

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Milda Juknevičienė

**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, 2024

Disertacija rengta 2018–2023 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Histologijos ir embriologijos katedroje.

Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. Donatas Stakišaitis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologijos mokslo kryptis – N 010).

Konsultantas

prof. dr. Ingrida Balnytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

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

Nariai:

prof. dr. Edgaras Stankevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Neringa Paužienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

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

prof. dr. Mara Pilmane (Rygos Stradinio universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija bus ginama viešajame biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2024 m. gruodžio mėn. 18 d. 15.00 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto prof. J. Žilinsko auditorijoje.

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

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Milda Juknevičienė

**THE PHARMACOLOGICAL EFFECTS
OF DICHLOROACETATE, VALPROIC
ACID AND THEIR COMBINATION ON
RAT THYMOCYTES AND THE
DEVELOPMENT OF ADULT HUMAN
GLIOBLASTOMA**

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biology (N 010)

Kaunas, 2024

The 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 2018–2023.

Scientific Supervisor

Prof. Habil. Dr. Donatas Stakišaitis (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Consultant

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

Members:

Prof. Dr. Edgaras Stankevičius (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Neringa Paužienė (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, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences at 3 pm on the 18th of December, 2024 in the Auditorium of Prof. J. Žilinskas.
Address: A. Mickevičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS.....	9
Darbo tikslas.....	10
Darbo uždaviniai.....	10
Darbo naujumas ir aktualumas.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1. Glioblastomos gydymo situacija.....	12
1.2. Tiriamų vaistinių preparatų priešvėžiniai veikimo mechanizmai.....	17
1.3. Kancerogenezė ir uždegimas.....	20
1.4. Valpro rūgšties ir dichloroacetato derinio tyrimų duomenys.....	22
1.5. Vėžio žymenų tyrimai – individualizuotos terapijos pagrindas.....	24
1.6. Eksperimentiniai modeliai, taikyti tyrimams.....	27
2. TIRTA MEDŽIAGA IR TYRIMŲ METODAI.....	30
2.1. Žiurkių tyrimo medžiaga ir atlikti tyrimai.....	31
2.1.1. Wistar žiurkių priežiūra ir gydymas.....	32
2.1.2. Žiurkių šlapimo tyrimai.....	32
2.1.3. Žiurkių kraujo serumo tyrimai.....	33
2.1.4. Žiurkių paruošimo tolesniems tyrimams ir tėkmės citometrijos metodikos.....	33
2.1.5. Žiurkių inksto, čiobrialiaukės histologinių preparatų paruošimas ir imunohistocheminis dažymas.....	34
2.1.6. Žiurkių TAL aukščio inkste ir HK skaičiaus čiobrialiaukėje tyrimo metodikos.....	34
2.1.7. RNR išskyrimas, kiekio ir kokybės nustatymas, santykinės genų raiškos analizė.....	35
2.2. Glioblastomos ląstelių navikų tyrimo <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> medžiaga ir atlikti tyrimai.....	36
2.2.1. Ląstelių linijos ir jų paruošimas tyrimui.....	37
2.2.2. Pirminių glioblastomos naviko ląstelių suspensijos paruošimas.....	38
2.2.3. CAM modelio taikymas U87, T98G ar 22-SANTA-2F ląstelių navikų tyrimui.....	39
2.2.4. Ląstelių linijų U87, T98G ar 22-SANTA-2F ląstelių navikų formavimas, jų užsodinimas ant CAM, <i>in vivo</i> biomikroskopija ir CAM su naviku paėmimas.....	39
2.2.5. Ląstelių linijų U87, T98G ar pirminių glioblastomos naviko ląstelių vaistinio preparato poveikio <i>in vitro</i> tyrimas.....	40
2.2.6. Ląstelių linijų U87, T98G ar pirminių glioblastomos ląstelių navikų invazijos į CAM, CAM storio kraujagyslių skaičiaus ir vėžio žymenų imunohistocheminis vertinimas.....	40
2.2.7. Pirminių glioblastomos ląstelių RNR mėginių ruošimas sekoskaitai.....	41
2.2.8. Sekoskaitos duomenų analizė.....	41
2.3. Statistinė analizė.....	42

3.	TYRIMŲ REZULTATAI.....	43
3.1.	VPA–NaDCA vienos paros gydymo ir ilgalaikio gydymo poveikio intaktinėms žiurkėms tyrimo rezultatai	43
3.1.1.	Tirtų žiurkių grupių kūno masės, blužnies, inksto ir čiobrialiaukės masės vertinimas	43
3.1.2.	Tirtų žiurkių grupių paros šlapimo vertinimas	44
3.1.3.	Tirtų žiurkių grupių kraujo serumo vertinimas	47
3.1.4.	Tirtų žiurkių histologinio tyrimo rezultatai	49
3.1.4.1.	Tirtų žiurkių grupių inkstų TAL aukščio vertinimas	49
3.1.4.2.	Tirtų žiurkių čiobrialiaukės Hasalio kūnelių skaičiaus vertinimas	50
3.1.5.	Tirtų žiurkių grupių timocitų ląstelės ciklo vertinimas	52
3.2.	Ilgalaikio VPA gydymo poveikio tirtų žiurkių grupių timocitų santykinei <i>Slc5a8</i> , <i>Slc12a2</i> ir <i>Slc12a5</i> raiškai vertinimas	52
3.3.	Ilgalaikio VPA–NaDCA gydymo poveikio tirtų žiurkių grupių timocitų santykinei <i>Slc5a8</i> , <i>Slc12a2</i> ir <i>Slc12a5</i> raiškai vertinimas	57
3.4.	MgDCA, VPA–MgDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikams ant CAM tyrimo rezultatai	58
3.4.1.	Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM stereomikroskopijos vertinimas	58
3.4.2.	Tirtų U87 ir T98G navikų invazijos į CAM dažnio ir CAM storio po naviku vertinimas	60
3.4.3.	MgDCA, VPA–MgDCA ir TMZ poveikio neoangiogenezei ir kraujagyslių skaičiui CAM po U87 ir T98G ląstelių navikais vertinimas	64
3.4.4.	Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM PLBA raiškos vertinimas	69
3.4.5.	Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM EZH2 raiškos vertinimas	71
3.4.6.	Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM p53 raiškos vertinimas	74
3.5.	VPA poveikio U87 ir T98G ląstelėms <i>in vitro</i> tyrimo rezultatai	77
3.6.	MgDCA, VPA–MgDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelėms <i>in vitro</i> vertinimas	81
3.7.	VPA–MgDCA poveikio paciento pirminių glioblastomos 22-SANTA-2F ląstelių navikui ant CAM ir <i>in vitro</i> tyrimo rezultatai	87
3.7.1.	Pirminių glioblastomos ląstelių navikų invazijos į CAM dažnio, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus po naviku vertinimas	87
3.7.2.	22-SANTA-2F naviko ant CAM PLBA, EZH2 ir p53 raiškos vertinimas	88
3.7.3.	22-SANTA-2F ląstelių <i>SLC12A2</i> , <i>SLC5A8</i> , <i>SLC12A5</i> , <i>CDH1</i> , <i>CDH2</i> ir <i>GAPDH</i> raiškos <i>in vitro</i> vertinimas	89
3.8.	VPA–MgDCA poveikio pirminių glioblastomos ląstelių genų, susijusių su apoptozės indukcija (proapoptozinis poveikis), raiškai vertinimas: sekoskaitos tyrimo duomenys	90
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	93
4.1.	Gydymo VPA–NaDCA ar VPA poveikis žiurkėms, čiobrialiaukei, timocitams	93
4.2.	U87 ir T98G ląstelių, jų navikų ant CAM ir gydymo poveikio ypatumai	98
4.3.	VPA–MgDCA poveikis 22-SANTA ląstelėms ir navikui ant CAM	103

IŠVADOS	104
SUMMARY	105
LITERATŪROS SĄRAŠAS	123
PASKELBTOS PUBLIKACIJOS	146
STRAIPSNIAI, KURIUOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI	149
CURRICULUM VITAE	191
PADĖKA	192

SANTRUMPOS

22-SANTA-2F	–	moters pacientės pirminės glioblastomos ląstelės
22-SANTA-4F	–	vyro paciento pirminės glioblastomos ląstelės
AMEM	–	mitybinė terpė (angl. <i>advanced minimum essential medium</i>)
ATP	–	adenozintrifosfatas
CAM	–	viščiuko embriono chorioalantojinė membrana
<i>CDH1</i>	–	E-kadheriną koduojantis genas
<i>CDH2</i>	–	N-kadheriną koduojantis genas
CT	–	slenkstinis ciklas (angl. <i>threshold cycle</i>)
DCA	–	dichloroacetatas
DMEM	–	mitybinė terpė (angl. <i>Dulbecco's modified eagles medium</i>)
EGFR	–	epidermio augimo veiksnio receptorius
EMT	–	epitelinė–mezenchiminė transformacija
EVP	–	embriono vystymosi para
EZH2	–	zeste homologo 2 stipriklis (angl. <i>enhancer of zeste homolog 2</i>)
GABA	–	γ -aminosviesto rūgštis (angl. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
<i>GAPDH</i>	–	gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenazės genas
GBM	–	glioblastoma
HDAC	–	histonų deacetilazė
H-E	–	hematoksilinas ir eozinas
<i>HIF1</i>	–	hipoksiją indukuojantis veiksnys 1
HK	–	Hasalio kūnelis
IHC	–	imunohistochemija
IL	–	interleukinas
KCC	–	K-Cl nešiklis
MgDCA	–	magnio dichloroacetatas
<i>MGMT</i>	–	metilguanino metiltransferazė (angl. <i>methylguanine methyltransferase</i>)
NaDCA	–	natrio dichloroacetatas
NKCC	–	Na-K-Cl nešiklis
PDH	–	piruvato dehidrogenazė
PDK	–	piruvato dehidrogenazės kinazė
PLBA	–	proliferuojančios ląstelės branduolio antigenas (angl. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
ROS	–	deguonies aktyviosios formos (angl. <i>oxygen reactive species</i>)
RPMI-1640	–	mitybinė terpė (angl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>)
RTK	–	tirozino kinazė
<i>SLC12A2</i>	–	Na^+ - K^+ - 2Cl^- nešiklį (NKCC1) koduojantis genas
<i>SLC12A5</i>	–	K^+ - Cl^- nešiklį (KCC2) koduojantis genas
<i>SLC5A8</i>	–	su Na^+ susijusio monokarboksilatų nešiklį (SLC5A8) koduojantis genas
T98G	–	vyro glioblastomos ląstelių linija
TAL	–	inksto Henlės kilpos storoji kylančioji dalis (angl. <i>thick ascending limb</i>)
TMZ	–	temozolomidas
U87	–	U-87 MG moters glioblastomos ląstelių linija
VEGF	–	kraujagyslių endotelio augimo veiksnys
VPA	–	valpro rūgštis
VPA–DCA	–	valpro rūgšties ir dichloroacetato darinys

IVADAS

Glioblastoma (GBM) yra piktybinis smegenų navikas, kuris priskiriamas retoms ligoms. GBM gali susirgti bet kurio amžiaus žmonės, tačiau suserga vyresni asmenys [1]. Pirminė GBM sudaro 80 proc. visų suaugusių žmonių GBM navikų [2], dažniau nustatomų vyrams nei moterims [3]. Moterų išgyvenamumo trukmė po GBM diagnozavimo yra ilgesnė nei vyrų [4], o po pakartotinės GBM operacijos moterų mirties rizika mažesnė nei vyrų [5].

Šiuo metu nėra veiksmingo aukšto laipsnio GBM gydymo. Standartinis GBM gydymas yra kompleksinis, t. y. chirurginė naviko rezekcija, po kurios skiriamas spindulinis gydymas ir chemoterapija. Gydant GBM, pirmos eilės vaistas yra temozolomidas (TMZ) [6, 7], tačiau dažniausiai jis tik nežymiai prailgina ligonio išgyvenamumą [8, 9]. Taikant standartinį gydymą, vidutinis ligonių išgyvenamumas yra 12–15 mėnesių [3, 7]. Didelis GBM pacientų mirtingumas yra susijęs su naviko rezistentiškumu chemoterapijai [10]. Nors prognozė yra nepalanki, tačiau apie 7 proc. GBM pacientų išgyvena 5 metus [3, 11]. Vaistinių preparatų poveikis pirmiausia siejamas su navikinių ląstelių proliferacijos slopinimu ir apoptozės aktyvinimu [12]. TMZ neveiksmingumas siejamas su rezistentiškumu gydymui, todėl liga recidyvuoja, o tai lemia blogą ligos prognozę [13]. Rezistentiškumą gydymui gali lemti paveldimi veiksniai, susiję su didele naviko invazija [14].

GBM ląstelėms yra būdingas pakitęs metabolizmas – suaktyvėję glikoliziniai procesai [15]. Vienas iš šiandienos GBM gydymo taikinių yra poveikis piruvato dehidrogenazės kinazėms (PDK) slopinant jų aktyvumą. PDK yra ląstelių mitochondrijose, o jų didelis glikolizinis aktyvumas siejamas su kancerogeneze [16]. PDK selektyviai inhibuoja piruvato dehidrogenazės (PDH) kompleksą, kuris yra svarbus glikolizės ir oksidacijos mechanizmams [15].

Naviko invaziją gali reguliuoti ir vienvalenčių jonų nešiklių aktyvumas. Na^+ , K^+ ir Cl^- jonų nešikliai yra siejami su ląstelės homeostaze, fiziologiniu ląstelės tūrio reguliavimu, proliferacija, ląstelės išgyvenamumu bei su šiais mechanizmais siejamų genų raiška naviko ląstelėse [10]. Naviko žymenų tyrimas padeda nuspėti atsaką į gydymą, nustatyti ankstyvą vėžio stadiją, ligos prognozę, parinkti tinkamesnį gydymą [17].

Nesant veiksmingo GBM gydymo, svarbu ieškoti būdų kaip sumažinti navikinių ląstelių rezistentiškumą gydymui. Yra duomenų, kad natrio dichloroacetatas (NaDCA) gali padidinti GBM ląstelių jautrumą TMZ [18, 19]. NaDCA yra specifinis PDK inhibitorius, slopinantis pieno rūgšties gamybą [20, 21]. Naviko ląstelėse ir jo mikroaplinkoje [22] glikolizė [23, 24] ir PDK raiška yra suaktyvėję [24]. Gydymas NaDCA skatina navikinių ląstelių apoptozę [25]. Kitas mūsų tirtas vaistinis preparatas yra valpro rūgštis (VPA).

VPA yra histonų deacetilazių (HDAC) inhibitorius [26], epigenetinis modulatorius per metilinimo mechanizmus galintis paveikti genų raišką, slopinti ląstelių proliferaciją, stabdyti ląstelės ciklą ir indukuoti apoptozę. Gydant vėžį, VPA skiriamas ir kaip imunomodulatorius [27]. Yra duomenų, kad VPA gali pagerinti DCA pernešimą į ląstelę per mitochondrinius mechanizmus [28, 29].

Ši disertacija skirta ištirti VPA, DCA ir jų derinio (VPA–DCA) poveikį žiurkėms, jų timocitams, suaugusių žmonių GBM ląstelių linijų ląstelėms ir paciento GBM pirminėms ląstelėms *in vitro*, jų navikams *in vivo* taikant eksperimentinį modelį. Tiriamų vaistinių preparatų VPA ir DCA derinio tyrimai skirti nustatyti, ar taikant šių preparatų derinį yra sinerginis poveikis, ar tai leidžia sumažinti vaistinių preparatų dozę siekiant gydymo veiksmingumo. Atliekant eksperimentinius tyrimus, siekta nustatyti gydymo tiriamais vaistiniais preparatais poveikio skirtumus, nustatyti GBM U87 ląstelių (moters) linijos ir T98G ląstelių (vyro) linijos ląstelių atsako į gydymą skirtumus, nustatyti magnio dichloroacetato (MgDCA) poveikį kancerogenezės mechanizmams duomenis palyginant su TMZ poveikio duomenimis; nustatyti VPA–MgDCA poveikį su proapoptoze susijusių genų raiškai pirminėse GBM ląstelėse.

Darbo tikslas

Nustatyti dichloroacetato, valpro rūgšties ir valpro rūgšties–dichloroacetato derinio farmakologinį poveikį žiurkėms, jų čiobrialiaukei, timocitams ir suaugusio žmogaus glioblastomos raidai.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti paros ir ilgalaikio gydymo VPA–NaDCA poveikį žiurkėms, Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} išsiskyrimui su paros šlapimu, kraujo gliukozės, testosterono koncentracijai, čiobrialiaukei ir Hasalio kūnelių skaičiui joje, inkstams, timocitų ląstelės ciklui, timocitų *Slc5a8*, *Slc12a2*, *Slc12a5* raiškai ir su lytimi susijusiems skirtumams.
2. Nustatyti VPA poveikį žiurkių timocitų *Slc5a8*, *Slc12a2*, *Slc12a5* raiškai ir U87 bei T98G ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, *CDH2* raiškai.
3. Nustatyti MgDCA, VPA–MgDCA ir TMZ poveikį glioblastomos U87 ir T98G ląstelių naviko ant CAM raidai, EZH2, PLBA, p53

- raiškai navike ir poveikį navikinių ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, *CDH2* raiškai.
4. Ištirti VPA–MgDCA poveikį paciento pirminių GBM ląstelių naviko ant CAM raidai, jo PLBA, EZH2, p53 raiškai, naviko ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, *CDH2* ir su proapoptoze susijusių genų raiškai.

Darbo naujumas ir aktualumas

Darbe yra pateikiami pirmą kartą atliktų eksperimentinių tyrimų VPA ar VPA–NaDCA poveikio žiurkėms, jų čiobrialiukei, timocitams ir gydymo poveikio su lytimi susijusių skirtumų duomenys. Nustatytas VPA–NaDCA derinio poveikis abiejų lyčių žiurkių kraujo serumo gliukozės koncentracijai. Gydymas šiuo deriniu reikšmingai sumažina patinų testosterono koncentraciją kraujo serume. Nustatytas tiriamo vaistinio preparato VPA–NaDCA poveikis žiurkių inkstams, paros diurezei ir Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} ir Ca^{2+} išsiskyrimui su paros šlapimu, gydymo VPA ar VPA–NaDCA poveikis žiurkių timocitų *SLC5A8*, *NKCC1* ir *KCC2* nešiklių genų raiškai, jų raiškos sąsaja su lytimi ir lytiniais hormonais.

Darbe pateikiame suaugusiųjų GBM U87 ir T98G ląstelių gydymo VPA poveikį *SLC5A8*, *NKCC1*, *KCC2*, E-kadherino ir N-kadherino genų raiškai ir gydymo poveikio skirtumus bei poveikį priklausomai nuo VPA dozės. VPA aktyvuoja *SCL5A8* raišką per DNR demetilavimo mechanizmus. Dėl to galima hipotetiškai teigti, kad VPA poveikis gali būti susijęs su didesniu DCA pernešimu į ląstelę. Toks poveikio sinerginis mechanizmas leistų sumažinti DCA dozę.

Pirmą kartą yra tirtas MgDCA, VPA–MgDCA poveikis suaugusiųjų GBM ląstelėms *in vitro* ir jų suformuotiems navikams *in vivo* taikant CAM modelį, GBM ląstelių navikų augimui, jų invazijai į CAM, neoangiogenezei, PLBA, EZH2, p53 žymenų raiškai navike ant CAM. VPA–MgDCA tyrimų duomenys yra palyginti su TMZ poveikio duomenimis. VPA–MgDCA gydymas didina U87 ląstelių *SLC5A8* raišką veiksmingiau nei gydant VPA monoterapija. Be to, VPA–MgDCA slopina *NKCC1* ir aktyvuoja *KCC2* nešiklių genų raišką ir šis poveikis skiriasi gydant U87 ir T98G ląsteles. Pirmą kartą naujos kartos sekoskaitos metodu nustatytas VPA–MgDCA poveikis suaugusio vyro pirminių GBM ląstelių su proapoptoze susijusių genų raiškai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Glioblastomos gydymo situacija

GBM pasižymi agresyvia eiga ir nepalankia prognoze. Šiandien nėra veiksmingo GBM gydymo [30]. Standartinis GBM gydymas dažniausiai tik nežymiai prailgina ligonio išgyvenamumą [31]. Neveiksmingas GBM gydymas yra susijęs su naviko bei jo mikroaplinkos heterogeniškumu ir gali priklausyti nuo gliomos kamieninių ląstelių. Gliomos kamieninės ląstelės gali atsinaujinti ir diferencijuotis į ląstelių linijas, kurios yra rezistentiškos citotoksiškai bei spinduliniam gydymui ir gali turėti didelį onkogeniškumą [30]. GBM ląstelėms būdinga aktyvi proliferacija, kuri susijusi su prislopinta apoptoze bei ląstelių žūtimi. Onkogenų, naviko supresorių ir DNR reparacinės sistemos genų raiškos pokyčiai lemia GBM genotipo ir fenotipo pokyčius [17].

GBM pasižymi sudėtinga, skatinančia naviko augimą mikroaplinka, slopinančia imuninę sistemą ir lemiančia atsparumą gydymui. Pagrindiniai naviko mikroaplinkos veiksniai yra citokinai: interleukinas-4 (IL-4), IL-6 ir IL-13, CD40. IL-4 ir IL-13 sukelia imunosupresinę aplinką poliarizuodami su naviku susijusius makrofagus į pronavikinį M2 fenotipą. IL-6 aktyvina JAK-STAT3 kelią, didina navikinių ląstelių išgyvenamumą ir proliferaciją. CD40 gali aktyvuoti naviko augimą, angiogenezės ir ląstelių gyvybingumo palaikymo kelius. Šių molekulių tarpusavio poveikis didina GBM piktybiškumą. Gydymo tikslas vienu metu veikiant IL-4, IL-6, IL-13 ir CD40 – yra sukurti gydymo strategijas, kurios padėtų nutraukti GBM naviką palaikančios aplinkos veikimą, slopinti naviko augimą ir pagerinti pacientų gydymo rezultatus [32].

GBM piktybiškumas siejamas su navikinių ląstelių genetiniais pokyčiais, susijusiais su svarbių signalinių kelių ir epigenetinių mechanizmų disreguliacija, susijusia su proliferacijos, ląstelių augimo, išgyvenamumo ir apoptozės mechanizmais. GBM prognostiniai pokyčiai siejami su PI3K/AKT, p53, RTK, RAS, RB, *STAT3*, ZIP4, PI3K/AKT/mTOR (PAMT) ir IL-6 sutrikusia signalinių kelių reguliacija, medžiagų apykaitos sutrikimu – glikolize, epigenetinio reguliavimo genų raiškos pokyčiais, svarbiais GBM ląstelių augimui ir metabolizmui. Siekiant veiksmingo GBM gydymo, svarbu iširti nukreiptą į šiuos kelius tiriamų vaistinių preparatų gydymo poveikį [33, 34].

Gydymo temozolomidu taikymas ir problemos. Europoje GBM gydymui TMZ registruotas 2000 metais [31]. TMZ nuo 2005 m. TMZ vartojamas naujai diagnozuotai GBM gydyti. TMZ pereina per kraujo–smegenų barjerą ir gali būti vartojamas *per os*. Gydant GBM po operacijos ir prie spindulinės terapijos pridėjus gydymą TMZ, bendras išgyvenamumas pailgėjo 2 mėnesiais [35]. Bendro išgyvenamumo mediana yra 15 mėnesių, o išgyvenamumas

be ligos progresavimo – 6 mėnesiai [36, 37]. GBM gydymo veiksmingumui pagerinti svarbu suprasti TMZ poveikio ir atsparumo gydymui raidos mechanizmus. TMZ metabolitas pažeidžia DNR, lemia citotoksiškumą [31, 38] ir kaip monofunkcinis alkiliantis preparatas veikia atskirų DNR dalių metilimą guanino N7, adenino O3 ir guanino O6 padėtyse [39]. Tai lemia mutacijas, viengrandės ir dvigrandės DNR trūkius, dėl kurių ląstelės ciklas sustoja ties G₂/M faze, ir sukelia GBM ląstelių apoptozę [7].

Nors TMZ išlieka pirmo pasirinkimo vaistiniu preparatu, tačiau ši chemoterapija yra susijusi su labai dažnu atsparumu gydymui ir ligos atsinaujinimu. Daugiau kaip 50 proc. GBM pacientų gydymas TMZ yra neveiksmingas – neturi poveikio. Todėl atsako į TMZ veiksmingumą ir prognostinių žymenų tyrimai išlieka labai aktualūs [13, 31]. Atsparumas TMZ gali būti pirminis, būdingas tam tikriems navikams, arba įgytas – pasireiškia po pradėto gydymo [40]. Atsparumas TMZ gydymui visada yra kliniškai reikšmingas [41].

Atsparumą TMZ pirmiausia lemia unikalios nediferencijuotų ir gliomos kamieninių ląstelių populiacijos [42, 43]. Plačiausiai su GBM atsparumo TMZ molekuliniais mechanizmais susiję pripažinti gliomos kamieninių ląstelių žymenys – CD133, CD44, CD15, CD70, *S100A4*, *ALDH1A3*, Nanog, *SOX-2* ir Nestin [41, 44]. Chemoterapija turėtų būti nukreipta ir į gliomos kamieninių ląstelių žymenis, kad būtų sumažinta ligos recidyvo tikimybė [45]. Gliomos kamieninės ląstelės sudaro iki 1 proc. GBM naviko ląstelių, bet jų gebėjimas atkurti naviko heterogeniškumą lemia naviko recidyvus [46].

Navikai, pasižymintys nemetilinta O6 metilguanino DNR metiltransferaze (angl. *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*, *MGMT*; padidėjęs *MGMT* aktyvumas), dažniausiai būna atsparūs TMZ. Todėl epigenetinė *MGMT* būklė yra svarbus pradinio atsparumo TMZ žymuo [47]. Bazių ekscizijos reparacijos (angl. *base excision repair*) kelio [31, 39] kai kurie fermentai yra susiję su atsparumu TMZ [48]. Tai poli (ADP-ribozės) polimerazė 1 (*PARP1*) [49, 50]. *PARP1* inhibicija didina jautrumą TMZ [51], o aktyvavimas skatina DNR pažaidas, mažina nikotinamidadeninukleotido (NAD⁺) ir adenozintrifosfato (ATP) susidarymą [52, 53]. GBM būdingi PI3K/AKT kelio sutrikimai; šio kelio tirozino kinazės (RTK) receptoriai dažnai suaktyvėja [54]. Viena iš labiausiai žinomų RTK aberacijų yra epidermio augimo veiksnio receptoriaus (EGFR) amplifikacija, nustatoma ~60 proc. GBM atvejų [55]. EGFR raiška yra susijusi su TMZ atsparumo mechanizmais. AKT – serino/reonino kinazė skatina GBM ląstelių chemorezistentiškumą [56]. Nustatyta, kad keli AKT kelio taikiniai yra susiję su specifiniais atsparumo TMZ mechanizmais: PDK1, hipoksiją indukuojančiu veiksniumi 1 (HIF-1), FOXO3A ir branduolio veiksniumi κB, apoptozės reguliavimu [45]. PDK1

atlieka PDH inaktyvavimo funkciją fosforilindamas E1 α subvienetą, inaktyvuodamas PDH kompleksą [57]. PDH inaktyvavimą patvirtina padidėjusi PDK1 raiška GBM ląstelėse [58], atsparumą chemoterapijai lemia ne tik PDK1, bet ir kartu padidinta EGFR raiška [57]. Mažas deguonies kiekis navike stabilizuoja HIF-1, kuris moduliuoja keletą glikolizinių genų raišką, svarbią apoptozės mechanizms [59]. HIF-1, HIF-1 α ir HIF-1 β aktyvuoja kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF) geną ir skatina angiogenezę. Dėl padidėjusios VEGF raiškos GBM yra labai vaskuliarizuotas [60, 61]. VEGF yra taikiny, kuris būtų naudingas gydant atsparius TMZ navikus [62]. HIF-1 α skatina *CXCL12* raišką ir reguliuoja *CXCR4*. *CXCL12/CXCR4* aktyvinimas skatina GBM ląstelių proliferaciją ir invazyvumą [63]. *CXCL12/CXCR4* ašis yra perspektyvus taikiny siekiant sumažinti GBM atsparumą gydymui [64].

GBM atveju, esant PI3K/AKT kelio sutrikimui, indukuojamas FOXO3A [65]. Padidėjusi FOXO3A raiška koreliuoja su naviko progresavimu ir bloga prognoze, tačiau kiti nustatė priešingus duomenis [66]. Svarbus taikiny yra branduolio veiksnys κ B [67], kuris yra gliomos onkogenas. Aktyvavus RTK/PI3K/AKT kelią, branduolio veiksnio κ B aktyvumas padidėja. Branduolio veiksnys κ B yra susijęs su atsparumu TMZ [68]. Apoptozės inhibitorių šeimos narys survivinas [69] blokuoja TMZ sukeltos apoptozės poveikį ir lemia atsparumą TMZ, o specifinis survivino geno slopinimas didina jautrumą TMZ [70]. Wnt/ β -katenino kelias svarbus GBM progresavimui ir chemoterapijos rezistentiškumo raidai [71]. Wnt signalinis kelias yra susijęs su GBM epitelinė–mezenchimine transformacija (EMT) [72]. Ši transformacija yra susijusi su GBM atsparumu chemoterapijai ir radioterapijai [73]. Wnt signalų moduliavimas pakeitė EMT aktyvatorių raišką [72, 74]. JAK/STAT signalinis kelias yra susijęs su glijos kamieninių ląstelių stimulavimu; *STAT3* aktyvavimas turi įtakos GBM perėjimui į mezenchiminį potipį [75]. *STAT3* veikia kaip transkripcijos veiksnys, moduliuojantis įvairių onkogenų – *SOX2* ir zeste homologo 2 stipriklis (EZH2) – raišką [76].

GBM patogenezei svarbus IL-6/Janus kinazės/*STAT3* (IL-6/JAK/*STAT3*) kelias. Dinamišką PI3K/AKT/branduolio veiksnio κ B ir JAK/STAT signalinio kelio sąveiką iliustruoja branduolio veiksnio κ B aktyvinimas, lemiantis *STAT3* raišką [77]. *STAT3* aktyvavimas siejamas su TMZ chemorezistentiškumu [78, 79]. IL-6 skatina imuninių ląstelių infiltraciją į naviką ir stiprina *STAT3* fosforilinimą, didinantį naviko ląstelių antiapoptozę; IL-6 hiperekspresija buvo nustatyta kaip GBM piktybiškumo žymuo [80]. *STAT3* raišką skatina padidėjusi IL-6 sekrecija [81]. Naujų tiriamų preparatų, slopinančių su rezistentiškumu chemoterapijai susijusius mechanizmus, kūrimas yra svarbus GBM farmakoterapijos uždavinys.

Veiksmingo glioblastomos gydymo paieška. Siekiant veiksmingo gydymo, ieškomi chemosensibilizatoriai siekiant slopinti rezistentiškumo gydymui TMZ raidą ar sinergiškai sustiprinti TMZ veiksmingumą [82, 83].

Klinikinių tyrimų metu tirtas vaistinių preparatų lomustino, karmustino ar bevacizumabo poveikis, bet nebuvo nustatyta, kad šie preparatai prailgintų išgyvenamumą. Tiriant gyvūnų modeliu įvairius GBM molekulinis kelius, buvo nustatyti potencialūs gydymo taikiniai ir sukurta nauja GBM klasifikavimo schema įtraukiant molekulinis žymenis pagal histopatologinius GBM duomenis [31]. GBM gydymui vis dažniau naudojami kombinuoti gydymo metodai [84], siekiama taikyti imunoterapiją, vartoti vakcinas [85], viruso pagrindu modifikuotus preparatus [86] ar gydymą citokiniais pagal navikinių ląstelių molekulinis žymenis [87, 88]. Gydant GBM, yra taikomi įvairūs imunomoduliaciniai vaistiniai preparatai, vienas iš jų – VPA [89, 90]. GBM ligojams nustatyta specifinė užkrūčio liaukos involiucija. Nepriklausomai nuo ligojimo amžiaus, sergančiųjų įvairiais smegenų navikais užkrūčio liaukos involiucija lemia T limfocitų gamybos ir pačių ląstelių pokyčius, susijusius su imunosupresijos raida. Pelių gliomos modelių tyrimai rodo, kad su liga susijusi imunosupresija paveikia ne tik T limfocitų diferenciaciją čiobrialiaukėje, bet ir jų aktyvaciją, dauginimąsi ir periferinių organų aprūpinimą T limfocitais [91].

Epigenetiniai glioblastomos mechanizmai kaip gydymo taikynys.

HDAC fermentai yra susiję su navikų raida [92]. HDAC raiškos lygis koreliuoja su naviko progresavimu ir išgyvenamumu. HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC8 ir HDAC9 kiekis GBM ląstelėse yra padidėjęs [93, 94]. Padidėjusi HDAC1 raiška GBM ląstelėse yra susijusi su proliferacija ir invazija aktyvuojant PI3K/AKT ir MEK/ERK kelius [95]. GBM HDAC6 raiškos slopinimas lemia sumažėjusią ląstelių migraciją ir naviko augimą. Manoma, kad tai vyksta aktyvinant priešvėžinį imuninį atsaką [96]. HDAC slopinimas gali būti vienas iš būdų išvengti atsparumo TMZ [45]. Tai paskatino intensyviai tirti HDAC inhibitorius kaip vaistinius preparatus vėžiui gydyti [62, 97]. HDAC inhibitoriai sukelia vėžinių ląstelių žūtį dėl ląstelių ciklo sustabdymo, poveikio diferenciacijai ir apoptozės mechanizmams, o jų veiksmingumas padidėja, kai jie derinami su kitais gydymui taikomais vaistiniais preparatais ar gydymo būdais [98, 99]. Trys specifiniai HDAC inhibitorių vaistai – vorinostatas, romidepsinas ir VPA – buvo tirti ikiklinikinių ir klinikinių tyrimų metu aiškinant jų poveikį GBM [100, 101]. Chemoterapijos ir HDAC inhibitorių sinerginis poveikis yra perspektyvus gydant GBM ir išvengiant rezistentiškumo chemoterapijai [45].

Individualizuoto glioblastomos gydymo aktualumas. Chirurginis gydymas ne visada būna veiksmingas naviko ląstelėms paplitus už intraoperacinių ribų [102, 103]. Individualaus gydymo strategija yra orientuota į

unikalių paciento naviko savybių nustatymą [104, 105]. Glioblastoma buvo pirmasis vėžys, kuriam atlikta išsami genomo analizė Vėžio genomo atlaso projekte [106], per kurią sukaupti su GBM susijusių genų ir molekulinį mechanizmų duomenų tyrimai [107, 108]. GBM pasižymi dideliu genomo heterogeniškumu [104, 109]. Individualizuoto gydymo tikslas – taikyti gydymą pagal navikui būdingus specifinius žymenis [110, 111]. Iki šiol daugumos genetinių žymenų funkcinė, biologinė ir klinikinė reikšmės ligos raidai yra nepakankamai ištirtos [103].

Individualizuoto GBM gydymo progresas yra neatsiejamas nuo standartinio gydymo, kuris tobulinamas ieškant naujų gydymo strategijų, chemoterapijai skiriant parinktus vaistinius preparatus pagal molekulinės ir metabolinės naviko savybes [112]. Mutacijomis pagrįsti diagnostiniai įrankiai gali padėti nustatyti naviko specifines mutacijas ir pagerinti individualiai taikomą gydymą [113]. Nurodoma, kad prieš skiriant gydymą vaistiniu preparatu, jo veiksmingumą tikslinga nustatyti sukuriant iš paciento navikinių ląstelių suformuotus organoidus [114]. Tokie organoidų modeliai gali būti naudingi vertinant naviko heterogeniškumą ir gydymo veiksmingumą [115] ir galėtų padėti atrasti naujus veiksmingus vaistus. Naujos kartos sekoskaitos pritaikymas individualizuotai terapijai yra svarbus nustatant naviko genetines, molekulinės bei epigenetinės savybes ir leistų parinkti veiksmingesnį gydymą [116, 117].

Paskutiniaisiais metais mokslininkai nurodo, kad perspektyvus vaistinių preparatų veiksmingumo tyrimų metodas *in vivo* yra viščiuko chorioalantojinės membranos (CAM) modelis. Jis skirtas tirti iš paciento gautą pirminę naviko medžiagą ir galėtų būti naudojamas kaip specifinis 3D naviko gydymo modelis, siekiant įvertinti priešvėžinius vaistus iki juos skiriant pacientui [118].

Glioblastomos mitochondrinio metabolizmo sutrikimai bei gydymo paieška. Kancerogenezę skatinančių metabolinių kelių ir jų mechanizmų supratimas yra svarbus ieškant gydymo taikinių ir veiksmingo gydymo. GBM ląstelės vartoja gliukozę kaip energijos šaltinį, bet gali panaudoti ir amino rūgščių, riebalų ir kitų šaltinių priklausomai nuo naviko genetinės prigimties ir mikroaplinkos. Gliukozė gali būti metabolizuojama į pieno rūgštį aerobinės glikolizės būdu arba gali būti oksiduojama mitochondrijose per Krebso ciklą [119].

Warburgo efektas, dar žinomas kaip aerobinė glikolizė, yra navikinių ląstelių medžiagų apykaitos sutrikimas, kuriam būdingas padidėjęs gliukozės suvartojimas, todėl padidėja pieno rūgšties gamyba [120]. Aerobinė glikolizė gamina mažiau energijos nei oksidacinis metabolizmas; tai svarbu naviko ląstelių išgyvenimui ir dauginimuisi hipoksijos sąlygomis [119]. Pieno rūgšties susidarymas lemia imunosupresinės mikroaplinkos raidą, skatina navikinių ląstelių augimą ir jų invaziją [119, 121]. Naviko mikroaplinkoje aktyvi

glikolizė ir pieno rūgšties perteklinis susidarymas sukelia metabolinę acidozę [122], aktyvina ląstelių augimą, inhibuoja apoptozės ir ląstelių žūties mechanizmus [120]. Pieno rūgštis indukuoja per endotelio ląsteles angiogenezę [123]. Slopinant pieno rūgšties gamybą, svarbus taikynys yra PDK [119]. PDK1 yra svarbus GBM kamieninių ląstelių išgyvenamumui. PDK1 slopina PDH aktyvumą, mažina acetyl-CoA gamybą mitochondrijose sumažindamas oksidacinį metabolizmą [15]. DCA slopina PDK1 aktyvumą, aktyvina mitochondrijų PDH ir didina piruvato patekimą į mitochondrijas, o tai lemia membranos depoliarizaciją, mitochondrijų deguonies aktyviųjų formų (angl. *oxygen reactive species*, ROS) gamybos padidėjimą ir galiausiai apoptozės indukciją [124].

1.2. Tiriamų vaistinių preparatų priešvėžiniai veikimo mechanizmai

Dichloroacetato priešvėžinis poveikis. DCA yra mažos 150 Da molekulinės tiriamas vaistinis preparatas. DCA yra vandenyje tirpi medžiaga. Atlikti klinikiniai tyrimai DCA skiriant gydyti ūminę ir įgimtą pieno rūgšties acidozę [125]. Eksperimentiniai *in vivo* tyrimai parodė, kad gydymas DCA pasižymi priešvėžiniu poveikiu [126]. DCA 50–200 mg/kg/parai dozė yra siejama su įvairaus tipo navikų masės, ląstelių proliferacijos ir metastazių sumažėjimu [120, 127]. Balb/c plikųjų pelių patinų modelio tyrimai parodė, kad DCA monoterapija slopino GBM U87 ląstelių naviko augimą poodyje [128]. Imunodeficitinių pelių U87 naviko smegenyse tyrimų metu DCA monoterapijos teigiamo poveikio nenustatyta, nors DCA ir spindulinės terapijos derinys padidino pelių išgyvenamumą [124]. Kiti mokslininkai, tyrę DCA poveikį Balb/c SCID pelių U87 navikui poodyje, poveikio nenustatė, bet tyrimai parodė DCA gydymo slopinantį poveikį sferoidų augimui *in vitro* [129].

Priešvėžinis DCA veiksmingumas siejamas su poveikiu navikinių ląstelių metabolizmui [120]. DCA veikia navikines ląsteles pakeisdamas glikolizę į oksidacinį fosforilinimą. PDK inhibicija aktyvina PDH [127], kas skatina mitochondrijų piruvato oksidaciją ir sutrikdo vėžinių ląstelių metabolizmą. Dėl sumažėjusio pieno rūgšties susidarymo pakinta naviko mikroaplinka [120]. Piruvato patekimas į mitochondrijas sukelia organelių remodeliavimą – citochromo c ir kitų apoptozę skatinančių veiksnių išskyrimą ir ROS kiekio padidėjimą ir taip slopina vėžinių ląstelių gyvybingumą [130]. PDH E1 α subvienetas yra lokalizuotas X chromosomoje; tai gali lemti su lytimi susijusius skirtingus ligos požymius. Žinomi PDH komplekso aktyvumo bei raiškos skirtumai susiję su lytimi. Tai gali būti siejama su moteriškų lytinių hormonų poveikiu glikolizei ar genų raiškai [126].

NaDCA geba įjautrinti TMZ rezistentiškas navikines ląsteles [18, 19]. DCA padidina navikinių ląstelių jautrumą spindulinei terapijai. Tiriant GBM gyvūnų modelius, buvo nustatyta, kad DCA kartu su spinduline terapija pagerina Balb/c pelių išgyvenamumą [124]. Nors buvo atlikti DCA poveikio sergančiųjų GBM I fazės [131] ir II fazės [132] klinikiniai tyrimai, klinikinių duomenų apie jo priešvėžinį veiksmingumą nepakanka. Tyrimai parodė, kad DCA yra gerai toleruojamas preparatas [119]. DCA derinys su metforminu reikšmingai slopino GBM augimą ir padidino pelių išgyvenamumą [133]. NaDCA veiksmingumo *in vitro* duomenys rodo skirtingą tyrimų priešvėžinį veiksmingumą [134]. Tokių skirtumų viena priežasčių yra ta, kad tiriant NaDCA veiksmingumą, tyrėjai naudojo dideles NaDCA koncentracijas terpėse, kurios yra susijusios ir su hipernatremija [126]. Vėžinių ląstelių aplinkoje tyrimams naudojama skirtinga Na^+ koncentracija gali paveikti kancerogenezę. Na^+ , esantis naviko mikroaplinkoje, yra susiję su naviko progresavimu [135, 136].

Viena iš dažniausių DCA nepageidaujamo poveikio reakcijų yra grįžtamoji neuropatija. Klinikinių tyrimų metu DCA kancerogeninio poveikio nenustatyta [120].

Valpro rūgšties priešvėžinis poveikis. VPA yra HDAC inhibitorius, inhibuoja aerobinę glikolizę naviko ląstelėse slopindamas gliukozės paėmimą, pieno rūgšties ir ATP gamybą, mažindamas E2F transkripcijos veiksnio 1 kiekį; VPA veikia į E2F transkripcijos veiksnio 1 prisijungimą prie glikozilintų *GPI* ir *PGK1* promotorių. Šis VPA poveikis glikolizei rodo naują gydymo strategiją ieškant VPA poveikio navikinėms ląstelėms [137].

VPA tiriamas kartu su chemoterapija ir radioterapija [138, 139] skiriant pradžioje ar po chemoradioterapijos siekiant padidinti GBM pacientų chemoterapijos veiksmingumą ir pagerinti bendro išgyvenamumo medianą [140, 141]. Kitų tyrimų duomenys tokio poveikio neparodė [142, 143]. Suaugusių GBM pacientų gydymas su TMZ, radioterapija ir didele VPA doze parodė skirtingą poveikį proteominėms savybėms lyginant su gydytų TMZ ir radioterapija duomenimis, tačiau gydymas VPA neturėjo poveikio klinikiškiems požymiams [144]. VPA gydymas sumažino plikųjų Balb/c pelių GBM naviko dydį poodyje [145]. VPA vienas ar derinyje su kitu gydymu pasižymi inhibiciniu poveikiu gliomai *in vivo* ir *in vitro* [146]. Netoksinė VPA dozė padidina U87 ir T98G ląstelių jautrumą gefitinibui inhibuojant ląstelių augimą ir aktyvinant autofagiją per padidėjusį ROS susidarymą [139]. VPA padidina radioterapijos veiksmingumą didindama GBM ląstelių jautrumą [138] ir aktyvindama spindulinės terapijos apoptozinį atsaką [147]. Trumpalaikis gydymas VPA suaktyvina *MGMT* metilinimo pokyčius, galinčius paveikti GBM ląstelių ir kamieninių ląstelių jautrumą TMZ [148, 149]. Gydant TMZ, GBM kamieninių ląstelių diferenciacijos ir DNR metilinimo

tyrimai rodo, kad jos elgiasi heterogeniškai [148]. VPA poveikis kamieninių ląstelių išgyvenamumui yra svarbus veiksmingam GBM gydymui [149].

Gydant GBM, VPA veiksmingumo duomenys yra prieštaraujantys. Tiriant VPA poveikį derinyje su kitais vaistais, labai svarbu nustatyti vaistų sąveiką. VPA gali skatinti DNR demetilinimą, kuris padidina ląstelių jautrumą VPA, bet ne TMZ [148, 149]. VPA gydytos GBM ląstelės išskyrė didelius amfiregulinio kiekius, kurių raiška teigiamai koreliavo su atskirų GBM ląstelių rezistentiškumu TMZ [150]. Damanskienė E. ir kt. nustatė, kad TMZ reikšmingai padidino PBT24 ir SF8628 ląstelių NKCC1 raišką [151]. NKCC1 aktyvumas yra tiesiogiai susijęs su GBM ląstelių proliferacija [152]. Padidėjusi žmogaus GBM NKCC1 baltymo raiška koreliuoja su vėžio stadija [153]. NKCC1 aktyvacija priklauso nuo WNK kinazės baltymo fosforilinimo [154]. Tikėtina, kad VPA ir TMZ derinys gali sinergiškai aktyvinti NKCC1 ir sumažinti gydymo veiksmingumą.

Epilepsija sergančių ir gydytų VPA pacientų oksidacinio streso rodikliai buvo padidėję [155]. VPA skatina ROS susidarymą ir slopina kai kurių vėžinių ląstelių linijų apoptozę [99]. ROS susidarymas lemia tiesioginę ląstelės DNR pažeidimą, gali pakeisti įprastus ląstelės signalinius kelius [156]. ROS susidarymas gali priklausyti nuo lyties. Pelių patelių ląstelės pasižymi silpnesniu oksidaciniu streso aktyvumu lyginant su patiniais, t. y. patelės gali būti geriau apsaugotos nuo ROS keliamų pažeidimų. Pelių ovariektomija suaktyvino ROS susidarymo rodiklius, o orchiektomija nepaveikė oksidacinio streso [157]. Padidėjęs ROS susidarymas slopino žiurkių timocitų proliferaciją [158]. VPA gali skatinti SLC5A8 nešiklio aktyvumą, kuris svarbus reguliuojant ląstelės metabolizmą [137].

Magnio jonų ryšys su glioblastomos raida. Yra hipotezė, kad didesnis Mg^{2+} įsisavinimas su maistu gali sumažinti gliomos riziką, bet jai pagrįsti reikalingi tolimesni tyrimai [159]. Tiriant žiurkių patinų gliomos naviką smegenyse, buvo nustatytas padidėjęs Mg^{2+} kiekis ląstelėse [160]. Mg^{2+} yra reikalingas mitochondrijų funkcijoms – ATP gamybai ir glikolizės procesams [161]. PDH yra netiesiogiai stimuliuojama Mg^{2+} , kuris aktyvina PDH fosfatazę ir taip aktyvuoja PDH kompleksą [162]. Mg^{2+} yra svarbus uždegimui, DNR replikacijai ir pažeidimų reparacijai, ląstelės proliferacijai ir signalo perdavimui bei siejamas su oksidacinio streso, ląstelių diferenciacijos ir apoptozės reguliavimu [163, 164]. Mg^{2+} trūkumas siejamas su imuninio atsako sutrikimais, kurie gali būti susiję su kancerogeneze [163]. Viduląstelinės ir tarpląstelinės Mg^{2+} koncentracijos svarba naviko raidai yra prieštaringa [165, 166]. Mg^{2+} ir kancerogenezės ryšio ikiklinikinių tyrimų duomenų vertinimas gali būti svarbus aiškinant Mg^{2+} homeostazės sutrikimus [166]. Gliomos ląstelėse Mg^{2+} pernaša ir Mg^{2+} surišimas yra sustiprėję, o tai yra rimtas pagrindas toliau tirti GBM dėl pakitusios Mg^{2+} homeostazės ir jonų

pernašos, kaip galimus terapinius taikinius [160]. Mitochondrijų Mg^{2+} yra būtinas elektronų pernašos grandinei palaikyti, metabolitų kontrolei Krebso ciklo metu ir ląstelių glikolizei [167]. Mg^{2+} mitochondrijose yra labai svarbus ląstelės atsparumui oksidacijai palaikyti ir jos gebėjimui ištaisyti oksidacinę pažaidą arba užkirsti jai kelią [168]. Smegenų navikams būdingas padidėjęs laisvųjų Mg^{2+} ir laisvojo ATP santykis lyginant su aplinkiniu sveiku audiniu [169]. Siūlomas daugiaparametrinės paieškos algoritmas, skirtas įvertinti pH vertę ir Mg^{2+} kiekį taikant 31P magnetinio rezonanso spektroskopiją GBM navikuose. Ryšys tarp viduląstelinio pH verčių ir Mg^{2+} kiekio leidžia įvertinti labiausiai tikėtinus biocheminius parametrus [170].

Mg^{2+} trūkumas gali pakenkti DNR stabilumui ir yra glaudžiai susijęs su navikų augimu, o Mg^{2+} papildymas iš dalies slopina navikų augimą [171]. Konkretūs mechanizmai, kuriais Mg^{2+} slopina navikinių ląstelių dauginimąsi, lieka neaiškūs. Tyrimai rodo, kad mitochondrijos gali būti svarbios reguliuojant naviko vystymąsi, Mg^{2+} pernašą, energijos apykaitą ir oksidacinius procesus, susijusius su naviko ląstelių dauginimusi ir invazija [172]. Magnio sulfatas gali apsaugoti mitochondrijų kvėpavimo grandinę bei sumažinti ROS ir uždegimo veiksnių susidarymą [173].

MgDCA farmakologinis poveikis, gydant suaugusiųjų GBM *in vitro* ir *in vivo* nebuvo tirtas. Damanskienė E. ir kt. biomikroskopiniais ir histomorfometriniiais tyrimais nustatyta, kad pediatriinių GBM ląstelių gydymas su NaDCA ar MgDCA veikė skirtingai: tiriamo vaistinio preparato veiksmingumas ksenografto augimui ant CAM, naviko invazijai į CAM ir angiogenezei priklausė ne tik nuo ląstelių biologijos ir nuo DCA anijono koncentracijos, bet ir nuo katijono tiriamo preparato druskoje [174]. Disertacijoje pristatomi eksperimentinių MgDCA poveikio tyrimų duomenys suaugusiųjų GBM augimui ir galimiems mechanizmom, netiesiogiai susijusiems su Mg^{2+} .

1.3. Kancerogenezė ir uždegimas

Vėžio ir uždegiminių ligų audinių mikroaplinka yra panašios: joms būdinga audinio hipoksija ir padidėję pieno rūgšties kiekio pokyčiai [175]. Dažnas GBM bruožas yra audinio nekrozė, kurią lydi naviko mikroaplinkos uždegiminiai pokyčiai. Imunosupresinis uždegimas kartu su nekroze yra siejamas su didesniu GBM rezistentiškumu gydymui ir bloga prognoze [176]. GBM ląstelės ekspresuoja ir išskiria chemokinus bei citokinus – IL-6, IL-10, transformuojantį augimo veiksnį- β , galektiną 1 ir prostaglandiną-E – kurie veikia naviką infiltruojančias imunines ląsteles. Uždegimo mediatorių lemti imunosupresiniai pokyčiai skatina GBM ląstelių proliferaciją, migraciją, angiogenezę ir rezistentiškumą gydymui [177]. Hipoksinė aplinka GBM

kamieninėse ląstelėse suaktyvina uždegiminio reparacinio atsako genų raišką [178, 179]. Citokinai IL-1 β ir transformuojantysis augimo veiksnys- β sąveikauja suaktyvindami uždegime dalyvaujančių genų raišką, skatinančią ląstelių proliferaciją ir migraciją [180].

Kartu su išoriniais naviko veiksniais, ląsteliniai naviko veiksniai gali sukelti naviko augimą skatinantį uždegimą [181]. Su kancerogeneze susijusio uždegimo veiksniai gali būti lėtinė infekcija ar autoimuninės reakcijos, senėjimas, naviko ar gydymo sukeltas uždegimas [182]. Senėjimas yra siejamas su sisteminio žemo laipsnio uždegimo mechanizmais, o tai gali būti susiję su dažnesniu sergamumu vėžiu [183, 184]. Su senėjimu susiję uždegiminiai mechanizmai yra lemti senstančių ląstelių sekretuojamais ir kancerogenezę skatinančiais uždegimo veiksniais – IL-6 ir IL-8 [185, 186]. Naviko aplinkoje gaminasi uždegimą skatinantys citokinai ir chemokinai, yra įtraukiamos imuninės ląstelės ir indukuojama angiogenezė [187].

Nekrozinės naviko ląstelės išskiria tarpląstelinius komponentus, t. y. funkcinius uždegiminius mediatorius (IL-1 α , ATP ir didelio judrumo grupės 1 dėžutė (angl. *high mobility group box 1 protein*), skatinančius naviko progresavimą [182]. Priešvėžiniai vaistai ir spindulinis gydymas lemia ląstelių mirtį, o naviko ląstelių liekanos arba išsiskyrusios molekulės skatina imunines ląsteles gaminti prouždegiminius citokinus, palaikančius naviko augimą, angiogenezę ir metastazavimą [188, 189]. Pavyzdžiui, 5-fluorouracilo vartojimas sukelia naviką skatinantį uždegiminį atsaką, tačiau citokino IL-17A išlaisvinimo inhibicija gerina atsaką į gydymą preparatu [182]. Cito toksinis vėžio gydymas gali sustiprinti priešnavikinį imuninį atsaką [190]. Pažymėtina, kad apoptozė ir autofagija yra mažiau uždegimą skatinantys, o nekrozė ir nekroptozė yra stipresni uždegimo induktoriai [191, 192].

Dichloroacetato poveikis uždegimui. DCA yra tiriamas priešvėžinis vaistinis preparatas: jo vartojimas gydymui yra saugus, pasižymi geru biologiniu prieinamumu ir dėl šių savybių DCA gali būti taikomas ir uždegiminėms ligoms gydyti [193]. Priešuždegiminis DCA poveikis [194] buvo nustatytas tiriant pelių patelių artritą [195]. Nustatytas DCA inhibicinis poveikis T limfocitų aktyvacijai esant bronchų astmai [196]. DCA gali slopinti kraujagyslių uždegimą, paveikti aterosklerozinės plokštelės formavimąsi inhibuodamas *NLRP3* aktyvaciją ir makrofagų IL-1 β sekreciją plokštelėje [197]. Pelių sepsio modeliu buvo nustatytas DCA poveikis lipidų apykaitos ir mitochondrijų disfunkcijos keliams, kai gydant DCA slopinami sepsio sukelti pokyčiai [198]. Stanevičiūtės J. ir kt. tyrimų duomenys rodo, kad DCA gydymas sumažino žiurkių patinų čiobrialiaukės svorį [199, 200] ir padidino timocitų kiekį G₂–M ciklo bei sumažino G₁–G₀ ciklo fazėse [199], DCA turėjo poveikį ir intaktinių žiurkių patelių čiobrialiaukės svoriui. Nustatytas DCA poveikis intaktinių patinų Hasalio kūnelių (HK) skaičiui, jo

šąsaja su lytimi [200]. DCA gydymas lėmė intaktinių [200, 201] ir kastruotų žiurkių patinų timocitų NKCC1 geno raiškos sumažėjimą [200].

Valpro rūgšties poveikis uždegimui. GBM naviko uždegiminė mikroaplinka, joje išskiriami citokinai ir chemokinai bei uždegimo kelių aktyvacija skatina naviko piktybiškumą ir rezistentiškumą gydymui [202]. Imunomoduliacinis ir priešuždegiminis VPA poveikis [89, 203] gali būti susijęs su nuo lyties priklausančiu VPA metabolizmu [204, 205].

VPA pasižymi priešvirusinėmis savybėmis [206, 207]. Priešvirusinis gydymas gali apimti vaistus, kurie keičia energijos gamybą mitochondrijose ir aktyvina priešuždegiminius procesus [208]. VPA yra riebalų rūgščių beta oksidacijos kelio substratas ir jo metabolitai mažina nuo piruvato priklausomą oksidacinį fosforilinimą mitochondrijose [137]. Imunomoduliacinis VPA poveikis yra susijęs su inhibicija I ir II klasės HDAC, aktyvinančiomis H2, H3 ir H4 histonų acetilinimą ir keičiančiomis imuninių ląstelių genų raišką [209]. VPA slopina branduolio veiksnio κ B, IL-6 ir auglio nekrozės veiksnio α susidarymą [210]. Priešuždegiminės imuninės ląstelės sukuria daugiausia energijos iš aerobinės glikolizės [211]. Gydymas VPA mažina gliukozės kiekį gyvūnų ir žmonių kraujyje [212, 213]. Tyrimai parodė, kad VPA slopina T limfocitų proliferaciją *in vitro* [214], slopina limfocitų proliferaciją [215, 216] ir aktyvina limfocitų apoptozę [217, 218]. VPA slopina Th1 ir Th17 ląsteles ir susijusius citokinus [219], indukuoja M1 makrofagų transformaciją į M2 fenotipą [220]. Valančiūtės A. ir kt. tyrimų duomenimis gydymas VPA slopino kastruotų Wistar žiurkių patinų timocitų proliferaciją, sumažino čiobrialiaukės masę ir indukavo čiobrialiaukės šerdinės dalies epiteloretikulinių ląstelių diferenciaciją į HK [221]. Taip pat aštuonių savaičių gydymas VPA sumažino blužnies ir limfmazgių masę bei organų ląstelingumą palyginus su MRL/lpr(-/-) pelių patelių kontrole [216]. Prenatalinis VPA skyrimas sumažino naujagimių žiurkių patinų, bet ne patelių čiobrialiaukės masę [222].

1.4. Valpro rūgšties ir dichloroacetato derinio tyrimų duomenys

Intaktinių žiurkių patinų pakaitinis gydymas DCA ir VPA sumažino čiobrialiaukės masę, šis sumažėjimas buvo mažesnis nei tik DCA gydytų žiurkių. Tokio poveikio kastruotų gyvūnų čiobrialiaukei nenustatyta [199].

LSMU Histologijos ir embriologijos katedroje atlikti pelių, dvi savaites gydytų VPA–NaDCA, patinų timocitų tyrimai parodė priešuždegiminį derinio poveikį. Vaistinis preparatas poveikio pelių kūno ir čiobrialiaukės masėms bei HK skaičiui neturėjo. Gydymas padidino timocitų *Slc5a8* raišką, o tas įrodo VPA poveikį DCA nešikliui. Tyrimo metu derinys reikšmingai paveikė su

uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raišką: slopino 19 genų (*Ccl2*, *Ccl3*, *Ccr5*, *Cdkn1a*, *Cebpb*, *Csf3*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Il17f*, *Il18r1*, *Il1rl1*, *Il6*, *Ptgs2*, *Rel*, *Spp1*, *Thbs1*, *Tnfsf11*, *Vegfa*) ir aktyvino 20 genų raišką (*Bmp4*, *Bmp7*, *C3*, *Ccl19*, *Ccl25*, *Ciita*, *Cmklr1*, *Cx3cl1*, *Cxcl11*, *Cxcl12*, *Cxcl13*, *Il2*, *Il7*, *Il21*, *Il23a*, *Il27*, *Il33*, *Kitl*, *Nos2*, *Pparg*). VPA–NaDCA slopino 11 genų ir aktyvino 14 genų, dalyvaujančių citokinų aktyvumo kelyje, padidino 25 uždegiminio atsako kelyje dalyvaujančių genų raišką ir inhibavo 9 genų raišką IL-17 perdavimo kelyje. Vadinasi, VPA–NaDCA pasižymi priešūždegiminiu poveikiu, inhibuodamas uždegiminius mechanizmus pelių patinų timocituose, t. y. slopindamas uždegimą aktyvinančių genų ir indukuodamas priešūždegiminių chemokinių bei citokinų genų raišką [223].

Stakišaitis D. ir kt. nustatė, kad VPA–NaDCA turi priešūždegiminį poveikį T limfocitams ir tai yra susiję su lytimi. Vyrų, sergančių SARS-CoV-2 infekcija ir pneumonija, T limfocitų gydymas deriniu reikšmingai sumažino 40 genų, susijusių su uždegiminiu ir imuniniu atsaku, raišką: 22 genų dalyvaujančių citokinų aktyvumo (*CCL22*, *CCL24*, *CSF1*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL13*, *EBI3*, *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL6*, *IL10*, *IL19*, *IL24*, *IL27*, *LIF*, *OSM*); 17 genų – chemokinių perdavimo (*CKR3*, *CCL4*, *CCL22*, *CCL24*, *CCR1*, *CCR2*, *CCRL2*, *CMKLR1*, *CX3CR1*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL13*, *CXCR2*, *CXCR3*); 11 genų – neutrofilų (*CCL4*, *CCL22*, *CCL24*, *CSF3R*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL13*, *ITGB2*) ir 5 genų – limfocitų chemotaksio (*CCL4*, *CCL22*, *CCL24*, *CXCL13*, *CXCR3*); T limfocitų proliferacijos valdymo keliuose (*CCR2*, *CD209*, *EBI3*, *IL1A*, *IL1B*, *IL2RA*, *IL6*, *IL10*, *IL12RB1*, *IL23A*, *IL27*, *IL27RA*, *JAK3*, *TNFRSF14*). Sergančių moterų T limfocitų gydymas deriniu reikšmingai indukavo 10 genų ir inhibavo 11 genų raišką, dalyvaujančių uždegiminiame ir imuniniame atsakuose. Citokinų aktyvumo kelyje VPA–DCA slopino *CSF3* raišką ir aktyvino *BMP6*, *CCL20*, *CXCL2*, *CXCL8*, *IL11*, *IL1A*, *IL1B*, *IL23A*, *IL24*, *NODAL* raišką. Derinys slopino T limfocitų *ACKR3*, *CCL2*, *CCL24*, *CCL7*, *CCR1*, *CCR3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCR2* raišką chemokinių perdavimo kelyje. Po gydymo neutrofilų chemotaksio kelio *CCL2*, *CCL24*, *CCL7*, *CSF3R*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCR2* raiška buvo užslopinta. VPA–DCA slopino limfocitų chemotaksio kelio *CCL2*, *CCL7*, *CCL24* raišką T limfocituose. Derinio poveikis buvo stipresnis SARS-CoV-2 infekcija ir pneumonija sergantiems vyrams nei moterims [224]. Nustatytas poveikis uždegimo patogeneziniams keliams ir genų raiškai rodo, kad VPA–DCA derinys lemia pokyčius genų, kurie svarbūs ir kancerogenezei. Išsiaiškinti su lytimi susijusius GBM dimorfizmo ir gydymo veiksmingumo skirtumus

svarbu, nes taip galima pagerinti gydymo veiksmingumą ir pacientų išgyvenamumą taikant individualų GBM gydymą, pagrįsta su lytimi susijusiais specifiniais molekuliniais mechanizmais [225].

1.5. Vėžio žymenų tyrimai – individualizuotos terapijos pagrindas

PLBA ryšys su vėžiu. Proliferuojančios ląstelės branduolio antigenas (PLBA) – baltymas atsakingas už DNR replikaciją, atitaisymą ir pažaidų toleravimą bei chromatinio remodeliavimą. Tyrimai rodo, kad PLBA yra susijęs su apoptozės ir ląstelių signalo perdavimo keliais ir sąveikauja su daugiau nei 600 baltymų [226]. PLBA yra nustatomas tik proliferuojančių ląstelių branduoliuose ir jo raiška didėja kartu su GBM sunkumo stadija. PLBA suaugusių GBM pacientų navikuose yra prognostinis veiksnys ir jo padidėjusi raiška koreliuoja su pacientų mažesniu išgyvenamumu [227, 228]. Žymuo svarbus prognozuojant ligos recidyvo tikimybę ir piktybiškumą [229]. PLBA raiška leidžia vertinti naviko gydymo veiksmingumą tiriant CAM modeliu [230].

EZH2 ryšys su vėžiu. EZH2 yra polikombo slopinantis komplekso 2 katalizinis subvienetas (angl. *enzymatic subunit of polycomb repressive complex 2*), histonų N-metiltransferazė, kuri metilina H3 liziną žinduolių ląstelėse ir slopina transkripciją [231, 232]. EZH2 inhibuoja genus atsakingus už kancerogenezės slopinimą, o EZH2 aktyvumo slopinimas gali mažinti naviko augimą [233]. Didelė EZH2 raiška nustatoma piktybinių navikų kamieninėse ląstelėse [234]. EZH2 svarbus gliomos, krūties ir prostatos vėžio raidai bei naviko metastazavimui [232]. Šešerių tyrimų metaanalizė parodė, kad padidėjusi EZH2 raiška yra susijusi su bloga GBM prognoze [235]. EZH2 svarbus kamieninių ląstelių atsinaujinimo, jų vystymosi, imuninio atsako ir ląstelių senėjimo procesams [236]. EZH2 sąveikaudamas su onkogenais (*MYC*, *PTEN*) daro įtaką naviko piktybiškumui aktyvindamas EMT mechanizmą, inicijuoja GBM ląstelių invaziją ir metastazavimą [237]. EZH2 yra priešvėžinių vaistų taikinytis [238]: tiriant vaistų poveikį kancerogenezei, EZH2 raiškos nustatymas navike CAM modeliu yra informatyvus metodas [239, 240].

p53 ryšys su vėžiu. *TP53* genas koduoja p53 baltymą, veikiantį kaip transkripcijos veiksnys. Normaliose somatinėse ląstelėse p53 raiška yra žema [241]. p53 palaiko ląstelės homeostazę, yra atsakingas už ląstelių proliferaciją, išgyvenamumą, funkcionuoja kaip transkripcijos veiksnys, aktyvina ląstelės ciklo stabdymą ir apoptozę [242]. *TP53* raiška daugelyje navikinių susirgimų yra sutrikusi ir jo mutacijos yra susijusios su GBM progresavimu ir p53 inaktyvacija, koreliuojančia su padidėjusiu naviko invazyvumu [241], prislopinta apoptoze, su aktyvesnės proliferacijos naviko fenotipu [1]. Mutantinio p53 kiekis koreliuoja su bloga vėžio prognoze ir trumpesniu

GBM liginio išgyvenamumu. Mutantinio p53 dažnis priklauso nuo GBM molekulinio potipio [241].

E-kadherino ir N-kadherino ryšys su glioblastomos raida. Kadherinai priklauso adhezijos molekulių šeimai, reguliuojančiai apoptozę, genų raišką, ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir migraciją [243]. Gliomos progresavimas ir rezistentiškumas gydymui yra susiję su ląsteliniiais EMT mechanizmais. EMT metu ląstelės įgyja mezenchiminį potipį ir suaktyvėja ląstelių migracijos savybės [243, 244]. GBM mezenchiminė transformacija yra nustatoma navikui atsinaujinant arba esant rezistentiškumui į TMZ gydymą. Mezenchiminis GBM potipis yra invazyvesnis ir rezistentiškesnis gydymui [243]. EMT metu E-kadherino raiška sumažėja ir padidėja N-kadherino raiška [245].

CDH1 koduoja ląstelių adhezijos baltymą E-kadheriną. *CDH1* yra naviko supresorius [243]. E-kadherino pokyčiai yra susiję su specifinių epitelinės kilmės navikų vystymusi, bet reti *CDH1* variantai gali sukelti ir neuroepitelinės ar epitelinės kilmės smegenų navikus, t. y. Wnt/ β katenino signalinis kelias siejamas su E-kadherino paveiktų navikų raida [246]. Gliomų E-kadherino genas yra neaktyvus arba geno raiška yra žema dėl hipermetilavimo GBM audinyje ir mažėja su smegenų naviko stadija [247, 248]. Tačiau N-kadherino genas (*CDH2*) yra aktyvus GBM audinyje ir yra siejamas su gliomos progresavimu [153, 244]. N-kadherino raiška tiesiogiai koreliuoja su gliomos laipsniu ir su Ki-67 žymens raiška [243]. Spindulinei terapijai rezistentiškų gliomos kamieninių ląstelių populiacijoje N-kadherino raiška yra didelė [249].

NKCC1 nešiklio svarba naviko progresavimui. Na-K-Cl nešiklis (NKCC) perneša Na^+ , K^+ ir Cl^- į ląstelės vidų. Nešiklis turi dvi izoformas: NKCC1 ir NKCC2. NKCC1 yra koduojamas *SLC12A2* ir randamas įvairių tipų audiniuose, o NKCC2 – aktyvus inkstuose. NKCC aktyvumas priklauso nuo fosforilinimo, aktyvinančio abi izoformas [250, 251]. NKCC1 perneša vieną Na^+ , vieną K^+ ir du Cl^- jonus ir yra atsakingas už Cl^- kaupimąsi ląstelėje [251]. Navikinės ląstelės kaupdamos Cl^- , didina ląstelės tūrį. Farmakologinė NKCC1 inhibicija bumetanidu slopina gliomos ląstelių migraciją ir invaziją [252]. NKCC1 aktyvumo pokyčiai gali pakeisti mitochondrijų funkciją. Fibroblastuose, gydytuose NKCC1 inhibitoriumi bumetanidu, nustatomi suaktyvėję mitochondrijų oksidaciniai procesai [253].

Na^+ ir Cl^- koncentracija svarbi naviko mikroaplinkai, nes šie jonai yra susiję su vėžio progresavimo mechanizmais [135, 136]. NKCC1 svarbus naviko ląstelių proliferacijos ir apoptozės mechanizmams [153]. Tai būdinga navikinėms ląstelėms, pasižyminčioms didelio aktyvumo NKCC1 raiška [152, 254]. Naviko viduląstelinė Cl^- koncentracija yra vienas iš svarbių priešvėžinės terapijos taikinių, todėl viduląstelinio Cl^- koncentracijos

reguliavimas per NKCC1 aktyvumą gali stiprinti priešvėžinių vaistų poveikį [255, 256]. Damanskienė E. ir kt. nustatė, kad VPA gydymas padidino pediatriinių GBM ląstelių NKCC1 geno raišką *in vitro*, bet šis poveikis priklausė nuo ląstelių linijos [257].

NaDCA inhibuoja $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ nešiklį [201]. NKCC1 inhibicija mažina viduląstelinio Cl^- kiekį, galintį paveikti navikinių ląstelių proliferaciją ir apoptozę [255, 256]. NKCC1 aktyvumas žiurkių timocituose yra jautrus NKCC inhibitoriui furozemidui [258, 259]. NKCC1 gali būti aktyvinamas ląstelėse, kurioms trūksta Cl^- [260]. NKCC1 stimuliacija ląstelės G_1 ciklo fazės metu yra būtina tam tikrų ląstelių proliferacijai [261].

NKCC1 raiška intaktinių žiurkių timocituose priklauso nuo lyties – NKCC1 daugiau aktyvus patinų nei patelių timocituose [200]. Gimimo dieną NKCC1 mRNA kiekis buvo didesnis žiurkių patelių, o ne patinų smegenų pogumburio ląstelėse; bendrasis NKCC1 baltymo kiekis buvo didesnis žiurkių patinų, o ne patelių vaisiaus pogumburyje [262]. Palyginus žmogaus ir žiurkių ląsteles, nustatytas NKCC1 aktyvumo skirtumas: žmogaus neuronuose NKCC1 pernešamo Cl^- aktyvumas buvo 61,7 proc. žemesnis nei žiurkių neuronuose [263]. Eritrocitų vidutinis $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ nešiklio baltymo kiekis buvo nuo 26 proc. iki 46 proc. didesnis vyrų nei moterų [264, 265].

Laisvieji radikalai ir tirozino baltymo nitrinimas gali paveikti NKCC struktūrą ir funkcinis pokyčius [266, 267].

KCC2 nešiklio svarba naviko progresavimui. K-Cl nešiklis (KCC) priklauso katijono-chlorido nešiklių šeimai ir jis gali būti 4 tipų. Visi 4 nešikliai yra panašūs savo struktūra ir funkcija, bet KCC2 nustatomas centrinės nervų sistemos ląstelėse [268]. KCC2 nešiklis išneša K^+ ir Cl^- iš ląstelės ir yra koduojamas *SLC12A5* [269]. KCC2 yra aktyvus nerviniame audinyje ir smegenų žievėje [270]. KCC2 yra gliomos naviko supresorius. KCC2 raiška yra sumažėjusi GBM ląstelėse. Padidėjusi KCC2 raiška GBM ląstelėse slopina GBM proliferaciją [271]. VPA padidina KCC2 geno raišką pediatriinių GBM ląstelėse, taip pat aktyvina K^+ ir Cl^- išėjimą iš ląstelės, bet poveikis priklauso nuo GBM ląstelių [257]; preparato poveikis nesusijęs su DNR metiliniu [271]. KCC2 yra GBM prognostinis žymuo. KCC2 yra susijęs su naviko imuninio atsako reguliavimu ir reguliuoja ląstelių proliferaciją bei migraciją [272].

Histologiniuose preparatuose buvo nustatyta, kad suaugusių GBM ir epilepsija sergančių pacientų KCC2 raiška buvo sumažėjusi [273, 274]. NKCC1 ir KCC2 aktyvumo balanso sutrikimai gali sumažinti hiperpolarizuojantį γ -aminosviesto rūgšties (angl. *γ -aminobutyric acid*; GABA) poveikį ir gali veikti epilepsijos pasireiškimą GBM pacientams. Esant epilepsijai, traukuliai blogina GBM ligos eigą [275]. Tinkamas KCC2 aktyvumas užtikrina postsinapsinių neuronų GABA A receptorių funkcionavimą [269]. Epilepsija,

atsirandanti sergant GBM, yra siejama su sumažėjusiu KCC2 aktyvumu naviko aplinkoje. Aktyvuojant KCC2, galima paveikti viduląstelinio Cl^- homeostazę ir taip galėtų padėti sukontroliuoti traukulių dažnį ir intensyvumą [276]. Aktyvuojančių KCC2 vaistų poveikis GBM ląstelėse nešikli daro potencialiu priešvėžiniu žymeniu.

SLC5A8 nešiklis, jo reikšmė dichloroacetato pernešimui ir naviko progresavimui. Su Na^+ susijęs monokarboksilatų nešiklis (SLC5A8) yra koduojamas *SLC5A8* ir priklauso nuo Na^+ [277]. Nešiklis perneša į ląstelę pieno rūgštį, piruvatą, acetatą, propionatą, valeratą, butiratą, monokarboksilato vaistus (DCA, nikotiną ir kitus) ir ketonus [28, 277]. Nešiklio aktyvumas priklauso nuo viduląstelinio Na^+ ir Cl^- kiekio. Suaugusių patinų laukinio tipo *c/ebpδ+/-* ir *c/ebpδ-/-* pelių tyrimai parodė, kad SLC5A8 daugiausia perneša trumpąsias riebalų rūgščių grandines į ląstelę [278, 279]. Jei nešiklis nėra aktyvus, ląstelėje substratas gali nesikaupiti. Trumposios riebalų rūgštys, patekusios į imuninės kilmės ląstelę per SLC5A8 pakeičia HDAC aktyvumą sukeldamos imunomoduliuojantį poveikį: slopina dendritinių ląstelių vystymąsi, citokinų išskyrimą ir aktyvina T limfocitų apoptozę; tai rodo SLC5A8 svarbą uždegimo mechanizmams [280, 281]. SLC5A8 aktyvina ląstelės apoptozę per nuo piruvato priklausomą HDAC supresiją [28].

SLC5A8 yra pirminių žmogaus ir eksperimentinių gyvūnų gliomų augimo supresorius, svarbus kancerogenezei, susijusiai su epigenetiniais mechanizmais [277, 282]. *SLC5A8* raiškos slopinimas yra siejamas su DNR metiliniu, o naviko ląstelių gydymas su DNR demetilinančiomis medžiagomis padidina *SLC5A8* raišką [28]. VPA gali aktyvuoti genus, reguliuojamus DNR metiliniu [29, 283]. SLC5A8 aktyvumas žiurkių patinų dvylikapirštės žarnos enterocituose priklauso nuo NKCC1 nešiklio aktyvumo [284].

SLC5A8 raiška gyvūnų T limfocituose gali paveikti imuninį atsaką ir būti susijusi su virusinių ligų progresavimu [285]. Žema SLC5A8 raiška yra susijusi su *papilloma* viruso paveiktu naviko vystymusi [286]. *SLC5A8* raiška navikinėse ląstelėse yra užslopinta hipermetilavimo ir toks genų užtildymas yra susijęs su prasta prognoze [287]. VPA gali padidinti *SLC5A8* raišką GBM ląstelėse [257, 283]. HDAC inhibicija sukelia ląstelių apoptozę per SLC5A8 [28, 288].

1.6. Eksperimentiniai modeliai, taikyti tyrimams

Čiobrialiaukės modelio taikymas vėžio tyrimams. Čiobrialiaukė priklauso centriniams imuninės sistemos organams, kur T limfocitai formuojasi, bręsta ir diferencijuojasi iš timocitų [289]. Žinduolių čiobrialiaukė yra padalinta į žievinę ir šerdinę dalis. Žievinėje dalyje yra daugiau limfocitų nei

šerdinėje [290]. Nesubrendę $CD4^-CD8^-$ ir $CD4^+CD8^+$ timocitai yra čiobrialiaukės žievinėje dalyje, o labiau subrendę $CD4^+CD8^-$ ar $CD4^-CD8^+$ timocitai yra šerdinėje liaukos dalyje [291]. Timocitai sąveikauja su čiobrialiaukės epitelioretikulinėmis ląstelėmis, suaktyvinančiomis timocitų diferenciaciją į subrendusius $CD4^+$ ir $CD8^+$ [292]. Viduląstelinė Cl^- koncentracija yra vienas svarbiausių rodiklių ląstelės proliferacijos ir diferenciacijos procesuose [293]. Už Na^+ ir Cl^- patekimą į timocitus yra atsakingas NKCC1 nešiklis [258]. Šerdinės dalies HK atspindi galutinę čiobrialiaukės epitelioretikulinį ląstelių diferenciacijos stadiją ir dalyvauja timocitų atsinaujinimo ar brendimo bei apoptozės procesuose [292]. HK formavimasis yra siejamas su nuo amžiaus priklausoma liaukos atrofija ir sumažėjusia interferono α gamyba, t. y. susijęs su sumažėjusių uždegiminių signalų perdavimu ir sutrikusiu timocitų vystymusi [294].

Dėl netinkamos mitybos ar infekcijos čiobrialiaukė yra linkusi atrofuotis mažėjant žievinės dalies audiniui bei timocitų kiekiui liaukoje [291]. Be to, čiobrialiaukė su amžiumi regresuoja. Sumažėjęs čiobrialiaukės dydis ir funkcija lemia sumažėjusią T limfocitų cirkuliaciją periferijoje. Šie liaukos funkcijos pokyčiai gali padidinti autoimuninių ligų, bakterijų, virusinių infekcijų ir neoplazmų riziką [289].

Tyrimai rodo, kad nuo amžiaus priklausoma čiobrialiaukės involiucija priklauso nuo lytinių hormonų [295]. Senų rezus makakų patinų gydymas testosteronu padidino naivių T limfocitų kiekį kraujyje, o kartu padidėjo ir čiobrialiaukė [296]. Timocitai ir epitelioretikulinės ląstelės turi androgenų receptorius [297]. Su lytimi susiję imuninio atsako skirtumai priklauso nuo mitochondrijų dimorfinės populiacijos ir lytinių hormonų [298].

Tiriant vaistus, svarbu nustatyti vaistinio preparato poveikį čiobrialiaukės masei ir jos struktūros pokyčiams. Čiobrialiaukė yra vertingas eksperimentinių tyrimų modelis, kurio taikymas leidžia vertinti vaistinių preparatų poveikį liaukai ir timocitų proliferacijai.

U87 ir T98G ląstelių linijų ląstelių tyrimai taikant glioblastomos eksperimentinius modelius. Eksperimentiniams tyrimams buvo naudotos dvi GBM U-87 MG (U87; ECACC 89081402) ir T98G (ATCC Nr. CRL-1690™) ląstelių linijų ląstelės. U87 ląstelių linija išskirta iš 44 metų amžiaus moters navikinio smegenų audinio (glioblastomos astrocitomos) [299]. Kartu su U87 ląstelėmis yra nustatoma $CD133^+$ ląstelių populiacija, padedanti U87 ląstelėms formuoti neurosferas, kurios gali būti naudojamos GBM tyrimams [300]. U87 linijos ląstelės turi *TERT*, *ATRX*, *PTEN* mutacijas ir metilintą *MGMT*, bet U87 ląstelės neturi izocitrato dehidrogenazės 1 mutacijos [301, 302]. Pelių modelių U87 navikai smegenyse yra apsupami aktyvuotų astrocitų be infiltracijos požymių. Taip pat U87 ląstelių atsakas spindulinei terapijai priklauso nuo spinduliuotės dozės [303].

T98G ląstelių linija išskirta iš 61 metų amžiaus vyro daugiaformės glioblastomos naviko [304]. Palyginus su U87 ląstelėmis, T98G ląstelės geriau atspindi GBM navikams būdingą proliferacinį ir invazinį fenotipą tiriant *ex vivo*, *in vitro* ir *in vivo* modeliais. T98G ląstelių invazija koreliuoja su proliferacija ir kamieninių ląstelių savybėmis [305].

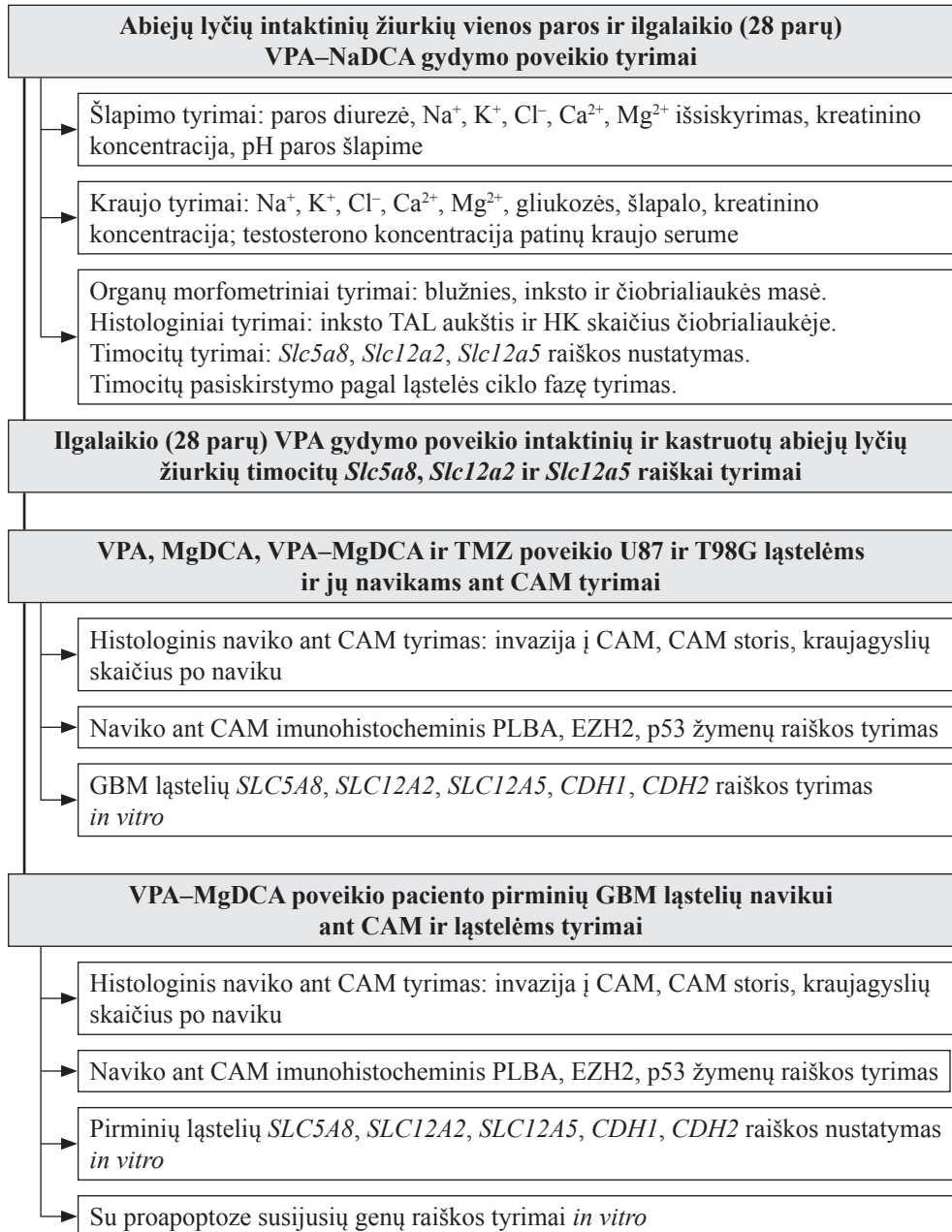
U87 ir T98G ląstelės skiriasi atsaku į TMZ gydymą: U87 yra jautrios gydymui, o T98G ląstelės yra rezistentiškesnės, todėl joms citotoksiška TMZ dozė yra didesnė. T98G turi aktyvų *MGMT* ir alkilpurino DNR N glikozilazės (angl. *alkylpurine-DNA-N-glycosylase*) baltymą, kurie dalyvauja DNR reparacijos procesuose [13].

Abi ląstelių linijų ląstelės yra naudojamos tiriant *in vivo* ir *in vitro* modeliais, nes gali atkartoti žmogaus pirminės GBM histopatologinius pokyčius. Dėl panašumo į žmogaus GBM pirmines ląsteles, šių ląstelių tyrimai ksenografo CAM modeliu padeda iširti navikui specifinius patogenezės kelius – naviko augimo, apoptozės ir angiogenezės mechanizmus [303].

CAM modelio taikymas vėžio tyrimams. CAM modelis yra taikomas tirti naviko gydymo galimybes analizuojant naviko augimą, invaziją ir angiogenezę [239, 306]. Suformuoti iš GBM ląstelių navikai ant CAM atspindi pirminį naviko piktybiškumą. CAM modeliu tiriami iš paciento naviko suformuoti ksenograftai suteikia galimybę įvertinti galimą individualios chemoterapijos gydymo veiksmingumą [307]. CAM modelis yra tinkamesnis prognozuojant iš paciento suformuoto naviko ksenografo gydymo prognozę bei padeda tirti naviką. Šis metodas leidžia gauti tyrimo duomenis greičiau nei taikant graužikų imunodeficitinius modelius [308]. CAM modelis iki dešimtos viščiuko embriono vystymosi dienos yra imunodeficitinis modelis [306, 309]. Ksenograftas sukelia uždegiminius procesus CAM srityje [306]. Krūties vėžio navikinių ląstelių linijų histomorfologinių ir imunohistocheminių tyrimų rezultatai, naudojant CAM modelį, buvo panašūs į pelių modelio ir paciento naviko audinio tyrimų rezultatus [310]. Palyginamieji vaistinių preparatų poveikio U87 naviko augimui ant CAM ir U87 sferoidams tyrimai parodė, kad sferoidų tyrimų modelis neatspindi naviko progresavimo ar gydymo poveikio navikui, kas yra nustatoma taikant CAM modelį [311]. Taikant CAM modelį, galima analizuoti papildomus rodiklius, padedančius vertinti ksenografo piktybiškumą ir CAM mezenchimos storio kitimą po naviku; kas yra tiesiogiai susiję su padidėjusiu kraujagyslių skaičiumi mezenchimoje po naviku [312, 313]. GBM yra indukuojantis neoangiogenezę navikas [314], o CAM modelis padeda nustatyti tiriamo vaistinio preparato poveikį neoangiogenezei.

2. TIRTA MEDŽIAGA IR TYRIMŲ METODAI

Atliktų tyrimų schema yra pateikta 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Atliktų tyrimų schema

2.1. Žiurkių tyrimo medžiaga ir atlikti tyrimai

Vienos paros ir ilgalaikio (28 parų) VPA–NaDCA gydymo (150 mg/kg/parai VPA ir 100 mg/kg/parai NaDCA derinio dozė) poveikiui įvertinti buvo tirtos abiejų lyčių 5–6 savaičių amžiaus intaktinės Wistar žiurkės. Tirtos žiurkių grupės ir jų imtys pateiktos 2.1.1 lentelėje (iš viso tirti 24 gyvūnai).

2.1.1 lentelė. VPA–NaDCA gydytos žiurkių grupės ir jų imtis

Tirtos grupės			
Patiniai	n	Patelės	n
Kontrolė	6	Kontrolė	6
Gydyti VPA–NaDCA	6	Gydytos VPA–NaDCA	6

Žiurkėms buvo atlikti šie tyrimai:

- 1) kūno masės morfometriniai matavimai pirmą, 14 ir 28 tyrimo dieną;
- 2) inksto, blužnies ir čiobrialiaukės masės morfometriniai matavimai tyrimo pabaigoje (po 28 parų gydymo);
- 3) vienos VPA–NaDCA paros poveikio šlapimo paros diurezei, Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺ išsiskyrimui, kreatinino koncentracijai ir paros šlapimo pH tyrimai;
- 4) ilgalaikio VPA–NaDCA gydymo poveikio tyrimai (9–10 savaičių amžiaus žiurkės):
 - a) 28 paros šlapimo diurezė, paros šlapimo Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺ išsiskyrimui, kreatinino koncentracija ir šlapimo pH tyrimai;
 - b) kraujo tyrimai: gliukozės, Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, šlapalo, kreatinino koncentracija; patinų testosterono kraujo serume koncentracija po gydymo;
 - c) inksto storosios kylančiosios Henlės kilpos dalies (angl. *thick ascending limb*, TAL) epiteliocitų aukščio histomorfometriniai matavimai;
 - d) HK skaičiaus vertinimas čiobrialiaukės histologiniuose preparatuose;
 - e) timocitų santykinės *Slc5a8*, *Slc12a2* ir *Slc12a5* raiškos tyrimas;
 - f) timocitų pasiskirstymo pagal ląstelės ciklo fazę tyrimas.

VPA (300 mg/kg/parai) 28 parų gydymo poveikiui *Slc5a8*, *Slc12a2* ir *Slc12a5* raiškai nustatyti, tirtos 4–5 savaičių amžiaus abiejų lyčių Wistar žiurkių grupės (tyrimas atliktas po gydymo 8–9 savaičių amžiaus žiurkėms) yra pateiktos 2.1.2 lentelėje.

2.1.2 lentelė. VPA gydytos žiurkių grupės ir jų imtis

Tirtos grupės			
Intaktiniai patinai	n	Kastruoti patinai	n
Kontrolė	6	Kontrolė	6
Gydyti VPA	6	Gydyti VPA	6
Intaktinės patelės		Kastruotos patelės	
Kontrolė	6	Kontrolė	6
Gydytos VPA	6	Gydytos VPA	5

2.1.1. Wistar žiurkių priežiūra ir gydymas

Ekperimentiniam tyrimui su gyvūnais buvo gautas Lietuvos maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas (2019-01-09; Nr. G2-98). Žiurkės laikytos kolonijiniuose narveliuose (*1500 U Standart IV S, Techniplast, Italija*) po 6 gyvūnus. Žiurkės įsigytos iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (toliau – LSMU) Veterinarijos akademijos vivariumo. Tyrimas vykdytas LSMU Veterinarijos akademijos Biologinių tyrimų centre. Iki eksperimento pradžios, aklimatizacijos tikslu 5 paras gyvūnai laikyti LSMU Veterinarijos akademijos Biologinių tyrimų centre. Tyrimas truko 28 paras. Žiurkės šertos specialiu graužikų granuliuotu pašaru (*Joniškio grūdai, Lietuva*) *ad libitum*. Kontrolės žiurkės girdytos *ad libitum* šviežiu vandentiekio vandeniu, o gydytos VPA–NaDCA vandeniniu tirpalu (150 mg/kg/parai VPA (*Sigma-Aldrich GmbH, Vokietija*) ir 100 mg/kg/parai NaDCA (*Sigma-Aldrich GmbH, Vokietija*). Patalpoje, kurioje laikytos žiurkės, visą tyrimo laikotarpį palaikytos pastovios aplinkos sąlygos: temperatūra 22 ± 1 °C, drėgmė ~60 proc., paros šviesos/tamsos režimas – 12/12 valandų.

2.1.2. Žiurkių šlapimo tyrimai

Pradėjus tyrimą, tikslu surinkti paros šlapimą, 24 valandas žiurkės laikytos po vieną metaboliniame narvelyje (*3701M081, Techniplast, Italija*). Narvelyje žiurkės laikytos be maisto, bet su laisva prieiga prie vandens arba VPA–NaDCA vandeninio tirpalo. Šlapimo analizė atlikta automatizuotu analizatoriumi (*Iris iQ200, Iris Diagnostics, JAV*). Paros šlapimo pH nustatytas analizatoriumi (*AUTION ELEVEN-4020, Arkray, Japonija*). Tikslu nustatyti ilgalaikio gydymo VPA–NaDCA poveikį paros šlapimo tirtiems rodikliams, 27 tyrimo parą žiurkės vėl buvo patalpintos 24 valandoms į metabolinius narvelius ir surinktas paros šlapimas. Paros diurezė ir šlapimo jonų koncentracija buvo apskaičiuojama 100 g gyvūno kūno masės.

2.1.3. Žiurkių kraujo serumo tyrimai

Žiurkių kraujo serumo tirtų rodiklių pokyčiams nustatyti 28 parą buvo paimtas kraujas (metodika nurodyta 2.1.4 skyriuje). Kraujas centrifuguotas 1200×g greičiu 15 min. 4 °C temperatūroje (*HERAEUS Megafuge 8R*, *Thermo Scientific*, Vokietija) ir tyrimui buvo nusiurbtas serumas. Kraujo analizių serumo analizė atlikta automatizuotu klinikinės chemijos analizatoriumi (*Olympus AU680*, *Beckman Coulter/Olymus*, JAV). Patinų testosterono koncentracija kraujo serume nustatyta kiekybiniu imun fermentiniu ELISA metodu (*Sigma-Aldrich*, Vokietija).

2.1.4. Žiurkių paruošimo tolesniems tyrimams ir tėkmės citometrijos metodikos

Po 28 parų žiurkės buvo pasvertos svarstyklėmis (*KERN 440-21N*, *KERN & Sohn GmbH*, Vokietija) ir į pilvaplėvę suleista po 100 µl bromodeoksiuridino tirpalo (*BD Pharmingen*, JAV), kuris, inkorporuodamasis į ląstelės DNR grandinę, fluorescuoja ir taip padeda aptikti proliferuojančias ląsteles tėkmės citometrijos metodu. Suleidus bromodeoksiuridino tirpalą, buvo laukiama dvi valandas. Po to gyvūnai užmigdyti 70 proc. CO₂ kame- roje. Giliai įmigus gyvūnui, bet dar plakant jo širdžiai, žiurkė nukraujinta – perkirpus miego arteriją ir aortą, siekiant maksimaliai sumažinti eritrocitų kiekį žiurkės čiobrialiaukėje. Tyrimams buvo paimti ir pasverti žiurkės dešiny- nysis inkstas, čiobrialiaukė ir blužnis. Kairioji čiobrialiaukės skiltis, inkstas (vienas pjūvis inkstą dalino išilgai piramidės ir išilgai inksto į dvi dalis, t. y. per vartus link žievės) ir blužnis tris paras buvo fiksuoti 10 proc. formalino buferiniame tirpale (*Merck KGaA*, Vokietija) ir naudoti histologiniams tyri- mams. Kraujo likučiai nuo dešinės čiobrialiaukės skilties nuplauti *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640) mitybine terpe (*Sigma-Aldrich GmbH*, Vokietija). Čiobrialiaukės skiltis mechaniškai susmulkinta 37 °C temperatūros RPMI-1640 terpeje pipetuojuant automatine pipete (*Eppendorf Research*, *Eppendorf AG*, Vokietija). Siekiant pašalinti jungiamojo audinio likučius, timocitų suspensija buvo perkošta per du sterilios neaustinės ser- vetėlės sluoksnius (*Mesoft*, *Molnlycke*, Švedija). Suspensija dar kartą buvo centrifuguota, kad pašalintume eritrocitus. Timocitų suspensija naudota tėkmės citometrijos, *Slc5a8*, *Slc12a2* ir *Slc12a5* raiškos tyrimams.

Timocitų pasiskirstymo pagal ląstelės ciklo fazę vertinimui buvo naudo- tas *APC BrdU* tėkmės rinkinys (angl. *APC BrdU flow kit*; *BD Pharmingen*TM, *BD Bioscience Pharmingen*, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. Paruoš- tos ląstelės buvo analizuojamos tėkmės citometru (*aFCSLyric*, *Becton Dickinson*, JAV).

2.1.5. Žiurkių inksto, čiobrialiaukės histologinių preparatų paruošimas ir imunohistocheminis dažymas

Po fiksacijos tirta medžiaga buvo sudėta į biopsines kasetes (*Carl Roth GmbH+Co. KG*, Vokietija) ir plauta 4 valandas po tekančio vandens srove fiksatoriui pašalinti. Tada tirta medžiaga buvo dehidratuota, kietinta ir impregnuota. Po impregnavimo 64 °C termostate (*Ecocell*, Vokietija), naudojant liejimo formas (*BioOptica*, Italija), tirta medžiaga buvo įlieta į parafino blokus. Parafino blokai buvo šaldyti ant –10 °C temperatūros šaldymo plokštės (*Pfm medical AG*, Vokietija), tada 3 μm storio pjūviais supjaustyti rotaciniu mikrotomu (*RM2155, Leica microsystems*, Vokietija). Pjūviai buvo ištiesinti 37 °C temperatūros vandens vonelėje (*HI 1210, Leica microsystems*, Vokietija) ir buvo sudėti ant šlifuotais kraštais objekcinio stiklelio (*Duran group*, Vokietija). Nupjauti preparatai laikyti ant šildymo plokštės (*13801, Medax*, Vokietija). Prieš dažymą nupjauti preparatai tris paras džiovinti 37 °C temperatūroje termostate (*LSIS-B2V/EC55, Ecocell*, Vokietija) ir deparafinuoti ksilenu (*Merck KGaA*, Vokietija).

Inksto ir čiobrialiaukės preparatai dažyti hematoksilino ir eozino (H-E) dažais. Imunohistocheminis (IHC) dažymo metodas naudotas didelio molekulinio svorio citokeratinams (citokeratino monokloninis antikūnas, klonas 34βE12; *Dako A/S*, Vokietija) išryškinti čiobrialiaukėje.

2.1.6. Žiurkių TAL aukščio inkste ir HK skaičiaus čiobrialiaukėje tyrimo metodikos

Histomorfometrinė analizė atlikta naudojant šviesinio mikroskopo foto-kamerą (*OLYMPUS BX40F4, Olympus Life Science Europa GMBH*, Vokietija) ir *CellSens Dimension 1.9* skaitmeninę vaizdavimo programinę įrangą (*Olympus Corporation of America*, JAV).

Histologiniai inksto pjūviai buvo dažyti H-E. Keturiuose regėjimo laukuose (fotografuota 40× padidiniu) matuotas po 10 kubinių epiteliocitų išklojančių TAL aukštis (μm) kiekvienam tirtam atvejui, apskaičiuotas vidurkis.

Čiobrialiaukė buvo įlieta taip, kad atliekant histologinius pjūvius liauka būtų pjaunama išilgai. Kiekvienu atveju buvo pjaunama 16 pjūvių: 8 dažomi H-E, kiti 8 – IHC dažais. IHC dažymui buvo naudotas *EnVisionPlus-HRP* rinkinys (*Dako*, Danija). 100 kartų padidinti preparatų vaizdai fotografuoti su skaitmenine kamera (*U-CMAD3, Olympus*, Japonija) ir skenuojančiu mikroskopu (*OLYMPUS BX40F4, Olympus Opticae co. LTD.*, Japonija). Naudojant *Image-Pro Plus 7* versijos programinę įrangą (*MediaCybernetics*, JAV), kiekviename preparate buvo matuojamas bendras čiobrialiaukės ir šerdinės dalies plotas (mm²) ir apskaičiuojamas kiekvieno tiriamo atvejo ploto

vidurkis. Šerdinėje dalyje buvo skaičiuojamas HK skaičius ir jų vidurkis kiekvienam tiriamam atvejui.

2.1.7. RNR išskyrimas, kiekio ir kokybės nustatymas, santykinės genų raiškos analizė

Bendrosios (angl. *total*) RNR išskyrimui iš žiurkės čiobrialiaukės buvo naudotas *TRIZol Plus* RNR gryninimo rinkinys (*Life Technologies*, JAV).

RNR buvo išskiriama iš timocitų suspensijos (žiūrėti 2.1.4 skyrių) ar 8–9 savaičių amžiaus kastruotų ir intaktinių abiejų lyčių žiurkių kontrolių bei gydytų 4 savaites 300 mg/kg/parai VPA žiurkių čiobrialiaukės audinio ($n = 47$; Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimo Nr. G2-53; 2017-01-02). Šviežias kairiosios čiobrialiaukės skilties audinys buvo patalpintas į RNR stabilizuojantį reagentą (*RNAlaterRNA*, *Qiagen*, Vokietija) ir laikytas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki RNR gryninimo.

Timocitų suspensija buvo homogenizuota ją pipetuoiant su *TRIZol* reagentu. Užšaldytas čiobrialiaukės audinys homogenizuotas trinant skystame azote (*Gaschema*, Lietuva). Gryninant genetinę medžiagą vadovautasi gamintojo rekomendacijomis. Koncentracija bei švarumas nustatyti naudojant bekiuветį spektrofotometrą (*NanoDrop 2000*, *Thermo Scientific*, JAV), ir po to buvo užšaldyti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki tolimesnio naudojimo. Atsižvelgiant į išmatuotų mėginių koncentracijas, buvo pagaminti darbiniai tirpalai, kurių koncentracijos atitiko gamintojo metodikos rekomenduojamas.

RNR kokybei bei kiekybei nustatyti taikyta integralumo analizė naudojant RNR 6000 nano rinkinį (*Agilent Technologies*, Vokietija). RNR mėginių analizė atlikta bioanalizatoriumi (*Agilent 2100*, *Agilent Technologies*, Vokietija) pagal gamintojo rekomendacijas. Visi tirti žiurkių mėginiai atitiko tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos tyrimui rekomenduojamą kokybę [315].

Santykinei genų raiškai nustatyti buvo atlikta atvirkštinės transkripcijos reakcija naudojant aukštos kokybės kopijinės DNR atvirkštinės transkripcijos rinkinį su ribonukleazių inhibitoriumi (*AppliedBiosystems*, Lietuva) ir genų raiška vertinta tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu (*7900 Fast Real-Time PCR System*, *Applied Bio-Systems*, JAV) naudojant *TaqMan* zondus (2.1.7.1 lentelė) [316, 317]. Tyrimas buvo atliktas mėginius kartojant tris kartus pagal gamintojo rekomendacijas. Tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos nustatymai buvo $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min., 40 ciklai $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s ir $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min. Santykinei genų raiškai vertinti pasirinktas $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (*Livak*) metodas [318]. Slenkstinio ciklo (angl. *threshold cycle*, CT) ≥ 35 reikšmė buvo vertinama kaip raiškos nebuvimas ir neįtraukta į skaičiavimus.

2.1.7.1 lentelė. Genai ir atitinkami *TaqMan* zondai naudoti santykinai genų raiškai nustatyti

Pavadinimas	Genas	
	Žmogus (ląstelių linija)	Žiurkė
Referentinis genas	<i>GAPDH</i> (Hs02786624_g1)	<i>Gapdh</i> (Rn01775763_g1)
SLC5A8	<i>SLC5A8</i> (Hs00377618_m1)	<i>Slc5a8</i> (Rn01503812_m1)
NKCC1	<i>SLC12A2</i> (Hs00169032_m1)	<i>Slc12a2</i> (Rn00582505_m1)
KCC2	<i>SLC12A5</i> (Hs00221168_m1)	<i>Slc12a5</i> (Rn00592624_m1)
E-kadherinas	<i>CDH1</i> (Hs01023894_m1)	–
N-kadherinas	<i>CDH2</i> (Hs00983056_m1)	–

„–“ *TaqMan* zondai nenaudoti.

**2.2. Glioblastomos ląstelių navikų tyrimo
in vivo ir in vitro medžiaga ir atlikti tyrimai**

U87 ir T98G ląstelių navikų invazijos dažnis į CAM, CAM storis, kraujagyslių skaičius po naviku ir naviko žymenų raiškos IHC analizė buvo atlikta grupėms, nurodytoms 2.2.1 lentelėje.

2.2.1 lentelė. Kontrolės ir gydytų navikų ant CAM grupės ir jų imtis

Tirtos grupės	Navikų ant CAM skaičius		PLBA		EZH2		p53	
	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G
Kontrolė	20	12	8	9	12	9	12	9
5 mmol MgDCA	14	15	8	9	7	10	7	8
2,5 mmol MgDCA	11	15	8	8	8	8	12	8
2 mmol VPA – 3 mmol MgDCA	15	15	15	8	13	9	14	9
100 μmol TMZ	15	11	7	5	8	5	8	5
50 μmol TMZ	15	16	8	6	8	7	7	7

24 valandas gydytų vaistiniais preparatais U87 ir T98G ląstelių tyrimų *in vitro* grupių imtis, taikyta dozė ir tirtų genų raiškos tyrimų grupių duomenys yra pateikti 2.2.2 lentelėje.

2.2.2 lentelė. Kontrolės ir gydytų ląstelių grupės *in vitro* ir jų imtis

Tirtos grupės	SLC5A8		SLC12A2		SLC12A5		CDH1		CDH2	
	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G
Kontrolė	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
1,5 mmol MgDCA	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,75 mmol MgDCA	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2 mmol VPA– 1,5 mmol MgDCA	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,75 mmol VPA– 1,5 mmol MgDCA	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
1,5 mmol VPA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
0,75 mmol VPA	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,5 mmol VPA	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
50 µmol TMZ	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

48 metų amžiaus pacientės GBM 22-SANTA-2F ląstelių naviko (G4 pagal PSO) invazijos dažnio į CAM, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus CAM po juo tirtų grupių duomenys yra pateikti 2.2.3 lentelėje.

2.2.3 lentelė. Kontrolės ir gydytų paciento navikų ant CAM grupės ir jų imtis

Tirtos grupės	Navikų ant CAM skaičius	PLBA	EZH2	p53
Kontrolė	16	8	8	8
2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	4	4	4

Po 48 valandų gydymo VPA–MgDCA *in vitro* buvo atlikti SLC5A8, SLC12A2, SLC12A5, CDH1 ir CDH2 raiškos tyrimai. Tirtos grupės: gydyta 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir kontrolė (n = 6 grupėje).

46 metų amžiaus paciento GBM naviko (G4 pagal PSO) 22-SANTA-4F ląstelės buvo gydytos 48 valandas VPA–MgDCA *in vitro*. Atlikti su proapoptoze susijusių genų raiškos tyrimai. Tirtos grupės: gydyta 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir kontrolė (n = 3 grupėje).

2.2.1. Ląstelių linijos ir jų paruošimas tyrimui

Ekperimentui buvo naudotos dvi komercinės glioblastomos U-87 MG (U87; ECACC 89081402) ir T98G (ATCC Nr. CRL-1690™) ląstelių linijos [319].

U87 ląstelių linija buvo gauta iš LSMU Neuromokslų instituto [299]. Adhezyvios U87 ląstelės auginamos *Dulbecco's modified eagles medium*

(DMEM) terpėje (*Gibco*, JK) su 10 proc. jaučio vaisiaus serumu (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) bei 1 proc. 100 IU/ml penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišiniu (*Lonza/biowhittaker*, JAV). Ląstelių atkabimui nuo auginimo indo dugno naudotas tripsino (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) ir fosfato buferinio tirpalo mišinys (2,5 proc. tripsino tirpalas praskiestas su fosfato buferiniu tirpalu, santykiu 1:9).

Komercinės T98G ląstelių linijos ląstelės buvo padovanotos prof. M. M. Alonso (Navaros universitetas, Pamplona, Ispanija) [304]. Adhezyvios ląstelės augintos *Advanced minimum essential medium* (AMEM) sumažinto serumo mitybinėje terpėje (*Gibco*, JK) su 5 proc. jaučio vaisiaus serumu (*Gibco*, JK), 2 proc. glutamino *glutamax* (100×) papildu (*Gibco*, JK) bei 1 proc. 100 IU/ml penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišiniu. Ląstelių atkabimui nuo auginimo indo dugno naudotas 0,25 proc. tripsino–EDTA (1×) tirpalas (*Gibco*, JK).

Ląstelės augintos inkubatoriuje (*Hera cell vios 160i*, *Thermo Scientific*, JAV), pastovioje 37 °C temperatūroje, 95 proc. O₂ ir 5 proc. CO₂ koncentracijų aplinkoje.

2.2.2. Pirminių glioblastomos naviko ląstelių suspensijos paruošimas

Pirminės GBM ląstelės buvo išgaunamos pagal LSMU Histologijos ir embriologijos katedros parengtus „Žmogaus GBM naviko ląstelių suspensijos paruošimo“ protokolus (Nr. 2021-03-01 (GB1) ir Nr. 2021-10-05 (GB3)). Tyrimams atlikti buvo gautas Regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr. BE-2-80, 2020-08-31). Paciento naviko audinys po operacijos buvo gautas iš Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Neurochirurgijos centro. Paimtas GBM navikas 15 minučių po operacijos įdėtas į mėgintuvėlį su DMEM be Ca²⁺ (*Thermo Scientific*, JAV) bei 1 proc. 100 IU/ml penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišiniu. Tuomet GBM audinio gabalėlis steriliais pincetais buvo suardytas į smulkias daleles sterilioje *Petri* lėkštelėje (*Greiner bio-one*, Vengrija) su DMEM be Ca²⁺ bei 1 proc. 100 IU/ml penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišiniu. Ląstelių suspensija gauta susmulkinus GBM audinį su terpe pipetuojuant apie 5 minutes. Nuo GBM audinio gavimo laiko, suspensijos paruošimo trukmė buvo 20 minučių. Suspensija buvo centrifuguota 800 rpm 3 min. Po to, nusiurbus supernatantą, ląstelės užpiltos 37 °C temperatūros DMEM be Ca²⁺, turinčio 10 proc. jaučio vaisiaus serumo bei 1 proc. 100 IU/ml penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišinio. Gautoms GBM ląstelėms suteikti 22-SANTA-2F ar 22-SANTA-4F kodai. Ląstelės naudotos naviko ant CAM ir *in vitro* tyrimams. Laikotarpio

trukmė nuo naviko audinio gavimo, ląstelių suspensijos parengimo ir jų uždėjimo ant CAM buvo apie 1,5 valandos.

2.2.3. CAM modelio taikymas U87, T98G ar 22-SANTA-2F ląstelių navikų tyrimui

CAM modelio tyrimams pagal Lietuvos ir Europos teisės aktus, Bioetikos komiteto leidimas nereikalaujamas. Eksperimente naudoti apvaisinti Cobb500 veislės vištos kiaušiniai, gauti iš Rumšiškių paukštyno (Lietuva). Atsivežti kiaušiniai buvo dezinfekuoti 70 proc. etilo alkoholiu ir sudėti į inkubatorių (*MiniPro 147/200 DU, Maino Incubatrici S.R.L.*, Italija), kur vertikaloje pozicijoje vartyti automatinio būdu vieną kartą per valandą. Inkubatoriuje palaikyta pastovi 37,7 °C temperatūra ir 60 proc. santykinė oro drėgmė. 3-iają embriono vystymosi parą (EVP) automatinis vartymas išjungtas ir kiaušinių lukšte buvo padaryti langeliai. Prieš atidarant langelį, kiaušinio paviršius dezinfekuotas 70 proc. etilo alkoholiu ir bukajame kiaušinio lukšto gale automatinio grąžtu (*HobbyDrill*, Vokietija) pragręžta ertmė. Tuomet steriliu švirškštu (*Neoject, Neomedic*, JK) nusiurbta apie 2 ml baltymo, kad CAM atkibtų nuo kiaušinyje esančios plėvės. Ertmė užklijuota pleistru (*Mefix, Molnlycke*, Švedija), kad išvengti baltymo ištekėjimo. Tada kiaušinio lukšte pragręžtas apie 1 cm² dydžio langelis. Atvėrus langelį buvo vertinamas embriono gyvybingumas, t. y. ar matoma plakanti embriono širdis. Nustačius gyvybingą embrioną langelis užklijuotas sterilia plėvele (*Parafilm, Bemis*, JAV) tinkamai drėgmei bei sterilumui palaikyti. Kiaušiniai toliau inkubuoti vertikaloje padėtyje, jų nevertant iki EVP12.

2.2.4. Ląstelių linijų U87, T98G ar 22-SANTA-2F ląstelių navikų formavimas, jų užsodinimas ant CAM, *in vivo* biomikroskopija ir CAM su naviku paėmimas

EVP7 suformuotas U87, T98G ar 22-SANTA-2F navikas buvo užsodinamas ant CAM. U87, T98G (1 mln.) ar 22-SANTA-2F (0,2 mln.) ląstelių suspensija buvo sumaišoma su žiurkės uodegos I tipo kolagenu (*Gibco*, JAV) ir atitinkamomis vaistinių preparatų koncentracijomis, kurios ištirpintos mitybinėje terpėje (bendras suformuoto naviko tūris vienam atvejui 20 μl). 20 μl suspensija buvo užlašinama ant 9 mm³ (3 × 3 × 1 mm) absorbuojančios hemostatinės želatininės kempinėšės (*SURGISPON, Aegis Lifesciences*, Indija). Suformuotas navikas buvo uždedamas ant CAM šalia stambiausios kraujagyslės, po to langelis buvo uždengiamas plėvele. EVP9–12 navikai buvo stebimi ir 3,2× bei 5× padidinimais fotografuojami stereomikroskopu su skaitmenine fotokamera (*OLYMPUS 31SZX16, Olympus Life Science Europa GMBH*, Vokietija) naudojant *CellSens Dimension* kompiuterinės

programos 1.9 versiją. EVP12 insulininiu švirškštu (*ONICAM 100, BRAUN, Vokietija*) buvo sušvirškstas 20 μ l fluoresceino izotiocianato dekstrano tirpalas (*PKH67, Sigma, Vokietija*) į CAM kraujagyslę. Palaukus apie 1 minutę, kol fluoresceino izotiocianato dekstranas tolygiai pasiskirstys CAM kraujagyslėse, ant CAM užpilta 2 ml 10 proc. formalino buferinio tirpalo. Tada CAM su naviku buvo iškirpta ir patalpinta į *Petri* lėkštelę su formalino buferiniu tirpalu. CAM vaizdas buvo fiksuojamas iš abiejų pusių 3,2 \times ir 5 \times padidinimais stereomikroskopo skaitmenine fotokamera, ją fotografuojant dienos šviesoje ar panaudojant žaliai fluorescuojantį proteino filtrą su ultravioletine spinduliuote generuojančiu filtru. Iškirptos CAM buvo paliekamos fiksuotis formalino buferiniame tirpale 24 valandas, vėliau įlietos į parafino blokelius ir naudotos histologiniams bei IHC tyrimams [320].

2.2.5. Ląstelių linijų U87, T98G ar pirminių glioblastomos naviko ląstelių vaistinio preparato poveikio *in vitro* tyrimas

U87 ir T98G ląstelės 24 valandas buvo veikiamos vaistiniu preparatu *in vitro*, jas kultivuojant įprastomis sąlygomis inkubatoriuje (metodika nurodyta 2.2.1 skyriuje) su atitinkamu vaistiniu preparatu ir jo koncentracija mišinyje terpeje.

Pirminių GBM naviko ląstelių santykinė genų ir su proapoptoze susijusių genų raiškos buvo vertintos po 48 valandų gydymo *in vitro*, ląsteles kultivuojant pastovioje 37 °C temperatūroje, 95 proc. O₂ ir 5 proc. CO₂ koncentracijų aplinkoje inkubatoriuje.

RNR buvo gryninama iš navikinių ląstelių suspensijos. RNR gryninimui iš pirminių GBM naviko ląstelių naudotas *miRNeasy Micro* gryninimo rinkinys (*Qiagen, Vokietija*). Genetinės medžiagos gryninimo iš ląstelių linijų, koncentracijos matavimo, kokybės nustatymo, atvirkštinės transkripcijos bei santykinės *SLC5A8, SLC12A2, SLC12A5, CDH1* ir *CDH2* raiškos vertinimo metodikų aprašymas pateiktas 2.1.7 skyriuje. RNR grynimo metu mėginiai buvo veikti *PureLink* DNazių rinkiniu (*Invitrogen, JAV*). Tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos nustatymai buvo: 95 °C 10 min., 45 ciklai 95 °C 15 s ir 60 °C 1 min. [319].

2.2.6. Ląstelių linijų U87, T98G ar pirminių glioblastomos ląstelių navikų invazijos į CAM, CAM storio kraujagyslių skaičiaus ir vėžio žymenų imunohistocheminis vertinimas

H-E dažytuose CAM preparatuose buvo vertinamas invazijos dažnis pagal šiuos pokyčius: navikinės ląstelės suardė choriono epitelio pamatinę membraną ir/arba buvo matomos CAM mezenchimoje; matoma naviko invazija CAM mezenchimoje; navike virš choriono epitelio nustatytos viščiuko

kraujagyslės su eritrocitais. Navikas be invazijos į CAM mezenchimą lokalizavosi ant CAM paviršiaus ir nepažeidė choriono epitelio. Invazija buvo vertinama 4×, 10× ir 40× padidinimais.

CAM storis ir kraujagyslių skaičius po naviku buvo vertinamas H-E dažytuose preparatuose 4× padidiniu. Regėjimo lauke fiksuota vieta, kurioje matyti CAM su ant jos esančiu naviku. CAM storis (μm) matuotas 10 atsitiktinių CAM vietų, iš kurių apskaičiuotas vidurkis. Kraujagyslių skaičiaus vertinimui buvo pasirinktos didesnės nei 10 μm diametro kraujagyslės, esančios CAM po naviku.

IHC metodu navikų ląstelių branduoliai išryškinti PLBA (monokloninis antikūnas, klonas PC10, *Thermo Fisher Scientific*, JAV), KMT6/EZH2 (polikloninis antikūnas, phospho S21, ab84989; *Abcam*, JK) ir p53 (monokloninis antikūnas, aa 211-220, klonas 240, CBL404; *Merck*, Vokietija) žymenimis [320]. Navikuose buvo vertinama PLBA, EZH2 ir p53 vėžio žymenų raiška. Pirmiausia vertinta ar antikūnas sureagavo į CAM choriono epitelį ir jį nudažė (ruda spalva). Tuomet, kiekviename navike pasirinkti du atsitiktiniai regėjimo laukai ir fotografuoti 40× padidiniu. Regėjimo laukuose buvo skaičiuojamos visos matomos ir žymeniui-teigiamos ląstelės (ląstelių branduolys dažėsi rudai). Vėliau buvo skaičiuotas teigiamą raišką turinčių ląstelių ir visų ląstelių santykis regėjimo laukuose, t. y. teigiamų ląstelių procentinė dalis (proc.) navike.

2.2.7. Pirminių glioblastomos ląstelių RNR mėginių ruošimas sekoskaitai

RNR sekoskaitai pasirinktas *Illumina* naujos kartos sekvenavimo metodas paremtas sinteze. Sekoskaitai pasirinkti RNR mėginiai, kurių RNR integralumo numeris (RIN) ≥ 8 [321]. RNR mėginių bibliotekos paruoštos pagal gamintojo rekomendacijas naudojant *QIAseq* taikininės RNR rinkinį skirtą nustatyti apoptozės ir ląstelės žūties žymenis (*QIAGEN*, USA) bei sekvenatorių (*NextSeq 550 v2.5*, *Illumina*, USA). Iš viso buvo sekvenuoti 264 genai. Sekoskaitos parametrai: 150 ciklų, vieno galo nuskaitymas, 151 bp ilgio fragmentai, 8 bp abiejų galų indeksai.

2.2.8. Sekoskaitos duomenų analizė

Duomenų kokybę įvertinta naudojant *MultiQC v1.13* [322]. Adapterių 3' nukleotidų sekos bei sekos, kurių ilgis mažesnis nei 15 nukleotidų, o kokybės balas mažesnis nei 25, pašalintos naudojant *Cutadapt v1.9.1* [323]. Žmogaus genomą (GRCh38.p13) parsisiųstas iš *Ensembl* duomenų bazės [324]. Likusios sekos prilygiuotos prie žmogaus genomo *STAR 2.1.3* įrankiu [325]. Genų raiškos matrica gauta naudojant *FeatureCounts v3.15* [326]. Sekų

raiška normalizuota viršutinio kvartilio metodu, pašalinti genai, kurių suminė raiška tarp mėginių mažesnė nei 50. Diferencialinė genų raiškos analizė atlikta su *DESeq2* v3.15 [327], p reikšmės koreguotos naudojant *Benjamin-Hochberg* metodą. Raiškos biologinių kelių praturtinimo analizė atlikta naudojantis *DAVID* serverį [328, 329].

2.3. Statistinė analizė

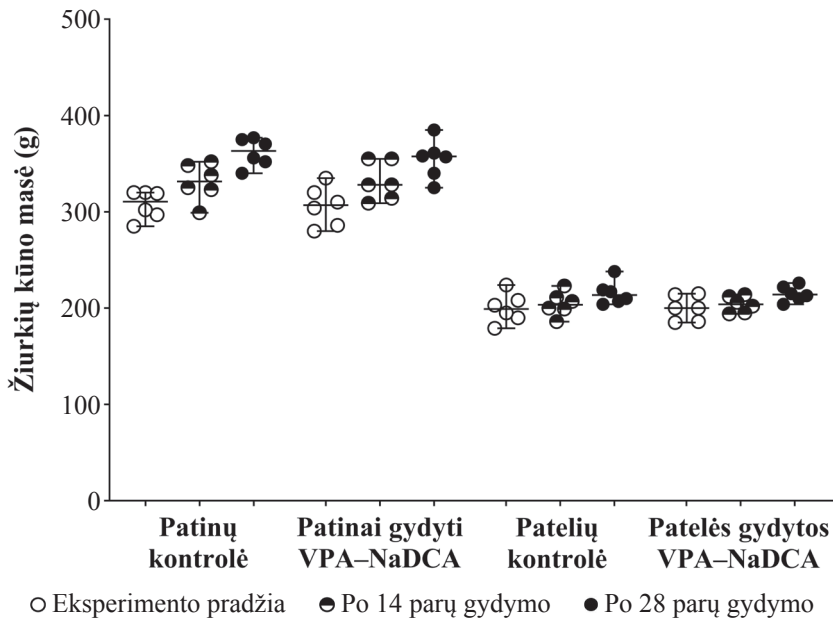
Statistinė duomenų analizė ir grafinis duomenų vaizdavimas atlikti naudojant statistinius programinius paketus: *IBM SPSS* programos 23.0 versiją arba *GraphPad Prism* programos 7 versiją. Šapiro-Vilko (angl. *Shapiro-Wilk*) testas buvo taikytas normalumo hipotezei patikrinti. Kiekybiniai duomenys pateikti mediana ir ribomis arba vidurkiu ir standartiniu nuokrypiu, o kokybiniai – procentine dalimi grupėje (proc.). Kiekybinei duomenų analizei atlikti taikytas Mano–Vitnio U (angl. *Mann-Whitney U*) kriterijus dviem grupėms palyginti. Kokybinių duomenų ryšio stiprumui įvertinti buvo taikytas *Chi* kvadrato (χ^2) kriterijus. Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, jeigu $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. VPA–NaDCA vienos paros gydymo ir ilgalaikio gydymo poveikio intaktinėms žiurkėms tyrimo rezultatai

3.1.1. Tirtų žiurkių grupių kūno masės, blužnies, inksto ir čiobrialiaukės masės vertinimas

Abiejų lyčių žiurkių kontrolės ir gydytų 150 mg/kg/parai VPA ir 100 mg/kg/parai NaDCA derinio doze kūno masės pokyčiai tyrimo metu yra pateikti 3.1.1.1 paveiksle.



3.1.1.1 pav. Tirtų žiurkių grupių kūno masė eksperimento pradžioje, po 14 parų ir po 28 parų gydymo

Ilgas horizontalus brūkšnis – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Tyrimo pradžioje 5–6 savaičių amžiaus žiurkių patinų kontrolės grupės kūno masės vidurkis buvo $307,20 \pm 14,77$ g, grupės prieš gydymą 150 mg/kg/parai VPA ir 100 mg/kg/parai NaDCA derinio doze – $305,80 \pm 20,65$ g; patelių kontrolės grupės – $199,80 \pm 15,59$ g ir grupės prieš gydymą VPA–NaDCA– $200,00 \pm 12,98$ g. Statistiškai reikšmingo gydymo VPA–NaDCA poveikio gyvūnų kūno masės augimui nenustatyta.

Palyginus su patinų kontrole, viso tyrimo metu patelių kontrolės grupės kūno masė buvo reikšmingai mažesnė ($p = 0,002$).

Tirtų žiurkių čiobrialiaukės, blužnies ir inksto masės duomenys yra pateikti 3.1.1.1 lentelėje.

3.1.1.1 lentelė. Tirtų žiurkių grupių blužnies, inksto ir čiobrialiaukės masės duomenys po 28 parų gydymo

Tirtos grupės	n	Tirtų organų masė, g (mediana (ribos))		
		blužnis	inkstas	čiobrialiaukė
Patiniai				
Kontrolė	6	0,59 (0,51–0,64)	1,12 (1,08–1,28)	0,49 (0,44–0,66)
Gydyti VPA–NaDCA	6	0,65 (0,59–0,70)	1,38 (1,31–1,64) ^a	0,42 (0,31–0,46)
Patelės				
Kontrolė	6	0,40 (0,34–0,45) ^b	0,71 (0,64–0,78) ^c	0,36 (0,34–0,43) ^d
Gydytos VPA–NaDCA	6	0,45 (0,38–0,50)	0,87 (0,83–1,00) ^c	0,35 (0,30–0,41)

^a $p = 0,002$, palyginus su patinų kontrole; ^b $p = 0,002$, palyginus su patinų kontrole; ^c $p = 0,002$, palyginus su patinų kontrole; ^d $p = 0,002$, palyginus su patinų kontrole; ^e $p = 0,002$, palyginus su patelių kontrole.

Patinų kontrolės grupės blužnies masė buvo statistiškai reikšmingai 1,5 karto didesnė nei patelių kontrolės grupės. Palyginus su atitinkama kontrole, 28 parų gydymas VPA–NaDCA poveikio patinų ir patelių blužnies masei neturėjo.

Patinų kontrolės grupės inksto masė buvo reikšmingai 1,6 karto didesnė nei patelių kontrolės. Palyginus su atitinkama kontrole, 28 parų gydymas VPA–NaDCA reikšmingai padidino patinų ir patelių inksto masę.

Žiurkių patelių kontrolės grupės čiobrialiaukės masė buvo reikšmingai mažesnė nei patinų kontrolės. Palyginus su kontrole, 28 parų gydymas VPA–NaDCA neturėjo poveikio patelių ir patinų čiobrialiaukės masei.

3.1.2. Tirtų žiurkių grupių paros šlapimo vertinimas

Tirtų žiurkių grupių pirmos paros (po 24 valandų gydymo) ir po 28 parų gydymo paros diurezės ir atliktų paros šlapimo tyrimų duomenys yra pateikti 3.1.2.1 lentelėje.

3.1.2.1 lentelė. Tirtų žiurkių paros diurezė, paros šlapimo pH ir kreatinino koncentracijos duomenys po vienos paros gydymo ir gydymo po 28 parų

Tirtos grupės	n	Po vienos paros gydymo			Po 28 parų gydymo		
		paros diurezė, ml/100 g kūno masės	pH	kreatininas, mmol/l	paros diurezė, ml/100 g kūno masės	pH	kreatininas, mmol/l
		mediana (ribos)					
Patiniai							
Kontrolė	6	3,91 (2,61–7,43)	6,5 (6,0–6,5) ^a	9,17 (4,47–11,72)	2,83 (0,95–4,30)	6,5 (6,5–6,5)	10,35 (5,80–23,51)
Gydyti VPA–NaDCA	6	3,86 (2,15–5,46)	6,5 (6,5–6,5)	8,89 (6,79–13,47)	3,95 (3,20–5,74) ^b	6,5 (6,5–7,0)	9,42 (7,56–11,52)
Patelės							
Kontrolė	6	3,96 (1,60–7,27)	7,0 (7,0–8,0)	10,69 (4,70–15,78)	2,42 (1,52–4,00)	6,5 (6,0–6,5)	12,29 (8,06–23,40)
Gydytos VPA–NaDCA	6	3,73 (2,46–5,95)	6,5 (6,0–7,5)	9,13 (5,66–10,88) ^c	3,61 (2,26–5,80)	6,5 (6,0–6,5)	10,66 (7,15–13,08)

^a $p = 0,002$, palyginus su patelių kontrole; ^b $p = 0,04$, palyginus su patinų kontrole; ^c $p = 0,04$, palyginus su patelių kontrole.

Palyginus su atitinkama kontrole, nenustatyta reikšmingo pirmų 24 valandų gydymo deriniu poveikio paros diurezei patinų ir patelių grupėse, o po 28 parų VPA–NaDCA dozavimo paros diurezė buvo reikšmingai padidėjusi tik gydytų patinų grupėje. Patelėms 28 parų gydymo poveikis paros diurezei nenustatytas.

Vienos ir 28 parų gydymas VPA–NaDCA neturėjo poveikio žiurkių paros šlapimo pH. Po vienos paros tyrimo, patelių kontrolės šlapimo pH buvo reikšmingai didesnis už patinų kontrolės, bet po 28 parų gydymo skirtumų nenustatyta.

Po vienos ir 28 parų tyrimo palyginus patinų ir patelių kontrolės grupių kreatinino kiekį šlapime, skirtumų nenustatyta. Vienos paros gydymas VPA–NaDCA reikšmingai sumažino tik patelių kreatinino kiekį paros šlapime, o po 28 parų gydymo, palyginus tirtas žiurkių grupes, poveikio nenustatyta.

Kontrolės ir 24 valandas gydytų tiriamu preparatu žiurkių paros šlapimo jonų kiekio, apskaičiuoto 100 g žiurkių kūno masės, duomenys yra pateikti 3.1.2.2 lentelėje.

3.1.2.2 lentelė. Tirtų žiurkių grupių paros šlapimo jonų kiekio duomenys po vienos paros gydymo

Tirtos grupės	n	Jonų kiekis, mmol/100 g kūno masės (mediana (ribos))				
		K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Patinai						
Kontrolė	6	0,46 (0,35–0,79) ^a	0,31 (0,16–0,59)	0,24 (0,16–0,46)	0,01 (0,004–0,03)	0,09 (0,06–0,17)
Gydyti VPA–NaDCA	6	0,49 (0,43–0,61)	0,36 (0,15–0,65)	0,23 (0,09–0,40)	0,01 (0,004–0,02)	0,09 (0,08–0,12)
Patelės						
Kontrolė	6	0,30 (0,22–0,44)	0,36 (0,15–0,65)	0,22 (0,09–0,40)	0,01 (0,004–0,02)	0,04 (0,01–0,08)
Gydytos VPA–NaDCA	6	0,33 (0,23–0,55)	0,34 (0,23–0,53)	0,21 (0,14–0,33)	0,01 (0,004–0,03)	0,06 (0,01–0,07)

^a $p = 0,01$, palyginus su patelių kontrole.

Palyginus patelių ir patinų kontroles, nustatytas reikšmingas K⁺ kiekio skirtumas: jono kiekis patelių paros šlapime buvo reikšmingai mažesnis nei patinų. Palyginus vieną parą deriniu gydytų patinų ir patelių žiurkių grupes su atitinkama kontrole, statistiškai reikšmingų K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ ir Mg²⁺ kiekio pokyčių paros šlapime nenustatyta.

Kontrolės ir 28 paras gydytų žiurkių paros jonų išsiskyrimo su šlapimu 100 g kūno masės duomenys yra pateikti 3.1.2.3 lentelėje.

3.1.2.3 lentelė. Tirtų žiurkių grupių paros šlapimo jonų išsiskyrimo duomenys po 28 parų gydymo

Tirtos grupės	n	Jonų kiekis, mmol/100 g kūno masės (mediana (ribos))				
		K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Patinai						
Kontrolė	6	0,37 (0,32–0,47)	0,28 (0,10–0,39)	0,18 (0,06–0,25)	0,01 (0,003–0,02)	0,07 (0,03–0,07)
Gydyti VPA–NaDCA	6	0,47 (0,39–0,64) ^a	0,38 (0,30–0,53) ^b	0,24 (0,20–0,34) ^c	0,01 (0,004–0,02)	0,07 (0,02–0,12)
Patelės						
Kontrolė	6	0,28 (0,19–0,52)	0,23 (0,15–0,38)	0,14 (0,10–0,24)	0,01 (0,008–0,03)	0,06 (0,04–0,10)
Gydytos VPA–NaDCA	6	0,37 (0,26–0,44)	0,35 (0,21–0,53)	0,23 (0,14–0,35)	0,02 (0,02–0,04)	0,09 (0,08–0,12) ^d

^a $p = 0,04$, palyginus su patinų kontrole; ^b $p = 0,04$, palyginus su patinų kontrole; ^c $p = 0,03$, palyginus su patinų kontrole; ^d $p = 0,03$, palyginus su patelių kontrole.

28 parų gydymas deriniu reikšmingai padidino K^+ , Na^+ ir Cl^- išsiskyrimą tik žiurkių patinų paros šlapime. Palyginus su kontrole, gydytų patelių paros šlapimo Mg^{2+} išsiskyrimas buvo reikšmingai padidėjęs, bet tokio poveikio nenustatyta patinėliams.

3.1.3. Tirtų žiurkių grupių kraujo serumo vertinimas

Kraujo serumo šlapalo koncentracija patinų kontrolės grupės buvo 4,95 (3,60–5,60) mmol/l, gydytų VPA–NaDCA – 5,75 (4,80–8,90) mmol/l; patelių kontrolės – 5,15 (4,80–5,80) mmol/l ir gydytų VPA–NaDCA – 7,00 (4,10–7,90) mmol/l. Palyginus tirtas grupes, reikšmingų kraujo šlapalo koncentracijos skirtumų nenustatyta.

Kraujo serumo kreatinino koncentracija patinų kontrolės grupės buvo 58,00 (46,00–72,00) μ mol/l, gydytų VPA–NaDCA – 58,50 (47,00–78,00) μ mol/l; patelių kontrolės – 62,50 (49,00–72,00) μ mol/l, gydytų VPA–NaDCA patelių – 59,50 (45,00–80,00) μ mol/l. Palyginus tirtas grupes, reikšmingų kraujo kreatinino koncentracijos skirtumų nenustatyta.

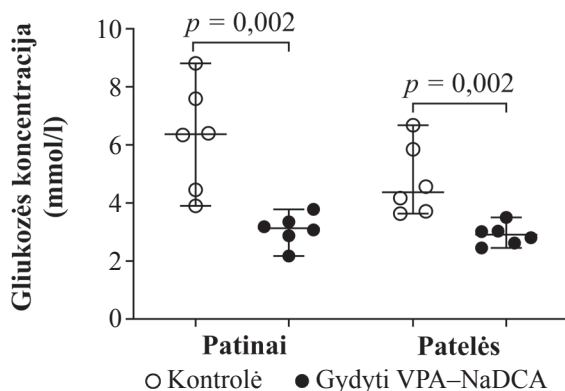
Kontrolės ir gydytų 28 paras žiurkių kraujo serumo jonų koncentracijos tyrimo duomenys yra pateikti 3.1.3.1 lentelėje.

3.1.3.1 lentelė. Žiurkių grupių kraujo serumo tirtų jonų kiekio duomenys po 28 parų gydymo

Tirtos grupės	n	Jonų kiekis, mmol/l (mediana (ribos))				
		K^+	Na^+	Cl^-	Ca^{2+}	Mg^{2+}
Patinai						
Kontrolė	6	5,45 (4,90–8,40)	139,00 (136,00–142,00)	97,00 (93,00–103,00)	2,47 (2,23–2,59)	1,14 (1,08–1,35)
Gydyti VPA–NaDCA	6	6,20 (5,50–12,20)	139,50 (135,00–142,00)	100,50 (93,00–106,00)	2,36 (2,17–2,50)	1,08 (0,98–1,50)
Patelės						
Kontrolė	6	5,65 (5,30–7,60)	139,00 (138,00–148,00)	102,50 (97,00–106,00)	2,35 (2,28–2,56)	1,09 (0,98–1,39)
Gydytos VPA–NaDCA	6	6,20 (5,40–10,50)	139,00 (134,00–142,00)	98,50 (95,00–106,00)	2,46 (2,26–2,64)	1,11 (0,85–1,34)

Palyginus tirtas žiurkių grupes, reikšmingų K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} ir Mg^{2+} koncentracijos kraujo serume skirtumų nenustatyta.

Kontrolės ir 28 paras gydytų žiurkių grupių gliukozės koncentracijos kraujo serume duomenys yra pateikti 3.1.3.1 paveiksle.

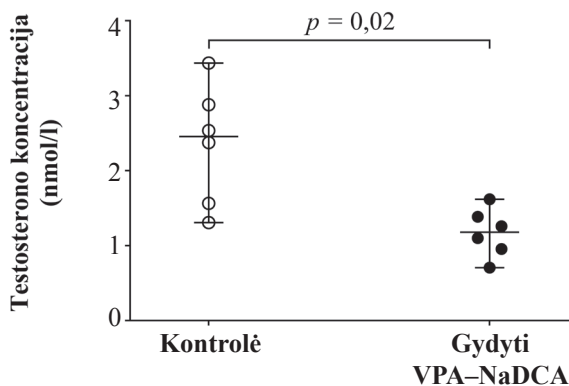


3.1.3.1 pav. Tirtų žiurkių grupių gliukozės koncentracija kraujo serume po 28 parų gydymo

Ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus su atitinkama kontrole, nustatyta, kad 28 parų gydymas VPA–NaDCA reikšmingai sumažino gliukozės koncentraciją patinų ir patelių kraujo serume. Kontrolės grupės patinų ir patelių gliukozės koncentracija serume nesiskyrė.

Kontrolės ir 28 paras gydytų patinų grupių testosterono koncentracijos serume duomenys yra pateikti 3.1.3.2 paveiksle.



3.1.3.2 pav. Tirtų patinų grupių testosterono koncentracija kraujo serume po 28 parų gydymo

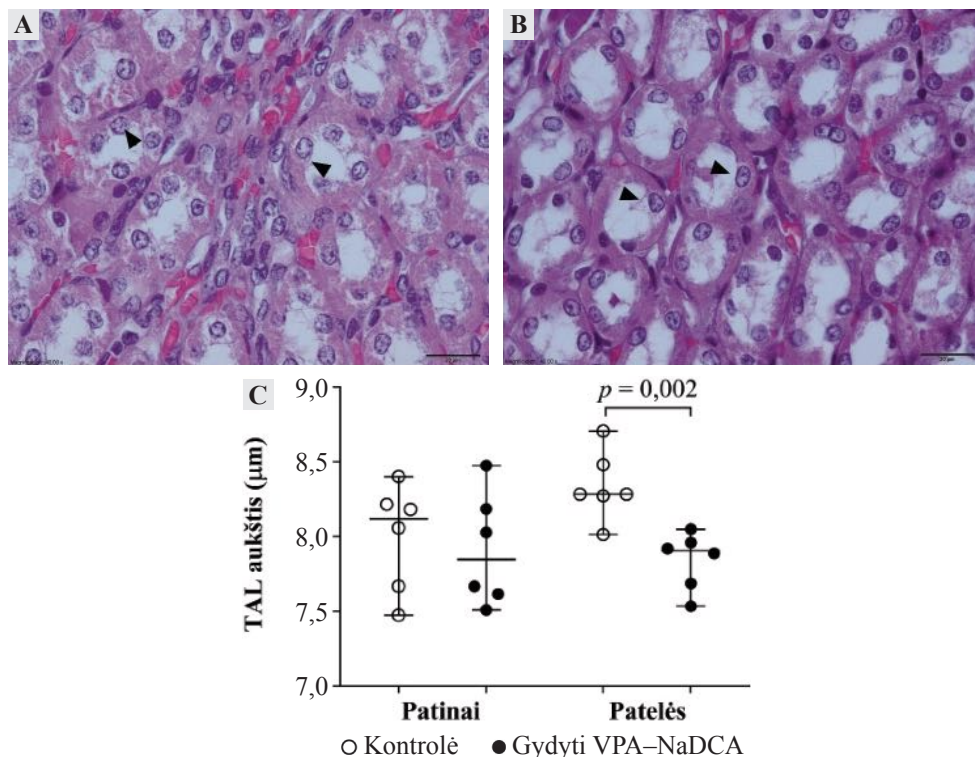
Ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus su negydytų patinų duomenimis, gydymas tiriamu preparatu reikšmingai, du kartus, sumažino testosterono koncentraciją patinų kraujo serume.

3.1.4. Tirtų žiurkių histologinio tyrimo rezultatai

3.1.4.1. Tirtų žiurkių grupių inkstų TAL aukščio vertinimas

Kontrolės ir 28 paras gydytų žiurkių grupių TAL aukščio duomenys yra pateikti 3.1.4.1.1 paveiksle.



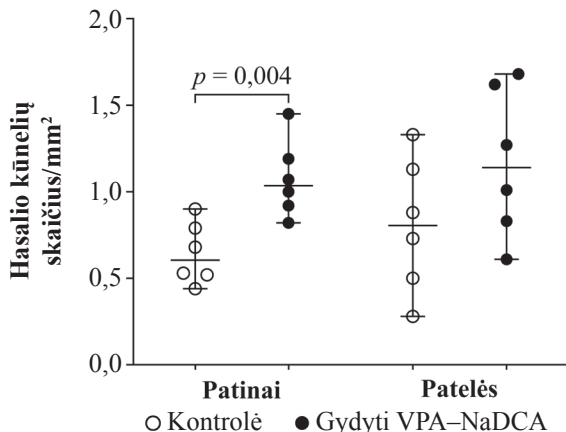
3.1.4.1.1 pav. Tirtų žiurkių grupių inkstų TAL aukštis po 28 parų gydymo

A – patelių kontrolės ir **B** – patelių, gydytų VPA–NaDCA, inksto šerdinės dalies TAL epitelinių ląstelių histologinis vaizdas. Rodyklė rodo TAL kanalėlį išklojančios ląstelės branduolį. Skalė – 20 µm.; **C** – tirtų žiurkių grupių TAL epitelinių ląstelių aukštis (µm). Ilgas horizontalus brūkšnyš – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus su atitinkama kontrole, ilgalaikis žiurkių gydymas VPA–NaDCA reikšmingai sumažino TAL aukštį patelių inkstuose, bet toks poveikis nenustatytas patinėliams.

3.1.4.2. Tirtų žiurkių čiobrialiaukės Hasalio kūnelių skaičiaus vertinimas

Tirtų žiurkių čiobrialiaukės šerdinės dalies HK skaičiaus duomenys po 28 dienų gydymo yra pateikti 3.1.4.2.1 paveiksle.

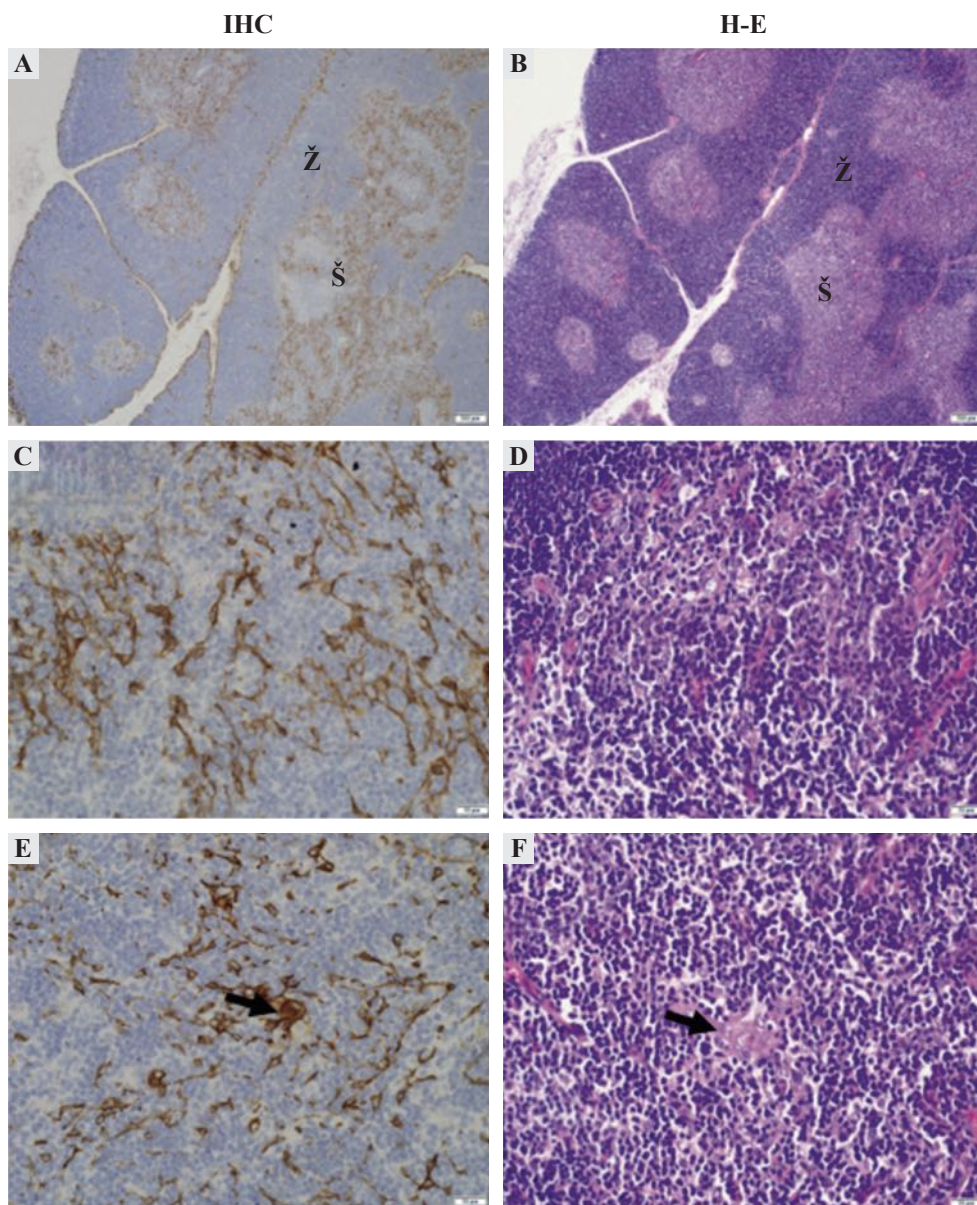


3.1.4.2.1 pav. Tirtų žiurkių čiobrialiaukės šerdinės dalies HK skaičius po 28 dienų gydymo

Ilgas horizontalus brūkšnis – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus abiejų lyčių žiurkių kontrolės, reikšmingų HK skaičiaus skirtumų nenustatyta. HK skaičius šerdinėje dalyje buvo reikšmingai didesnis gydytų patinų grupės nei patinų kontrolės grupės. 28 parų gydymas VPA–NaDCA poveikio patelių HK skaičiui neturėjo.

Žiurkių patinų čiobrialiaukės ir Hasalio kūnelių vaizdai šerdinėje dalyje yra pateikti 3.1.4.2.2 paveiksle.



3.1.4.2.2 pav. Gydytų patinų čiobrialiaukės ir HK imunohistocheminis ir histologinis vaizdas

A ir B – čiobrialiaukės žievinė (Ž) ir šerdinė (Š) dalys. Skalė – 200 μ m; C ir D – šerdinė dalis (HK nematyti). Skalė – 200 μ m; E ir F – HK (pažymėta rodykle) šerdinėje dalyje. Skalė – 20 μ m; A, C, E – dažyta IHC, žymėta citokeratino monokloniniu antikūnu (klonas 34 β E12); B, D, F – dažyta H-E.

3.1.5. Tirtų žiurkių grupių timocitų ląstelės ciklo vertinimas

Tirtų žiurkių grupių timocitų pasiskirstymo pagal ląstelės ciklo fazes tyrimo duomenys po 28 parų gydymo yra pateikti 3.1.5.1 lentelėje.

3.1.5.1 lentelė. Tirtų žiurkių grupių timocitų kiekio duomenys pagal ląstelės ciklo fazę po 28 parų gydymo

Tirtos grupės	n	Ląstelės ciklo fazė, proc. (mediana (ribos))			
		S	G ₂ -M	G ₁ -G ₀	pre-G
Patinai					
Kontrolė	6	5,23 (3,82–6,30)	6,01 (4,02–11,17)	85,56 (82,63–89,87)	2,28 (1,13–2,62)
Gydyti VPA–NaDCA	6	6,08 (2,76–7,24)	6,27 (2,48–11,95)	84,52 (77,98–89,79)	2,56 (0,49–6,45)
Patelės					
Kontrolė	6	6,24 (4,93–6,62)	10,59 (3,31–12,99)	83,06 (79,45–89,59)	1,42 (0,48–1,78)
Gydytos VPA–NaDCA	6	6,21 (4,67–7,48)	11,33 (5,91–15,87)	79,92 (76,24–85,99)	1,38 (0,62–5,63)

Tirtų žiurkių grupių timocitų pasiskirstymo pagal ląstelės ciklo fazę skirtumų po 28 parų gydymo nenustatyta.

3.2. Ilgalaikio VPA gydymo poveikio tirtų žiurkių grupių timocitų santykinei *Slc5a8*, *Slc12a2* ir *Slc12a5* raiškai vertinimas

Kontrolės ir 28 paras gydytų 300 mg/kg/parai VPA žiurkių grupių *Slc5a8* ir *Gapdh* raiškos duomenys yra pateikti 3.2.1 lentelėje ir 3.2.1 paveiksle.

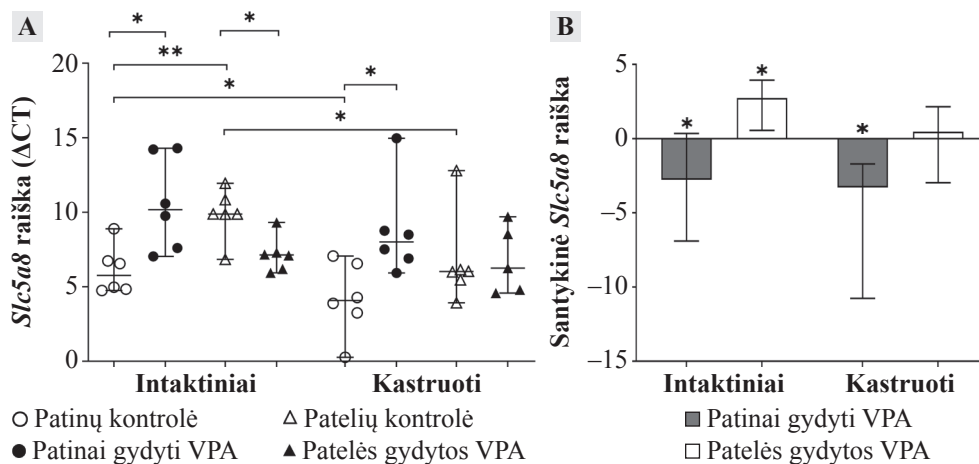
3.2.1 lentelė. Kontrolės ir gydytų VPA žiurkių grupių timocitų *Slc5a8* ir *Gapdh* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		<i>Slc5a8</i>	<i>Gapdh</i>			
Intaktiniai patinai						
Kontrolė	6	29,45 ± 1,69	22,91 ± 0,64	6,55 ± 1,62 ^a	0,00 ± 1,62	1,09 ± 0,59
Gydyti VPA	6	33,56 ± 2,65	22,98 ± 0,62	10,58 ± 3,50 ^b	4,03 ± 3,50	0,06 ± 0,36

3.2.1 lentelės tęsinys

Tirtos grupės	Rodiklis, vidurkis ± SN					
	n	CT		ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		<i>Slc5a8</i>	<i>Gapdh</i>			
Intaktinės patelės						
Kontrolė	6	33,41 ± 0,61	23,53 ± 0,38	9,88 ± 1,55	0,00 ± 1,55	1,09 ± 1,79
Gydytos VPA	6	30,25 ± 1,15	23,08 ± 0,41	7,17 ± 1,09 ^e	-2,71 ± 1,09	6,54 ± 4,62
Kastruoti patinai						
Kontrolė	6	29,65 ± 0,87	25,44 ± 2,02	4,21 ± 2,46 ^d	0,00 ± 2,46	1,24 ± 0,72
Gydyti VPA	6	31,08 ± 2,82	22,32 ± 0,49	8,76 ± 3,59 ^e	4,55 ± 3,59	0,04 ± 0,34
Kastruotos patelės						
Kontrolė	6	29,40 ± 2,85	22,68 ± 2,17	6,73 ± 3,09 ^f	0,00 ± 3,09	1,06 ± 2,39
Gydytos VPA	5	31,60 ± 2,32	24,83 ± 1,06	6,77 ± 2,27	0,05 ± 2,27	0,97 ± 1,78

^a $p = 0,004$, palyginus su intaktinių patelių kontrole; ^b $p = 0,02$, palyginus su intaktinių patinų kontrole; ^c $p = 0,03$, palyginus su intaktinių patelių kontrole; ^d $p = 0,03$, palyginus su intaktinių patinų kontrole; ^e $p = 0,03$, palyginus su kastruotų patinų kontrole; ^f $p = 0,04$, palyginus su intaktinių patelių kontrole.



3.2.1 pav. Tirtų žiurkių grupių timocitų *Slc5a8* raiška

A – *Slc5a8* raiška. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; **B** – gydytų intaktinių ir kastruotų žiurkių grupių santykinė *Slc5a8* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$). * $p < 0,05$, palyginus su atitinkama kontrole; ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Intaktinių patinų kontrolės grupės *Slc5a8* raiška timocituose buvo reikšmingai didesnė nei intaktinių patelių kontrolės. Intaktinių patinų ir patelių kontrolės grupių ΔCT reikšmės buvo statistškai reikšmingai didesnės nei atitinkamų kastruotų abiejų lyčių žiurkių kontrolės grupių.

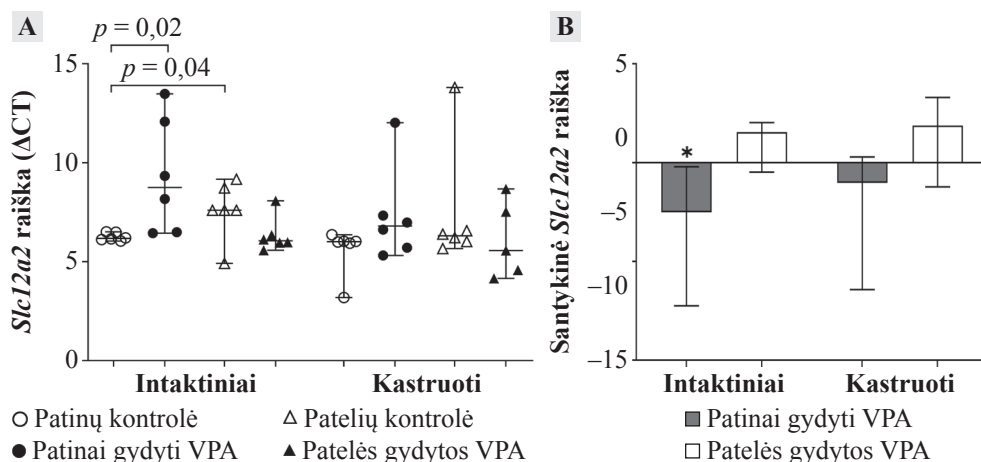
Gydymas VPA (28 paras 300 mg/kg/parai) reikšmingai sumažino intaktinių ir kastruotų patinų grupių timocitų santykinę *Slc5a8* raišką ($2^{-\Delta\Delta CT}$), kuri buvo lygi 0,06 ir 0,04, atitinkamai. Priešingai intaktinių gydytų patinų grupės raiškai, intaktinių patelių gydymas VPA aktyvino SLC5A8 nešiklį koduojančio geno raišką, santykinė raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo lygi 6,54. Gydymas VPA poveikio kastruotų patelių grupės timocitų geno raiškai neturėjo.

Tirtų žiurkių grupių timocitų *Slc12a2* ir *Gapdh* raiškos duomenys yra pateikti 3.2.2 lentelėje ir 3.2.2 paveiksle.

3.2.2 lentelė. Kontrolės ir gydytų VPA žiurkių grupių timocitų *Slc12a2* ir *Gapdh* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis \pm SN				
		CT		ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
		<i>Slc12a2</i>	<i>Gapdh</i>			
Intaktiniai patinai						
Kontrolė	6	29,13 \pm 0,39	22,91 \pm 0,44	6,23 \pm 0,13 ^a	0,00 \pm 0,13	0,97 \pm 0,10
Gydyti VPA	6	32,31 \pm 2,23	22,98 \pm 0,57	9,33 \pm 2,66 ^b	3,10 \pm 2,66	0,35 \pm 2,92
Intaktinės patelės						
Kontrolė	6	31,13 \pm 0,38	23,53 \pm 0,97	7,60 \pm 1,35	0,00 \pm 1,35	1,01 \pm 1,14
Gydytos VPA	6	29,43 \pm 0,94	23,08 \pm 0,41	6,34 \pm 0,81	-1,26 \pm 0,81	2,69 \pm 0,89
Kastruoti patinai						
Kontrolė	6	30,31 \pm 1,60	24,71 \pm 1,47	5,59 \pm 1,12	0,00 \pm 1,12	1,09 \pm 1,63
Gydyti VPA	6	29,65 \pm 2,09	22,32 \pm 0,48	7,33 \pm 2,42	1,74 \pm 2,42	0,30 \pm 2,71
Kastruotos patelės						
Kontrolė	6	30,12 \pm 3,25	22,68 \pm 2,17	7,44 \pm 2,86	0,00 \pm 2,86	1,06 \pm 2,19
Gydytos VPA	5	30,93 \pm 2,09	24,83 \pm 1,06	6,10 \pm 1,73	-1,34 \pm 1,73	2,53 \pm 1,94

^a $p = 0,04$, palyginus su intaktinių patelių kontrole; ^b $p = 0,02$, palyginus su intaktinių patinų kontrole.



3.2.2 pav. Tirtų žiurkių grupių timocitų *Slc12a2* raiška

A – *Slc12a2* raiška; **B** – gydytų intaktinių ir kastruotų žiurkių grupių santykinė *Slc12a2* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$). * $p < 0,05$, palyginus su atitinkama kontrole; ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus tirtų intaktinių žiurkių kontrolių grupių raišką, nustatytas statistiškai reikšmingas su lytimi susijęs *Slc12a2* raiškos skirtumas – *Slc12a2* raiška buvo didesnė patinų grupėje. Gydytas VPA (28 paras 300 mg/kg/parai) reikšmingai sumažino timocitų NKCC1 nešiklį koduojančio geno raišką intaktinių patinų grupėje, santykinė raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo lygi 0,35. Kastruotų gyvūnų grupių ir intaktinių patelių grupės timocitų *Slc12a2* raiškai gydymas VPA poveikio neturėjo.

Tirtų žiurkių grupių timocitų *Slc12a5* ir *Gapdh* raiškos duomenys yra pateikti 3.2.3 lentelėje ir 3.2.3 paveiksle.

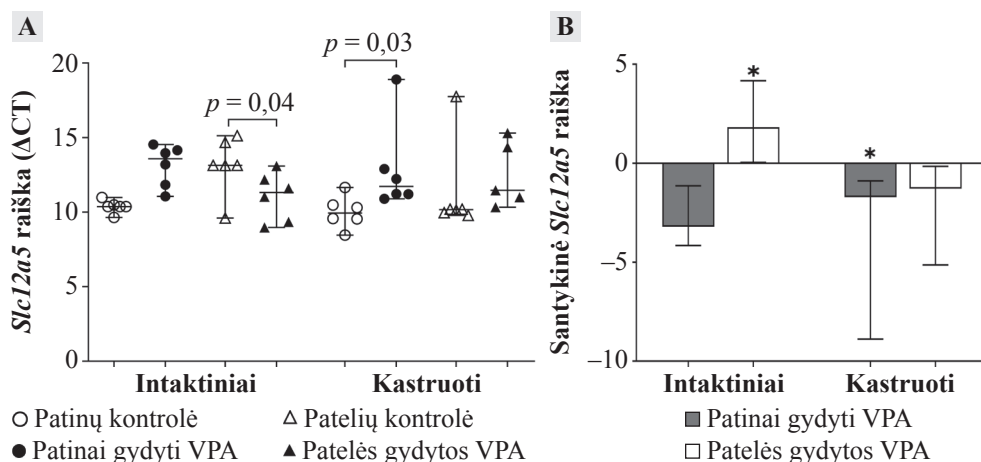
3.2.3 lentelė. Kontrolės ir gydytų VPA žiurkių grupių timocitų *Slc12a5* ir *Gapdh* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis \pm SN				
		CT		ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
		<i>Slc12a5</i>	<i>Gapdh</i>			
Intaktiniai patinai						
Kontrolė	6	31,39 \pm 0,18	21,03 \pm 0,49	10,37 \pm 0,56	0,00 \pm 0,56	1,08 \pm 0,52
Gydyti VPA	6	34,35 \pm 1,27	21,16 \pm 0,35	13,19 \pm 1,26	2,83 \pm 1,26	0,14 \pm 1,30
Intaktinės patelės						
Kontrolė	6	34,85 \pm 1,24	21,72 \pm 1,28	13,13 \pm 1,77	0,00 \pm 1,77	1,13 \pm 1,45
Gydytos VPA	6	32,31 \pm 1,28	21,27 \pm 0,50	11,03 \pm 1,61 ^a	-2,10 \pm 1,61	4,29 \pm 1,63

3.2.3 lentelės tęsinys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		<i>Slc12a5</i>	<i>Gapdh</i>			
Kastruoti patinai						
Kontrolė	6	33,00 ± 1,70	23,00 ± 2,08	10,00 ± 0,98	0,00 ± 0,98	1,05 ± 0,91
Gydyti VPA	6	33,49 ± 2,66	20,61 ± 0,40	12,89 ± 3,04 ^b	2,89 ± 3,04	0,14 ± 3,10
Kastruotos patelės						
Kontrolė	6	32,49 ± 3,17	21,06 ± 1,89	11,43 ± 2,84	0,00 ± 2,68	1,05 ± 1,13
Gydytos VPA	5	34,19 ± 1,73	21,70 ± 0,70	12,49 ± 1,97	1,14 ± 1,97	0,48 ± 2,20

^a $p = 0,04$, palyginus su intaktinių patelių kontrole; ^b $p = 0,03$, palyginus su kastruotų patinų kontrole.



3.2.3 pav. Tirtų žiurkių timocitų *Slc12a5* raiška

A – *Slc12a5* raiška; **B** – gydytų intaktinių ir kastruotų žiurkių grupių santykinė *Slc12a5* raiška. Duomenys pateikti $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$. * $p < 0,05$, palyginus su atitinkama kontrole; ilgas horizontalus brūkšnis – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus abiejų lyčių kontrolių SLC12A5 nešiklio geno raišką, skirtumų nenustatyta. Gydytas VPA poveikio tirtų timocitų *Slc12a5* raiškai intaktinių patinų grupėje neturėjo, o intaktinių patelių gydymas VPA reikšmingai suaktyvino *Slc12a5* raišką. Gydytų patelių santykinė *Slc12a5* raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo 4,29 karto didesnė nei patelių kontrolės. Raišką palyginus su atitinkamomis kontrolėmis, kastruotų žiurkių gydymas VPA (28 paras gydytų 300 mg/kg/parai) timocitų santykinę *Slc12a5* raišką slopino reikšmingai tik patinų grupėje, santykinė raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo lygi 0,14.

3.3. Ilgalaikio VPA–NaDCA gydymo poveikio tirtų žiurkių grupių timocitų santykinei *Slc5a8*, *Slc12a2* ir *Slc12a5* raiškai vertinimas

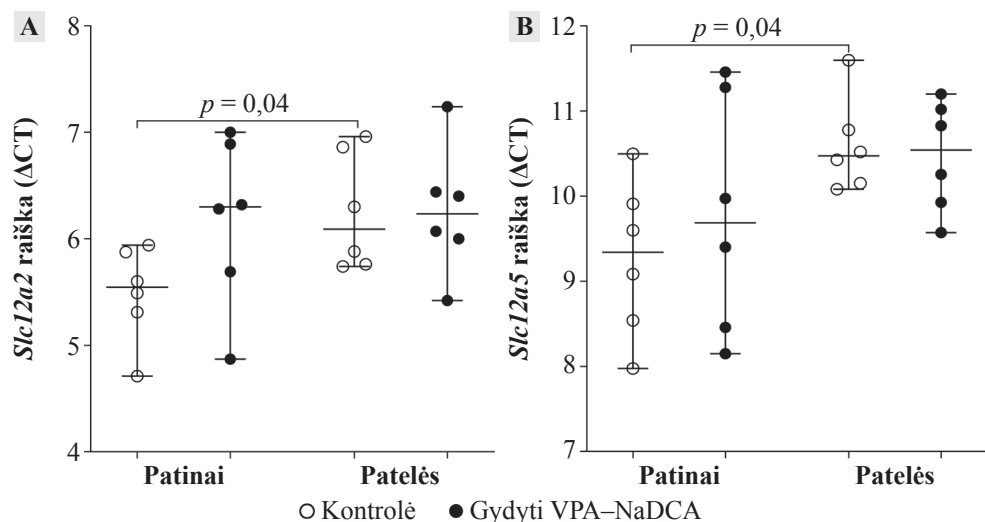
Kontrolės ir gydytų 28 paras 150 mg/kg/parai VPA bei 100 mg/kg/parai NaDCA derinio doze žiurkių grupių timocitų *Slc5a8* ir *Gapdh* raiškos duomenys yra pateikti 3.3.1 lentelėje.

3.3.1 lentelė. Tirtų žiurkių grupių timocitų *Slc5a8* ir *Gapdh* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		<i>Slc5a8</i>	<i>Gapdh</i>			
Patiniai						
Kontrolė	6	33,43 ± 0,64	24,52 ± 0,60	8,91 ± 0,95	0,00 ± 0,95	1,08 ± 1,13
Gydyti VPA–NaDCA	6	33,43 ± 0,85	24,15 ± 0,60	9,29 ± 0,66	0,38 ± 0,66	0,77 ± 0,49
Patelės						
Kontrolė	6	33,67 ± 1,06	24,34 ± 0,73	9,33 ± 1,17	0,00 ± 1,17	1,05 ± 1,04
Gydytos VPA–NaDCA	6	32,55 ± 2,07	24,47 ± 0,56	8,08 ± 1,69	-1,25 ± 1,69	2,37 ± 4,34

Palyginus tirtas žiurkių grupes, statistiškai reikšmingo *Slc5a8* raiškos pokyčio po gydymo nenustatyta.

Kontrolės ir gydytų VPA–NaDCA žiurkių grupių timocitų *Slc12a2* ir *Slc12a5* raiškos duomenys po 28 parų gydymo yra pateikti 3.3.1 paveiksle.



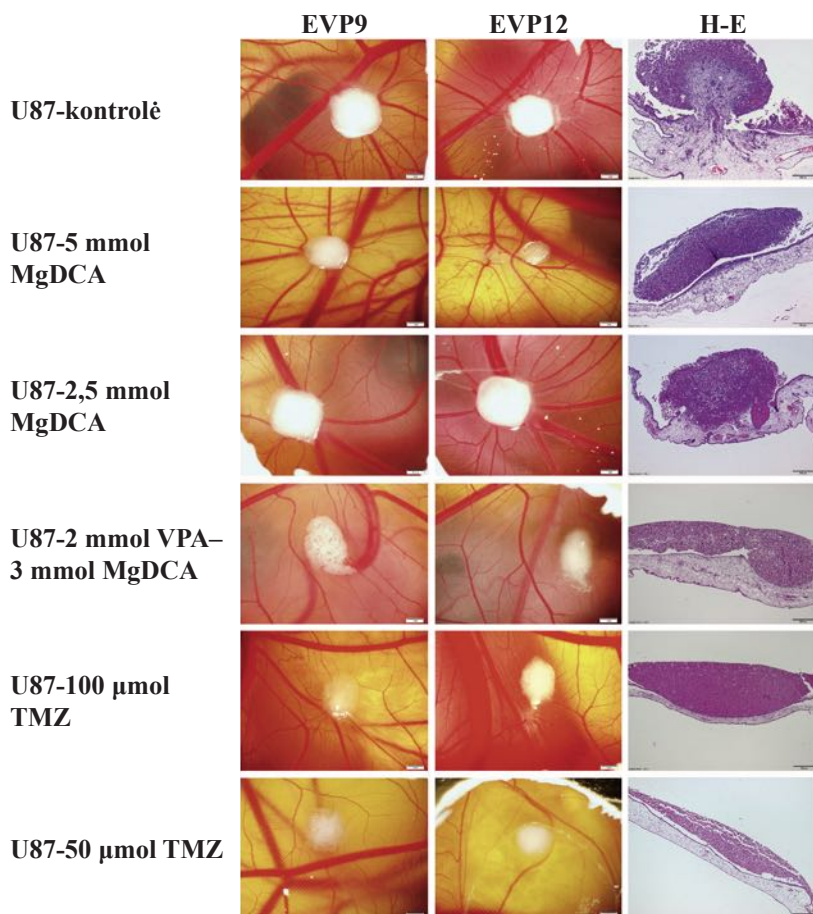
3.3.1 pav. Tirtų žiurkių timocitų genų raiška

A – *Slc12a2* raiška; B – *Slc12a5* raiška. Ilgas horizontalus brūkšnyš – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

3.4. MgDCA, VPA–MgDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių navikams ant CAM tyrimo rezultatai

3.4.1. Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM stereomikroskopijos vertinimas

U87 naviko ant CAM tirtų grupių biomikroskopijos EVP9, EVP12 ir H-E histologijos nuotraukos yra pateiktos 3.4.1.1 paveiksle.



3.4.1.1 pav. Tirtų U87 navikų grupių biomikroskopijos EVP9, EVP12 ir H-E histologijos nuotraukos

EVP9 rodo naviką po dviejų parų ir EVP12 – po 5 parų po transplantacijos ant CAM. Navikai buvo tirti kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. EVP9 ir EVP12 nuotraukų skalė – 1 mm; H-E preparatų skalė – 200 μm.

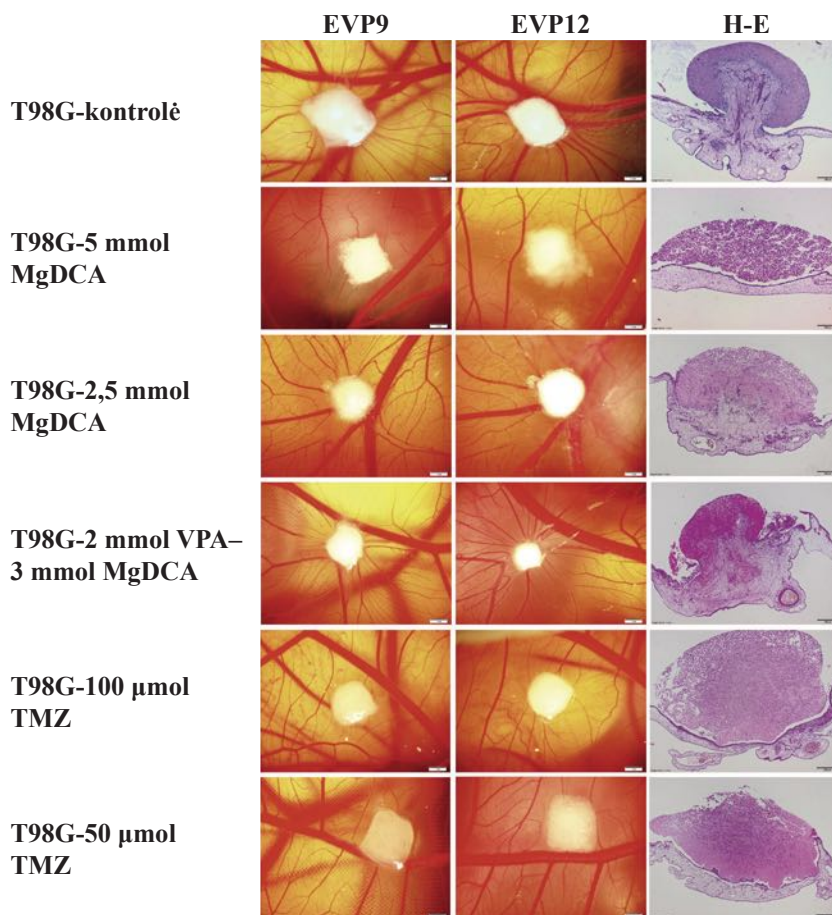
U87-kontrolės navikas EVP9 ant CAM yra vizualiai didesnis už EVP12, nes EVP12 navikas yra invazavęs į CAM mezenchimą ir tik jo dalis matoma virš CAM. Invazija patvirtinta H-E histologiniu tyrimu – choriono epitelio vientisumas pažeistas, matoma naviko invazija ir viščiuko kraujagyslės navike. EVP9 ir EVP12 U87-2,5 mmol MgDCA naviko dydis nekito, H-E preparate matyti pažeistas choriono epitelis su naviko invazija į CAM. EVP9 ir EVP12 U87-5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikai auga ant CAM paviršiaus, o H-E nuotraukoje choriono epitelis yra vientisas.

EVP9 bei EVP12 nuotraukose 100 μmol TMZ ir 50 μmol TMZ navikai yra panašaus dydžio, o H-E nuotraukose matyti, kad jie auga ant CAM paviršiaus, choriono epitelis yra nepažeistas.

T98G naviko ant CAM tirtų grupių biomikroskopijos EVP9, EVP12 ir H-E histologijos nuotraukos yra pateiktos 3.4.1.2 paveiksle.

Palyginus su T98G EVP9 naviku, EVP12 T98G kontrolės ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikai ant CAM yra mažesni, nes naviko dalis yra invazavusi į chorioalantoinę membraną. EVP9 U87-2,5 mmol MgDCA navikas nežymiai mažesnis nei EVP12. Kontrolės ir gydytų 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų H-E nuotraukose matomas membranos epitelio vientisumo pažeidimas. T98G-kontrolės naviko H-E nuotraukoje matyti viščiuko kraujagyslės navike. 5 mmol MgDCA navikas EVP9–12 nekito, o H-E nuotraukoje matomas navikas ant CAM membranos paviršiaus ir nepažeistas choriono epitelis. T98G kontrolės, T98G-2,5 mmol, T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų EVP9 ir EVP12 biomikroskopijos nuotraukose matyti pritrauktos link naviko kraujagyslės.

Abi TMZ dozės slopino T98G naviko ant CAM augimą. H-E vaizdas rodo, kad TMZ gydyti navikai nepažeidė choriono epitelio vientisumo ir augo ant CAM paviršiaus.



3.4.1.2 pav. Tirtų T98G navikų grupių biomikroskopijos EVP9, EVP12 ir H-E histologijos nuotraukos

EVP9 rodo naviką po dviejų parų ir EVP12 – po 5 parų po transplantacijos ant CAM. Navikai buvo tirti kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. EVP9 ir EVP12 nuotraukų skalė – 1 mm; H-E preparatų skalė – 200 μm.

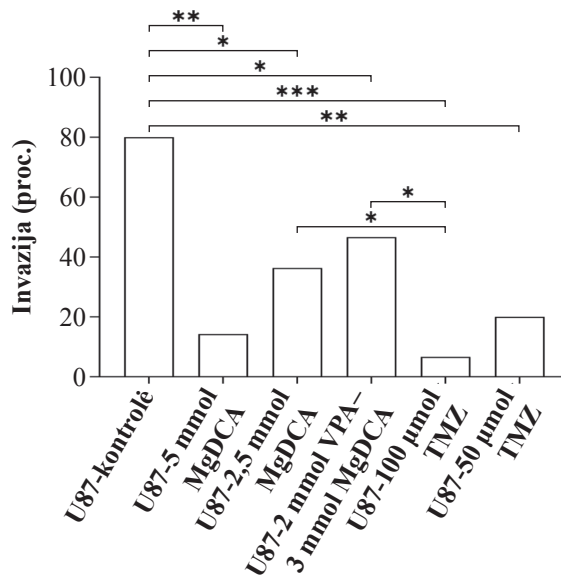
3.4.2. Tirtų U87 ir T98G navikų invazijos į CAM dažnio ir CAM storio po naviku vertinimas

Tirtų U87 navikų grupių invazijos dažnio į CAM duomenys yra pateikti 3.4.2.1 lentelėje ir 3.4.2.1 paveiksle.

3.4.2.1 lentelė. Tirtų U87 navikų grupių invazijos dažnio į CAM ir CAM storio po naviku duomenys

Tirtos grupės	n	Invazijos dažnis, proc.	CAM storis, μm (mediana (ribos))
U87-kontrolė	20	80,00	197,80 (65,20–387,94)
U87-5 mmol MgDCA	14	14,29 ^a	105,16 (35,87–579,59) ^{b, c}
U87-2,5 mmol MgDCA	11	36,36 ^d	142,51 (49,44–378,32) ^e
U87-2 mmol VPA– 3 mmol MgDCA	15	46,67 ^f	256,76 (66,82–749,99) ^g
U87-100 μmol TMZ	15	6,67 ^{h, i, j}	71,18 (46,99–243,78) ^{k, l}
U87-50 μmol TMZ	15	20,00 ^m	120,19 (44,47–393,93) ⁿ

^a $p = 0,0008$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p = 0,047$, palyginus su U87-kontrolė; ^c $p = 0,003$, palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^d $p = 0,02$, palyginus su U87-kontrolė; ^e $p = 0,046$, palyginus su U87-100 μmol TMZ; ^f $p = 0,03$, palyginus su U87-kontrolė; ^g $p = 0,03$, palyginus su U87-2,5 mmol MgDCA; ^h $p < 0,0001$, palyginus su U87-kontrolė; ⁱ $p = 0,04$, palyginus su U87-2,5 mmol MgDCA; ^j $p = 0,01$, palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^k $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^l $p < 0,001$, palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^m $p = 0,0004$, palyginus su U87-kontrolė; ⁿ $p = 0,004$, palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA.



3.4.2.1 pav. Tirtų U87 naviko grupių invazijos dažnis į CAM

Naviko invazijos į CAM dažnis buvo tirtas kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

U87 navikų gydymas 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA dozėmis reikšmingai sumažino naviko invazijos dažnį į CAM. Palyginus gydytas MgDCA ir deriniu grupes, reikšmingų skirtumų nenustatyta.

U87 naviko invazijos dažnis buvo mažiausias gydytoje 100 μmol TMZ naviko grupėje ir buvo reikšmingai mažesnis nei kontrolės, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA ir 2,5 mmol MgDCA navikų grupėse. Palyginus su U87-kontrolės grupės invazijos dažniu, 50 μmol TMZ dozė reikšmingai sumažino naviko invaziją į CAM. Reikšmingo U87 naviko invazijos dažnio skirtumo, palyginus dvi TMZ dozes, nesustatyta.

CAM storis po U87 kontrolės grupės navikais ir navikais, gydytais 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA dozėmis, reikšmingai nesiskyrė. Palyginus su kontrole, U87 navikų gydymas 5 mmol MgDCA reikšmingai sumažino CAM storį po naviku. CAM storis buvo didžiausias U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA naviko grupės ir reikšmingas skirtumas nustatytas šią grupę palyginus su U87-5 mmol MgDCA, U87-2,5 mmol MgDCA navikų grupėmis (3.4.2.1 lentelė).

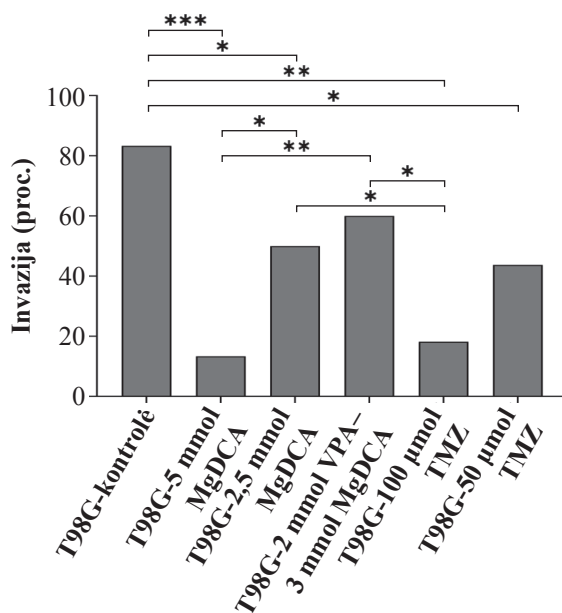
CAM storis po U87 naviko kontrolės ir gydyto 50 μmol TMZ doze, nesiskyrė. Palyginus su kontrole, U87 navikų gydymas 100 μmol TMZ reikšmingai sumažino CAM storį po naviku. CAM storis po U87-100 μmol TMZ naviko grupe buvo reikšmingai mažesnis nei po U87-2,5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA naviko grupėmis. CAM storis po U87-50 μmol TMZ grupės navikais buvo mažesnis nei po U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupės navikais. Palyginus tirtas TMZ grupes, skirtumų nenustatyta (3.4.2.1 lentelė).

Tirtų T98G navikų grupių invazijos dažnio į CAM duomenys yra pateikti 3.4.2.2 lentelėje ir 3.4.2.2 paveiksle.

3.4.2.2 lentelė. Tirtų T98G navikų grupių invazijos dažnio į CAM ir CAM storio po naviku duomenys

Tirtos grupės	n	Invazijos dažnis, proc.	CAM storis, μm (mediana (ribos))
T98G-kontrolė	12	83,33	248,15 (60,11–968,15)
T98G-5 mmol MgDCA	15	13,33 ^a	131,47 (66,11–282,07) ^b
T98G-2,5 mmol MgDCA	15	46,67 ^{c, d}	152,24 (36,58–380,23) ^e
T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA	15	60,00 ^f	223,56 (55,89–409,76) ^g
T98G-100 μmol TMZ	11	18,18 ^{h, i, j}	168,64 (57,74–359,90) ^k
T98G-50 μmol TMZ	16	43,75 ^l	219,64 (48,73–775,97) ^m

^a $p = 0,0003$, palyginus su T98G-kontrolė; ^b $p < 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė; ^c $p = 0,049$, palyginus su T98G-kontrolė; ^d $p = 0,03$, palyginus su T98G-5 mmol MgDCA; ^e $p = 0,01$, palyginus su T98G-kontrolė; ^f $p = 0,008$, palyginus su T98G-5 mmol MgDCA; ^g $p = 0,02$, palyginus su T98G-5 mmol MgDCA; ^h $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė; ⁱ $p = 0,03$, palyginus su T98G-2,5 mmol MgDCA; ^j $p = 0,03$, palyginus su T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^k $p = 0,049$, palyginus su T98G-kontrolė; ^l $p = 0,03$, palyginus su T98G-kontrolė; ^m $p = 0,04$, palyginus su T98G-5 mmol MgDCA.



3.4.2.2 pav. Tirtų T98G naviko grupių invazijos dažnis į CAM

Naviko invazijos į CAM dažnis buvo tirtas kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Invazijos dažnis po T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA ir T98G-kontrolės grupių navikais reikšmingai nesiskyrė. Palyginus su kontrole, gydymas 5 mmol MgDCA ir 2,5 mmol MgDCA reikšmingai sumažino T98G naviko invazijos dažnį į CAM. Palyginus su 2,5 mmol MgDCA ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA gydytomis grupėmis, 5 mmol MgDCA dozė veiksmingiausiai sumažino invazijos dažnį ir jis buvo reikšmingai mažiausias šioje grupėje. Palyginus 2,5 mmol MgDCA ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupes, reikšmingo invazijos dažnio skirtumo nenustatyta.

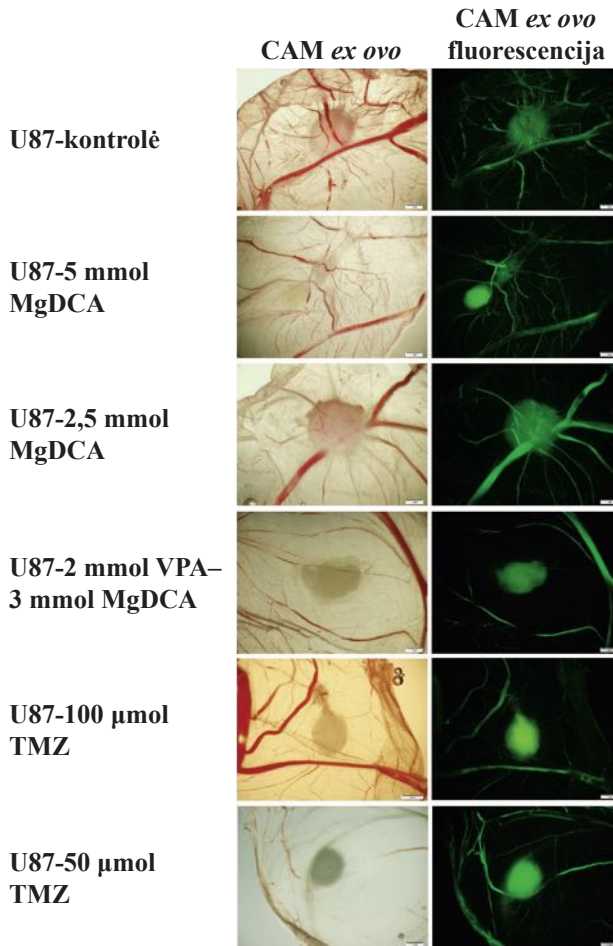
T98G naviko gydymas 100 μmol ir 50 μmol TMZ dozėmis reikšmingai sumažino invazijos dažnį į CAM. T98G-100 μmol TMZ grupės invazijos dažnis buvo reikšmingai mažesnis nei navikų, gydytų 2 mmol VPA–3 mmol ir 2,5 mmol MgDCA dozėmis grupėse. Gydytų 100 μmol ir 50 μmol TMZ dozėmis T98G navikų invazijos dažnis nesiskyrė.

CAM storis po T98G kontrolės ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupių navikais nesiskyrė. Gydymas MgDCA CAM storį reikšmingai sumažino po T98G-5 mmol MgDCA ir T98G-2,5 mmol MgDCA grupių navikais. CAM storis po T98G-5 mmol MgDCA grupės navikais buvo reikšmingai mažesnis nei po T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupės navikais. CAM storis po 2,5 mmol MgDCA ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA T98G navikais nesiskyrė (3.4.2.2 lentelė).

Gydymas TMZ CAM storį reikšmingai sumažino po T98G-100 μmol TMZ grupės navikais, bet ne po T98G-50 μmol TMZ grupės navikais. CAM storis po T98G-5 mmol MgDCA grupės navikais buvo reikšmingai mažesnis nei po T98G-50 μmol TMZ grupės navikais. CAM storis po T98G navikais, gydytais 100 μmol ir 50 μmol dozėmis, nesiskyrė (3.4.2.2 lentelė).

3.4.3. MgDCA, VPA–MgDCA ir TMZ poveikio neoangiogenezei ir kraujagyslių skaičiui CAM po U87 ir T98G ląstelių navikais vertinimas

U87 naviko ant CAM tirtų grupių EVP12 *ex ovo* iškirpto naviko su membrana ir kraujagyslių fluorescencijos su dekstranu nuotraukos yra pateiktos 3.4.3.1 paveiksle.



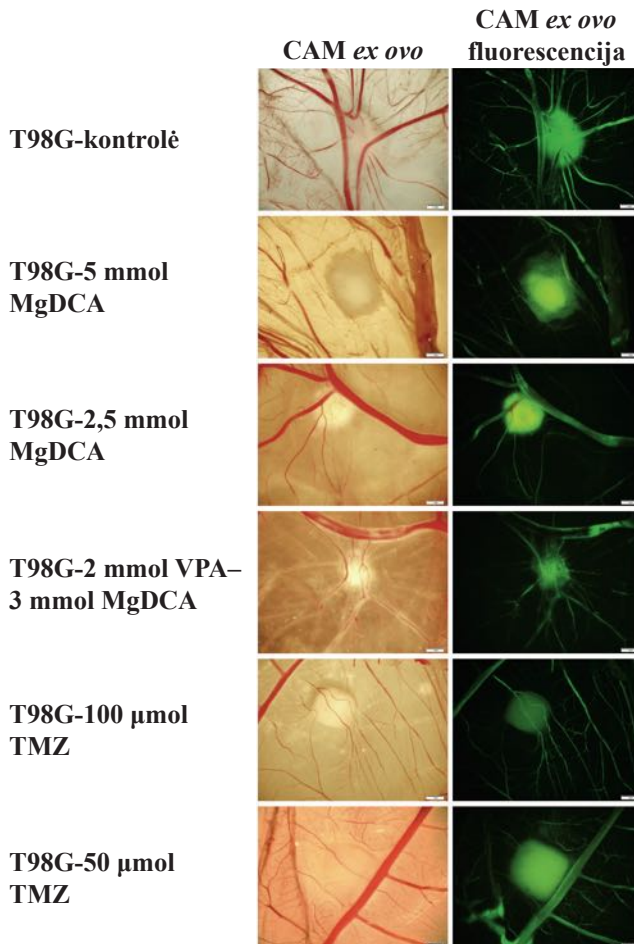
3.4.3.1 pav. Tirtų U87 naviko grupių neoangiogenės raiška CAM su naviku *ex ovo* ir kraujagyslių fluorescencijos nuotraukose

CAM *ex ovo* nuotraukoje matoma iškirpta membrana (apatinė pusė) su naviku. Navikai buvo tirti kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. CAM *ex ovo* ir kraujagyslių fluorescencijos nuotraukų skalė – 1 mm.

Kontrolės naviko *ex ovo* ir jo fluorescencijos nuotraukose apie naviką matomas gerai išreikštas kraujagyslių tinklas – „stipininis ratas“. Palyginus su kontrole, kraujagyslių tinklas apie U87-5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikus yra silpniau išreikštas. Fluorescencijos nuotraukose kraujagyslių tinklas aplink deriniu gydytą naviką buvo silpniausiai išreikštas.

CAM *ex ovo* ir jos fluorescencijos nuotraukose apie navikus, gydytus 100 μmol ir 50 μmol TMZ, kraujagyslių tinklas yra silpniau išreikštas nei kontrolės, tai rodo gydymo slopinantį poveikį neoangiogenezei.

T98G naviko ant CAM tirtų grupių EVP12 *ex ovo* iškirpto naviko su membrana ir jo fluorescencijos su dekstranu nuotraukos yra pateiktos 3.4.3.2 paveiksle.



3.4.3.2 pav. Tirtų T98G naviko grupių neoangiogenėzės raiška CAM su naviku *ex ovo* ir kraujagyslių fluorescencijos nuotraukose

CAM *ex ovo* nuotraukoje matoma iškirpta membrana (apatinė pusė) su naviku. Navikai buvo tirti kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. CAM *ex ovo* ir kraujagyslių fluorescencijos nuotraukų skalė – 1 mm.

T98G-kontrolės ir T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų CAM *ex ovo* ir fluorescencijos nuotraukose matyti, pritrauktos link naviko kraujagyslės ir „stipininis ratas“. Palyginus su kontrole, kraujagyslių tinklo raiška aplink T98G-2,5 mmol MgDCA ir T98G-5 mmol MgDCA navikus silpniau išreikšta, o tai rodo, kad gydymas slopino neoangiogenezę. CAM *ex ovo* fluorescencijos nuotraukose matyti aplink gydytus 2,5 mmol ir 5 mmol MgDCA navikus sumažėjusi kraujagyslinio tinklo raiška nei kontrolės ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų nuotraukose.

Gydymas 100 μmol ir 50 μmol TMZ dozėmis slopino kraujagyslių tinklo formavimąsi aplink T98G navikus. *Ex ovo* nuotraukose kraujagyslių pritraukimo link T98G-100 μmol TMZ ir T98G-50 μmol TMZ navikų nematyti ir kraujagyslių tinklas silpniau išreikštas nei kontrolės grupės.

Kraujagyslių skaičius CAM po tirtais U87 ir T98G navikais yra pateiktas 3.4.3.1 lentelėje.

3.4.3.1 lentelė. Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM grupių kraujagyslių skaičius po naviku

Tirtos grupės	Kraujagyslių skaičius (mediana (ribos))			
	n	U87	n	T98G
Kontrolė	20	23,5 (9–63)	12	28 (3–45)
5 mmol MgDCA	14	18 (6–35) ^a	15	12 (5–19) ^b
2,5 mmol MgDCA	11	20 (6–32) ^c	15	8,5 (4–24) ^{d, e}
2 mmol VPA–3 mmol MgDCA	15	16 (7–35) ^f	15	30 (7–55) ^g
100 μmol TMZ	15	7 (1–21) ^{h, i, j, k}	11	11 (2–18) ^{l, m}
50 μmol TMZ	15	13 (2–29) ⁿ	16	12 (5–18) ^{o, p}

^a $p = 0,009$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p = 0,02$, palyginus su T98G-kontrolė; ^c $p = 0,04$, palyginus su U87-kontrolė; ^d $p = 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė; ^e $p < 0,001$, palyginus su T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^f $p = 0,02$, palyginus su U87-kontrolė; ^g $p < 0,001$, palyginus su T98G-5 mmol MgDCA; ^h $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ⁱ $p = 0,02$, palyginus su U87-2,5 mmol MgDCA; ^j $p = 0,003$, palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^k $p = 0,04$, palyginus su U87-5 mmol MgDCA; ^l $p = 0,002$, palyginus su T98G-kontrolė; ^m $p < 0,001$, palyginus su T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ⁿ $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^o $p = 0,007$, palyginus su T98G-kontrolė; ^p $p < 0,001$, palyginus su T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA.

Palyginus su U87-kontrolė, naviko gydymas tiriamu vaistiniu preparatu sumažino kraujagyslių skaičių CAM mezenchimoje po U87-5 mmol MgDCA, U87-2,5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupių navikais. Palyginus 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupes, reikšmingo kraujagyslių skaičiaus skirtumo nenustatyta.

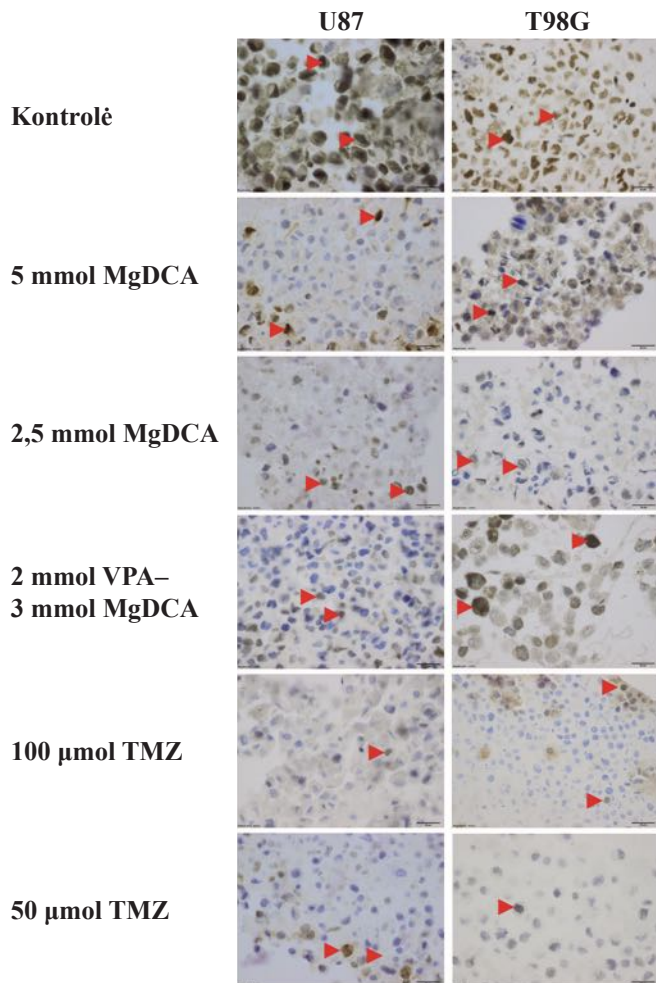
Palyginus su U87-kontrolė, naviko gydymas TMZ kraujagyslių skaičių CAM mezenchimoje sumažino po U87-100 μ mol TMZ ir U87-50 μ mol TMZ grupių navikais. Kraujagyslių skaičius po U87-100 μ mol TMZ grupės navikais CAM mezenchimoje buvo mažiausias ir buvo reikšmingai mažesnis nei U87-5 mmol MgDCA, U87-2,5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupių. U87-50 μ mol TMZ grupės kraujagyslių skaičius nesiskyrė nuo U87-5 mmol MgDCA, U87-2,5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupių. Kraujagyslių skaičiaus skirtumo po U87-100 μ mol TMZ ir U87-50 μ mol TMZ grupių navikais nenustatyta.

Kraujagyslių skaičius po T98G navikais, gydytais 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA doze, ir po kontrolės grupės, nesiskyrė. Kraujagyslių skaičius CAM mezenchimoje po T98G-2,5 mmol MgDCA ir T98G-5 mmol MgDCA grupių navikais buvo reikšmingai mažesnis nei po kontrolės. Deriniu gydytų T98G navikų grupės kraujagyslių skaičius CAM buvo reikšmingai didesnis nei T98G-5 mmol MgDCA ir T98G-2,5 mmol MgDCA navikų grupių.

Gydymas TMZ reikšmingai sumažino kraujagyslių skaičių CAM po T98G-100 μ mol TMZ ir T98G-50 μ mol TMZ grupių navikais. T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupės kraujagyslių skaičius po naviku buvo didžiausias ir šią grupę palyginus su T98G-100 μ mol TMZ ir T98G-50 μ mol TMZ navikų grupėmis, buvo nustatytas reikšmingas skirtumas. T98G navikų, gydytų 100 μ mol ir 50 μ mol TMZ dozėmis, kraujagyslių skaičius nesiskyrė nuo T98G-5 mmol MgDCA ir T98G-2,5 mmol MgDCA navikų grupių. Kraujagyslių skaičius po T98G-100 μ mol TMZ ir T98G-50 μ mol TMZ grupių navikais nesiskyrė.

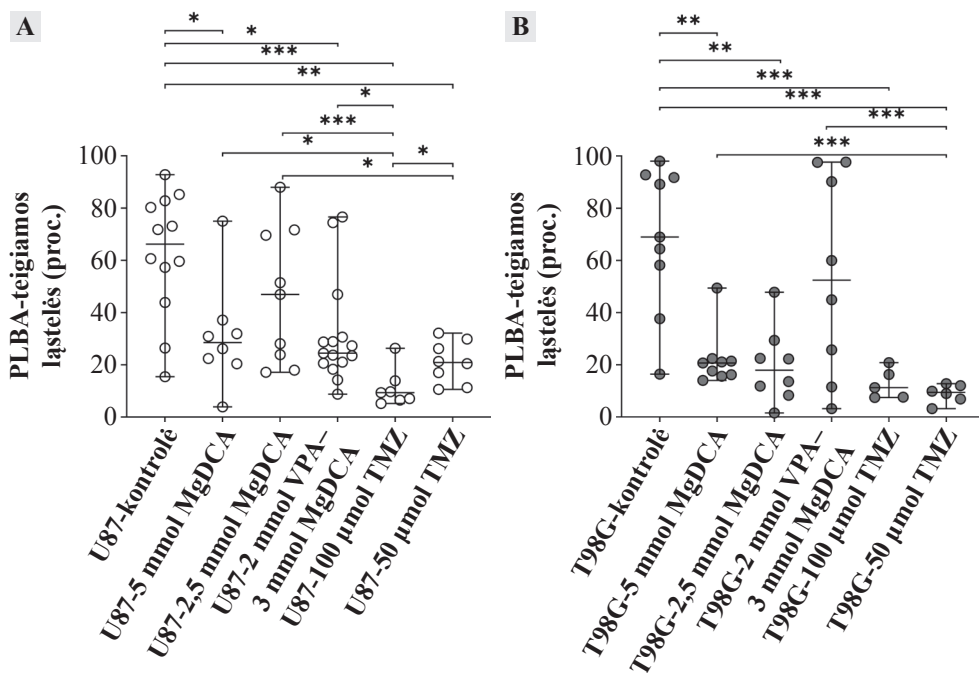
3.4.4. Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM PLBA raiškos vertinimas

Tirtų U87 ir T98G navikų grupių PLBA-teigiamų ląstelių skaičius yra pateiktas 3.4.4.1, 3.4.4.2 paveiksluose ir 3.4.4.1 lentelėje.



3.4.4.1 pav. Tirtų U87 ir T98G navikų grupių PLBA raiška

Ruda spalva nusidažę ląstelių branduoliai rodo PLBA-teigiamas ląsteles (raudonos rodyklės). IHC preparatai žymėti monokloniniu antikūnu (klonas PC10). Skalė – 20 μm.



3.4.4.2 pav. Tirtų U87 ir T98G navikų grupių PLBA-teigiamų ląstelių raiška

A – tirtos U87 naviko grupės; **B** – tirtos T98G naviko grupės. Raiška naviko ląstelėse buvo tirta kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. Ilgas horizontalus brūkšnys – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

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

Tirtos grupės	PLBA-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))				
	n	U87		T98G	
Kontrolė	8	67,73 (15,44–92,73)		9	68,95 (16,41–98,04)
5 mmol MgDCA	8	28,53 (3,12–74,99) ^{a, b}		9	20,67 (14,01–49,41) ^c
2,5 mmol MgDCA	8	44,18 (17,14–87,98) ^{d, e}		8	17,91 (1,52–47,79) ^f
2 mmol VPA–3 mmol MgDCA	15	24,46 (8,76–74,41) ^{g, h}		8	52,43 (3,20–97,67)
100 μmol TMZ	7	9,33 (5,22–26,32) ⁱ		5	11,22 (7,44–20,83) ^j
50 μmol TMZ	8	20,89 (10,59–32,13) ^{k, l}		6	9,43 (3,17–12,77) ^{m, n, o}

^a $p = 0,049$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p = 0,02$, palyginus su U87-100 μmol TMZ; ^c $p = 0,003$, palyginus su T98G-kontrolė; ^d $p = 0,04$, palyginus su U87-50 μmol TMZ; ^e $p < 0,001$, palyginus su U87-100 μmol TMZ; ^f $p = 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė; ^g $p = 0,04$, palyginus su U87-kontrolė; ^h $p = 0,01$, palyginus su U87-100 μmol TMZ; ⁱ $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^j $p < 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė; ^k $p = 0,008$, palyginus su U87-kontrolė; ^l $p = 0,02$, palyginus su U87-100 μmol TMZ; ^m $p < 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė; ⁿ $p < 0,001$, palyginus su T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^o $p < 0,001$, palyginus su T98G-5 mmol MgDCA.

PLBA-teigiamų ląstelių skaičius U87-kontrolės ir U87-2,5 mmol MgDCA navikų grupėse nesiskyrė. Palyginus su U87-kontrolė, navikų gydymas 5 mmol MgDCA ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA dozėmis reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų ląstelių skaičių U87 navike. Palyginus su U87-2,5 mmol MgDCA, U87-5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupių PLBA-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė.

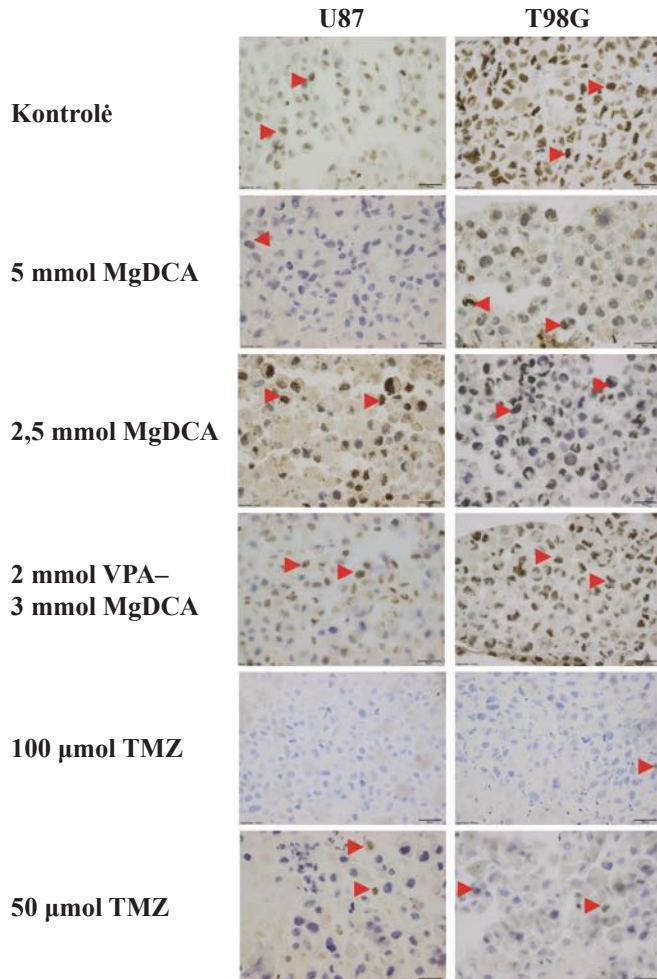
U87 naviko gydymas 100 μ mol ir 50 μ mol TMZ dozėmis reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų ląstelių skaičių navike. U87-100 μ mol TMZ grupės PLBA-teigiamų ląstelių raiška buvo reikšmingai mažesnė nei U87-5 mmol MgDCA, U87-2,5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupių. U87-50 μ mol TMZ grupės PLBA-teigiamų ląstelių skaičius navike buvo reikšmingai mažesnis nei U87-2,5 mmol MgDCA grupės. U87-50 μ mol TMZ grupės navikų PLBA-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė nuo U87-5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupių. Palyginus 100 μ mol ir 50 μ mol TMZ gydytų U87 navikų grupes, PLBA-teigiamų ląstelių raiška U87-100 μ mol TMZ grupės navike buvo reikšmingai mažesnė.

T98G-kontrolės ir T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupių PLBA-teigiamų ląstelių navike skaičius nesiskyrė. Palyginus su kontrolė, T98G navikų gydymas 5 mmol ir 2,5 mmol MgDCA reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų ląstelių skaičių navike. PLBA-teigiamų ląstelių skaičius MgDCA dozėmis gydytuose navikuose nesiskyrė nuo T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA naviko grupės. Palyginus PLBA raišką T98G-5 mmol ir T98G-2,5 mmol MgDCA navikų grupių, reikšmingo PLBA-teigiamų ląstelių skaičiaus skirtumo nenustatyta.

Palyginus su T98G kontrolė, 100 μ mol ir 50 μ mol TMZ dozės reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų ląstelių skaičių T98G navikuose. PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai didesnis T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA naviko grupės nei T98G-50 μ mol TMZ grupės. T98G navikų, gydytų 100 μ mol TMZ doze, ir T98G-5 mmol MgDCA, T98G-2,5 mmol MgDCA bei T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupių, PLBA-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė. T98G-50 μ mol TMZ ir T98G-2,5 mmol MgDCA navikų grupių PLBA-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė, o T98G-5 mmol MgDCA grupės navikų teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai didesnis nei TMZ naviko.

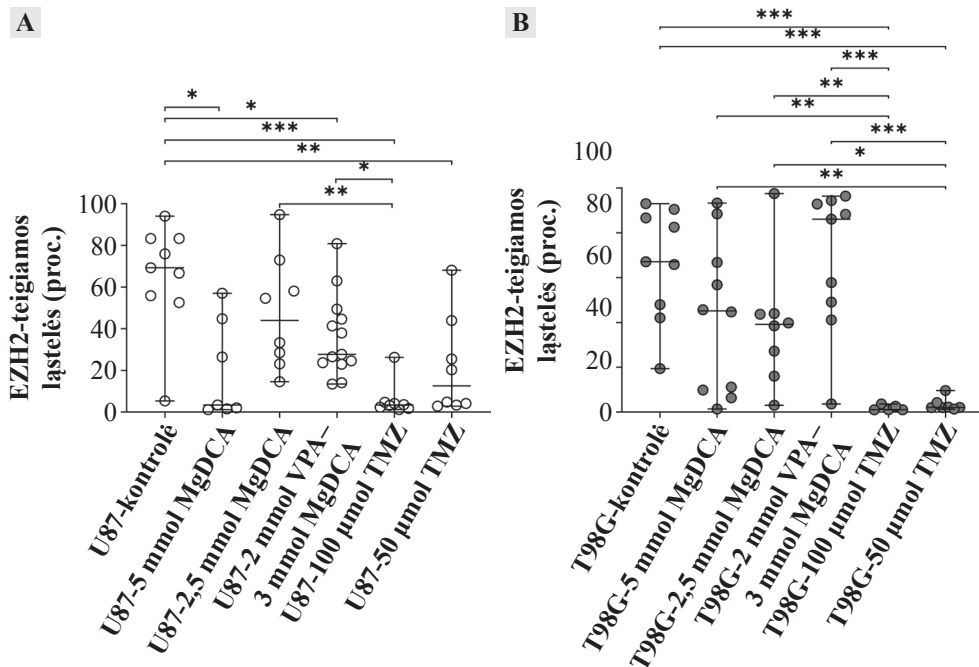
3.4.5. Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM EZH2 raiškos vertinimas

Tirtų U87 ir T98G navikų grupių EZH2-teigiamų ląstelių raiškos duomenys yra pateikti 3.4.5.1, 3.4.5.2 paveiksluose ir 3.4.5.1 lentelėje.



3.4.5.1 pav. Tirtų U87 ir T98G navikų grupių EZH2 raiška

Ruda spalva nusidažę ląstelių branduoliai rodo EZH2-teigiamas ląsteles (raudonos rodyklės). IHC preparatai žymėti polikloniniu antikūnu (phospho S21). Skalė – 20 μm.



3.4.5.2 pav. Tirtų U87 ir T98G navikų grupių EZH2-teigiamų ląstelių raiška

A – tirtos U87 naviko grupės; **B** – tirtos T98G naviko grupės. Raiška naviko ląstelėse buvo tirta kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μ mol TMZ arba 50 μ mol TMZ dozėmis grupėse. Ilgas horizontalus brūkšnyš – mediana, trumpas horizontalios linijos – ribos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

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

Tirtos grupės	EZH2-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	n	U87	n	T98G
Kontrolė	12	69,48 (5,34–94,06)	9	67,09 (19,37–93,03)
5 mmol MgDCA	7	3,39 (1,14–57,02) ^a	10	45,66 (1,36–93,31) ^{b, c}
2,5 mmol MgDCA	8	43,99 (14,59–94,77) ^d	8	39,15 (3,05–97,56) ^{e, f}
2 mmol VPA–3 mmol MgDCA	13	27,72 (13,46–80,86) ^{g, h}	9	86,08 (3,60–96,40) ^{i, j}
100 μ mol TMZ	8	3,36 (1,23–26,26) ^k	5	1,04 (1,00–3,59) ^l
50 μ mol TMZ	8	12,55 (2,84–68,12) ^m	7	1,99 (1,31–9,59) ⁿ

^a $p = 0,04$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p = 0,003$, palyginus su T98G-100 μ mol TMZ; ^c $p = 0,005$, palyginus su T98G-50 μ mol TMZ; ^d $p = 0,003$, palyginus su U87-100 μ mol TMZ; ^e $p = 0,007$, palyginus su T98G-100 μ mol TMZ; ^f $p = 0,01$, palyginus su T98G-50 μ mol TMZ; ^g $p = 0,03$, palyginus su U87-kontrolė; ^h $p = 0,02$, palyginus su U87-100 μ mol TMZ; ⁱ $p < 0,001$, palyginus su T98G-100 μ mol TMZ; ^j $p < 0,001$, palyginus su T98G-50 μ mol TMZ; ^k $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^l $p < 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė; ^m $p = 0,04$, palyginus su U87-kontrolė; ⁿ $p < 0,001$, palyginus su T98G-kontrolė.

U87-kontrolės ir navikų, gydytų 2,5 mmol MgDCA doze, EZH2-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė. EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai didesnis U87-kontrolės grupės nei U87-5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupių. Palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, U87-5 mmol MgDCA ir U87-2,5 mmol MgDCA grupių EZH2-teigiamų ląstelių skaičius nesiskyrė.

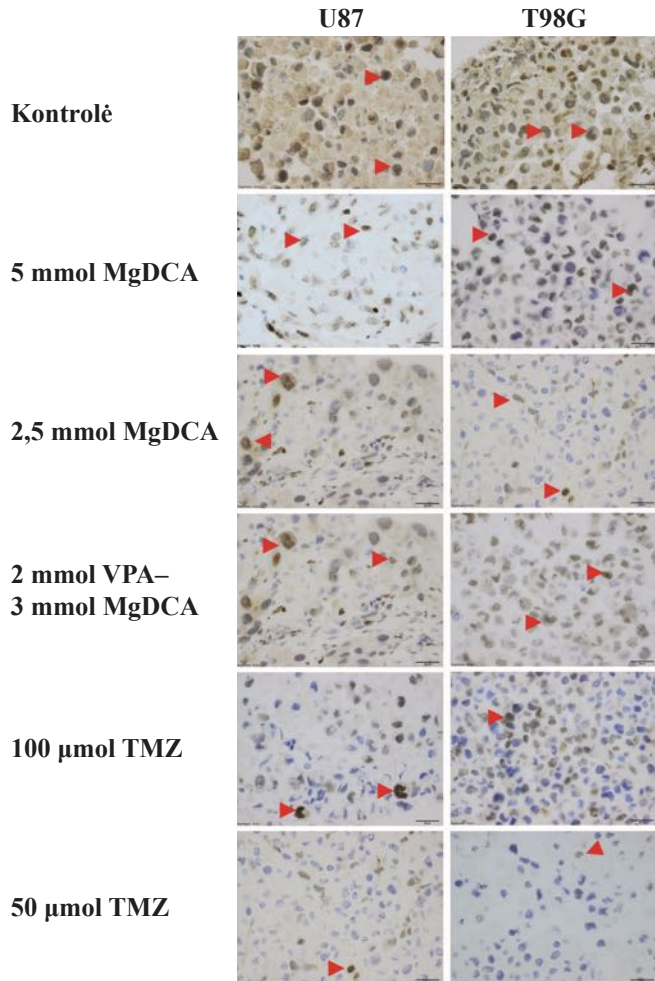
Palyginus su kontrole, U87 navikų gydymas 100 μ mol ir 50 μ mol TMZ dozėmis reikšmingai sumažino EZH2-teigiamų ląstelių skaičių navike. Palyginus U87-100 μ mol TMZ ir U87-50 μ mol TMZ grupių EZH2 raišką, reikšmingo skirtumo nenustatyta. U87-100 μ mol TMZ grupės navikų EZH2-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei U87-2,5 mmol MgDCA ir U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA navikų grupių.

EZH2-teigiamų ląstelių skaičius T98G-kontrolės ir T98G-5 mmol MgDCA, T98G-2,5 mmol MgDCA, T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupių nesiskyrė.

Palyginus su T98G-kontrole, navikų gydymas 100 μ mol ir 50 μ mol TMZ dozėmis reikšmingai sumažino EZH2-teigiamų ląstelių skaičių. EZH2-teigiamų ląstelių skaičius T98G-50 μ mol TMZ grupės nesiskyrė nuo T98G-100 μ mol TMZ grupės. T98G navikų EZH2-teigiamų ląstelių skaičius abejose TMZ gydytose grupėse buvo reikšmingai mažesnis nei T98G-5 mmol MgDCA, T98G-2,5 mmol MgDCA ir T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupių.

3.4.6. Tirtų U87 ir T98G navikų ant CAM p53 raiškos vertinimas

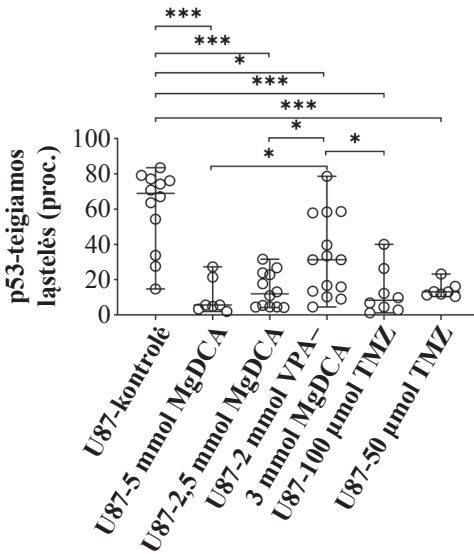
Tirtų U87 ir T98G navikų grupių p53-teigiamų ląstelių raiškos duomenys yra pateikti 3.4.6.1, 3.4.6.2 paveiksluose ir 3.4.6.1 lentelėje.



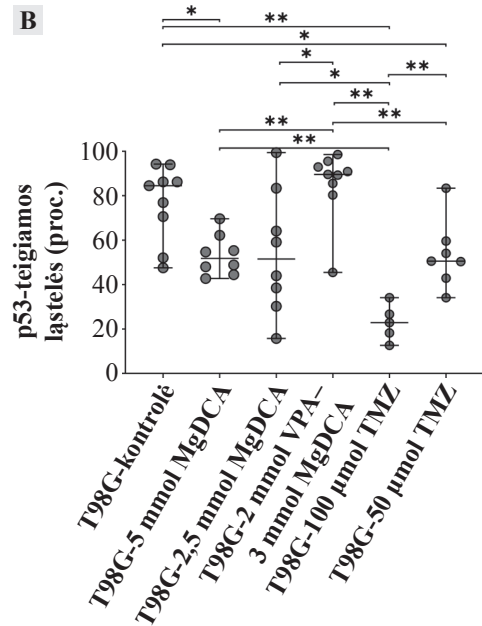
3.4.6.1 pav. Tirtų U87 ir T98G navikų grupių p53 raiška

Ruda spalva nusidažę ląstelių branduoliai rodo p53-teigiamas ląsteles (raudonos rodyklės). IHC preparatai žymėti monokloniniu antikūnu (aa 211-220, klonas 240, CBL404). Skalė – 20 μm.

A



B



3.4.6.2 pav. Tirtų U87 ir T98G navikų grupių p53-teigiamų ląstelių raiška

A – tirtos U87 naviko grupės; **B** – tirtos T98G naviko grupės. Raiška naviko ląstelėse buvo tirta kontrolės ir gydytų 5 mmol MgDCA, 2,5 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA, 100 μmol TMZ arba 50 μmol TMZ dozėmis grupėse. Ilgas horizontalus brūkšnyš – mediana, trumpas horizontalios linijos – ribos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

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

Tirtos grupės	p53-teigiamos ląstelės, proc. (mediana (ribos))			
	n	U87	n	T98G
Kontrolė	12	72,51 (14,72–83,44)	9	84,52 (47,57–94,23)
5 mmol MgDCA	7	5,62 (1,92–27,26) ^{a, b}	8	51,77 (42,73–69,60) ^{c, d}
2,5 mmol MgDCA	12	11,96 (4,17–31,62) ^e	8	51,55 (15,76–99,41) ^f
2 mmol VPA–3 mmol MgDCA	14	31,27 (4,48–78,60) ^{g, h}	9	89,60 (45,47–98,54) ^{i, j}
100 μmol TMZ	8	8,29 (1,14–40,00) ^{k, l}	5	22,90 (12,64–34,10) ^{m, n, o}
50 μmol TMZ	7	13,07 (10,39–23,17) ^p	7	50,53 (34,09–83,38) ^{r, s}

^a $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^b $p = 0,048$, palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^c $p = 0,01$, palyginus su T98G-kontrolė; ^d $p = 0,005$, palyginus su T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^e $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^f $p = 0,04$, palyginus su T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^g $p = 0,01$, palyginus su U87-kontrolė; ^h $p = 0,03$, palyginus su U87-2,5 mmol MgDCA; ⁱ $p = 0,001$, palyginus su T98G-100 μmol TMZ; ^j $p = 0,009$, palyginus su T98G-50 μmol TMZ; ^k $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^l $p = 0,02$, palyginus su U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA; ^m $p = 0,004$, palyginus su T98G-kontrolė; ⁿ $p = 0,002$, palyginus su T98G-5 mmol MgDCA; ^o $p = 0,03$, palyginus su T98G-2,5 mmol MgDCA; ^p $p < 0,001$, palyginus su U87-kontrolė; ^r $p = 0,02$, palyginus su T98G-kontrolė; ^s $p = 0,005$, palyginus su T98G-100 μmol TMZ.

Palyginus su U87-kontrole, p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis U87 navikų, gydytų 5 mmol, 2,5 mmol MgDCA ir 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA dozėmis. U87-5 mmol MgDCA ir U87-2,5 mmol MgDCA grupių navikų p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo mažesnis nei U87-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupės. Reikšmingų p53-teigiamų ląstelių skaičiaus skirtumų U87-2,5 mmol MgDCA ir U87-5 mmol MgDCA grupių navikuose nenustatyta.

U87 navikų gydymas 100 μmol ir 50 μmol TMZ dozėmis reikšmingai sumažino p53-teigiamų ląstelių skaičių navikuose. Palyginus U87-100 μmol TMZ ir U87-50 μmol TMZ grupių p53 raišką su U87-5 mmol MgDCA ir U87-2,5 mmol MgDCA grupėmis, reikšmingų skirtumų nenustatyta. Deriniu gydytos grupės p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai didesnis nei U87-100 μmol TMZ grupės, bet palyginus deriniu ir 50 μmol TMZ doze gydytas grupes, skirtumų nenustatyta.

Palyginus su T98G-kontrole, T98G-2,5 mmol MgDCA ir T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupėse reikšmingo poveikio p53 raiškai nenustatyta. T98G-5 mmol MgDCA grupės p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei kontrolės. T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupės p53 raiška buvo didžiausia ir reikšmingai skyrėsi palyginus su MgDCA gydytomis grupėmis.

T98G navikų gydymas TMZ dozėmis reikšmingai sumažino p53-teigiamų ląstelių skaičių navikuose. T98G-2 mmol VPA–3 mmol MgDCA grupės p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai didesnis nei T98G-100 μmol TMZ ir T98G-50 μmol TMZ grupių. 100 μmol TMZ doze gydytų navikų p53-teigiamų ląstelių skaičius buvo reikšmingai mažesnis nei T98G-5 mmol MgDCA ir T98G-2,5 mmol MgDCA navikų grupių. Gydymo 50 μmol TMZ, 5 mmol MgDCA ir 2,5 mmol MgDCA dozių poveikis p53-teigiamų ląstelių skaičiui T98G navikuose nesiskyrė. Rastas TMZ poveikio p53 raiškai skirtumas navikuose: T98G-100 μmol TMZ navikų žymens raiška buvo reikšmingai mažesnė nei T98G-50 μmol TMZ navikų.

3.5. VPA poveikio U87 ir T98G ląstelėms *in vitro* tyrimo rezultatai

U87 ir T98G kontrolės ląstelių *SLC5A8* raiška nenustatyta. Gydymas 1,5 mmol VPA doze suaktyvino U87 ląstelių *SLC5A8* raišką (CT vidurkis – $34,87 \pm 0,49$, ΔCT – $18,15 \pm 0,57$). U87 ląstelių gydymas 0,75 mmol ir 0,5 mmol VPA dozėmis nelėmė *SLC5A8* raiškos pokyčių – geno raiška buvo nenustatyta. T98G ląstelių gydymas skirtingomis VPA dozėmis poveikio *SLC5A8* raiškai neturėjo ir geno raiška buvo nenustatyta.

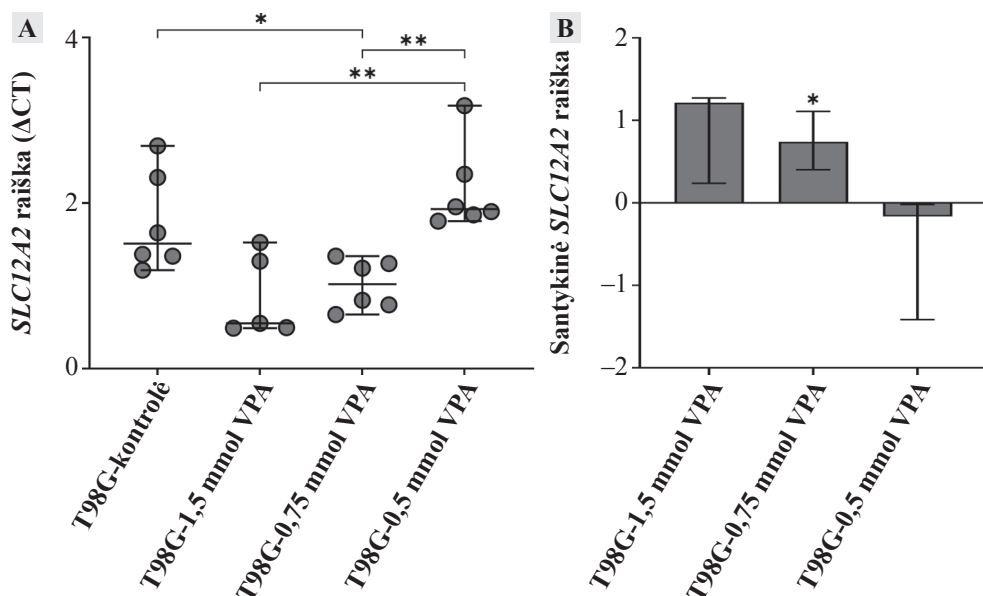
Tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.1 lentelėje.

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

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-kontrolė	6	22,07 ± 1,12	18,14 ± 1,41	3,93 ± 0,64	0,00 ± 0,64	1,08 ± 0,46
U87-1,5 mmol VPA	5	22,62 ± 0,36	18,76 ± 0,93	3,87 ± 0,83	-0,06 ± 0,83	1,20 ± 0,61
U87-0,75 mmol VPA	6	22,40 ± 0,33	18,52 ± 1,25	3,88 ± 1,15	-0,05 ± 1,15	1,28 ± 0,71
U87-0,5 mmol VPA	6	23,49 ± 0,99	19,72 ± 1,87	3,77 ± 1,16	-0,16 ± 1,16	1,36 ± 0,70

Palyginus tirtas U87 ląstelių grupes, reikšmingų *SLC12A2* raiškos skirtumų nenustatyta – gydymas VPA neturėjo poveikio geno raiškai.

Tirtų T98G ląstelių grupių *SLC12A2* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.1 paveiksle.



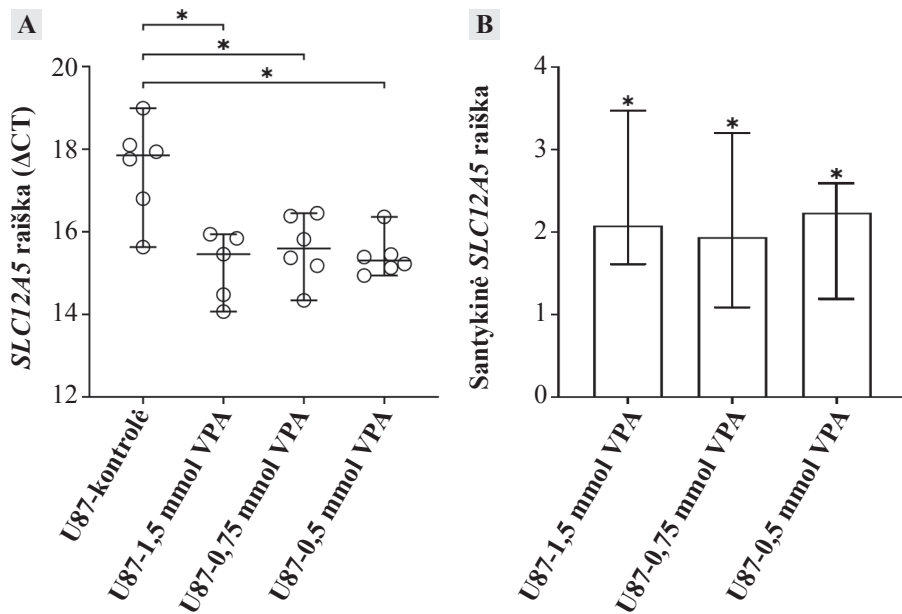
3.5.1 pav. Tirtų T98G ląstelių grupių *SLC12A2* raiška

A – tirtų T98G ląstelių grupių *SLC12A2* raiška: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; **B** – gydytų T98G ląstelių grupių santykinė *SLC12A2* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$): * $p = 0,02$, palyginus su kontrole; ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

T98G ląstelių, gydytų 0,75 mmol VPA doze, *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai didesnė nei kontrolės. T98G-0,75 mmol VPA grupės ląstelių santykinė *SLC12A2* raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo 1,71 karto didesnė nei T98G-kontrolės. T98G-0,5 mmol VPA ir T98G-1,5 mmol VPA grupių ląstelių *SLC12A2* raiška reikšmingai nesiskyrė nuo T98G-kontrolės grupės. *SLC12A2* raiška buvo didesnė T98G-1,5 mmol VPA ($p = 0,004$) ir T98G-0,75 mmol VPA ($p = 0,002$) ląstelių grupių nei T98G-0,5 mmol VPA grupės.

Palyginus U87-kontrolės ir T98G-kontrolės grupių *SLC12A2* raišką, ji buvo reikšmingai didesnė T98G ląstelių ($p = 0,002$). Gydytų 1,5 mmol ($p = 0,008$), 0,75 mmol ($p = 0,002$) ar 0,5 mmol ($p = 0,02$) VPA dozėmis ląstelių *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai didesnė T98G ląstelių grupių nei atitinkamų U87 ląstelių grupių.

Tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A5* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.2 paveiksle.



3.5.2 pav. Tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A5* raiška

A – tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A5* raiška: * $p < 0,01$; **B** – gydytų U87 ląstelių grupių santykinė *SLC12A5* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$): * $p < 0,05$, palyginus su kontrolė; ilgas horizontalus brūkšnyš – mediana, trumpas horizontalios linijos – ribos.

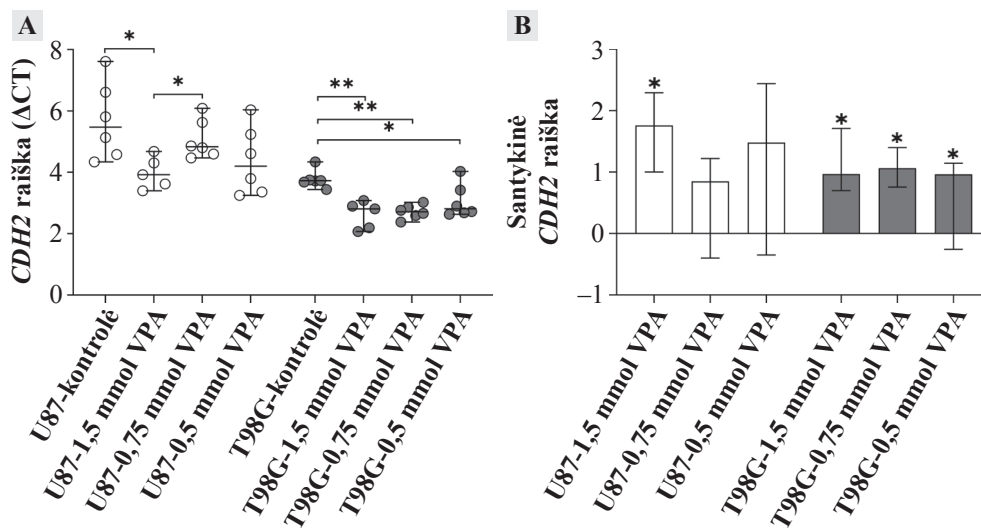
U87-kontrolės grupės *SLC12A5* raiška buvo aktyvus, o T98G-kontrolės grupės tirtu geno raiška nenustatyta. U87 ląstelių gydymas 1,5 mmol ($p = 0,002$), 0,75 mmol ($p = 0,002$) ir 0,5 mmol ($p = 0,009$) VPA dozėmis reikšmingai padidino *SLC12A5* nešiklio geno raišką. U87-1,5 mmol VPA, U87-0,75 mmol VPA ir U87-0,5 mmol VPA grupių santykinė *SLC12A5* raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo atitinkamai 5,97, 4,40 ir 4,54 karto didesnė nei kontrolės. Palyginus U87-1,5 mmol VPA, U87-0,75 mmol VPA ir U87-0,5 mmol VPA grupių ΔCT reikšmes, reikšmingo skirtumo nenustatyta.

Tirtų T98G ląstelių *SLC12A5* raiška nenustatyta, VPA gydymas poveikio nešiklį koduojančiam genui neturėjo.

CDH1 buvo neaktyvus U87 kontrolės ląstelėse ir gydymas skirtingomis VPA dozėmis nepaveikė *CDH1* raiškos (geno raiška nenustatyta).

CDH1 raiška buvo nustatyta T98G ląstelėse, gydytose 1,5 mmol ir 0,75 mmol VPA (CT vidurkis – $34,89 \pm 0,38$ ir $34,87 \pm 0,38$, ΔCT – $16,81 \pm 0,57$ ir $16,27 \pm 0,47$, atitinkamai), o T98G kontrolės ir gydytų 0,5 mmol VPA doze grupės ląstelėse *CDH1* raiška nenustatyta.

Tirtų U87 ir T98G ląstelių grupių *CDH2* raiškos duomenys yra pateikti 3.5.3 paveiksle.



3.5.3 pav. Tirtų U87 ir T98G ląstelių grupių *CDH2* raiška

A – tirtų U87 ir T98G ląstelių grupių *CDH2* raiška: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; **B** – gydytų U87 ir T98G ląstelių grupių santykinė *CDH2* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$): * $p < 0,05$, palyginus su kontrole; ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

T98G kontrolės ląstelių *CDH2* raiška buvo didesnė nei U87 kontrolės ląstelių ($p = 0,002$). Palyginus su U87-kontrolė, U87-1,5 mmol VPA grupės *CDH2* raiška buvo reikšmingai didesnė ($p = 0,02$), santykinė raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo lygi 3,41. *CDH2* raiškos skirtumų palyginus U87-kontrolės, U87-0,75 mmol VPA ir U87-0,5 mmol VPA grupes nenustatyta. U87-1,5 mmol VPA grupės ląstelių *CDH2* raiška buvo didesnė nei U87-0,75 mmol VPA grupės ląstelių ($p = 0,02$). U87 ląstelių, gydytų 1,5 mmol ir 0,5 mmol VPA dozėmis, *CDH2* raiška nesiskyrė.

Palyginus su kontrolė, visos VPA dozės reikšmingai padidino T98G ląstelių *CDH2* raišką: santykinė T98G-1,5 mmol VPA grupės geno raiška ($2^{-\Delta\Delta CT}$) buvo 2,34 karto ($p = 0,004$), T98G-0,75 mmol grupės – 2,11 karto ($p = 0,002$) ir T98G-0,5 mmol VPA grupės – 1,73 karto ($p = 0,04$) didesnė nei kontrolės. Palyginus VPA gydytų T98G ląstelių *CDH2* raišką, skirtumų nenustatyta.

Palyginus U87 ir T98G ląstelių *CDH2* raišką nustatyta, kad T98G-1,5 mmol VPA ($p = 0,008$), T98G-0,75 mmol VPA ($p = 0,002$) ir T98G-0,5 mmol VPA ($p = 0,04$) grupių ląstelių raiška buvo didesnė nei atitinkamų U87 ląstelių grupių.

3.6. MgDCA, VPA–MgDCA ir TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelėms *in vitro* vertinimas

U87-kontrolės, U87-1,5 mmol MgDCA, U87-0,75 mmol MgDCA ir U87-50 μ mol TMZ grupių *SLC5A8* raiška nenustatyta. U87 ląstelių gydymas deriniais suaktyvino *SLC5A8* raišką: 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA (CT vidurkis – $32,80 \pm 0,24$, ΔCT – $17,23 \pm 0,16$) ir 0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA (CT vidurkis – $33,52 \pm 0,52$, ΔCT – $17,72 \pm 0,25$).

Tirtų T98G kontrolės ląstelių *SLC5A8* raiška nenustatyta. T98G ląstelių gydymas skirtingomis VPA–MgDCA dozėmis ar TMZ poveikio *SLC5A8* neturėjo – genas buvo neaktyvus.

Tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.6.1 lentelėje.

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

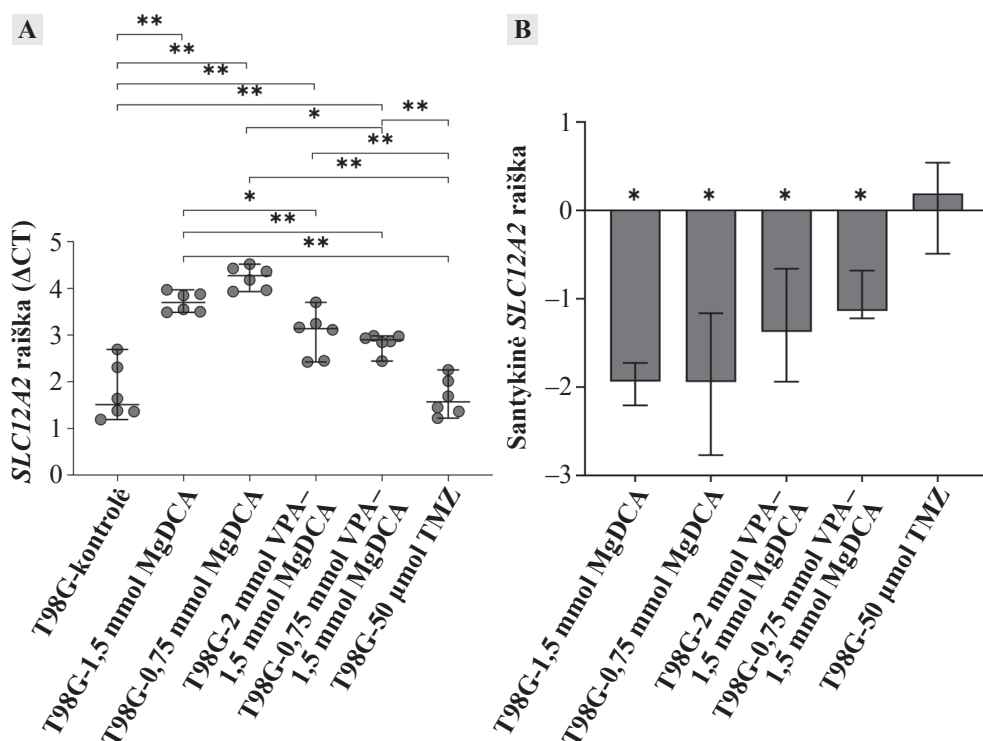
Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis \pm SN				
		CT		ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-kontrolė	6	22,07 \pm 1,23	18,14 \pm 1,41	3,93 \pm 0,64	0,00 \pm 0,64	1,08 \pm 0,46
U87-1,5 mmol MgDCA	6	22,74 \pm 0,71	18,64 \pm 1,25	4,10 \pm 0,60	0,18 \pm 0,60	0,94 \pm 0,31

3.6.1 lentelės tęsinys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-0,75 mmol MgDCA	6	22,83 ± 0,74	18,70 ± 1,65	4,13 ± 1,00	0,20 ± 1,00	1,04 ± 0,60
U87-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	22,33 ± 0,33	17,98 ± 0,50	4,36 ± 0,33	0,43 ± 0,33	0,76 ± 0,18
U87-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	22,46 ± 0,58	18,23 ± 0,70	4,23 ± 0,25	0,30 ± 0,25	0,82 ± 0,14
U87-50 μmol TMZ	6	21,67 ± 0,18	17,20 ± 0,19	4,46 ± 0,30	0,53 ± 0,30	0,70 ± 0,14

Palyginus su U87-kontrolė, visų tirtų U87 ląstelių grupių, gydytų tiriamaisiais vaistiniais preparatais, *SLC12A2* raiška nesiskyrė.

Tirtų T98G ląstelių grupių *SLC12A2* raiškas yra pateikta 3.6.1 paveiksle.



3.6.1 pav. Tirtų T98G ląstelių grupių *SLC12A2* raiška

A – tirtų T98G ląstelių *SLC12A2* raiška: * $p = 0,02$, ** $p < 0,01$; **B** – gydytų T98G ląstelių grupių santykinė *SLC12A2* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$): * $p < 0,05$, palyginus su kontrolė; ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

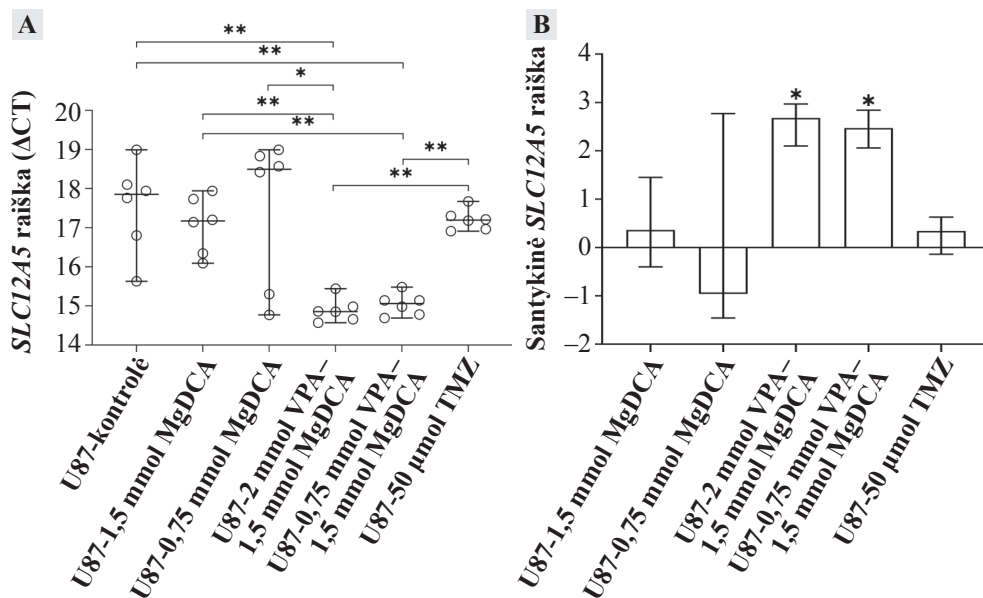
Palyginus su T98G-kontrolė, T98G-1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$) ir T98G-0,75 mmol MgDCA ($p = 0,002$) ląstelių grupių *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai mažesnė. Palyginus MgDCA gydytas T98G ląstelių grupes, *SLC12A2* raiškos skirtumų nenustatyta.

T98G-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,009$) ir T98G-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,004$) ląstelių grupių *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai mažesnė nei kontrolės. *SLC12A2* raiškos skirtumo palyginus skirtingais dviem deriniais gydytas T98G ląstelių grupes, nenustatyta. Palyginus su T98G-1,5 mmol MgDCA, *SLC12A2* raiška T98G-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir T98G-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$) ląstelių grupių buvo reikšmingai didesnė. T98G-0,75 mmol MgDCA ląstelių grupės *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai mažesnė už T98G-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ląstelių grupės.

T98G-50 μ mol TMZ ląstelių grupės *SLC12A2* raiška nesiskyrė nuo kontrolės. Palyginus su T98G-50 μ mol TMZ ląstelių grupe, *SLC12A2* raiška T98G-1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$), T98G-0,75 mmol MgDCA ($p = 0,002$), T98G-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$) ir T98G-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$) ląstelių grupėse buvo reikšmingai mažesnė.

T98G-kontrolės grupės ląstelių *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai didesnė už U87-kontrolės ląstelių ($p = 0,002$). Tirtų T98G ląstelių grupių *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai didesnė nei atitinkamai tirtų U87 ląstelių: U87-50 μ mol TMZ ($p = 0,002$), U87-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$) ir U87-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$) grupių.

Tirtų U87 ląstelių grupių *SLC12A5* raiška yra pateikta 3.6.2 paveiksle.



3.6.2 pav. Tirtų U87 grupių *SLC12A5* raiška

A – tirtų U87 ląstelių *SLC12A5* raiška: * $p = 0,04$, ** $p = 0,002$; **B** – gydytų U87 ląstelių grupių santykinė *CDH2* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$): * $p = 0,002$, palyginus su kontrole; ilgas horizontalus brūkšnys – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos

U87-1,5 mmol MgDCA ir U87-0,75 mmol MgDCA ląstelių grupių *SLC12A5* raiška nesiskyrė nuo kontrolės. U87 ląstelių gydymas deriniais reikšmingai padidino *SLC12A5* raišką. Palyginus deriniais gydytas U87 ląstelių grupes, reikšmingų skirtumų nenustatyta. MgDCA gydytų U87 ląstelių grupių raiška buvo reikšmingai mažesnė nei deriniais gydytų ląstelių grupių.

U87 ląstelių gydymas TMZ reikšmingo poveikio *SLC12A5* raiškai neturėjo. Palyginus su U87-50 μmol TMZ, *SLC12A5* raiška buvo reikšmingai didesnė U87-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir U87-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ląstelių grupių. TMZ ir skirtingomis MgDCA dozėmis gydytų grupių raiška nesiskyrė.

Tirtų T98G kontrolės ir gydytos skirtingomis MgDCA dozėmis, 0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir TMZ ląstelės *SLC12A5* raiškos neturėjo. Aktyvi *SLC12A5* raiška nustatyta tik T98G-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA grupės ląstelėse (CT vidurkis – $34,82 \pm 1,21$, ΔCT – $17,89 \pm 1,03$).

SLC12A5 raiška buvo nustatyta U87-kontrolės, U87-1,5 mmol MgDCA, U87-0,75 mmol MgDCA, U87-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir U87-50 μmol TMZ ląstelių grupių, o atitinkamų T98G ląstelių grupės raiškos neturėjo. Palyginus gydytų U87-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ląstelių

grupių *SLC12A5* raišką su atitinkamomis T98G ląstelėmis, reikšmingai mažesnė raiška buvo nustatyta T98G ląstelėse ($p = 0,004$).

U87-kontrolės, U87-1,5 mmol MgDCA, U87-0,75 mmol MgDCA, U87-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir U87-50 μ mol TMZ grupių ląstelių *CDH1* raiška nenustatyta. Gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA suaktyvino *CDH1* raišką U87 ląstelėse (CT vidurkis – $34,82 \pm 0,64$, Δ CT – $19,24 \pm 0,62$).

CDH1 raiška nenustatyta T98G kontrolės ląstelių ir ląstelių, gydytų skirtingomis MgDCA, derinio dozėmis ar TMZ.

Tirtų U87 ląstelių grupių *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys yra pateikti 3.6.2 lentelėje.

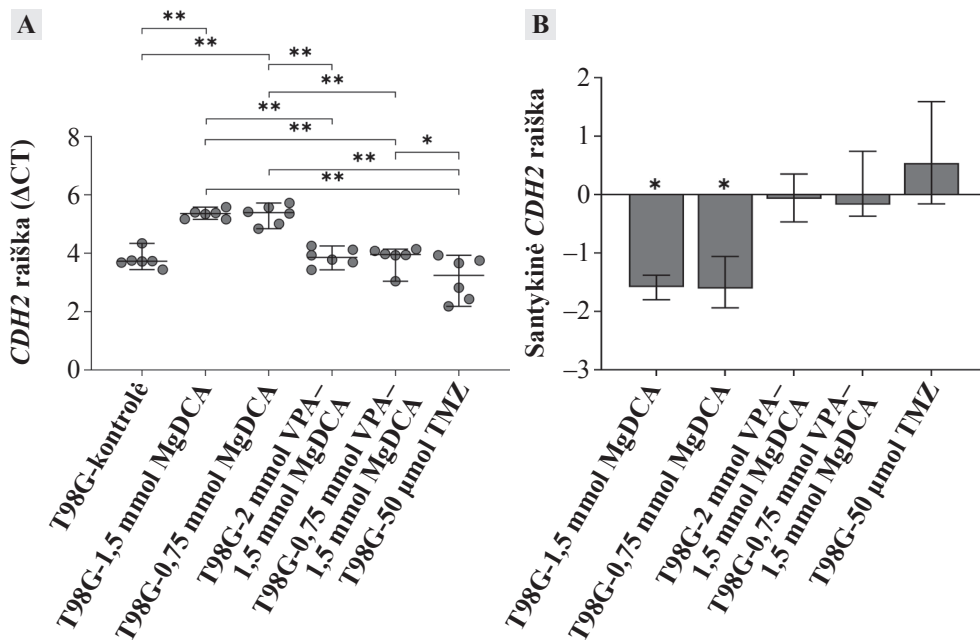
3.6.2 lentelė. Tirtų U87 ląstelių grupių *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis \pm SN				
		CT		Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
		<i>CDH2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87-kontrolė	6	$23,82 \pm 0,72$	$18,14 \pm 1,41$	$5,68 \pm 1,26$	$0,00 \pm 1,26$	$1,01 \pm 0,82$
U87-1,5 mmol MgDCA	6	$24,01 \pm 1,16$	$18,64 \pm 1,25$	$5,37 \pm 0,14^a$	$-0,31 \pm 0,14$	$1,24 \pm 0,11$
U87-0,75 mmol MgDCA	6	$23,44 \pm 1,38$	$18,70 \pm 1,65$	$4,74 \pm 0,41$	$-0,95 \pm 0,41$	$1,99 \pm 0,46$
U87-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	$23,40 \pm 0,67$	$17,98 \pm 0,50$	$5,42 \pm 0,40^b$	$-0,26 \pm 0,40$	$1,23 \pm 0,30$
U87-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	$23,34 \pm 0,75$	$18,23 \pm 0,70$	$5,12 \pm 0,26$	$-0,56 \pm 0,26$	$1,50 \pm 0,25$
U87-50 μ mol TMZ	6	$22,52 \pm 0,12$	$17,20 \pm 0,19$	$5,32 \pm 0,28^c$	$-0,37 \pm 0,28$	$1,31 \pm 0,22$

^a $p = 0,03$, palyginus su U87-0,75 mmol MgDCA; ^b $p = 0,03$, palyginus su U87-0,75 mmol MgDCA; ^c $p = 0,03$, palyginus su U87-0,75 mmol MgDCA.

Palyginus U87 kontrolės ląstelių *CDH2* raišką su gydytų grupių ląstelių raiška, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. U87-0,75 mmol MgDCA grupės ląstelių raiška buvo reikšmingai didesnė nei U87-1,5 mmol MgDCA, U87-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir U87-50 μ mol TMZ grupių ląstelių. Palyginus deriniais gydytas grupes, *CDH2* raiškos skirtumų nenustatyta.

T98G ląstelių grupių *CDH2* raiškos duomenys yra pateikti 3.6.3 paveiksle.



3.6.3 pav. Tirtų T98G ląstelių grupių *CDH2* raiška

A – tirtų T98G ląstelių *CDH2* raiška: * $p = 0,04$, ** $p = 0,002$; **B** – gydytų T98G ląstelių grupių santykinė *CDH2* raiška ($\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$): * $p < 0,05$, palyginus su kontrole; ilgas horizontalus brūkšny – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

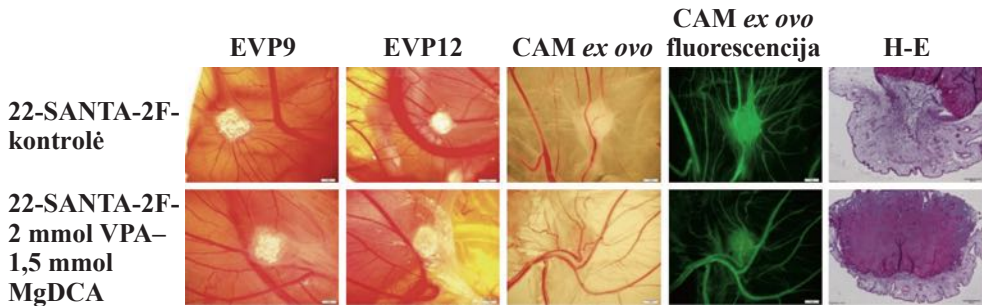
T98G-kontrolės grupės *CDH2* raiška buvo reikšmingai didesnė nei T98G-1,5 mmol MgDCA ir T98G-0,75 mmol MgDCA grupių, santykinė geno ($2^{-\Delta\Delta CT}$) raiška buvo lygi 0,34 ir 0,35, atitinkamai. Palyginus su kontrole, T98G ląstelių gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA, 0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ar 50 μmol TMZ dozėmis poveikio *CDH2* raiškai neturėjo. Gydytų MgDCA ląstelių grupių *CDH2* raiška buvo reikšmingai mažesnė nei T98G ląstelių, gydytų 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA, 0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir 50 μmol TMZ dozėmis. Palyginus deriniais gydytas grupes, *CDH2* raiškos skirtumų nenustatyta. T98G-50 μmol TMZ grupės *CDH2* raiška buvo reikšmingai didesnė nei T98G-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ląstelių grupės.

Palyginus tirtų U87 ir T98G grupių *CDH2* raišką, U87-kontrolės ($p = 0,002$), U87-0,75 mmol MgDCA ($p = 0,03$), U87-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$), U87-0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ($p = 0,002$) ir U87-50 μmol TMZ ($p = 0,002$) ląstelių grupių raiška buvo mažesnė nei atitinkamų T98G ląstelių grupių.

3.7. VPA–MgDCA poveikio paciento pirminių glioblastomos 22-SANTA-2F ląstelių navikui ant CAM ir *in vitro* tyrimo rezultatai

3.7.1. Pirminių glioblastomos ląstelių navikų invazijos į CAM dažnio, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus po naviku vertinimas

48 metų GBM pacientės (galvos smegenų GBM, G4 pagal PSO) tirtu 22-SANTA-2F naviko grupių ant CAM biomikroskopijos EVP9 ir EVP12 vaizdai, naviko *ex ovo* su CAM, naviko fluorescencijos ir histologiniai H-E vaizdai yra pateikti 3.7.1.1 paveiksle.



3.7.1.1 pav. Tirtu 22-SANTA-2F naviko grupių ant CAM biomikroskopijos *in vivo*, iškirptos CAM su naviku *ex ovo*, naviko fluorescencijos ir H-E histologijos nuotraukos

EVP9, EVP12, CAM *ex ovo* skalė – 1 mm, H-E – 200 μ m.

Palyginus su EVP9 kontrolės naviku, EVP12 22-SANTA-2F-kontrolės navikas yra invazavęs į CAM mezenchimą, H-E nuotraukoje matomas suardytas choriono epitelio vientisumas ir naviko invazija į CAM mezenchimą, po naviku CAM sustorėjusi, joje gausu kraujagyslių. EVP12 kontrolės *ex ovo* nuotraukoje matyti išreikštas kraujagyslių tinklas („stipininis ratas“), kuris aiškiai matomas po fluorescuojančio dekstrano sušvirkštimo į CAM kraujagyslę. Palyginus EVP9 22-SANTA-2F-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA naviką su EVP12, naviko dydis išliko panašus. Palyginus EVP12 *ex ovo* kontrolės naviką su 22-SANTA-2F naviku gydytu 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA, matyti, kad gydymas slopino naviko augimą ir kraujagyslių tinklo formavimąsi apie naviką. 22-SANTA-2F-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA naviko H-E nuotraukoje matyti, kad choriono epitelis nepažeistas ir navikas auga ant CAM paviršiaus.

22-SANTA-2F naviko tirtų grupių invazijos į CAM dažnio, CAM storio ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku histomorfometrinių duomenų yra pateikti 3.7.1.1 lentelėje.

3.7.1.1 lentelė. 22-SANTA-2F naviko invazijos į CAM dažnis, CAM storis ir kraujagyslių skaičiaus CAM po naviku duomenys

Tirtos grupės	n	Invazija (proc.)	CAM storis (μm)	Kraujagyslių skaičius
			mediana (ribos)	
22-SANTA-2F-kontrolė	16	75,00	201,80 (47,32–677,70)	21,5 (7–65)
22-SANTA-2F-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	33,33	157,40 (89,75–225,20)	20,5 (13–23)

Gydymas neturėjo poveikio 22-SANTA-2F paciento navikų invazijos dažniui į CAM, CAM storiui po naviku ir kraujagyslių skaičiui.

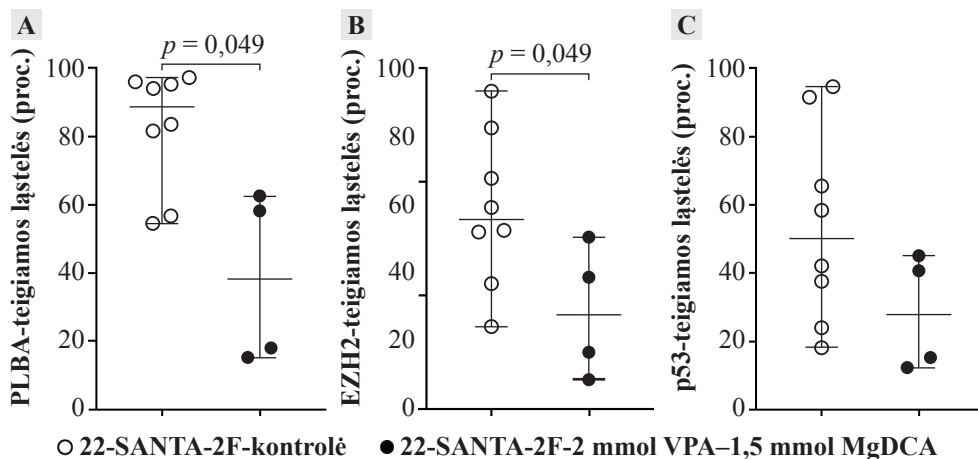
3.7.2. 22-SANTA-2F naviko ant CAM PLBA, EZH2 ir p53 raiškos vertinimas

Tirto 22-SANTA-2F naviko grupių PLBA, EZH2 ir p53 raiškos duomenys yra pateikti 3.7.2.1 lentelėje ir 3.7.2.1 paveiksle.

3.7.2.1 lentelė. Tirto 22-SANTA-2F naviko PLBA-, EZH2- ir p53-teigiamų ląstelių raiškos navike duomenys

Tirtos grupės	Rodiklis, proc. (mediana (ribos))					
	n	PLBA-teigiamos ląstelės	n	EZH2-teigiamos ląstelės	n	p53-teigiamos ląstelės
22-SANTA-2F-kontrolė	8	88,88 (54,60–97,30)	8	73,48 (54,52–96,08)	8	50,13 (18,23–94,54)
22-SANTA-2F-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	4	38,24 (15,22–62,54) ^a	4	56,61 (45,20–70,30) ^b	4	27,90 (12,20–45,06)

^a $p = 0,049$, palyginus su 22-SANTA-2F-kontrolė; ^b $p = 0,049$, palyginus su 22-SANTA-2F-kontrolė.



3.7.2.1 pav. Tirta 22-SANTA-2F naviko ląstelių vėžio žymenų raiška

A – PLBA-teigiamų ląstelių raiška; **B** – EZH2-teigiamų ląstelių raiška; **C** – p53-teigiamų ląstelių raiška. Ilgas horizontalus brūkšnys – mediana, trumpos horizontalios linijos – ribos.

Palyginus su 22-SANTA-2F-kontrolė, gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA doze reikšmingai sumažino PLBA- ir EZH2-teigiamų ląstelių skaičių 22-SANTA-2F navikuose, bet neturėjo reikšmingo poveikio p53 raiškai (matoma žymens raiškos sumažėjimo tendencija).

3.7.3. 22-SANTA-2F ląstelių *SLC12A2*, *SLC5A8*, *SLC12A5*, *CDH1*, *CDH2* ir *GAPDH* raiškos *in vitro* vertinimas

22-SANTA-2F kontrolės ląstelės neturėjo aktyvių *SLC5A8*, *SLC12A5* ir *CDH1* bei gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA neturėjo poveikio šių genų raiškai (raiška nenustatyta).

22-SANTA-2F ląstelių *SLC12A2*, *CDH2* ir *GAPDH* genų raiškos duomenys yra pateikti 3.7.3.1 lentelėje.

3.7.3.1 lentelė. 22-SANTA-2F ląstelių tirtų grupių *SLC12A2*, *CDH2* ir *GAPDH* raiškos duomenys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
22-SANTA-2F-kontrolė	6	27,42 ± 0,73	27,15 ± 0,47	0,27 ± 0,96	0,00 ± 0,96	1,09 ± 0,78
22-SANTA-2F-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	29,68 ± 1,11	27,06 ± 3,86	2,62 ± 2,86	2,36 ± 2,86	0,65 ± 0,78

3.7.3.1 lentelės tęsinys

Tirtos grupės	n	Rodiklis, vidurkis ± SN				
		CT		ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
		CDH2	GAPDH			
22-SANTA-2F-kontrolė	6	25,28 ± 0,22	27,15 ± 0,47	-1,87 ± 0,48	0,00 ± 0,48	1,05 ± 0,37
22-SANTA-2F-2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA	6	27,79 ± 0,80	27,06 ± 3,86	0,73 ± 3,08	2,60 ± 3,08	0,60 ± 0,67

Gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA doze neturėjo reikšmingo poveikio 22-SANTA-2F paciento ląstelių *SLC12A2* ir *CDH2* raiškai.

3.8. VPA–MgDCA poveikio pirminių glioblastomos ląstelių genų, susijusių su apoptozės indukcija (proapoptozinis poveikis), raiškai vertinimas: sekoskaitos tyrimo duomenys

Paciento 22-SANTA-4F ląstelių RNR sekoskaitos duomenų analizės metu buvo išrinktas 81 su proapoptoze susijęs genas. Palyginus su 22-SANTA-4F ląstelių kontrole, po gydymo VPA–MgDCA nustatyti 33 genų raiškos reikšmingi pokyčiai, siejami su proapoptoze (3.8.1 lentelė ir 3.8.1 paveikslas).

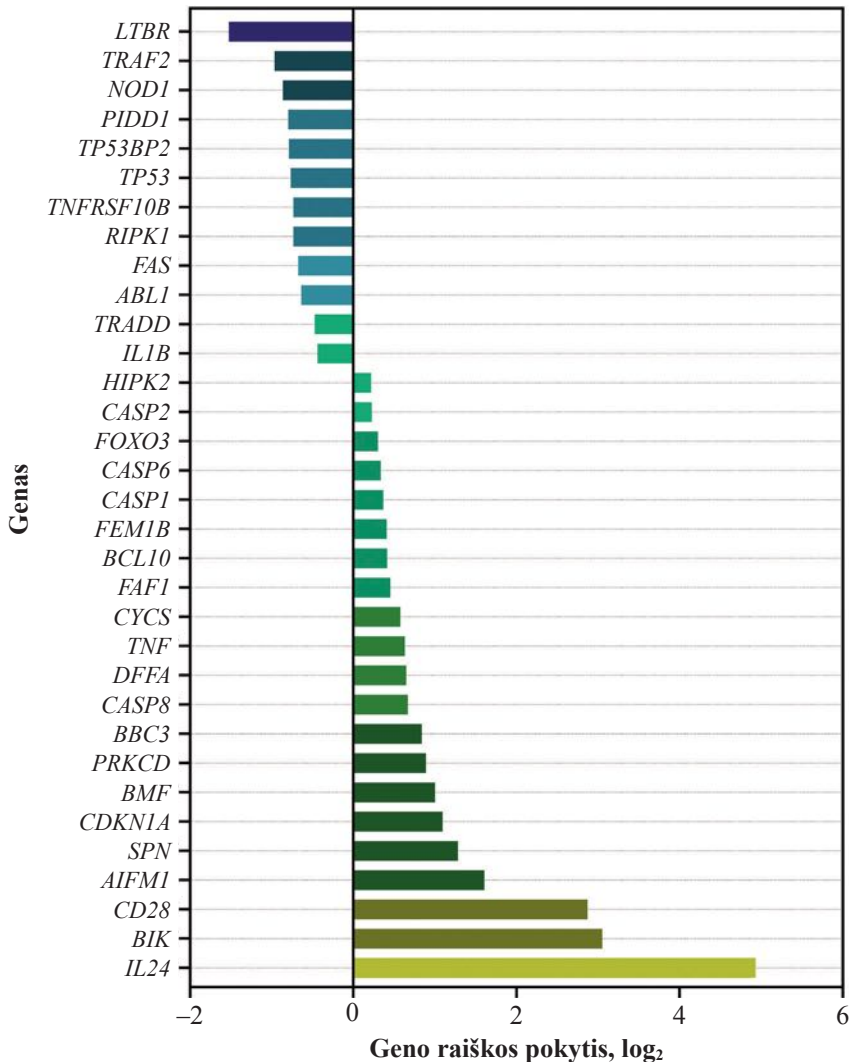
3.8.1 lentelė. 22-SANTA-4F ląstelių kontrolės ir gydytų 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA su proapoptoze susijusių genų sekoskaitos tyrimo duomenys

Genas	Raiška (log ₂ vidurkis)		Geno raiškos pokytis, log ₂	Raiškos pokytis	p reikšmė
	kontrolė	gydytos			
<i>ABL1</i>	11,76	11,14	-0,64	↓	9,68 × 10 ⁻⁷
<i>AIFM1</i>	10,95	12,56	1,61	↑	6,39 × 10 ⁻⁴³
<i>BBC3</i>	11,23	12,06	0,84	↑	3,39 × 10 ⁻¹¹
<i>BCL10</i>	10,54	10,96	0,42	↑	0,01
<i>BIK</i>	4,60	7,82	3,05	↑	1,78 × 10 ⁻⁷
<i>BMF</i>	9,49	10,46	1,00	↑	2,06 × 10 ⁻⁸
<i>CASP1</i>	11,03	11,40	0,37	↑	0,008
<i>CASP2</i>	11,89	12,12	0,23	↑	0,02
<i>CASP6</i>	10,94	11,27	0,34	↑	0,005
<i>CASP8</i>	10,21	10,92	0,67	↑	0,0003
<i>CD28</i>	3,85	6,26	2,87	↑	0,006

3.8.1 lentelės tęsinys

Genas	Raiška (\log_2 vidurkis)		Geno raiškos pokytis, \log_2	Raiškos pokytis	<i>p</i> reikšmė
	kontrolė	gydytos			
<i>CDKN1A</i>	14,04	15,12	1,09	↑	$3,20 \times 10^{-24}$
<i>CYCS</i>	15,16	14,74	0,58	↑	$7,32 \times 10^{-8}$
<i>DFFA</i>	11,72	12,37	0,65	↑	$9,12 \times 10^{-9}$
<i>FAF1</i>	12,24	12,70	0,46	↑	$2,14 \times 10^{-6}$
<i>FAS</i>	11,03	10,37	-0,67	↓	$2,00 \times 10^{-6}$
<i>FEM1B</i>	12,52	12,94	0,41	↑	$9,36 \times 10^{-5}$
<i>FOXO3</i>	13,76	14,01	0,30	↑	$2,63 \times 10^{-5}$
<i>HIPK2</i>	12,42	12,63	0,22	↑	0,046
<i>IL1B</i>	12,79	12,36	-0,44	↓	$1,77 \times 10^{-6}$
<i>IL24</i>	2,39	5,81	4,93	↑	0,002
<i>LTBR</i>	9,73	8,21	-1,52	↓	0,0004
<i>NOD1</i>	8,44	7,61	-0,86	↓	0,01
<i>PIDD1</i>	8,75	7,96	-0,80	↓	0,02
<i>PRKCD</i>	9,84	9,42	0,89	↑	0,02
<i>RIPK1</i>	11,83	11,10	-0,73	↓	$2,15 \times 10^{-6}$
<i>SPN</i>	7,20	8,38	1,28	↑	0,001
<i>TNF</i>	12,65	13,27	0,63	↑	$2,76 \times 10^{-5}$
<i>TNFRSF10B</i>	11,73	10,99	-0,73	↓	$8,38 \times 10^{-10}$
<i>TP53</i>	12,11	11,34	-0,76	↓	$2,43 \times 10^{-9}$
<i>TP53BP2</i>	11,26	10,48	-0,79	↓	$7,53 \times 10^{-10}$
<i>TRADD</i>	9,46	9,00	-0,47	↓	0,047
<i>TRAF2</i>	8,39	7,45	-0,97	↓	0,03

↑ – geno raiška po gydymo reikšmingai padidėjusi; ↓ – geno raiška po gydymo reikšmingai sumažėjusi.



3.8.1 pav. VPA–MgDCA gydymo poveikio 22-SANTA-4F ląstelių su proapoptoze susijusių genų raiškai

Raiškos pokyčio log₂ duomenys su proapoptoze susijusių genų, kurių raiška po gydymo VPA–MgDCA buvo reikšmingai slopinta arba buvo reikšmingai padidėjusi.

Paciento 22-SANTA-4F ląstelių 21 geno (*HIPK2*, *CASP2*, *FOXO3*, *CASP6*, *CASP1*, *FEM1B*, *BCL10*, *FAF1*, *CYCS*, *TNF*, *DFFA*, *CASP8*, *BBC3*, *PRKCD*, *BMF*, *CDKN1A*, *SPN*, *AIFM1*, *CD28*, *BIK*, *IL24*) raiška buvo reikšmingai padidėjusi. VPA–MgDCA gydymas reikšmingai sumažino 22-SANTA-4F ląstelių 12 genų raišką (*LTBR*, *TRAF2*, *NOD1*, *PIDD1*, *TP53BP2*, *TP53*, *TNFRSF10B*, *RIPK1*, *FAS*, *ABL1*, *TRADD*, *IL1B*).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Iki šiol veiksmingo GBM gydymo nėra [330, 331]. Siekiant pagerinti GBM gydymo sėkmę yra svarbūs tyrimai, kurie leistų nustatyti individualų naviko jautrumą gydymui, o gydymo veiksmingumas turėtų būti nustatomas ikiklinikiniais tyrimais prieš pradedant chemoterapiją [330, 332]. Biomolekulinių kelių tyrimai gali padėti numatyti GBM ląstelių ir jų navikų prigimties ryšį su gydymo veiksmingumu [24, 333]. Naviko rezistentiškumas gydymui yra siejamas su sutrikusia mitochondrijų funkcija; šių funkcijų atstatymas gali būti vienas iš vėžio gydymo būdų [334]. Veiksmingo gydymo paieška, vaistų veikimo mechanizmų tyrimai, pagrįsti vėžio žymenų, naviko ląstelių genų analize, veiksmingo gydymo svarbių kancerogenezės molekulinė kelių išaiškinimas ir tuo pagrindu naujų vaistų kūrimas racionaliai projektuojant vaistus ar žinomų vaistų derinius gydymui yra svarbūs [335]. Kancerogenezė yra neatsiejama nuo uždegimo, koreliuojančio su naviko piktybiškumu ir prognoze. Dėl to svarbūs gydymo uždaviniai yra kurti daugiataksles terapines strategijas, kurios taip pat padėtų nutraukti GBM naviką palaikančios uždegimo aplinkos veikimą ir slopinti prouždegiminių-pronavikinių imuninių ląstelių aktyvumą [32].

Žmogaus ir žinduolių užkrūčio liauka (čiobrialiaukė) yra pirminis limfoidinis organas, gaminantis prouždegiminius mediatorius net fiziologinėmis sąlygomis [336, 337]. Todėl čiobrialiaukės audinys turi pastovų mikroaplinkos toninio uždegimo foną, kuris svarbus imuninių ląstelių formavimuisi. Čiobrialiaukė gali būti naudojama kaip modelis tiriamų vaistų poveikio prieš uždegiminių ir su uždegimu bei imuniniu atsaku susijusių genų raiškos pokyčiams timocituose tirti. Čiobrialiaukėje T limfocitai bręsta ir diferencijuojasi vykstant imuniniam atsakui. Liauka yra atsakinga už T limfocitų formavimąsi ir jos pokyčiai ypač jautriai reaguoja į uždegimo, infekcijos bei vėžinius procesus [91, 291]. Mūsų tyrimas apima tiriamų vaistinių preparatų poveikio gyvūnų čiobrialiaukei, timocitams ir GBM ląstelėms bei jų navikams ant CAM tyrimus, kurie lyginami su TMZ poveikiu.

4.1. Gydymo VPA–NaDCA ar VPA poveikis žiurkėms, čiobrialiaukei, timocitams

Vienos paros ir 28 parų VPA–NaDCA gydymo poveikis žiurkėms. Atliekant vaistų tyrimus, ne mažiau svarbu nustatyti tiriamo vaistinio preparato poveikį gyvūno kūno ir čiobrialiaukės masei bei liaukos struktūriniam pokyčiams. Mūsų tyrimų duomenys rodo, kad 28 parų gydymas 150 mg/kg/parai VPA ir 100 mg/kg/parai NaDCA deriniu 5–6 savaitių

amžiaus Wistar patinų ir patelių žiurkių kūno masei poveikio neturėjo. Stakišaičio D. ir kt. atlikti tyrimai taip pat neparodė dvi savaites gydytų 6–7 savaičių amžiaus Balb/c pelių patinų tokia pat derinio paros doze poveikio gyvūnų kūno masei [223]. Stanevičiūtė J. ir kt. nustatė, kad po keturių savaičių 200 mg/kg/parai NaDCA monoterapijos 9–10 savaičių amžiaus intaktinių patinų kūno masė reikšmingai sumažėjo [201]; taip pat ši mokslininkų grupė nustatė, kad keturių savaičių gydymas, pradėtas ta pačia NaDCA doze iki lytinio brendimo, 5 savaičių amžiaus intaktinių patinų kūno masę reikšmingai sumažino [199]. Kito tyrimo metu keturių savaičių gydymas 200 mg/kg/parai NaDCA doze 4–5 savaičių amžiaus intaktinių patinų ir patelių žiurkių poveikio kūno masei neturėjo, bet keturias savaites tokia pat NaDCA doze parai gydytų 4–5 savaičių amžiaus abiejų lyčių kastruotų žiurkių kūno masė sumažėjo [200]. Valančiūtės A. ir kt. tyrimas parodė, kad ilgalaikis gydymas 300 mg/kg/parai VPA doze 8 savaičių amžiaus Wistar abiejų lyčių intaktinių ir kastruotų žiurkių gyvūno kūno masei poveikio neturėjo [221]. Analizuojant literatūroje esančius duomenis, matyti, kad DCA, VPA poveikis žiurkių kūno masei, diurezei, jonų išsiskyrimui su šlapimu ir čiobrialiaukei priklauso ne tik nuo vaistinio preparato dozės, gydymo trukmės, bet ir nuo lyties bei pradėto gydymo – ar jis gyvūnams pradėtas iki lytinio brendimo ar lytiškai subrendusiems, taip pat yra nustatomi poveikio skirtumai kastruotiems gyvūnams.

Mūsų tyrime keturių savaičių gydymas VPA–NaDCA deriniu reikšmingai padidino 5–6 savaičių amžiaus patinų ir patelių inksto masę. Stanevičiūtės J. ir kt. tyrimas parodė, kad keturias savaites taikyta 200 mg/kg/parai NaDCA monoterapija poveikio 5–6 savaičių amžiaus intaktinių žiurkių patinų inksto masei neturėjo [201].

Nustatėme, kad vienos paros gydymas VPA–NaDCA abiejų lyčių žiurkių pirmos paros diurezei ir K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} išsiskyrimui su paros šlapimu poveikio neturėjo. Keturių savaičių gydymas deriniu lėmė reikšmingai padidėjusią patinų paros diurezę ir K^+ , Na^+ , Cl^- išsiskyrimą su paros šlapimu, bet tai nebūdinga patelėms. Keturių savaičių gydymas VPA–NaDCA padidino patelių Mg^{2+} kiekio išsiskyrimą paros šlapime, bet tai nebūdinga patinams.

Stanevičiūtė J. ir kt. nustatė, kad viena 200 mg/kg/parai NaDCA dozė reikšmingai padidino žiurkių patinų paros diurezę ir Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} išsiskyrimą su paros šlapimu, o 28 parų gydymas šia doze poveikio diurezei neturėjo, bet padidino Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} išsiskyrimą su paros šlapimu [201]. Kitų tyrimai parodė, kad gydymas viena 300 mg/kg/parai VPA doze lytiškai subrendusių 13–14 savaičių amžiaus Wistar žiurkių skatina abiejų lyčių paros diurezę ir Cl^- , K^+ išsiskyrimą su paros šlapimu [338]. Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} yra reabsorbuojami inkstų šerdinės dalies TAL epitelio citų Henlės kilpoje.

Poveikis šlapimo vienvalenčių ir divalenčių jonų išsiskyrimui siejamas su NKCC2 nešiklio inhibicija žiurkių inkstuose [339, 340]. Didesnis NKCC2 aktyvumas yra nustatomas žiurkių patinų inkstuose nei patelių [341]. Žiurkių su lytimi susijęs vaistų diurezinis poveikis gali būti sietinas ir su didesniu patinų kūno vandens kiekiu [342].

Mūsų tyrimas rodo, kad ilgalaikis gydymas VPA–NaDCA reikšmingai sumažino gliukozės koncentraciją patinų ir patelių kraujo serume. Qin H. ir kt. nustatė, kad DCA padidino gliukozės panaudojimą ir sumažino pieno rūgšties susidarymą vėžinėse ląstelėse [343]. Stacpoole P. ir kt. tyrimas parodė, kad diabetu sergančių žiurkių dviejų savaičių gydymas 100 mg/kg/parai DCA sumažino gliukozės kiekį kraujo serume ir pakeitė riebalų rūgščių metabolizmą [344, 345]; Avery L. ir kt. nustatė, kad 8–9 savaičių amžiaus ob/ob pelių gydymas dvi savaites 0,26 proc. VPA koncentracijos tirpalu sumažino gliukozės kiekį kraujyje, riebalų kaupimąsi riebaliniame audinyje bei kepenyse [346]. VPA inhibuoja I ir IIa klasių HDAC, kurios yra susijusios su gliukoneogenezės ir insulino gamybos mechanizmais [347]. Tiriamų vaistinių preparatų poveikis, mažinantis gliukozės kiekį kraujo serume, yra svarbus slopinant uždegimą, nes prouždegimės imuninės ląstelės daugiausia energijos pagamina iš aerobinės glikolizės [348, 349].

Ilgalaikis gydymas VPA–NaDCA sumažino testosterono koncentraciją mūsų tirtų patinų kraujo serume. Alsemeh A. ir kt. nustatė, kad aštuonių savaičių amžiaus žiurkių aštuonių dienų gydymas 100, 300 ar 500 mg/kg VPA sumažino kraujo testosterono koncentraciją, spermą kokybę, sėklidžių masę, padidino sėklidės audinių pažaidas, o poveikis buvo priklausomas nuo dozės [350]. Didelės DCA dozės pasižymi toksišku poveikiu sėklidės audiniams taip pat [126]; dėl Leidigo ląstelių degeneracijos sumažėja testosterono gamyba [163]. Cirkuliuojantis testosterono kiekis yra susijęs su GBM prognoze, nes pacientų, kuriems trūksta androgenų, prognozė yra geresnė nei tų, kurių androgenų kiekis normalus [351]. Žiurkių čiobrialiaukės involiucija (atrofija) turi įtakos T limfocitų susidarymui ir migracijai į periferinius organus, taip paveikia T limfocitų įvairovę organizme. Tačiau mechanizmai, lemiantys čiobrialiaukės atrofiją, nėra iki galo išaiškinti. Chirurginė kastracija reikšmingai sumažino apoptozę bei padidino CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ ir CD4⁻CD8⁺ timocitų išgyvenamumą. Chirurginiu būdu kastruotoms žiurkėms skyrus testosterono, timocitų proliferacija išliko nepakitusi, tačiau CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ ir CD4⁻CD8⁺ timocitų apoptozė reikšmingai padidėjo. Kastruotoms žiurkėms čiobrialiaukės atsakas į kortikosteroną reikšmingai sumažėjo, o gliukokortikoidų receptorių signalinio kelio blokavimas reikšmingai sumažino timocitų apoptozę. Taigi testosteronas reguliuoja čiobrialiaukės persitvarkymą darydamas įtaką kortikosterono sintezei timocituose, kuri skatina timocitų apoptozę [352]. Šie tyrimai rodo kaip svarbu nustatyti

tiriamų vaistinių preparatų poveikį čiobrialiaukės masei, jos struktūrai, timocitams ir galimą poveikį imuniniam atsakui.

Čiobrialiaukės atrofija ir su ja susijęs liaukos žievinės ir šerdinės dalių santykio sumažėjimas gali būti naudingas kaip kiekybinis objektyvus parametras, t. y. netiesioginis žymuo vertinant vaistinio preparato poveikį [353]. Liaukos šerdinėje dalyje yra randama unikali struktūra, vadinama Hasalio kūneliais. HK struktūra yra galutinis Aire+ linijos diferenciacijos etapas [354, 355]. HK dydis ir skaičius mažėja vykstant liaukos involiucijai [356].

Mūsų tyrimo metu ilgalaikio derinio poveikio žiurkių patinų ir patelių timocitų ląstelių ciklui nenustatėme. Stanevičiūtės J. ir kt. tyrime pakaitomis 300 mg/kg/parai VPA ir 200 mg/kg/parai NaDCA gydant po dvi savaites 5 savaičių amžiaus žiurkių timocitų ciklui poveikio nebuvo nustatyta, o ilgalaikė 200 mg/kg/parai DCA monoterapija padidino timocitų kiekį G_2-M ciklo bei sumažino G_1-G_0 ciklo fazės metu [199].

Mūsų tyrimas neparodė derinio poveikio abiejų lyčių žiurkių čiobrialiaukės masei, liaukos žievinės ir šerdinės dalių santykiui, bet gydymas VPA–NaDCA lėmė čiobrialiaukės šerdinėje dalyje HK skaičiaus padidėjimą tik patinų grupėje.

Stakišaičio D. ir kt. tyrimas rodo, kad dviejų savaičių trukmės 6–7 savaičių amžius Balb/c pelių patinų gydymas VPA–NaDCA poveikio čiobrialiaukės masei ir HK skaičiui neturėjo [223]. Stanevičiūtės J. ir kt. tyrimai, per kuriuos 5 savaičių amžiaus žiurkėms buvo taikytas pakaitinis 300 mg/kg/parai VPA ir 200 mg/kg/parai NaDCA gydymas, sumažino intaktinių patinų čiobrialiaukės masę ir šis sumažėjimas buvo reikšmingai mažesnis lyginant su keturių savaičių 200 mg/kg/parai NaDCA monoterapijos poveikiu [199]; taip pat DCA monoterapija reikšmingai sumažino intaktinių patinų ir patelių čiobrialiaukės masę, o gydymas NaDCA sukėlė čiobrialiaukės HK skaičiaus pokyčius tik intaktiniams patinams, bet ne žiurkių patelėms [200]. Valančiūtė A. ir kt. keturių savaičių gydymo 300 mg/kg/parai VPA sukkelto poveikio abiejų lyčių intaktinių žiurkių čiobrialiaukės masei nenustatė, bet gydymas lėmė abiejų lyčių žiurkių čiobrialiaukės šerdinės dalies HK skaičiaus padidėjimą. Žiurkių kastracija yra susijusi su padidėjusia timocitų proliferacija, čiobrialiaukės hiperplazija ir HK skaičiaus padidėjimu liaukoje [221].

Patvirtinta, kad čiobrialiaukės šerdinės dalies epitelio retikulinės ląstelės ir HK dalyvauja indukuojant permanentinę prouždegiminę mikroaplinką liaukoje; tiriant Aire KO peles, kuriose nėra post-Aire ląstelių [357], sumažėja uždegimo mediatorių raiška [294]. Manoma, kad HK gali būti būtini čiobrialiaukės audinio mikroaplinkai būdingam toniniam uždegimui. HK ekspresuoja liaukos stromos limfopoetiną, kuris gali paskatinti normalius T limfocitus tapti T reguliaciniais limfocitais [358, 359]. Manoma, kad HK susidarymas

yra susijęs su senėjimo liaukos atrofijos fenotipu, kai sumažėja interferono α gamyba, o tai rodo, kad uždegimo signalo trūkumas lemia sutrikusį timocitų vystymąsi [294]. Įrodžius, kad epitelioiretikulinės ląstelės ir HK yra toninės (persistuojančios) prouždegiminės mikroaplinkos užkrūčio liaukoje induktoriai [360], išryškėja tiriamų vaistų poveikio nustatant genų, dalyvaujančių timocitų uždegimo ir imuninio atsako procesuose, raišką tyrimų svarba. Stakišaičio D. ir kitų tyrimo duomenys rodo, kad tiriant vaisto poveikį čiobrialiaukei, galima vertinti ir vaistinio preparato poveikį uždegimui, ir su uždegimu susijusių timocitų genų raiškai, nes čiobrialiaukė yra svarbus uždegimo modelis [223].

Ilgalaikio VPA ir VPA–NaDCA gydymo poveikis tirtų žiurkių timocitų santykinei genų raiškai. Keturias savaites 300 mg/kg/parai gydytų iki lytinio brendimo 4–5 savaičių amžiaus intaktinių žiurkių patelių timocitų *Slc5a8* raiška buvo reikšmingai padidėjusi, o VPA poveikio kastruotų patelių *Slc5a8* raiškai neturėjo [316, 317]. VPA gydytų intaktinių ir kastruotų patinų grupių *Slc5a8* raiška buvo sumažėjusi [316]. Kitų tyrimai parodė, kad VPA aktyvina DNR demetilimą ir padidina SLC5A8 raišką [361, 362]; per mitochondrijas paveikia imuninių ląstelių metabolizmą ir uždegiminius procesus [363], inhibuoja oksidacinį fosforilinimą mitochondrijose ir taip slopina energijos gamybą mitochondrijose [364]. SLC5A8 ir NKCC1 nešiklių aktyvumas ląstelėje yra susijęs su Na^+ ir Cl^- pernešimu į ląstelę. Šių jonų viduląstelinė koncentracija priklauso nuo lyties [365] ir yra svarbi uždegimo ir glikolizės procesams [135]. Mitochondrijose VPA inhibuoja HDAC aktyvumą [366] ir taip pakeičia raišką genų, susijusių su ląstelės diferenciacija ir apoptoze [367, 368].

Keturių savaičių gydymas 300 mg/kg/parai VPA doze iki lytinio brendimo sumažino intaktinių žiurkių patinų timocitų *Slc12a2* raišką ir neturėjo poveikio kastruotų patinų ir intaktinių bei kastruotų patelių timocitams. Mūsų tyrimų duomenimis silpnesnis VPA gydymo poveikis *Slc12a2* raiškai buvo kastruotų žiurkių patinų timocitams nei intaktinių patinų [317]. Tai galėtų būti susiję su galimu sinerginiu VPA ir testosterono poveikiu. Čiobrialiaukės ląstelės turi androgenų receptorius [297]. Androgenai mažina NZB pelių čiobrialiaukės masę [369]. Žiurkių patinų chirurginė ir cheminė kastracija sukėlė čiobrialiaukės regeneraciją [370]. Sprague–Dawley žiurkių kastracija padidino čiobrialiaukės masę, o gydymas lytiniais hormonais sumažino kastracijos sukeltą čiobrialiaukės hiperplaziją [371]. Mūsų tyrimas neparodė reikšmingo VPA poveikio *Slc12a2* raiškai intaktinių ir kastruotų patelių timocitams [317].

Nustatėme, kad intaktinių žiurkių patelių ilgalaikis gydymas 300 mg/kg/parai VPA reikšmingai padidino *Slc12a5* raišką, o kastruotų patinų reikšmingai sumažino. Gydymas VPA poveikio tirtų intaktinių žiurkių

patinų ir kastruotų patelių grupių timocitų *Slc12a5* raiškai neturėjo. Ląstelės tūrio sumažėjimas yra ankstyvas apoptozės bruožas dėl viduląstelinio K^+ ir Cl^- netekimo [271], kuris yra siejamas su kaspazių aktyvinimu ir su kaspazėmis susijusiais apoptoziniais mechanizmais [372].

28 dienas žiurkių gydymas VPA–NaDCA reikšmingo poveikio *Slc5a8*, *Slc12a5* ir *Slc12a2* raiškai neturėjo. Stakišaitis D. ir kt. nustatė, kad dviejų savaičių pelių patinų gydymas deriniu reikšmingai padidino *Slc5a8* raišką timocituose [223]. Stanevičiūtės J. ir kt. tyrimai parodė, kad ilgalaikė 200 mg/kg/parai NaDCA monoterapija sumažino timocitų NKCC1 geno raišką [201].

4.2. U87 ir T98G ląstelių, jų navikų ant CAM ir gydymo poveikio ypatumai

U87 ir T98G ląstelių skirtumai. U87 ir T98G kontrolės navikų invazijos į CAM mezenchimą dažnis ir kraujagyslių skaičius po naviku, taip pat PLBA-teigiamų, EZH2-teigiamų ir p53-teigiamų ląstelių dažnis ant CAM nesiskyrė. *SLC5A8* ir *CDH1* raiška abejose kontrolės ląstelėse neaptikta. Mūsų tyrimai parodė U87 ir T98G kontrolės ląstelių ir jų kontrolės navikų ant CAM savybių skirtumus. CAM storis po T98G-kontrolės navikais buvo reikšmingai 1,3 karto didesnis nei po U87-kontrolės navikais. *SLC12A2* raiška T98G ląstelių buvo reikšmingai 1,8 karto didesnė nei U87 ląstelių. *SLC12A5* raiška buvo aktyvi U87 ląstelėse, o šio geno raiška T98G ląstelėse nenustatyta. *CDH2* raiška T98G kontrolės ląstelių buvo reikšmingai 1,5 karto didesnė nei U87 ląstelių. Nustatyti ląstelių ir jų navikų skirtumai rodo, kad T98G ląstelės gali būti piktybiškesnės nei U87 ląstelės [319].

GBM ląstelių viduląstelinio Cl^- homeostazės sutrikimai yra susiję su padidėjusiu NKCC1 nešiklio aktyvumu ir raiška, taip pat su KCC2 nešiklio sumažėjusiu aktyvumu ir raiška naviko ląstelėse [273, 373]. Aukšto laipsnio GBM ląstelių vidutinė Cl^- koncentracija gali būti 10 kartų didesnė nei II stadijos gliomos navikuose ir smegenų žievinės dalies ląstelėse. Žmogaus gliomos ląstelių NKCC1 baltymo raiška koreliuoja su naviko laipsniu [374] ir tiesiogiai koreliuoja su ląstelių proliferacija [152]. Sun H. ir kt. analizė parodė, kad didelė gliomos NKCC1 raiška yra susijusi su MAPK ir transformuojančiojo augimo veiksnio β keliais bei EMT reguliavimu, o mezenchiminio GBM potipio naviko nešiklio raiška buvo susijusi su ligos blogesne prognoze ir trumpesniu ligoonio išgyvenamumo laikotarpiu [153]. Na^+ ir Cl^- koncentracija naviko mikroaplinkoje yra susijusi su naviko progresavimu [135, 152]. Padidėjusi tarpląstelinė Na^+ koncentracija gali aktyvinti NKCC1 [375]. Šiuo aspektu čia paminėtas nustatytas VPA poveikis žiurkių diurezei

ir Na⁺ bei Cl⁻ išsiskyrimui su šlapimu gali būti reikšmingas, nes gali veikti šių jonų koncentraciją ne tik ląstelės viduje, bet ir audinio mikroaplinkoje [135, 136, 153]. U87 ir T98G ląstelių ir jų navikų ant CAM gydymo tyrimai parodė tiriamų vaistinių preparatų poveikio skirtumus.

Gydymo VPA poveikio U87 ir T98G ląstelių genų raiškai skirtumai.

24 valandų gydymas 1,5 mmol, 0,75 mmol ir 0,5 mmol VPA dozėmis neturėjo poveikio U87 ląstelių *SLC12A2* raiškai, bet 0,75 mmol VPA dozė padidino T98G ląstelių *SLC12A2* raišką. Kaip įrodyta, U87 kontrolės ląstelių *SLC12A2* raiška buvo reikšmingai mažesnė nei T98G kontrolės ląstelių [319]. Damanskienė E. ir kt. nustatė skirtingą VPA poveikį pediatriinių GBM ląstelių *SLC12A2* raiškai: padidino PBT24 ląstelių, bet neturėjo poveikio SF8628 ląstelių geno raiškai [257]. *SLC12A2* raiškos padidėjimas gydymo metu gali būti vertinamas kaip nepageidaujamas vaistinio preparato poveikis. NKCC1 svarbus naviko ląstelių proliferacijos ir apoptozės mechanizmas [153], o tai tiesiogiai siejama su stipriai išreikšta NKCC1 raiška [152, 254].

Mūsų tyrimo duomenimis U87 ląstelių gydymas VPA reikšmingai padidino *SLC12A5* raišką, bet skirtingos VPA dozės nelėmė U87 ląstelių geno raiškos skirtumų. T98G ląstelių gydymas VPA poveikio *SLC12A5* raiškai neturėjo [319]. Damanskienė E. ir kt. nustatė, kad pediatriinių PBT24 ir SF8628 ląstelių gydymas VPA reikšmingai padidino *SLC12A5* raišką, bet PBT24 ląstelių raiška padidėjo daug daugiau [257]. Padidėjusi *SLC12A5* raiška inhibuoja gliomos U251 MG ląstelių proliferaciją ir *SLC12A5* yra potencialus GBM prognostinis žymuo; šio nešiklio aktyvavimas yra vienas iš ankstyvų ląstelių apoptozės požymių [271]. KCC2 teigiamai koreliuoja su naviką infiltruojančiais makrofagais ir CD4⁺ T limfocitais. Tai rodo, kad KCC2 yra atsakingas už vėžio imuninį atsaką ir ląstelių migraciją [272].

Nustatėme, kad U87 ląstelių gydymas 1,5 mmol VPA aktyvino *SLC5A8* raišką, bet T98G ląstelių gydymas VPA reikšmingo poveikio šio geno raiškai neturėjo [319]. *SLC5A8* nešiklio funkcija yra svarbi, nes šis nešiklis perneša DCA į ląstelę ir VPA aktyvindamas nešiklio funkciją gali gerinti DCA pernešimą į GBM ląsteles [376, 377]. Gyvūnų ir žmogaus pirminių gliomų eksperimentiniai modeliai parodė, kad *SLC5A8* yra naviko augimo supresorius, kuris dalyvauja onkogenezeje ir yra užslopintas epigenetiniais mechanizmais. *SLC5A8* yra aktyvus sveikose smegenų ląstelėse, bet jo raiška reikšmingai sumažėja daugumoje žmogaus pirminių gliomos ląstelių ir GBM ląstelių linijų ląstelių, ypač kai CpG salelėse vyksta metilinimas [282]. *SLC5A8* raiška siejama su gliomos ląstelių linijų kolonijų formavimosi slopinimu, t. y. slopina GBM augimą *in vitro* [282]. *SLC5A8* skatina ląstelių apoptozę per nuo piruvato priklausomą HDAC inhibiciją [378]. Hipermetilinimas užslopiną *SLC5A8* raišką navikinėse ląstelėse ir tai siejama su bloga vėžio

prognoze [287]. VPA demetilinis poveikis epigenetiniams mechanizmais gali padidinti *SLC5A8* raišką GBM ląstelėse [257, 283].

Mūsų tyrimai parodė, kad *CDHI* buvo neaktyvus U87 ir T98G kontrolės ląstelėse [319]. *CDHI* raiška dažniausiai nenustatoma GBM ląstelėse dėl hipermetilintos būklės arba ji mažėja priklausomai nuo smegenų naviko stadijos [247, 248]. Mūsų tyrimo duomenimis U87 ląstelių gydymas VPA poveikio *CDHI* raiškai neturėjo ir genas liko neaktyvus; VPA gydytų T98G ląstelių *CDHI* raiška buvo suaktyvinta.

CDH2 raišką U87 ląstelėse padidino tik gydymas 1,5 mmol VPA doze, o T98G ląstelių *CDH2* raišką reikšmingai padidino visos tirtos VPA dozės. VPA gydytų T98G ląstelių *CDH2* raiška buvo didesnė nei gydytų U87 ląstelių [319]. *CDH1* ir *CDH2* svarbūs kancerogenezės ir EMT mechanizams: EMT metu *CDH1* raiška mažėja, o *CDH2* – didėja [247]. Mezenchiminio GBM potipio ląstelių *CDH2* yra siejamas su NKCC1 aktyvumu, kuris taip pat svarbus EMT [247, 379].

Gydymo TMZ arba MgDCA poveikio U87 ir T98G ląstelių navikams ant CAM ir GBM ląstelėms palyginimas. TMZ poveikio eksperimentiniai tyrimai GBM navikams ir jų ląstelėms yra plačiai atliekami, o MgDCA poveikio tyrimais buvo atlikti pirmą kartą, todėl šių preparatų poveikio palyginimas nurodo tyrimo naujumą. Gydymas 50 μmol ir 100 μmol TMZ dozėmis reikšmingai sumažino U87 ir T98G navikų invazijos dažnį į CAM, neoangiogenezę CAM mezenchimoje po jais ir tik 100 μmol TMZ dozė buvo veiksminga slopinant CAM storį po U87 ir T98G navikais. Gydymas 5 mmol MgDCA ir 2,5 mmol MgDCA dozėmis panašiai reikšmingai slopino U87 ir T98G navikų ant CAM invazijos dažnį ir neoangiogenezę po jais. 2,5 mmol MgDCA dozė neveikė CAM storio po U87 navikais, bet T98G navikų atveju abi MgDCA dozės sumažino CAM storį. Vadinasi, TMZ ir MgDCA poveikis U87 ir T98G navikų invazijai į CAM mezenchimą ir slopinant neoangiogenezę yra panašus.

Ribatti D. ir kt. tyrimai parodė, kad ksenograftas sukelia uždegiminius procesus CAM srityje [312, 380]. Navikas ant CAM aktyvina neoangiogenezę kartu ir CAM mezenchimos sustorėjimą [312, 313].

TMZ abi tirtos dozės reikšmingai slopino U87 ir T98G navikų EZH2, p53 ir PLBA baltymų raišką navike. Gydymas 5 mmol MgDCA doze veiksmingai slopino PLBA raišką U87 ir T98G navikuose, bet 2,5 mmol dozė reikšmingai ją slopino tik T98G naviko ląstelėse. Tik 5 mmol MgDCA dozė U87 navikuose paveikė EZH2-teigiamų ląstelių raišką, o T98G navikuose abi MgDCA dozės poveikio neturėjo. Gydytų 5 mmol MgDCA doze U87 ir T98G navikų p53 baltymo raiška buvo reikšmingai sumažėjusi, o 2,5 mmol dozė ją sumažino tik U87 navike.

Damanskienės E. ir kt. nurodo, kad TMZ poveikis pediatriinių GBM PBT24 ir SF8628 ląstelių navikams priklausė nuo ląstelių linijos ir dozės: 100 μmol TMZ dozė reikšmingai slopino PBT24 naviko invazijos dažnį, mažino kraujagyslių skaičių CAM mezenchimoje ir CAM storį, bet neturėjo poveikio SF8628 navikams [151]; gydymas MgDCA sumažino CAM storį ir kraujagyslių skaičių tik po PBT24 navikais [174]. Mūsų tyrimas parodė panašų MgDCA poveikį U87 ir PBT24 navikų augimui ant CAM [320].

Tyrimai įrodė, kad sergančiųjų GBM gydymas TMZ chemoterapija padidina bendrą vyresnių pacientų išgyvenamumo trukmę, tačiau šis poveikis buvo mažesnis jaunesniems pacientams [381]. U87 ir T98G ląstelių rezistentiškumo TMZ gydymui raidos skirtumai priklauso nuo TMZ dozės [13]. Tyrimų duomenų apžvalga parodė, kad PLBA raiška navike reikšmingai koreliuoja su pažengusia naviko stadija ir blogu ligonio 5 metų išgyvenamu, todėl jis gali būti prognostinis ir diagnostinis žymuo [227]. Slopinantys PLBA raišką naviko ląstelėse vaistiniai preparatai turi platesnį priešvėžinį poveikį nei preparatai, veikiantys specifinius signalinius baltymus [382]. GBM p53 aktyvumas yra susijęs su rezistentiškumo chemoterapiniams preparatams raida [241]. Todėl p53 raiškos tyrimai gali padėti nustatyti GBM rezistentiškumą vaistams [383]. GBM ląstelių EZH2 raiška yra didesnė nei astrocitų, o GBM pacientų biopsijos audinio EZH2 raiška yra siejama su naviko laipsniu [384]. TMZ chemoterapijai rezistentiškų GBM ląstelių EZH2 inhibicija slopina jų augimą [385], priklausanti nuo vaistinio preparato dozės [386].

Mūsų 50 μmol TMZ dozės poveikio U87 ir T98G ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1* ir *CDH2* raiškai tyrimai *in vitro* neparodė. *SLC12A2* ir *CDH2* raiška buvo didesnės TMZ gydytų T98G ląstelių nei atitinkamų U87 ląstelių. TMZ gydytose U87 ląstelėse *SLC12A5* buvo aktyvus, o T98G ląstelių geno raiška buvo užslopinta. Tą galima būtų sieti su galimai aktyvesne TMZ gydytų T98G ląstelių proliferacija.

Gydymas MgDCA neturėjo poveikio U87 ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, *CDH2* raiškai ir T98G ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A5*, *CDH1* raiškai. MgDCA reikšmingai sumažino T98G ląstelių *SLC12A2* ir *CDH2* raišką.

Damanskienė E. ir kt. nustatė, kad gydymas TMZ padidino PBT24 ir SF8628 ląstelių *SLC12A2* raišką [151]. NKCC1 inhibicija bumetanidu padidina TMZ sukeltą GBM ląstelių apoptozę sumažėjus K^+ , Cl^- koncentracijai ląstelėje ir ląstelės tūriui [387]. Žema *CDH2* raiška koreliuoja su geresniu atsaku į TMZ gydymą ir pagerina pacientų išgyvenamumą [388]. Farmakologinė NKCC1 inhibicija sumažina gliomos ląstelių migraciją ir invaziją [374, 389]. DCA slopina suaktyvėjusią navikinių ląstelių glikolizę, nes taip sutrikdoma proliferacija ir navikinės ląstelės tampa jautresnės apoptozės signalams [390].

U87 ir T98G navikų ir jų ląstelių atsako į VPA–MgDCA ar TMZ gydymą palyginimas. Reikšmingas 2 mmol VPA–3 mmol MgDCA poveikis buvo U87 naviko invazijos į CAM dažniui ir kraujagyslių skaičiui po navikais, bet šio poveikio T98G navikams nenustatėme; pažymėtina, kad palyginus derinio poveikį su 50 μmol TMZ dozės poveikiu U87 ir T98G invazijai bei kraujagyslių skaičiui po U87 navikais, reikšmingo skirtumo nenustatėme.

Derinys neturėjo reikšmingo poveikio CAM storiui po U87 ir T98G navikais. Gydymas VPA–MgDCA reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų, EZH2-teigiamų ir p53-teigiamų ląstelių dažnį U87 naviko ląstelėse, bet T98G ląstelėms poveikio nebuvo. U87 ir T98G navikų, gydytų 100 μmol TMZ doze, invazijos dažnis buvo mažesnis nei gydytų deriniu, o CAM storis po TMZ ir deriniu gydytais T98G navikais nesiskyrė.

Pažymėtina, kad didesniu toksiškumu pasižyminti 100 μmol TMZ dozė, pasižymėjo ir didesniu poveikiu kraujagyslių skaičiui po U87 ir T98G navikais. U87 navikų, gydytų 100 μmol TMZ doze, PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo mažesnis nei gydytų deriniu. T98G navikų, gydytų deriniu, PLBA-teigiamų ląstelių skaičius buvo didesnis nei gydytų 50 μmol TMZ doze. Gydymas abiem TMZ dozėmis veiksmingiau slopino EZH2-teigiamų ir p53-teigiamų ląstelių skaičių T98G navikuose negu derinys. U87 navikuose 100 μmol TMZ dozė buvo veiksmingesnė nei derinys slopinant EZH2-teigiamų ir p53-teigiamų ląstelių skaičių.

U87 ląstelių gydymas VPA–MgDCA deriniais reikšmingai padidino *SLC5A8* raišką ir šis poveikis nepriklausė nuo VPA dozės derinyje; priešingai, gydymas T98G ląstelių deriniais neturėjo įtakos geno raiškai, kuri išliko užslopinta. Gydymas TMZ neturėjo įtakos *SLC5A8* raiškai.

VPA–MgDCA neturėjo įtakos U87 ląstelių *SLC12A2* raiškai, o gydymas deriniu reikšmingai sumažino T98G ląstelių *SLC12A2* raišką. Gydymas T98G ląstelių 50 μmol TMZ neturėjo įtakos *SLC12A2* raiškai.

Gydymas VPA–MgDCA deriniais reikšmingai padidino U87 ląstelių *SLC12A5* raišką, o TMZ neturėjo įtakos šių ląstelių *SLC12A5* raiškai. T98G ląstelių gydymas 0,75 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA ir 50 μmol TMZ gydytose T98G ląstelėse *SLC12A5* raiškai poveikio neturėjo, o jų gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA padidino T98G ląstelių *SLC12A5* raišką.

Gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA reikšmingai padidino U87 ląstelių *CDH1* raišką, o T98G ląstelėse šio geno raiška nebuvo nustatyta. *CDH2* raiškai U87 ir T98G ląstelėse gydymas deriniais ir TMZ įtakos neturėjo.

VPA–MgDCA derinių poveikio tyrimai parodė, kad priešingai nei MgDCA monoterapija, yra ryškus sinerginis dviejų vaistinių preparatų poveikis genų, kurie yra svarbūs GBM raidai, raiškai. Šis sinergizmas leidžia

mažinti DCA dozę ir tai gali būti svarbu vengiant nepageidaujamo vaistinio preparato poveikio.

VPA–DCA ir kitų tiriamų vaistinių preparatų poveikio GBM ląstelėms ir navikams tyrimai parodė, kad gydymo poveikis skiriasi priklausomai nuo GBM ląstelių ir taikytos dozės. Mūsų tyrimo rezultatai įrodo individualizuotos gydymo strategijos svarbą gydant GBM.

4.3. VPA–MgDCA poveikis 22-SANTA ląstelėms ir navikui ant CAM

Pirminių GBM ląstelių 22-SANTA-2F gydymas 2 mmol VPA–1,5 mmol MgDCA preparatu poveikio naviko invazijos dažniui, CAM storiui, kraujagyslių ir p53-teigiamų ląstelių skaičiui neturėjo. Gydymas deriniu reikšmingai sumažino PLBA-teigiamų ir EZH2-teigiamų ląstelių skaičių 22-SANTA-2F naviko ląstelėse ant CAM. VPA–MgDCA reikšmingo poveikio *SLC12A2* ir *CDH2* raiškos pokyčiams neturėjo, o *SLC5A8*, *SLC12A5*, *CDH1* ir kontrolės, ir gydytose 22-SANTA-2F ląstelėse buvo neaktyvūs.

Po gydymo VPA–MgDCA nustatėme su proapoptoze susijusių 33 genų raiškos pokyčius 22-SANTA-4F ląstelėse. Gydymas deriniu suaktyvino *HIPK2*, *CASP2*, *FOXO3*, *CASP6*, *CASP1*, *FEM1B*, *BCL10*, *FAF1*, *CYCS*, *TNF*, *DFFA*, *CASP8*, *BBC3*, *PRKCD*, *BMF*, *CDKN1A*, *SPN*, *AIFM1*, *CD28*, *BIK*, *IL24* (21 geno) raišką ir slopino *LTBR*, *TRAF2*, *NOD1*, *PIDD1*, *TP53BP2*, *TP53*, *TNFRSF10B*, *RIPK1*, *FAS*, *ABL1*, *TRADD*, *IL1B* (12 genų) raišką.

Disertacijoje pateikiami duomenys įrodė VPA–NaDCA poveikį žiurkėms, čiobrialiaukei, timocitams ir gydymo poveikio ryšį su lytimi. Nustatėme skirtingą VPA monoterapijos ir VPA–NaDCA poveikį timocitų genų raiškai. Atlikti tyrimai parodė U87 ir T98G navikų ant CAM bei jų ląstelių gydymo tiriamais vaistiniais preparatais – MgDCA ir VPA–MgDCA poveikio skirtumus. Tyrimai parodė, kad VPA aktyvina DCA nešiklį *SLC5A8*. Dėl to VPA ir DCA derinys gali leisti mažinti DCA dozę derinyje ir gali sumažinti nepageidaujamo DCA poveikio riziką. U87 ir T98G ląstelių genų raiškos *in vitro* tyrimai rodo galimą sinerginį sudedamųjų derinio dalių poveikį, priklausantį ir nuo naviko ląstelių linijos. Paciento ląstelių, gydytų VPA–MgDCA, sekoskaitos tyrimas parodė tiriamo preparato veiksmingumą proapoptozinių genų raiškai. Šie tyrimai tvirtina, jog siekiant veiksmingo GBM gydymo, turi būti taikomas individualizuotas GBM gydymas. Preliminarus gydymo veiksmingumas galėtų būti nustatomas iki pradedant chemoterapiją, o vaisto veiksmingumą nustatant ikiklinikiniais tyrimais.

Išvados

1. Nustatyta, kad 28 parų gydymas VPA–NaDCA lėmė abiejų lyčių žiurkių inksto masės reikšmingą padidėjimą, paros diurezės ir jonų išsiskyrimo su paros šlapimu pokyčius, susijusius su lytimi, sumažino patinų ir patelių kraujo serumo gliukozės koncentraciją ir testosterono koncentraciją patinų kraujyje. VPA–NaDCA neturėjo poveikio čiobrialiaukės masei, bet reikšmingai padidino patinų čiobrialiaukės šerdinės dalies Hasalio kūnelių skaičių. Gydymas neturėjo poveikio timocitų *Slc5a8*, *Slc12a2*, *Slc12a5* raiškai ir timocitų pasiskirstymui pagal ląstelės ciklo fazę.
2. VPA reikšmingas poveikis žiurkių timocitų *Slc5a8*, *Slc12a2*, *Slc12a5* raiškai priklausė nuo lyties, nuo lytinių hormonų – nustatyti intaktinių ir kastruotų gyvūnų gydymo poveikio timocitų genų raiškai skirtumai. Nustatyti U87 ir T98G ląstelių kontrolės *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, *CDH2* raiškos ir VPA poveikio tirtų ląstelių genų raiškai skirtumai; gydymo poveikis ląstelėms priklausė nuo VPA dozės.
3. Nustatyti tirtų vaistinių preparatų poveikio skirtumai navikams ant CAM ir jų ląstelėms:
 - 3.1. Gydymas MgDCA reikšmingai sumažino U87 ir T98G navikų invazijos dažnį į CAM, CAM storį po naviku, kraujagyslių skaičių mezenchimoje, PLBA, EZH2, p53 raišką U87 navikuose ir slopino T98G navikų PLBA, p53 raišką, o preparato poveikis priklausė nuo MgDCA dozės. MgDCA poveikio U87 ląstelių tirtų genų raiškai neturėjo, bet T98G ląstelėse reikšmingai sumažino *SLC12A2* ir *CDH2* raišką.
 - 3.2. VPA–MgDCA reikšmingai sumažino U87 navikų invazijos dažnį, kraujagyslių skaičių mezenchimoje po naviku, PLBA, EZH2 ir p53 raišką navike. VPA–MgDCA suaktyvino U87 ląstelių *SLC5A8* ir padidino *SLC12A5*, *CDH1* raišką. VPA–MgDCA sumažino T98G ląstelių *SLC12A2* ir suaktyvino *SLC12A5* raišką.
 - 3.3. TMZ reikšmingai sumažino U87 ir T98G navikų invazijos dažnį į CAM, CAM storį ir kraujagyslių skaičių po naviku, PLBA, EZH2 ir p53 raišką navike. TMZ poveikio U87 ir T98G ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1* ir *CDH2* raiškai neturėjo.
4. VPA–MgDCA sumažino paciento 22-SANTA-2F naviko ląstelių PLBA, EZH2 raišką ir neturėjo poveikio p53 raiškai bei ląstelių *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, *CDH2* raiškai. Genų sekoskaitos tyrimas parodė, kad VPA–MgDCA padidino paciento 22-SANTA-4F ląstelių su proapoptoze susijusių 21 ir sumažino 12 genų raišką.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

22-SANTA-2F	– glioblastoma primary cells of a female patient
22-SANTA-4F	– glioblastoma primary cells of a male patient
CAM	– chorioallantoic membrane of the chick embryo
<i>CDH1</i>	– E-cadherin-coding gene
<i>CDH2</i>	– N-cadherin-coding gene
DCA	– dichloroacetate
EZH2	– enhancer of zeste homolog 2
<i>GAPDH</i>	– glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene
GBM	– glioblastoma
H-E	– hematoxylin and eosin
IHC	– immunohistochemistry
MgDCA	– magnesium dichloroacetate
NaDCA	– sodium dichloroacetate
PDK	– pyruvate dehydrogenase kinase
PCNA	– proliferating cell nuclear antigen
<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
VPA–DCA	– combination of valproic acid and dichloroacetate

1. INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is a brain tumor classified as a rare disease. People of any age can develop GBM, but it is more common in older individuals [1]. Primary GBM constitutes 80 % of all adult GBM tumors [2]. GBM is more frequently diagnosed in men than women [3]. Women have a longer survival duration after GBM diagnosis compared to men [4], and following recurrent GBM surgery, women have a lower risk of death than men [5].

Currently, there is no effective treatment for high-grade GBM. Typically, standard GBM treatment is combined, involving surgical tumor resection followed by radiation therapy and chemotherapy. The first-line drug for treating GBM is temozolomide (TMZ) [6, 7]. However, TMZ treatment usually only extends the patient's survival [8]. The high mortality rate of GBM patients is associated with tumor resistance to treatment and disease recurrence [10]. With standard treatment, the average patient's survival is 12–15 months [3, 7]. Despite poor prognosis, about 7 % of GBM patients survive for 5 years

[3, 7]. The main effects of pharmaceutical preparations are linked to the inhibition of tumor cell proliferation and the activation of apoptosis [12].

The ineffectiveness of TMZ is associated with emerging treatment resistance, leading to disease recurrence and poor prognosis [13]. Treatment resistance may be due to inherited factors related to high tumor invasiveness [14].

GBM cells are characterized by altered metabolism, i.e. enhanced glycolytic processes [15]. One of the current treatment targets for GBM is pyruvate dehydrogenase kinases (PDK), acting by inhibiting their activity. PDK is in cell mitochondria, and its high glycolytic activity is associated with carcinogenesis [16]. PDK selectively inhibits the pyruvate dehydrogenase complex, which is important for glycolysis and oxidation mechanisms [15].

The invasion of tumor can also be regulated by the activity of monovalent ion transporters. Na^+ , K^+ , and Cl^- transporters are associated with cell homeostasis, physiological regulation of cell volume, proliferation, survival, and gene expression in tumor cells [10]. Tumor cells or normal cells, in response to the tumor, produce proteins known as tumor markers. The study of these markers helps predict tumor risk and response to treatment, determine the early stage of cancer, disease prognosis, and select more appropriate treatment [17].

In the absence of effective GBM treatment, it is important to seek treatment strategies to reduce tumor cell resistance to therapy. There is evidence that sodium dichloroacetate (NaDCA) can increase the sensitivity of GBM cells to TMZ [18, 19]. NaDCA is a specific PDK inhibitor that inhibits lactic acid production [20, 21] in the tumor and its microenvironment. Glycolytic processes [23, 24] and PDK expression [24] are activated in GBM cells. NaDCA treatment promotes apoptosis in tumor cells [25]. Another investigational drug we studied is valproic acid (VPA). VPA is a histone deacetylase inhibitor [26] that can affect gene expression through methylation mechanisms, inhibit cell proliferation, arrest the cell cycle, and induce apoptosis. VPA can also act as an epigenetic modulator. In cancer treatment, VPA is used as an immunomodulator [27]. There is evidence that VPA can improve DCA transport into the cell via mitochondrial mechanisms [28, 29].

This dissertation aimed to investigate the effects of VPA and dichloroacetate (DCA) and their combination (VPA–DCA) on rats, their thymocytes, adult GBM cell lines, and GBM primary cells from patients *in vitro* and their tumors using an experimental model *in vivo*. The studies on investigational drugs VPA, DCA, and their combination aimed to determine whether the combination of these drugs has a synergistic effect, allowing for a reduction in drug dosage to achieve the desired treatment efficacy. Experimental studies sought to determine gender-related differences in the response to treatment with investigational drugs, to identify differences in the response to treatment

between the GBM U87 cell line (female) and the T98G cell line (male), both *in vivo* and *in vitro*, and to determine the effect of magnesium dichloroacetate (MgDCA) on carcinogenesis mechanisms; to determine the effect of VPA–MgDCA on the expression of pro-apoptotic genes in GBM primary cells.

2. THE AIM AND OBJECTIVES OF THE WORK

The aim

To determine the effect of dichloroacetate, valproic acid, and the valproic acid–dichloroacetate combination on rats, their thymus, thymocytes, and the development of adult human glioblastoma.

The objectives

1. To determine the effects of single-dose and long-term treatment with VPA–NaDCA on rats, the excretion of Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} in 24-hour urine, concentration of glucose, testosterone in blood, the thymus and number of Hassall's corpuscle in it, kidneys, thymocytes cell cycle, the expression of *Slc5a8*, *Slc12a2*, and *Slc12a5* in the thymocyte, and gender-related differences.
2. To determine the effects of VPA on the expression of *Slc5a8*, *Slc12a2*, and *Slc12a5* in rat thymocytes and the expression of *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* in U87 and T98G cells *in vitro*.
3. To determine the effects of MgDCA, VPA–MgDCA, and TMZ on tumor progression in U87 and T98G glioblastoma cell lines on the CAM, expression of EZH2, PCNA, p53 *in vivo*, and expression of *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* in tumor cells *in vitro*.
4. To investigate the effect of VPA–MgDCA on tumor development from patient's GBM primary cells on the CAM, expression of PCNA, EZH2, p53, and expression of *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* as well as pro-apoptotic genes.

Novelty and relevance of work

The work presents data from experimental studies conducted for the first time on the effects of VPA or the VPA–NaDCA combination on rats, their thymus, thymocytes, and gender-related differences in treatment effects. It was found that the VPA–NaDCA combination affects the blood serum

glucose concentration in both male and female rats. The combination treatment significantly reduces the blood serum testosterone concentration in males. The study also determined the effects of the investigational drug VPA–NaDCA on the kidneys of rats, daily diuresis, and the excretion of Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , and Ca^{2+} in 24-hour urine, as well as the effects of VPA or VPA–NaDCA on the expression of *Slc5a8*, *Slc12a2*, and *Slc12a5* in rat thymocytes, and the association of their expression with gender and sex hormones.

The work includes data on the effects of VPA treatment on the expression of *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* in adult GBM cells U87 and T98G, showing differences in treatment effects depending on the VPA dose. VPA activates *SCL5A8* expression through DNA demethylation mechanisms, allowing for the hypothetical assertion that VPA effect may be associated with increased DCA transport into the cell. Such a synergistic mechanism of action could allow for a reduced DCA dose.

For the first time, the effects of MgDCA and VPA–MgDCA on adult GBM cells *in vitro* and their formed tumors *in vivo* were studied using the CAM model, focusing on GBM cell tumor growth, their invasion into the chick chorioallantoic membrane (CAM), neoangiogenesis, and the expression of markers PCNA, EZH2, and p53 in the tumor on the CAM. The data from the VPA–MgDCA studies were compared with the data on the effects of TMZ. VPA–MgDCA treatment increased *SLC5A8* expression in U87 cells more effectively than VPA monotherapy. Additionally, VPA–MgDCA inhibited *SLC12A2* and activated *SLC12A5* expression, with this effect differing between U87 and T98G cells. For the first time, next-generation sequencing was used to determine the effect of VPA–MgDCA on the expression of pro-apoptotic genes in GBM primary cells from an adult male.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Materials and methods used for rat studies

To evaluate the effects of single-day and long-term (4 weeks) treatment of VPA–NaDCA (a combination dose of 150 mg/kg/day VPA and 100 mg/kg/day NaDCA), both male and female intact Wistar rats aged 5–6 weeks were examined (the State Food and Veterinary Service of Lithuania No. G2-98, dated January 9, 2019). The study groups were control and VPA–NaDCA-treated groups ($n = 6$ per group). Rats in treated groups were given aqueous VPA–NaDCA solution.

To evaluate the impact of 300 mg/kg/day VPA treatment on the expression of *Slc12a2*, *Slc5a8*, and *Slc12a5*, 4-to-5-weeks-old Wistar rats were used. Treatment duration was 4 weeks. The study obtained permission

from the State Food and Veterinary Service of Lithuania to use experimental animals for research (No. G2-53, dated January 2, 2017). The study groups were gonad-intact and gonadectomized controls, as well as VPA-treated groups of both genders (n = 6 per group). One ovariectomized female rat treated with VPA had to be excluded from the study due to the formation of a fistula after the operation [316, 317].

3.1.1. Analysis of diuresis and ion levels in urine and blood serum

At the beginning of the study, to collect 24-hour urine samples, the rats were individually housed in metabolic cages with free access to water or a VPA–NaDCA aqueous solution without food. On the 27th day of the study, to assess the long-term effects of VPA–NaDCA treatment, the rats were once again placed in metabolic cages for 24 hours, and their daily urine was collected. The following indices were examined in 24-hour urine: daily urine diuresis, excretion of Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, creatinine concentration, and urine pH. The concentration of urine ions was calculated per 100 g of the animal's body weight.

To assess changes in the concentration of serum glucose, Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, urea, and creatinine, blood samples from rats were taken on the 28th day.

3.1.2. Preparation of rat kidney and *gl. thymus* for gene expression, flow cytometry, histological and immunohistological investigation

After 4 weeks, the animals were euthanized in a 70 % CO₂ chamber. The thymocyte suspension was performed and was used for flow cytometry and expression analysis of *Slc12a2*, *Slc5a8*, and *Slc12a5* [316, 317].

Histological kidney sections were stained with hematoxylin and eosin (H-E). In 4 fields of view, the height (µm) of 10 cuboidal epithelial cells lining the thick ascending limb of Henle loop was measured for each case, and an average was calculated.

The *gl. thymus* was embedded in paraffin so that histological sections would be sliced longitudinally. In each case, 8 slides were stained with H-E, and the other 8 were stained using immunohistochemistry (IHC) staining with a monoclonal antibody against high-molecular-weight cytokeratin. The total area of the *gl. thymus*, the medulla region (mm²), and the number of Hassall's corpuscles in each slide was measured, and the average area for each case was calculated.

3.2. Materials and methods used for GBM cells tumors *in vivo* and *in vitro* studies

Analysis of the frequency of U87 and T98G tumor invasion into the CAM, CAM thickness, number of blood vessels under the tumor, and expression of tumor markers by IHC was performed for the groups specified in Table 3.2.1.

Table 3.2.1. Control and treated tumors groups on CAM and sample size

Study groups	Number of tumors on CAM		PCNA		EZH2		p53	
	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G	U87	T98G
Control	20	12	8	9	12	9	12	9
5 mmol MgDCA	14	15	8	9	7	10	7	8
2.5 mmol MgDCA	11	15	8	8	8	8	12	8
2 mmol VPA– 3 mmol MgDCA	15	15	15	8	13	9	14	9
100 µmol TMZ	15	11	7	5	8	5	8	5
50 µmol TMZ	15	16	8	6	8	7	7	7

The study groups of *in vitro* studies of U87 and T98G cells treated with preparations for 24 hours were as follows: control, 1.5 mmol MgDCA, 0.75 mmol MgDCA, 2 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA, 0.75 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA, 0.75 mmol VPA, 0.5 mmol VPA, 50 µmol TMZ (n = 6 per group), and 1.5 mmol VPA (n = 5 per group).

Analysis of the frequency of invasion of 22-SANTA-2F tumor cells, obtained from a 48-year-old patient with GBM (Grade 4 according to the WHO), into the CAM, CAM thickness, number of blood vessels under the tumor, and expression of tumor markers by IHC was performed for the groups specified in Table 3.2.2.

Table 3.2.2. Control and treated patient tumors groups on CAM and sample size

Study groups	Tumor on CAM number	EZH2	PCNA	p53
Control	16	8	8	8
2 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA	6	4	4	4

After 48-hour treatment of 22-SANTA-2F cells with VPA–MgDCA *in vitro*, relative expressions of *SLC12A2*, *SLC5A8*, *SLC12A5*, *CDH1*, and

CDH2 were determined. The following groups were studied: treated with 2 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA and control (n = 6 per group).

22-SANTA-4F cells from a 46-year-old patient's GBM (G4 according to the WHO) were treated for 48 hours with VPA–MgDCA *in vitro*. Studies on the expression of pro-apoptotic genes were conducted. The groups studied were as follows: treated with 2 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA and control (n = 3 per group).

3.2.1. Cell lines, cell culturing and preparation of GBM primary cell suspension

Two commercial glioblastoma cell lines – U-87 MG (U87; ECACC 89081402) and T98G (ATCC No. CRL-1690™) – were used for the experiment. Cells were cultured in media depending on the cell line as described by us previously [319, 320].

GBM primary cells were extracted following the protocols “Preparation of Human GBM Tumor Cell Suspension” developed by the Department of Histology and Embryology at the Lithuanian University of Health Sciences (Protocol No. 2021-03-01 (GB1) and No. 2021-10-05 (GB3)). The study was conducted with the approval of the Regional Biomedical Research Ethics Committee (Approval No. BE-2-80, dated August 31, 2020). Patient tumor tissue obtained after surgery was obtained from the Center of Neurosurgery, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos. The GBM tumor was placed in a vial containing DMEM without Ca²⁺ and a mixture of 1 % penicillin (100 IU/mL) and 0.1 mg/mL streptomycin within 15 min after the surgery. A piece of GBM tissue was minced into smaller pieces. Cell suspension was obtained by pipetting the GBM tissue with the medium for about 5 min. The duration of suspension preparation after obtaining the GBM tissue was 20 min. The suspension was centrifuged, and the cells were resuspended in DMEM without Ca²⁺, containing 10 % fetal bovine serum, 1 % penicillin (100 IU/mL), and 0.1 mg/mL streptomycin at 37 °C. The obtained GBM cells from the female and male patient were assigned the codes 22-SANTA-2F and 22-SANTA-4F, respectively. These cells were used for both tumors on the CAM and *in vitro* studies. The entire process from tumor tissue collection to cell suspension preparation and their application on the CAM took approximately 1.5 hour.

3.2.2. Application of CAM model for the studies of U87, T98G and 22-SANTA-2F tumor

For studies involving the CAM model, according to Lithuanian and European regulations, bioethical approval is not required. Fertilized eggs

from Cobb500 breed chickens were used in the experiment, obtained from Rumšiškės Poultry Farm (Lithuania). Tumors formed from U87, T98G (1 million), or 22-SANTA-2F (0.2 million) cells were placed on the CAM. The effect of drug on tumor growth and neoangiogenesis was assessed with biomicroscopy *in vivo*. Histological examination of tumor invasion, thickness of the CAM and the blood vessel number in mesenchyme were performed in H-E-stained slides as described by us previously [320].

PCNA, p53 and EZH2 markers were identified by IHC method as described by us previously [320]. Then, two random fields of view in each tumor were selected and photographed at 40× magnification. All visible and marker-positive (cell nuclei stained brown) cells were counted in the fields of view. The ratio of cells with positive expression to all cells in the visual fields was calculated, i.e. percentage (%) of positive cells in the tumor.

3.2.3. Determination of relative *SLC12A2*, *SLC5A8*, *SLC12A5* expression in U87, T98G and 22-SANTA-2F cells

U87 and T98G cells were treated with VPA, MgDCA, VPA–MgDCA, and TMZ for 24 hours *in vitro* as described in [319].

The relative gene expression in 22-SANTA-2F cells was examined after 48-hours treatment with VPA–MgDCA *in vitro*.

The determination of relative *SLC12A2*, *SLC5A8*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* expression is described in [319].

3.2.4. Sequencing and data analysis of pro-apoptotic genes in 22-SANTA-4F cells

High-quality RNA samples with an RNA integrity number ≥ 8 were selected for sequencing [321]. RNA sample libraries were prepared according to the manufacturer's recommendations using the QIAseq Target RNA Kit for Apoptosis and Cell Death Markers and an Illumina sequencer with parameters: 150 cycles, single-end read, 151 bp fragments, 8 bp both-end indexes. A total of 264 genes were sequenced.

The 3' nucleotide sequences of adapters and sequences with a length of less than 15 nucleotides and a quality score of less than 25 were removed. The human genome (GRCh38.p13) was downloaded. Sequence expression was normalized using the upper quartile method, genes with cumulative expression between samples less than 50 were removed and differential gene expression analysis was performed. *p* values were corrected using the Benjamin-Hochberg method.

3.3. Statistical analysis

Statistical analysis and graphical representation of data were performed using statistical software packages: IBM SPSS version 23.0 or GraphPad Prism program version 7. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality hypothesis. Quantitative data are presented as median with range or average with standard deviation. Qualitative data are presented as percentages in the group (%). For quantitative data analysis, the Mann-Whitney U test was used to compare two groups. The chi-square (χ^2) test was used to assess the strength of the relationship between qualitative data. The relative *GAPDH*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* expression was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) method [318]. *GAPDH* was used as a house-keeping gene to normalize the target gene expression. Cut-offs of CT values were determined and the values of ≥ 35 were not used for any calculations. Data were considered statistically significant if $p < 0.05$.

4. RESULTS

4.1. The effect of VPA–NaDCA on rat the body weight, spleen, kidney, and thymus

There was no impact of VPA–NaDCA treatment on the body weight growth of the animals. Compared to the male control group, the body weight of the female control group was significantly lower throughout the study.

The spleen, kidney and thymus weight of the male control group was significantly higher than the female control group. Compared to the respective controls, 28-day treatment with VPA–NaDCA had no impact on the spleen and thymus weight of either males or females but increased the kidney weight of both males and females. Compared to the respective control, 28 days of treatment with VPA–NaDCA significantly reduced the height of the thick ascending limb in the kidneys of female rats, but such an impact was not observed in males.

Comparing the controls of both genders of rats, no differences in the number of Hassall's corpuscles were found. The number of Hassall's corpuscles in the medullary region was significantly higher only in the treated male group than in the male control group. Comparing the studied control and treated rat groups, no differences in thymocyte distribution by cell cycle phase were found.

4.2. The effect on rats' daily urine after single-day and long-term treatment with VPA–NaDCA

Compared to the respective controls, there was no impact of the combination treatment on daily diuresis in male and female groups during the first 24 hours. However, after 28 days of VPA–NaDCA treatment, daily diuresis was significantly increased only in the treated male group.

One-day treatment with VPA–NaDCA significantly reduced the creatinine levels in the daily urine of females only, but no effect was observed in the studied rat groups after 28 days of treatment.

Comparing the groups of males and females treated with the combination for one day with their respective controls, no changes were found in the levels of K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , or Mg^{2+} in the daily urine. The K^+ level in the daily urine of female control was significantly lower than that of males.

Combination treatment for 28 days significantly increased the excretion of K^+ , Na^+ , and Cl^- only in the daily urine of male rats. Compared to the control, the daily urine excretion of Mg^{2+} was significantly increased in treated females, but this effect was not observed in males.

4.3. The effect on rat blood serum after 28-days treatment

Comparison of the studied groups showed no differences in blood urea, creatinine, K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , or Mg^{2+} concentrations.

Compared to the respective controls, 28 days of treatment with VPA–NaDCA significantly reduced the glucose concentration in the blood serum of both males and females. The glucose concentration in the serum of the control groups did not differ between males and females.

Compared to untreated male data, 28-days treatment with the investigational drug significantly reduced testosterone concentration in the blood serum of males.

4.4. The effect of long-term VPA and VPA–NaDCA treatment on the relative expression of *Slc5a8*, *Slc12a2*, and *Slc12a5* in rat thymocytes

The expression of *Slc5a8* and *Slc12a2* in thymocytes of the 8–9-week-old gonad-intact male control group was significantly higher than that of the gonad-intact female control group. The ΔCT values of *Slc5a8* in the intact male and female control groups were statistically significantly higher than those of the corresponding castrated control groups of both genders.

Treatment with VPA significantly reduced the relative expression of *Slc5a8* in thymocytes of both the intact and castrated male groups. In contrast

to the treated intact male group, VPA treatment increased the expression of *Slc5a8* in the intact female group. VPA treatment had no effect on the gene expression in thymocytes of the castrated female group.

Treatment with VPA significantly reduced the expression of *Slc12a2* in thymocytes of the intact male group. VPA treatment had no effect on the expression of *Slc12a2* in thymocytes of the castrated animal groups and the intact female group.

VPA treatment had no effect on *Slc12a5* expression in thymocytes of the intact male group, but significantly increased *Slc12a5* expression in the intact female group. Compared to the respective controls, VPA treatment suppressed the relative expression of *Slc12a5* in thymocytes of the castrated rat groups, significantly only in the male group.

Comparing the expression of *Slc12a5* and *Slc12a2* in the control groups of both genders (9–10-week-old rats), the male control group had higher expression of the studied genes. Comparing the studied rat groups, no change in *Slc5a8*, *Slc12a2*, and *Slc12a5* expression after treatment with VPA–NaDCA was found.

4.5. Comparison of GBM U87 and T98G cells and their tumors on the CAM

Comparing the frequency of U87 and T98G tumor control invasion into the CAM, CAM thickness under the tumors, the number of blood vessels in mesenchyme, we found no differences. The expression of the PCNA, EZH2, and p53 markers of the U87 and T98G tumor control cells on the CAM was similar.

U87 and T98G control cells do not express *SLC5A8* and *CDH1*. The expressions of *SLC12A2* and *CDH2* in U87-control cells were significantly lower than in T98G-control cells. *SLC12A5* was expressed in U87-controls and *SLC12A5* was not expressed in T98G cells.

4.6. The effect of TMZ on U87 and T98G tumors *in vivo and in vitro*

The frequency of U87 tumor invasion was lowest in the group treated with 100 μmol TMZ. The invasion frequency, number of blood vessels in mesenchyme, the expression of PCNA-positive cells of TMZ-treated groups was significantly lower than in the control group. The CAM thickness under U87 control tumors and 50 μmol TMZ-treated tumors did not differ, but treatment with 100 μmol TMZ significantly reduced the CAM thickness under the U87 tumors. Comparing the groups of U87 tumors treated with TMZ, the expression of PCNA-positive cells was significantly lower in the U87-

100 μmol TMZ group tumors. Compared to control, treatment of U87 tumors with TMZ doses significantly reduced the frequency of EZH2- and p53-positive cells in the tumors.

Treatment of the T98G tumor with TMZ significantly reduced the frequency of invasion into the CAM and the number of blood vessels in the CAM under TMZ-treated tumor groups. Treatment with TMZ significantly reduced CAM thickness under T98G-100 μmol TMZ tumors. Compared to T98G-control, TMZ significantly reduced the expression of PCNA-, EZH2-, and p53-positive cells in T98G tumors. A significant difference in p53 expression due to TMZ treatment was found: the expression in T98G-100 μmol TMZ tumors was significantly lower than in T98G-50 μmol TMZ tumors.

The expression of *SLC5A8* and *CDH1* was silent in the U87-TMZ cell group. Compared to the U87-control cells, there were no differences in *SLC12A2*, *SLC12A5*, and *CDH2* expressions of U87 cells treated with TMZ.

SLC5A8, *SLC12A5*, and *CDH1* expressions were not detected in TMZ-treated T98G cells. The expressions of *SLC12A2* and *CDH2* in TMZ-treated T98G cells did not differ from control cells.

The expression of *SLC12A2* and *CDH2* was significantly higher in TMZ-treated T98G cells than in the corresponding TMZ-treated U87 cells.

4.7. The effect of MgDCA on U87 and T98G tumors *in vivo* and *in vitro*

Treatment of U87 tumors with MgDCA significantly reduced the frequency of tumor invasion into the CAM and blood vessels in the CAM mesenchyme under tumors treated with MgDCA. Compared to control, treatment of U87 tumors with 5 mmol MgDCA significantly reduced the CAM thickness under the tumor and reduced the number of PCNA- and EZH2-positive cells in U87 tumors. Compared to U87-control, the number of p53-positive cells was significantly lower in U87 tumors treated with both MgDCA doses.

Compared to T98G-control, treatment with MgDCA significantly reduced the frequency of invasion of the T98G tumor into the CAM, CAM thickness under tumors and blood vessels in CAM mesenchyme under MgDCA-treated tumor groups. Compared to the 2.5 mmol MgDCA treated group, the dose of 5 mmol MgDCA was more effective in reducing the frequency of invasion. Compared to control, treatment of T98G tumors with MgDCA significantly reduced the number of PCNA-positive cells in the tumors. The number of EZH2-positive cells did not differ between T98G-control and T98G tumors

treated with MgDCA. The number of p53-positive cells in T98G-5 mmol MgDCA group tumors was significantly lower than in control.

SLC5A8 and *CDH1* expression was silent in the MgDCA-treated U87 cells. Compared to U87-control, there was no difference in the expressions of *SLC12A2*, *SLC12A5*, and *CDH2* in MgDCA-treated U87 cells. The expression of *CDH2* in the U87-0.75 mmol MgDCA group was significantly higher than that of the U87-1.5 mmol MgDCA group.

SLC5A8, *SLC12A5*, and *CDH1* expression was not detected in T98G cells with treated MgDCA. Compared to T98G-control, T98G cells treated with MgDCA showed significantly lower expression of *SLC12A2*, but there was no difference in expression. The T98G-control group had significantly higher *CDH2* expression than the T98G-MgDCA-treated groups.

Comparison of *CDH2* expression between the U87 and T98G groups revealed that the expression of this marker was lower in U87-0.75 mmol MgDCA cell groups than in the corresponding T98G cell groups.

4.8. The effect of VPA on U87 and T98G cells *in vitro*

Treatment of cells with 1.5 mmol VPA induced *SLC5A8* expression in U87 cells, but this expression was low. VPA at 0.75 mmol and 0.5 mmol had no effect on the expression of *SLC5A8* in U87 cells and no gene expression was observed. Treatment of T98G cells with different doses of VPA had no effect on *SLC5A8* expression.

VPA treatment did not affect *SLC12A2* expression in U87 cells. The T98G cells treated with 0.75 mmol VPA had significantly higher expression of *SLC12A2* than control cells. The expression of *SLC12A2* in the T98G-1.5 mmol VPA and T98G-0.5 mmol VPA groups was not different from that of the T98G-control group. The expression of this marker in the T98G-0.5 mmol VPA group was significantly lower than that of the T98G-0.75 mmol VPA and the T98G-1.5 mmol VPA groups. The T98G cell groups treated with VPA had significantly higher expression of *SLC12A2* than the respective U87 cell groups.

Treatment of U87 cells with VPA significantly increased *SLC12A5* expression. No difference was found when comparing the gene expression in the U87 groups treated with different doses of VPA. No expression of *SLC12A5* was detected in T98G control cells and in VPA-treated cell groups.

Treatment of U87 cells with VPA had no effect on *CDH1* expression, and expression was not detected. *CDH1* expression was detectable in T98G-1.5 mmol VPA and T98G-0.75 mmol VPA cells, whereas cells in the T98G-control and T98G-0.5 mmol VPA groups did not express the *CDH1* gene.

Compared to U87 control cells, *CDH2* expression was significantly higher in the U87-1.5 mmol group. There was no difference in *CDH2* expression between U87 control cells and treated with 0.75 mmol or 0.5 mmol VPA. U87-1.5 mmol VPA cells showed significantly higher expression of *CDH2* than U87-0.75 mmol VPA cells. *CDH2* expression in U87 cells treated with 1.5 mmol and 0.5 mmol VPA did not differ. Compared to controls, all doses of VPA significantly increased *CDH2* expression in T98G cells. Comparison of the VPA-treated T98G groups showed no difference in *CDH2* expression. Comparison of *CDH2* expression between U87 and T98G cells showed that T98G cells treated with VPA had higher gene expression than the corresponding U87 cells.

4.9. The effect of VPA–MgDCA on U87 and T98G tumors *in vivo* and *in vitro*. Comparison with the effect of MgDCA and TMZ

Treatment of U87 tumors with VPA–MgDCA significantly reduced the frequency of tumor invasion into the CAM and the number of blood vessels in CAM mesenchyme under VPA–MgDCA-treated tumor groups. No significant differences in invasion frequency were found when comparing the MgDCA-, and VPA–DCA-treated U87 groups. The frequency of U87 tumor invasion in the group treated with 100 μ mol TMZ was significantly lower than in the VPA–MgDCA-treated group. The CAM thickness was greatest in the U87 VPA–MgDCA-treated tumor group, with a significant difference observed when compared to the MgDCA-treated tumor groups. The CAM thickness in the TMZ-treated U87 tumor groups was significantly lower than in the VPA–MgDCA-treated tumor group. When comparing U87 groups treated with MgDCA- and VPA–MgDCA-treated tumors, no significant difference in the number of blood vessels was found. The number of blood vessels under U87-100 μ mol TMZ tumor group in CAM mesenchyme was lower than in the U87 VPA–MgDCA-treated tumor group. Compared to U87-control, treatment of tumors with VPA–MgDCA significantly reduced the number of PCNA-, EZH2-, and p53-positive cells in U87 tumors. The expression of PCNA- and EZH2-positive cells in U87-100 μ mol TMZ group was significantly lower compared to U87-VPA–MgDCA tumor group. Comparison among U87 tumor VPA–MgDCA- and MgDCA-treated groups showed no significant difference in the number of EZH2-positive cells. The number of p53-positive cells in U87-MgDCA-treated groups was lower than in the U87-VPA–MgDCA group. The VPA–MgDCA-treated group had a significantly higher number of p53-positive cells compared to the U87-100 μ mol TMZ group.

The frequency of invasion into the CAM, the CAM thickness under tumors and the number of blood vessels under T98G tumors were not significantly different between the VPA–MgDCA-treated and control groups. Compared to the VPA–MgDCA-treated group, the dose of 5 mmol MgDCA was more effective in reducing the frequency of invasion. The invasion frequency in the T98G-100 μ mol TMZ group was significantly lower than in the group treated with VPA–MgDCA. The CAM thickness under T98G-5 mmol MgDCA tumors was significantly lower than under VPA–MgDCA-treated T98G tumors. In the VPA–MgDCA-treated T98G tumor groups, the number of blood vessels in the CAM was significantly higher compared to the MgDCA- and TMZ-treated tumor groups. The number of PCNA-positive cells in T98G-control and T98G tumors VPA–MgDCA-treated group did not differ. The number of PCNA-, EZH2-, and p53-positive cells in tumors treated with MgDCA doses did not differ from the T98G-VPA–MgDCA tumor group. The number of PCNA-positive cells was significantly higher in T98G-VPA–MgDCA tumors compared to T98G-50 μ mol TMZ group tumors. The number of EZH2-positive cells in both TMZ-treated T98G groups was significantly lower than in the T98G-VPA–MgDCA tumor group. The expression of p53 in the T98G-VPA–MgDCA tumor group was highest and significantly different compared to the MgDCA- and TMZ-treated groups.

Treatment of U87 cells with both VPA–MgDCA combinations upregulated *SLC5A8* and *SLC12A5* expression, and no differences were observed when comparing to the VPA–MgDCA-treated cell groups. Compared to U87-control, there was no difference in *SLC12A2* expression among all groups of U87 cells treated with investigational preparations. The *SLC12A5* expression of the MgDCA-treated U87 cell group was significantly lower than that of the combination-treated cell groups. Compared to the U87-50 μ mol TMZ group, *SLC12A5* expression was significantly higher in the U87-VPA–MgDCA cell groups. No *CDH1* expression was detected in cells from the U87-0.75 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA group. Treatment with 2 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA activated *CDH1* expression in U87 cells. *CDH2* expression was not significantly different among the U87 controls and cells treated with VPA–MgDCA. The expression of *CDH2* in the U87-0.75 mmol MgDCA group was significantly higher than that of cells of the U87-2 mmol VPA–1.5 mmol MgDCA group.

SLC5A8 and *CDH1* expression was not detected in T98G cells treated with VPA–MgDCA. The expression of *SLC12A2* in the T98G-VPA–MgDCA groups was significantly lower than that of the control, but there was no difference of expression in treated groups. Compared to the T98G-1.5 mmol MgDCA group, *SLC12A2* expression was significantly higher in T98G cells treated with VPA–MgDCA. The expression of *SLC12A2* in the

T98G-0.75 mmol MgDCA cell group was significantly lower than in the T98G-0.75 mmol VPA-1.5 mmol MgDCA cell group. Compared to the T98G-50 μ mol TMZ group, *SLC12A2* expression was significantly lower in the T98G-VPA-MgDCA groups. No expression was detected in T98G cells treated with 0.75 mmol VPA-1.5 mmol MgDCA. Treatment with 2 mmol VPA-1.5 mmol MgDCA activated *SLC12A5* expression in T98G cells. Compared to control, treatment of T98G cells with VPA-MgDCA had no effect on *CDH2* expression. MgDCA-treated T98G cells had significantly lower expression of *CDH2* than T98G cells treated with VPA-MgDCA. No differences in *CDH2* expression were found when comparing the VPA-MgDCA-treated T98G groups. The T98G-50 μ mol TMZ group had significantly higher *CDH2* expression than the T98G-0.75 mmol VPA-1.5 mmol MgDCA cell group.

The expression of *SLC12A2* and *CDH2* was significantly higher in the T98G-VPA-MgDCA cell groups than in the corresponding U87-VPA-MgDCA groups. Comparison of *SLC12A5* expression between U87 and T98G cells treated with 2 mmol VPA-1.5 mmol MgDCA showed a significantly lower expression of *SLC12A5* in T98G cells.

4.10. The effect of VPA-MgDCA on patient's GBM primary cell tumor on the CAM *in vivo* and cells *in vitro*

The treatment did not affect the frequency of invasion into the CAM, the CAM thickness under tumors, or the number of blood vessels in the CAM under the 22-SANTA-2F tumors.

Compared with the 22-SANTA-2F control, treatment with VPA-MgDCA significantly reduced the number of PCNA- and EZH2-positive cells in 22-SANTA-2F tumors but had no effect on p53 expression.

Sequencing analysis was performed for 81 pro-apoptotic genes. Compared with 22-SANTA-4F cell control, after treatment with VPA-MgDCA, significant changes were observed in the expression of 33 pro-apoptotic genes: the expression of *HIPK2*, *CASP2*, *FOXO3*, *CASP6*, *CASP1*, *FEM1B*, *BCL10*, *FAF1*, *CYCS*, *TNF*, *DFFA*, *CASP8*, *BBC3*, *PRKCD*, *BMF*, *CDKN1A*, *SPN*, *AIFM1*, *CD28*, *BIK*, and *IL24* was significantly increased; VPA-MgDCA treatment significantly reduced the expression of *LTBR*, *TRAF2*, *NOD1*, *PIDD1*, *TP53BP2*, *TP53*, *TNFRSF10B*, *RIPK1*, *FAS*, *ABL1*, *TRADD*, and *IL1B*.

5. CONCLUSIONS

1. It was found that 28-day treatment with VPA–NaDCA resulted in a significant increase in kidney weight in rats of both genders, changes in daily diuresis and ion excretion in the daily urine, which were gender-related, a decrease in serum glucose levels in males and females, and a reduction in the concentration of testosterone in the blood of males. VPA–NaDCA did not affect the weight of the thymus, but significantly increased the number of Hassall's corpuscles in the medulla of the male thymus. The treatment did not affect the expression of *Slc5a8*, *Slc12a2*, and *Slc12a5* in thymocytes or the distribution of thymocytes according to the cell cycle phase.
2. The significant effect of VPA on the expression of *Slc5a8*, *Slc12a2*, and *Slc12a5* in rats depended on gender and sex hormones – differences were found in the effect of treatment on the expression of thymocyte genes in gonad-intact and castrated animals. Differences were found in the expressions of *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* between control and VPA-treated U87 and T98G cells; the effect of treatment on cells depended on the VPA dose.
3. Differences in the effects of the studied medicinal preparations on tumors on the CAM and their cells were found:
 - 3.1. MgDCA significantly reduced the frequency of U87 and T98G tumor invasion into the CAM, the number of blood vessels in the mesenchyme, expression of PCNA, EZH2, and p53 in U87 tumors and reduced the expression of PCNA and p53 in T98G tumors; the effect was depended on the MgDCA dose. MgDCA had no effect on expression of the studied genes in U87 cells, but in T98G cells, it significantly reduced the expression of *SLC12A2* and *CDH2*.
 - 3.2. VPA–MgDCA significantly reduced the frequency of U87 tumor invasion, the number of blood vessels in the mesenchyme under the tumor, and the expression of PCNA, EZH2, and p53 in the tumor. VPA–MgDCA activated the expression of *SLC5A8* and increased the expression of *SLC12A5* and *CDH1* in U87 cells. In T98G cells, VPA–MgDCA reduced the expression of *SLC12A2* and activated the expression of *SLC12A5*.
 - 3.3. TMZ significantly reduced the invasion frequency of U87 and T98G tumors, CAM thickness, the number of blood vessels under the tumor, and expression of PCNA, EZH2, and p53 in the tumor. TMZ had no effect on the expression of *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* in U87 and T98G cells.

4. Treatment with VPA–MgDCA reduced the expression of PCNA and EZH2 in patient’s 22-SANTA-2F tumor cells and had no effect on p53 expression in the tumor, as well as on the expression of *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2*. Gene sequencing analysis showed that VPA–MgDCA increased the expression of 21 and reduced the expression of 12 pro-apoptotic genes in patient’s 22-SANTA-4F cells.

LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. 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.
2. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol* 2019, 21(S5):1–100.
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 2015–2019. *Neuro Oncol* 2022, 24(5):V1–95.
4. 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.
5. 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):1231–9.
6. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: Standard of care and future directions. 2007, 25(26):4127–36.
7. 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.
8. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. 2017, 18(1):3–9.
9. Sengupta S, Marrinan J, Frishman C, Sampath P. Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. *Clin Dev Immunol* 2012, 2012:831090.
10. Seker-Polat F, Pinarbasi Degirmenci N, Solaroglu I, Bagci-Onder T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers (Basel)* 2022, 14(2):443.
11. Waite KA, Cioffi G, Kruchko C, Patil N, Brat DJ, Bruner JM, et al. Aligning the Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) histology groupings with current definitions. *Neurooncol Pract* 2022, 9(4):317–27.
12. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. 2017, 14(2):284–97.
13. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. 2016, 3(3):198–210.
14. Rayati M, Mansouri V, Ahmadbeigi N. Gene therapy in glioblastoma multiforme: Can it be a role changer? *Heliyon* 2024, 10(5):e27087.
15. 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.
16. Sutendra G, Michelakis ED. Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol* 2013, 3:38.
17. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi M. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg* 2016, 7(1):17–20.
18. 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* 2014, 17(1):70–80.

19. 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 - PubMed. 2019, 28(16):2738–51.
20. Stacpoole PW. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017, 109(11).
21. 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? 2012, 29(3–4): 373–80.
22. Ward NP, Poff AM, Koutnik AP, D’Agostino DP. Complex I inhibition augments dichloroacetate cytotoxicity through enhancing oxidative stress in VM-M3 glioblastoma cells. Zhang J, editor. *PLoS One* 2017, 12(6):e0180061.
23. Chinopoulos C, Seyfried TN. Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN Neuro* 2018, 10:1759091418818261.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Soria-Castro R, Schcolnik-Cabrera A, Rodríguez-López G, Campillo-Navarro M, Puebla-Osorio N, Estrada-Parra S, et al. Exploring the drug repurposing versatility of valproic acid as a multifunctional regulator of innate and adaptive immune cells. *J Immunol Res* 2019, 2019:9678098.
28. 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 HHS Public Access. 2011, 30(38):4026–37.
29. 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.
30. Loras A, Gonzalez-Bonet L, Gutierrez-Arroyo J, Martinez-Cadenas C, Marques-Torrejon M. Neural Stem Cells as Potential Glioblastoma Cells of Origin. 2023, 13(4):905.
31. Arora A, Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biol Ther* 2019, 20(8):1083.
32. Aydin S, Darko K, Detchou D, Barrie U. A call for clinical trials in glioblastoma multiforme for interleukin 4, interleukin 6, interleukin 13 and CD40. *Neurosurg Rev* 2024, 47(1):571.
33. Dakal TC, Kakde GS, Maurya PK. Genomic, epigenomic and transcriptomic landscape of glioblastoma. *Metab Brain Dis* 2024, .

34. Mokhfi FZ, Al Amin M, Zehravi M, Sweilam SH, Arjun UVNV, Gupta JK, et al. Alkaloid-based modulators of the PI3K/Akt/mTOR pathway for cancer therapy: Understandings from pharmacological point of view. *Chem Biol Interact* 2024, 402:111218.
35. 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 Suppl 3:93–101.
36. Krex D, Klink B, Hartmann C, Von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 2007, 130(Pt 10):2596–606.
37. Johnson DR, O’Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol* 2012, 107(2):359–64.
38. Mohammad SN, Hopfinger AJ. Chemical reactivity of a methyl diazonium ion with nucleophilic centers of DNA bases. *J Theor Biol* 1980, 87(2):401–19.
39. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2000, 6(7):2585–97.
40. Wick W, Platten M. Understanding and targeting alkylator resistance in glioblastoma. *Cancer Discov* 2014, 4(10):1120–2.
41. Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro Oncol* 2014, 16(12):1575–84.
42. 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.
43. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012, 488(7412):522–6.
44. Mesrati MH, Behrooz AB, Abuhamad AY, Syahir A. Understanding Glioblastoma Biomarkers: Knocking a Mountain with a Hammer. *Cells* 2020, 9(5):1236.
45. 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.
46. Corder R, Black KL, Wheeler CJ. Exploitation of adaptive evolution in glioma treatment. *CNS Oncol* 2013, 2(2):171–9.
47. 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.
48. Tang JB, Svilar D, Trivedi RN, Wang XH, Goellner EM, Moore B, et al. N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase beta modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. *Neuro Oncol* 2011, 13(5):471–86.
49. 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.
50. 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.
51. Azuaje F, Tiemann K, Nicolou SP. Therapeutic control and resistance of the EGFR-driven signaling network in glioblastoma. *Cell Commun Signal* 2015, 13(1):23.
52. Del Alcazar CRG, Todorova PK, Habib AA, Mukherjee B, Burma S. Augmented HR Repair Mediates Acquired Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Mol Cancer Res* 2016, 14(10):928–40.

53. Erasmus H, Gobin M, Niclou S, Van Dyck E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2016, 769:19–35.
54. Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduct Target Ther* 2017, 2:17040.
55. Westphal M, Maire CL, Lamszus K. EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. *CNS Drugs* 2017, 31(9):723–35.
56. Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 2017, 8(35):59950–64.
57. Velpula KK, Guda MR, Sahu K, Tuszynski J, Asuthkar S, Bach SE, et al. Metabolic targeting of EGFRvIII/PDK1 axis in temozolomide resistant glioblastoma. *Oncotarget* 2017, 8(22):35639–55.
58. Velpula KK, umar, Tsung AJ. PDK1: a new therapeutic target for glioblastoma? *CNS Oncol* 2014, 3(3):177–9.
59. Muñoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis* 2012, 3(1):e248.
60. Steiner HH, Karcher S, Mueller MM, Nalbantis E, Kunze S, Herold-Mende C. Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. *J Neurooncol* 2004, 66(1–2):129–38.
61. Joensuu H, Puputti M, Sihto H, Tynninen O, Nupponen NN. Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol* 2005, 207(2):224–31.
62. Sun Y, Sun Y, Yue S, Wang Y, Lu F. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Top Med Chem* 2019, 18(28):2420–8.
63. Würth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci* 2014, 8:144.
64. Wang S, Chen C, Li J, Xu X, Chen W, Li F. The CXCL12/CXCR4 axis confers temozolomide resistance to human glioblastoma cells via up-regulation of FOXM1. *J Neurol Sci* 2020, 414:116837.
65. Qian Z, Ren L, Wu D, Yang X, Zhou Z, Nie Q, et al. Overexpression of FoxO3a is associated with glioblastoma progression and predicts poor patient prognosis. *Int J Cancer* 2017, 140(12):2792–804.
66. Shi J, Zhang L, Shen A, Zhang J, Wang Y, Zhao Y, et al. Clinical and biological significance of forkhead class box O 3a expression in glioma: mediation of glioma malignancy by transcriptional regulation of p27kip1. *J Neurooncol* 2010, 98(1):57–69.
67. Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer* 2009, 125(12):2863–70.
68. Nogueira L, Ruiz-Ontañón P, Vazquez-Barquero A, Moris F, Fernandez-Luna JL. The NFkappaB pathway: a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget* 2011, 2(8):646–53.
69. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3(6):401–10.
70. 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.
71. 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.

72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. Swiatek-Machado K, Kaminska B. STAT Signaling in Glioma Cells. *Adv Exp Med Biol* 2020, 1202:203–22.
77. Lu Y, Zhou J, Xu C, Lin H, Xiao J, Wang Z, et al. JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 2008, 21(4):305–14.
78. Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F. Constitutively activated STAT3 frequently co-expresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Cancer Res* 2008, 14(19):6042–54.
79. 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.
80. Xu H, Lai W, Zhang Y, Liu L, Luo X, Zeng Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer* 2014, 14:330.
81. Liang H, Chen G, Li J, Yang F. Snail expression contributes to temozolomide resistance in glioblastoma. *Am J Transl Res* 2019, 11(7):4277–89.
82. Lesueur P, Lequesne J, Grellard JM, Dugué A, Coquan E, Brachet PE, et al. Phase I/IIa study of concomitant radiotherapy with olaparib and temozolomide in unresectable or partially resectable glioblastoma: OLA-TMZ-RTE-01 trial protocol. *BMC Cancer* 2019, 19(1):198.
83. Xu M, Li G, Zhang H, Chen X, Li Y, Yao Q, et al. Sequential delivery of dual drugs with nanostructured lipid carriers for improving synergistic tumor treatment effect. *Drug Deliv* 2020, 27(1):983–95.
84. Angom RS, Nakka NMR, Bhattacharya S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sci* 2023, 13(11):1536.
85. Hilf N, Kuttruff-Coqui S, Frenzel K, Bukur V, Stevanović S, Gouttefangeas C, et al. Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 2019, 565(7738):240–5.
86. Westphal M, Ylä-Herttua S, Martin J, Warnke P, Menci P, Eckland D, et al. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013, 14(9):823–33.
87. Medikonda R, Dunn G, Rahman M, Fecci P, Lim M. A review of glioblastoma immunotherapy. *J Neurooncol* 2021, 151(1):41–53.
88. Giles AJ, Hutchinson MKND, Sonnemann HM, Jung J, Fecci PE, Ratnam NM, et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2018, 6(1):51.

89. Stakišaitis D, Kapočius L, Valančiūtė A, Balnyte I, Tamošutis 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.
90. Roger T, Lugrin J, Le Roy D, Goy G, Mombelli M, Koessler T, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 2011, 117(4):1205–17.
91. Ayasoufi K, Pfaller CK, Evgin L, Khadka RH, Tritz ZP, Goddery EN, et al. Brain cancer induces systemic immunosuppression through release of non-steroid soluble mediators. 2020, 143(12):3629–52.
92. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007, 1(1):19–25.
93. Lee DH, Ryu HW, Won HR, Kwon SH. Advances in epigenetic glioblastoma therapy. *Oncotarget* 2017, 8(11):18577–89.
94. Staberg M, Michaelsen SR, Rasmussen RD, Villingshøj M, Poulsen HS, Hamerlik P. Inhibition of histone deacetylases sensitizes glioblastoma cells to lomustine. 2017, 40(1):21–32.
95. Li S, Chen X, Mao L, Zahid KR, Wen J, Zhang L, et al. Histone deacetylase 1 promotes glioblastoma cell proliferation and invasion via activation of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Brain Res* 2018, 1692:154–62.
96. Liu JR, Yu CW, Hung PY, Hsin LW, Chern JW. High-selective HDAC6 inhibitor promotes HDAC6 degradation following autophagy modulation and enhanced antitumor immunity in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* 2019, 163:458–71.
97. Zhao LM, Zhang JH. Histone Deacetylase Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Curr Med Chem* 2019, 26(17):2990–3008.
98. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5(9):769–84.
99. Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* 2008, 269(1):7–17.
100. Bezecey P. Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience. 2014, 31(6):985.
101. 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(11):46.
102. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Kall BA, Kispert DB. Stereotactic histologic correlations of computed tomography- and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. *Mayo Clin Proc* 1987, 62(6):450–9.
103. Prados MD, Byron SA, Tran NL, Phillips JJ, Molinaro AM, Ligon KL, et al. Toward precision medicine in glioblastoma: the promise and the challenges. *Neuro Oncol* 2015, 17(8):1051–63.
104. Mowforth OD, Brannigan J, El Khoury M, Sarathi CIP, Bestwick H, Bhatti F, et al. Personalised therapeutic approaches to glioblastoma: A systematic review. *Front Med (Lausanne)* 2023, 10:1166104.
105. Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril* 2018, 109(6):952–63.
106. McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, Mastrogiannis GM, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008, 455(7216):1061–8.

107. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCHH, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008, 321(5897):1807–12.
108. Liu A, Hou C, Chen H, Zong X, Zong P. Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. *Front Oncol* 2016, 6:16.
109. Parker NR, Khong P, Parkinson JF, Howell VM, Wheeler HR. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Front Oncol* 2015, 5:55.
110. Mair R, Moulriere F. Cell-free DNA technologies for the analysis of brain cancer. *Br J Cancer* 2022, 126(3):371–8.
111. Moulriere F, Smith CG, Heider K, Su J, van der Pol Y, Thompson M, et al. Fragmentation patterns and personalized sequencing of cell-free DNA in urine and plasma of glioma patients. *EMBO Mol Med* 2021, 13(8):e12881.
112. Scorsetti M, Ducray F, Razis ED, 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.
113. Park JH, Feroze AH, Emerson SN, Mihalas AB, Keene CD, Cimino PJ, et al. A single-cell based precision medicine approach using glioblastoma patient-specific models. *NPJ Precis Oncol* 2022, 6(1):55.
114. Loong HHF, Wong AM, Chan DTM, Cheung MSH, Chow C, Ding X, et al. Patient-derived tumor organoid predicts drugs response in glioblastoma: A step forward in personalized cancer therapy? 2020, 78:400–2.
115. Pawlowski KD, Duffy JT, Babak M V., Balyasnikova I V. Modeling glioblastoma complexity with organoids for personalized treatments. *Trends Mol Med* 2023, 29(4):282–96.
116. Jovčevska I. Next Generation Sequencing and Machine Learning Technologies Are Painting the Epigenetic Portrait of Glioblastoma. *Front Oncol* 2020, 10:509645.
117. Zeitberger AM, Putora PM, Hofer S, Schucht P, Migliorini D, Hottinger AF, et al. Next generation sequencing in adult patients with glioblastoma in Switzerland: a multi-centre decision analysis. *J Neurooncol* 2022, 158(3):359–67.
118. 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. 2022, 148(5):1033–43.
119. Bernhard C, Reita D, Martin S, Entz-Werle N, Dontenwill M. Glioblastoma Metabolism: Insights and Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 2023, 24(11):9137.
120. Tataranni T, Piccoli C. Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 2019:8201079.
121. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 2019, 9:1143.
122. Pillai SR, Damaghi M, Marunaka Y, Spugnini EP, Fais S, Gillies RJ. Causes, Consequences, and Therapy of Tumors Acidosis. *Cancer Metastasis Rev* 2019, 38(1–2):205–22.
123. Agnihotri S, Zadeh G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro Oncol* 2016, 18(2):160–72.
124. 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.

125. Stacpoole PW. Lactic acidosis and other mitochondrial disorders. *Metabolism* 1997, 46(3):306–21.
126. Stakišaitis D, Juknevičienė M, Damanskiene 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).
127. Kankotia S, Stacpoole PW. Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? 2014, 1846(2):617–29.
128. 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.
129. 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 (Berl)* 2013, 91(6):749–58.
130. Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer* 2008, 99(7):989–94.
131. 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.
132. Study Details | The Safety and Efficacy of DCA for the Treatment of Brain Cancer | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 Jul 31]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00540176#more-information>.
133. 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.
134. Papandreou I, Goliassova T, Denko NC. Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer* 2011, 128(5):1001–8.
135. Amara S, Tiriveedhi V. Inflammatory role of high salt level in tumor microenvironment (Review). *Int J Oncol* 2017, 50(5):1477–81.
136. Amara S, Ivy MT, Myles EL, Tiriveedhi V. Sodium channel γ ENaC mediates IL-17 synergized high salt induced inflammatory stress in breast cancer cells. *Cell Immunol* 2016, 302:1–10.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. Happold C, Gorlia T, Chinot O, Gilbert MR, Nabors LB, Wick W, et al. Does Valproic Acid or Levetiracetam Improve Survival in Glioblastoma? A Pooled Analysis of

- Prospective Clinical Trials in Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Clin Oncol* 2016, 34(7):731–9.
143. Natale G, Fini E, Calabrò PF, Carli M, Scarselli M, Bocci G. Valproate and lithium: Old drugs for new pharmacological approaches in brain tumors? *Cancer Lett* 2023, 560:216125.
 144. Krauze A V., Zhao Y, Li MC, Shih J, Jiang W, Tasci E, et al. Revisiting Concurrent Radiation Therapy, Temozolomide, and the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid for Patients with Glioblastoma-Proteomic Alteration and Comparison Analysis with the Standard-of-Care Chemoirradiation. *Biomolecules* 2023, 13(10):1499.
 145. Tseng JH, Chen CY, Chen PC, Hsiao SH, Fan CC, Liang YC, et al. Valproic acid inhibits glioblastoma multiforme cell growth via paraoxonase 2 expression. *Oncotarget* 2017, 8(9):14666–79.
 146. Han W, Guan W. Valproic Acid: A Promising Therapeutic Agent in Glioma Treatment. *Front Oncol* 2021, 11:687362.
 147. 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.
 148. Bell EH, Zhang P, Fisher BJ, Macdonald DR, McElroy JP, Lesser GJ, et al. Association of MGMT Promoter Methylation Status With Survival Outcomes in Patients With High-Risk Glioma Treated With Radiotherapy and Temozolomide: An Analysis From the NRG Oncology/RTOG 0424 Trial. *JAMA Oncol* 2018, 4(10):1405–9.
 149. Riva G, Butta V, Cilibrasi C, Baronchelli S, Redaelli S, Dalprà L, et al. Epigenetic targeting of glioma stem cells: Short-term and long-term treatments with valproic acid modulate DNA methylation and differentiation behavior, but not temozolomide sensitivity. *Oncol Rep* 2016, 35(5):2811–24.
 150. Chen JC, Lee IN, Huang C, Wu YP, Chung CY, Lee MH, et al. Valproic acid-induced amphiregulin secretion confers resistance to temozolomide treatment in human glioma cells. *BMC Cancer* 2019, 19(1):756.
 151. 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.
 152. Cong D, Zhu W, S. Kuo J, Hu S, Sun D. Ion transporters in brain tumors. *Curr Med Chem* 2015, 22(10):1171–81.
 153. 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.
 154. East MP, Laitinen T, Asquith CRM. WNK kinases: an untapped opportunity to modulate ion transport. *Nat Rev Drug Discov* 2020, 19(12):828.
 155. Nisha Y, Bobby Z, Wadwekar V. Biochemical derangements related to metabolic syndrome in epileptic patients on treatment with valproic acid. *Seizure* 2018, 60:57–60.
 156. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJJ, Perstin J, et al. Oxidative Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits, and Cancer. 2009, 108(1):4–18.
 157. Gagnard P, Savouroux S, Liere P, Pianos A, Théron P, Schumacher M, et al. Effect of Sex Differences on Brain Mitochondrial Function and Its Suppression by Ovariectomy and in Aged Mice. *Endocrinology* 2015, 156(8):2893–904.
 158. Aulwurm UR, Brand KA. Increased formation of reactive oxygen species due to glucose depletion in primary cultures of rat thymocytes inhibits proliferation. *Eur J Biochem* 2000, 267(18):5693–8.

159. Zhang W, He Y, Kang X, Wang C, Chen F, Kang Z, et al. Association between dietary minerals and glioma: A case-control study based on Chinese population. *Front Nutr* 2023, 10:1118997.
160. Chandra S, Parker DJ, Barth RF, Pannullo SC. Quantitative imaging of magnesium distribution at single-cell resolution in brain tumors and infiltrating tumor cells with secondary ion mass spectrometry (SIMS). *J Neurooncol* 2016, 127(1):33–41.
161. 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.
162. Fiorentini D, Cappadone C, Farruggia G, Prata C. Magnesium: Biochemistry, Nutrition, Detection, and Social Impact of Diseases Linked to Its Deficiency. *Nutrients* 2021, 13(4):1136.
163. Glasdam SM, Glasdam S, Peters GH. The Importance of Magnesium in the Human Body. 2016, 73:169–93.
164. Ashique S, Kumar S, Hussain A, Mishra N, Garg A, Gowda BHJ, et al. Correction: A narrative review on the role of magnesium in immune regulation, inflammation, infectious diseases, and cancer. *J Health Popul Nutr* 2023, 42(1):117.
165. Wolf FI, Maier JAM, Nasulewicz A, Feillet-Coudray C, Simonacci M, Mazur A, et al. Magnesium and neoplasia: From carcinogenesis to tumor growth and progression or treatment. *Arch Biochem Biophys* 2007, 458(1):24–32.
166. Castiglioni S, Maier JAM. Magnesium and cancer: a dangerous liason. *Magnes Res* 2011, 24(3):S92–100.
167. Yamanaka R, Tabata S, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Soga T, et al. Mitochondrial Mg(2+) homeostasis decides cellular energy metabolism and vulnerability to stress. *Sci Rep* 2016, 6:30027.
168. Maguire D, Neytchev O, Talwar D, McMillan D, Shiels PG. Telomere Homeostasis: Interplay with Magnesium. *Int J Mol Sci* 2018, 19(1):157.
169. Taylor JS, Vigneron DB, Murphy-Boesch J, Nelson SJ, Kessler HB, Coia L, et al. Free magnesium levels in normal human brain and brain tumors: 31P chemical-shift imaging measurements at 1.5 T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(15):6810–4.
170. Franke VL, Breitling J, Boyd PS, Feignier A, Bangert R, Weckesser N, et al. A versatile look-up algorithm for mapping pH values and magnesium ion content using 31P MRSI. *NMR Biomed* 2024, 37(6):e5113.
171. Blaszczyk U, Duda-Chodak A. Magnesium: its role in nutrition and carcinogenesis. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2013, 64(3):165–71.
172. Huang L, Lin R, Chen J, Qi Y, Lin L. Magnesium Ion: A New Switch in Tumor Treatment. *Biomedicines* 2024, 12(8):1717.
173. Koning G, Leverin AL, Nair S, Schwendimann L, Ek J, Carlsson Y, et al. Magnesium induces preconditioning of the neonatal brain via profound mitochondrial protection. *J Cereb Blood Flow Metab* 2019, 39(6):1038–55.
174. 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.
175. Certo M, Tsai CH, Pucino V, Ho PC, Mauro C. Lactate modulation of immune responses in inflammatory versus tumour microenvironments. 2020, 21(3):151–61.
176. DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK, et al. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immunol* 2020, 11:1402.

177. Roesler R, Dini SA, Isolan GR. Neuroinflammation and immunoregulation in glioblastoma and brain metastases: Recent developments in imaging approaches. *Clin Exp Immunol* 2021, 206(3):314–24.
178. Papale M, Buccarelli M, Mollinari C, Russo MA, Pallini R, Ricci-Vitiani L, et al. Hypoxia, Inflammation and Necrosis as Determinants of Glioblastoma Cancer Stem Cells Progression. 2020, 21(8):2660.
179. Tafani M, Di Vito M, Frati A, Pellegrini L, De Santis E, Sette G, et al. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J Neuroinflammation* 2011, 8(1):1–16.
180. Wang L, Liu Z, Balivada S, Shrestha T, Bossmann S, Pyle M, et al. Interleukin-1 β and transforming growth factor- β cooperate to induce neurosphere formation and increase tumorigenicity of adherent LN-229 glioma. *Stem Cell Res Ther* 2012, 3(1):5.
181. Wang K, Karin M. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Adv Cancer Res* 2015, 128:173–96.
182. 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.
183. Nagai N, Kudo Y, Aki D, Nakagawa H, Taniguchi K. Immunomodulation by Inflammation during Liver and Gastrointestinal Tumorigenesis and Aging. *Int J Mol Sci* 2021, 22(5):1–15.
184. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2018, 14(10):576–90.
185. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, Lebrasseur NK, Childs BG, Van De Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011, 479(7372):232–6.
186. Faget DV, Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* 2019, 19(8):439–53.
187. Hamarshah S, Groß O, Brummer T, Zeiser R. Immune modulatory effects of oncogenic KRAS in cancer. *Nat Commun* 2020, 11(1):5439.
188. Gartung A, Yang J, Sukhatme VP, Bielenberg DR, Fernandes D, Chang J, et al. Suppression of chemotherapy-induced cytokine/lipid mediator surge and ovarian cancer by a dual COX-2/sEH inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, 116(5):1698–703.
189. Roca H, Jones JD, Purica MC, Weidner S, Koh AJ, Kuo R, et al. Apoptosis-induced CXCL5 accelerates inflammation and growth of prostate tumor metastases in bone. *J Clin Invest* 2018, 128(1):248–66.
190. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010, 140(6):883–99.
191. Green DR. Ghostly metabolic messages from dying cells. *Nature* 2020, 580(7801):36–7.
192. Henson PM. Cell Removal: Efferocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2017, 33:127–44.
193. Abdel-Razek EAN, Mahmoud HM, Azouz AA. 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(1):667–82.
194. Lu C, Zhou ZW, Jiang Y, Li J, He JB, Zhang C, et al. Sodium dichloroacetate improves migration ability by suppressing LPS-induced inflammation in HTR-8/SVneo cells via the TLR4/NF- κ B pathway. *Iran J Basic Med Sci* 2024, 27(1):16–23.

195. Bian L, Josefsson E, Jonsson IM, Verdrengh M, Ohlsson C, Bokarewa M, et al. Dichloroacetate alleviates development of collagen II-induced arthritis in female DBA/1 mice. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(5):1–10.
196. Ostroukhova M, Goplen N, Karim MZ, Michalec L, Guo L, Liang Q, et al. The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012, 302(3):L300–7.
197. Forteza MJ, Berg M, Edsfeldt A, Sun J, Baumgartner R, Kareinen I, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase regulates vascular inflammation in atherosclerosis and increases cardiovascular risk. *Cardiovasc Res* 2023, 119(7):1524–36.
198. Mainali R, Zabalawi M, Long D, Buechler N, Quillen E, Key CC, et al. Dichloroacetate reverses sepsis-induced hepatic metabolic dysfunction. *Elife* 2021, 10:1–20.
199. Stanevičiūtė J, Urbonienė D, Valančiūtė A, Balnytė I, Vitkauskienė A, Grigalevičienė B, et al. The effect of dichloroacetate on male rat thymus and on thymocyte cell cycle. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2016, 29(4):818–22.
200. Stanevičiūtė J, Juknevičienė M, Balnytė I, Valančiūtė A, Lesauskaite 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.
201. 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. 2018, 16(4):1–11.
202. Larangeira Nóbrega AH, Sampaio Pimentel R, 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.
203. Amirzargar MA, Yaghubi F, Hosseinipana 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.
204. Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruitter 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):205–16.
205. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, et al. Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2013, 23(4):236–41.
206. Naasani I. Compare Analysis, a Bioinformatic Approach to Accelerate Drug Repurposing against Covid-19 and Other Emerging Epidemics. 2020, 26(3):345–51.
207. Andreu S, Ripa I, Bello-Morales R, López-Guerrero JA. Valproic Acid and Its Amidic Derivatives as New Antivirals against Alpha herpes viruses. *Viruses* 2020, 12(12):1356.
208. Nunn AVW, Guy GW, Brysch W, Botchway SW, Frasch W, Calabrese EJ, et al. SARS-CoV-2 and mitochondrial health: implications of lifestyle and ageing. 2020, 17(1):1–21.
209. Bennett RL, Licht JD. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2018, 58:187–207.
210. Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Sodium valproate inhibits production of TNF- α and IL-6 and activation of NF- κ B. *Brain Res* 2000, 857(1–2):246–51.
211. Shyer JA, Flavell RA, Bailis W. Metabolic signaling in T cells. *Cell Res* 2020, 30(8):649–59.
212. Rakitin A, Kōks S, Haldre S. Valproate modulates glucose metabolism in patients with epilepsy after first exposure. *Epilepsia* 2015, 56(11):e172–5.

213. Khan S, Jena G. Valproic Acid Improves Glucose Homeostasis by Increasing Beta-Cell Proliferation, Function, and Reducing its Apoptosis through HDAC Inhibition in Juvenile Diabetic Rat. *J Biochem Mol Toxicol* 2016, 30(9):438–46.
214. Pietruczuk K, Lisowska KA, Grabowski K, Landowski J, Witkowski JM. Proliferation and apoptosis of T lymphocytes in patients with bipolar disorder. *Sci Rep* 2018, 8(1):1–10.
215. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2014, 13(9):673–91.
216. Dowdell KC, Pesnicak L, Hoffmann V, Steadman K, Remaley AT, Cohen JI, et al. Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas-deficient MRL/lpr^{-/-} murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Exp Hematol* 2009, 37(4):487–94.
217. Chen Q, Ouyang DY, Geng M, Xu LH, Zhang YT, Wang FP, et al. Valproic acid exhibits biphasic effects on apoptotic cell death of activated lymphocytes through differential modulation of multiple signaling pathways. *J Immunotoxicol* 2011, 8(3):210–8.
218. Khan O, La Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: Emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol* 2012, 90(1):85–94.
219. Long J, Chang L, Shen Y, Gao WH, Wu YN, Dou HB, et al. Valproic Acid Ameliorates Graft-versus-Host Disease by Downregulating Th1 and Th17 Cells. 2015, 195(4):1849–57.
220. Wu C, Li A, Leng Y, Li Y, Kang J. Histone deacetylase inhibition by sodium valproate regulates polarization of macrophage subsets. *DNA Cell Biol* 2012, 31(4):592–9.
221. Valančiute A, Mozuraite R, Balnyte I, Didžiapetriene J, Matusėvičius P, Stakišaitis D. Sodium valproate effect on the structure of rat glandule thymus: Gender-related differences. 2015, 67(7–8):399–406.
222. Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 2008, 33(6):728–40.
223. 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.
224. Stakišaitis D, Kapočius L, Tatarūnas V, Gečys D, Mickienė A, Tamošūitis 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.
225. 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.
226. 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.
227. 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.

228. Wang L, Kong W, Liu B, Zhang X. Proliferating cell nuclear antigen promotes cell proliferation and tumorigenesis by up-regulating STAT3 in non-small cell lung cancer. 2018, 104:595–602.
229. Kayaselçuk F, Zorludemir S, Gümürdülü D, Zeren H, Erman T. Laboratory Investigation PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *J Neurooncol* 2002, 57:115–21.
230. 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.
231. Yamagishi M, Uchimarū K. Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2017, 29(5):375–81.
232. El Baba R, Pasquereau S, Haidar Ahmad S, Monnien F, Abad M, Bibeau F, et al. EZH2-Myc driven glioblastoma elicited by cytomegalovirus infection of human astrocytes. *Oncogene* 2023, 42(24):2031–45.
233. Kim KH, Roberts CWM. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med* 2016, 22(2):128–34.
234. Sharma S, Wang SA, Yang WB, Lin HY, Lai MJ, Chen HC, et al. First-in-Class Dual EZH2-HSP90 Inhibitor Eliciting Striking Antiglioblastoma Activity *In Vitro* and *In Vivo*. *J Med Chem* 2024, 67(4):2963–85.
235. 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.
236. Huang J, Gou H, Yao J, Yi K, Jin Z, Matsuoka M, et al. The noncanonical role of EZH2 in cancer. *Cancer Sci* 2021, 112(4):1376–82.
237. 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. 2022, 146:112532.
238. Helin K, Dhanak D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* 2013, 502(7472):480–8.
239. Kavaliauskaitė D, Stakišaitis D, Martinkutė J, Šlekienė L, Kazlauskas A, Balnytė 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.
240. 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.
241. 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.
242. Kastenhuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell* 2017, 170(6):1062–78.
243. Noronha C, Ribeiro AS, Taipa R, Castro DS, Reis J, Faria C, et al. Cadherin Expression and EMT: A Focus on Gliomas. *Biomedicines* 2021, 9(10):1328.
244. 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.
245. Iwadate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* 2016, 11(3):1615–20.
246. 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.

247. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Giannini C, Bryant SC, Jenkins RB. Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastoma and gliosarcoma. *Cancer* 2008, 113(10):2779–89.
248. Belut DR, Lima E de O, Zanini MA, Galvani AF, Furtado FB, Ferrasi AC. CDH1 hypermethylation: a potential molecular pathway for invasiveness in glioblastoma. 2024, 33(1):73-btii.
249. Osuka S, Zhu D, Zhang Z, Li C, Stackhouse CT, Sampetean O, et al. N-cadherin upregulation mediates adaptive radioresistance in glioblastoma. *J Clin Invest* 2021, 131(6):e136098.
250. Yang X, Wang Q, Cao E. Structure of the human cation–chloride cotransporter NKCC1 determined by single-particle electron cryo-microscopy. 2020, 11(1):1–11.
251. Gong Y, Wu M, Shen J, Tang J, Li J, Xu J, et al. Inhibition of the NKCC1/NF- κ B Signaling Pathway Decreases Inflammation and Improves Brain Edema and Nerve Cell Apoptosis in an SBI Rat Model. *Front Mol Neurosci* 2021, 14:641993.
252. Haas BR, Sontheimer H. Inhibition of the Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter Isoform-1 Reduces Glioma Invasion. *Cancer Res* 2010, 70(13):5597–606.
253. Omer S, Koumangoye R, Delpire E. A mutation in the Na-K-2Cl cotransporter-1 leads to changes in cellular metabolism. *J Cell Physiol* 2020, 235(10):7239–50.
254. 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. 2016, 109(4):237–44.
255. 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. 2010, 25(4–5):379–88.
256. 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. 2017, 42(1):68–80.
257. 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.
258. Stakisaitis D, Lapointe MS, Battle D. Mechanisms of chloride transport in thymic lymphocytes. 2001, 280:F314–24.
259. Juška A, Stakišaitis D. Chloride/bicarbonate exchanger in rat thymic lymphocytes: experimental investigation and mathematical modeling. 2013, 30(4):167–172.
260. Maeno E, Takahashi N, Okada Y. Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Lett* 2006, 580(27):6513–7.
261. 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(2):911.
262. Perrot-Sinal TS, Sinal CJ, Reader JC, Speert DB, Mccarthy MM. Sex Differences in the Chloride Cotransporters, NKCC1 and KCC2, in the Developing Hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2007, 19(4):302–8.
263. Deisz RA, Lehmann TN, Horn P, Dehnicke C, Nitsch R. Components of neuronal chloride transport in rat and human neocortex. *J Physiol* 2011, 589(Pt 6):1317–47.
264. Smith JB, Wade MB, Fineberg NS, Weinberger MH. Influence of race, sex, and blood pressure on erythrocyte sodium transport in humans. *Hypertension* 1988, 12(3):251–8.

265. Monaghan JC, Flemming CL, Stokes GS. Effects of 17 alpha-ethinyl oestradiol in vitro on erythrocyte cation transport in men and women. *Clin Exp Hypertens A* 1991, 13(1):53–63.
266. Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush B, Reddy PVB, et al. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the Mechanism of Ammonia-induced Astrocyte Swelling. 2008, 283(49):33874–82.
267. Elliott SJ, Schilling WP. Oxidant stress alters Na⁺ pump and Na(+)-K(+)-Cl-cotransporter activities in vascular endothelial cells. 1992, 263(1):H96–102.
268. Pozzi D, Chini B. Quest for pharmacological regulators of KCC2. Tang Xin, editor. *Neuronal Chloride Transporters in Health and Disease*. Academic Press; 2020. 709–727 p.
269. 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.
270. 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–e2691.
271. 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.
272. 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.
273. 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.
274. Di Cristo G, Awad PN, Hamidi S, Avoli M. KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. *Prog Neurobiol* 2018, 162:1–16.
275. 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.
276. MacKenzie G, O’Toole KK, Moss SJ, Maguire J. Compromised GABAergic inhibition contributes to tumor-associated epilepsy. *Epilepsy Res* 2016, 126:185–96.
277. 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. 2020, 472(9):1177–206.
278. Thangaraju M, Ananth S, Martin PM, Roon P, Smith SB, Sterneck E, et al. *c/ebpδ* Null mouse as a model for the double knock-out of *slc5a8* and *slc5a12* in kidney. *J Biol Chem* 2006, 281(37):26769–73.
279. 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. 2008, 283(36):24729–37.
280. Singh N, Thangaraju M, Prasad PD, Martin PM, Lambert NA, Boettger T, et al. Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. 2010, 285(36):27601–8.
281. Zimmerman MA, Singh N, Martin PM, Thangaraju M, Ganapathy V, Waller JL, et al. Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent fas upregulation

- and fas-mediated apoptosis of T cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012, 302(12):G1405–15.
282. 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.
 283. Milutinovic S, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 2007, 28(3):560–71.
 284. 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.
 285. Orellana-Manzano A, O’Ryan MG, Lagomarcino AJ, George S, Muñoz MS, Mamani N, et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with decreased expression of SLC5A8, a cancer suppressor gene, in young children. *Front Cell Infect Microbiol* 2016, 6:121.
 286. Hernández-Juárez J, Vargas-Sierra O, Herrera LA, Cantú De León D, Fernández-Retana J, Pérez-Plasencia C, et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporter is a target of epigenetic repression in cervical cancer. *Int J Oncol* 2019, 54(5):1613–24.
 287. 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.
 288. Thangaraju M, Karunakaran SK, Itagaki S, Gopal E, Elangovan S, Prasad PD, et al. Transport by SLC5A8 with subsequent inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC3 underlies the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Cancer* 2009, 115(20):4655–66.
 289. Remien K, Jan A. *Anatomy, Head and Neck, Thymus*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
 290. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2016, 12(2):77–89.
 291. 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.
 292. Al-Suhaimi EA, Aljafary MA, Alkhulaifi FM, Aldossary HA, Alshammari T, AL-Qaaneh A, et al. Thymus Gland: A Double Edge Sword for Coronaviruses. *Vaccines (Basel)* 2021, 9(10):1119.
 293. Gururaja Rao S, Patel NJ, Singh H. Intracellular Chloride Channels: Novel Biomarkers in Diseases. *Front Physiol* 2020, 11:96.
 294. Wang J, Sekai M, Matsui T, Fujii Y, Matsumoto M, Takeuchi O, et al. Hassall’s corpuscles with cellular-senescence features maintain IFN α production through neutrophils and pDC activation in the thymus. *Int Immunol* 2019, 31(3):127–39.
 295. Lepasavić G, Perišić M. Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines. *Neuroimmunomodulation* 2008, 15(4–6):290–322.
 296. Rais M, Wilson RM, Urbanski HF, Messaoudi I. Androgen supplementation improves some but not all aspects of immune senescence in aged male macaques. *Geroscience* 2017, 39(4):373–84.
 297. Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, Gu X, Kovacs WJ. Androgen Receptors in Thymic Epithelium Modulate Thymus Size and Thymocyte Development. *Endocrinology* 2001, 142(3):1278–83.
 298. Kloc M, Ghobrial RM, Kubiak JZ. The Role of Genetic Sex and Mitochondria in Response to COVID-19 Infection. *Int Arch Allergy Immunol* 2020, 181(8):629–34.

299. ECACC General Cell Collection: 89081402 U-87 MG [Internet]. [cited 2024 Feb 7]. Available from: URL: https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=89081402&collection=ecacc_gc.
300. Qiang L, Yang Y, Ma YJ, Chen FH, Zhang LB, Liu W, et al. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett* 2009, 279(1):13–21.
301. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang VT, Lemarié A, et al. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One* 2015, 10(4):e0123721.
302. Patil V, Pal J, Somasundaram K. Elucidating the cancer-specific genetic alteration spectrum of glioblastoma derived cell lines from whole exome and RNA sequencing. *Oncotarget* 2015, 6(41):43452–71.
303. Haddad AF, Young JS, Amara D, Berger MS, Raleigh DR, Aghi MK, et al. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neurooncol Adv* 2021, 3(1):1–16.
304. T98G [T98-G] [Internet]. [cited 2024 Feb 7]. Available from: URL: <https://www.atcc.org/products/crl-1690>.
305. Oraiopoulou ME, Tampakaki M, Tzamali E, Tamiolakis T, Makatounakis V, Vakis AF, et al. A 3D tumor spheroid model for the T98G Glioblastoma cell line phenotypic characterization. *Tissue Cell* 2019, 59:39–43.
306. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev* 2016, 141:70–7.
307. 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.
308. 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.
309. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. 2017, 70:97–101.
310. Ranjan RA, Muenzner JK, Kunze P, Geppert CI, Ruebner M, Huebner H, et al. The Chorioallantoic Membrane Xenograft Assay as a Reliable Model for Investigating the Biology of Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2023, 15(6):1704.
311. 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.
312. 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.
313. Rema RB, Rajendran K, Ragnathan M. Angiogenic efficacy of Heparin on chick chorioallantoic membrane. *Vasc Cell* 2012, 4(1):8.
314. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol* 2020, 57(5):2461–78.
315. Padhi BK, Singh M, Rosales M, Pelletier G, Cakmak S. A PCR-based quantitative assay for the evaluation of mRNA integrity in rat samples. *Biomol Detect Quantif* 2018, 15:18–23.

316. 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, 36:1–8.
317. Juknevičienė M, Balnytė I, Valančiūtė A, Lesauskaitė V, Stanevičiūtė J, Curkūnavičiūtė R, et al. Valproic acid inhibits Na-K-2Cl cotransporter RNA expression in male but not in female rat thymocytes. 2019, 17(2):1559325819852444.
318. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001, 25(4):402–8.
319. 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.
320. 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. 2021, 19(1):1559325821990166.
321. Farrell RE. Quality control for RNA preparations. 3rd ed. Farrell RE, editor. *RNA Methodologies*. Academic Press; 2005. 183–178 p.
322. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. 2016, 32(19):3047–8.
323. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 2011, 17(1):12.
324. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res* 2022, 50(D1):D988–95.
325. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. 2013, 29(1):15–21.
326. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. 2014, 30(7):923–30.
327. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014, 15(12):550.
328. Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res* 2022, 50(W1):W216–21.
329. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. 2008, 4(1):44–57.
330. 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):541–9.
331. 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):103–10.
332. 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.
333. Jha MK, Suk K. Pyruvate dehydrogenase kinase as a potential therapeutic target for malignant gliomas. *Brain Tumor Res Treat* 2013, 1(2):57–63.
334. Bhat TA, Kumar S, Chaudhary AK, Yadav N, Chandra D. Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discov Today* 2015, 20(5):635–43.
335. Shi S, Ji X, Shi J, Shi S, She F, Zhang Q, et al. Andrographolide in atherosclerosis: integrating network pharmacology and in vitro pharmacological evaluation. *Biosci Rep* 2022, 42(7):BDR20212812.

336. Lienenklaus S, Cornitescu M, Ziętara N, Łyszkiewicz M, Gekara N, Jabłońska J, et al. Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN-beta in vivo. *J Immunol* 2009, 183(5):3229–36.
337. 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.
338. Jakutiene E, Grikinienė J, Vaitkevicius A, Tschaika M, Didziapetriene J, Stakisaitis D. Sodium valproate stimulates potassium and chloride urinary excretion in rats: gender differences. *BMC Pharmacol* 2007, 7(1):9.
339. Todd Alexander R, Dimke H. Effect of diuretics on renal tubular transport of calcium and magnesium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017, 312(6):F998–1015.
340. Wile D. Diuretics: a review. *Ann Clin Biochem* 2012, 49(5):419–31.
341. Brandoni A, Villar SR, Torres AM. Gender-Related Differences in the Pharmacodynamics of Furosemide in Rats. *Pharmacology* 2004, 70(2):107–12.
342. Craft RM, Ulibarri CM, Raub DJ. Kappa opioid-induced diuresis in female vs. male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000, 65(1):53–9.
343. Qin H, Zheng G, Li Q, Shen L. Metabolic reprogramming induced by DCA enhances cisplatin sensitivity through increasing mitochondrial oxidative stress in cholangiocarcinoma. *Front Pharmacol* 2023, 14:1128312.
344. Schoenmann N, Tannenbaum N, Hodgeman RM, Raju RP. Regulating mitochondrial metabolism by targeting pyruvate dehydrogenase with dichloroacetate, a metabolic messenger. 2023, 1869(7):166769.
345. Stacpoole PW, Greene YJ. Dichloroacetate. *Diabetes Care* 1992, 15(6):785–91.
346. Avery LB, Bumpus NN. Valproic Acid Is a Novel Activator of AMP-Activated Protein Kinase and Decreases Liver Mass, Hepatic Fat Accumulation, and Serum Glucose in Obese Mice. *Mol Pharmacol* 2014, 85(1):1–10.
347. Felisbino MB, Ziemann M, Khurana I, Okabe J, Al-Hasani K, Maxwell S, et al. Valproic acid influences the expression of genes implicated with hyperglycaemia-induced complement and coagulation pathways. *Sci Rep* 2021, 11(1):2163.
348. Day M. Covid-19: European drugs agency to review safety of ibuprofen. *BMJ* 2020, 368:m1168.
349. Shyer JA, Flavell RA, Bailis W. Metabolic signaling in T cells. *Cell Res* 2020, 30(8):649–59.
350. Alsemeh AE, Ahmed MM, Fawzy A, Samy W, Tharwat M, Rezaq S. Vitamin E rescues valproic acid-induced testicular injury in rats: Role of autophagy. *Life Sci* 2022, 296:120434.
351. Fariña-Jerónimo H, Martín-Ramírez R, González-Fernández R, Medina L, de Vera A, Martín-Vasallo P, et al. Androgen deficiency is associated with a better prognosis in glioblastoma. *Eur J Med Res* 2024, 29(1):57.
352. Li D, Yao H, Cao X, Han X, Song T, Zeng X. Testosterone regulates thymic remodeling by activating glucocorticoid receptor signaling pathway to accelerate thymocyte apoptosis in male rats. *J Reprod Immunol* 2024, 164:104288.
353. Sebastianelli M, Forte C, Galarini R, Gobbi M, Pistidda E, Moncada C, et al. LC-MS/MS analyses of bile and histological analyses of thymus as diagnostic tools to detect low dose dexamethasone illicit treatment in beef cattle at slaughterhouse. *Steroids* 2020, 160:108671.
354. Wang X, Laan M, Bichele R, Kisand K, Scott HS, Peterson P. Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front Immunol* 2012, 3(March):19.

355. Kadouri N, Nevo S, Goldfarb Y, Abramson J. Thymic epithelial cell heterogeneity: TEC by TEC. *Nat Rev Immunol* 2020, 20(4):239–53.
356. Smith SM, Ossa-Gomez LJ. A quantitative histologic comparison of the thymus in 100 healthy and diseased adults. *Am J Clin Pathol* 1981, 76(5):657–65.
357. Yano M, Kuroda N, Han H, Meguro-Horike M, Nishikawa Y, Kiyonari H, et al. Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med* 2008, 205(12):2827–38.
358. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005, 436(7054):1181–5.
359. Besin G, Gaudreau S, Menard M, Guindi C, Dupuis G, Amrani A. Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes* 2008, 57(8):2107–17.
360. Laan M, Salumets A, Klein A, Reintamm K, Bichele R, Peterson H, et al. Post-Aire Medullary Thymic Epithelial Cells and Hassall's Corpuscles as Inducers of Tonic Pro-Inflammatory Microenvironment. *Front Immunol* 2021, 12:635569.
361. 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 HHS Public Access. 2011, 30(38):4026–37.
362. Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, 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.
363. Liu S, Zhao S, Cheng Z, Ren Y, Shi X, Mu J, et al. Akkermansia muciniphila Protects Against Antibiotic-Associated Diarrhea in Mice. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2024, 16(4):1190–204.
364. Silva MFB, Ruiter JPN, Ijlst L, Jakobs C, Duran M, Tavares De Almeida I, et al. Valproate inhibits the mitochondrial pyruvate-driven oxidative phosphorylation in vitro. *J Inher Metab Dis* 1997, 20(3):397–400.
365. Grikinienė J, Volbekas V, Stakisaitis D. Gender differences of sodium metabolism and hyponatremia as an adverse drug effect. 2004, 40(10):935–42.
366. Bennett RL, Licht JD. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2018, 58:187–207.
367. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2014, 13(9):673–91.
368. Khan O, La Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: Emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol* 2012, 90(1):85–94.
369. Simpson LO. Studies on the NZB mouse thymus. I. Thymus weight relationships to age and body weight from birth to old age. 1974, 141(1):127–32.
370. Dorko F, Kluchová D, Boleková A, Lovasová K, Špakovská T, Borošová T. Influence of surgical and chemical orchidectomy on weight and distribution of AChE-nerve fibres in thymuses of adult rats. 2011, 55(3):22.
371. Windmill KF, Lee VW. Influences of surgical castration on the thymus of male rats. *J Reprod Immunol* 1999, 44(1–2):29–39.
372. Bortner CD, Cidlowski JA. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2007, 462(2):176–88.

373. 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.
374. 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.
375. 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.
376. Majchrzak-Celińska A, Kleszcz R, Stasiłowicz-Krzemień A, Cielecka-Piontek J. Sodium Butyrate Enhances Curcuminoids Permeability through the Blood-Brain Barrier, Restores Wnt/ β -Catenin Pathway Antagonists Gene Expression and Reduces the Viability of Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci* 2021, 22(20):11285.
377. Kamson DO, Chinnasamy V, Grossman SA, Bettgowda C, Barker PB, Stacpoole PW, et al. In-vivo magnetic resonance spectroscopy of lactate as a non-invasive biomarker of dichloroacetate activity in cancer and non-cancer central nervous system disorders. *Front Oncol* 2023, 13:1077461.
378. Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, Ganapathy V. Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J* 2009, 417(1):379–89.
379. Lewis-Tuffin LJ, Rodriguez F, Giannini C, Scheithauer B, Necela BM, Sarkaria JN, et al. E-Cadherin Expression Associated with an Aggressive Brain Tumor Phenotype. *PLoS One* 2010, 5(10):e13665.
380. 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.
381. Efremov L, Abera SF, Bedir A, Vordermark D, Medenwald D. Patterns of glioblastoma treatment and survival over a 16-years period: pooled data from the German Cancer Registries. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021, 147(11):3381–90.
382. Li CM, Haratipour P, Lingeman RG, Perry JJP, Gu L, Hickey RJ, et al. Novel Peptide Therapeutic Approaches for Cancer Treatment. *Cells* 2021, 10(11):2908.
383. Meng J, Qian W, Yang Z, Gong L, Xu D, Huang H, et al. p53/E2F7 axis promotes temozolomide chemoresistance in glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* 2024, 24(1).
384. Del Moral-Morales A, González-Orozco JC, Hernández-Vega AM, Hernández-Ortega K, Peña-Gutiérrez KM, Camacho-Arroyo I. EZH2 Mediates Proliferation, Migration, and Invasion Promoted by Estradiol in Human Glioblastoma Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022, 13:703733.
385. 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.
386. deVries NA, Hulsman D, Akhtar W, deJong J, Miles DC, Blom M, et al. Prolonged Ezh2 Depletion in Glioblastoma Causes a Robust Switch in Cell Fate Resulting in Tumor Progression. *Cell Rep* 2015, 10(3):383–97.
387. Algharabil J, Kintner DB, Wang Q, Begum G, Clark PA, Yang S Sen, et al. Inhibition of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoform 1 accelerates temozolomide-mediated apoptosis in glioblastoma cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 2012, 30(1):33.
388. Chen Q, Cai J, Jiang C. CDH2 expression is of prognostic significance in glioma and predicts the efficacy of temozolomide therapy in patients with glioblastoma. *Oncol Lett* 2018, 15(5):7415.

389. 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.
390. Pustynnikov S, Costabile F, Beghi S, Facciabene A. Targeting mitochondria in cancer: current concepts and immunotherapy approaches. 2018, 202:35–51.

PASKELBTOS PUBLIKACIJOS

Publikacijos disertacijos darbo tema:

1. **Juknevičienė, Milda**; Balnytė, Ingrida; Valančiūtė, Angelija; Alonso, Marta Marija; Preikšaitis, Aidanas; Sužiedėlis, Kęstutis; Stakišaitis, Donatas. Differential Impact of Valproic Acid on SLC5A8, SLC12A2, SLC12A5, CDH1, and CDH2 Expression in Adult Glioblastoma Cells // *Biomedicines*, 2024, t. 12, nr. 7, p. 1-12, ISSN 2227-9059. doi:10.3390/biomedicines12071416. [Citav. rodiklis: 3.9, bendr. cit. rod.: 4.528, kvartilis: Q2 (2023. InCites JCR SCIE)]
2. **Juknevičienė, Milda**; Balnytė, Ingrida; Valančiūtė, Angelija; Stanevičiūtė, Jūratė; Sužiedėlis, Kęstutis; Stakišaitis, Donatas. The Effect of Valproic Acid on SLC5A8 Expression in Gonad-intact and Gonadectomized Rat Thymocytes: Original Research article. *International journal of immunopathology and pharmacology*. London: Sage Publications. ISSN 0394-6320, 2022, vol. 36, p. 1-8. doi:10.1177/20587384211051954. [Citav. rodiklis: 3.5, bendr. cit. rod.: 4.9, kvartilis: Q2 (2022. InCites JCR SCIE)].
3. Stakišaitis, Donatas; Damanskienė, Eligija; Curkūnavičiūtė, 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. ISSN 1559-3258, 2021, vol 19, no. 1, p. 1-14. doi:10.1177/1559325821990166. [Citav. rodiklis: 2.623, bendr. cit. rod.: 4.813, kvartilis: Q3 (2021. InCites JCR SCIE)].
4. **Juknevičienė, Milda**; Balnytė, Ingrida; Valančiūtė, Angelija; Lesauskaitė, Vaiva; Stanevičiūtė, Jūratė; Curkūnavičiūtė, Rūta; Stakišaitis, Donatas. Valproic Acid Inhibits NA-K-2CL Cotransporter RNA Expression in Male but not in Female Rat Thymocytes: research article. *Dose-Response*. ISSN 1559-3258, 2019, vol. 17, no. 2, p. 1-8. doi:10.1177/1559325819852444. [Citav. rodiklis: 2.438, bendr. cit. rod.: 3.322, kvartilis: Q2 (2019. InCites JCR SCIE)].

Su disertacijos darbo tema susijusi publikacija:

1. Stakišaitis, Donatas; **Juknevičienė, Milda**; Damanskienė, Eligija; Valančiūtė, Angelija; Balnytė, Ingrida; Alonso, Marta Maria. The Importance of Gender-related Anticancer Research on Mitochondrial Regulator Sodium Dichloroacetate in Preclinical Studies In Vivo: review. *Cancers*. ISSN 2072-6694, 2019, vol. 11, no. 8, p. 1-28. doi:10.3390/cancers11081210. [Citav. rodiklis: 6.126, bendr. cit. rod.: 4.837, kvartilis: Q1 (2019. InCites JCR SCIE)].

Pranešimai disertacijos darbo tema:

1. Balnytė, Ingrida; Stakišaitis, Donatas; **Juknevičienė, Milda**; Valančiūtė, Angelija. Valproic Acid Effect on NKCC1, KCC2, and SLC5A8 Expression in Rat Thymocytes is Sex-related // The 3rd Immuno-Oncology World Congress – Immuno-Oncology 2022 : 2-3 November 2022, Copenhagen, Denmark : Abstract book. 2022, p. 24-24. [T2] [M.kr.: M001, N010]
2. **Juknevičienė, Milda**; Balnytė, Ingrida; Valančiūtė, Angelija; Stakišaitis, Donatas. Experimental Study of Magnesium Dichloroacetate Effect on Adult Glioblastoma T98G and U87 MG cells Xenografts in Vivo // Health for All: 2022 – International Conference Health for All “Our planet, our health” : abstract book : Kaunas, Lithuania, 6-7 April, 2022 / [organised: Doctoral Student’s committee of Lithuanian University of Health Sciences]. Kaunas : Lithuanian University of Health Sciences, 2022, p. 22-23, ISSN 2669-1507. [T1e] [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. **Juknevičienė, Milda**; Balnytė, Ingrida; Valančiūtė, Angelija; Stanevičiūtė, Jūratė; Stakišaitis, Donatas. Gender-related sodium valproate effect on NKCC1 and SMCT1 RNA expression in rat thymocytes // 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, Karo-

- lina Slapšytė, Gvidas Mikalauskas]. Kaunas : Student's Scientific Society of Lithuanian University of Health Sciences, 2020, p. 49-51. [T1d] [M.kr.: M001]
5. **Juknevičienė, Milda;** Valančiūtė, Angelija; Stanevičiūtė, Jūratė; Balnytė, Ingrida; Stakišaitis, Donatas. The Experimental research of valproic acid effect on chloride transport in rat thymocytes and thymus structure // International Lithuanian-Polish Conference on Histology : 28 February 2020, Kaunas, Lithuania. Kaunas : Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2020. ISBN 9789955156512, p. 18-19, ISBN 9789955156512. [T1e] [M.kr.: M001]
 6. **Juknevičienė, Milda;** Valančiūtė, Angelija; Stanevičiūtė, Jūratė; Balnytė, Ingrida; Stakišaitis, Donatas. Gender-related sodium valproate effect on thymocytes NKCC1 RNA expression and on rat thymus // 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. 232-232, ISSN 1648-9233. [T1e] [M.kr.: M001]

STRAIPSNIAI, KURIUOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI



Article

Differential Impact of Valproic Acid on *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* Expression in Adult Glioblastoma Cells

Milda Juknevičienė ¹, Ingrida Balnytė ¹, Angelija Valančiūtė ¹, Marta Marija Alonso ², Aidanas Preikšaitis ³,
Kęstutis Sužiedėlis ⁴ and Donatas Stakišaitis ^{1,4,*}

¹ Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, 44307 Kaunas, Lithuania; milda.jukneviociene@lsmu.lt (M.J.); ingrida.balnyte@lsmu.lt (I.B.); angelija.valanciute@lsmu.lt (A.V.)

² Department of Pediatrics, Clínica Universidad de Navarra, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain; mmalonso@unav.es

³ Centre of Neurosurgery, Clinic of Neurology and Neurosurgery, Faculty of Medicine, Vilnius University, 03101 Vilnius, Lithuania; aidanas.preiksaitis@santa.lt

⁴ Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute, 08660 Vilnius, Lithuania; kestutis.suziedelis@nvi.lt

* Correspondence: donatas.stakisaitis@lsmu.lt; Tel.: +37064641384

Abstract: Valproic acid (VPA) has anticancer, anti-inflammatory, and epigenetic effects. The study aimed to determine the expression of carcinogenesis-related *SLC5A8*, *SLC12A2*, *SLC12A5*, *CDH1*, and *CDH2* in adult glioblastoma U87 MG and T98G cells and the effects of 0.5 mM, 0.75 mM, and 1.5 mM doses of VPA. RNA gene expression was determined by RT-PCR. *GAPDH* was used as a control. U87 and T98G control cells do not express *SLC5A8* or *CDH1*. *SLC12A5* was expressed in U87 control but not in T98G control cells. The *SLC12A2* expression in the U87 control was significantly lower than in the T98G control. T98G control cells showed significantly higher *CDH2* expression than U87 control cells. VPA treatment did not affect *SLC12A2* expression in U87 cells, whereas treatment dose-dependently increased *SLC12A2* expression in T98G cells. Treatment with 1.5 mM VPA induced *SLC5A8* expression in U87 cells, while treatment of T98G cells with VPA did not affect *SLC5A8* expression. Treatment of U87 cells with VPA significantly increased *SLC12A5* expression. VPA increases *CDH1* expression depending on the VPA dose. *CDH2* expression was significantly increased only in the U87 1.5 mM VPA group. Tested VPA doses significantly increased *CDH2* expression in T98G cells. When approaching treatment tactics, assessing the cell's sensitivity to the agent is essential.

Keywords: valproic acid; adult glioblastoma; U87 MG cell; T98G cell; *SLC5A8*; *NKCC1*; *KCC2*; *CDH1*; *CDH2*



Citation: 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. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071416>

Academic Editors: M. R. Mozafari and Jason K. Sa

Received: 16 March 2024

Revised: 13 June 2024

Accepted: 22 June 2024

Published: 25 June 2024



Copyright: © 2024 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) has a poor prognosis due to treatment resistance, high relapse rates, and mortality [1]. Valproic acid (VPA) is being investigated as an adjuvant for GBM in combination with chemotherapy and radiotherapy [2,3]. Studies examining the potential of VPA at the beginning of chemoradiotherapy or after chemoradiotherapy to enhance the antineoplastic activity of chemotherapy in GBM patients have shown conflicting results, with the inclusion of VPA in the regimen improving median overall survival [4,5]. In contrast, other data have shown no effect [6,7]. The combination of temozolomide (TMZ), radiotherapy, and high doses of VPA (25 mg/kg/day) treatment in the adult GBM patient population revealed groups with different proteomic characteristics compared to those treated with TMZ and radiotherapy. At the same time, clinical factors showed no association with the effect of the VPA combination [8].

The effects of VPA on GBM cells are consistent with biological mechanisms: It is an inhibitor of HDACs [9] and induces apoptosis [10]. Non-toxic concentrations of VPA sensitized U87 and T98G glioma cells to gefitinib, inhibiting cell growth and inducing autophagy through increased formation of intracellular reactive oxygen species [3]. VPA increases the effectiveness of radiotherapy by sensitizing GBM cells [2] and inducing apoptotic responses to irradiation [11]. Short-term treatment with VPA induced a change in the methylation status of O6-methylguanine-DNA methyl-transferase (MGMT), which can be used to sensitize GBM cells and glioblastoma stem cells to TMZ [12,13]. The heterogeneous behavior of GBM stem cell lines in terms of pro-differentiation capacity and changes in DNA methylation during TMZ treatment reflects the heterogeneity of GBM [12]. The effect of VPA on eradicating the stem cell subpopulation is vital for the effective treatment of GBM. Differentiation-promoting and epigenetic therapies are promising approaches to overcome GBM [13]. The inflammatory microenvironment of the GBM tumor, the released cytokines and chemokines, and the activation of inflammatory signaling pathways promote tumor aggressiveness and resistance to treatment. New data on the GBM inflammatory microenvironment are essential for a prospective approach to GBM treatment [14]. VPA has immunomodulatory and anti-inflammatory effects in exposure [15] that may also be related to sex-related differences in VPA metabolism in animals and humans [16,17]. Elucidating the evolution of GBM sex-linked dimorphism and the efficacy of treatments will be essential to improve the effectiveness of treatment and patient survival, and ensuring that personalized treatment based on specific molecular mechanisms of GBM is an essential challenge for further research [18]. Treatment with a combination of VPA and dichloroacetate significantly increased *Slc5a8* gene expression and showed a significant anti-inflammatory effect on thymocytes from male mice [19], and treatment of T lymphocytes from males and females with this combination showed a significant anti-inflammatory effect and gender-related differences [20]. It was reported that different VPA effect the expression of the *SLC12A2* (NKCC1) and *SLC12A5* (KCC2) co-transporter genes in pediatric glioblastoma PBT24 (boys) and SF8628 (girls) cells [21]. The molecular and clinical role of cation-chloride co-transporters illustrates the significant association of KCC2 and NKCC1 with tumorigenesis. It may be necessary for molecular diagnostics and new treatment strategies for cancer patients [22].

When investigating the efficacy of VPA in combination with other drugs, it is also essential to consider potential drug–drug interactions. The results of studies on the effectiveness of VPA are contradictory. VPA can induce a genomic DNA methylation profile that increases susceptibility to VPA but not TMZ [12,13]. VPA-treated GBM cells secreted high amphiregulin levels, whose expression was positively correlated with resistance to TMZ of different GBM cells [23]. VPA induces the activation of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ co-transporter (NKCC1), significantly increasing the expression of the NKCC1 gene (*SLC12A2*) in PBT24 but not affecting SF8628 cells [21]. The TMZ caused significantly increased RNA expression of the *SLC12A2* in both PBT24 and SF8628 cell types [24]. NKCC1 activity is directly related to GBM cell proliferation [25], and increased NKCC1 protein expression in human GBM is associated with tumor grade [26]. The NKCC1 activation is associated with protein phosphorylation of WNK kinases [27,28]. Thus, it is plausible that combining VPA with TMZ could synergistically activate NKCC1 and reduce treatment efficacy.

K-Cl co-transporter (*SLC12A5*; KCC2), whose expression is reduced in GBM cells, is associated with intracellular ions' balance. Increased expression of *SLC12A5* inhibits GBM cell proliferation [29]. VPA significantly increases the expression of the *SLC12A5* gene (*SLC12A5*) in GBM cells; i.e., it promotes the efflux of K^+ and Cl^- ions from the cell, but this effect depends on different GBM cells [21] and does not have an association with DNA methylation [29]. Thus, *SLC12A5* may become an important new GBM biomarker of prognostic significance.

Solute carrier family 5 member A8 (*SLC5A8*) is a sodium (Na^+) and chloride (Cl^-) ion-dependent and Na^+ -coupled monocarboxylate co-transporter [30], the activity of which may therefore be dependent on the intracellular Na^+ and Cl^- levels. *SLC5A8* is a tumor growth suppressor in primary human and experimental animal gliomas that contributes to

carcinogenesis and is repressed by epigenetic mechanisms [31]. The expression of *SLC5A8* in cancer cells is silenced by hypermethylation, and the gene silencing of *SLC5A8* by hypermethylation is associated with poor prognosis [30]. VPA can increase the *SLC5A8* expression in GBM cells [21,32]. *SLC5A8* induces cell apoptosis via mitochondrial pyruvate-dependent HDAC inhibition [33]. Studies on the co-activity and interaction of the *SLC5A8* co-transporter with *NKCC1* and *KCC2* and their activity may indicate a link between changes in intracellular Na^+ , K^+ , and Cl^- ion concentrations in GBM cells and the treatment effect of the drug on GBM cell ion homeostasis. There are almost no studies on the relationship between *SLC5A8* co-transporter activity and the regulation of intracellular Na^+ , K^+ , and Cl^- levels.

Cadherin E (*CDH1*) and cadherin N (*CDH2*) are significant contributors to tumor development: a form of metaplasia known as epithelial–mesenchymal transition (EMT) [34]. During EMT, epithelial *CDH1* expression is reduced in exchange for increased mesenchymal *CDH2* expression [35]. *CDH1* expression is rare or absent in gliomas, and expression decreases with brain tumor grade [35,36]. *CDH2* is expressed in brain GBM and plays an important role with *NKCC1* in glioma genesis [34,37].

There is significant evidence that the expression of specific genes is altered after VPA treatment. However, the relationship between differentially expressed mRNA and protein of the same gene is inconsistent. On a genome-wide scale, the correlation between mRNA and protein is low [38–40]. Therefore, it is justified to limit gene expression studies to determining expression only. This study aimed to investigate the effect of VPA on the expression of the *NKCC1*, *KCC2*, and *SLC5A8* co-transporters genes and the *CDH1* and *CDH2* genes in adult glioblastoma U87 MG (female) and T98G (male) cells. The studies showed differences in the effect of VPA on the expression of the genes studied in U87 MG and T98G cells, and this effect was dose-dependent.

2. Materials and Methods

2.1. Glioblastoma Cells and The Tested Groups

The glioblastoma cell line cells of an adult Caucasian 44-year-old female’s high-grade glioblastoma U87 MG cell line (U87; ECACC 89081402), donated by Dr. Arūnas Kazlauskas (Laboratory of Neuro-Oncology and Genetics, Neuroscience Institute, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50009 Kaunas, Lithuania), and an adult Caucasian 61-year-old male’s high-grade glioblastoma T98G cell line cells (product code ATTC-CRL-1690), donated by Prof. M.M. Alonso (University of Navarra, Pamplona, Spain), for the study were used.

The U87 cells were cultivated in Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Paisley, UK) and 1% 100 IU/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (P/S; Gibco, Grand Island, NY, USA), as reported [41]. The T98G cells were cultivated in Advanced Minimum Essential Medium (AMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) and supplemented with 5% FBS, 4 mM of L-glutamine (Glutamax; Gibco, Paisley, UK) and 1% P/S, as described in the product sheet [42].

Then, 10 µL of the tested cells suspension mixed with 10 µL trypan blue solution (Sigma-Aldrich, Irvine, UK) was used to count the cells number in a Neubauer hemocytometer chamber (Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Germany). Next, 0.5×10^6 U87 and 0.7×10^6 T98G cells were seeded in 75 cm² vented culture flasks (ThermoScientific, Rochester, NY, USA) with 15 mL of culture media at 37 °C in a 95% O₂ and 5% CO₂ atmosphere. After a 24 h incubation, the culture media were changed to media containing VPA (for the groups treated with 0.5 mM or 0.75 mM or 1.5 mM VPA) and/or media without VPA (control groups). U87 and T98G cells were treated for 24 h. There were eight tested groups: (1) U87 control (n = 6), (2) U87 treated with 0.5 mM VPA (n = 6), (3) U87 treated with 0.75 mM VPA (n = 6), and (4) U87 treated with 1.5 mM VPA (n = 5) and (5) T98G control (n = 6), (6) T98G treated with 0.5 mM VPA (n = 6), (7) T98G treated with 0.75 mM VPA (n = 6), and (8) T98G treated with 1.5 mM VPA (n = 5). The effect of VPA on the cells was assessed by comparing the control with the treatment with three different concentrations of VPA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the medium.

2.2. RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR Analysis

Total RNA was extracted with TRIzol Plus RNA Purification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The RNA purity and concentration were assessed using a NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Branchburg, NJ, USA). The RNA integrity was analyzed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with an Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Reverse transcription was performed with 100 ng RNA using Biometra TAdvanced thermal cycler (Analytik Jena AG, Jena, Germany) with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), according to manufacture instructions. The relative RNA expression assay was performed using Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCR System (Applied Bio-Systems, Waltham, MA, USA) with TaqMan assays (Applied Biosystems, Pleasanton, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The reactions were run in triplicates with 4 μ L of cDNA template in a 20 μ L reaction volume (10 μ L of TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania), 1 μ L of TaqMan Gene Expression Assay 20x (Applied Biosystems, Pleasanton, CA, USA), and 5 μ L of nuclease-free water (Invitrogen, Paisley, UK) with the program running at 95 $^{\circ}$ C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s and 60 $^{\circ}$ C for 1 min. The investigated genes were *SLC12A5* (Hs00221168_m1; 80 bp), *SLC12A2* (Hs00169032_m1; 97 bp), *SLC5A8* (Hs00377618_m1; 88 bp), *CDH1* (Hs01023894_m1; 61 bp), and *CDH2* (Hs00983056_m1; 66 bp). As a control, we used the *GAPDH* (Hs02786624_g1; 157 bp) gene [43,44]. We used CT cut-off at 35 values as described by the others [45], and these values were not used for calculations.

2.3. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 29 software. For the relative gene expression study, the Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method [46] was used to calculate the expression between the VPA-treated (test) and control groups of the target genes. The Shapiro–Wilk test was used to verify the normality assumption. The difference between the two independent groups was evaluated using the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Significant differences were considered at the value of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. VPA Treatment Effect on *SLC5A8* Expression in U87 and T98G Cells

Table 1 shows the *SLC5A8* and *GAPDH* expression data for the U87- and T98G-cell controls and the VPA-treated tested cell groups.

Table 1. The *SLC5A8* and *GAPDH* expression data from U87- and T98G-cell controls and VPA-treated groups.

Study Group	n	Indicator, Mean \pm SD		
		CT		Δ CT
		<i>SLC5A8</i>	<i>GAPDH</i>	
U87 control	6	37.31 \pm 1.51	16.25 \pm 1.26	–
U87 1.5 mM VPA	5	34.88 \pm 0.54	16.73 \pm 0.29	18.15 \pm 0.57
U87 0.75 mM VPA	6	35.39 \pm 1.19	16.41 \pm 1.21	–
U87 0.5 mM VPA	6	36.51 \pm 0.61	17.87 \pm 1.77	–
T98G control	6	not detected	17.41 \pm 0.22	–
T98G 1.5 mM VPA	5	36.31 \pm 0.82	18.07 \pm 0.77	–
T98G 0.75 mM VPA	6	37.16 \pm 0.36	18.60 \pm 0.37	–
T98G 0.5 mM VPA	6	not detected	17.93 \pm 0.76	–

“–” no gene expression.

U87 and T98G control cells do not express *SLC5A8*. Treatment of cells with 1.5 mM VPA induced *SLC5A8* expression in U87 cells, but this expression was low. VPA at 0.75 mM and 0.5 mM did not affect the expression of *SLC5A8* in U87 cells, and no gene expression was observed. Treatment of T98G cells with different doses of VPA did not affect *SLC5A8* expression—the gene was not expressed. VPA treatment did not affect the expression of *GAPDH*.

3.2. VPA Treatment Effect on *SLC12A2* Expression in U87 and T98G Cells

Table 2 shows the *SLC12A2* and *GAPDH* expression data for the tested U87- and T98G-cell groups.

Table 2. The *SLC12A2* and *GAPDH* expression data in the U87- and T98G-cell study groups.

Study Group	n	Indicator, Mean \pm SD				
		CT		Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
		<i>SLC12A2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87 control	6	22.07 \pm 1.23	18.14 \pm 1.41	3.93 \pm 0.64	0.00 \pm 0.64	1.08 \pm 0.46
U87 1.5 mM VPA	5	22.62 \pm 0.36	18.76 \pm 0.93	3.87 \pm 0.83	−0.06 \pm 0.83	1.20 \pm 0.54
U87 0.75 mM VPA	6	22.40 \pm 0.36	18.52 \pm 1.25	3.88 \pm 1.15	−0.05 \pm 1.14	1.28 \pm 0.71
U87 0.5 mM VPA	6	23.49 \pm 1.09	19.72 \pm 1.87	3.77 \pm 1.16	−0.16 \pm 1.16	1.36 \pm 0.70
T98G control	6	21.63 \pm 0.60	19.87 \pm 0.23	1.76 \pm 0.60 ^a	0.00 \pm 0.60	1.07 \pm 0.19
T98G 1.5 mM VPA	5	21.37 \pm 0.55	20.50 \pm 0.31	0.87 \pm 0.50 ^b	−0.89 \pm 0.50	1.94 \pm 0.61
T98G 0.75 mM VPA	6	21.83 \pm 0.16	20.81 \pm 0.20	1.02 \pm 0.30 ^{c,d}	−0.75 \pm 0.30	1.71 \pm 0.35
T98G 0.5 mM VPA	6	22.00 \pm 0.26	19.83 \pm 0.74	2.17 \pm 0.53 ^{e,f,g}	0.41 \pm 0.53	0.79 \pm 0.23

^a $p = 0.002$, compared with U87 control; ^b $p = 0.008$, compared with U87 1.5 mM VPA; ^c $p = 0.02$, compared with T98G control; ^d $p = 0.002$, compared with U87 0.75 mM VPA; ^e $p = 0.002$, compared with T98G 0.75 mM VPA; ^f $p = 0.02$, compared with U87 0.5 mM VPA; ^g $p = 0.004$, compared with T98G 1.5 mM VPA.

In all cell groups tested, the expression of *GAPDH* was not different between control and cells treated with different doses of VPA; i.e., VPA treatment did not affect the expression of the control gene.

The *SLC12A2* expression in U87 control cells was significantly lower than in T98G control cells. VPA treatment did not affect *SLC12A2* expression in U87 cells; no significant differences in *SLC12A2* expression were found when comparing the U87-cell groups tested.

The T98G cells treated with 0.75 mM VPA had significantly higher *SLC12A2* expression than controls, and the relative expression of *SLC12A2* was 1.71-fold higher than that of T98G controls. The *SLC12A2* expression of the T98G 0.5 mM VPA group was not different from that of the T98G control group and was significantly lower than that of the T98G 0.75 mM VPA group and the T98G 1.5 mM VPA group.

The T98G-cell groups treated with 1.5 mM, 0.75 mM, or 0.5 mM VPA had significantly higher *SLC12A2* expression than the respective U87-cell groups.

3.3. The VPA Treatment Effect on *SLC12A5* Expression in U87 and T98G Cells

Table 3 shows the *SLC12A5* and *GAPDH* expression data for the U87- and T98G-cell groups.

SLC12A5 was expressed in U87 controls, and *SLC12A5* was not expressed in T98G cells. Treatment of U87 cells with 1.5 mM, 0.75 mM, or 0.5 mM VPA significantly increased *SLC12A5* expression, and the relative expression of *SLC12A5* was 5.97-, 4.40-, and 4.54-fold higher than that of controls, respectively. No significant difference was found when comparing the gene expression of the U87 groups treated with different doses of VPA.

No expression of *SLC12A5* was detected in T98G control cells and T98G 1.5 mM VPA, T98G 0.75 mM VPA, and T98G 0.5 mM VPA cell groups.

Table 3. The *SLC12A5* and *GAPDH* expression data of the studied U87- and T98G-cell groups.

Study Group	n	Indicator, mean \pm SD				
		CT		Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
		<i>SLC12A5</i>	<i>GAPDH</i>			
U87 control	6	33.79 \pm 1.21	16.25 \pm 1.26	17.54 \pm 1.07	0.00 \pm 1.07	1.05 \pm 1.26
U87 1.5 mM VPA	5	31.89 \pm 0.66	16.73 \pm 0.29	15.16 \pm 0.75 ^a	-2.38 \pm 0.75	5.97 \pm 3.18
U87 0.75 mM VPA	6	32.00 \pm 0.63	16.41 \pm 1.21	15.59 \pm 0.73 ^b	-1.95 \pm 0.73	4.40 \pm 2.39
U87 0.5 mM VPA	6	33.28 \pm 1.35	17.87 \pm 1.77	15.41 \pm 0.45 ^c	-2.12 \pm 0.45	4.54 \pm 1.18
T98G control	6	37.31 \pm 0.46	17.41 \pm 0.22	–	–	–
T98G 1.5 mM VPA	5	36.46 \pm 0.60	18.07 \pm 0.77	–	–	–
T98G 0.75 mM VPA	6	37.10 \pm 0.46	18.60 \pm 0.37	–	–	–
T98G 0.5 mM VPA	6	36.79 \pm 0.70	17.93 \pm 0.76	–	–	–

^a–^c no gene expression; ^a $p = 0.002$, compared with U87 control; ^b $p = 0.002$, compared with U87 control; ^c $p = 0.009$, compared with U87 control.

3.4. The VPA Treatment Effect on *CDH1* Expression in U87 and T98G Cells

Table 4 shows the *CDH1* and *GAPDH* expression data for the U87- and T98G-cell groups.

Table 4. The *CDH1* and *GAPDH* expression data of the studied U87- and T98G-cell groups.

Study Group	n	Indicator, Mean \pm SD		
		CT		Δ CT
		<i>CDH1</i>	<i>GAPDH</i>	
U87 control	6	36.21 \pm 0.49	16.25 \pm 1.26	–
U87 1.5 mM VPA	5	35.86 \pm 0.60	16.73 \pm 0.29	–
U87 0.75 mM VPA	6	36.41 \pm 0.61	16.41 \pm 1.21	–
U87 0.5 mM VPA	6	36.12 \pm 0.56	17.87 \pm 1.77	–
T98G control	6	not detected	17.41 \pm 0.22	–
T98G 1.5 mM VPA	5	34.89 \pm 0.38	18.07 \pm 0.77	16.81 \pm 0.57
T98G 0.75 mM VPA	6	34.87 \pm 0.38	18.60 \pm 0.37	16.27 \pm 0.47
T98G 0.5 mM VPA	6	35.08 \pm 0.83	17.93 \pm 0.76	–

^a–^c no gene expression.

CDH1 was inactive in U87 control cells, and VPA treatment of U87 cells did not affect *CDH1* expression.

CDH1 expression was detectable in T98G 1.5 mM VPA and T98G 0.75 mM VPA cells, whereas T98G control and T98G 0.5 mM VPA groups did not express the *CDH1* gene.

3.5. The VPA Treatment Effect on *CDH2* Expression in U87 and T98G Cells

Table 5 shows the *CDH2* and *GAPDH* expression data for the U87- and T98G-cell groups.

T98G control cells showed significantly higher *CDH2* expression than U87 control cells. Compared to U87 control cells, *CDH2* expression was significantly higher in the U87 1.5 mM group with a relative expression of 3.41. There was no difference in *CDH2* expression among control U87, U87 0.75 mM VPA, and U87 0.5 mM VPA groups. U87 1.5 mM VPA cells showed significantly higher *CDH2* expression than U87 0.75 mM VPA cells. U87 cells treated with 1.5 mM and 0.5 mM VPA did not differ in expression.

Compared to controls, all doses of VPA significantly increased *CDH2* expression in T98G cells: There was 2.34-fold higher expression in the T98G 1.5 mM VPA group, 2.11-fold higher expression in the T98G 0.75 mM group, and 1.73-fold higher expression in the T98G

0.5 mM VPA group than in control. A comparison of the VPA-treated T98G groups showed no difference in *CDH2* expression.

A comparison of *CDH2* expression between U87 and T98G cells showed that T98G 1.5 mM VPA, T98G 0.75 mM VPA, and T98G 0.5 mM VPA cells had higher gene expression than the corresponding U87 cells.

Table 5. The *CDH2* and *GAPDH* expression data of studied U87- and T98G-cell groups.

Study Group	n	Indicator, Mean \pm SD				
		CT		Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
		<i>CDH2</i>	<i>GAPDH</i>			
U87 control	6	23.82 \pm 0.72	18.14 \pm 1.41	5.68 \pm 1.26	0.00 \pm 1.26	1.01 \pm 0.82
U87 1.5 mM VPA	5	22.74 \pm 1.44	18.76 \pm 0.93	3.98 \pm 0.52 ^a	-1.70 \pm 0.52	3.41 \pm 1.16
U87 0.75 mM VPA	6	23.60 \pm 0.68	18.52 \pm 1.25	5.07 \pm 0.64 ^b	-0.61 \pm 0.64	1.64 \pm 0.62
U87 0.5 mM VPA	6	24.10 \pm 1.46	19.72 \pm 1.87	4.38 \pm 1.11	-1.30 \pm 1.11	3.06 \pm 1.93
T98G control	6	23.64 \pm 0.22	19.87 \pm 0.23	3.78 \pm 0.30 ^c	0.00 \pm 0.30	1.02 \pm 0.17
T98G 1.5 mM VPA	5	23.11 \pm 0.46	20.50 \pm 0.31	2.61 \pm 0.45 ^{d,e}	-1.17 \pm 0.45	2.34 \pm 0.74
T98G 0.75 mM VPA	6	23.52 \pm 0.31	20.81 \pm 0.20	2.71 \pm 0.22 ^{f,g}	-1.06 \pm 0.22	2.11 \pm 0.33
T98G 0.5 mM VPA	6	22.90 \pm 0.31	19.83 \pm 0.74	3.07 \pm 0.55 ^{h,i}	-0.71 \pm 0.55	1.73 \pm 0.55

^a $p = 0.02$, compared with U87 control; ^b $p = 0.02$, compared with U87 1.5 mM VPA; ^c $p = 0.002$, compared with U87 control; ^d $p = 0.008$, compared with U87 1.5 mM VPA; ^e $p = 0.004$, compared with T98G control; ^f $p = 0.002$, compared with T98G control; ^g $p = 0.002$, compared with U87 0.75 mM VPA; ^h $p = 0.04$, compared with T98G control; ⁱ $p = 0.04$, compared with U87 0.5 mM VPA.

4. Discussion

The application of integrative approaches that combine data from multiple mechanisms enables us to understand disease pathogenesis and develop diagnostic tools to predict brain cancer's progression or its treatment's effectiveness [47]. Elucidating the functions of biomolecules and their interrelationships can help interpret the course of disease. In this study, the gene expression of *NKCC1*, *KCC2*, *SLC5A8*, *CDH1*, and *CDH2* genes in GBM cells and the possible effect of VPA on their gene expression were determined. The data allowed us to address the potential interrelationship between the expression of studied specific markers.

A comprehensive study found that *KCC2* and *NKCC1* co-transporters have opposing cancer-regulatory mechanisms [22]. High-grade GBM cells are associated with increased intracellular chloride $[Cl^-]_i$ level [26], which is associated with increased $Na^+K^+Cl^-$ co-transporter-1 (*NKCC1*, encoded by *SLC12A2*) and decreased K^+Cl^- co-transporter (*KCC2*, encoded *SLC12A5*) activity [48,49]. The $[Cl^-]_i$ content of high-grade GBM cells is significantly higher than the average in grade II glioma and normal cortical cells [26].

DNA methylation is an essential epigenetic mechanism that regulates gene expression. Decreased DNA methylation in gene promoters usually leads to the activation of gene transcription, while increased methylation often inhibits gene expression [50]. Phosphorylation has emerged as a key means to rapidly and reversibly modulate the intrinsic transport activity of *NKCC1* and *KCC2* as a potential therapeutic effect by regulating $[Cl^-]_i$ levels [51,52]. The activity of *NKCC1* is precisely regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation, where several kinases have been proposed to regulate *NKCC1* expression and activity through phosphorylation determined by the balance between kinase and protein phosphatase activities in the neuronal cells [25,50]. VPA has been shown to induce acetylation and demethylation in the test system, and VPA-induced histone acetylation and DNA demethylation have been shown to activate gene expression [32].

Our study showed that the *SLC12A2* expression in U87 control cells was significantly lower than in T98G control cells. VPA treatment did not affect *SLC12A2* expression in U87

cells, whereas VPA treatment increased *SLC12A2* expression in T98G cells dose-dependently. The T98G-cell groups treated with 1.5 mM, 0.75 mM, and 0.5 mM VPA had significantly higher *SLC12A2* expression than the respective U87-cell groups. The differential VPA effect on *SLC12A2* expression in pediatric GBM cells was reported also [21].

NKCC1 was shown to be highly expressed in gliomas, and a higher glioma grade directly correlated with NKCC1 expression [37]. NKCC1 is one of the most important transporters of Cl^- into cells and regulates cell volume expansion [53]. Increased NKCC1 protein expression in human GBM attenuates cancer cell proliferation and migration, and inhibition of NKCC1 activity impairs tumor invasion and cell apoptosis [25–27,54–56]. Bioinformatic analysis showed that high glioma NKCC1 expression is associated with MAPK signaling pathways, TGF-beta signaling, and epithelial–mesenchymal transition regulation, and its expression in mesenchymal GBMs was associated with GBM patients' shorter survival and worse prognosis [37].

Our study data show that the *SLC12A5* was expressed in U87 controls and not in T98G cells. Treatment of U87 cells with VPA significantly increased *SLC12A5* expression, but there was no association with the doses of VPA tested. No expression of *SLC12A5* was detected in the T98G control and T98G VPA-treated cells. Recently, it was reported that VPA differentially but significantly increased *SLC12A5* expression in pediatric GBM cells [21].

The different effects of VPA on KCC2 gene expression in GBM cells that we have identified may be significant in several respects. Cell volume reduction is an early sign of apoptosis associated with the loss of intracellular K^+ and Cl^- anions [29,57], which is associated with caspase activation and caspase cascade-related apoptotic mechanisms [58]. KCC2 positively correlated with the levels of tumor-infiltrating macrophages and CD4^+ T cells [22]. Bioinformatics analysis suggests that overexpression of *SLC12A5* inhibits the proliferation of glioma U251MG cells, and *SLC12A5* may be a novel effective biomarker of GBM with prognostic significance [29].

Furthermore, in neurons, the regulation of $[\text{Cl}^-]_i$ is mediated by NKCC1 and KCC2 transporters: NKCC1 increases, while KCC2 decreases $[\text{Cl}^-]_i$. Histologically reduced neuronal KCC2 staining was reported in adult patients with GBM and epilepsy [49,59]. Alterations in the balance of NKCC1 and KCC2 activity may decrease the hyperpolarizing effects of γ -aminobutyric acid (GABA), contributing to epileptogenesis in human GBM. Associated seizures worsen the prognosis of GBM patients [60,61]. Proper KCC2 activity ensures the functioning of neuronal postsynaptic GABA receptors by acting as a neuron-specific K^+ and Cl^- extruder, using the K^+ gradient to maintain low $[\text{Cl}^-]_i$ levels. The excitatory effects of GABA are dependent on relatively high $[\text{Cl}^-]_i$ levels [62]. The mechanisms of GBM-associated epilepsy are linked to the reduction of KCC2 activity in the peritumoral region, leading to impaired GABAergic inhibition, and they suggest that modulating $[\text{Cl}^-]_i$ homeostasis by activating KCC2 may help control seizures [63]. The drug's effect on activating the KCC2 function in GBM cells makes it relevant as a potential new anticancer therapeutic target.

The study showed that U87 and T98G control cells do not express *SLC5A8*. Treatment with 1.5 mM VPA induced *SLC5A8* expression in U87 cells, while treatment of T98G cells with VPA did not affect *SLC5A8* expression. *SLC5A8* co-transporter is a sodium (Na^+) and chloride (Cl^-) ion-dependent and Na^+ -coupled monocarboxylate co-transporter [31,64]. Thus, the activity may depend on the intracellular Na^+ and Cl^- concentration. *SLC5A8* is a tumor growth suppressor in experimental animals and primary human gliomas that contributes to carcinogenesis and is repressed by epigenetic mechanisms [31].

The *SLC5A8* is expressed in normal brain cells but is significantly reduced in most human glioma primary cells and cell lines, especially when the associated CpG islands were aberrantly methylated [31]. Hypermethylation silences the expression of *SLC5A8* in cancer cells, and gene silencing of *SLC5A8* by hypermethylation was associated with poor prognosis [30]. The reduced expression of *SLC5A8* in the absence of aberrant methylation in a few primary tumors suggests that *SLC5A8* may not be affected by multiple epigenetic

mechanisms. Ectopic expression of SLC5A8 strongly inhibits colony formation in glioma cell lines, indicating that it suppresses glioma growth in vitro [31]. SLC5A8 induces cell apoptosis via mitochondrial pyruvate-dependent HDAC inhibition [33]. VPA can increase the expression of SLC5A8 in GBM cells [21,32].

SLC5A8 is a transporter that moves short-chain fatty acids and other monocarboxylic acids or drugs, such as pyruvate, butyrate, or dichloroacetate, in a Na⁺-dependent manner [64,65]. Thus, this leads to the hypothesis that SLC5A8-mediated tumor growth inhibition is associated with transposing antiproliferative molecules into the cells, thereby improving mitochondrial function.

A limitation of our study is that we could not show the interdependence of the studied co-transporters activity. The activity of all co-transporters is attributable to [Cl⁻]_i, which can be seen as a signaling pathway. Therefore, it would be meaningful to investigate further the effect of VPA on the mechanisms of [Cl⁻]_i regulation in glioblastoma and the malignancy of GBM cells.

The SLC5A8 expression may also be linked to the activity of the NKCC1 and KCC2 co-transporters function, which, by regulating the Na⁺ and Cl⁻ intracellular levels, may also regulate the Na⁺ and Cl⁻ dependent SLC5A8 co-transporter function. The transport function of SLC5A8 is particularly significant in brain tumors, as butyrate and dichloroacetate are currently being investigated for treating human gliomas [66,67].

The data show that *CDH1* was inactive in U87 control and U87 VPA-treated cells. The *CDH1* gene was not expressed in the T98G control and T98G 0.5 mM VPA groups, whereas *CDH1* expression was detectable in T98G 1.5 mM VPA and T98G-0.75 mM VPA cells. The researchers report that *CDH1* expression decreases with brain tumor grade [35]. *CDH1* expression is rare or absent in gliomas; *CDH1* hypermethylation was found in 39.4% of GBM samples [36]. During EMT, epithelial *CDH1* expression decreases and mesenchymal *CDH2* expression increases [35]. Our data on *CDH2* expression showed that *CDH2* expression was significantly higher in T98G control cells than in control U87 cells. *CDH2* expression was significantly increased only in the U87 1.5 mM VPA group. All doses of VPA studied significantly increased *CDH2* expression in T98G cells, whereas *CDH2* expression did not differ. Comparison of *CDH2* expression between U87 and T98G cells showed that T98G cells treated with VPA had significantly higher gene expression than the corresponding U87 cells. In mesenchymal GBMs, *CDH2* is associated with NKCC1 activity and a form of metaplasia, which is termed EMT [34,37].

The study showed that the GBM cells tested have different expressions of the genes tested and different effects of VPA on them, which may be an essential avenue for more extensive future studies.

5. Conclusions

The expression of *SLC12A2*, *SLC12A5*, and *CDH2* in adult glioblastoma U87 MG and T98G control cells differs significantly. These differences could potentially serve as indicators for assessing tumor malignancy. The studies also revealed distinct responses of the tested cells to VPA treatment, suggesting that the differences in cell marker expression could influence treatment outcomes. This underscores the need for further preclinical and clinical studies on the effect of VPA on tumor cell marker expression, which could open up new approaches for more personalized and effective treatment.

Author Contributions: Conceptualization, D.S., I.B., A.V. and M.J.; methodology, M.J.; validation, D.S., I.B. and A.V.; formal analysis, M.J., D.S., I.B., M.M.A., A.P., K.S. and A.V.; investigation, M.J.; resources, D.S., I.B. and M.M.A.; data curation, M.J.; writing—original draft preparation, M.J. and D.S.; writing—review and editing, M.J., D.S., A.V., I.B., A.P., K.S. and M.M.A.; visualization, M.J.; supervision, D.S.; 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: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- D'Amico, R.S.; Englander, Z.K.; Canoll, P.; Bruce, J.N. Extent of Resection in Glioma—A Review of the Cutting Edge. *World Neurosurg.* **2017**, *103*, 538–549. [CrossRef]
- 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]
- 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]
- 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]
- 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*, 479–483. [CrossRef] [PubMed]
- Happold, C.; Gorlia, T.; Chinot, O.; Gilbert, M.R.; Nabors, L.B.; Wick, W.; Pugh, S.L.; Hegi, M.; Cloughesy, T.; Roth, P.; et al. Does Valproic Acid or Levetiracetam Improve Survival in Glioblastoma? A Pooled Analysis of Prospective Clinical Trials in Newly Diagnosed Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 731–739. [CrossRef] [PubMed]
- Natale, G.; Fini, E.; Calabrò, P.F.; Carli, M.; Scarselli, M.; Bocci, G. Valproate and Lithium: Old Drugs for New Pharmacological Approaches in Brain Tumors? *Cancer Lett.* **2023**, *560*, 216125. [CrossRef]
- Krauze, A.V.; Zhao, Y.; Li, M.C.; Shih, J.; Jiang, W.; Tasci, E.; Cooley Zgela, T.; Sproull, M.; Mackey, M.; Shankavaram, U.; et al. Revisiting Concurrent Radiation Therapy, Temozolomide, and the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid for Patients with Glioblastoma—Proteomic Alteration and Comparison Analysis with the Standard-of-Care Chemoirradiation. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1499. [CrossRef] [PubMed]
- Han, W.; Guan, W. Valproic Acid: A Promising Therapeutic Agent in Glioma Treatment. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 687362. [CrossRef]
- Zhang, C.; Liu, S.; Yuan, X.; Hu, Z.; Li, H.; Wu, M.; Yuan, J.; Zhao, Z.; Su, J.; Wang, X.; et al. Valproic Acid Promotes Human Glioma U87 Cells Apoptosis and Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 β Through ERK/Akt Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *39*, 2173–2185. [CrossRef]
- 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]
- Bell, E.H.; Zhang, P.; Fisher, B.J.; Macdonald, D.R.; McElroy, J.P.; Lesser, G.J.; Fleming, J.; Chakraborty, A.R.; Liu, Z.; Becker, A.P.; et al. Association of MGMT Promoter Methylation Status with Survival Outcomes in Patients with High-Risk Glioma Treated with Radiotherapy and Temozolomide: An Analysis from the NRG Oncology/RTOG 0424 Trial. *JAMA Oncol.* **2018**, *4*, 1405–1409. [CrossRef] [PubMed]
- Riva, G.; Butta, V.; Cilibrasi, C.; Baronchelli, S.; Redaelli, S.; Dalprà, L.; Lavitrano, M.; Bentivegna, A. Epigenetic Targeting of Glioma Stem Cells: Short-Term and Long-Term Treatments with Valproic Acid Modulate DNA Methylation and Differentiation Behavior, but Not Temozolomide Sensitivity. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 2811–2824. [CrossRef]
- Larangeira Nóbrega, A.H.; Sampaio Pimentel, R.; 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]
- Stakišaitis, D.; Kapočius, L.; Valančiūtė, A.; Balnytė, I.; Tamošaitis, T.; Vaitkevičius, A.; Sužiedėlis, K.; Urbonienė, D.; Tatarūnas, V.; Kilimaitė, 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]
- Silva, M.F.B.; Aires, C.C.P.; Luis, P.B.M.; Ruiten, 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. Inherit. Metab. Dis.* **2008**, *31*, 205–216. [CrossRef] [PubMed]
- Ghodke-Puranik, Y.; Thorn, C.F.; Lamba, J.K.; Leeder, J.S.; Song, W.; Birnbaum, A.K.; Altman, R.B.; Klein, T.E. Valproic Acid Pathway: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genom.* **2013**, *23*, 236–241. [CrossRef] [PubMed]
- Jovanovich, N.; Habib, A.; Chilukuri, A.; Hameed, N.U.F.; Deng, H.; Shanahan, R.; Head, J.R.; Zinn, P.O. Sex-Specific Molecular Differences in Glioblastoma: Assessing the Clinical Significance of Genetic Variants. *Front. Oncol.* **2024**, *13*, 1340386. [CrossRef]
- Stakišaitis, D.; Kapočius, L.; Kilimaitė, E.; Gečys, D.; Šlekienė, L.; Balnytė, I.; Palubinskiėnė, 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]

20. Stakišaitis, D.; Kapočius, L.; Tatarūnas, V.; Gečys, D.; Mickienė, A.; Tamošaitis, 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]
21. Damanskienė, E.; Balnytė, I.; Valančiūtė, A.; Alonso, M.M.; 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*, 968. [CrossRef] [PubMed]
22. Wang, J.; Liu, W.; Xu, W.; Yang, B.; Cui, M.; Li, Z.; Zhang, H.; Jin, C.; Xue, H.; Zhang, J. Comprehensive Analysis of the Oncogenic, Genomic Alteration, and Immunological Landscape of Cation-Chloride Cotransporters in Pan-Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 819688. [CrossRef]
23. Chen, J.C.; Lee, I.N.; Huang, C.; Wu, Y.P.; Chung, C.Y.; Lee, M.H.; Lin, M.H.C.; Yang, J.T. Valproic Acid-Induced Amphiregulin Secretion Confers Resistance to Temozolomide Treatment in Human Glioma Cells. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 756. [CrossRef] [PubMed]
24. 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]
25. Cong, D.; Zhu, W.; Kuo, J.S.; Hu, S.; Sun, D. Ion Transporters in Brain Tumors. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1171–1181. [CrossRef]
26. Garzon-Muvdi, T.; Schiapparelli, P.; ap Rhys, C.; Guerrero-Cazares, H.; Smith, C.; Kim, D.H.; Kone, L.; Farber, H.; Lee, D.Y.; An, S.S.; et al. Regulation of Brain Tumor Dispersal by NKCC1 through a Novel Role in Focal Adhesion Regulation. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001320. [CrossRef] [PubMed]
27. Algharabil, J.; Kintner, D.B.; Wang, Q.; Begum, G.; Clark, P.A.; Yang, S.-S.; Lin, S.-H.; Kahle, K.T.; Kuo, J.S.; Sun, D. Inhibition of Na(+)-K(+)-2Cl(−) Cotransporter Isoform 1 Accelerates Temozolomide-Mediated Apoptosis in Glioblastoma Cancer Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2012**, *30*, 33–48. [CrossRef]
28. Kahle, K.T.; Rinehart, J.; Lifton, R.P. Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl Cotransporters by the WNK Kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1802*, 1150–1158. [CrossRef]
29. 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]
30. 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]
31. 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]
32. Milutinovic, S.; Detich, N.; Szyf, M. Valproate Induces Widespread Epigenetic Reprogramming Which Involves Demethylation of Specific Genes. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 560–571. [CrossRef] [PubMed]
33. Thangaraju, M.; Carswell, K.N.; Prasad, P.D.; Ganapathy, V. Colon Cancer Cells Maintain Low Levels of Pyruvate to Avoid Cell Death Caused by Inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 379–389. [CrossRef]
34. 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]
35. Rodriguez, F.J.; Scheithauer, B.W.; Giannini, C.; Bryant, S.C.; Jenkins, R.B. Epithelial and Pseudoepithelial Differentiation in Glioblastoma and Gliosarcoma. *Cancer* **2008**, *113*, 2779–2789. [CrossRef] [PubMed]
36. 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-bt11. [CrossRef]
37. 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]
38. de Sousa Abreu, R.; Penalva, L.O.; Marcotte, E.M.; Vogel, C. Global Signatures of Protein and mRNA Expression Levels. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 1512–1526. [CrossRef]
39. Vogel, C.; Marcotte, E.M. Insights into the Regulation of Protein Abundance from Proteomic and Transcriptomic Analyses. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 227–232. [CrossRef]
40. Koussounadis, A.; Langdon, S.P.; Um, I.H.; Harrison, D.J.; Smith, V.A. Relationship between Differentially Expressed mRNA and mRNA-Protein Correlations in a Xenograft Model System. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10775. [CrossRef]
41. Stakišaitis, D.; Damanskienė, E.; Curkunavičiūtė, 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]
42. T98G [T98-G]. Available online: <https://www.atcc.org/products/crl-1690> (accessed on 7 February 2024).
43. Xing, Y.; Wei, X.; Liu, Y.; Wang, M.-M.; Sui, Z.; Wang, X.; Zhu, W.; Wu, M.; Lu, C.; Fei, Y.-H.; et al. Autophagy Inhibition Mediated by MCOLN1/TRPML1 Suppresses Cancer Metastasis via Regulating a ROS-Driven TP53/P53 Pathway. *Autophagy* **2022**, *18*, 1932–1954. [CrossRef] [PubMed]
44. Wang, N.; Zhang, Q.; Luo, L.; Ning, B.; Fang, Y. B-Asarone Inhibited Cell Growth and Promoted Autophagy via P53/Bcl-2/Blin-1 and P53/AMPK/MTOR Pathways in Human Glioma U251 Cells. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 2434–2443. [CrossRef] [PubMed]

45. McCall, M.N.; McMurray, H.R.; Land, H.; Almudevar, A. On Non-Detects in QPCR Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2310–2316. [CrossRef] [PubMed]
46. Livak, K.; Schmittgen, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef] [PubMed]
47. Madhumita; Paul, S. Capturing the Latent Space of an Autoencoder for Multi-Omics Integration and Cancer Subtyping. *Comput. Biol. Med.* **2022**, *148*, 105832. [CrossRef] [PubMed]
48. Pallud, J.; Le Van Quyen, M.; Bielle, F.; Pellegrino, C.; Varlet, P.; Labussiere, M.; Cresto, N.; Dieme, M.J.; Baulac, M.; Duyckaerts, C.; et al. Cortical GABAergic Excitation Contributes to Epileptic Activities around Human Glioma. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 244ra89. [CrossRef] [PubMed]
49. 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, Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter and K⁺-Cl⁻-Cotransporter, in Epilepsy-Associated Malformations of Cortical Development. *Neuroscience* **2007**, *145*, 185–196. [CrossRef] [PubMed]
50. Ghosh, K.; Zhou, J.-J.; Shao, J.-Y.; Chen, S.-R.; Pan, H.-L. DNA Demethylation in the Hypothalamus Promotes Transcription of *Agr1a* and *Slc12a2* and Hypertension Development. *J. Biol. Chem.* **2024**, *300*, 105597. [CrossRef] [PubMed]
51. Kahle, K.T.; Deeb, T.Z.; Puskarjov, M.; Silayeva, L.; Liang, B.; Kaila, K.; Moss, S.J. Modulation of Neuronal Activity by Phosphorylation of the K-Cl Cotransporter KCC2. *Trends Neurosci.* **2013**, *36*, 726–737. [CrossRef]
52. Hartmann, A.M.; Nothwang, H.G. NKCC1 and KCC2: Structural Insights into Phospho-Regulation. *Front. Mol. Neurosci.* **2022**, *15*, 964488. [CrossRef]
53. Zhu, W.; Begum, G.; Pointer, K.; A Clark, P.; Yang, S.-S.; Lin, S.-H.; Kahle, K.T.; Kuo, J.S.; Sun, D. WNK1-OSR1 Kinase-Mediated Phospho-Activation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter Facilitates Glioma Migration. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 31. [CrossRef]
54. Turner, K.L.; Sontheimer, H. Cl⁻ and K⁺ Channels and Their Role in Primary Brain Tumour Biology. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2014**, *369*, 20130095. [CrossRef] [PubMed]
55. Haas, B.R.; Cuddapah, V.A.; Watkins, S.; Rohn, K.J.; Dy, T.E.; Sontheimer, H. With-No-Lysine Kinase 3 (WNK3) Stimulates Glioma Invasion by Regulating Cell Volume. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *301*, C1150–C1160. [CrossRef]
56. Haas, B.R.; Sontheimer, H. Inhibition of the Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter Isoform-1 Reduces Glioma Invasion. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5597–5606. [CrossRef]
57. Bortner, C.D.; Sifre, M.I.; Cidlowski, J.A. Cationic Gradient Reversal and Cytoskeleton-Independent Volume Regulatory Pathways Define an Early Stage of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 7219–7229. [CrossRef] [PubMed]
58. Bortner, C.D.; Cidlowski, J.A. Cell Shrinkage and Monovalent Cation Fluxes: Role in Apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *462*, 176–188. [CrossRef] [PubMed]
59. Di Cristo, G.; Awad, P.N.; Hamidi, S.; Avoli, M. KCC2, Epileptiform Synchronization, and Epileptic Disorders. *Prog. Neurobiol.* **2018**, *162*, 1–16. [CrossRef]
60. Iuchi, T.; Hasegawa, Y.; Kawasaki, K.; Sakaida, T. Epilepsy in Patients with Gliomas: Incidence and Control of Seizures. *J. Clin. Neurosci.* **2015**, *22*, 87–91. [CrossRef]
61. 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]
62. McMoneagle, E.; Zhou, J.; Zhang, S.; Huang, W.; Josiah, S.S.; Ding, K.; Wang, Y.; Zhang, J. Neuronal K⁺-Cl⁻ Cotransporter KCC₂ as a Promising Drug Target for Epilepsy Treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* **2024**, *45*, 1–22. [CrossRef] [PubMed]
63. MacKenzie, G.; O'Toole, K.K.; Moss, S.J.; Maguire, J. Compromised GABAergic Inhibition Contributes to Tumor-Associated Epilepsy. *Epilepsy Res.* **2016**, *126*, 185–196. [CrossRef] [PubMed]
64. Miyachi, S.; Gopal, E.; Fei, Y.-J.; Ganapathy, V. Functional Identification of SLC5A8, a Tumor Suppressor down-Regulated in Colon Cancer, as a Na(+)-Coupled Transporter for Short-Chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13293–13296. [CrossRef] [PubMed]
65. Coady, M.J.; Chang, M.; Charron, F.M.; Plata, C.; Wallendorff, B.; Sah, J.F.; Markowitz, S.D.; Romero, M.F.; Lapointe, J. The Human Tumour Suppressor Gene SLC5A8 Expresses a Na⁺ -Monocarboxylate Cotransporter. *J. Physiol.* **2004**, *557*, 719–731. [CrossRef] [PubMed]
66. Majchrzak-Celińska, A.; Kleszcz, R.; Stasiłowicz-Krzemień, A.; Cielecka-Piontek, J. Sodium Butyrate Enhances Curcuminoids Permeability through the Blood-Brain Barrier, Restores Wnt/β-Catenin Pathway Antagonists Gene Expression and Reduces the Viability of Glioblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11285. [CrossRef] [PubMed]
67. Kamson, D.O.; Chinnasamy, V.; Grossman, S.A.; Bettgowda, C.; Barker, P.B.; Stacpoole, P.W.; Oeltzschner, G. In-Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy of Lactate as a Non-Invasive Biomarker of Dichloroacetate Activity in Cancer and Non-Cancer Central Nervous System Disorders. *Front. Oncol.* **2023**, *13*, 1077461. [CrossRef]

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.

The effect of valproic acid on SLC5A8 expression in gonad-intact and gonadectomized rat thymocytes

International Journal of
Immunopathology and Pharmacology
Volume 36: 1–8
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/20587384211051954
journals.sagepub.com/home/iji
SAGE

Milda Juknevičienė¹, Ingrida Balnytė¹, Angelija Valančiūtė¹, Jūratė Stanevičiūtė¹,
Kęstutis Sužiedėlis² and Donatas Stakišaitis^{1,2} 

Abstract

Background: Valproic acid (VPA) pharmacological mechanisms are related to the anti-inflammatory and anti-viral effects. VPA is a histone deacetylases inhibitor and serves a role in its immunomodulatory impacts. VPA has complex effects on immune cell's mitochondrial metabolism. The SLC5A8 transporter of short fatty acids has an active role in regulating mitochondrial metabolism. The study aimed to investigate whether SLC5A8 expresses the sex-related difference and how SLC5A8 expression depends on gonadal hormones, VPA treatment, and NKCC1 expression in rat thymocytes.

Methods: Control groups and VPA-treated gonad-intact and gonadectomized Wistar male and female rats were investigated ($n = 6$ in a group). The VPA 300 mg/kg/day in drinking water was given for 4 weeks. The SLC5A8 (*Slc5a8* gene) and NKCC1 (*Slc12a2* gene) RNA expressions were determined by the RT-PCR method.

Results: The higher *Slc5a8* expression was found in the gonad-intact males than respective females ($p = 0.004$). VPA treatment decreased the *Slc5a8* expression in gonad-intact and castrated males ($p = 0.02$ and $p = 0.03$, respectively), and increased in gonad-intact female rats compared to their control ($p = 0.03$). No significant difference in the *Slc5a8* expression between the ovariectomized female control and VPA-treated females was determined ($p > 0.05$). VPA treatment alters the correlation between *Slc5a8* and *Slc12a2* gene expression in thymocytes of gonad-intact rats.

Conclusion: VPA effect on the *Slc5a8* expression in rat thymocytes is gender- and gonadal hormone-dependent.

Keywords

valproic acid, SLC5A8, thymocyte, sex-related difference

Date received: 22 July 2021; accepted: 21 September 2021

Introduction

VPA is one of the most frequently prescribed anti-epileptic drugs.¹ VPA is an inhibitor of histone deacetylases (HDACs).² Studies raise the possibility of the therapeutic anti-viral potential of VPA.^{3,4} The virus replication and survival depend on the produced mitochondrial energy; thus, the anti-viral therapy tactics may involve medicine preparations that change energetic mitochondrial functions and activate anti-

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

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

Corresponding authors:

Donatas Stakišaitis, Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute, Santariskiu 1, LT 08660 Vilnius, Lithuania.

Email: donatas.stakisaitis@ismuni.lt

Milda Juknevičienė, Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Sukileliu pr. 13, Kaunas, LT 44307, Lithuania.

Email: milda.girdauskaite-jukneviene@ismuni.lt



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial 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>).

inflammatory mechanisms.⁵ As a simple fatty acid, VPA is a substrate for the fatty acid β -oxidation pathway.⁶ VPA bioactivation directs the metabolite 4-ene-VPA into the mitochondria, forming the 2,4-diene-VPA-CoA ester by β -oxidation.⁷ VPA metabolites induce the significant decrease of pyruvate-driven oxidative phosphorylation in mitochondria by conflict with pyruvate transport.⁶ Such VPA effect could interfere with the short fatty acid transporter SLC5A8 (Solute carrier family-5 member-8) activity. The SLC5A8, transporting short fatty acids as a substrate for the β -oxidation pathway in mitochondria, has a vital role in regulating cell metabolism.

SLC5A8 acts as electrogenic sodium (Na^+) and chloride (Cl^-)-dependent sodium-coupled transporter, transporting into the cell lactate, pyruvate, acetate, propionate, valerate, butyrate, and monocarboxylate drugs (dichloroacetate, nicotinate, salicylate, and 5-aminosalicylate) and ketone bodies.^{8–12} Research of adult male wild-type *c/ebp δ ^{+/+}* and *c/ebp δ ^{-/-}* mice shows that the SLC5A8 physiologic function operates an essential role in the short-chain fatty acids transport into the cell.^{13,14} If the transporter is not expressed, cells may not accumulate a substrate. Short fatty acids transported into immune cells through the SLC5A8 change the HDAC activity, exerting immunomodulatory effects: blockade of dendritic cell development, releasing cytokines and inducing T cell apoptosis, emphasizing the importance of SLC5A8 in the immune homeostasis, and suppression of inflammation.^{15,16} SLC5A8 triggers cell apoptosis by pyruvate-dependent repression of HDACs.¹⁷ The silencing of the *SLC5A8* gene is related to DNA methylation, and treating cancer cells with DNA-demethylating agents increases the SLC5A8 expression.¹² VPA could activate genes regulated by DNA methylation, and the VPA effect may be triggered to active DNA demethylation in cancer cells.^{18,19} The SLC5A8 activity in the male rat duodenum enterocytes depends on Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter (NKCC1) activity.²⁰ Changes in the NKCC1 activity might lead to mitochondrial function changes. In fibroblasts treated with NKCC1 inhibitor bumetanide, the increase in maximal respiration suggests enhanced substrate availability and mitochondrial oxidation.²¹ VPA reduces NKCC1 RNA expression in males but not in female rat thymocytes.²² Pro-inflammation-immune cells derive most of their energy from aerobic glycolysis rather than mitochondrial oxidation to generate more energy and support their intensified activity.²³ Sex differences in the immune response depending on the sexually dimorphic populations of mitochondria and gonadal hormones.²⁴

The present study aimed at the following questions: (1) whether SLC5A8 transporter expresses the sex-related difference in rat thymocytes? (2) does VPA treatment change the SLC5A8 expression in thymocytes? (3) how SLC5A8 expression depends on gonadal hormones, VPA treatment, and NKCC1 expression in thymocytes? The

answers to these questions are significant in dealing with personalized VPA therapy purposes.

Methods

Animals and treatment

Permission of the study was obtained from the State Food and Veterinary Service of Lithuania to use experimental animals for research (2017-01-02 No. G2-53). The pre-clinical and clinical research of pharmaceuticals regulatory guidelines indicates the importance of evaluating sex differences, stressing that medicine development should provide adequate information about the drug effects in both genders.²⁵ The VPA treatment effect on the thymus was started in the 4-to-5-weeks old Wistar rats: gonad-intact and gonadectomized controls and VPA-treated groups of both genders ($n = 6$ each). The animals were housed in standard colony cages with free entrance to food in the state of constant temperature ($21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), light/dark cycle (12-h/12-h), and humidity. Rats got a commercial pellet diet ad libitum. The orchidectomy and ovariectomy were performed at 28 ± 2 days of age (in the peripubertal period). Male gonadectomy was performed by orchidectomy using the scrotal approach, and female ovariectomy was performed by midline laparotomy. The following preparations for anesthesia were used for gonadectomy: Sedator 1 mg/kg intramuscular injection (i.m.) (Eurovet Animal Health B.V., Bladel, the Netherlands), Bioketan 75 mg/kg i.m. (Vetoquinol Biowet, Gorzów, Poland), and Atipam 2 mg/kg i.m. as an antidote of Sedator (Eurovet Animal Health B.V.). The accommodation period after the castration was 1 week. After the accommodation, animals were treated for 28 days with VPA 300 mg/kg/day in the drinking water as reported.²² The only source of drinking for treated groups was the VPA solution, and the fresh tap water for the control groups was provided. One ovariectomized VPA-treated female was eliminated from the study due to a fistula formed after the operation.

Thymus preparation

After treatment, the animals were euthanized in a 70% CO_2 camera. The carotid arteries and the aorta were cut, and the animals exsanguinated to minimize the thymus contamination with red blood cells. After the euthanasia of the animals, their thymus was harvested, and the contaminating blood was removed by rinsing with Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) medium (Biological Industries, Israel). The thymus surrounding connective tissue was removed, and the left lobe samples were stored in the RNAlaterRNA stabilization reagent (Qiagen, Germany) at -80°C until further RNA extraction and analysis.

Extraction of RNA from the thymus

The frozen tissue was ground in liquid nitrogen. According to the manufacturer's instruction, the total RNA was extracted using the TRIzol Plus RNA Purification Kit (Life Technologies, USA). The RNA quality and concentration were assessed using a NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The total RNA integrity was analyzed using the Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, CA) with an Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA). RNA samples had the RNA integrity number (RIN) higher than 5. The samples of RNA were stored at -80°C until further analysis.

Determination of the *Slc5a8* and *Slc12a2* genes expression in thymocytes

RNA expression assays were performed for *Slc5a8* (Rn01503812_m1), *Slc12a2* (Rn00582505_m1), and *Gapdh* (Rn01775763_g1) genes. According to the manufacturer's instruction, the reverse transcription was performed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, USA) in 20 μL reaction volume containing 50 ng RNA using Biometra TAdvanced thermal cycler (Analytik Jena AG, Germany). The synthesized copy DNA (cDNA) was stored at 4°C until use or at -20°C for a longer time. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using an Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). The reactions were run in triplicate with 4 μL of cDNA template in a 20 μL reaction volume (10 μL of TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, USA), 1 μL of TaqMan Gene Expression Assay 20x (Applied Biosystems, USA), 5 μL of nuclease-free water (Invitrogen, USA) with the program running at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The amplification efficiency was about 100%. The amplicon length of TaqMan assays was 60 bp for the *Slc5a8* gene, *Slc12a2*—67 bp, and *Gapdh*—174 bp.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 23.0 for Windows (IBM SPSS Statistics 23.0). The figures were performed using GraphPad Prism 7 and IBM SPSS Statistics 23.0 software. The normality assumption was conducted by the Shapiro–Wilk test. Differences between the two independent groups were evaluated using the nonparametric Mann–Whitney *U* test. To investigate the SLC5A8 (*Slc5a8* gene) and NKCC1 (*Slc12a2* gene) RNA expression changes in the VPA-treated and control groups, the threshold cycle

(CT) value was normalized with the control *Gapdh* gene, and ΔCT value was obtained. For the gene expression study, the $\Delta\Delta\text{CT}$ ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) Livak method was used to calculate the expression level between the VPA-treated (test) and the control conditions of the target gene when compared to the reference gene.²⁶ The Spearman's rank correlation coefficient (*r*) was used to assess relationships between the *Slc5a8* and *Slc12a2* genes (ΔCT values were used). R^2 linear was estimated by performing correlation plots. Differences at the value of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

The VPA effect on *Slc5a8* and *Slc12a2* RNA expression in rat thymocytes

The *Slc5a8* gene expression differences in gonad-intact and gonadectomized VPA-treated and control groups of both genders are considered in the ΔCT value (Table 1 and Figure 1(a)). A significantly 1.5-fold higher RNA expression was found in the gonad-intact male control than in the female control. The VPA treatment caused a statistically significantly decreased RNA gene expression in gonad-intact males and increased in gonad-intact female rats compared with their controls (Table 1 and Figure 1(a)).

Comparing the thymocytes *Slc5a8* gene expression of the gonad-intact of both sexes of rats with the expression in the respective gonadectomized animal groups, there is a clear increase trend: castration is associated with the increased gene expression in ovariectomized female (1.5-

Table 1. RNA expression of SLC5A8 cotransporter in the thymus of study groups.

Study group	CT mean				
	<i>Gapdh</i>	<i>Slc5a8</i>	ΔCT	$\Delta\Delta\text{CT}$	$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$
Gonad-intact female					
Control	23.530	33.406	9.876	-2.708	6.534
VPA-treated	23.083	30.251	7.168 ^a		
Gonad-intact male					
Control	22.905	29.452	6.547 ^b	4.034	0.061
VPA-treated	22.982	33.563	10.581 ^c		
Gonadectomized female					
Control	22.675	29.403	6.728	0.046	0.969
VPA-treated	24.831	31.604	6.774		
Gonadectomized male					
Control	25.436	29.649	4.213	4.545	0.043
VPA-treated	22.319	31.077	8.758 ^d		

^a*p* = 0.03, significant compared with the gonad-intact female control.

^b*p* = 0.004, significant compared with the gonad-intact female control.

^c*p* = 0.02, significant compared with the gonad-intact male control.

^d*p* = 0.03, significant compared with the castrated male control.

fold) and male (1.6-fold) groups; still, the difference is statistically insignificant. In castrated VPA-treated males, a statistically significant decrease of the *Slc5a8* gene expression in thymocytes was found compared with their control rats. Data showed no significant effects of VPA treatment on the gene expression level of the ovariectomized females (Table 1 and Figure 1(a)). The relative *Slc5a8* gene expression is shown in Table 1 and Supplemental material Figure 1(a).

The RNA expression of the *Slc12a2* gene was found significantly higher in the gonad-intact males than the gonad-intact females. The comparison showed significantly increased *Slc12a2* gene expression in gonad-intact VPA-treated females as compared with the control group. The *Slc12a2* expression level in the gonad-intact VPA-treated males was significantly decreased as compared with the control group. Compared with the controls, there were no significant *Slc12a2* gene expression changes in the gonadectomized female and male VPA-treated groups (Figure 1(b) and Table 2). The relative *Slc12a2* gene expression is shown in Supplemental material Figure 1(b).

The VPA effect on the correlation between *Slc5a8* and *Slc12a2* RNA expression in rat thymocytes of study groups

The *Slc12a2* gene expression, the correlation (r) between *Slc5a8* and *Slc12a2* RNA expression in thymocytes of gonad-intact, and gonadectomized VPA-treated and their control groups of both genders are shown in Figure 2 and Table 2.

The gonad-intact females' thymocytes showed a significantly strong correlation between *Slc5a8* and *Slc12a2* genes. The gonad-intact VPA-treated female thymocytes did not express this relationship. R^2 linear value in the VPA-treated female decreases in the VPA-treated female group compared with the control (Table 2).

Ovariectomized VPA-treated females showed a significant correlation between *Slc5a8* and *Slc12a2* genes. Study data did not establish a substantial relationship between *Slc5a8* and *Slc12a2* in thymocytes of tested male groups (Table 2 and Figure 2).

Discussion

Pharmacological impacts of VPA show the association with the therapeutic anti-viral^{7,27,28} and anti-inflammatory pathogenic mechanisms.²⁹ The immunomodulatory effect of VPA is related to the inhibition of class I and class II HDACs, which drives an increase in the acetylation of histones H2, H3, and H4, altering the gene expression related to immune cells activation.^{30–33} VPA represses the generation of pro-inflammatory factors such as NF- κ B, IL-

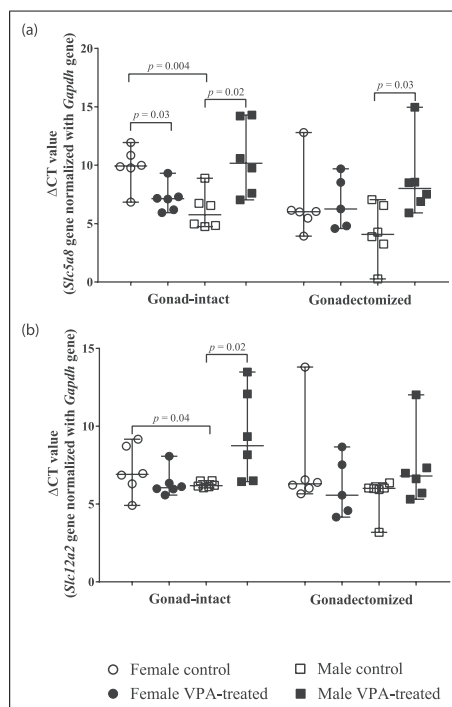


Figure 1. *Slc5a8* (a) and *Slc12a2* (b) genes expression in thymocytes of both gender gonad-intact and gonadectomized rats. Data after normalization with *Gapdh* gene. Delta threshold cycle (Δ CT) values were used for the graph (the horizontal bars represent the median; the short horizontal lines show the minimal and maximal values).

6, and TNF- α and prevents macrophages migration.³⁴ Our previous work reported that the 4 weeks of VPA treatment did not significantly impact thymus weight in the study gonad-intact and gonadectomized rat groups of both genders.²² Others noted that the 8 weeks VPA treatment significantly reduced the lymph node and spleen weight and cellularity compared to control in MRL/lpr(-/-) mice females.³⁵ VPA suppresses T cell proliferation *in vitro*³³ and induces apoptosis of the lymphocyte.³⁶ Rat gonadectomy induces thymus hyperplasia by increased thymocyte proliferation.³⁷ In male rats, age-related thymus involution depends on testosterone.³⁸ Supplementation of testosterone in aged rhesus macaque males increases the number of naive T cells by raising thymic output.³⁹

The present study of the VPA effect on rat thymocyte *SLC5A8* transporter expression identified differences concerning gender, sex hormones, and NKCC1 expression

Table 2. Delta threshold cycle (Δ CT) values correlation (r) between *Slc5a8* and *Slc12a2* (NKCC1) genes, R^2 linear in the study groups.

Index	Gonad-intact female		Gonad-intact male		Gonadectomized female		Gonadectomized male	
	Control	VPA-treated	Control	VPA-treated	Control	VPA-treated	Control	VPA-treated
Δ CT <i>Slc12a2</i>	7.600 ^a	6.344	6.229	9.332 ^b	7.440	6.100	5.593	7.327
Spearman correlation (r)	0.941 ^c	0	0.029	0.800	0.600	1 ^d	0.700	0.800
R^2 linear	0.872	0.656	0.097	0.966	0.959	0.997	0.676	0.958

^a $p = 0.04$, significant compared with gonad-intact male control.

^b $p = 0.02$, significant compared with gonad-intact male control.

^c $p = 0.02$, significant Δ CT values correlation between *Slc5a8* and *Slc12a2* genes in the study group.

^d $p = 0.02$, significant Δ CT values correlation between *Slc5a8* and *Slc12a2* genes in the study group.

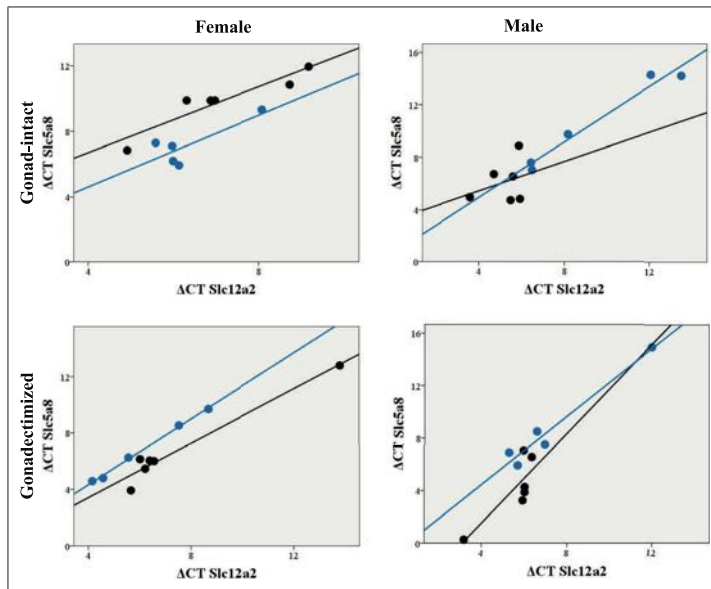


Figure 2. Correlation plots of the *Slc5a8* and *Slc12a2* (NKCC1) genes in the study rat groups. Black color represents control group, blue—VPA-treated group.

potential VPA gender-related effects on cell function. Our study revealed that gonad-intact male rat thymocytes express a significantly higher SLC5A8 RNA level than gonad-intact females; the research shows an insignificant increase of SLC5A8 RNA expression in gonadectomized males and female rat controls, with no sex-related difference. The VPA treatment caused an opposite effect on the SLC5A8 RNA gene expression in female and male rats' thymocytes. In gonad-intact females, the VPA treatment increased 2.7-fold of *Slc5a8* gene expression while did not effect on ovariectomized female thymocytes. In VPA-

treated gonad-intact and castrated males, the thymocyte *Slc5a8* gene expression was decreased.

The SLC5A8 transporter function depends on NKCC1 cotransporter activity; its inhibition increases SLC5A8 activity and activates the mitochondrial function.^{20,21} The NKCC1 RNA expression in the gonad-intact male rat thymocytes is higher than in females. VPA downregulates NKCC1 expression in gonad-intact male rat thymocytes, and no VPA effect on the NKCC1 was found in castrated male, gonad-intact, and ovariectomized female rat thymocytes.²² Our study shows the natural gender-related

differences in the NKCC1 and SLC5A8 gene expression correlation in thymocytes. Such a biological gender-related relationship between SLC5A8 and NKCC1 gene expression differences disappeared in VPA-treated animals.

The SLC5A8 is a Na⁺-coupled and electrogenic transporter, able to concentrate short fatty acids into the cell: with a Na⁺ and substrate stoichiometry between 4:1 and 2:1.⁴⁰ The activity and expression of SLC5A8 and NKCC1 in the cell are related to the Na⁺ and Cl⁻ ions transport into the cell; their intracellular and extracellular concentrations, which are sex-dependent,⁴¹ and essential for immune-inflammatory, glycolytic processes.⁴² A mice study shows that NKCC1 performs a novel role in acute lung inflammatory responses: a specific NKCC1 inhibition could benefit sepsis treatment.⁴³

By mitochondrial mechanisms, VPA inhibits HDACs activity,³¹ inducing DNA demethylation and increase the SLC5A8 gene expression.^{12,18,19} Pro-inflammatory-immune cells derive most of their energy from aerobic glycolysis rather than mitochondrial oxidation to generate higher energy and maintain their enhanced activity.²³ The virus-activated T cells starting accelerated growth and proliferation need glucose uptake and glycolysis.⁴⁴⁻⁴⁶ VPA treatment decreases glucose blood concentration in animals and humans.^{47,48}

VPA inhibits Th1 and Th17 cells and related pro-inflammatory cytokines.⁴⁹ VPA polarizes macrophages from M1 to M2 phenotype, which cannot induce naïve CD4⁺ T cells differentiation into a Th1 profile, favoring a Th2 phenotype⁵⁰ by mitochondria affected immune cell metabolism changing from the down TCA cycle to β-oxidation.⁵¹ VPA does not affect the viability and the activation of CD8⁺ T lymphocytes exposed to viral peptides,³⁰ increased CD4⁺ T cell level with no change in CD8⁺ T cell level.⁵² HDACs inhibition by VPA alters the gene expression related to cell differentiation and apoptosis.^{33,36} In females, aging does not lead to T cell dysfunction, and older females generate strong T cell immunity; men aging leads to T cell dysfunction.⁵³

VPA inhibits the aerobic glycolysis in tumor cells by reducing glucose uptake and decreasing lactate and ATP production via lowering the levels of E2F transcription factor 1; VPA affects E2F1 binding to the promoter of glycolytic genes GPI and PGK1.⁵⁴ Such VPA impact on glycolysis shows a new therapeutic strategy in researching the VPA effect on immune cells. The expression of SLC5A8 in T cells may likely affect the immune response and be related to the viral disease progression. It is known that the decreased SLC5A8 expression is the risk factor for *Helicobacter pylori* infection in children⁵⁵; the low SLC5A8 expression is related to papillomavirus-related carcinogenesis.⁵⁶ The limitation of the study is that the influence of sex hormones on thymocytes SLC5A8 expression has not been studied. Further studies are needed to

determine the role of SLC5A8 transporter expression with sex-specific risk mechanisms for disease progression.

Conclusions

Gonad-intact male rat thymocytes express a higher SLC5A8 RNA level than gonad-intact females. The effect of VPA treatment on the SLC5A8 RNA gene expression in rat thymocytes depends on gender and gonadal hormones. The VPA treatment caused an opposite effect on the SLC5A8 gene expression in gonad-intact female and male rats thymocytes. In gonadectomized rats, VPA decreases the SLC5A8 expression in castrated males, with no effect in ovariectomized female rat thymocytes.

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 present study was funded by the Research Fund of the Lithuanian University of Health Sciences [No.V-31; 2019-12-18].

Ethics approval

Ethical approval for this study was obtained from the STATE FOOD and VETERINARY SERVICE of LITHUANIA (2017-01-02 No. G2-53).

Animal welfare

The present study followed international, national, and/or institutional guidelines for human animal treatment and complied with relevant legislation.

ORCID iD

Donatas Stakišaitis  <https://orcid.org/0000-0002-1547-7050>

Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

References

1. Perucca E (2002) Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 16: 695–714.
2. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, et al. (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anti-convulsant, mood stabilizer, and teratogen. *Journal of Biological Chemistry* 276: 36734–36741.
3. Naasani I (2020) Compare analysis, a bioinformatic approach to accelerate drug repurposing against Covid-19 and

- other emerging epidemics. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* 26: 345–351.
4. Andreu S, Ripa I, Bello-Morales R, et al. (2020) Valproic acid and its amidic derivatives as new antivirals against alphaherpesviruses. *Viruses* 12: 1356.
 5. Nunn AVW, Guy GW, Brysch W, et al. (2020) SARS-CoV-2 and mitochondrial health: implications of lifestyle and ageing. *Immunity & Ageing* 17: 33–21.
 6. Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, et al. (2008) Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 31: 205–216.
 7. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, et al. (2013) Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics* 23: 236–241.
 8. Gopal E, Fei Y-JJ, Miyauchi S, et al. (2005) Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by *slc5a8*, a member of the Na⁺/glucose cotransporter gene family. *Biochemical Journal* 388: 309–316. Epub ahead of print 15 May 2005. DOI: 10.1042/BJ20041916.
 9. Gopal E, Fei Y-J, Sugawara M, et al. (2004) Expression of SLC5A8 in kidney and its role in Na⁺-coupled transport of lactate. *Journal of Biological Chemistry* 279: 44522–44532.
 10. Thangaraju M, Cresci G, Itagaki S, et al. (2008) Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 12: 1773–1782.
 11. Thangaraju M, Karunakaran SK, Itagaki S, et al. (2009) Transport by SLC5A8 with subsequent inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC3 underlies the antitumor activity of 3-bromopyruvate. *Cancer* 115: 4655–4666.
 12. Babu E, Ramachandran S, Cothandandaswamy V, et al. (2011) Role of SLC5A8, a plasma membrane transporter and a tumor suppressor, in the antitumor activity of dichloroacetate. *Oncogene* 30: 4026–4037.
 13. Thangaraju M, Ananth S, Martin PM, et al. (2006) *c/bpδ* Null mouse as a model for the double knock-out of *slc5a8* and *slc5a12* in kidney. *Journal of Biological Chemistry* 281: 26769–26773.
 14. Frank H, Gröger N, Diener M, et al. (2008) Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 283: 24729–24737.
 15. Singh N, Thangaraju M, Prasad PD, et al. (2010) Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. *Journal of Biological Chemistry* 285: 27601–27608.
 16. Zimmerman MA, Singh N, Martin PM, et al. (2012) Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent fas upregulation and fas-mediated apoptosis of T cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 302: G1405–G1415.
 17. Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, et al. (2009) Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochemical Journal* 417: 379–389.
 18. Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, et al. (2007) Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28: 560–571.
 19. Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, et al. (2017) DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. *PLoS One* 12: e0170740.
 20. Kaji I, Iwanaga T, Watanabe M, et al. (2015) SCFA transport in rat duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 308: G188–G197.
 21. Omer S, Koumangoye R and Delpire E (2020) A mutation in the Na-K-2Cl cotransporter-1 leads to changes in cellular metabolism. *Journal of Cellular Physiology* 235: 7239–7250.
 22. Juknevičienė M, Balnytė I, Valančiūtė A, et al. (2019) Valproic acid inhibits Na-K-2Cl cotransporter RNA expression in male but not in female rat thymocytes. *Dose-Response* 17: 1559325819852444.
 23. Shyer JA, Flavell RA and Bailis W (2020) Metabolic signaling in T cells. *Cell Research* 30: 649–659.
 24. Kloc M, Ghobrial RM and Kubiak JZ (2020) The role of genetic sex and mitochondria in response to COVID-19 infection. *International Archives of Allergy and Immunology* 181: 629–634.
 25. European Medicines Agency. 2011. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals part I (parent guideline). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002828.pdf (accessed 12 July 2018).
 26. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25: 402–408.
 27. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270–273.
 28. Bhavesh NS and Patra A. Virtual screening and molecular dynamics simulation suggest valproic acid co-A could bind to SARS-CoV2 RNA depended RNA polymerase. Epub ahead of print 26 March 2020. DOI: 10.20944/preprints202003.0393.v1.
 29. Hull EE, Montgomery MR and Leyva KJ (2016) HDAC inhibitors as epigenetic regulators of the immune system: impacts on cancer therapy and inflammatory diseases. *Biomed Research International* 2016: 8797206.
 30. Li G, Nowak M, Bauer S, et al. (2013) Levetiracetam but not valproate inhibits function of CD8⁺ T lymphocytes. *Seizure* 22: 462–466.

31. Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, et al. (2011) Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145: 607–621.
32. Bennett RL and Licht JD (2018) Targeting epigenetics in cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 58: 187–207.
33. Falkenberg KJ and Johnstone RW (2014) Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 13: 673–691.
34. Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, et al. (2000) Sodium valproate inhibits production of TNF- α and IL-6 and activation of NF- κ B. *Brain Research* 857: 246–251.
35. Dowdell KC, Pesnicak L, Hoffmann V, et al. (2009) Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas-deficient MRL/lpr $^{-/-}$ murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Experimental Hematology* 37: 487–494.
36. Khan O and La Thangue NB (2012) HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology & Cell Biology* 90: 85–94.
37. Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, et al. (2008) Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33: 728–740.
38. Leposavic G and Perisic M (2008) Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines. *Neuroimmunomodulation* 15: 290–322.
39. Rais M, Wilson RM, Urbanski HF, et al. (2017) Androgen supplementation improves some but not all aspects of immune senescence in aged male macaques. *GeroScience* 39: 373–384.
40. Miyauchi S, Gopal E, Fei Y-J, et al. (2004) Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na $^{+}$ -coupled transporter for short-chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 279: 13293–13296.
41. Grikiniene J, Volbekas V and Stakisaitis D (2004) Gender differences of sodium metabolism and hyponatremia as an adverse drug effect. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 40: 935–942.
42. Amara S and Tiriveedhi V (2017) Inflammatory role of high salt level in tumor microenvironment (review). *International Journal of Oncology* 50: 1477–1481.
43. Nguyen MT, Pace AJ and Koller BH (2007) Mice lacking NKCC1 are protected from development of bacteremia and hypothermic sepsis secondary to bacterial pneumonia. *Journal of Experimental Medicine* 204: 1383–1393.
44. Kidani Y, Elsaesser H, Hock MB, et al. (2013) Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nature Immunology* 14: 489–499.
45. Sinclair LV, Rolf J, Emslie E, et al. (2013) Control of amino acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nature Immunology* 14: 500–508.
46. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, et al. (2011) The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 35: 871–882.
47. Khan S and Jena G (2016) Valproic acid improves glucose homeostasis by increasing beta-Cell proliferation, function, and reducing its apoptosis through HDAC inhibition in Juvenile diabetic rat. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 30: 438–446.
48. Rakitin A, Köks S and Haldre S (2015) Valproate modulates glucose metabolism in patients with epilepsy after first exposure. *Epilepsia* 56: e172–e175.
49. Long J, Chang L, Shen Y, et al. (2015) Valproic acid ameliorates graft-versus-host disease by downregulating Th1 and Th17 Cells. *The Journal of Immunology* 195: 1849–1857.
50. Wu C, Li A, Leng Y, et al. (2012) Histone deacetylase inhibition by sodium valproate regulates polarization of macrophage subsets. *DNA and Cell Biology* 31: 592–599.
51. Angajala A, Lim S, Phillips JB, et al. (2018) Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immuno-metabolism. *Frontiers in Immunology* 9: 1605.
52. Lee K, Vivithanaporn P, Siemieniuk RA, et al. (2010) Clinical outcomes and immune benefits of anti-epileptic drug therapy in HIV/AIDS. *BMC Neurology* 10: 44.
53. Takahashi T, Wong P, Ellingson MK, et al. (2020) Sex differences in immune responses to SARS-CoV-2 that underlie disease outcomes. *medRxiv* 588: 315–320.
54. Fang E, Wang J, Hong M, et al. (2019) Valproic acid suppresses Warburg effect and tumor progression in neuroblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 508: 9–16.
55. Orellana-Manzano A, O’Ryan MG, Lagomarcino AJ, et al. (2016) Helicobacter pylori infection is associated with decreased expression of SLC5A8, a cancer suppressor gene, in young children. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6. Epub ahead of print 10 October 2016. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00121.
56. Hernández-Juárez J, Vargas-Sierra O, Herrera LA, et al. (2019) Sodium-coupled monocarboxylate transporter is a target of epigenetic repression in cervical cancer. *International journal of oncology* 54: 1613–1624.

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
SAGE

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/ham/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 (Rumšiškės, 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 μm^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

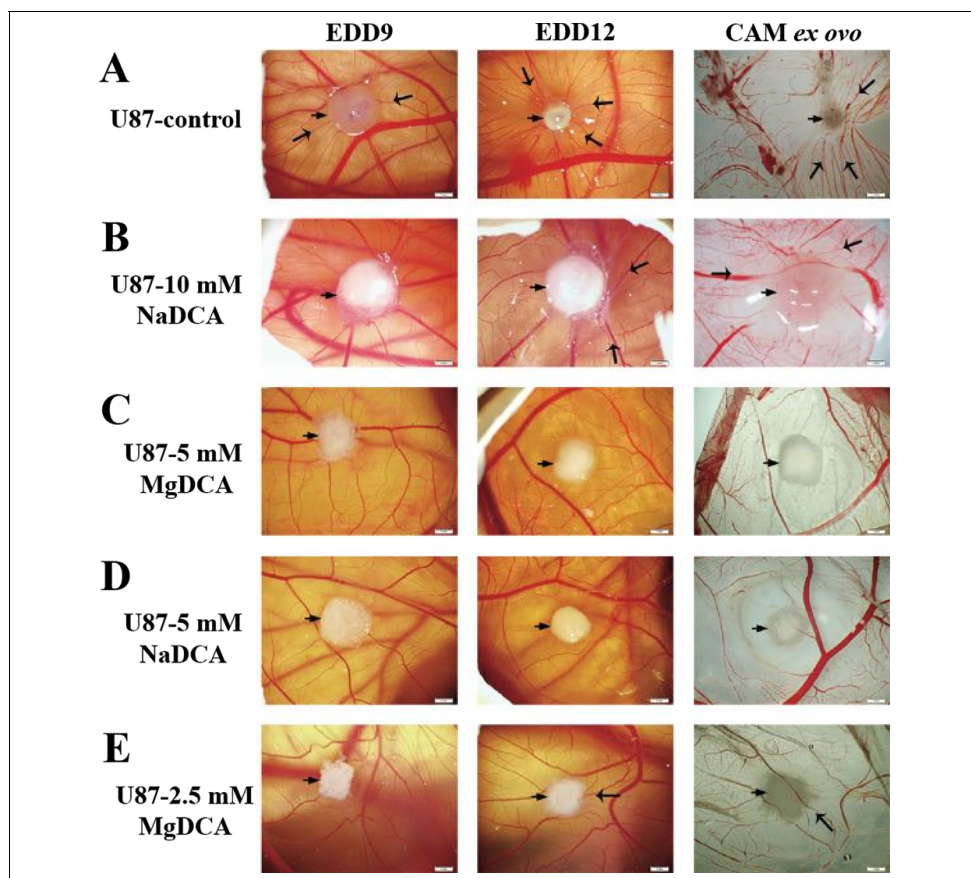


Figure 1. Biomicroscopy of U87 tumor on CAM *in vivo* and the chorioallantoic membrane with tumor *ex ovo* of the study groups (A, B, C, D, E). The EDD9 pictures represent the tumor 2 days after the xenograft transplantation, and EDD12—after 5 days of transplantation on CAM. The *ex ovo* photos represent 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

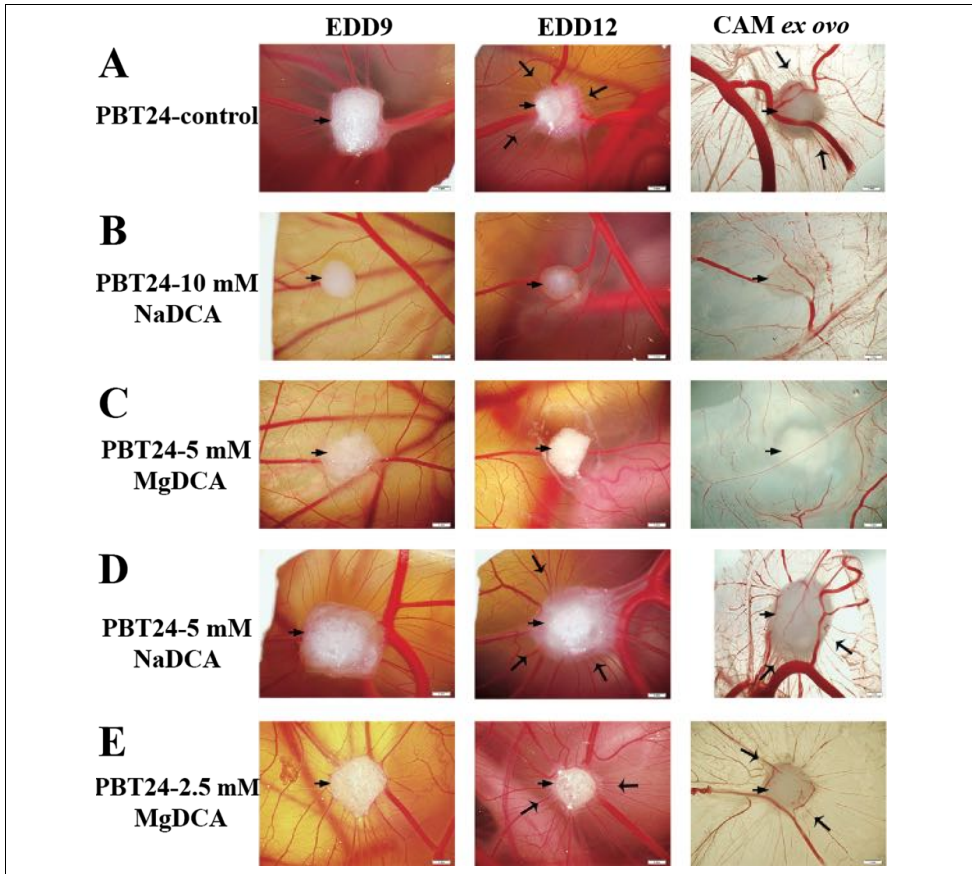


Figure 2. Biomicroscopy of PBT24 tumor in vivo and chorioallantoic membrane with tumor ex ovo of the study groups (A, B, C, D, E). The EDD9 pictures show the tumor 2 days after, and the EDD12—5 days after its transplantation on CAM. Ex ovo pictures represent the harvested tumor with CAM at EDD12. A short 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 μm with the range being from 35.68 to 51.19 μm ($n = 10$). 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

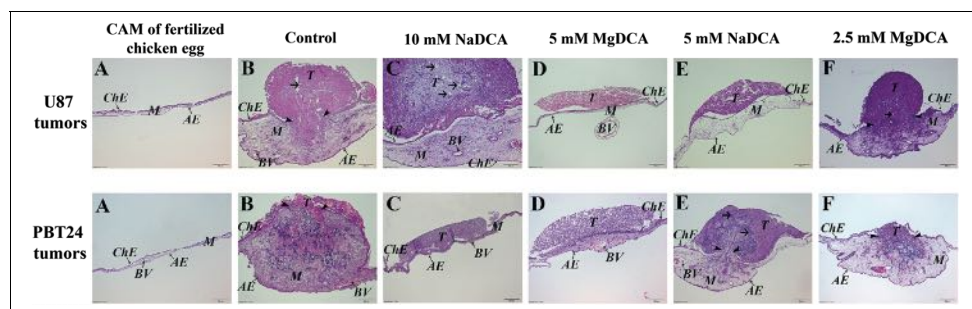


Figure 3. The histologic images of CAM, tumor growth, and its invasion into the CAM frequency in the U87 and PBT24 study groups. A—CAM of a fertilized chicken egg without tumor, B—control tumor, C—10 mM NaDCA, D—5 mM MgDCA, E—5 mM NaDCA tumor, F—2.5 mM MgDCA. Arrowhead indicates the destruction of the 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: chorioalantoic 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) ^e	7 (2–27) ^g
PBT24-5 mM NaDCA	13	53.85 ^{c,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: chorioalantoic 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

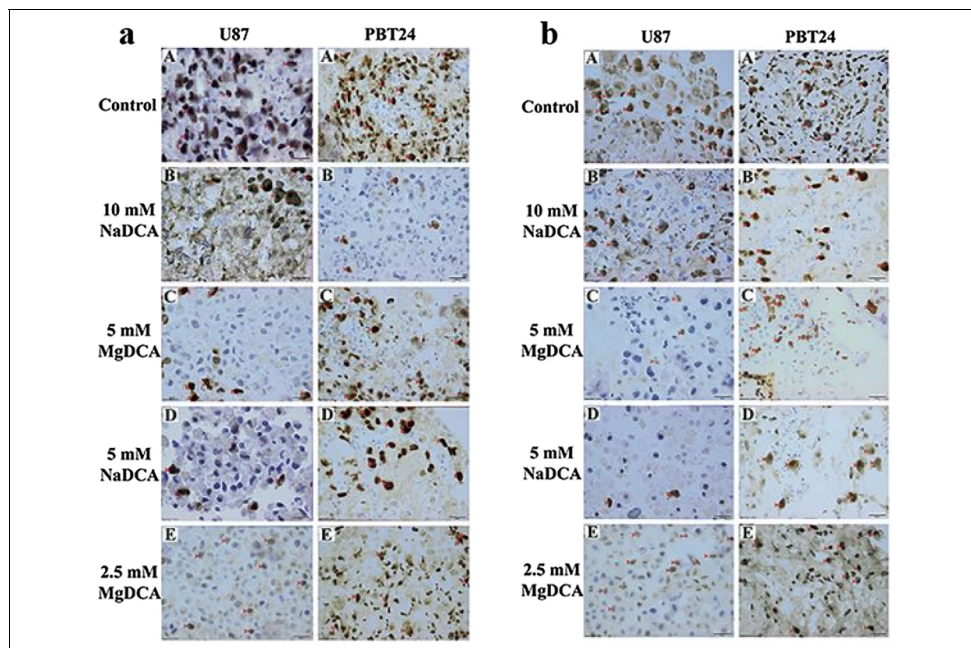


Figure 4. PCNA- and EZH2-positive stained tumor of the U87 and PBT24 study groups. **a.** PCNA-positive stained tumor of the U87 and PBT24 study groups. A—control, B—10 mM NaDCA, C—5 mM MgDCA, D—5 mM NaDCA, and E—2.5 mM MgDCA treated tumors. Red arrowhead indicates positively stained cells. Scale bar—20 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 Mg²⁺ 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 [Cl⁻]_i to levels ~10-fold higher than average.⁴⁴ GB cell [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 Mg²⁺ 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 Mg²⁺ is required in mitochondrial function and glycolysis processes.⁵⁵ The relevance of intracellular and extracellular Mg²⁺ concentration to tumorigenesis has been shown to be associated with contradictory data.^{56,57} Elucidation of the relationship between Mg²⁺ and tumorigenesis by preclinical data could be significant in the clarification of Mg²⁺ 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/braincstumorsinadults/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
- Velupula 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, Goliaivos 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, Damaskienė 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*. 2015;6(3):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

Valproic Acid Inhibits NA-K-2CL Cotransporter RNA Expression in Male But Not in Female Rat Thymocytes

Dose-Response:
An International Journal
April-June 2019; 1-8
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1559325819852444
journals.sagepub.com/home/dos



Milda Juknevičienė¹, Ingrida Balnytė¹, Angelija Valančiūtė¹, Vaiva Lesauskaitė²,
Jurate Stanevičiūtė¹, Rūta Curkūnavičiūtė¹, and Donatas Stakišaitis^{1,3} 

Abstract

Objective: The NKCCI is a recognized tumorigenesis marker as it is important for tumor cell proliferation, differentiation, apoptosis, and tumor progression. The study aim was to investigate the effect of sodium valproate (VPA) on thymus NKCCI RNA expression.

Material and Methods: Wistar rats, age 4 to 5 weeks, were investigated in the control and VPA-treated male and female gonad-intact and castrated groups. The treatment duration with VPA 300 mg/kg/d was 4 weeks. Rat thymus was weighted; its lobe was taken for the expression of NKCCI RNA determined by the real-time polymerase chain reaction method.

Results: The RNA expression of the *Slc12a2* gene was found to be significantly higher in the gonad-intact male control compared with the gonad-intact female control ($P = .04$). There was a gender-related VPA treatment effect on NKCCI RNA expression in thymus: The *Slc12a2* gene RNA expression level was found to be decreased in VPA-treated gonad-intact males ($P = .015$), and no significant VPA effects were found in the castrated males and in the gonad-intact and castrated females compared with the respective controls ($P > .05$).

Conclusions: The study showed a gender-related difference in the NKCCI RNA expression in rat thymus. The VPA decreases the NKCCI expression in the thymus only in gonad-intact male rats. The NKCCI RNA expression downregulation by VPA could be important for further VPA pharmacological studies in oncology.

Keywords

valproic acid, thymus, NKCCI, gender, rat

Introduction

The valproic acid (VPA) is a histone deacetylase inhibitor.¹ The VPA alters the expression of genes, suppresses cell proliferation, inhibits cell growth through cell-cycle arrest, and increases apoptosis.²⁻⁴ It belongs to a class of potent epigenetic modulators, acts as an immunomodulator, and is a potential investigational product for cancer treatment: The nonclinical data suggest that the VPA could be used in combination with several hormonal, cytotoxic and immunotherapeutic agents, and radiation therapy as an adjunctive product and with the existing therapies to increase the treatment effectiveness, disease-free survival, and to decrease resistance emergence in the cancer therapy.⁵⁻⁸ The VPA was approved by the Competent Authorities as an investigational medicinal product for 84 clinical trials treating different cancers.⁹

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

² Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

³ Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania

Received 06 March 2019; received revised 12 April 2019; accepted 23 April 2019

Corresponding Author:

Donatas Stakišaitis, Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Mickevičiaus Str 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania.

Email: donatas.stakisaitis@ismuni.lt



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial 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>).

The valproic acid suppresses proliferation in vitro of T cells,¹⁰ reduces lymphoproliferation,¹¹ and activates the lymphocyte apoptosis.¹² The VPA treatment for 8 weeks significantly reduces the spleen and lymph node weight and cellularity compared to control in MRL/lpr(−/−) mice females.¹¹ Thymus weight reduction was induced after VPA prenatal exposure in male but not in female newborn rats.¹³ Age-related thymus involution depends on sex hormones.¹⁴ The VPA decreases the rat thymus weight concomitantly with increasing in thymus the number of Hassall's corpuscles, which is gonad hormone dependent.¹⁵ Hassall's corpuscles represent the terminal stage of thymic medullary epithelial cell differentiation^{16,17} and participate in the removal of apoptotic or the maturation of thymocytes.^{18,19} Thymocytes and thymic epithelial cells possess functional androgen receptors.²⁰ Many aspects of the VPA treatment significance in gender-related pathophysiological processes have not been elucidated.

The experimental data indicate that VPA has aquaretic and saluretic effects in rats: Alongside its diuretic effect, VPA enhances Na^+ , Cl^- , and K^+ excretion with 24-hour urine.^{21,22} Also, VPA significantly increases the urinary excretion of magnesium ions.²³ The abovedescribed saluretic effects of VPA on urinary ion excretion could be characteristic for the Na-K-2Cl (NKCC2) inhibition in rat kidney because NKCC2 inhibitors increase urinary monovalent as well as divalent cation excretion.²⁴ The NKCC1 is responsible for sodium and chloride (Cl^-) influx into thymocytes.²⁵ The intracellular Cl^- concentration would be one of the critical messengers in cell proliferation and differentiation processes.^{26,27}

The abovedescribed facts induce the aim to test the VPA pharmacological effect on NKCC1 RNA expression in the rat thymus. The article presents data on the pharmacological VPA effect as the inhibition of NKCC1 RNA expression in rat thymocytes after the repeated VPA dosage treatment that is gender related.

Materials and Methods

Study Design

The effect of the VPA treatment on the thymus was investigated in the following 8 groups of age-matched Wistar rats of both genders: gonad-intact and castrated male and female controls and in respective male and female VPA-treated groups. The permission was obtained from the State Food and Veterinary Service of Lithuania to use experimental animals for research (2015-05-18 No. G2-28). The animals were purchased from the Animals Facility of the Veterinary Academy at the Lithuanian University of Health Sciences (Kaunas, Lithuania). The experiment was carried out at the Animal Research Center at the Lithuanian University of Health Sciences (Kaunas, Lithuania). The animals were housed in standard colony cages with free access to food, in the conditions of constant temperature (21°C [1°C]), humidity, and the light/dark cycle (12-hour/12-hour). A commercial pellet diet was provided ad libitum. The experiments were performed in compliance with the

relevant laws and institutional guidelines for animal care in order to avoid any unnecessary animal distress.

For the experiment, 4 to 5 weeks aged Wistar rats were selected with the same animal number ($n = 6$) in the groups; there was no difference in rat weight among the formed groups. In the animal groups selected for castration, the male orchidectomy and female ovariectomy operations were performed. The castration was performed at the age of 28 (2) days (in the peripubertal period of animals). The accommodation period after the castration was 1 week. After the accommodation period, the treatment of gonad-intact and castrated animals was started. At the end of the experiment, one castrated VPA-treated female was eliminated from the study due to a fistula formed after the operation and significant weight loss.

Treatment with VPA aqueous solutions (300 mg/kg/d) in drinking water was used. The only source of drinking was the VPA solution for treated groups, and fresh tap water was provided for the control groups; VPA solution and water were offered to animals ad libitum. The treatment duration was 4 weeks.

Thymus Preparation

Completing the experiment, the animals were killed in a 70% CO_2 camera. To minimize the thymus contamination with red blood cells, the *carotid* arteries and the aorta were cut, and the animals exsanguinated. Upon killing the animals, their thymus was harvested and the contaminating blood was removed by rinsing with RPMI-1640 (Biological Industries, Israel). The weight of the thymus was evaluated, and the left rat thymus lobe samples of the study groups after thymus surrounding connective tissue were removed and the thymus lobe was stored in the RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen, Germany) at -80°C until further RNA extraction and analysis.

Extraction of RNA From the Thymus

Rat thymus samples of all study groups were stored in RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen) at -80°C until further RNA extraction. The frozen tissue was ground in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the TRIzol Plus RNA purification kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instruction. The integrity of the total RNA was analyzed using the Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with an Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). All RNA samples had the RNA integrity number (RIN) higher than 5. The quantity and quality of RNA samples were measured with a NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). Only the RNA samples with the 260:280 ratio between 1.9 and 2.1 and the 260:230 ratio greater than 2.0 were used for the downstream analysis. The extracted RNA samples were stored at -80°C until further analysis.

Determination of the *NKCC1* Expression in Thymus

RNA expression assay was performed for *Slc12a2* (Rn00582505_m1) and *Glpdh* (Rn01775763_g1) genes. High-capacity complementary DNA (cDNA) reverse transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) was used for reverse transcription reaction in 20 μ L reaction volume containing 50 ng of total RNA incubated at 25°C for 10 minutes, transcribed at 37°C for 120 minutes, and terminated by heating at 85°C for 5 minutes using Biometra TAdvanced thermocycler (Analytik Jena AG, Germany). The synthesized cDNA was stored at 4°C until use or at -20°C for a longer time. The real-time polymerase chain reaction (PCR) was run in triplicate with 4 μ L of cDNA template in a 20 μ L reaction volume (10 μ L of TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), 1 μ L of TaqMan gene expression assay 20 \times (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), 5 μ L of nuclease-free water (Invitrogen, Carlsbad, CA) with the program running at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The reaction was performed using an Applied Biosystems 7900 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the Statistical Package (IBM SPSS Statistics v22.0) for Windows. The normality assumption was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. The animal weight data are expressed as the mean (standard deviation) values. The thymus weight data are presented as the median and the range (minimum and maximum values). Differences between 2 independent groups were evaluated using the nonparametric the Mann-Whitney *U* test. The 1-way analysis of variance was used to determine significance among the groups, and post hoc tests with Fisher least significant difference were used for comparison among the individual groups. To investigate the *NKCC1* (*Slc12a2*) RNA expression changes in the VPA-treated group, the threshold cycle (CT) values were normalized with the control *Glpdh* gene; for the gene expression study, the delta delta threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method was used to calculate the expression ratio between the VPA-treated (test) and control conditions of the target gene compared with the reference gene. Spearman rank correlation coefficient (*r*) was used to assess the relationship between thymus weight and ΔCT value. Differences at the value of $P < .05$ were considered significant.

Results

VPA Impact on Rat Thymus Weight

No statistically significant difference was found in thymus weight between the male and female control groups and the castrated male and female rat controls ($P > .05$). Comparing gonad-intact and castrated rats, the thymus weight in castrated rats of both genders was found increased: The gonad-intact and the castrated controls of both gender groups indicated a

Table 1. Rat Thymus Weight Data in Male and Female Study Groups.

Study Group	Thymus Weight (g), Median (Min-Max)	
	Males	Females
Gonad-intact rats		
Control	0.639 (0.483-0.823)	0.496 (0.495-0.508)
VPA treated	0.596 (0.551-0.624)	0.447 (0.3760.468)
Castrated rats		
Control	0.793 (0.682-0.982) ^a	0.808 (0.625-1.172) ^b
VPA treated	0.775 (0.669-0.887)	0.857 (0.364-1.185)

Abbreviation: VPA, valproic acid.

^a*P* – significant compared with the gonad-intact male control.

^b*P* – significant compared with the gonad-intact female control.

significant thymus weight increase in castrated males ($P = .02$) and females ($P = .001$). The thymus weight of gonad-intact control male and female rat groups was higher than in respective male and female rats treated for 4 weeks with 300 mg/kg VPA, although the difference was not significant ($P > .05$); a comparison of the thymus weight of castrated rats and castrated VPA-treated rats of both genders showed a thymus weight loss after VPA treatment, although no statistically significant difference was found ($P > .05$; Table 1).

The VPA Impact on the *NKCC1* RNA Expression in the Rat Thymus

The expression difference in the *Slc12a2* and *Glpdh* genes comparing the VPA-treated and the control groups as well as the data of male and female controls is considered as the ΔCT value. The *Slc12a2* RNA expression in the thymus after normalization with the *Glpdh* gene in analyzed rats groups is shown in Figure 1.

The significant difference was found between the ΔCT values of the gonad-intact male control and gonad-intact female control groups ($P = .04$). In the gonad-intact male group, the *Slc12a2* gene expression after normalization with *Glpdh* gene was found a significant difference between the VPA-treated and the control groups ($P = .015$). The difference between the ΔCT of a target and reference genes as expressed by the $\Delta\Delta CT$ is shown in Table 2. The RNA expression level ($2^{-\Delta\Delta CT}$) in the gonad-intact VPA-treated males was 0.116-fold lower compared with the control. This means the 88% downregulation of expression as the expression level is decreased by 88% to the level of 12% under control conditions. The significant difference between the ΔCT values of gonad-intact VPA-treated female and male groups was found ($P = .032$). Also, there was a nonsignificant *Slc12a2* gene expression change in the castrated male VPA-treated group compared with its control: Its expression level was found to be decreased by 70% in VPA-treated animals ($P = .471$). There was no statistical significance in the RNA expression analysis when comparing the control and the VPA-treated groups in both gonad-intact and castrated female rats ($P > .05$; Table 2 and Figure 1).

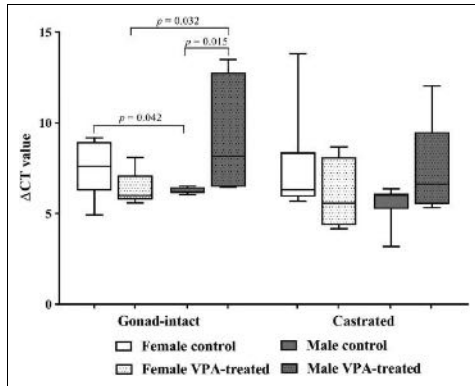


Figure 1. *Slc12a2* RNA levels in the rats after normalization with *Glp1h* gene. Delta threshold cycle (Δ CT) method was used for this analysis (the horizontal bars represent the mean, the minimal and maximal values are shown with short horizontal lines).

Table 2. RNA Expression of NKCC1 in Thymus of the Study Groups.

Study Group	CT Mean				
	<i>Glp1h</i>	<i>Slc12a2</i>	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
Gonad-intact female					
Control	23.530	31.130	7.600	-1.256	2.389
VPA treated	23.083	29.427	6.344 ^a		
Gonad-intact male					
Control	22.905	29.134	6.229 ^b	3.103	0.116
VPA treated	22.982	32.314	9.332 ^c		
Castrated female					
Control	22.675	30.115	7.440	-1.340	2.531
VPA treated	24.831	30.931	6.100		
Castrated male					
Control	24.712	30.305	5.593	1.734	0.301
VPA treated	22.319	29.646	7.327		

Abbreviations: CT, threshold cycle; VPA, valproic acid.

^aP – significant compared with the gonad-intact VPA-treated male.

^bP – significant compared with the gonad-intact female control.

^cP – significant compared with the gonad-intact male control.

No significant correlations between thymus weight and Δ CT values were found in the study groups (data are not shown).

Discussion

Three decades ago, researchers suggested that the anticonvulsant medicine VPA induces anticancer effect, inhibiting proliferation, inducing the differentiation, and immunogenicity of glioblastoma cells in vitro.²⁸ In 2001, VPA was reported to be the histone deacetylase (HDAC) inhibitor, and by this mechanism, it induces cancer cell proliferation, inhibition, and differentiation²⁹; cell-cycle arrest; and apoptosis.⁵ The

VPA is a selective inhibitor of class I and IIa HDAC isoforms, with the highest selectivity for HDAC2.^{30,31} The VPA increases the turnover of δ -aminobutyric acid (GABA) in neurons.³² The GABA A receptor subunits form a functional chloride channel,³³ which is expressed in rat kidney and other tissue cells.³⁴⁻³⁶

The new VPA effect was observed: The VPA diuretic effect and its relation to Na^+ , K^+ , Cl^- and Mg^{2+} 24-hour urinary excretion; the total 24-hour diuresis and the 24-hour diuresis per 100 g of body weight were found to be significantly higher in VPA-treated rats of both genders than in the control groups with gender-related differences.²¹⁻²³ These data support the possible NKCC2 inhibition by VPA, as the increased diuresis and increased saluretic effect accompanied by an increase in divalent ions in the urine is characteristic of the NKCC2 inhibition in kidneys.^{24,37} A gender difference in the NKCC2 in rat kidneys is known: The lower abundance of NKCC2 was observed in females compared with males.³⁸ It was supposed that the gender-related diuretic effect of medicines in rats could be due to males' larger body water content than in females.³⁹

NKCC belongs to the Cl^- cotransporter family; there are 2 NKCC isoforms: NKCC1 and NKCC2. NKCC1 is distributed in various tissue types, and NKCC2 is expressed in the kidney.⁴⁰ The NKCC activity is controlled by phosphorylation; the phosphoacceptor sites are highly preserved in both NKCC1 and NKCC2, and these isoforms are activated in a similar phosphorylation manner of the N-terminus.^{40,41} NKCC1 is expressed in most tissues, it transports 1 Na^+ , 1 K^+ and 2 Cl^- ions into a cell and plays a major role in Cl^- accumulation.^{40,42} By accumulating Cl^- , migrating cancer cells can utilize the electrochemical driving force for Cl^- efflux to osmotically release cytoplasmic water, thus modulating the cellular volume and cell migration: Pharmacological inhibition of NKCC1 with bumetanide reduces glioma cell migration and invasion.⁴³

The NKCC1 activity in rat thymocytes was found to be related with the Cl^- influx, which is sensitive to the NKCC inhibitor furosemide.^{25,44} NKCC1 is an important biomarker of the cell ion homeostasis regulation; it participates in the cell regulatory volume increase and can be activated in chloride depleted cells.⁴⁵ NKCC1 stimulation in the G_1 phase is essential for the proliferation of certain cell types via cell-cycle progression by modulating cell volume.⁴⁰

The thymus is a valuable model in experimental research for evaluating the impact of medicinal products on thymocyte proliferation. The study results show that the NKCC1 RNR expression in the gonad-intact rat thymocytes is gender dependent: It was significantly more expressed in male rats compared with females. We did not find respective data concerning thymocytes in the literature, but there are data about gender-related differences in the NKCC function activity or its protein expression. On the day of birth, the NKCC1 messenger RNA (mRNA) level was higher in male than in female rat hypothalamus, and the total NKCC1 protein level was higher in the male than in female hypothalamus of rat fetuses.⁴⁶ The mean value of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport protein in red blood cells was by 26% to 46% higher in men than that in women.^{47,48} The

NKCC1 cotransport activity was found to be lower in women erythrocytes during the follicular phase⁴⁹. The lowest in ovulatory women and the highest in men.⁵⁰ Other authors have shown that NKCC1 activity is unchanged during the menstrual cycle in female erythrocytes.⁵¹ There is a difference in the activity of NKCC1 comparing human and rat cells: In human neurons, the rate of the Cl⁻ transport via NKCC1 was smaller than that in rat neurons by 61.7%.⁵²

The study results show a gender-related repeated-dosage VPA treatment effect on the expression of NKCC1 in the rat thymus. The VPA was found as a significantly downregulated NKCC1 RNA expression in gonad-intact male thymocytes (expression level is decreased by 88% to the level of 12%), and nonsignificantly (decreased by 70% to the level of 30%) in the castrated VPA-treated male rats was observed. The tendency for VPA effect is clear and the lack of confidence possibly is related only with a small sample size. No significant VPA effect on the NKCC1 RNA expression in thymocytes was found in the gonad-intact and castrated female rats.

The study limitation is that the mRNA expression of NKCC1 is necessary to complete represents the transporter per se. Thus, further investigation of VPA effect on the transporter activity in relationship with gender and gonad hormone impact on the transporter protein level and NKCC1 function is necessary.

The NKCC activity in different cell types is regulated by oxidation and nitration; the oxidative/nitrosative stress effects on the NKCC activity may depend on the levels of free radicals or nitric oxide donors. Free radicals and protein tyrosine nitration can affect the NKCC structure and result in changes in its function.^{53,54} The NKCC1 activity inhibition was found in endothelial cells exposed to the oxidant tertbutylhydroperoxide.⁵⁴ Oxidative stress parameters were elevated in VPA-treated patients with epilepsy as compared with the nontreated control.⁵⁵ The reactive oxygen species (ROS) production can cause direct damage to cellular DNA, protein, lipids, and can alter normal cell signaling pathways.⁵⁶ The VPA has been shown to increase ROS production and induce apoptosis in several cancer cell lines.⁵⁷ There are data on gender-related difference in ROS production. Female mice have a lower oxidative stress activity compared with males, so females may be better protected against the ROS damage. Ovariectomy enhanced the ROS production parameters, whereas an orchidectomy did not modify the oxidative stress in mice.⁵⁸ The male rats showed higher production of hydrogen peroxide in cardiac mitochondria compared to females.⁵⁹ The rat thymocytes proliferation was inhibited by the increased formation of ROS production.⁶⁰

The study results show that castration significantly increased the thymus weight of both genders, and this was accompanied by the tendency to increase NKCC1 RNA. Castration induces an increased rat thymocyte proliferation with thymus hyperplasia.¹³ The VPA treatment effect of decreased NKCC1 RNA expression in the castrated male rats was lower compared with the gonad-intact males, indicating a possible synergistic VPA effect with testosterone. Thymus cells have

functional androgen receptors²⁰; androgens induce a decline of thymus weight in NZB mice⁶¹; the surgical and chemical castration of male rats caused regeneration of thymus,⁶² and castration of Sprague-Dawley rat enhanced thymic weight while gender hormones reduced the castration-induced thymus hypertrophy.⁶³ The study results show that the testosterone level declined after castration is related to vanishing the NKCC1 RNA expression gender difference noted among gonad-intact rats of both genders.

The study presents the gender-related VPA effect on the NKCC1 RNA expression in rat thymocytes. This imposes the necessity to evaluate the gender differences of VPA pharmacological efficacy in preclinical studies. The regulatory guideline for the study and evaluation of gender differences in the research of pharmaceuticals stresses the growing concerns that the investigational medicinal product development should provide adequate information about the effects of medicinal products in both genders.⁶⁴

The researchers reviewed the importance of Na⁺ and Cl⁻ ions in a tumor microenvironment as they are involved in cancer progression mechanisms.⁶⁵ NKCC regulating the urine excretion of Na⁺ and Cl⁻, as well as their intracellular and extracellular levels, increases its importance in cancerogenesis. NKCC1 plays an important role in cancer cell proliferation, apoptosis, and tumor progression,^{45,26} especially in cancer cells with a high NKCC1 expression.^{66,67} The tumors' intracellular Cl⁻ concentration could be one of the keys for anticancer therapy targets, and the regulation of the intracellular Cl⁻ concentration by NKCC1 activity would enhance the antitumor effect of anticancer medicines.^{26,68}

Conclusions

The study showed a gender-related difference in the NKCC1 RNA expression in rat thymus, which is gonad hormone dependent. The VPA decreases the NKCC1 expression in the thymus of gonad-intact males, but it has no significant effect in gonad-intact female rats. The NKCC1 RNA expression downregulation by VPA as the antitumor effect could be one of the keys for anticancer therapy targets, especially in the personalized treatment of cancer with NKCC1 overexpression in cells.

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 present study was funded by the Research Fund of the Lithuanian University of Health Sciences.

ORCID iD

Donatas Stakišaitis  <https://orcid.org/0000-0002-1547-7050>

References

- Santoro F, Botrugno OA, Dal Zuffo R, et al. A dual role for Hdac1: oncosuppressor in tumorigenesis, oncogene in tumor maintenance. *Blood*. 2013;121(17):3459-3468. doi:10.1182/blood-2012-10-461988.
- Kwiecińska P, Tauböll E, Gregoraszczyk EL. Effects of valproic acid and levetiracetam on viability and cell cycle regulatory genes expression in the OVCAR-3 cell line. *Pharmacol Rep*. 2012; 64(1):157-165.
- Osuka S, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012; 52(4):186-193.
- Sidana A, Wang M, Shabbeer S, et al. Mechanism of growth inhibition of prostate cancer xenografts by valproic acid. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:180363. doi:10.1155/2012/180363.
- Heers H, Stanislaw J, Harrelson J, Lee MW. Valproic acid as an adjunctive therapeutic agent for the treatment of breast cancer. *Eur J Pharmacol*. 2018;835:61-74. doi:10.1016/j.ejphar.2018.07.057.
- Goey AK, Sissung TM, Peer CJ, Figg WD. Pharmacogenomics and histone deacetylase inhibitors. *Pharmacogenomics*. 2016; 17(16):1807-1815. doi:10.2217/pgs-2016-0113.
- Ochiai S, Nomoto Y, Yamashita Y, et al. Roles of valproic acid in improving radiation therapy for glioblastoma: a review of literature focusing on clinical evidence. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(2):463-466.
- Tran LNK, Kichenadasse G, Sykes PJ. Combination therapies using metformin and/or valproic acid in prostate cancer: possible mechanistic interactions. *Curr Cancer Drug Targets*. 2019;19(5): 368-381. doi:10.2174/1568009618666180724111604.
- U.S. National library of Medicine. Home – ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>. Accessed September 24, 2018.
- Lee K, Vivithanaporn P, Siemieniuk RA, et al. Clinical outcomes and immune benefits of anti-epileptic drug therapy in HIV/AIDS. *BMC Neurol*. 2010;10(1):44. doi:10.1186/1471-2377-10-44.
- Dowdell KC, Pesnick L, Hoffmann V, et al. Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas-deficient MRL/lpr^{-/-} murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Exp Hematol*. 2009;37(4):487-494. doi:10.1016/j.exphem.2008.12.002.
- Chen Q, Ouyang D, Geng M, et al. Valproic acid exhibits biphasic effects on apoptotic cell death of activated lymphocytes through differential modulation of multiple signaling pathways. *J Immunotoxicol*. 2011;8(3):210-218. doi:10.3109/1547691X.2011.568979.
- Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(6):728-740. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.02.011.
- Leposavic G, Perisic M. Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(4-6):290-322. doi:10.1159/000156473.
- Valančiūtė A, Mozuraitė R, Balnytė I, Didžiapetriene J, Matusėvičius P, Stakisaitis D. Sodium valproate effect on the structure of rat glandule thymus: gender-related differences. *Exp Toxicol Pathol*. 2015;67(7-8):399-406. doi:10.1016/j.etp.2015.04.005.
- White AJ, Nakamura K, Jenkinson WE, et al. Lymphotoxin signals from positively selected thymocytes regulate the terminal differentiation of medullary thymic epithelial cells. *J Immunol*. 2010;185(8):4769-4776. doi:10.4049/jimmunol.1002151.
- Yano M, Kuroda N, Han H, et al. Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med*. 2008;205(12):2827-2838. doi:10.1084/jem.20080046.
- Blau JN, Veall N. The uptake and localization of proteins, Evans blue and carbon black in the normal and pathological thymus of the guinea-pig. *Immunology*. 1967;12(4):363-372.
- Senelar R, Escola MJ, Escola R, Serrou B, Serre A. Relationship between Hassall's corpuscles and thymocytes fate in guinea-pig foetus. *Biomedicine*. 1976;24(2):112-122.
- Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, Gu X, Kovacs WJ. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology*. 2001;142(3):1278-1283. doi:10.1210/endo.142.3.8032.
- Grikinienė J, Stakisaitis D, Tschaika M. Influence of sodium valproate on sodium and chloride urinary excretion in rats, gender differences. *Pharmacology*. 2005;75(3):111-115. doi:10.1159/000087505.
- Jakutiene E, Grikinienė J, Vaitkevicius A, Tschaika M, Didžiapetriene J, Stakisaitis D. Sodium valproate stimulates potassium and chloride urinary excretion in rats: gender differences. *BMC Pharmacol*. 2007;7(1):9. doi:10.1186/1471-2210-7-9.
- Stakisaitis D, Driziene Z, Uleckiene S, Kazbariene B, Didžiapetriene J. Gender-related differences of urinary magnesium excretion: implications for chemotherapy in cancer patients. *Trace Elem Electrolytes*. 2011;28(10):208-212. doi:10.5414/TEX01180.
- Alexander RT, Dimke H. Effect of diuretics on renal tubular transport of calcium and magnesium. *Am J Physiol Physiol*. 2017;312(6):F998-F1015. doi:10.1152/ajprenal.00032.2017.
- Stakisaitis D, Lapointe MS, Batlle D. Mechanisms of chloride transport in thymic lymphocytes. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2001;280: F314-F324.
- 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.
- Shiozaki A, Miyazaki H, Niisato N, et al. Furosemide, a blocker of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, diminishes proliferation of poorly differentiated human gastric cancer cells by affecting G0/G1 state. *J Physiol Sci*. 2006;56(6):401-406. doi:10.2170/physiolsci.RP010806.
- Cinatl J, Cinatl J, Driever PH, et al. Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs*. 1997;8(10):958-963.
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of

- transformed cells. *EMBO J.* 2001;20(24):6969-6978. doi:10.1093/emboj/20.24.6969.
30. Terranova-Barberio M, Roca MS, Zotti AI, et al. Valproic acid potentiates the anticancer activity of capecitabine in vitro and in vivo in breast cancer models via induction of thymidine phosphorylase expression. *Oncotarget.* 2016;7(7):7715-7731. doi:10.18632/oncotarget.6802.
 31. Bicaku E, Marchion DC, Schmitt ML, Munster PN. Selective inhibition of histone deacetylase 2 silences progesterone receptor-mediated signaling. *Cancer Res.* 2008;68(5):1513-1519. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2822.
 32. Löscher W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs.* 2002;16(10):669-694.
 33. Bureau M, Laschet J, Minier F, Chauvel P. Intervention of GABAergic neurotransmission in partial epilepsies. *Rev Neurol (Paris).* 1997;153(suppl 1):S46-S54.
 34. Li YH, Liu Y, Li YD, et al. GABA stimulates human hepatocellular carcinoma growth through overexpressed GABAA receptor theta subunit. *World J Gastroenterol.* 2012;18(21):2704. doi:10.3748/wjg.v18.i21.2704.
 35. Sarang SS, Plotkin MD, Gullans SR, Cummings BS, Grant DF, Schnellmann RG. Identification of the gamma-aminobutyric acid receptor beta(2) and beta(3) subunits in rat, rabbit, and human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(6):1107-1113.
 36. Zhang X, Zhang R, Zheng Y, et al. Expression of gamma-aminobutyric acid receptors on neoplastic growth and prediction of prognosis in non-small cell lung cancer. *J Transl Med.* 2013;11(1):102. doi:10.1186/1479-5876-11-102.
 37. Wile D. Diuretics: a review. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(5):419-431. doi:10.1258/acb.2011.011281.
 38. Brandoni A, Villar SR, Torres AM. Gender-related differences in the pharmacodynamics of furosemide in rats. *Pharmacology.* 2004;70(2):107-112. doi:10.1159/000074675.
 39. Craft RM, Ulibarri CM, Raub DJ. Kappa opioid-induced diuresis in female vs. male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;65(1):53-59. doi:10.1016/S0091-3057(99)00186-0.
 40. Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* 2000;80(1):211-276. doi:10.1152/physrev.2000.80.1.211.
 41. Darman RB, Forbush B. A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37542-37550. doi:10.1074/jbc.M206293200.
 42. Hamann S, Herrera-Perez JJ, Zeuthen T, Alvarez-Leefmans FJ. Cotransport of water by the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in mammalian epithelial cells. *J Physiol.* 2010;588(21):4089-4101. doi:10.1113/jphysiol.2010.194738.
 43. Haas BR, Sontheimer H. Inhibition of the sodium-potassium-chloride cotransporter isoform-1 reduces glioma invasion. *Cancer Res.* 2010;70(13):5597-5606. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4666.
 44. Juška A, Stakišaitis D. Chloride/bicarbonate exchanger in rat thymic lymphocytes: experimental investigation and mathematical modeling. *Trace Elem Electrolytes.* 2013;30(4):167-172.
 45. Maeno E, Takahashi N, Okada Y. Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Lett.* 2006;580(27):6513-6517. doi:10.1016/j.febslet.2006.10.074.
 46. Perrot-Sinal TS, Sinal CJ, Reader JC, Speert DB, McCarthy MM. Sex differences in the chloride cotransporters, NKCC1 and KCC2, in the developing hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2007;19(4):302-308. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01530.x.
 47. Smith JB, Wade MB, Fineberg NS, Weinberger MH. Influence of race, sex, and blood pressure on erythrocyte sodium transport in humans. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 1988;12(3):251-258.
 48. Monaghan JC, Flemming CL, Stokes GS. Effects of 17 alpha-ethinyl oestradiol in vitro on erythrocyte cation transport in men and women. *Clin Exp Hypertens A.* 1991;13(1):53-63.
 49. M'Buyamba-Kabangu JR, Lijnen P, Lommelen L, et al. Physiologic variability of erythrocyte concentrations and transport of sodium and potassium. *Presse Med.* 1986;15(19):871-875.
 50. Gallery ED, Bean C, Grigg R, Saunders DM. The effect of cyclical hormonal changes on erythrocyte electrolyte transport mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 1986;70(3):263-269.
 51. Monaghan JC, Willcocks DA, Sinosich MJ, Stokes GS. Erythrocyte cation fluxes during the menstrual cycle in normal female subjects. *Clin Sci (Lond).* 1987;73(2):223-226.
 52. Deisz RA, Lehmann T-N, Horn P, Dehnicke C, Nitsch R. Components of neuronal chloride transport in rat and human neocortex. *J Physiol.* 2011;589(Pt 6):1317-1347. doi:10.1113/jphysiol.2010.201830.
 53. Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, et al. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem.* 2008;283(49):33874-33882. doi:10.1074/jbc.M804016200.
 54. Elliott SJ, Schilling WP. Oxidant stress alters Na⁺ pump and Na(+)-K(+)-Cl⁻ cotransporter activities in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Circ Physiol.* 1992;263(1):H96-H102. doi:10.1152/ajpheart.1992.263.1.H96.
 55. Nisha Y, Bobby Z, Wadwekar V. Biochemical derangements related to metabolic syndrome in epileptic patients on treatment with valproic acid. *Seizure.* 2018;60:57-60. doi:10.1016/j.seizure.2018.06.003.
 56. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci.* 2009;108(1):4-18. doi:10.1093/toxsci/kfn263.
 57. Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008;269(1):7-17. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.037.
 58. Gaignard P, Savouroux S, Liere P, et al. Effect of sex differences on brain mitochondrial function and its suppression by ovariectomy and in aged mice. *Endocrinology.* 2015;156(8):2893-2904. doi:10.1210/en.2014-1913.
 59. Vijay V, Han T, Moland CL, Kwekel JC, Fuscoe JC, Desai VG. Sexual dimorphism in the expression of mitochondria-related genes in rat heart at different ages. Marais GA, ed. *PLoS One.* 2015;10(1):e0117047. doi:10.1371/journal.pone.0117047.
 60. Aulwurm UR, Brand KA. Increased formation of reactive oxygen species due to glucose depletion in primary cultures of rat thymocytes inhibits proliferation. *Eur J Biochem.* 2000;267(18):5693-5698. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01576.X.

61. Simpson LO. Studies on the NZB mouse thymus. I. Thymus weight relationships to age and body weight from birth to old age. *Am J Anat.* 1974;141(1):127-132. doi:10.1002/aja.1001410108.
62. Dorko F, Kluchová D, Boleková A, Lovasová K, Špakovská T, Borošová T. Influence of surgical and chemical orchidectomy on weight and distribution of AChE-nerve fibres in thymuses of adult rats. *Eur J Histochem.* 2011;55(3):22. doi:10.4081/ejh.2011.e22.
63. Windmill KF, Lee VW. Influences of surgical castration on the thymus of male rats. *J Reprod Immunol.* 1999;44(1-2):29-39.
64. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals Part I (Parent guideline) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. 2011. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/docume nt_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002828.pdf. Accessed July 12, 2018.
65. 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.
66. Cong D, Zhu W, Kuo JS, Hu S, Sun D. Ion transporters in brain tumors. *Curr Med Chem.* 2015;22(10):1171-1181.
67. Sun PL, Jin Y, Park SY, 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):237-244. doi:10.1093/qjmed/hev207.
68. 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.

CURRUCULUM VITAE

Name, Surname: Milda Juknevičienė
Address: Lithuanian University of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, A. Mickevičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania
E-mail: milda.juknevicene@lsmu.lt

Education:

2018-09-01–2023-12-31 PhD study at the Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas
2015-09-01–2017-06-30 Master’s degree in medical genetics, Vilnius University, Vilnius
2011-09-01–2015-06-30 Bachelor’s degree in medical and veterinary genetics, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas

Work experience:

2017-09-04–still present Assistant in the Histology and Embryology Department, Medicine Academy, Faculty of Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas

PADĖKA

Dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. habil. dr. Donatui Stakišaičiui už patarimus, pamokymus, pastabas ir suteiktą galimybę tobulėti; už vadovavimą atliekant eksperimentus, pagalbą rengiant tezes konferencijoms, rašant straipsnius ir disertacijos darbą.

Esu dėkinga mokslinio darbo konsultantei ir LSMU Histologijos ir embriologijos katedros vedėjai prof. dr. Ingridai Balnytei ir prof. habil. dr. Angelijai Valančiūtei už visuomet šiltą bendravimą, palaikymą, patarimus ir parodytą rūpestį; visam Histologijos ir embriologijos katedros kolektyvui už nuoširdumą, palaikymą ir galimybę augti. Dėkoju Rūtai Skredėnienei ir dr. Eligijai Damanskienei už pagalbą įsisavinant CAM modelį; doc. dr. Jolitai Palubinskienei už pagalbą analizuojant žiurkių inkstus ir Linui Kapočiui už pagalbą analizuojant sekoskaitos rezultatus.

Taip pat dėkoju LSMU Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijos vadovei prof. habil. dr. Vaivai Lesauskaitei ir dr. Dovydui Gečiui, LSMU Genetikos ir molekulinės medicinos klinikos medicinos genetikui Dariui Čereškevičiui, LSMU Laboratorinės medicinos klinikos vadovei prof. Astrai Vitkauskienei ir prof. dr. Daivai Urbonienei, LSMU Biologinių tyrimų centro vadovei Vilmai Zigmantaitei ir šių institucijų darbuotojams už pagalbą ir patarimus atliekant mokslinius tyrimus.

Dėkoju LSMU Mokslo fondui už materialinę paramą skirtą atlikti tyrimams, publikacijų spausdinimui ir suteiktą pagalbą rengiantis gynimui.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai ir ypač vyrui Linui už tai, kad mane suprato ir visados palaikė.