
T98G-2 mM VPA-3 mM NaDCA	6	23.13 $\pm$ 0.45	18.35 $\pm$ 0.24	4.77 $\pm$ 0.32 ^{a,b,c}	1.00	0.50

^a $p = 0.002$, compared with T98G-control; ^b $p = 0.002$, compared with T98G-50 μ M TMZ; ^c $p = 0.004$, compared with T98G-3 mM NaDCA.

References

- Park, C.M.; Park, M.J.; Kwak, H.J.; Moon, S.I.; Yoo, D.H.; Lee, H.C.; Park, I.C.; Rhee, C.H.; Hong, S.I. Induction of P53-Mediated Apoptosis and Recovery of Chemosensitivity through P53 Transduction in Human Glioblastoma Cells by Cisplatin. *Int. J. Oncol.* **2006**, *28*, 119–125. [CrossRef] [PubMed]
- Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Gittleman, H.; Patil, N.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* **2019**, *21*, v1–v100. [CrossRef] [PubMed]
- Ostrom, Q.T.; Price, M.; Neff, C.; Cioffi, G.; Waite, K.A.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro Oncol.* **2022**, *24*, v1–v95. [CrossRef] [PubMed]
- Gittleman, H.; Ostrom, Q.T.; Stetson, L.C.; Waite, K.; Hodges, T.R.; Wright, C.H.; Wright, J.; Rubin, J.B.; Berens, M.E.; Lathia, J.; et al. Sex Is an Important Prognostic Factor for Glioblastoma but Not for Nonglioblastoma. *Neurooncol. Pract.* **2019**, *6*, 451–462. [CrossRef] [PubMed]
- Goldman, D.A.; Hovinga, K.; Reiner, A.S.; Esquenazi, Y.; Tabar, V.; Panageas, K.S. The Relationship between Repeat Resection and Overall Survival in Patients with Glioblastoma: A Time-Dependent Analysis. *J. Neurosurg.* **2018**, *129*, 1231–1239. [CrossRef] [PubMed]
- Stupp, R.; Hegi, M.E.; Gilbert, M.R.; Chakravarti, A. Chemoradiotherapy in Malignant Glioma: Standard of Care and Future Directions. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 4127–4136. [CrossRef] [PubMed]
- Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [CrossRef] [PubMed]
- Stupp, R.; Brada, M.; van den Bent, M.J.; Tonn, J.C.; Pentheroudakis, G. High-Grade Glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, III93–III101. [CrossRef] [PubMed]
- Krex, D.; Klink, B.; Hartmann, C.; Von Deimling, A.; Pietsch, T.; Simon, M.; Sabel, M.; Steinbach, J.P.; Heese, O.; Reifenberger, G.; et al. Long-Term Survival with Glioblastoma Multiforme. *Brain* **2007**, *130*, 2596–2606. [CrossRef] [PubMed]
- Johnson, D.R.; O'Neill, B.P. Glioblastoma Survival in the United States before and during the Temozolomide Era. *J. Neurooncol.* **2012**, *107*, 359–364. [CrossRef] [PubMed]
- Nagpal, M.; Singh, S.; Singh, P.; Chauhan, P.; Zaidi, M. Tumor Markers: A Diagnostic Tool. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* **2016**, *7*, 17–20. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, R.; Smith-Cohn, M.; Cohen, A.L.; Colman, H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 284–297. [CrossRef] [PubMed]
- Larrieu, C.M.; Storevik, S.; Guyon, J.; Pagano Zottola, A.C.; Bouchez, C.L.; Derieppe, M.A.; Tan, T.Z.; Miletic, H.; Lorens, J.; Tronstad, K.J.; et al. Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development. *Cancers* **2022**, *14*, 3769. [CrossRef] [PubMed]
- Sutendra, G.; Michelakis, E.D. Pyruvate Dehydrogenase Kinase as a Novel Therapeutic Target in Oncology. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 38. [CrossRef] [PubMed]
- Chinopoulos, C.; Seyfried, T.N. Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN Neuro.* **2018**, *10*, 1759091418818261. [CrossRef] [PubMed]

16. Shen, H.; Yu, M.; Tsoli, M.; Chang, C.; Joshi, S.; Liu, J.; Ryall, S.; Chornenkyy, Y.; Siddaway, R.; Hawkins, C.; et al. Targeting Reduced Mitochondrial DNA Quantity as a Therapeutic Approach in Pediatric High-Grade Gliomas. *Neuro Oncol.* **2020**, *22*, 139–151. [CrossRef] [PubMed]
17. Cardoso, A.M.S.; Sousa, M.; Morais, C.M.; Oancea-Castillo, L.R.; Régnier-Vigouroux, A.; Rebelo, O.; Tão, H.; Barbosa, M.; Pedroso, M.C.D.L.; Jurado, A.S. MiR-144 Overexpression as a Promising Therapeutic Strategy to Overcome Glioblastoma Cell Invasiveness and Resistance to Chemotherapy. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 2738–2751. [CrossRef] [PubMed]
18. Wicks, R.T.; Azadi, J.; Mangraviti, A.; Zhang, I.; Hwang, L.; Joshi, A.; Bow, H.; Hutt-Cabezas, M.; Martin, K.L.; Rudek, M.A.; et al. Local Delivery of Cancer-Cell Glycolytic Inhibitors in High-Grade Glioma. *Neuro Oncol.* **2015**, *17*, 70–80. [CrossRef] [PubMed]
19. Li, C.; Meng, G.; Su, L.; Chen, A.; Xia, M.; Xu, C.; Yu, D.; Jiang, A.; Wei, J. Dichloroacetate Blocks Aerobic Glycolytic Adaptation to Attenuated Measles Virus and Promotes Viral Replication Leading to Enhanced Oncolysis in Glioblastoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 1544–1555. [CrossRef] [PubMed]
20. Shen, H.; Hau, E.; Joshi, S.; Dilda, P.J.; McDonald, K.L. Sensitization of Glioblastoma Cells to Irradiation by Modulating the Glucose Metabolism. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1794–1804. [CrossRef] [PubMed]
21. Kumar, K.; Wigfield, S.; Gee, H.E.; Devlin, C.M.; Singleton, D.; Li, J.L.; Buffa, F.; Huffman, M.; Sinn, A.L.; Silver, J.; et al. Dichloroacetate Reverses the Hypoxic Adaptation to Bevacizumab and Enhances Its Antitumor Effects in Mouse Xenografts. *J. Mol. Med.* **2013**, *91*, 749–758. [CrossRef] [PubMed]
22. Tataranni, T.; Piccoli, C. Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 8201079. [CrossRef] [PubMed]
23. Elsherbiny, N.M.; Ahmed, E.; Kader, G.A.; Abdel-mottaleb, Y.; ElSayed, M.H.; Youssef, A.M.; Zaitone, S.A. Inhibitory Effect of Valproate Sodium on Pain Behavior in Diabetic Mice Involves Suppression of Spinal Histone Deacetylase 1 and Inflammatory Mediators. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *70*, 16–27. [CrossRef] [PubMed]
24. Wadia, R.J.; Stolar, M.; Grens, C.; Ehrlich, B.E.; Chao, H.H. The Prevention of Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy by Concurrent Treatment with Drugs Used for Bipolar Disease: A Retrospective Chart Analysis in Human Cancer Patients. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7322–7331. [CrossRef] [PubMed]
25. Um, J.H.; Yun, J. Emerging Role of Mitophagy in Human Diseases and Physiology. *BMB Rep.* **2017**, *50*, 299–307. [CrossRef] [PubMed]
26. Gaffke, L.; Firy, N.; Rintz, E.; Pierzynowska, K.; Piotrowska, E.; Mazur-Marzec, H.; Węgrzyn, G. Therapeutic Potential of Lithium Chloride and Valproic Acid against Neuronopathic Types of Mucopolysaccharidoses through Induction of the Autophagy Process. *Arch. Biochem. Biophys.* **2023**, *747*, 109754. [CrossRef] [PubMed]
27. Santoro, F.; Botrugno, O.A.; Dal Zuffo, R.; Pallavicini, I.; Matthews, G.M.; Cluse, L.; Barozzi, I.; Senese, S.; Fornasari, L.; Moretti, S.; et al. A Dual Role for Hdac1: Oncosuppressor in Tumorigenesis, Oncogene in Tumor Maintenance. *Blood* **2013**, *121*, 3459–3468. [CrossRef] [PubMed]
28. Stakisaitis, D.; Kapočius, L.; Valančiūtė, A.; Balnyte, I.; Tamošaitis, T.; Vaitkevičius, A.; Sužiedelis, K.; Urboniene, D.; Tatarūnas, V.; Kilimaite, E.; et al. SARS-CoV-2 Infection, Sex-Related Differences, and a Possible Personalized Treatment Approach with Valproic Acid: A Review. *Biomedicines* **2022**, *10*, 962. [CrossRef] [PubMed]
29. Bezcny, P. Histone Deacetylase Inhibitors in Glioblastoma: Pre-Clinical and Clinical Experience. *Med. Oncol.* **2014**, *31*, 985. [CrossRef] [PubMed]
30. Yelton, C.J.; Ray, S.K. Histone Deacetylase Enzymes and Selective Histone Deacetylase Inhibitors for Antitumor Effects and Enhancement of Antitumor Immunity in Glioblastoma. *Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2018**, *5*, 46. [CrossRef] [PubMed]
31. Babu, E.; Ramachandran, S.; Coothankandaswamy, V.; Elangovan, S.; Prasad, P.D.; Ganapathy, V.; Thangaraju, M. Role of SLC5A8, a Plasma Membrane Transporter and a Tumor Suppressor, in the Antitumor Activity of Dichloroacetate. *Oncogene* **2011**, *30*, 4026–4037. [CrossRef] [PubMed]
32. Veronezi, G.M.B.; Felisbino, M.B.; Gatti, M.S.V.; Mello, M.L.S.; De Vidal, B.C. DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis, Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170740. [CrossRef] [PubMed]
33. Singh, N.; Miner, A.; Hennis, L.; Mittal, S. Mechanisms of Temozolomide Resistance in Glioblastoma—A Comprehensive Review. *Cancer Drug Resist.* **2021**, *4*, 17–43. [CrossRef] [PubMed]
34. Han, W.; Guan, W. Valproic Acid: A Promising Therapeutic Agent in Glioma Treatment. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 687362. [CrossRef] [PubMed]
35. Chang, C.Y.; Li, J.R.; Wu, C.C.; Ou, Y.C.; Chen, W.Y.; Kuan, Y.H.; Wang, W.Y.; Chen, C.J. Valproic Acid Sensitizes Human Glioma Cells to Gefitinib-Induced Autophagy. *IUBMB Life* **2015**, *67*, 869–879. [CrossRef] [PubMed]
36. Fang, E.; Wang, J.; Hong, M.; Zheng, L.; Tong, Q. Valproic Acid Suppresses Warburg Effect and Tumor Progression in Neuroblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *508*, 9–16. [CrossRef] [PubMed]
37. Nóbrega, A.H.L.; Pimentel, R.S.; Prado, A.P.; Garcia, J.; Frozza, R.L.; Bernardi, A. Neuroinflammation in Glioblastoma: The Role of the Microenvironment in Tumour Progression. *Curr. Cancer Drug Targets* **2024**, *24*, 579–594. [CrossRef] [PubMed]

38. Certo, M.; Tsai, C.H.; Pucino, V.; Ho, P.C.; Mauro, C. Lactate Modulation of Immune Responses in Inflammatory versus Tumour Microenvironments. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 151–161. [CrossRef] [PubMed]
39. DeCordova, S.; Shastri, A.; Tsolaki, A.G.; Yasmin, H.; Klein, L.; Singh, S.K.; Kishore, U. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1402. [CrossRef] [PubMed]
40. Abdel-Razek, E.A.N.; Mahmoud, H.M.; Azouz, A.A. Management of Ulcerative Colitis by Dichloroacetate: Impact on NFATC1/NLRP3/IL1B Signaling Based on Bioinformatics Analysis Combined with in Vivo Experimental Verification. *Inflammopharmacology* **2024**, *32*, 667–682. [CrossRef] [PubMed]
41. Amirzargar, M.A.; Yaghubi, F.; Hosseiniapanah, M.; Jafari, M.; Pourjafar, M.; Rezaeepoor, M.; Rezaei, H.; Roshanaei, G.; Hajilooi, M.; Solgi, G. Anti-Inflammatory Effects of Valproic Acid in a Rat Model of Renal Ischemia/Reperfusion Injury: Alteration in Cytokine Profile. *Inflammation* **2017**, *40*, 1310–1318. [CrossRef] [PubMed]
42. Silva, M.F.B.; Aires, C.C.P.; Luis, P.B.M.; Ruiter, J.P.N.; IJlst, L.; Duran, M.; Wanders, R.J.A.; Tavares de Almeida, I. Valproic Acid Metabolism and Its Effects on Mitochondrial Fatty Acid Oxidation: A Review. *J. Inher. Metab. Dis.* **2008**, *31*, 205–216. [CrossRef] [PubMed]
43. Stakišaitis, D.; Kapočius, L.; Kilimaitė, E.; Gečys, D.; Šlekiene, L.; Balnytė, I.; Palubinskienė, J.; Lesauskaitė, V. Preclinical Study in Mouse Thymus and Thymocytes: Effects of Treatment with a Combination of Sodium Dichloroacetate and Sodium Valproate on Infectious Inflammation Pathways. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2715. [CrossRef] [PubMed]
44. Gaca-Tabaszewska, M.; Bogusiewicz, J.; Bojko, B. Metabolomic and Lipidomic Profiling of Gliomas—A New Direction in Personalized Therapies. *Cancers* **2022**, *14*, 5041. [CrossRef] [PubMed]
45. Medikonda, R.; Dunn, G.; Rahman, M.; Fecci, P.; Lim, M. A Review of Glioblastoma Immunotherapy. *J. Neurooncol.* **2021**, *151*, 41–53. [CrossRef] [PubMed]
46. Lee, S.Y. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme. *Genes. Dis.* **2016**, *3*, 198–210. [CrossRef] [PubMed]
47. Arora, A.; Somasundaram, K. Glioblastoma vs. Temozolomide: Can the Red Queen Race Be Won? *Cancer Biol. Ther.* **2019**, *20*, 1083–1090. [CrossRef] [PubMed]
48. Kohl, C.; Aung, T.; Haerteis, S.; Ignatov, A.; Ortmann, O.; Papathelemis, T. The 3D in Vivo Chorioallantoic Membrane Model and Its Role in Breast Cancer Research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2022**, *148*, 1033–1043. [CrossRef] [PubMed]
49. DeBord, L.C.; Pathak, R.R.; Villaneuva, M.; Liu, H.-C.; Harrington, D.A.; Yu, W.; Lewis, M.T.; Sikora, A.G. The Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) as a Versatile Patient-Derived Xenograft (PDX) Platform for Precision Medicine and Preclinical Research. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 1642–1660. [PubMed]
50. Wick, W.; Platten, M. Understanding and Targeting Alkylator Resistance in Glioblastoma. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 1120–1122. [CrossRef] [PubMed]
51. Stacpoole, P.W. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2017**, *109*, djx071. [CrossRef] [PubMed]
52. Niewisch, M.R.; Kuçi, Z.; Wolburg, H.; Sautter, M.; Krampen, L.; Deubzer, B.; Handgretinger, R.; Bruchelt, G. Influence of Dichloroacetate (DCA) on Lactate Production and Oxygen Consumption in Neuroblastoma Cells: Is DCA a Suitable Drug for Neuroblastoma Therapy? *Cell. Physiol. Biochem.* **2012**, *29*, 373–380. [CrossRef] [PubMed]
53. Michelakis, E.D.; Sutendra, G.; Dromparis, P.; Webster, L.; Haromy, A.; Niven, E.; Maguire, C.; Gammer, T.L.; Mackey, J.R.; Fulton, D.; et al. Metabolic Modulation of Glioblastoma with Dichloroacetate. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*, 31ra34. [CrossRef] [PubMed]
54. Velpula, K.K.; Tsung, A.J. PDK1: A New Therapeutic Target for Glioblastoma? *CNS Oncol.* **2014**, *3*, 177–179. [CrossRef] [PubMed]
55. Velpula, K.K.; Guda, M.R.; Sahu, K.; Tuszyński, J.; Asuthkar, S.; Bach, S.E.; Lathia, J.D.; Tsung, A.J. Metabolic Targeting of EGFRvIII/PDK1 Axis in Temozolomide Resistant Glioblastoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 35639–35655. [CrossRef] [PubMed]
56. Bennett, R.L.; Licht, J.D. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *58*, 187–207. [CrossRef] [PubMed]
57. Thotala, D.; Karvas, R.M.; Engelbach, J.A.; Garbow, J.R.; Hallahan, A.N.; DeWees, T.A.; Laszlo, A.; Hallahan, D.E. Valproic Acid Enhances the Efficacy of Radiation Therapy by Protecting Normal Hippocampal Neurons and Sensitizing Malignant Glioblastoma Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35004–35022. [CrossRef] [PubMed]
58. Lu, V.M.; Texakalidis, P.; McDonald, K.L.; Mekary, R.A.; Smith, T.R. The Survival Effect of Valproic Acid in Glioblastoma and Its Current Trend: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2018**, *174*, 149–155. [CrossRef] [PubMed]
59. Kresbach, C.; Bronsema, A.; Guerreiro, H.; Rutkowski, S.; Schüller, U.; Winkler, B. Long-Term Survival of an Adolescent Glioblastoma Patient under Treatment with Vinblastine and Valproic Acid Illustrates Importance of Methylation Profiling. *Child's Nerv. Syst.* **2022**, *38*, 479–483. [CrossRef] [PubMed]
60. Zhou, Y.; Xu, Y.; Wang, H.; Niu, J.; Hou, H.; Jiang, Y. Histone Deacetylase Inhibitor, Valproic Acid, Radiosensitizes the C6 Glioma Cell Line in Vitro. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 203–208. [CrossRef] [PubMed]
61. Lv, Q.; Zhang, J.; Yi, Y.; Huang, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhang, W. Proliferating Cell Nuclear Antigen Has an Association with Prognosis and Risks Factors of Cancer Patients: A Systematic Review. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 6209–6217. [CrossRef] [PubMed]

62. Li, Z.; Guo, M.; Gu, M.; Cai, Z.; Wu, Q.; Yu, J.; Tang, M.; He, C.; Wang, Y.; Sun, P.; et al. Design and Synthesis of 7-Oxabicyclo [2.2.1] Heptane-2,3-Dicarboxylic Acid Derivatives as PP5 Inhibitors To Reverse Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 15691–15710. [CrossRef] [PubMed]
63. Damanskienė, E.; Balnytė, I.; Valančiūtė, A.; Lesauskaitė, V.; Alonso, M.M.; Stakišaitis, D. The Comparative Experimental Study of Sodium and Magnesium Dichloroacetate Effects on Pediatric PBT24 and SF8628 Cell Glioblastoma Tumors Using a Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model and on Cells In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10455. [CrossRef] [PubMed]
64. Tsai, C.Y.; Ko, H.J.; Chiou, S.J.; Lai, Y.L.; Hou, C.C.; Javaria, T.; Huang, Z.Y.; Cheng, T.S.; Hsu, T.I.; Chuang, J.Y.; et al. Nbm-Bmx, an Hdac8 Inhibitor, Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme by Downregulating the β -Catenin/c-Myc/Sox2 Pathway and Upregulating P53-Mediated Mgmt Inhibition. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5907. [CrossRef] [PubMed]
65. AghaAmiri, S.; Ghosh, S.C.; Hernandez Vargas, S.; Halperin, D.M.; Azhdarinia, A. Somatostatin Receptor Subtype-2 Targeting System for Specific Delivery of Temozolomide. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 2425–2437. [CrossRef] [PubMed]
66. Gilbert, M.R.; Wang, M.; Aldape, K.D.; Stupp, R.; Hegi, M.E.; Jaeckle, K.A.; Armstrong, T.S.; Wefel, J.S.; Won, M.; Blumenthal, D.T.; et al. Dose-Dense Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 4085–4091. [CrossRef] [PubMed]
67. Le Rhun, E.; Preusser, M.; Roth, P.; Reardon, D.A.; van den Bent, M.; Wen, P.; Reifenberger, G.; Weller, M. Molecular Targeted Therapy of Glioblastoma. *Cancer Treat Rev* **2019**, *80*. [CrossRef] [PubMed]
68. Osanai, T.; Takagi, Y.; Toriya, Y.; Nakagawa, T.; Aruga, T.; Iida, S.; Uetake, H.; Sugihara, K. Inverse Correlation between the Expression of O6-Methylguanine-DNA Methyl Transferase (MGMT) and P53 in Breast Cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2005**, *35*, 121–125. [CrossRef] [PubMed]
69. Yamagishi, M.; Uchimar, K. Targeting EZH2 in Cancer Therapy. *Curr. Opin. Oncol.* **2017**, *29*, 375–381. [CrossRef] [PubMed]
70. El Baba, R.; Pasquereau, S.; Haidar Ahmad, S.; Monnien, F.; Abad, M.; Bibeau, F.; Herbein, G. EZH2-Myc Driven Glioblastoma Elicited by Cytomegalovirus Infection of Human Astrocytes. *Oncogene* **2023**, *42*, 2031–2045. [CrossRef] [PubMed]
71. Kim, K.H.; Roberts, C.W.M. Targeting EZH2 in Cancer. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 128–134. [CrossRef] [PubMed]
72. Helin, K.; Dhanak, D. Chromatin Proteins and Modifications as Drug Targets. *Nature* **2013**, *502*, 480–488. [CrossRef] [PubMed]
73. Kavaliauskaitė, D.; Stakišaitis, D.; Martinkute, J.; Šlekiene, L.; Kazlauskas, A.; Balnytė, I.; Lesauskaitė, V.; Valančiūtė, A. The Effect of Sodium Valproate on the Glioblastoma U87 Cell Line Tumor Development on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and on EZH2 and P53 Expression. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 6326053. [CrossRef] [PubMed]
74. Böhm, J.; Muenzner, J.K.; Caliskan, A.; Ndreshkjana, B.; Erlenbach-Wünsch, K.; Merkel, S.; Croner, R.; Rau, T.T.; Geppert, C.I.; Hartmann, A.; et al. Loss of Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) at Tumor Invasion Front Is Correlated with Higher Aggressiveness in Colorectal Cancer Cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2019**, *145*, 2227–2240. [CrossRef] [PubMed]
75. Zhang, Y.; Yu, X.; Chen, L.; Zhang, Z.; Feng, S. EZH2 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Glioma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 565–573. [CrossRef] [PubMed]
76. Paskeh, M.D.A.; Mehrabi, A.; Gholami, M.H.; Zabolian, A.; Ranjbar, E.; Saleki, H.; Ranjbar, A.; Hashemi, M.; Ertas, Y.N.; Hushmandi, K.; et al. EZH2 as a New Therapeutic Target in Brain Tumors: Molecular Landscape, Therapeutic Targeting and Future Prospects. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146*, 112532. [CrossRef] [PubMed]
77. Yang, X.; Wang, Q.; Cao, E. Structure of the Human Cation–Chloride Cotransporter NKCC1 Determined by Single-Particle Electron Cryo-Microscopy. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1016. [CrossRef] [PubMed]
78. Gong, Y.; Wu, M.; Shen, J.; Tang, J.; Li, J.; Xu, J.; Dang, B.; Chen, G. Inhibition of the NKCC1/NF-KB Signaling Pathway Decreases Inflammation and Improves Brain Edema and Nerve Cell Apoptosis in an SBI Rat Model. *Front. Mol. Neurosci.* **2021**, *14*, 641993. [CrossRef] [PubMed]
79. Cong, D.; Zhu, W.; Kuo, J.S.; Hu, S.; Sun, D. Ion Transporters in Brain Tumors. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1171–1181. [CrossRef] [PubMed]
80. Sun, H.; Long, S.; Wu, B.; Liu, J.; Li, G. NKCC1 Involvement in the Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is a Prognostic Biomarker in Gliomas. *PeerJ* **2020**, *8*, e8787. [CrossRef] [PubMed]
81. Sun, P.L.; Jin, Y.; Park, S.Y.; Kim, H.; Park, E.; Jheon, S.; Kim, K.; Lee, C.T.; Chung, J.H. Expression of Na⁺-K⁺-2Cl[−] Cotransporter Isoform 1 (NKCC1) Predicts Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma and EGFR-Mutated Adenocarcinoma Patients. *QJM Int. J. Med.* **2016**, *109*, 237–244. [CrossRef] [PubMed]
82. Hiraoka, K.; Miyazaki, H.; Niisato, N.; Iwasaki, Y.; Kawachi, A.; Miki, T.; Marunaka, Y. Chloride Ion Modulates Cell Proliferation of Human Androgen-Independent Prostatic Cancer Cell. *Cell. Physiol. Biochem.* **2010**, *25*, 379–388. [CrossRef] [PubMed]
83. Tanaka, S.; Miyazaki, H.; Shiozaki, A.; Ichikawa, D.; Otsuji, E.; Marunaka, Y. Cytosolic Cl[−] Affects the Anticancer Activity of Paclitaxel in the Gastric Cancer Cell Line, MKN28 Cell. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 68–80. [CrossRef] [PubMed]
84. Damanskienė, E.; Balnytė, I.; Valančiūtė, A.; Alonso, M.M.; Preikšaitis, A.; Stakišaitis, D. The Different Temozolomide Effects on Tumorigenesis Mechanisms of Pediatric Glioblastoma PBT24 and SF8628 Cell Tumor in CAM Model and on Cells In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2001. [CrossRef] [PubMed]

85. East, M.P.; Laitinen, T.; Asquith, C.R.M. WNK Kinases: An Untapped Opportunity to Modulate Ion Transport. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 828. [CrossRef] [PubMed]
86. Zhu, W.; Begum, G.; Pointer, K.; Clark, P.A.; Yang, S.S.; Lin, S.H.; Kahle, K.T.; Kuo, J.S.; Sun, D. WNK1-OSR1 Kinase-Mediated Phospho-Activation of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Cotransporter Facilitates Glioma Migration. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 31. [CrossRef] [PubMed]
87. Haas, B.R.; Sontheimer, H. Inhibition of the Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter Isoform-1 Reduces Glioma Invasion. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5597–5606. [CrossRef] [PubMed]
88. Pozzi, D.; Chini, B. Quest for Pharmacological Regulators of KCC2. In *Neuronal Chloride Transporters in Health and Disease*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 709–727. [CrossRef]
89. McMoneagle, E.; Zhou, J.; Zhang, S.; Huang, W.; Josiah, S.S.; Ding, K.; Wang, Y.; Zhang, J. Neuronal $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ Cotransporter KCC2 as a Promising Drug Target for Epilepsy Treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* **2024**, *45*, 1–22. [CrossRef] [PubMed]
90. Liu, J.Y.; Dai, Y.B.; Li, X.; Cao, K.; Xie, D.; Tong, Z.T.; Long, Z.; Xiao, H.; Chen, M.K.; Ye, Y.L.; et al. Solute Carrier Family 12 Member 5 Promotes Tumor Invasion/Metastasis of Bladder Urothelial Carcinoma by Enhancing NF-KB/MMP-7 Signaling Pathway. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2691. [CrossRef] [PubMed]
91. Chen, J.; Wang, H.; Deng, C.; Fei, M. SLC12A5 as a Novel Potential Biomarker of Glioblastoma Multiforme. *Mol. Biol. Rep.* **2023**, *50*, 4285–4299. [CrossRef] [PubMed]
92. Juknevičienė, M.; Balnytė, I.; Valančiūtė, A.; Alonso, M.M.; Preikšaitis, A.; Sužiedėlis, K.; Stakišaitis, D. Differential Impact of Valproic Acid on SLC5A8, SLC12A2, SLC12A5, CDH1, and CDH2 Expression in Adult Glioblastoma Cells. *Biomedicines* **2024**, *12*, 1416. [CrossRef] [PubMed]
93. Aronica, E.; Boer, K.; Redeker, S.; Spliet, W.G.M.; van Rijen, P.C.; Troost, D.; Gorter, J.A. Differential Expression Patterns of Chloride Transporters, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter and $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransporter, in Epilepsy-Associated Malformations of Cortical Development. *Neuroscience* **2007**, *145*, 185–196. [CrossRef] [PubMed]
94. Di Cristo, G.; Awad, P.N.; Hamidi, S.; Avoli, M. KCC2, Epileptiform Synchronization, and Epileptic Disorders. *Prog. Neurobiol.* **2018**, *162*, 1–16. [CrossRef] [PubMed]
95. Conti, L.; Palma, E.; Roseti, C.; Lauro, C.; Cipriani, R.; De Groot, M.; Aronica, E.; Limatola, C. Anomalous Levels of Cl^- Transporters Cause a Decrease of GABAergic Inhibition in Human Peritumoral Epileptic Cortex. *Epilepsia* **2011**, *52*, 1635–1644. [CrossRef] [PubMed]
96. MacKenzie, G.; O'Toole, K.K.; Maguire, J. Compromised GABAergic Inhibition Contributes to Tumor-Associated Epilepsy. *Epilepsy Res.* **2016**, *126*, 185–196. [CrossRef] [PubMed]
97. Gyimesi, G.; Pujol-Giménez, J.; Kanai, Y.; Hediger, M.A. Sodium-Coupled Glucose Transport, the SLC5 Family, and Therapeutically Relevant Inhibitors: From Molecular Discovery to Clinical Application. *Pflug. Arch.* **2020**, *472*, 1177–1206. [CrossRef] [PubMed]
98. Hong, C.; Maunakea, A.; Jun, P.; Bollen, A.W.; Hodgson, J.G.; Goldenberg, D.D.; Weiss, W.A.; Costello, J.F. Shared Epigenetic Mechanisms in Human and Mouse Gliomas Inactivate Expression of the Growth Suppressor SLC5A8. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3617–3623. [CrossRef] [PubMed]
99. Kaji, I.; Iwanaga, T.; Watanabe, M.; Guth, P.H.; Engel, E.; Kaunitz, J.D.; Akiba, Y. SCFA Transport in Rat Duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2015**, *308*, G188–G197. [CrossRef] [PubMed]
100. Thangaraju, M.; Ananth, S.; Martin, P.M.; Roon, P.; Smith, S.B.; Sterneck, E.; Prasad, P.D.; Ganapathy, V. C/Ebpdelta Null Mouse as a Model for the Double Knock-out of Slc5a8 and Slc5a12 in Kidney. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26769–26773. [CrossRef] [PubMed]
101. Frank, H.; Gröger, N.; Diener, M.; Becker, C.; Braun, T.; Boettger, T. Lactaturia and Loss of Sodium-Dependent Lactate Uptake in the Colon of SLC5A8-Deficient Mice. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 24729–24737. [CrossRef] [PubMed]
102. Ikeda, K.; Shiraishi, K.; Koga, T.; Motooka, Y.; Fujino, K.; Shibata, H.; Mori, T.; Suzuki, M. Prognostic Significance of Aberrant Methylation of Solute Carrier Gene Family 5A8 in Lung Adenocarcinoma. *Ann. Thorac. Surg.* **2015**, *99*, 1755–1759. [CrossRef] [PubMed]
103. Milutinovic, S.; Detich, N.; Szyf, M. Valproate Induces Widespread Epigenetic Reprogramming Which Involves Demethylation of Specific Genes. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 560–571. [CrossRef] [PubMed]
104. Noronha, C.; Ribeiro, A.S.; Taipa, R.; Castro, D.S.; Reis, J.; Faria, C.; Paredes, J. Cadherin Expression and Emt: A Focus on Gliomas. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1328. [CrossRef] [PubMed]
105. Förster, A.; Brand, F.; Banan, R.; Hüneburg, R.; Weber, C.A.M.; Ewert, W.; Kronenberg, J.; Previti, C.; Elyan, N.; Beyer, U.; et al. Rare Germline Variants in the E-Cadherin Gene CDH1 Are Associated with the Risk of Brain Tumors of Neuroepithelial and Epithelial Origin. *Acta Neuropathol.* **2021**, *142*, 191–210. [CrossRef] [PubMed]
106. Lewis-Tuffin, L.J.; Rodriguez, F.; Giannini, C.; Scheithauer, B.; Necela, B.M.; Sarkaria, J.N.; Anastasiadis, P.Z. Misregulated E-Cadherin Expression Associated with an Aggressive Brain Tumor Phenotype. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13665. [CrossRef] [PubMed]
107. Rodriguez, F.J.; Scheithauer, B.W.; Giannini, C.; Bryant, S.C.; Jenkins, R.B. Epithelial and Pseudoepithelial Differentiation in Glioblastoma and Gliosarcoma: A Comparative Morphologic and Molecular Genetic Study. *Cancer* **2008**, *113*, 2779–2789. [CrossRef] [PubMed]

108. Belut, D.R.; Lima, E.D.O.; Zanini, M.A.; Galvani, A.F.; Furtado, F.B.; Ferrasi, A.C. CDH1 Hypermethylation: A Potential Molecular Pathway for Invasiveness in Glioblastoma. *Eur. J. Cancer Prev.* **2024**, *33*, 73–75. [CrossRef] [PubMed]
109. Ji, X.; Chen, S.; Guo, Y.; Li, W.; Qi, X.; Yang, H.; Xiao, S.; Fang, G.; Hu, J.; Wen, C.; et al. Establishment and Evaluation of Four Different Types of Patient-Derived Xenograft Models. *Cancer Cell Int.* **2017**, *17*, 122. [CrossRef] [PubMed]
110. Charbonneau, M.; Harper, K.; Brochu-Gaudreau, K.; Perreault, A.; Roy, L.O.; Lucien, F.; Tian, S.; Fortin, D.; Dubois, C.M. The Development of a Rapid Patient-Derived Xenograft Model to Predict Chemotherapeutic Drug Sensitivity/Resistance in Malignant Glial Tumors. *Neuro Oncol.* **2023**, *25*, 1605–1616. [CrossRef] [PubMed]
111. Zeng, W.; Tang, Z.; Li, Y.; Yin, G.; Liu, Z.; Gao, J.; Chen, Y.; Chen, F. Patient-Derived Xenografts of Different Grade Gliomas Retain the Heterogeneous Histological and Genetic Features of Human Gliomas. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 1. [CrossRef] [PubMed]
112. Joo, K.M.; Kim, J.; Jin, J.; Kim, M.; Seol, H.J.; Muradov, J.; Yang, H.; Choi, Y.L.; Park, W.Y.; Kong, D.S.; et al. Patient-Specific Orthotopic Glioblastoma Xenograft Models Recapitulate the Histopathology and Biology of Human Glioblastomas In Situ. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 260–273. [CrossRef] [PubMed]
113. Piaskowski, S.; Bienkowski, M.; Stoczynska-Fidelus, E.; Stawski, R.; Sieruta, M.; Szybka, M.; Papier, W.; Wolanczyk, M.; Jaskolski, D.J.; Liberski, P.P.; et al. Glioma Cells Showing IDH1 Mutation Cannot Be Propagated in Standard Cell Culture Conditions. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 968–970. [CrossRef] [PubMed]
114. William, D.; Mullins, C.S.; Schneider, B.; Orthmann, A.; Lamp, N.; Krohn, M.; Hoffmann, A.; Classen, C.F.; Linnebacher, M. Optimized Creation of Glioblastoma Patient Derived Xenografts for Use in Preclinical Studies. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 27. [CrossRef] [PubMed]
115. Stakišaitis, D.; Damanskienė, E.; Kurkūnavičiūtė, R.; Juknevičienė, M.; Alonso, M.M.; Valančiūtė, A.; Ročka, S.; Balnytė, I. The Effectiveness of Dichloroacetate on Human Glioblastoma Xenograft Growth Depends on Na⁺ and Mg²⁺ Cations. *Dose-Response* **2021**, *19*, 1559325821990166. [CrossRef] [PubMed]
116. ATCC: T98G [T98-G] CRL-1690TM Product Information. Available online: <https://www.atcc.org/products/crl-1690> (accessed on 12 July 2025).
117. Ribatti, D. Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2008**, *270*, 181–224. [CrossRef] [PubMed]
118. Stakišaitis, D.; Valančiūtė, A.; Balnytė, I.; Lesauskaitė, V.; Juknevičienė, J.; Stanevičiūtė, J.; Jasaitis, D.J. Valpro rūgšties ir Dichloroacetato Druskų Derinio Taikymas Vėžio Gydymui. *LT6874B*, 25 October 2021.
119. European Patent Application. Derivative of Valproic Acid and Dichloroacetate Used for the Treatment of Cancer. European Patent Application No. 21168796.7, 16 April 2021. Available online: <https://register.epo.org/application?number=EP21168796> (accessed on 6 November 2024).
120. Šlekienė, L.; Stakišaitis, D.; Balnytė, I.; Valančiūtė, A. Sodium Valproate Inhibits Small Cell Lung Cancer Tumor Growth on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and Reduces the P53 and EZH2 Expression. *Dose-Response* **2018**, *16*, 1559325818772486. [CrossRef] [PubMed]
121. Ortiz, R.; Perazzoli, G.; Cabeza, L.; Jiménez-Luna, C.; Luque, R.; Prados, J.; Melguizo, C. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Curr. Neuropharmacol.* **2021**, *19*, 513–537. [CrossRef] [PubMed]
122. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{−ΔΔCT} Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including table and figures. Furthermore, no special permission is required for authors to submit their work to external repositories (MDPI | Open Access Information).



Article

Effect of Treatment with a Combination of Dichloroacetate and Valproic Acid on Adult Glioblastoma Patient-Derived Primary Cells Xenografts on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane

Rūta Skredėnienė ¹ , Donatas Stakisaitis ^{1,2,*} , Aidanas Preikšaitis ³, Angelija Valančiūtė ¹, Vaiva Lesauskaitė ⁴ and Ingrida Balnytė ¹

¹ Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, 44307 Kaunas, Lithuania; ruta.skredeniene@lsmu.lt (R.S.); angelija.valanciate@lsmu.lt (A.V.); ingrida.balnyte@lsmu.lt (I.B.)

² Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute, 08660 Vilnius, Lithuania

³ Centre of Neurosurgery, Clinic of Neurology and Neurosurgery, Faculty of Medicine, Vilnius University, 03101 Vilnius, Lithuania; aidanas.preiksaitis@santa.lt

⁴ Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, 50009 Kaunas, Lithuania; vaiva.lesauskaite@lsmu.lt

* Correspondence: donatas.stakisaitis@lsmuni.lt

Abstract

Background/Objectives: The ineffectiveness of current treatments for glioblastoma underscores the urgent need for effective alternatives. This study aimed to investigate the effectiveness of sodium dichloroacetate (NaDCA) and a sodium valproate NaDCA combination (NaVPA–NaDCA) on formed patients' primary cell tumors on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). **Methods:** Glioblastoma tissue samples were obtained from three patients during tumor surgery. WHO grade IV, IDH wild-type, and a strong positive cytoplasmic GFAP reaction in tumor cells characterized the investigated glioblastoma cases. The tumor cells GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM-4M from the patients were examined. Histological examination of tumor invasion into CAM, angiogenesis, and immunohistochemical expression of GFAP-, PCNA-, p53-, EZH2- and vimentin-positive cells were examined. **Results:** No difference in GFAP expression was observed between the patient's GBM tumor tissue and the tumor formed on CAM from the same patient's tumor cells. There were no significant differences in invasion or in the frequency of GFAP- and p53-positive cells among the study control groups. The expression of PCNA-, EZH2-, and vimentin-positive cells in control tumors varied significantly. Treatment significantly reduced the incidence of tumor invasion in GBM2-2F and GBM2-4M and did not affect GBM2-3F tumors; treatment also significantly reduced GFAP expression in GBM2-3F and GBM2-4M and did not affect GBM2-2F tumors. The treatment with NaVPA–NaDCA significantly reduced the expression of PCNA, p53, EZH2 and vimentin in the tested tumors. **Conclusions:** Data demonstrated an antitumor effect of NaVPA–NaDCA in an in vivo model of a patient's primary glioblastoma cells.

Keywords: adult glioblastoma; GFAP; PCNA; p53; EZH2; vimentin; dichloroacetate-valproic acid combination; patient-derived tumor cells; chicken embryo chorioallantoic membrane model



Academic Editors: Hassan Bousbaa and Zhiwei Hu

Received: 19 November 2025

Revised: 17 December 2025

Accepted: 23 December 2025

Published: 30 December 2025

Copyright: © 2025 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

1. Introduction

Adult glioblastoma (GBM), as WHO Grade IV, IDH wild-type, is classified as primary, the most frequent, highly aggressive, and heterogeneous brain cancer with a poor prognosis, as there is no effective treatment despite multidisciplinary research efforts. The incidence of adult GBM peaks between the ages of 65–74 years, with an average age of 65 years and an overall survival (OS) of 8 months [1,2]. The current treatment regimen consists of tumor maximal surgical resection, adjuvant treatment with temozolomide (TMZ) chemotherapy and radiotherapy [3,4]. TMZ was authorized 20 years ago for the treatment of newly diagnosed GBM [5,6]. The addition of TMZ to radiotherapy prolonged OS by 2.5 months [6], progression-free survival (PFS) is 6 months, and TMZ is ineffective in more than 50% of patients; with standard multimodality therapy, 70% of patients progress within the first year. The GBM 5-year survival rate is less than 5% and is among the lowest of all cancers [6]. It is essential to develop preclinical models for both standard and novel therapies that are as effective and personalized as possible [7].

GBM cells require oxidative phosphorylation (OXPHOS) to survive, and OXPHOS is often a hallmark of cancer stem cells and cells resistant to chemotherapy. Inhibition of OXPHOS function may also effect the tumor microenvironment by reducing hypoxia and improving the anti-tumor immune response, with great potential in GBM in both in vitro and in vivo studies [8,9]. GBM cells exhibit increased expression of pyruvate dehydrogenase kinases (PDK), resulting in enhanced glycolytic activity [10–12]. PDK inhibition is a target for GBM treatment [13]. Dichloroacetate (DCA) has a selective effect on cancer cells by inhibiting PDK [14], thereby activating pyruvate dehydrogenase (PDH) [15]. DCA inhibits the growth of U87 MG and PBT24 xenografts on CAM, reduces tumor invasion, and decreases the number of blood vessels in the CAM model, impacting the expression of PCNA and EZH2 in tumor tissue cells [16]. In studies of immunodeficient orthotopic U87 glioblastoma-bearing mice, the combination of DCA and radiotherapy increased animal survival [17].

Valproic acid (VPA) is a histone deacetylase (HDAC) inhibitor that, alone or in combination with other therapies, suppresses glioma growth both in vivo and in vitro [18]. Non-toxic doses of VPA increase the sensitivity of U87 and T98G cells to gefitinib and inhibit cell growth via autophagy [19]. VPA suppresses aerobic glycolysis by reducing the levels of the E2F transcription factor 1, thereby reducing the expression of glycolytic genes, such as glucose-6-phosphate isomerase and phosphoglycerate kinase 1 [20]. VPA may enhance the transport of DCA into the cell through mitochondrial pathways [21,22]. The synergistic action of combining chemotherapy and HDAC inhibitors shows promise for treating GBM and preventing chemotherapy resistance [23]. VPA and DCA are drugs whose pharmacokinetics, blood levels and safety are well known.

It was reported that VPA [24], DCA, the combination of sodium dichloroacetate and sodium valproate (NaVPA–NaDCA), and TMZ have a cell line-dependent effect on the growth, neo-angiogenesis, and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), and tumor protein p53 (p53) in tumor tissues of adult GBM U87 and T98G cells tumors on CAM. In combination, VPA and DCA act synergistically. The effects in vitro of NaVPA–NaDCA and TMZ on SLC12A2 (Na–K–2Cl cotransporter; NKCC1), SLC12A5 (K–Cl cotransporter; KCC2), SLC5A8 (a Na⁺-coupled high-affinity transporter for short-chain fatty acids), CDH1 (E-cadherin) and CDH2 (N-cadherin) gene expression in U87 or T98G cells were cell line-dependent, with efficacy data indicating a superior impact of NaVPA–NaDCA compared with TMZ [25].

Inflammation and immune response pathways are directly linked to GBM progression, and their dysregulation is associated with greater treatment resistance and poorer

outcomes [26,27]. NaVPA–NaDCA inhibits inflammatory and immune pathways relevant in the genesis of GBM [28,29].

The Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) model is used to assess approaches to treating GBM, and drug response is evaluated by examining tumor growth, vascularization, invasion, and tumor marker expression via histological analysis [25,30]. The relevance of using patient-derived xenograft (PDX) models for translational oncology research is highlighted in GBM. These models more accurately reflect the genetic and molecular heterogeneity of tumors, which facilitates the development of personalized treatment approaches [7,30,31].

The study aimed to determine differences in the response of GBM IDH-wild-type patients' derived primary cell xenograft (PDX) on the CAM model to treatment with a NaVPA–NaDCA in terms of tumor growth, invasion, angiogenesis, and the expression of glioma markers such as GFAP, PCNA, p53, EZH2 and vimentin in the tumor tissue on CAM.

GFAP is expressed in human astrocytes, GBM cancer stem cells, and GBM cells and is used for histological identification of GBM [32]. GFAP is a key intermediate filament protein of glial cells, involved in cytoskeleton remodeling and linked to GBM progression, with a functional role in intercellular mitochondrial transfer between GBM cells in response to proapoptotic stimuli [33]. Immunohistochemical analysis of GBM has shown that the GFAP value is associated with worse survival, independent of the methylation status of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter [34].

The proliferation of cancer cells correlates with a high degree of tumor malignancy, as assessed by PCNA protein expression [35]. In assessing the association between clinical outcome and GBM immunohistochemical expression and apoptosis in GBM patients, it was found that increased PCNA labelling index and decreased apoptosis index were associated with shorter patient survival [36]. PCNA-associated complexes influence p53 regulators [37].

The tumor marker p53 is a target in the context of developing cancer treatment strategies [38]. There is an interaction between the p53 mutation and wild-type p53; the mutated p53 protein acts as a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 tumor suppressor programs and can acquire oncogenic functions [39]. The wild-type, normal p53 protein acts as a tumor suppressor, promoting apoptosis in cancer cells. Mutations in p53 lead to the accumulation of the dysfunctional protein in tumor tissue, while wild-type p53 does not accumulate [40,41]. Drug treatment must target the p53 mutant proteins [40,42,43].

EZH2 is overexpressed in gliomas, correlates with high-grade GBM, and is associated with poorer survival outcomes [44,45]. Its activity contributes to GBM progression by silencing tumor-suppressor genes [46]. The importance of EZH2 inhibition has attracted interest as a therapeutic target [47]. The use of EZH2 inhibitors in GBM models warrants further investigation, as EZH2 inhibition may also have downstream effects on tumor suppressors and other signaling pathways [48].

RNA sequencing data show that vimentin is highly expressed in OXPHOS-resistant cancer cells, particularly in GBM cells. Vimentin plays a vital role in cancer progression, immunotherapy suppression, the development of cancer stem cell properties, and the emergence of drug resistance [49]. The epithelial–mesenchymal transition (EMT) process is characterized by increased vimentin expression in the tumor, which is also associated with loss of cell adhesion [50]. Some studies have reported a link between TMZ resistance and the EMT factor vimentin [51]. Providing new insights into vimentin as a target for GBM treatment strategies [49], considering it as a prospective GBM therapeutic target [52].

The study demonstrates the anticancer effect of NaVPA–NaDCA, reducing PCNA, EZH2, p53, and vimentin expression in GBM IDH-wild-type primary cells GBM2-2F, GBM2-

3F, and GBM2-4M tumors on CAM, while the impact on GFAP expression and invasion in CAM has individual effects.

2. Materials and Methods

2.1. GBM Patient Clinical Data

GBM tissue samples were obtained from three patients who underwent surgery, and their details are provided below. GBM2-2F, 48-year-old female, glioblastoma (WHO Grade IV), IDH wild-type; strong positive cytoplasmic reaction in GFAP tumor cells (surgery 4 October 2021); GBM2-3F, 82-year-old female, glioblastoma (WHO Grade IV), IDH wild-type; strong positive cytoplasmic reaction in GFAP tumor cells (surgery 28 November 2024); GBM2-4M, 46-year-old male; glioblastoma (WHO Grade IV), IDH wild-type; strong positive cytoplasmic reaction in GFAP tumor cells (surgery 1 March 2021). All patients had been diagnosed with GBM for the first time before surgery and had not received any prior anticancer treatment.

The Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee granted authorization to conduct biomedical research on 8 August 2020, authorization No. BE 2-80. Patients were not given anticancer treatment before surgery. They were operated on at the Neurosurgery Clinic of Vilnius University Santaros Hospital (Santariškių St. 2, Vilnius, Lithuania).

2.2. GBM Patient Study Groups

In the GBM tumor groups, tumor growth, the frequency of invasion into the CAM, sub-tumoral changes in the CAM (thickening), PCNA, p53, EZH2, vimentin and GFAP immunohistochemical markers were studied. Cells were treated with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA and the group sample sizes are presented in Table 1.

Table 1. Sample size of GBM tumors on CAM and tumor marker expression in the studied groups.

Patient Study Group	Invasion, CAM Thickness			GFAP, PCNA, p53, EZH2, Vimentin		
	Number of Tumors on CAM					
	GBM2 -2F	GBM2 -3F	GBM2 -4M	GBM2 -2F	GBM2- 3F	GBM2 -4M
Control	8	10	7	4	6	4
2 mM NaVPA-3 mM NaDCA-treated	8	10	7	6	5	5

2.3. Investigational Medicinal Preparations

A 2 mM concentration of sodium valproate (NaVPA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and a 3 mM concentration of sodium dichloroacetate (NaDCA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used in the NaVPA–NaDCA combination. The combination of these therapeutic agents is patented, which recognizes NaVPA–NaDCA as a novel pharmaceutical formulation for treating cancer: National patent—the combination of VPA and NaDCA products is for the treatment of cancer/Valpro rūgšties ir dichloroacetato druskų derinio taikymas vėžio gydymui (Official Bulletin of the State Patent Bureau of the Republic of Lithuania, Patent No. 6874, Int. Cl. A61K 31/00) [53]; European Patent—derivative of valproic acid and dichloroacetate used for the treatment of cancer (Application No. 21168796.7, Publication No. EP3895702, publication date 24 September 2025, Int. Cl. A61K 31/19, A61K 45/06, A61P 35/00 [54]. The doses of NaDCA and VPA were selected based on previously published studies that employed these investigational agents as monotherapies [16,24,55].

2.4. The CAM Model

Fresh surgically resected glioblastoma tumor tissue was placed in DMEM medium without Ca^{2+} (Gibco, Grand Island, NY, USA) with 1% 100 IU/mL of penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (P/S; Gibco, Grand Island, NY, USA). Part of the tissue was fixed in formalin for paraffin embedding. The other part was placed in a Petri dish (Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár, Hungary) and washed repeatedly with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco, Grand Island, NY, USA) to reduce the amount of red blood cells. Any visible connective tissue was removed using sterile tweezers. DMEM with P/S was then added to a Petri dish, and the tissue was minced into small pieces using sterile tweezers within a laminar airflow cabinet under sterile conditions. A cell suspension was acquired by smoothly pipetting a dissected GBM sample in 37°C DMEM with P/S and 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, UK) in a 50 mL conical tube (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) for 5 min. The time between sample collection and cell suspension acquisition is no more than 20 min.

In compliance with European Union and Lithuanian legal frameworks, the use of the CAM model in research does not necessitate prior approval from an Ethics Committee. Rumšiškės hatchery (Rumšiškės, Lithuania) supplied Cobb-500 freshly fertilized chicken eggs, which were placed in an incubator (Maino Incubators, Oltrona di San Mamette, Como, Italy) for 3 consecutive days at 37°C under humid conditions (60% relative humidity). Eggs were automatically turned hourly and turning was discontinued on day 3 of embryo development (EDD3). At EDD3, ~2.5 mL of egg white was withdrawn from the blunt end of each egg using a sterile syringe to facilitate detachment of the CAM from the shell. A 1 cm^2 window was then carefully drilled in the shell and sealed with sterile, transparent film. The eggs were returned to the incubator for GBM patient tumor cell transplantation on CAM at EDD7.

The GBM cell suspension was centrifuged at 800 rpm for 3 min and the supernatant was discarded. The cells in DMEM were resuspended in rat tail collagen, type I (Gibco, New York, NY, USA) (group—control), and in a mixture of collagen, 2 mM NaVPA and 3 mM NaDCA in DMEM (treated group), total volume of preparation for single tumor formation—20 μL . A 20 μL of GBM cell suspension mixture was pipetted onto a 4 mm^3 piece ($1\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$) of a hemostatic, absorbable gelatin sponge (Surgispon, Aegis Lifesciences, Gujarat, India). The gelatin sponge serves as a suitable scaffold for delivering tumor cell suspensions onto the CAM surface, as previously reported by Ribatti [56]. At the EDD7, the tumor-bearing sponge was transplanted on the CAM in proximity to major blood vessels. Structural changes in the tumor were monitored *in vivo* with a stereomicroscope (SZX2RFA16, Olympus, Tokyo, Japan) from EDD 9 to 12. Tumor images were acquired with a DP92 digital camera connected to CellSens Dimension 1.9 imaging software (Olympus, Tokyo, Japan).

On EDD12, 0.25 mL of fluorescein isothiocyanate–dextran (5 mg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was injected into a major CAM blood vessel using an insulin syringe (Chirana T. Injecta, Stara Tura, Slovakia). The tumor and surrounding CAM were harvested and photographed under natural light and ultraviolet illumination using a green fluorescent protein (GFP) filter (Olympus, Tokyo, Japan), as visualized with the aforementioned imaging software (version 1.9).

2.5. Histological and Immunohistochemical Study of the Tumor

Harvested CAM specimens and part of the postoperatively obtained GBM tumor tissue were fixed in 10% neutral and buffered formalin solution for approximately 24 h. Following fixation, samples were embedded in paraffin wax and sectioned at a thickness of $3\text{ }\mu\text{m}$ using a microtome (Leica, Wetzlar, Germany). Hematoxylin and eosin (H-E) and

immunohistochemical (IHC) staining methods were performed, as reported [16]. Capturing and visualization of slides stained with H-E and IHC were performed using a microscope (BX 40F4, Olympus, Tokyo, Japan) and a digital camera (XC30, Olympus, Tokyo, Japan), with CellSens Dimension 1.9 software.

Each tumor was evaluated for invasiveness into the CAM using 10× and 40× magnifications in two H-E sections. The invasion was defined as either disruption of the chorionic epithelium (ChE) and/or the presence of tumor cells infiltrating the underlying CAM mesenchyme. In non-invasive cases, the tumor remained localized on the surface of the chorionic epithelium, which retained its structural integrity. Two H-E sections of the CAM region beneath each tumor were captured at 4× magnification for analysis. The average CAM thickness was determined by measuring at 10 distinct points (in μm). All measurements were conducted over a standardized CAM length of 1792 μm .

IHC was performed to detect GFAP, PCNA, p53, EZH2, and vimentin expression. Tissue sections (3 μm thick) were mounted on poly-L-lysine-coated slides (Thermo Fisher Scientific, Branchburg, NJ, USA). Antigen retrieval was performed using the heat-induced epitope retrieval method for 20 min at 95 °C. High pH EnVision FLEX Target Retrieval Solution (pH 9, K8004, Dako, Glostrup, Denmark) was used for GFAP, PCNA, p53, and EZH2, while Low pH EnVision FLEX Target Retrieval Solution (pH 6, K8005, Dako, Glostrup, Denmark) was used for vimentin. Staining was performed using the Shandon CoverPlate System (Thermo Fisher Scientific, Branchburg, NJ, USA). Endogenous peroxidase activity was blocked for 10 min using EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent (SM801, Dako, Glostrup, Denmark). Primary antibodies were applied at a 1:100 dilution: for PCNA, p53 and EZH2, incubation was conducted for 30 min at room temperature; for GFAP and vimentin, incubation was conducted overnight at 4 °C. The primary antibodies used were: anti-GFAP (EPR1034Y, ab68428, Abcam, Cambridge, UK), anti-PCNA (PC10, Thermo Fisher Scientific, Branchburg, NJ, USA), anti-p53 (aa 211–220, clone PAb240, CBL404), recognizes both mutant and denatured wild-type p53 (Merck, Darmstadt, Germany), anti-KMT6/EZH2 (phospho S21, ab84989, Abcam, Cambridge, UK), and anti-vimentin (V9, M0725, Dako, Glostrup, Denmark). To achieve negative control, the primary antibody was omitted; for positive control, each slide array was used. Detection of immunoreactivity was achieved using a horseradish peroxidase-conjugated polymer dextran system labeled with a mouse antibody (secondary) and a linker (respectively, SM802 and SM804; Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min at room temperature. Visualization was completed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB, DM827, Dako, Glostrup, Denmark) as the chromogen. For a wash buffer, a Tween 20-containing Tris-buffered saline solution (DM831, Dako, Glostrup, Denmark) was used. Counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Protein expression of the investigated markers was evaluated by selecting two randomly chosen vision fields (each with a plot area of 23,863.7 μm^2) within two histological sections of IHC-stained tumor and capturing them at 40× magnification. The marker-positive stained cells and total tumor cells were counted, and the percentage of marker-positive cells was calculated in each histological section.

In Tables 2 and A1–A5, n represents the number of histological sections analyzed. For each tumor on CAM, two sections were assessed for histomorphometry measurements (invasion and CAM thickness) and for immunohistochemical evaluation (GFAP, PCNA, p53, EZH2 and vimentin). For each GBM patient tumor tissue sample, a total of 10 sections were analyzed. Histological and histomorphometric analyses were performed by an operator blinded to the experimental groups.

Table 2. The invasion into CAM frequency and the CAM thickness data of the tested tumors.

Patient Study Group	n	Invasion Frequency (%)	CAM Thickness (μm), Median (Range)
GBM2-2F			
Control	16	75.00	201.80 (47.32–677.70)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	16	37.50 ^a	403.10 (150.30–672.20)
GBM2-3F			
Control	20	60.00	398.60 (98.00–675.60)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	20	60.00	422.70 (100.05–782.40)
GBM2-4M			
Control	14	71.43	201.30 (44.77–350.10)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	14	28.57 ^b	171.40 (120.10–356.50) ^c

^a $p = 0.033$, compared with control; ^b $p = 0.005$, compared with control; ^c $p = 0.037$, compared with control.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis and visualization were performed using IBM SPSS Statistics version 23.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The frequency of tumor invasion into the CAM was expressed as a percentage (%), and comparisons between study groups were performed using the chi-square test. The Shapiro–Wilk test was applied to assess the normality of data distribution. CAM sub-tumoral thickness and IHC marker expression are presented as medians with corresponding minimum and maximum values. The nonparametric Mann–Whitney U test was used to assess differences between the two independent groups. A p -value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Stereomicroscopic and Histologic Images of Tested Tumors on the CAM In Vivo, the Tumor Ex Ovo, and Their H-E Histological Images

Figure 1 shows stereomicroscopic and histologic images of GBM2-2F, GBM2-3F and GBM2-4M tumors on the CAM.

Figure 1a shows the GBM2-2F biomicroscopy images of tumors on the CAM at the EDD9 and EDD12, the ex ovo tumor with CAM, and the histological H-E images. Comparison of the control tumor EDD9 with EDD12 reveals tumor invasion into the CAM. The H-E image shows damaged chorionic epithelial integrity and tumor invasion into the CAM, with the CAM beneath the tumor appearing thickened and containing multiple vessels. Ex ovo control images show blood vessels around the tumor. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA inhibited tumor growth and the formation of a vascular network around the tumor, as evidenced by the absence of a vascular network and no chorionic epithelial damage on H-E images.

Figure 1b shows the biomicroscopy images of the GBM2-3F tumor at EDD9 and EDD12, the excised tumor with the CAM, and the H-E histological images of the tumor on the CAM. GBM2-3F control at EDD9 and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA tumors on CAM have clear boundaries. The control tumor at EDD12 is reduced due to tumor invasion into the CAM mesenchyme. The control ex ovo image shows a pronounced vascular network around the tumor, and the H-E preparation shows compromised chorionic epithelial integrity, tumor

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18010052>

invasion, and CAM thickening. Compared to the control, treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA in the H-E image of the tumor reveals CAM thickening beneath the tumor, indicating damage to chorionic epithelial integrity.

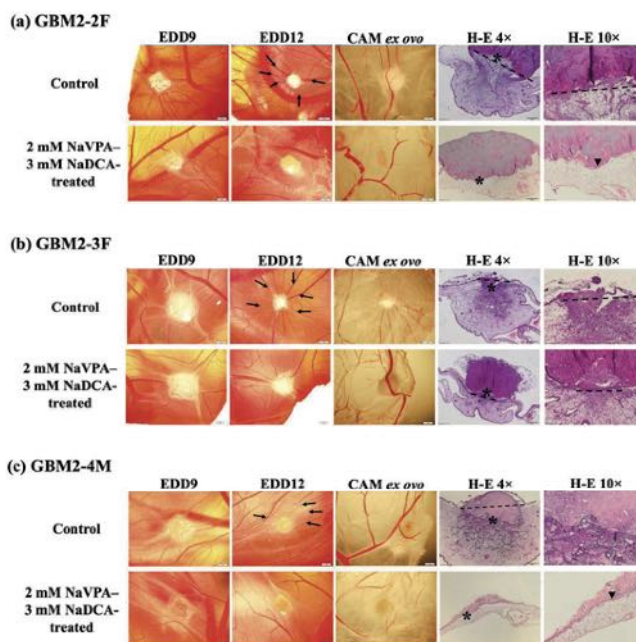


Figure 1. Stereomicroscopic and histologic images of GBM2-2F (a), GBM2-3F (b) and GBM2-4M (c) tumors in vivo on the CAM at EDD9, EDD12, ex ovo at EDD12 (scale bar—1 mm), and H-E stained histologically (4x scale bar—200 μ m, 10x—50 μ m). Arrows indicate the “spoked wheel”; dotted line—disruption of chorionic epithelium; asterisk—the enlarged region in H-E 10x pictures; arrowhead—intact chorionic epithelium.

Figure 1c shows the biomicroscopy of the GBM2-4M tumor images at EDD9 and EDD12 on the CAM, the tumor ex ovo with the CAM, and the histological H-E images of the tumor in the control and treatment groups.

The GBM2-4M control tumor at EDD9 is visually larger than the tumor at EDD12, as it has penetrated the CAM mesenchyme on day 12, and only part of the tumor is visible on the CAM surface. The histological section of the control H-E tumor shows extensive tumor invasion and is surrounded by CAM mesenchyme. The control ex ovo image shows a vascular network surrounding the tumor. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA inhibited tumor invasion (where the tumor is located on the CAM surface) and the formation of a vascular network around the tumor. No lesions of the chorionic epithelium are seen on the H-E image of the treated tumor at EDD12.

3.2. GBM2-2F, GBM2-3F and GBM2-4M Tumors' Growth, Tumor Invasion Rate into CAM, the IMP Impact on Neo-Angiogenesis and CAM Thickness Under the Tumor

Table 2 and Figure 2 present the histomorphometric data on the incidence of tumor invasion into the CAM and the thickness of the CAM beneath the tumor in the studied groups.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18010052>

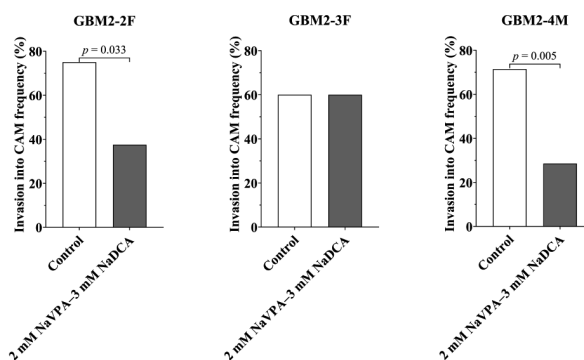


Figure 2. The frequency of tumor invasion into CAM in the study tumor in the CAM groups: GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M.

There were no significant differences in invasion among the GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M control groups. Compared to matched controls, treatment with 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA significantly reduced the incidence of tumor invasion into the CAM in patients GBM2-2F and GBM2-4M. The 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA did not affect the invasion of GBM2-3F tumors.

Treatment did not affect the sub-tumor CAM thickness of GBM2-2F and GBM2-3F tumors. Compared to the GBM2-4M control, 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA significantly reduced the thickness of the CAM under the tumor. CAM thickness was significantly lower in the GBM2-4M control group than in the GBM2-3F control ($p = 0.003$). Among the treated groups, CAM thickness in GBM2-4M was significantly lower compared to GBM2-2F ($p = 0.0003$) and GBM2-3F ($p = 0.005$).

Figure 3 shows fluorescence stereo-microscopy images after injecting fluorescent dextran into a CAM vessel. Dextran highlighted the vascular network around the tested tumor. Compared to controls, images of 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA-treated GBM2-2F, GBM2-3F and GBM2-4M tumors showed blunted neoangiogenesis.

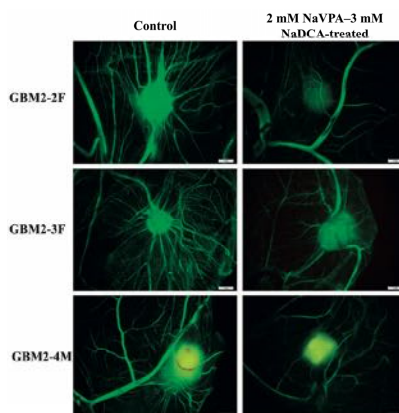


Figure 3. Fluorescent stereomicroscopic images of GBM (glioblastoma) patient tumors (fluorescent dextran highlights the tumor and surrounding blood vessels). Scale bar—1 mm.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18010052>

3.3. GBM2-2F, GBM2-3F and GBM2-4M Immunohistochemical Examination of GFAP, PCNA, p53, EZH2 and Vimentin Markers Expression in the Tested Tumors on CAM

3.3.1. The GFAP Expression in GBM-Resected Tumor Tissue of Studied Patients and Tumors Formed by Tumor Cells on CAM

Figure 4 and Appendix A, Table A1 present the GFAP expression data in the operated tumor tissue of GBM patients and the GFAP expression in GBM-formed tumors on CAM in control and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated groups.

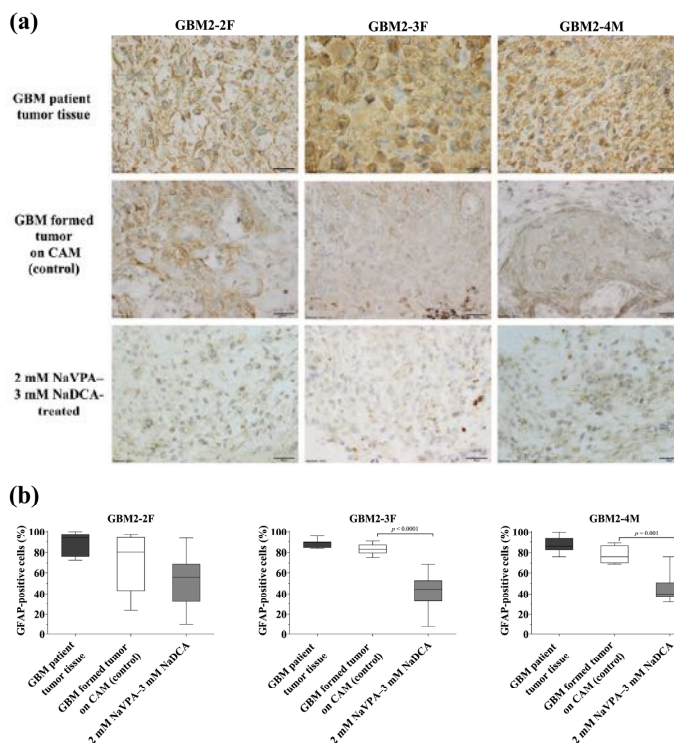


Figure 4. Immunohistochemical GFAP expression in the GBM patient tumor tissue and the GBM tumors on CAM formed from the corresponding patient's tumor cells in control and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated groups. (a) Brown cytoplasm shows GFAP-positive cells. Scale bar—20 μm; (b) The percentage of GFAP-positive cells.

Histological analysis revealed no differences in GFAP expression between the tumor tissue removed from patients and the control tumor formed by the same tumor cells on CAM ($p > 0.05$). Immunohistochemical analysis showed that the frequency of GFAP-positive cells in the GBM patient tumor tissue and the frequency of GFAP-positive cells in the tumor on the CAM formed from the corresponding patient's tumor cells (at EDD12) were not significantly different, indicating that the formatted tumors on the CAM are consistent with the histological characteristics of the patient's tumor.

The frequency of GFAP-positive cells in the control GBM2-2F tumor was 80.24%, in the GBM2-3F tumor, 82.63%, and in the GBM2-4M tumor, 76.00%. Compared with the control,

2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of GFAP-positive cells in GBM2-3F and GBM2-4M tumors and had no significant effect on GFAP expression in the GBM2-2F tumor on CAM. The frequency of GFAP-positive cells did not differ significantly among the GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M treated groups.

3.3.2. The PCNA Expression of GBM Tumors in Control and Treated Groups

Figure 5 and Appendix A, Table A2 present PCNA expression data from tumors studied on CAM. The frequency of PCNA-positive cells in control tumors—GBM2-2F—88.88%, GBM2-3F—90.95%, and GBM2-4M—was 49.00%.

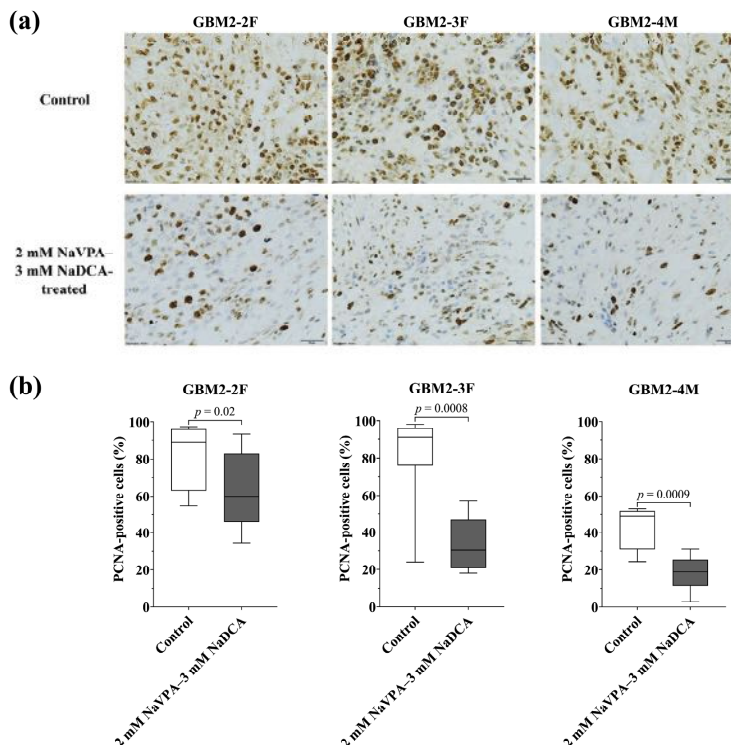


Figure 5. Immunohistochemical PCNA expression in the GBM tumors on CAM. (a) Brown nucleus shows PCNA-positive cells in control and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated tumors on CAM. Scale—20 μ m; (b) The percentage of PCNA-positive cells.

Compared to the respective control, 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of PCNA-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors on CAM. Comparison of control groups showed that GBM2-4M had a significantly lower frequency of PCNA-positive cells than GBM2-2F ($p = 0.0002$) or GBM2-3F ($p = 0.007$). Among the treatment groups, GBM2-2F showed the highest frequency of PCNA-positive cells, when compared with GBM2-3F ($p = 0.002$) and GBM2-4M ($p < 0.0001$). GBM2-4M showed a significantly lower frequency of PCNA-positive cells compared with GBM2-3F ($p = 0.02$).

3.3.3. The p53 Expression of GBM Tumors in Control and Treated Groups

Figure 6 and Appendix A, Table A3 display p53 expression data from the tumors of the GBM tumor-on-CAM model.

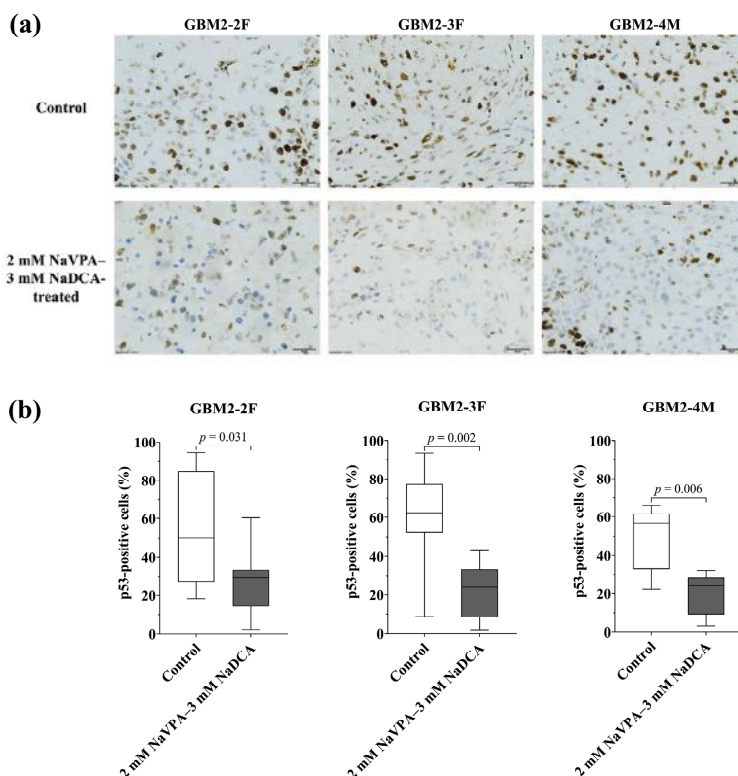


Figure 6. Immunohistochemical p53 expression in the GBM tumors on CAM. (a) Brown nucleus shows p53-positive cells in control and 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA-treated tumors on CAM. Scale—20 μ m; (b) The percentage of p53-positive cells.

The frequency of p53-positive cells in the GBM2-2F control tumor was 50.13%, 62.34% in GBM2-3F, and 56.58% in GBM2-4M. Compared to the control, 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA significantly reduced the frequency of p53-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors on CAM. The frequency of p53-positive cells did not differ significantly among GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M in either control or treated groups.

3.3.4. The EZH2 Expression of GBM Tumors in Control and Treated Groups

Figure 7 and Appendix A, Table A4 present the EZH2 expression data for the tumors studied on CAM. The frequency of EZH2-positive cells was 73.48% in the control of GBM2-2F, 91.11% in GBM2-3F, and 58.11% in GBM2-4M.

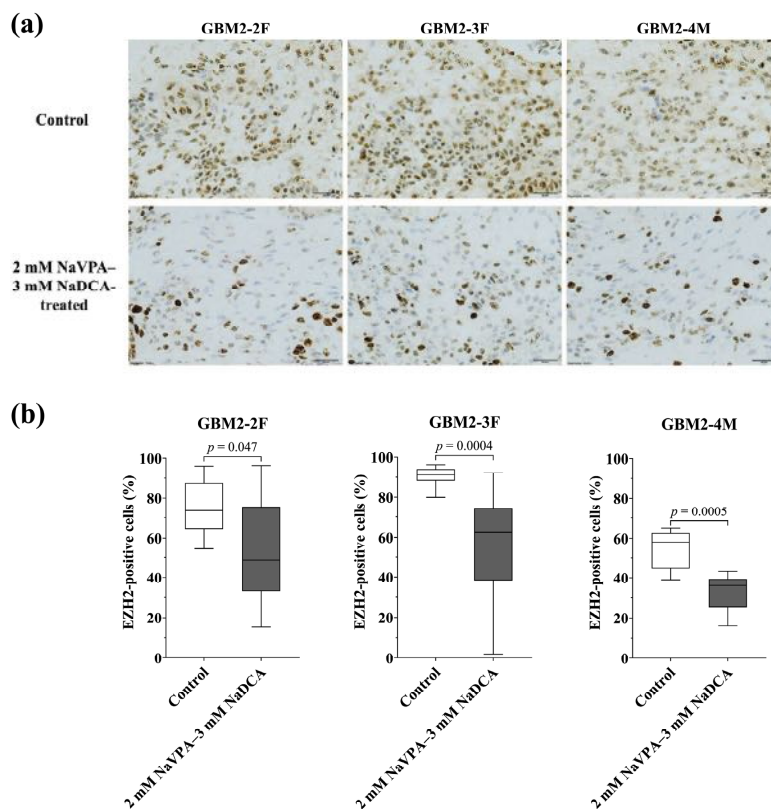


Figure 7. Immunohistochemical EZH2 expression in the GBM tumors on CAM. (a) Brown nucleus shows EZH2-positive cells in control and 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA-treated tumors on CAM. Scale—20 μ m; (b) The percentage of EZH2-positive cells.

In the control groups, GBM2-3F had a significantly higher frequency of EZH2-positive cells than GBM2-2F ($p = 0.01$) and GBM2-4M ($p < 0.0001$). In the treatment groups, GBM2-4M had the lowest frequency of EZH2-positive cells, when compared with GBM2-2F ($p = 0.04$) and GBM2-3F ($p = 0.02$). Compared to the control, 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA significantly reduced the number of EZH2-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors on CAM.

3.3.5. The Vimentin Expression in the Studied GBM Tumors in the Control and Treated Groups

Figure 8 and Appendix A, Table A5 show the vimentin expression data of the investigated GBM tumors on CAM. The frequency of vimentin-positive cells in the GBM2-2F control tumor was 45.85%, 26.91% in GBM2-3F, and 79.00% in GBM2-4M.

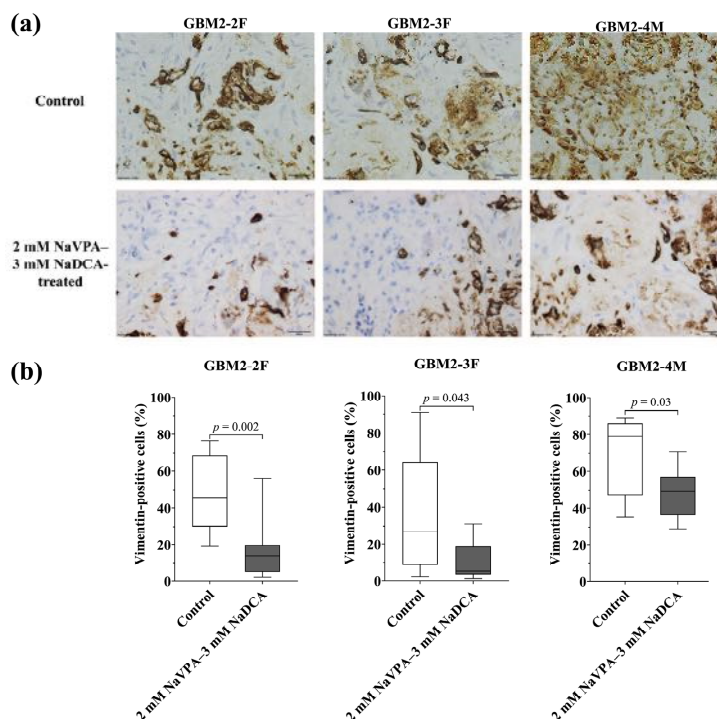


Figure 8. Immunohistochemical vimentin expression in the GBM tumors on CAM. (a) Brown cytoplasm shows vimentin-positive cells in control and 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA-treated tumors on CAM. Scale—20 μ m; (b) The percentage of vimentin-positive cells.

GBM2-4M had a significantly higher frequency of vimentin-positive cells than GBM2-2F ($p = 0.04$) and GBM2-3F ($p = 0.03$) in the control groups. Compared to the control, 2 mM NaVPA-3 mM NaDCA significantly reduced the number of vimentin-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F and GBM2-4M tumors on CAM. GBM2-4M had a significantly higher frequency of vimentin-positive cells than GBM2-2F ($p = 0.001$) and GBM2-3F ($p < 0.0001$) in the treatment groups.

4. Discussion

Advances in personalized GBM treatment are closely linked to standard treatment, and new treatment strategies are being explored, including chemotherapy with medicines that target the tumor's metabolic and molecular properties. Understanding the mechanisms of drug action and drug resistance, while assessing the effect of drugs on changes in cancer prognostic markers, is essential for confirming the effectiveness of GBM treatment [57,58]. The anticancer effect of NaVPA-NaDCA is supported by non-clinical data from in vivo CAM model studies that evaluated the drug's effects on tumor growth, vascularization, invasion, and tumor tissue marker expression via histological analysis. The data from this study suggest that the CAM model is a valuable tool for evaluating the in vivo efficacy

of the investigational drug. The absence of a mature immune response and a capillary network characterizes the CAM. Successful engraftment of transplanted tissue on the CAM requires neovascularization to ensure graft survival. Host capillaries from the chick embryo grow vertically into the implanted GBM tissue [59–62]. Angiogenesis in the CAM is characterized by increased blood vessel density around the transplanted and invading tumor. Neoplastic cells secrete specific endothelial cell growth factors, cytokines and chemokines that stimulate the growth of recipient blood vessels. Histological changes in CAM located under tumor grafts include increased membrane thickness [59–61,63–65]. The angiostatic response to NaVPA–NaDCA manifests as a decrease in blood vessel density, which can also be attributed to its proinflammatory and immune-suppressive effects [28,29]. The impact of NaVPA–NaDCA on membrane thickness under the tumors was individual: it did not impact the CAM thickness in GBM2-2F and GBM2-3F tumors. NaVPA–NaDCA significantly reduced the thickness of the CAM of GBM2-4M.

NaVPA–NaDCA, as well as TMZ, *in vitro* had individual effects on the SLC12A2, SLC12A5, CDH1, CDH2, EZH2 and GFAP gene expressions in human primary cells of GBM (IDH-wild-type tumors), and it was found that NaVPA–NaDCA could have a greater impact, and that may be more effective than TMZ, but the effect is individual [66]. This study investigated the impact of NaVPA–NaDCA on the cancer markers of patient-derived GBM primary cell-formed tumors on CAM under treatment.

GFAP is expressed in human GBM cells and GBM stem cells, serving as a marker for the histological identification of GBM [32]. When comparing the percentage of GFAP-positive cells in the patient's GBM tumor tissue and in the tumor formed on CAM from the same patient's tumor cells, IHC evaluation showed no difference. The frequency of GFAP-positive cells did not differ among GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM-4M tumor tissues, nor did it differ among the corresponding tumors formed on CAM from the tested patient tumor, demonstrating that GBM control tumors formed from patients' primary GBM cells on CAM retain tumor immunohistochemical GFAP expression.

The protein GFAP participates in cytoskeletal remodeling, plays a functional role among GBM cell mitochondria in response to a proapoptotic stimulus, and is associated with GBM progression [33]. It was reported that IHC showed that GFAP levels in GBM tumors were linked to worse survival: studies of adult GBM patients showed that the GFAP $\geq 75\%$ had significantly poorer survival, regardless of MGMT promoter methylation status or isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations, leading to the suggestion that quantitative immunohistochemical GFAP assessment could be a new biological marker for predicting survival in GBM patients [34]. Other researchers concluded that there is no strong correlation between GFAP and astrocytoma malignancy, that GFAP-positive populations are highly heterogeneous, and that differentiation between GFAP isoforms GFAP δ and GFAP α could improve the assessment of tumor malignancy status [32].

An increase in GFAP content is a strong indication of reactive astrocyte remodeling. Reactive astrocytes are key regulators of inflammation during glioma genesis, shaping the GBM microenvironment. In the GBM, astrocytes are activated and regulate tumor microenvironment cells through cell–cell contact or the secretion of proinflammatory cytokines, chemokines and other active substances [67]. NaVPA–NaDCA reduces inflammation by inhibiting proinflammatory cytokines and chemokines [28,29], which may counteract the effects of active substances in the GBM microenvironment and alter GFAP protein expression in tumor cells. The 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA treatment significantly reduced the number of GFAP-positive cells in GBM2-3F and GBM2-4M tumors on CAM, but did not affect the expression of the GBM2-2F tumor. The *Ezh2* cKO mouse model shows that *Ezh2* depletion in astrocytes significantly increases GFAP expression [68]. Interpreting GFAP-positive cell counts as indicative of astrocyte proliferation, GFAP immunofixation

should be evaluated in conjunction with proliferation markers such as PCNA, Ki-67, or other relevant markers [67].

It was reported that GFAP gene expression varies among primary GBM cells, with GBM5-1F and GBM5-3F exhibiting higher expression than GBM5-2F. Treatment with NaVPA–NaDCA significantly upregulated GFAP gene expression in GBM5-2F cells, significantly downregulated it in GBM5-3F cells, and had no effect on gene expression in GBM5-1F cells, while TMZ did not affect GFAP expression in the tested cells [66]. A correlation was observed between shorter survival in patients with grade IV GBM and increased GFAP transcription activity. Similarly, qRT-PCR analysis revealed a trend toward shorter survival with higher GFAP mRNA levels in patients with grade IV astrocytoma. The REMBRANDT dataset also confirmed the association between more prolonged survival in glioma patients and decreased GFAP mRNA expression. Thus, GFAP expression studies may have clinical relevance, as GFAP can be used as a prognostic marker for glioma [34,69].

PCNA studies indicate that increased PCNA expression is associated with malignant tumor characteristics, advanced stage, higher GBM grade, and poor prognosis. Furthermore, alterations in PCNA during tumor treatment may indicate the effectiveness of therapy [35,36,70]. After tumor removal, even supramarginal resection inevitably leaves some tumor cells behind. The remaining GBM cells retain both proliferative and invasive properties, underscoring the importance of effective chemotherapy during tumor progression [71]. Comparison of control groups showed that GBM2-4M has significantly lower PCNA-positive cell expression than GBM2-2F and GBM2-3F. Treatment with 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of PCNA-positive cells in all tested tumors on CAM. After treatment with the combination, the frequency of PCNA-positive cells was significantly higher in GBM2-2F tumors than in GBM2-3F and GBM2-4M tumors, and the expression of the marker was significantly lower in GBM2-4M compared to GBM2-3F tumors. It has been reported that the effect of NaVPA–NaDCA on PCNA expression in T98G cells tumors on CAM is synergistic: the frequency of PCNA-positive cells was significantly reduced in those treated with NaVPA–NaDCA, while 3 mM NaDCA did not affect marker expression; the effect of NaVPA–NaDCA and 50 μ M TMZ on T98G tumors was comparable [25]. PCNA-associated complexes and p53 activity regulation are closely linked through the p53 signaling pathway [37,72].

p53 mutations cause the accumulation of dysfunctional p53 protein in tumor tissue, while natural p53 is consumed and does not accumulate in tumor tissue [40,41]. The immunochemistry method revealed p53-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M control tumors, with no difference in marker expression among them. The mutated p53 protein can acquire oncogenic functions and act as a dominant inhibitor of the wild-type p53 tumor suppressor and apoptosis pathways in GBM cells [39]. When developing cancer treatment strategies, therapies targeting mutated p53 proteins in tumor tissue should be considered [38,40,42,43]. The 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the frequency of p53-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F and GBM2-4M tumors on CAM, with no difference in marker expression among the treated tumor groups. It was reported that 3 mM NaDCA or 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA had no effect on the expression of p53-positive cells in U87 or T98G cell tumors on CAM, while treatment with 50 μ M TMZ significantly reduced the number of p53-positive cells in the tumor groups studied, and the expression of p53-positive T98G cells did not differ between the TMZ- and 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated groups [25]. The unsatisfactory efficacy of TMZ chemotherapy in treating GBM is associated with high levels of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression [73]. High doses of TMZ to reduce MGMT activity are limited by toxicity issues [73,74]. The p53 protein is reported to regulate MGMT [75]. Reduced MGMT expression levels in GBM are associated with p53 activation [76,77]. VPA may induce

methylation of the MGMT promoter, reduce MGMT expression in GBM cells, and increase the sensitivity of temozolomide-resistant glioma cells and GBM stem cells [78,79]. In vivo, combined treatment with dichloroacetate and radiotherapy improved survival in mice with orthotopic glioblastoma, demonstrating that DCA can increase the sensitivity of GBM cells to radiotherapy by modulating tumor cell metabolism [17].

EZH2 expression in GBM cells correlates with high-grade GBM, which is associated with poorer survival outcomes [44,45]. EZH2 activity is related to the suppression of GBM tumor suppressors and tumor progression [46]. The frequency of EZH2-positive cells in the study's GBM primary cell control groups ranged from 58.11% to 91.11%. A 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA treatment significantly reduced the number of EZH2-positive cells in GBM2-2F, GBM2-3F, and GBM2-4M tumors on CAM. EZH2 inhibition is being investigated as a therapeutic target [47]. Preclinical studies, both in vivo and in vitro, demonstrated that EZH2 inhibitor GSK126 inhibited the viability of primary GBM cells and GBM stem cells, weakened the aggressive malignant phenotype, cell migration and invasion [80]. Interactions between CCL2+ malignant cells and IL-10+ tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment, mediated by the EZH2-FOSL2-CCL2 axis, are significant for GBM mesenchymal transition pathways [81]. Studies of T lymphocytes in patients with COVID-19 pneumonia have shown that NaVPA–NaDCA significantly downregulates the expression of the chemokine CCL2 and the IL-10 gene in T cells [28]. The use of EZH2 inhibitors in GBM models warrants further investigation, as EZH2 inhibition may also affect the regulation of tumor suppressors and other signaling pathways [48].

RNA sequencing data indicate that vimentin is highly expressed in OXPPOS-resistant GBM cells and plays a crucial role in tumor progression, immunotherapy suppression, cancer stem cell properties, and the development of drug resistance [49]. Vimentin expression data from the study investigating GBM tumors on CAM showed significant variability: the frequency of vimentin-positive cells was 45.85% in GBM2-2F, 26.91% in GBM2-3F and 79.00% in the GBM2-4M control tumors. The 2 mM NaVPA–3 mM NaDCA significantly reduced the number of vimentin-positive cells in the study tumors on CAM. Vimentin is a key marker of the EMT process, promoting a mesodermal tumor phenotype [82]. An increase in vimentin expression in tumors is associated with EMT, characterized by a loss of cell adhesion [50]. Some studies have reported a link between TMZ resistance and vimentin expression [51]. The EMT process not only causes drug resistance in GBM but also facilitates tumor invasion [83]. GBM can hijack brain communication for tumor invasion through tumor microtubule formation, and vimentin plays an essential role in this process. In clinical GBM patients, immunofluorescence staining for GFAP and vimentin showed a progressive increase in vimentin expression, correlating with higher tumor grade. Vimentin-positive cells were partially colocalized with GFAP-positive cells, suggesting that GFAP-positive, vimentin-positive cells are associated with GBM progression and may influence tumor invasion [84]. Vimentin expression is inversely correlated with the prognosis of glioma patients [84]. Vimentin is considered a promising therapeutic target for GBM [49,52].

It would also be essential to discuss the advantages of the CAM model compared to conventional PDX models that involve implanting patient tumor cells or tumor fragments into immunodeficient mice. They are the mainstay of preclinical and clinical drug evaluation, as they preserve key histopathological and genetic features of the primary tumor better than cell lines or genetically modified mice [31]. A significant research hurdle is the limited use of PDXs in rodents, as patient-derived tumor cells often fail to grow in these animals [7]. Without a technically complex orthotopic model of brain tumors, the adherence of human glioma fragments in mice is very low. Repeated tissue transfers into mice can replace the human tumor microenvironment with mouse components, potentially altering drug response [85,86]. Notably, there is a discrepancy in vimentin expression between

patient samples and tumor xenografts in mice [84]. The successful engraftment rate for GBM on CAM was 98.3% [30], and in heterotopic mouse PDX glioma models, success rates ranged from 38% to 69% [87,88]. The orthotopic brain tumor model had a success rate of 76–90% [89,90]; however, a long-standing problem in developing GBM PDX models is the almost complete failure to engraft IDH1-mutant samples when transplanted into mice [87,91]. In contrast, PDX-CAM is practically always successful regardless of glioma IDH status [30,59]. PDX-CAM results are available within a week, whereas PDXs in rodents take a few times longer.

The synergistic action of chemotherapy and the HDAC inhibitor VPA is promising for treating GBM and preventing chemotherapy resistance. [23,92]. The novelty of the study lies in the finding that VPA may enhance DCA transport into the cell via demethylated SLC5A8, the DCA transporter [21,22]. Such synergism may be relevant because it could allow a reduction in the DCA dose and the risk of its undesirable effects.

The limitation of the study is that only three patients with GBM primary cell tumors on CAM were studied. However, studies have shown that the NaVPA–NaDCA combination is effective in inhibiting GBM carcinogenesis. Another important aspect is that further studies on GBM primary cells are needed to determine the effect of the combination on immune and inflammatory pathways important for GBM progression.

5. Conclusions

1. Glioblastoma tumors formed from patients' primary cells on CAM retain tumor GFAP expression, indicating that the CAM model is reliable for studying the properties of the tumor.
2. Preclinical in vivo studies using the CAM model indicate that NaVPA–NaDCA has an anticancer effect on GFAP, p53, PCNA, EZH2, and vimentin GBM markers expression, which is important for carcinogenesis.
3. The CAM model is informative for assessing the efficacy of the investigational drug in glioma primary cell tumors and may be a relevant tool for evaluating the potential effectiveness of chemotherapy; however, the expected effect of the drug should be assessed individually.

6. Patents

National patent—the combination of NaVPA and NaDCA products is for the treatment of cancer/Valpro rūgštis ir dichloroacetato druskų derinio taikymas vėžio gydymui (Official Bulletin of the State Patent Bureau of the Republic of Lithuania, Patent No. 6874, Int. Cl. A61K 31/00) [53]; European Patent—derivative of valproic acid and dichloroacetate used for the treatment of cancer (Application No. 21168796.7, Publication No. EP3895702, publication date 24 September 2025, Int. Cl. A61K 31/19, A61K 45/06, A61P 35/00 [54].

Author Contributions: Conceptualization, D.S., A.V., V.L. and I.B.; data curation, R.S. and A.P.; formal analysis, R.S. and A.P.; funding acquisition, D.S. and I.B.; investigation, R.S. and A.P.; methodology, R.S. and A.P.; project administration, D.S. and I.B.; resources, D.S. and I.B.; software, R.S.; supervision, D.S. and I.B.; validation, R.S.; visualization, R.S.; writing—original draft, R.S., D.S., A.P., A.V., V.L. and I.B.; writing—review and editing, R.S., D.S., A.P., A.V., V.L. and I.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Research Council of Lithuania, grant number P-MIP-20-36.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Ethics Committee of Kaunas Regional Biomedical Research (protocol code BE 2-80, dated 8 August 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18010052>

Data Availability Statement: Data will be made available upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

CAM	Chick embryo chorioallantoic membrane
DCA	Dichloroacetate
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium for cell culture
EDD	Day of embryo development
EZH2	Polycomb inhibitory complex catalytic subunit 2
FBS	Fetal bovine serum
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GBM	Glioblastoma
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HDAC	Histone deacetylase
H-E	Hematoxylin and eosin
IDH	Isocitrate dehydrogenase
IHC	Immunohistochemistry
NaDCA	Sodium dichloroacetate
NaVPA–NaDCA	Combination of sodium dichloroacetate and sodium valproate
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDH	Pyruvate dehydrogenase
PDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
PDX	Patient-derived xenograft model
p53	TP53 gene-encoded p53 protein
P/S	Penicillin and streptomycin
TMZ	Temozolomide
VPA	Valproic acid

Appendix A

Table A1. Percentage of GFAP-positive cells in the GBM patient tumors on CAM.

Patient Study Group	<i>n</i>	GFAP-Positive Cells (%), Median (Range)
GBM2-2F		
GBM patient tumor tissue	10	93.70 (72.56–100.00)
Control tumor on CAM	8	80.24 (23.61–97.45)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	12	55.83 (10.10–93.60)
GBM2-3F		
GBM patient tumor tissue	10	89.44 (83.56–95.65)
Control tumor on CAM	12	82.63 (75.05–90.63)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	44.38 (8.00–68.65) ^a
GBM2-4M		
GBM patient tumor tissue	10	85.88 (76.00–100.00)
Control tumor on CAM	8	76.00 (69.06–89.00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	39.92 (32.00–76.00) ^b

^a *p* < 0.0001, compared with control; ^b *p* = 0.001, compared with control.

Table A2. Percentage of PCNA-positive cells in the GBM patient tumors on CAM.

Patient Study Group	<i>n</i>	PCNA-Positive Cells (%), Median (Range)
GBM2-2F		
Control	8	88.88 (54.60–97.30)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	12	59.95 (34.31–93.20) ^a
GBM2-3F		
Control	12	90.95 (24.00–98.00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	30.35 (18.00–56.91) ^b
GBM2-4M		
Control	8	49.00 (24.43–53.00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	18.79 (3.00–31.10) ^c

^a *p* = 0.02, compared with control; ^b *p* = 0.0008, compared with control; ^c *p* = 0.0009, compared with control.

Table A3. Percentage of p53-positive cells in the GBM patient tumors on CAM.

Patient Study Group	<i>n</i>	p53-Positive Cells (%), Median (Range)
GBM2-2F		
Control	8	50.13 (18.23–94.54)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	12	29.54 (2.01–60.32) ^a
GBM2-3F		
Control	12	62.34 (8.60–93.33)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	23.93 (1.73–43.05) ^b
GBM2-4M		
Control	8	56.58 (22.19–66.00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	24.00 (3.00–32.19) ^c

^a *p* = 0.031, compared with control; ^b *p* = 0.002, compared with control; ^c *p* = 0.006, compared with control.

Table A4. Percentage of EZH2-positive cells in the GBM patient tumors on CAM.

Patient Study Group	<i>n</i>	EZH2-Positive Cells (%), Median (Range)
GBM2-2F		
Control	8	73.48 (54.52–96.08)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	12	48.73 (15.21–96.40) ^a
GBM2-3F		
Control	12	91.11 (79.90–96.22)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	62.50 (2.00–92.17) ^b
GBM2-4M		
Control	8	58.11 (39.00–65.00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	36.00 (16.00–43.36) ^c

^a *p* = 0.047, compared with control; ^b *p* = 0.0004, compared with control; ^c *p* = 0.0005, compared with control.

Table A5. Percentage of vimentin-positive cells in the GBM patient tumors on CAM.

Patient Study Group	<i>n</i>	Vimentin-Positive Cells (%), Median (Range)
GBM2-2F		
Control	8	45.85 (19.20–76.45)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	12	13.94 (2.02–56.02) ^a
GBM2-3F		
Control	12	26.91 (2.15–91.00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	5.14 (1.18–31.25) ^b
GBM2-4M		
Control	8	79.00 (35.38–89.00)
2 mM NaVPA–3 mM NaDCA-treated	10	49.50 (29.00–70.72) ^c

^a *p* = 0.002, compared with control; ^b *p* = 0.043, compared with control; ^c *p* = 0.03, compared with control.

References

- Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Gittleman, H.; Patil, N.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncol.* **2019**, *21*, v1–v100. [CrossRef]
- Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncol.* **2021**, *23*, III1–III105. [CrossRef]
- Yalamarty, S.S.K.; Filipczak, N.; Li, X.; Subhan, M.A.; Parveen, F.; Ataide, J.A.; Rajmalani, B.A.; Torchilin, V.P. Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). *Cancers* **2023**, *15*, 2116. [CrossRef] [PubMed]
- Tan, A.C.; Ashley, D.M.; López, G.Y.; Malinzak, M.; Friedman, H.S.; Khasraw, M. Management of Glioblastoma: State of the Art and Future Directions. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 299–312. [CrossRef] [PubMed]
- Stupp, R.; Hegi, M.E.; Gilbert, M.R.; Chakravarti, A. Chemoradiotherapy in Malignant Glioma: Standard of Care and Future Directions. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 4127–4136. [CrossRef]
- Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [CrossRef] [PubMed]
- Thomas, G.; Rahman, R. Evolution of Preclinical Models for Glioblastoma Modelling and Drug Screening. *Curr. Oncol. Rep.* **2025**, *27*, 601–624. [CrossRef]
- Xu, Y.; Xue, D.; Bankhead, A.; Neamati, N. Why All the Fuss about Oxidative Phosphorylation (OXPHOS)? *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 14276–14307. [CrossRef]
- Wu, Z.; Ho, W.S.; Lu, R. Targeting Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Glioblastoma Therapy. *NeuroMolecular Med.* **2022**, *24*, 18–22. [CrossRef]
- Larrieu, C.M.; Storevik, S.; Guyon, J.; Pagano Zottola, A.C.; Bouchez, C.L.; Derieppe, M.A.; Tan, T.Z.; Miletic, H.; Lorens, J.; Tronstad, K.J.; et al. Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development. *Cancers* **2022**, *14*, 3769. [CrossRef]
- Chinopoulos, C.; Seyfried, T.N. Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN Neuro* **2018**, *10*, 1759091418818261. [CrossRef]
- Shen, H.; Yu, M.; Tsoli, M.; Chang, C.; Joshi, S.; Liu, J.; Ryall, S.; Chornenkyy, Y.; Siddaway, R.; Hawkins, C.; et al. Targeting Reduced Mitochondrial DNA Quantity as a Therapeutic Approach in Pediatric High-Grade Gliomas. *Neuro-Oncol.* **2020**, *22*, 139–151. [CrossRef]
- Sutendra, G.; Michelakis, E.D. Pyruvate Dehydrogenase Kinase as a Novel Therapeutic Target in Oncology. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 38. [CrossRef] [PubMed]
- Kankotia, S.; Stacpoole, P.W. Dichloroacetate and Cancer: New Home for an Orphan Drug? *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2014**, *1846*, 617–629. [CrossRef] [PubMed]
- Stacpoole, P.W.; Nagaraja, N.V.; Hutson, A.D. Efficacy of Dichloroacetate as a Lactate-Lowering Drug. *J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *43*, 683–691. [CrossRef]
- Stakišaitis, D.; Damaskienė, E.; Čurkūnavičiūtė, R.; Juknevičienė, M.; Alonso, M.M.; Valančiūtė, A.; Ročka, S.; Balnytė, I. The Effectiveness of Dichloroacetate on Human Glioblastoma Xenograft Growth Depends on Na⁺ and Mg²⁺ Cations. *Dose-Response* **2021**, *19*, 1559325821990166. [CrossRef] [PubMed]

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18010052>

17. Shen, H.; Hau, E.; Joshi, S.; Dilda, P.J.; McDonald, K.L. Sensitization of Glioblastoma Cells to Irradiation by Modulating the Glucose Metabolism. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1794–1804. [CrossRef]
18. Han, W.; Guan, W. Valproic Acid: A Promising Therapeutic Agent in Glioma Treatment. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 687362. [CrossRef] [PubMed]
19. Chang, C.Y.; Li, J.R.; Wu, C.C.; Ou, Y.C.; Chen, W.Y.; Kuan, Y.H.; Wang, W.Y.; Chen, C.J. Valproic Acid Sensitizes Human Glioma Cells to Gefitinib-Induced Autophagy. *IUBMB Life* **2015**, *67*, 869–879. [CrossRef]
20. Fang, E.; Wang, J.; Hong, M.; Zheng, L.; Tong, Q. Valproic Acid Suppresses Warburg Effect and Tumor Progression in Neuroblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *508*, 9–16. [CrossRef]
21. Babu, E.; Ramachandran, S.; Coothankandaswamy, V.; Elangovan, S.; Prasad, P.D.; Ganapathy, V.; Thangaraju, M. Role of SLC5A8, a Plasma Membrane Transporter and a Tumor Suppressor, in the Antitumor Activity of Dichloroacetate. *Oncogene* **2011**, *30*, 4026–4037. [CrossRef] [PubMed]
22. Veronezi, G.M.B.; Felisbino, M.B.; Gatti, M.S.V.; Mello, M.L.S.; De Vidal, B.C. DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis, Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170740. [CrossRef]
23. Singh, N.; Miner, A.; Henniss, L.; Mittal, S. Mechanisms of Temozolomide Resistance in Glioblastoma—A Comprehensive Review. *Cancer Drug Resist.* **2021**, *4*, 17–43. [CrossRef] [PubMed]
24. Kavaliauskaitė, D.; Stakišaitis, D.; Martinkutė, J.; Šlekienė, L.; Kazlauskas, A.; Balnytė, I.; Lesauskaitė, V.; Valančiūtė, A. The Effect of Sodium Valproate on the Glioblastoma U87 Cell Line Tumor Development on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and on EZH2 and P53 Expression. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 6326053. [CrossRef]
25. Skredėnienė, R.; Stakišaitis, D.; Valančiūtė, A.; Balnytė, I. In Vivo and In Vitro Experimental Study Comparing the Effect of a Combination of Sodium Dichloroacetate and Valproic Acid with That of Temozolomide on Adult Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 6784. [CrossRef]
26. Alghamri, M.S.; McClellan, B.L.; Hartlage, M.S.; Haase, S.; Faisal, S.M.; Thalla, R.; Dabaja, A.; Banerjee, K.; Carney, S.V.; Mujeeb, A.A.; et al. Targeting Neuroinflammation in Brain Cancer: Uncovering Mechanisms, Pharmacological Targets, and Neuropharmaceutical Developments. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 680021. [CrossRef] [PubMed]
27. DeCordova, S.; Shastri, A.; Tsolaki, A.G.; Yasmin, H.; Klein, L.; Singh, S.K.; Kishore, U. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1402. [CrossRef]
28. Stakišaitis, D.; Kapočius, V.; Tatarūnas, V.; Gečys, D.; Mickienė, A.; Tamošiūtis, T.; Ugenskienė, R.; Vaitkevičius, A.; Balnytė, I.; Lesauskaitė, V. Effects of Combined Treatment with Sodium Dichloroacetate and Sodium Valproate on the Genes in Inflammation- and Immune-Related Pathways in T Lymphocytes from Patients with SARS-CoV-2 Infection with Pneumonia: Sex-Related Differences. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 409. [CrossRef]
29. Stakišaitis, D.; Kapočius, L.; Kilimaitė, E.; Gečys, D.; Šlekienė, L.; Balnytė, I.; Palubinskienė, J.; Lesauskaitė, V. Preclinical Study in Mouse Thymus and Thymocytes: Effects of Treatment with a Combination of Sodium Dichloroacetate and Sodium Valproate on Infectious Inflammation Pathways. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2715. [CrossRef]
30. Charbonneau, M.; Harper, K.; Brochu-Gaudreau, K.; Perreault, A.; Roy, L.O.; Lucien, F.; Tian, S.; Fortin, D.; Dubois, C.M. The Development of a Rapid Patient-Derived Xenograft Model to Predict Chemotherapeutic Drug Sensitivity/Resistance in Malignant Glial Tumors. *Neuro-Oncol.* **2023**, *25*, 1605. [CrossRef]
31. Williams, J.A. Using Pdx for Preclinical Cancer Drug Discovery: The Evolving Field. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 41. [CrossRef] [PubMed]
32. van Bodegraven, E.J.; van Asperen, J.V.; Robe, P.A.J.; Hol, E.M. Importance of GFAP Isoform-Specific Analyses in Astrocytoma. *Glia* **2019**, *67*, 1417–1433. [CrossRef] [PubMed]
33. Simone, L.; Capobianco, D.L.; Di Palma, F.; Binda, E.; Legnani, F.G.; Vescovi, A.L.; Svelto, M.; Pisani, F. GFAP Serves as a Structural Element of Tunneling Nanotubes between Glioblastoma Cells and Could Play a Role in the Intercellular Transfer of Mitochondria. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*, 1221671. [CrossRef]
34. Ahmadipour, Y.; Gembruch, O.; Pierscianek, D.; Sure, U.; Jabbarli, R. Does the Expression of Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) Stain in Glioblastoma Tissue Have a Prognostic Impact on Survival? *Neurochirurgie* **2020**, *66*, 150–154. [CrossRef]
35. Guzińska-Ustymowicz, K.; Pryczynicz, A.; Kemona, A.; Czyżewska, J. Correlation between Proliferation Markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and Antiapoptotic Protein Bcl-2 in Colorectal Cancer. *Anticancer. Res.* **2009**, *29*, 3049–3052.
36. Korshunov, A.; Golanov, A.; Sycheva, R.; Pronin, I. Prognostic Value of Tumour Associated Antigen Immunoreactivity and Apoptosis in Cerebral Glioblastomas: An Analysis of 168 Cases. *J. Clin. Pathol.* **1999**, *52*, 574–580. [CrossRef]
37. Xu, J.; Morris, G.F. P53-Mediated Regulation of Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cells Exposed to Ionizing Radiation. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 12–20. [CrossRef]
38. Zhang, S.; Carlsen, L.; Hernandez Borrero, L.; Seyhan, A.A.; Tian, X.; El-Deiry, W.S. Advanced Strategies for Therapeutic Targeting of Wild-Type and Mutant P53 in Cancer. *Biomolecules* **2022**, *12*, 548. [CrossRef] [PubMed]
39. Kennedy, M.C.; Lowe, S.W. Mutant P53: It's Not All One and the Same. *Cell Death Differ.* **2022**, *29*, 983–987. [CrossRef]

40. Babamohamadi, M.; Babaei, E.; Ahmed Salih, B.; Babamohammadi, M.; Jalal Azeze, H.; Othman, G. Recent Findings on the Role of Wild-Type and Mutant P53 in Cancer Development and Therapy. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 903075. [CrossRef]
41. Kanapathipillai, M. Treating P53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers* **2018**, *10*, 154. [CrossRef]
42. Issaeva, N. P53 Signaling in Cancers. *Cancers* **2019**, *11*, 332. [CrossRef] [PubMed]
43. Duffy, M.J.; Synnott, N.C.; Crown, J. Mutant P53 as a Target for Cancer Treatment. *Eur. J. Cancer* **2017**, *83*, 258–265. [CrossRef]
44. Chen, Y.; Hou, S.; Jiang, R.; Sun, J.; Cheng, C.; Qian, Z. EZH2 Is a Potential Prognostic Predictor of Glioma. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25*, 925–936. [CrossRef]
45. Zhang, J.; Chen, L.; Han, L.; Shi, Z.; Zhang, J.; Pu, P.; Kang, C. EZH2 Is a Negative Prognostic Factor and Exhibits Pro-Oncogenic Activity in Glioblastoma. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 929–936. [CrossRef]
46. Chang, C.J.; Hung, M.C. The Role of EZH2 in Tumour Progression. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 243–247. [CrossRef]
47. Simon, J.A.; Lange, C.A. Roles of the EZH2 Histone Methyltransferase in Cancer Epigenetics. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2008**, *647*, 21–29. [CrossRef]
48. Stitzlein, L.M.; Adams, J.T.; Stitzlein, E.N.; Dudley, R.W.; Chandra, J. Current and Future Therapeutic Strategies for High-Grade Gliomas Leveraging the Interplay between Epigenetic Regulators and Kinase Signaling Networks. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2024**, *43*, 12. [CrossRef] [PubMed]
49. Liu, Y.; Zhao, S.; Chen, Y.; Ma, W.; Lu, S.; He, L.; Chen, J.; Chen, X.; Zhang, X.; Shi, Y.; et al. Vimentin Promotes Glioma Progression and Maintains Glioma Cell Resistance to Oxidative Phosphorylation Inhibition. *Cell. Oncol.* **2023**, *46*, 1791–1806. [CrossRef]
50. Zeisberg, M.; Neilson, E.G. Biomarkers for Epithelial-Mesenchymal Transitions. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1429–1437. [CrossRef] [PubMed]
51. Lai, S.W.; Huang, B.R.; Liu, Y.S.; Lin, H.Y.; Chen, C.C.; Tsai, C.F.; Lu, D.Y.; Lin, C. Differential Characterization of Temozolomide-Resistant Human Glioma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 127. [CrossRef]
52. Zottel, A.; Jovčevska, I.; Samec, N.; Komel, R. Cytoskeletal Proteins as Glioblastoma Biomarkers and Targets for Therapy: A Systematic Review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2021**, *160*, 103283. [CrossRef] [PubMed]
53. Stakišaitis, D.; Valančiūtė, A.; Balnytė, I.; Lesauskaitė, V.; Juknevičienė, M.; Stanevičienė, J.; Juozas, J.D. Valpro Rūgšties ir Dichloroacetato Druskų Derinio Taikymas Vėžio Gydymui. LT6874B, 25 October 2021.
54. European Patent Application. Derivative of Valproic Acid and Dichloroacetate Used for the Treatment of Cancer. European Patent Application No. 21168796.7, 16 April 2021. Available online: <https://register.epo.org/application?number=EP21168796> (accessed on 6 November 2025).
55. Šlekienė, L.; Stakišaitis, D.; Balnytė, I.; Valančiūtė, A. Sodium Valproate Inhibits Small Cell Lung Cancer Tumor Growth on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and Reduces the P53 and EZH2 Expression. *Dose-Response* **2018**, *16*, 1559325818772486. [CrossRef] [PubMed]
56. Ribatti, D. Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2008**, *270*, 181–224. [CrossRef] [PubMed]
57. Angom, R.S.; Nakka, N.M.R.; Bhattacharya, S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sci.* **2023**, *13*, 1536. [CrossRef]
58. Rončević, A.; Koruga, N.; Soldo Koruga, A.; Rončević, R.; Rotim, T.; Šimundić, T.; Kretić, D.; Perić, M.; Turk, T.; Štimac, D. Personalized Treatment of Glioblastoma: Current State and Future Perspective. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1579. [CrossRef]
59. Chu, P.Y.; Koh, A.P.F.; Antony, J.; Huang, R.Y.J. Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies. *Cells Tissues Organs* **2022**, *211*, 222–237. [CrossRef]
60. Ribatti, D. *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis: The CAM Assay in the Study of Angiogenesis and Metastasis*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010.
61. Kaufman, N.; Kinney, T.D.; Mason, E.J.; Prieto, L.C. Maintenance of Human Neoplasm on the Chick Chorioallantoic Membrane. *Am. J. Pathol.* **1956**, *32*, 271–285.
62. Ausprunk, D.H.; Knighton, D.R.; Folkman, J. Vascularization of Normal and Neoplastic Tissues Grafted to the Chick Chorioallantoic. Role of Host and Preexisting Graft Blood Vessels. *Am. J. Pathol.* **1975**, *79*, 597–618.
63. Uloza, V.; Kuzminienė, A.; Šalomskaite-Davalgienė, S.; Palubinskienė, J.; Balnytė, I.; Ulozienė, I.; Šaferis, V.; Valančiūtė, A. Effect of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Tissue Implantation on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: Morphometric Measurements and Vascularity. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 629754. [CrossRef]
64. Ribatti, D.; Vacca, A.; Roncali, L.; Dammacco, F. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model for in Vivo Research on Angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **1996**, *40*, 1189–1197. [CrossRef]
65. Balčiūnienė, N.; Tamašauskas, A.; Valančiūtė, A.; Deltuva, V.; Vaitiekaitis, G.; Gudiniavičienė, I.; Weis, J.; von Keyserlingk, D.G. Histology of Human Glioblastoma Transplanted on Chicken Chorioallantoic Membrane. *Medicina* **2009**, *45*, 123. [CrossRef]
66. Gečys, D.; Akramas, L.; Preikšaitis, A.; Balnytė, I.; Vaitkevičius, A.; Šimienė, J.; Stakišaitis, D. Comparison of the Effect of the Combination of Sodium Valproate and Sodium Dichloroacetate on the Expression of SLC12A2, SLC12A5, CDH1, CDH2, EZH2, and GFAP in Primary Female Glioblastoma Cells with That of Temozolomide. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 1161. [CrossRef]

67. Escartin, C.; Galea, E.; Lakatos, A.; O'Callaghan, J.P.; Petzold, G.C.; Serrano-Pozo, A.; Steinhäuser, C.; Volterra, A.; Carmignoto, G.; Agarwal, A.; et al. Reactive Astrocyte Nomenclature, Definitions, and Future Directions. *Nat. Neurosci.* **2021**, *24*, 312–325. [CrossRef] [PubMed]
68. Zhao, X.; Zhang, M.; Zou, W.Z.; Li, C.; Zhang, S.; Lv, Y.; Su, L.; Ji, F.; Jiao, J.; Gao, Y. Ezh2 Regulates Early Astrocyte Morphogenesis and Influences the Coverage of Astrocytic Endfeet on the Vasculature. *Cell Prolif.* **2025**, *58*, e70015. [CrossRef] [PubMed]
69. Sereika, M.; Urbanaviciute, R.; Tamasauskas, A.; Skiriute, D.; Vaitkiene, P. GFAP Expression Is Influenced by Astrocytoma Grade and Rs2070935 Polymorphism. *J. Cancer* **2018**, *9*, 4496–4502. [CrossRef]
70. Lv, Q.; Zhang, J.; Yi, Y.; Huang, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhang, W. Proliferating Cell Nuclear Antigen Has an Association with Prognosis and Risks Factors of Cancer Patients: A Systematic Review. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 6209–6217. [CrossRef]
71. Ratliff, M.; Karimian-Jazi, K.; Hoffmann, D.C.; Rauschenbach, L.; Simon, M.; Hai, L.; Mandelbaum, H.; Schubert, M.C.; Kessler, T.; Uhlig, S.; et al. Individual Glioblastoma Cells Harbor Both Proliferative and Invasive Capabilities during Tumor Progression. *Neuro-Oncol.* **2023**, *25*, 2150–2162. [CrossRef]
72. Wang, H.; Guo, M.; Wei, H.; Chen, Y. Targeting P53 Pathways: Mechanisms, Structures, and Advances in Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 92. [CrossRef]
73. AghaAmiri, S.; Ghosh, S.C.; Hernandez Vargas, S.; Halperin, D.M.; Azhdarinia, A. Somatostatin Receptor Subtype-2 Targeting System for Specific Delivery of Temozolomide. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 2425–2437. [CrossRef]
74. Gilbert, M.R.; Wang, M.; Aldape, K.D.; Stupp, R.; Hegi, M.E.; Jaeckle, K.A.; Armstrong, T.S.; Wefel, J.S.; Won, M.; Blumenthal, D.T.; et al. Dose-Dense Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 4085–4091. [CrossRef]
75. Le Rhun, E.; Preusser, M.; Roth, P.; Reardon, D.A.; van den Bent, M.; Wen, P.; Reifenberger, G.; Weller, M. Molecular Targeted Therapy of Glioblastoma. *Cancer Treat. Rev.* **2019**, *80*, 101896. [CrossRef]
76. Tsai, C.Y.; Ko, H.J.; Chiou, S.J.; Lai, Y.L.; Hou, C.C.; Javaria, T.; Huang, Z.Y.; Cheng, T.S.; Hsu, T.I.; Chuang, J.Y.; et al. Nbm-Bmx, an Hdac8 Inhibitor, Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme by Downregulating the β -Catenin/c-Myc/Sox2 Pathway and Upregulating P53-Mediated Mgmt Inhibition. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5907. [CrossRef] [PubMed]
77. Osanai, T.; Takagi, Y.; Toriya, Y.; Nakagawa, T.; Aruga, T.; Iida, S.; Uetake, H.; Sugihara, K. Inverse Correlation between the Expression of O6-Methylguanine-DNA Methyl Transferase (MGMT) and P53 in Breast Cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2005**, *35*, 121–125. [CrossRef]
78. Ryu, C.H.; Yoon, W.S.; Park, K.Y.; Kim, S.M.; Lim, J.Y.; Woo, J.S.; Jeong, C.H.; Hou, Y.; Jeun, S.S. Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 987495. [CrossRef]
79. Li, Z.; Xia, Y.; Bu, X.; Yang, D.; Yuan, Y.; Guo, X.; Zhang, G.; Wang, Z.; Jiao, J. Effects of Valproic Acid on the Susceptibility of Human Glioma Stem Cells for TMZ and ACNU. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 9877–9883. [CrossRef]
80. Zhao, G.; Deng, Z.; Li, X.; Wang, H.; Chen, G.; Feng, M.; Zhou, Y. Targeting EZH2 regulates the biological characteristics of glioma stem cells via the Notch1 pathway. *Exp. Brain Res.* **2023**, *241*, 2409–2418. [CrossRef]
81. Chen, X.; Lin, S.; You, H.; Chen, J.; Wu, Q.; Yin, K.; Lin, F.; Zhang, Y.; Song, J.; Ding, C.; et al. Integrating Metabolic RNA Labeling-Based Time-Resolved Single-Cell RNA Sequencing with Spatial Transcriptomics for Spatiotemporal Transcriptomic Analysis. *Small Methods* **2025**, *9*, e2401297. [CrossRef]
82. Virtakoivu, R.; Mai, A.; Mattila, E.; De Franceschi, N.; Imanishi, S.Y.; Corthals, G.; Kaukonen, R.; Saari, M.; Cheng, F.; Torvaldsen, E.; et al. Vimentin-ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2349–2362. [CrossRef] [PubMed]
83. Iser, I.C.; Pereira, M.B.; Lenz, G.; Wink, M.R. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *Med. Res. Rev.* **2017**, *37*, 271–313. [CrossRef] [PubMed]
84. Kyritsi, K.; Ye, J.; Douglass, E.; Pacholczyk, R.; Tsuboi, N.; Otani, Y.; Wang, Q.; Munn, D.H.; Kaur, B.; Hong, B. Brain CD73 Modulates Interferon Signaling to Regulate Glioblastoma Invasion. *Neuro-Oncol. Adv.* **2025**, *7*, vda080. [CrossRef]
85. Ben-David, U.; Ha, G.; Tseng, Y.Y.; Greenwald, N.F.; Oh, C.; Shih, J.; McFarland, J.M.; Wong, B.; Boehm, J.S.; Beroukhim, R.; et al. Patient-Derived Xenografts Undergo Mouse-Specific Tumor Evolution. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 1567–1575. [CrossRef]
86. Yoshida, G.J. Applications of Patient-Derived Tumor Xenograft Models and Tumor Organoids. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*, 4. [CrossRef] [PubMed]
87. Zeng, W.; Tang, Z.; Li, Y.; Yin, G.; Liu, Z.; Gao, J.; Chen, Y.; Chen, F. Patient-Derived Xenografts of Different Grade Gliomas Retain the Heterogeneous Histological and Genetic Features of Human Gliomas. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 1. [CrossRef]
88. Ji, X.; Chen, S.; Guo, Y.; Li, W.; Qi, X.; Yang, H.; Xiao, S.; Fang, G.; Hu, J.; Wen, C.; et al. Establishment and Evaluation of Four Different Types of Patient-Derived Xenograft Models. *Cancer Cell Int.* **2017**, *17*, 122. [CrossRef]
89. Joo, K.M.; Kim, J.; Jin, J.; Kim, M.; Seol, H.J.; Muradov, J.; Yang, H.; Choi, Y.L.; Park, W.Y.; Kong, D.S.; et al. Patient-Specific Orthotopic Glioblastoma Xenograft Models Recapitulate the Histopathology and Biology of Human Glioblastomas In Situ. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 260–273. [CrossRef]

90. Fei, X.F.; Zhang, Q.B.; Dong, J.; Diao, Y.; Wang, Z.M.; Li, R.J.; Wu, Z.C.; Wang, A.D.; Lan, Q.; Zhang, S.M.; et al. Development of Clinically Relevant Orthotopic Xenograft Mouse Model of Metastatic Lung Cancer and Glioblastoma through Surgical Tumor Tissues Injection with Trocar. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2010**, *29*, 84. [CrossRef]
91. William, D.; Mullins, C.S.; Schneider, B.; Orthmann, A.; Lamp, N.; Krohn, M.; Hoffmann, A.; Classen, C.F.; Linnebacher, M. Optimized Creation of Glioblastoma Patient Derived Xenografts for Use in Preclinical Studies. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 27. [CrossRef] [PubMed]
92. Chen, R.; Zhang, M.; Zhou, Y.; Guo, W.; Yi, M.; Zhang, Z.; Ding, Y.; Wang, Y. The Application of Histone Deacetylases Inhibitors in Glioblastoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*, 138. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PRIEDAI



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el. paštas: kaunorbtek@lsmuni.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2020-08-31 Nr. BE-2-80

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Eksperimentinis vaistinių preparatų poveikio glioblastomos 3D navikams, suformuotiems iš pacientų naviko audinio ląstelių, tyrimas“	
Protokolo Nr.:	P-MIP-20-36 (2020-03-20)
Data:	2020-06-20
Versija:	2A
Asmens informavimo forma	Versija 2B; data 2020-07-15
Pagrindinis tyrėjas:	Gyd. habil. dr. Donatas Stakišaitis
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Histologijos ir embriologijos katedra
Įstaigos pavadinimas:	
Adresas:	Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio **2020 m. liepos mėn. 8 d.** (protokolo Nr. BE-10-7) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininio tyrimų etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija	Taip
2.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmunologija, vidaus ligos	Ne
3.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija	Taip
4.	Doc. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija	Taip
5.	Prof. Kęstutis Petrikonis	Neurologija	Taip
6.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Filologija	Taip
7.	Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata	Taip
8.	Aušra Degutytė	Visuomenės sveikata	Ne
9.	Jurgita Laurinaitytė	Teisė	Ne

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininio tyrimų etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Kauno RBTEK pirmininkas



Prof. Edgaras Stankevičius

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Rūta Skredėnienė

Address: Lithuanian University of Health Sciences,
Department of Histology and Embryology,
A. Mickevičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania

E-mail: ruta.skredeniene@lsmu.lt

Education:

2019-09-01–
2025-08-31 PhD study at Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

2017-09-01–
2019-06-30 Master's degree in medical biology,
Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

2016-09-01–
2017-06-30 Additional studies in molecular biology and
biotechnologies, Vytautas Magnus University,
Kaunas, Lithuania

2013-09-01–
2016-06-30 Bachelor's degree in biomedical diagnostics,
Kauno kolegija Higher Education Institution,
Kaunas, Lithuania

Work experience:

2025-09-01–
still present Lecturer in the Department of Histology and
Embryology, Medicine Academy, Faculty of Medicine,
Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

2016-03-03–
still present Senior laboratory technician in the Department of
Histology and Embryology, Medicine Academy,
Faculty of Medicine, Lithuanian University of
Health Sciences, Kaunas, Lithuania

PADĖKA

Dėkoju mokslinio darbo vadovei prof. dr. Ingridai Balnytei ir konsultantui prof. habil. dr. Donatui Stakišaičiui už vadovavimą, patarimus, visapusišką pagalbą ir nesibaigiančią kantrybę doktorantūros studijų metu, atliekant eksperimentus, rengiant tezes konferencijoms, rašant straipsnius ir disertaciją.

Taip pat dėkoju gydytojui neurochirurgui doc. dr. Aidanui Preikšaičiui už tyrimams suteiktą glioblastomos pacientų biopsinę medžiagą.

Esu dėkinga prof. habil. dr. Angelijai Valančiūtei už palaikymą, konstruktyvius patarimus ir įkvėpimą mokslinėje veikloje.

Taip pat dėkoju nuostabiai draugei ir kolegei dr. Mildai Juknevičienei už pagalbą ir palaikymą studijų metu, dr. Eligijai Damanskienai bei visoms Histologijos ir embriologijos katedros kolegėms už geranoriškumą, draugišką ir motyvuojančią darbo aplinką.

Dėkoju prof. habil. dr. Vaivai Lesauskaitei už suteiktą galimybę naudotis Kardiologijos instituto Molekulinės onkologijos laboratorija ir dr. Dovydui Gečiui už pagalbą bei bendradarbiavimą mokslinių tyrimų projektuose.

Esu dėkinga dr. Arūnui Kazlauskui ir prof. Marta Maria Alonso už suteiktas ląstelių linijas.

Dėkoju Edvinui Urniežiui už galimybę disertacijoje panaudoti jo skaičiavimų duomenis ir Linui Kapočiui už pagalbą su duomenų analize.

Dėkoju LSMU Mokslo fondui ir Lietuvos mokslo tarybai (projekto Nr. P-MIP-20-36) už materialinę paramą.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai už visapusišką palaikymą. Iš visos širdies dėkoju savo vyrui Tomui už nuolatinį palaikymą, tikėjimą manimi ir besąlygišką meilę ne tik šiame etape, bet ir visoje mūsų bendro gyvenimo kelionėje. Kartu su sūnumi Adu jūs esate didžiausias stiprybės šaltinis.