

Sodyum Butirat'ın Glioblastoma Hücre Serisinde Radyosensitiviteye Etkisi

The Effects of Sodium Butyrate on Radiosensitivity in Glioblastoma

Tahir Çakır^{1*}, Mustafa Güven², Mehmet Taşpınar³, Farika Nur Denizler³, Bahar Kartal³

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik A.D., Van

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Van

³Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D., Van

ÖZET

Amaç: Glioblastoma (GB), oldukça agresif ve malign bir beyin tümörüdür. GB'nin kuratif bir tedavi modalitesi bulunmamaktadır. GB tedavisinin başarısında radyoterapi (RT) uygulamalarının rolü büyüktür. Bu nedenle, kemoterapötik potansiyeli bulunan moleküllerin RT ile kombine uygulanarak hücrelerin radyosensitivitelerinin artırılmasına yönelik yaklaşımlar önem kazanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar hem RT hem de kemoterapi (KT) yanıtında rol almaktadır. Bu çalışmada, bir histon deasetilaz inhibitörü olan sodyum butiratın (SB) RT ile kombine uygulandığında GB hücrelerinde radyosensitiviteye olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla, LN-405 hücre serilerine farklı konsantrasyonlarda SB (0,1, 2, 3, 4, 6 ve 8 mM) ve 8 Gy RT ayrı ayrı ve kombine biçimde uygulanmıştır. RT uygulamasında, 3 boyutlu konformal teknik kullanılmıştır. İnkübasyondan 72 saat sonra hücre canlılığı MTT ile tespit edilmiştir.

Bulgular: SB konsantrasyonuna bağlı ancak RT'den bağımsız hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. 0,5, 1 ve 2 mM SB ve RT'nin kombine uygulandığı gruplardaki hücre canlılığı yalnızca SB uygulanan gruplara göre sırasıyla %31,4, %36,9 ve %17,6 oranlarında azaldığı saptandı. Bu sonuçlara göre 0,5, 1, 2, ve 8 mM konsantrasyonlardaki SB'nin radyosensitiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, SB'nin konsantrasyona bağlı olarak RT uygulamalarının tedavici edici etkilerini artırabileceğini göstermiştir. Ayrıca, tek fraksiyonda akut radyasyon dozu verilen ve hücre serilerine RT uygulama yöntemi açısından 3 boyutlu konformal RT prosedürlerinin uygulanarak SB'nin radyosensitiviteyi arttırdığı ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Radyosensitivite, Glioblastoma, Sodyum Butirat

ABSTRACT

Objective: Glioblastoma (GB) is a highly aggressive and malignant brain tumor. Currently there is no cure therapy for GB. Radiotherapy (RT) has an important role in the success of GB treatment. Therefore, the studies regarding with to increase the radiosensitivity of cells by applying of the combine of the molecules having chemotherapeutic potential with RT gain importance. Epigenetic mechanisms play role in both RT and chemotherapy response. The aim of this study was to investigate the effect of sodium butyrate (SB), a histone deacetylase inhibitor, onto the radiosensitivity when combined with RT in GB cells.

Materials and Methods: For this purpose, different concentrations of SB (0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 mM) and 8 Gy RT were administered to LN-405 cell lines alone and in combination. 3D conformal technique was used in RT application. Cell viability was determined by MTT after incubation 72h.

Results: It is detected that SB reduced cell viability on concentration-dependent but RT-independent. Cell viability in the 0.5, 1 and 2 mM groups of SB combination with RT decreased compared to the groups treated with SB alone 31.4%, 36.9% and 17.6%, respectively. According to the results, it is detected that SB increased radiosensitivity at 0.5, 1, 2, 8 mM concentrations.

Conclusion: This study showed that SB may increase the therapeutic effects of RT applications depending on the concentration. In addition, it is the first study to increase the radiosensitivity of SB by applying 3-dimensional conformal RT procedures in terms of the method of applying RT to the cell series in which acute radiation dose is given in a single fraction.

Key Words: Radiosensitivity, Glioblastoma, Sodium butyrate.

Giriş

Glioblastoma (GB), oldukça agresif ve malign bir beyin tümörüdür. GB, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Evre IV astrositom olarak sınıflandırılmıştır. Tüm primer beyin tümörlerinin

%30' unu oluşturan GB (1), her yaşta görülebilmesiyle birlikte genellikle 55-60 yaş aralığındaki erişkinlerde görülmektedir (2). GB'ye neden olan risk faktörü veya faktörleri tam olarak bilinmemekle birlikte GB etkenleri başlıca sigara, elektromanyetik dalgalar, alerji, viral enfeksiyon (3) ve genetik yatkınlık (4) şeklinde

sıralanabilir. GB, yüksek proliferasyon ve infiltrasyon yeteneği, genetik açıdan kararsız yapısı, tedavilere gösterdiği direnç ve ortalama 14,6 ay yaşam süresi ile en kötü prognoza sahip malign tümör tiplerinden biridir. GB tedavisi genellikle tümör kitlesinin cerrahi olarak çıkarılmasını takiben RT±KT şeklinde gerçekleştirilmektedir.

GB'li hastalarda sağkalım süresini artırmak için; RT ve RT'nin farklı fraksiyonasyon türleri, adjuvan KT, proton ve bor nötron yakalama terapisi (BNCT) gibi parçacık tedavileri, RT ile kombine radyosensitif ajanların kullanımı, sterotaktik fraksiyone RT, radyocerrahi, yoğunluk ayarlı RT (IMRT) gibi farklı tedavi teknikleri uygulanmaktadır (5-7). GB'de RT ile birlikte uygulandığında faydalı olabilecek diğer tedavi modalitelerini geliştirmek için çeşitli inhibitörlerden (sisplatin, paklitaksel, kloroetilnitrosürelere ve alfa diflorometil ornitin poliamin) oluşan kemoterapötikler kullanılmıştır. Ancak bu kombine tedavi seçeneklerinden hiçbirinin tek başına RT uygulamasına kıyasla belirgin bir üstünlük sağlayamadığı görülmektedir (7). Bu nedenle günümüzde RT, GB tedavisinde halen cerrahi ile birlikte etkin bir tedavi seçeneğidir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada RT ile birlikte temozolomid uygulanmasının yalnızca RT uygulanmasına göre daha iyi tedavi yanıtlarının olduğu saptanmıştır.

Genetik mutasyonların aksine epigenetik değişiklikler geri dönüşümlüdür ve ilaçlar tarafından hedeflenebilir (8). Epigenetik değişikliklerin geri dönüştürülebilir olması, kanser tedavisinde epigenetik modifikasyonlara sebep olan ajanların kullanımı artmaktadır. GB, tek bir epigenetik modifikasyonun-MGMT geninin metilasyonu- biyolojik değişikliklere yol açtığı ve bunun klinik olarak anlamlı olduğu belirlenen ilk tümörlerden biridir. GB'de epigenetik modifikasyonlara sebep olan ajanlar klinik ve pre-klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Histon deasetilaz inhibitör (HDACi)'leri hücrenin büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi yollarında etkili epigenetik modifikasyonları etkileyen önemli moleküllerdendir.

Sodyum butirat (SB) GB tedavisinde pre-klinik fazda olan bir HDACi'dir. SB'nin, kan beyin bariyerini geçmesi GB tedavisinde kullanılabilme potansiyelini arttırmaktadır. A172 GB hücre hattında SB'nin hücre proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği, senesensi indüklediği (9) ve yine SB'nin vasküler endotelial büyüme faktörü sekresyonunun azalttığı böylece GB dokularında anjiyogenezin inhibe edilebileceği, bildirilmektedir (10). Ayrıca, SB farklı moleküllerle kombine edilerek uygulandığında apoptozisi tetiklediği belirtilmektedir (11,12). Bu veriler SB'nin GB tedavisinde kullanılabileceğini ve terapötik etkinliğini arttırmak için yeni yaklaşımların önemli olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada,

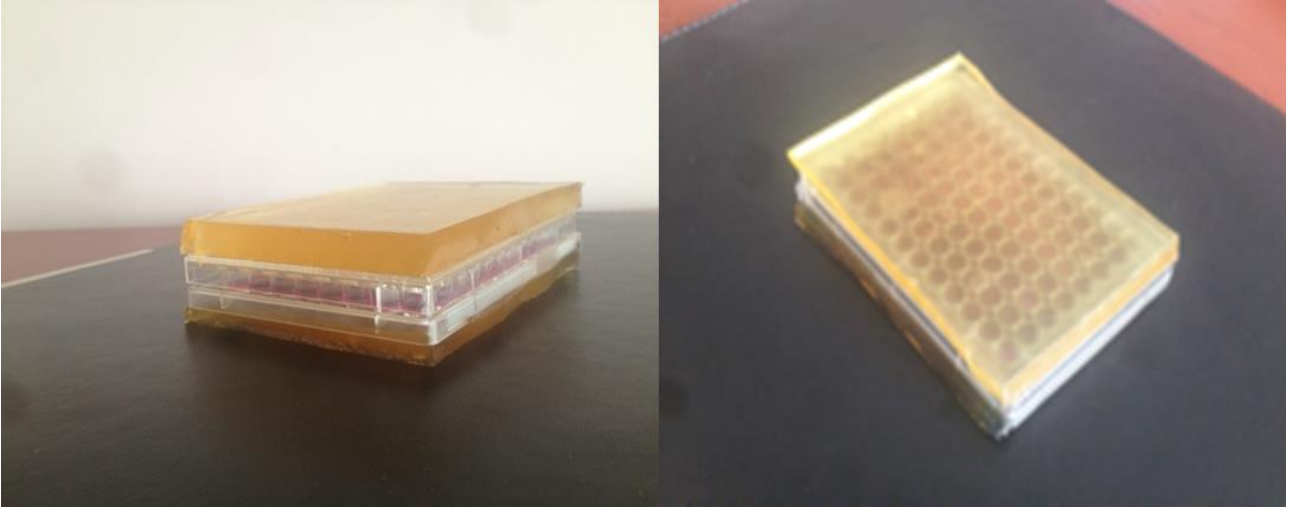
SB'nin LN-405 GB hücre serisinde radyosensitiviteye olan olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

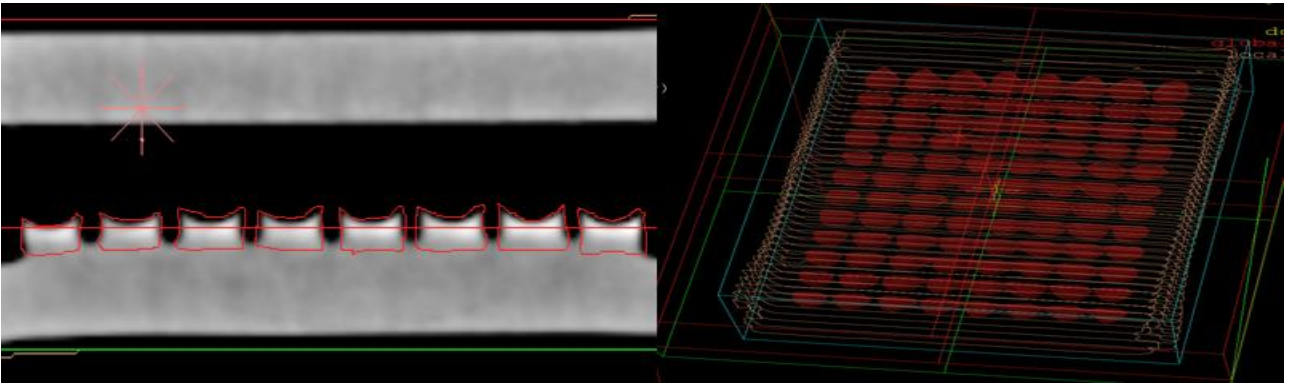
Kimyasal Maddeler: Hücre kültürü süreçlerinde Dulbecco's Modified Eagle Medyum (DMEM, [4.00 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose, Sodium Pyruvate] (Capricorn), FBS (Föetal Bovin Serum) (Capricorn), L-Glutamin (Capricorn), Penisilin-Streptomisin (Capricorn) ve Tripsin-EDTA (Capricorn), flasklar (Corning) ve Plaklar (Biologix), 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) (Sigma M5655) ise SB (Sigma, B-5857) maddeleri kullanılmıştır. SB; steril, distile, RNaz ve DNaz'dan yoksun suda çözünmüştür.

Sitotoksikite Testi: SB'nin yalnız ve RT uygulaması ile birlikte LN-405 hücreleri üzerindeki olası proliferatif ve/veya toksik etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, LN-405 hücre dizilerine ait hücrelerden 2 adet 96 kuyucuklu plağa, 8000 hücre/kuyucuk oranında hücre ekimi yapılmıştır. Bu hücrelerin plağa yapışması için hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin hücre döngülerinin eşitlenmesi amacıyla 8 saat serum açlığına bırakılmıştır. Serum açlığı sonunda, her iki plakta yer alan hücrelere farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 2, 3, 4, 6 ve 8 mM) SB hücre büyüme medyumuna içerisinde sunulmuştur. Plaklardan birine SB uygulamasını takiben aşağıda ayrıntılı olarak verilen RT metodu ile tek fraksiyonda 8 Gy'lik RT dozu uygulaması yapılmıştır. SB içeren plak ile SB ve RT kombinasyon uygulaması yapılan plaklar 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda plakların her bir kuyucuğuna MTT (5 mg/1 ml) eklenmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3 saatin sonunda her bir kuyucuğa lizis solüsyonu (1% Triton-X, 10% 0,1 mol/l HCl, 89% Isopropanol) eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Lizis solüsyonu eklenmesinden sonra her bir kuyucuğun 570 nm'deki absorban değeri ölçülmüş ve Graphad Prism programı kullanılarak olası proliferatif ve/veya toksik etki değeri saptanmıştır. Her bir konsantrasyon ve RT uygulaması için 4 tekrar yapılmıştır.

Radyoterapi: Hücre içeren 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğunun eşit oranda RT dozu alması ve in vivo modelleri temsil edebilmesi amacıyla, RT uygulaması öncesinde yalnızca hücre ve besi yeri içeren 96 kuyucuklu bir plak simülasyon materyali olarak kullanıldı. Bu simülasyon materyali plak, tüm kuyucuklardaki hücrelerde homojen doz dağılımı sağlamak ve in vivo koşulları model olarak temsil edilebilmesi için doku eşdeğeri bolus



Şekil 1. Plakların 1cm kalınlığındaki doku eşdeğeri bolus ile kaplanması



Şekil 2. Plagın CT-Simülasyonu kesitsel olarak konturlanmış bolus, plak ve hücre ve besiyeri görüntüsü

(Boyutları:12x8.5x1 cm³, fiziksel yoğunluğu 1 g/cm³) (Şekil 1) ile kaplandı (13).

Bu simülasyon materyali plaktan, Siemens marka Sensation 4 model CT-simülatör cihazı ile kesitsel CT görüntüleri (2.5 mm kesit kalınlığı) elde edildi. Elde edilen kesitsel görüntüler, Theratron 1000E kobalt-60 radyoterapi cihazının geometrik ve dozimetrik özellikleri tanımlanmış CMS XIO 3 boyutlu radyoterapi tedavi planlama sistemine aktarıldı. Her bir kesitte plak, bolus ve hücreler (besiyeri ile birlikte) ayrı ayrı konturlandı (Şekil 2). Konturlama işlemi tamamlandıktan sonra 1.25 MeV enerjili Co-60 foton demetleriyle 3 boyutlu doz planlaması yapıldı (Şekil 3). Karşılıklı paralel alanlar (13x10 cm² alan boyutunda) kullanılarak tüm kuyulardaki hücreler tek fraksiyonda 8 Gy'lik radyasyon dozu alacak şekilde planlama işlemi tamamlandı.

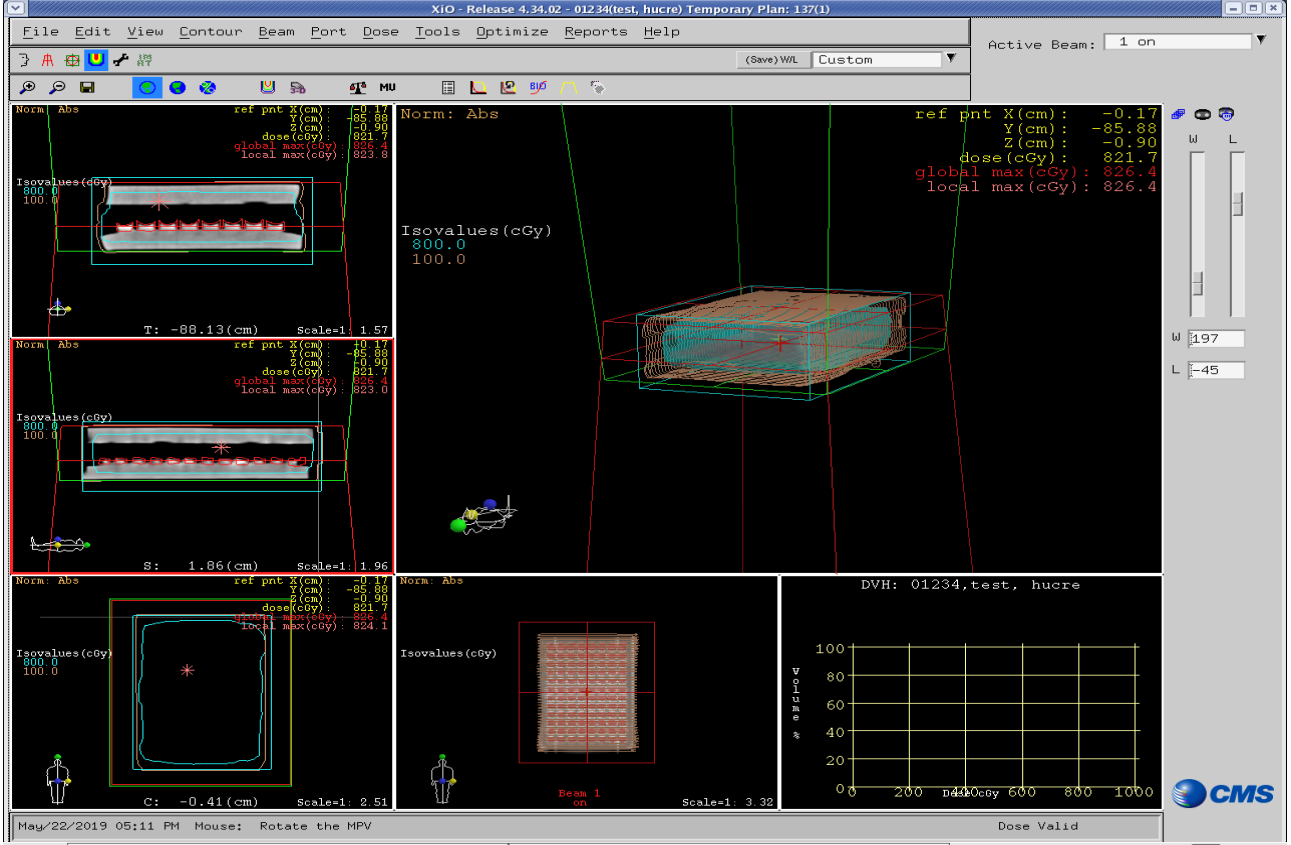
Tedavi planlama sisteminden; alan boyutu, SSD (Source Skin Distance) mesafesi, ışınlama açıları ve ışınlama süreleri belirlenmiştir. RT uygulaması yapılan plaktaki tüm hücreler, planlama prosedüründen elde edilen veriler ile ışınlanma işlemi yapıldı (Şekil 4).

Bulgular

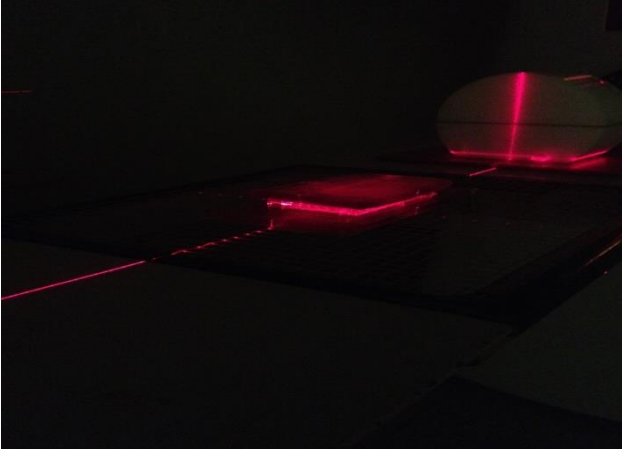
SB uygulanan ve 72 saat inkübasyona bırakılan hücrelerde SB için IC₅₀ (inhibitor of concentration) değeri saptanmamıştır. Ancak bu hücrelerde uygulanan SB'nin konsantrasyonu arttıkça hücre proliferasyonunun artan SB konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Hücre canlılığı, 0.5 mM SB uygulaması sonrasında kontrole göre %5.8 oranında azalırken, bu canlılıktaki azalma oranı 8mM SB uygulamasında kontrole göre %22.3 olarak saptanmıştır.

Kontrol grupları karşılaştırıldığında; 8 Gy radyoterapi uygulanan kontrol grubundaki hücre canlılığının SB ve RT uygulanmayan kontrol grubuna göre %16.4 oranında azaldığı saptanmıştır (Şekil 5). RT uygulaması SB'den bağımsız hücre ölümüne neden olmaktadır.

SB ve RT uygulamasının birlikte yapıldığı gruplar yalnızca SB uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında; 0.5, 1 ve 2 mM SB ve RT uygulanan gruplardaki hücre canlılığının yalnızca SB uygulanan gruplara göre sırasıyla %31.4, %36.9 ve %17.6 oranlarında azaldığı



Şekil 3. Plağa 3 boyutlu RT tedavi planlaması ve doz dağılımı



Şekil 4. Hücrelerin ışınlama işlemi

saptanmıştır (Şekil 5). Bu sonuca göre, SB 0,5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarında radyosensitiviteyi arttırmaktadır.

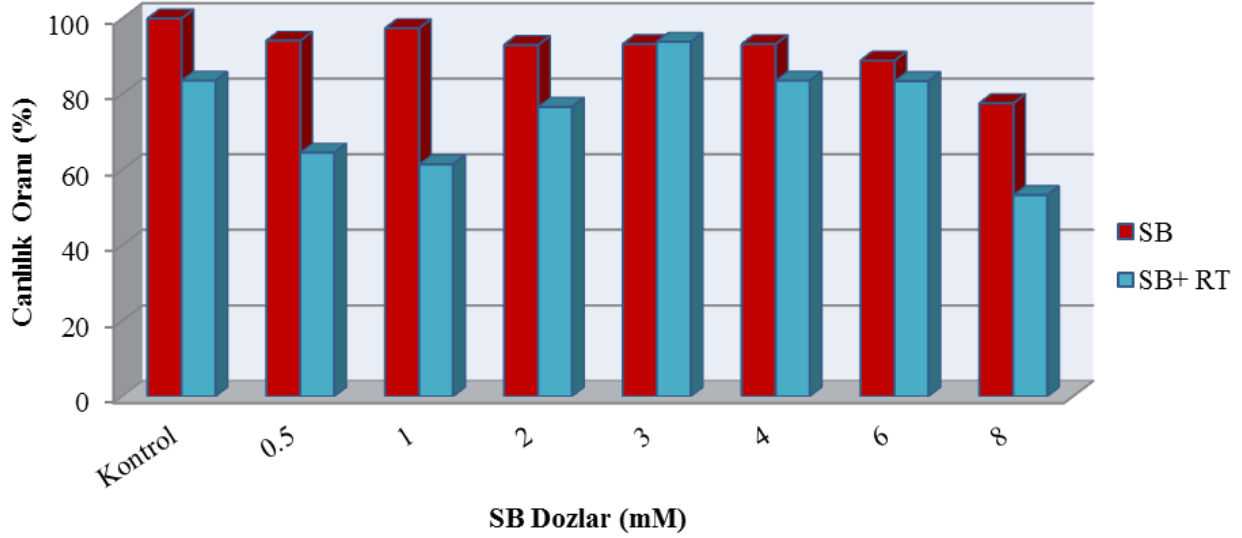
3mM SB ve 3mM SB + RT uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, bu gruplardaki hücre canlılığı RT uygulanmayan kontrol grubuna göre sırasıyla %6.75 ve %6.14 oranlarında azaltmış, RT uygulanan kontrol grubuna göre ise hücre canlılığını %9.65 ve %10.2 oranında arttırmıştır (Şekil 5). Buna göre, 3mM SB uygulaması, RT'nin olası toksik etkisini inhibe etmiştir.

4, 6 ve 8 mM SB uygulamalarında, SB tek başına RT'den bağımsız hücre canlılığını kontrole göre sırasıyla %6.76, %11.1 ve %22.3 oranında azaltmıştır (Şekil 5). Ancak bu konsantrasyonlardaki toksik etki RT uygulanan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise hücre canlılığı 8mM SB ve RT uygulanan grupta yalnızca RT uygulanan kontrol grubuna göre %30 oranında azalmıştır (Şekil 5). Bu veri, SB'nin artan dozlarda RT ile birlikte hücre canlılığı üzerinde daha toksik etki gösterebileceğine işaret etmektedir.

Tartışma

GB, kesin bir tedavi modalitesi bulunmayan, radyoterapi ve kemoterapötik yaklaşımlarına karşı direnç gösterebilen bir beyin tümörü tipidir (2). Tedavi yaklaşımlarına olan direnç GB'nin tedavi başarısını düşürmektedir. Hem KT'nin hem de RT'nin GB tedavisinde sağkalım süresini artırması bakımından önemli katkıları olduğu bilinmektedir (14). Bu nedenle, GB tedavisinde, RT ve KT kombinasyonlarını barındıran yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine şiddetle gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışma, epigenetik modifiye edici ajanlardan biri olan ve GB'de terapötik yaklaşımlarda kullanımına ilişkin umut vaat eden veriler sunan

SB ve SB+RT Uygulamasında



Şekil 5. SB ile SB ve RT kombinasyon uygulamasında, SB ve RT uygulanmayan kontrole göre GB hücrelerinde % canlılık değişimi

SB'nin terapötik etkinliğine radyoterapinin katkısının saptanması amacıyla yapılmıştır.

Epigenetik modifikasyonlara sebep olan ajanlar genetik mutasyonların aksine epigenetik değişikliklerin geri dönüştürülebilir olmasıyla önem kazanmaktadır. Bazı HDACi'lerin radyo-koruyucu olabileceği raporlansa da (15) HDACi'lerin γ -radyasyonun öldürücü etkilerini hem tümör hem de sağlıklı hücrelerde arttırdıkları bilinmektedir (16). Bu çalışmada kullanılan SB de pre-klinik fazda araştırmaları devam eden bir HDACi'dir.

Birçok çalışmada SB'nin doza bağımlı olarak hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (17-19). Bu çalışmamızda da, SB'nin RT'den bağımsız hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. SB'nin hücre canlılığı üzerindeki bağımsız etkisi açısından sonuçlarımız literatür bilgisiyle uyumludur (18,19).

DAOY ve UW228-2 medullablastom hücre hatlarında yapılan çalışmada, TSA'nın, SB'nin ve suberoilanolid *hidroksamik asidin* (SAHA), DAOY hücre hattında iyonize radyasyonun sitotoksik etkilerini arttırdığını, Sonnemann ve ark. tarafından gösterilmiştir (20). Bu çalışmamızda da SB RT kombinasyonu SB'nin tek başına kullanımına göre daha fazla toksik etki göstermiştir.

SB'nin 5-azasitidin ile kombine olarak kullanımında MCF-7 ve RKO hücre hatlarında radyosensitiviteyi arttırdığı bildirilmiştir (17). Koprinarova ve ark. tarafından yapılan çalışmada HeLa hücrelerinde 5mM SB'nin 10 Gy'lik radyotepapi uygulamasından 72 saat sonra hücre canlılığını kontrole göre %50 oranında düşürdüğü ve kontrol gruplarına göre

radyosensitiviteyi arttırdığı rapor edilmiştir (16). Bu çalışmada 8mM SB ve 8 Gy RT'nin birlikte verildiği hücrelerde saptanan hücre canlılığındaki azalma Koprinarova ve ark. tarafından yapılan çalışmayla uyumludur (16).

Perona ve ark. tarafından Nthy-ori 3-1, WRO ve TPC-1 isimli tiroit kanser hücre serileri üzerinde yapılan çalışmada, 1,5 mM SB'nin 1,3,5 ve 8 Gy RT'nin toksik etkisini arttırdığı rapor edilmiştir (21). Bu çalışmada da, 8 Gy RT'nin SB ile birlikte uygulandığında hücre canlılığı yalnızca SB kullanımına göre %31,3 oranında azalmıştır. Bu açıdan, Perona ve ark. her ne kadar farklı kanser türüne ait hücre serisi kullanılmış olsa da bulgularımız bu çalışma ile uyumludur.

Li ve ark. tarafından U251 GB hücre serisinde 3mM SB'ye kombine olarak 2, 4, 6 ve 8 Gy'lik RT uygulamasından 24 saat sonra yapılan MTT testinde SB verilen gruplarda hücre canlılığının azaldığı bildirilmiştir (22). Li ve ark.'nın çalışmasının sonuçları SB'nin radyosensitiviteyi arttırması yönüyle bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Ancak Li ve ark. 3mM SB ve 8 Gy'lik RT kombinasyonunda da hücre canlılığının azaldığını belirtmiştir. Çalışmamızda ise, aynı konsantrasyonda SB ve aynı dozda RT uygulamasında SB'nin radyoprotektif etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmamızda SB ile hücrelerin inkübasyonu 72 saat yapılmıştır. Dolayısıyla 3mM'lık SB'de görülen bu farklılık, 3mM'lık SB'nin yalnızca 24 saatlik uygulanmasından ve HDACi'lerin hücre spesifik farklı hücresel moleküler etkiler göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bir HDACi olan fenil bütiratın U251 ve SKMG-3 hücre serilerinde radyosensitiviteyi arttırdığı, U87 ve D54 hücre serilerinde ise radyosensitiviteyi arttırmadığı gösterilmiştir (19). HDACi'lerin epigenetik mekanizmalar üzerinden gösterdikleri etkiler hücre tipine, kullanılan moleküllerin konsantrasyonlarına ve uygulanma sürelerine göre değişiklik gösterebilir. Bizim çalışmamızda SB'nin 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarında radyosensitiviteyi arttırıp 3 mM'da arttırmamasının sebebi HDACi'lerin konsantrasyona bağlı etki mekanizmalarıyla açıklanabilir.

RT uygulamalarının *in vitro* modellemelerinde, hücrelerin eşit oranda homojen hedeflenen RT dozu almasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ileri düzey RT doz optimizasyonu süreçlerinin geliştirilmesine önem verilmelidir. Çalışmamızda hücrelerde hedeflenen homojen doz dağılımının sağlanması için *in vivo* şartlara benzer 3 boyutlu RT tedavi planlama süreçleri uygulanarak dozimetrik optimizasyon sağlanmıştır.

Literatürde GB'de radyoterapi ve HDACi'lerin kombine kullanımına ilişkin çalışmalar değerlendirildiğinde bu çalışmamız tek fraksiyonda akut radyasyon dozu uygulanan tek çalışmadır. Akut radyasyon doz kullanılmasının sebebi ise bu modelin hücre serilerinde SB'nin radyosensitif etkisinin görülebilmesi için en uygun model olmasındandır.

SB'nin radyosensitif niteliklerinin tam olarak ortaya konması için farklı hücre türlerinde ve kültür tiplerinde (primer, doku ve organoid gibi) farklı RT dozlarında ve farklı radyasyon türlerinde çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu terapötik yaklaşımın sunduğu *in vitro* ön veriler, epigenetik düzenleyici aday kemoterapötiklerin RT uygulamalarının tedavici edici etkilerini arttırabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, ilgili alanda daha detaylı radyoterapötik moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

SB'nin GB'de radyosensitiviteyi arttırdığını gösteren literatürdeki ikinci olan bu çalışma, LN-405 GB hücre serisinde SB'nin konsantrasyona bağlı olarak radyosensitiviteyi arttırdığının gösterildiği ilk çalışmadır. Ayrıca hücre serilerine RT uygulama yöntemi açısından 3 boyutu konformal RT prosedürlerinin uygulandığı ilk çalışmadır.

Kaynaklar

1. Sander P, Mostafa H, Soboh A, Schneider J.M, Pa'fa A, Baron A, et al. Vacquinol-1 inducible cell death in glioblastoma multiforme is counter regulated by TRPM7 activity induced by exogenous ATP. *Oncotarget* 2017; 8(21): 35124-35137.
2. Hanif FP, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma Multiforme: A Review of

its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 2017; 18(1): 3-9.

3. Krex DR, Klink B, Hartmann CG, Deimling AV, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain: a journal of neurology* 2007; 130: 2596-2606.
4. Blumenthal DT, & Schulman SF. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert review of neurotherapeutics* 2005; 5(5): 683-690.
5. Buatti JM, Marcus RB, Mendenhall WM, Friedman WA, Bova FJ. Accelerated hyperfractionated radiotherapy for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 34(4): 785-792.
6. Groves MD, Maor MH, Meyers C, Kyritsis AP, Jaeckle KA, Yung WK, et al. A phase II trial of high-dose bromodeoxyuridine with accelerated fractionation radiotherapy followed by procarbazine, lomustine, and vincristine for glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45(1): 127-135.
7. Eroglu C, Soyuer S, Yıldız OG, Özkan M, Menkü A, Orhan O, Kaplan B, The Effect of Temozolomide as Consolidation Chemotherapy on Treatment Results of Glioblastoma Multiforme Patients Treated with Concomittant Radiotherapy and Temozolomide, *International Journal of Hematology and Oncology* 2008; 18: 65-73.
8. Bezceny P. Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience. *Medical Oncology* 2014; 31: 1-15.
9. Nakagawa H, Sasagawa S, Itoh K. Sodium butyrate induces senescence and inhibits the invasiveness of glioblastoma cells. *Oncology letters* 2018; 15(2): 1495-1502.
10. Sawa H, Murakami H, Ohshima Y, Murakami M, Yamazaki I, Tamura Y, et al. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human glioblastoma cells. *Brain Tumor Pathol* 2002; 19(2): 77-81.
11. Taylor MA, Khathayer F, Ray SK. Quercetin and Sodium Butyrate Synergistically Increase Apoptosis in Rat C6 and Human T98G Glioblastoma Cells Through Inhibition of Autophagy. *Neurochem Res* 2019; 44(7): 1715-1725.
12. Egler V, Korur S, Faily M, Boulay JL, Imber R, Lino MM, et al. Histone deacetylase inhibition and blockade of the glycolytic pathway synergistically induce glioblastoma cell death. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(10): 3132-3140.
13. Tesei A, Sarnelli A, Arienti C, Menghi E, Medri L, Gabucci E, et al. In vitro irradiation system for radiobiological experiments. *Radiat Oncol* 2013; 8: 257.
14. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival

- in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10(5): 459-466.
15. Chung Y, Wang A, Yao L. Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: Implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. *Molecular cancer therapeutics* 2004; 3(3): 317-325.
 16. Koprinarova M, Botev P, Russev G. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2011; 10(9): 970-977.
 17. Wang Y, Hu PC, Ma YB, Fan R, Gao FF, Zhang JW, et al. Sodium butyrate-induced apoptosis and ultrastructural changes in MCF-7 breast cancer cells. *Ultrastruct Pathol* 2016; 40(4): 200-204.
 18. Cho HJ, Kim SY, Kim KH, Kang WK, Kim JI, Oh ST, et al. The combination effect of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on radiosensitivity in RKO colorectal cancer and MCF-7 breast cancer cell lines. *World J Surg Oncol* 2009; 7: 49.
 19. Lopez CA, Feng FY, Herman JM, Nyati MK, Lawrence TS, Ljungman M. Phenylbutyrate sensitizes human glioblastoma cells lacking wild-type p53 function to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69(1): 214-220.
 20. Sonnemann J, Kumar KS, Heesch S, Müller C, Hartwig C, Maass M, et al. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. *Int J Oncol* 2006; 28(3): 755-766.
 21. Perona M, Thomasz L, Rossich L, Rodriguez C, Pisarev MA, Rosemblit C, et al. Radiosensitivity enhancement of human thyroid carcinoma cells by the inhibitors of histone deacetylase sodium butyrate and valproic acid. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 478: 141-150.
 22. Li Y, Zhou H, Xing E, Dassarith M, Ren J, Dong X, et al. Contribution of decreased expression of Ku70 to enhanced radiosensitivity by sodium butyrate in glioblastoma cell line (U251). *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2011; 31(3): 359.