C57BL/6 Хулганад үүсгэсэн хавдрын загварт натрийн лактат ба циклофосфамид эмчилгээ туршсан дүн

Э.Энхдөлгөөн[1], Г.Энхтүшиг[1], Ч.Гансүх[1], Л.Энхсайхан[1], Б.Ариунзаяа[1,2]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим
[2]АШУҮИС, МЯЭ, Эмнэлзүйн Төв Лаборатори
Цахим шуудан: e.enkee1108@gmail.com, Утас: 99684547

Түлхүүр үг:

Натрийн лактат
MC38
C57BL/6
Хавдрын загвар

Товч утга:

Үндэслэл: Хавдрын бичил орчинд глюкозоос илүү лактат нь дархлааны эсийн энергийн эх үүсвэр болдог. Баруун Өмнөд Симмоннсийн хавдрын төвийн судлаачид эрчимтэй дасгал хийх үед үүсдэг бодисын солилцооны бүтээгдэхүүн лактат нь хавдар өвөрмөц CD8+T эсийг хавдрын бичил орчинд ихэсгэснээр хавдрын эсрэг дархлааны хариу урвалыг нэмэгдүүлдэг болохыг тогтоожээ. Нөгөө талаас Т зохицуулагч эсэд үзүүлэх лактатын нөлөө одоогоор тодорхойгүй байгаа ба Т зохицуулагч эсийн үйл ажиллагааг дарангуйлах үйлдэлтэй нь тогтоогдсон хими эмчилгээний гол төлөөлөгчдийн нэг циклофосфамид эмчилгээтэй синергетик үйлдэл байгаа эсэх нь сонирхол татаж байна. Туршилтын хулганад үүсгэсэн хавдрын загварт лактат ба циклофосфамид эмчилгээ хавсарсан нөлөөтэй эсэхийг туршин судалсан судалгаа байхгүй байгаа нь энэ судалгааны ажлыг хийх үндэслэл боллоо. **Зорилго:** C57BL/6 үүлдрийн туршилтын хулганад үүсгэсэн хавдрын загварт натрийн лактат ба циклофосфамид эмчилгээний хавсарсан нөлөөг судлах. **Арга, аргачлал:** *Туршилтын амьтан:* C57BL/6, 6-8 долоо хоногтой эмэгчин хулганыг туршилтад ашигласан. *Эсийн өсгөвөр:* Хулганын бүдүүн гэдэсний хавдрын эсийг (MC-38) 10%-ийн тугалын хээлийн ийлдэс, 0.5% мөөгөнцрийн эсрэг эм болон антибиотикийн холимог (Amphotericin B, Pencillin G, Streptomycin) агуулсан эсийн орчинд (DMEM) 5% CO_2-ийн чийгшилтэй 37^0C- хэмд өсгөвөрлөсөн. *Хавдрын загвар үүсгэсэн аргачлал:* Хавдрын эс (MC38)-ийг фосфат буферийн уусмалаар шингэрүүлэн 100 мкл $1x10^6$ тооны эсийг туршилтын амьтны хэвлийн арьсан дор цэврүү үүсгэн тарьж хорт хавдар үүсгэсэн. *Хавдарт лактат, циклофосфамид болон хавсарсан эмчилгээ хийсэн аргачлал:* Хавдрын эс тарьснаас хойш 8 дахь өдөрт, хавдрын эзлэхүүн 150 $мм^3$ болох үед хулганыг 5 бүлэгт хуваан эмчилгээг эхлүүлсэн. *Хавдрын хэмжээг хэмжсэн аргачлал:* Автомат калипр ашиглан хавдрын урт, өргөнийг өдөр бүр нэг удаад 3 удаагийн давтамжтай хэмжсэн. **Үр дүн:** Лактатын изотоник уусмалаар эмчилсэн бүлэгт хавдрын дундаж эзэлхүүн глюкозын болон PBS эмчилгээ хийсэн бүлэгтэй харьцуулахад статистик үнэн магадлалтай буурсан ($p<0.01$). Лактат, циклофосфамидын хавсарсан эмчилгээний бүлгийн хавдрын дундаж эзэлхүүн нь лактат эсвэл циклофосфамид эмчилгээг дангаар нь хийсэн бүлэгтэй харьцуулахад статистик үнэн магадлалтайгаар буурсан байлаа ($p<0.05$). Үүнээс үзэхэд хавсарсан эмчилгээ нь хавдрын ургалтыг саатуулж байна. Туршилтад хамрагдсан нийт амьтдыг ($n=20$) эмчилгээний дараа 30 хоногийн турш ажиглахад 65% нь эмчилгээний дараах 20 хоногийн дотор үхсэн. Лактат ба циклофосфамидын хосолсон эмчилгээ хийсэн хулганад эмчилгээний бусад бүлэг болон хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад амьд үлдэх магадлал статистик үнэн магадлалтайгаар ($p<0.001$) нэмэгдсэн. **Дүгнэлт:** Хавсарсан эмчилгээ хавдрын ургалтыг дарангуйлж байгаа нь лактат, хавдрын бичил орчинд лимфоцит эсийг идэвхжүүлэн хавдрын эсрэг үйлдэл үзүүлж, Т зохицуулагч эсийг дарангуйлах циклофосфамидын нөлөөг дэмжсэнээр туршилтын амьтны амьд үлдэх магадлалыг нэмэгдүүлж байна.

Үндэслэл: Хорт хавдар нь хэвийн бус эсийн хяналтгүй өсөлт, тархалтаар тодорхойлогддог бүлэг өвчин юм.[1] Хавдар нь эсийн өсөлт, ялгаран хөгжил болон програмчлагдсан үхлийг зохицуулдаг генийн мутаци өөрчлөлтөөс үүссэн эсийн хяналтгүй ургалт ба програмчлагдсан үхлээс зайлсхийх механизмын дүнд

бий болдог.[2]

Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллагын дэргэдэх Хавдар Судлалын Олон Улсын Агентлаг (GLOBOCAN)-аас гаргасан албан мэдээнээс үзэхэд 2022 оны байдлаар хавдрын 20 сая тохиолдол шинээр оношлогдож, хавдрын шалтгаант 9.7 сая нас баралт бүртгэгдсэн ба 2050 он гэхэд 35 сая болж өсөх хандлагатай.[3]

Монгол Улсын Эрүүл мэндийн хөгжлийн төвийн эрүүл мэндийн статистикийн нэгдсэн сангийн мэдээнд 2022 онд хавдрын шалтгаант нас баралт нь хүн амын нас баралтын тэргүүлэх шалтгааны хоёрдугаар байранд эрэмблэгдэж байна. Монгол Улсад 2023 оны байдлаар 7244 хавдрын тохиолдол шинээр оношлогдсоноос 4556 нас баралт бүртгэгдсэн. Нас баралтын нийт тохиолдлыг авч үзвэл элэгний хавдар 37.6%, ходоодны хавдар 16.4%, уушгины хавдар 8.7%, улаан хоолойн хавдар 6.0%, бүдүүн шулуун гэдэсний хавдар 4.5%, бусад хавдар 26.8%-тай тодорхойлогдсон.[4]

Дархлаа хяналтын цэгийн ингибитор болон Т эсийн эмчилгээ нь хавдрын эсрэг үр дүнтэй эмчилгээ ч зарим эмчлүүлэгчид нөлөө багатай байна. Цуллаг эрхтэний хавдрын үед хавдрын бичил орчин дархлаа эмчилгээний үр дүнд сөргөөр нөлөөлдөг. Хавдрын бичил орчин дохь хавдар өвөрмөц Т эсийн идэвхийг дарангуйлдаг гол хүчин зүйл нь бичил орчин дахь бодисын солилцооны өөрчлөлт юм.[5,6,7]

Бодисын солилцооны эцсийн бүтээгдэхүүн (глюкоз, тосны хүчил, амин хүчил гэх мэт) нь дархлааны эсийн ялгаран хөгжил болон үйл ажиллагааг зохицуулахад оролцдог. Эрдэмтэд туршилтын амьтны загварт эрчимтэй дасгал хөдөлгөөн нь хорт хавдрын хэмжээг бууруулдаг болохыг тогтоожээ.[8]

Сүүний хүчил болон лактат нь нэр томьёоны хувьд төстэй боловч хоорондоо ялгаатай. Лактат нь хүн амьтны эсийн дотор моносахар-глюкозоос анаэроб исэлдэлт буюу гликолизийн дүнд бие махбодод үүсдэг молекул ба сөрөг цэнэгтэй анион тул үүнийг ихэвчлэн “Сүүний хүчлийн анион” буюу “Лактат” гэж нэрлэдэг. Лактат нь гликолизийн эцсийн бүтээгдэхүүн болох пируватаас лактатдегидрогеназа (LDH) эсгэгийн үйлчлэлээр үүсэх ба олон төрлийн эсэд энергийн эх үүсвэр болдог.[8] Лактат нь араг ясны булчинд дасгал хөдөлгөөн хийх явцад анаэороб гликолизис эсвэл нүүрс усны исэлдэлтийн дүнд үүсдэг бодисын солилцооны эцсийн бүтээгдэхүүн юм.[9] Хавдрын бичил орчинд глюкозоос илүү лактат нь дархлааны эсийн энергийн эх үүсвэр болдог бөгөөд Баруун Өмнөд Симмоннсийн хавдрын төвийн судлаачид эрчимтэй дасгал хөдөлгөөн хийх үед үүсдэг бодисын солилцооны бүтээгдэхүүн лактат нь хавдрын эсрэг дархлааны хариу урвалыг нэмэгдүүлдэг болохыг тогтоожээ[10,11]. Уг төвд хийгдсэн судалгаагаар лактат нь хавдрын өвөрмөц CD8+Т эсийг хавдрын бичил орчинд ихэсгэдэг болохыг тодорхойлсон байна.[12] Feng Q (2022) нар судалгаагаар глюкоз биш лактатыг бүдүүн гэдэсний хавдрын хулганын загварт тарьж үзэхэд хавдрын хэмжээг багасгаж хавдрын эсрэг дархлааны хариу урвалыг нэмэгдүүлж байсан.[14] Т зохицуулагч эсэд үзүүлэх лактатын нөлөө одоогоор тодорхойгүй байгаа ба Т зохицуулагч эсийн үйл ажиллагааг дарангуйлах үйлдэлтэй нь тогтоогдсон хими эмчилгээний гол төлөөлөгчдийн нэг циклофосфамид эмчилгээтэй синергетик үйлдэл байгаа эсэх нь сонирхол татаж байна[7,13]. Туршилтын хулганад үүсгэсэн хавдрын загварт лактат болон циклофосфамид эмчилгээ хавсарсан нөлөөтэй эсэхийг туршин судалсан судалгаа байхгүй байгаа нь энэхүү судалгааны үндэслэл болж байна.

Зорилго: C57BL/6 үүлдрийн туршилтын хулганад үүсгэсэн хавдрын загварт натрийн лактат болон циклофосфамид эмчилгээний хавсарсан нөлөөг судлах

Арга, аргачлал: Бид энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхимийн дэргэдэх ‘’Эмнэлзүйн Эмгэг судлалын лаборатори’’, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэнгийн Тархи судлалын лаборатори, Эсийн өсгөвөрийн лабораторийг түшиглэн туршилт судалгааны аргаар хийлээ.

Туршилтын амьтан: C57BL/6, 6-8 долоо хоногтой эмэгчин хулганыг туршилтад ашигласан. Хулганын унтуулгад 2%-ийн изофлуран хэрэглэсэн.

Эсийн өсгөвөр: Хулганын бүдүүн гэдэсний хавдрын эсийг (MC-38) 10%-ийн тугалын хээлийн ийлдэс, 0.5% мөөгөнцрийн эсрэг эм болон антибиотикийн холимог (Amphotericin B, Pencillin G, Streptomycin) агуулсан эсийн орчинд (DMEM) 5% CO_2-ийн чийгшилтэй 37°C-хэмд өсгөвөрлөсөн.

Хавдрын загвар үүсгэсэн аргачлал: Хавдрын эс (MC38)-ийг фосфат буферийн уусмалаар шингэрүүлэн (100 мкл) $1x10^6$ тооны эсийг туршилтын амьтны хэвлийн арьсан дор цэврүү үүсгэн тарьж хорт хавдар үүсгэсэн.

Хавдарт лактат, циклофосфамид болон хавсарсан эмчилгээ хийсэн аргачлал: Туршилтын амьтанд хавдрын эс тарьж хавдрын загвар үүсгэв. Хавдрын эс тарьснаас хойш 8 дахь өдөрт, хавдрын эзлэхүүн 150 мм^3 болох үед хулганыг 5 бүлэгт хуваан эмчилгээг эхлүүлсэн.

1. Бүлэг I: Хяналт (PBS 100 мкл)
2. Бүлэг II: Глюкоз (5 гр/кг)
3. Бүлэг III: Лактат (1.68 гр/кг)
4. Бүлэг IV: Циклофосфамид 40 мг/кг тунгаар долоо хоногт 2 удаа удаа хоёр долоо хоногийн турш
5. Бүлэг V: Лактат ба Циклофосфамид 40 мг/кг тунгаар долоо хоногт 2 удаа хоёр долоо хоногийн турш хэвлийд тарьсан.

Хавдрын хэмжээг хэмжсэн аргачлал: Автомат калипр ашиглан хавдрын урт, өргөнийг өдөр бүр нэг удаад 3 удаагийн давтамжтай хэмжсэн. Хавдрын эзлэхүүнийг өргөн, уртаар нь дижитал калипр ашиглан хэмжиж (хавдрын эзэлхүүн=өргөн^2 $_X$ урт/2) бодсон. Хавдрын эзлэхүүнийг өдөр бүр дижитал калипр ашиглан хэмжиж, ажиглав.

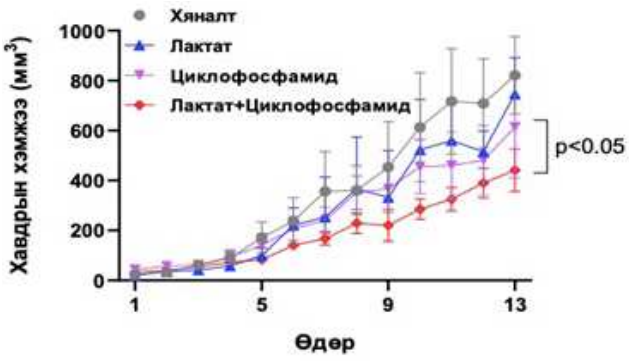
Эд судлалын шинжилгээ хийсэн аргачлал: Хавдрын эдийг авч 10%-ийн буфер формалины уусмалд бэхжүүлэн, усгүйжүүлэх, тосгүйжүүлэх дамжлагын дараа лааны тосон хэвэнд цутгасан бэлдцийг микротомоор зүсэн, гематоксилин ба эозин будгийн аргаар будаж, үр дүнг гэрлийн микроскопоор дүгнэсэн.

Статистик боловсруулалт: Эмчилгээний үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг IBM-SPSS-26.0, Графпад призм-8.0 программ ашиглан тойм статистик буюу арифметик дундаж, дунджийн стандарт алдааг тооцож, бүлэг хоорондын ялгааг Т тест ашиглан үнэлэв. Амьдрах чадварын муруйг тооцсон ба лог ранк тестээр үнэлсэн, p утга 0.05 ба түүнээс бага тохиолдолд статистик ач холбогдолтой хэмээн үзсэн. Хавдрын загвар үүсгэсэн туршилтын амьтныг (n=20) 30 хоног ажиглан амьд үлдэх магадлалыг тооцлоо.

Үр дүн:

Туршилтын амьтны хавдрын хэмжээг эмчилгээний бүлгүүдэд хэмжсэн дүн: Хавдрын эзлэхүүн 150 мм^3 болох үед, 8 дахь өдрөөс эхлэн нэгдүгээр бүлэгт PBS хяналт, хоёрдугаар бүлэгт глюкоз, гурав болон тавдугаар бүлэгт лактатын изотоник уусмалыг туршилтын амьтны сэрвээний ойролцоо арьсан дор өдөр бүр тарих замаар эмчилгээ хийсэн. Дөрөв болон тавдугаар бүлэгт циклофосфамидыг 40 мг/кг тунгаар долоо хоногт 2 удаа хоёр долоо хоногийн турш хэвлийд тарьсан. Туршилтын амьтны хэвлий хэсгийн арьсыг түрж ургасан MC38 шугаман эсээр үүсгэгдсэн хавдрын урт өргөнийг өдөр бүр (нэг удаад 3 хэмжилт хийж дунджийг тодорхойлсон) хэмжсэн. Туршилтын бүлэг хяналт, глюкоз болон лактатын бүлгийн хавдрын хэмжээг лактат, циклофосфамид, лактат ба циклофосфамидын хавсарсан эмчилгээний дүнг (Зураг 1), (Зураг 2) тус тус тодорхойлов.

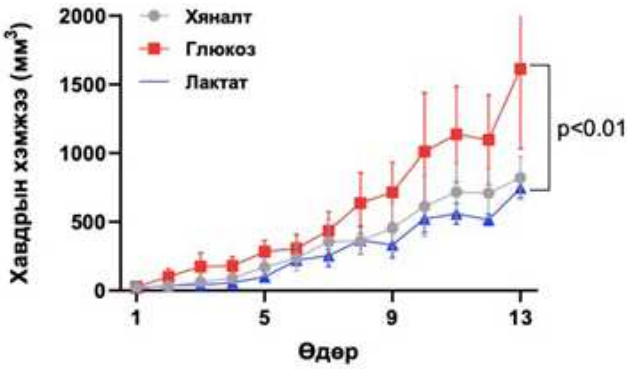
Туршилтын амьтанд үүсгэсэн хавдрын загварт глюкоз, лактат эмчилгээг туршсан дүн: Бид хулганын бүдүүн гэдэсний MC38 эсийг туршилтын амьтанд (n=4), 100мкл 1×10^6 тооны хавдрын эсээр тарьж хавдрын загвар үүсгэсэн. Хяналтын бүлэг, глюкозын бүлэг, лактатын бүлэгт өдөр бүр арьсан дор тарьж эмчилсэн. Автомат калипр ашиглан хавдрын урт, өргөнийг өдөр бүр (нэг удаад 3 удаагийн давтамжтай) хэмжсэн. Туршилтын амьтны хавдрын өсөлтийг тодорхойлсон дүнг зураг 1-т харуулав.



Зураг 1. Хавдрын өсөлтийн муруй.

Босоо тэнхлэгт хавдрын ургалтыг эзэлхүүнээр, хэвтээ тэнхлэгт эмчилгээ эхэлсэн өдрөөс эхлэн хоногийг өдрөөр тэмдэглэсэн. Хавдрын эзэлхүүнийг хавдрын урт ба өргөнийг ашиглан тооцсон. Тооцооллын дундаж ±стандарт алдааны дунджаар илэрхийллээ.

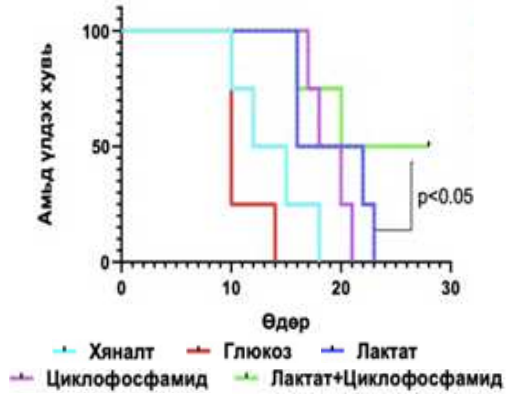
Туршилтын амьтанд үүсгэсэн хавдрын загварт лактат ба циклофосфамид эмчилгээг туршсан дүн: Бид хулганын бүдүүн гэдэсний MC38 эсийг туршилтын амьтанд (n=4), 100мкл 1×10^6 тооны хавдрын эсээр тарьж хавдрын загвар үүсгэсэн. Лактатын бүлэг, циклофосфамидын бүлэг, лактат ба циклофосфамидын хавсарсан бүлэгт (циклофосфамид 20мг/кг-аар) дангаар эсвэл лактаттай хослуулан эмчилсэн эмчилгээ туршиж, хавдрын өсөлтийг тодорхойлсон. Лактат, циклофосфамидын хавсарсан эмчилгээний бүлгийн хавдрын дундаж эзэлхүүн лактат, циклофосфамид дан эмчилгээ болон хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад статистик үнэн магадлалтайгаар буурсан байлаа ($p<0.05$). Иймд хавсарсан эмчилгээ нь хавдрын ургалтыг саатуулж байна. Туршилтын амьтны хавсарсан эмчилгээг тодорхойлсон дүнг зураг 2-т харуулав.



Зураг 2. Хорт хавдарт хавсарсан эмчилгээ туршсан дүн

Хавдрын эзэлхүүнийг хавдрын урт ба өргөнийг ашиглан тооцсон. Тооцооллын дундаж ±стандарт алдааны дунджаар илэрхийллээ. Лактат болон циклофосфамидын хавсарсан эмчилгээ нь хавдрын ургалтыг саатуулж байна.

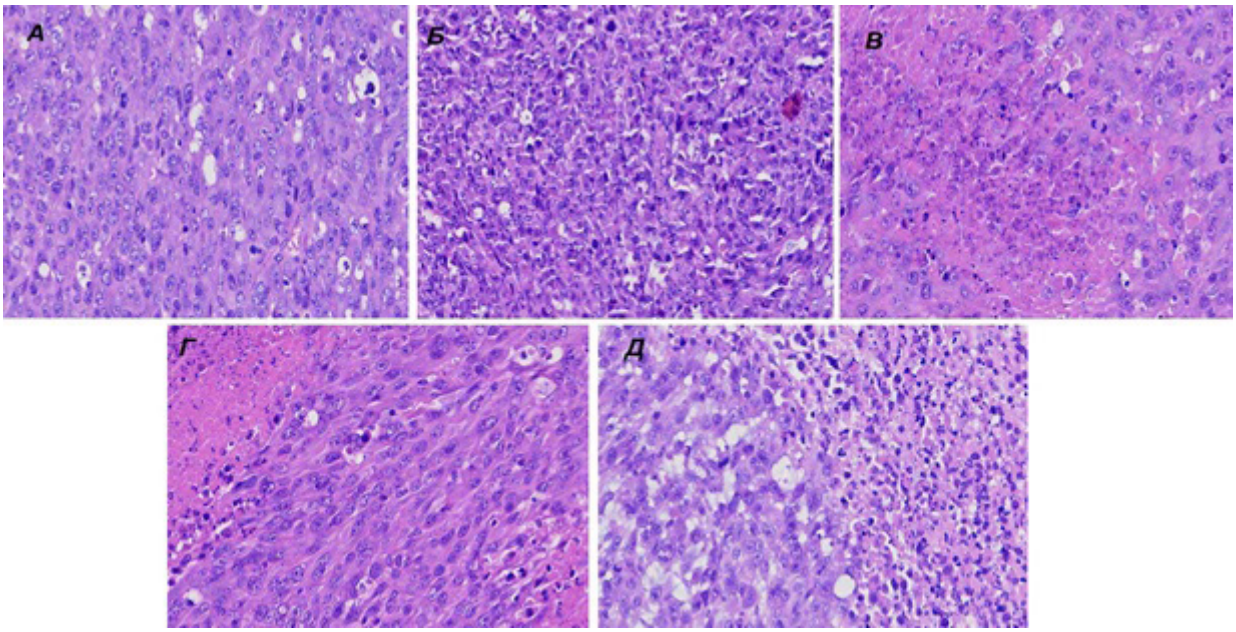
Туршилтын амьтны амьдрах магадлалд лактат, лактат ба циклофосфамид эмчилгээ туршсан дүн: Туршилтад хамрагдсан нийт амьтдыг (n=20) эмчилгээний дараа 30 хоногийн турш ажиглахад 65% нь эмчилгээний дараах 20 хоногийн дотор үхсэн. Лактат ба циклофосфамидын хосолсон эмчилгээ хийсэн хулганад бусад эмчилгээний бүлэг болон хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад амьд үлдэх магадлал статистик үнэн магадлалтайгаар ($p<0.05$) нэмэгдсэн.Туршилтын амьтны амьдрах магадлалыг (Каплен-Мейерийн амьдрах чадварын муруй) зураг 3-т харуулав.



Зураг 3. C56BL/6 хулганад MC38 эс тарьсанаас хойш амьдрах магадлал.

MC38 хавдрын загварт лактат эсвэл циклофосфамид, лактат ба циклофосфамидын хавсарсан эмчилгээ туршиж *амьдрах хугацааг тодорхойллоо. Босоо тэнхлэгт амьд үлдэх магадлал* (%), хэвтээ тэнхлэгт амьдарсан хугацааг харуулав.

C57BL/6 хулганад MC38 эсээр үүсгэсэн бүдүүн гэдэсний хавдарт эд судлалын шинжилгээ хийсэн дүн: MC38 эсээр үүсгэгдсэн хавдрын загварт глюкоз, лактат, циклофосфамид, лактат ба циклофосфамидын хавсарсан эмчилгээ туршиж, эд судлалын шинжилгээ хийж хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад глюкозын бүлэгт хавдрын эсийн хэт их үржил, митоз хуваагдал олширсон бол лактат болон циклофосфамидын бүлэгт үхжил ихтэй, харин хавсарсан эмчилгээ хийгдсэн бүлэгт үхжил, лимфоцит эсийн нэвчдэс илэрсэн.



Зураг 4. Туршилтын амьтанд *MC38* эсээр үүсгэгдсэн хавдарт эд судлалын шинжилгээ хийсэн дүн.

Тайлбар: *А-Хяналтын бүлэг, Б-Глюкозын бүлэг, В-Лактатын бүлэг, Г- Циклофосфамидын бүлэг, Д-Лактат ба циклофосфамидын хавсарсан бүлэгт эмчилгээ хийн туршиж хавдрын эдийг гематоксилин ба эозин будгийн аргаар будаж, үр дүнг гэрлийн микроскопоор дүгнэсэн. 40х*

Хэлцэмж: Лактатаар эмчилсэн бүлэгт хавдрын дундаж эзэлхүүн глюкоз болон PBS эмчилгээ хийсэн бүлэгтэй харьцуулахад статистик үнэн магадлалтай буурсан ($p<0.01$) ба лактат эмчилгээ хавдрын ургалтыг дарангуйлж байгаа нь Feng Q. et al. 2022 он нарын судалгааны үр дүнтэй дүйж байна[12].

Feng Q (2022), Hui S (2020) нар эд эсийн бодисын солилцооны анхдагч эх үүсвэр болох глюкозоос илүүтэй лактат дархлааны эсийн энергийн эх үүсвэр болохыг дурджээ.[12, 13] Хавдрын гаралтай сүүний хүчил нь Т зохицуулагч эсийн идэвжилийг нэмэгдүүлсэнээр хавдрын эсрэг дархлааны хариу урвалыг дарангуйлдаг.[10,14,15] Харин эрчимтэй дасгал хөдөлгөөний үр дүнд араг ясны булчингаас үүссэн лактат нь CD8+Т эсийг идэвхжүүлсэнээр хавдрын эсрэг нөлөөтэй.[16] Энэхүү судалгааны үр дүнд лактат хавдрын бичил орчинд ургалтыг дарангуйлж, хавдрын орчинд туршилтын амьтны амьдрах магадлалыг уртасгаж байна.

Дүгнэлт: Хавсарсан эмчилгээ хавдрын ургалтыг дарангуйлж байгаа нь лактат, хавдрын бичил орчинд лимфоцит эсийг идэвхжүүлэн хавдрын эсрэг үйлдэл үзүүлж, Т зохицуулагч эсийг дарангуйлах циклофосфамидын нөлөөг дэмжсэнээр туршилтын амьтны амьд үлдэх магадлалыг нэмэгдүүлж байна. Цаашид лактатын зохицуулагч болон эффектор Т эсэд үзүүлэх нөлөөг нарийвчлан судлах шаардлагатай байна.

Ном зүй:

1. *Giaquinto AN, Miller KD, Tossas KY, Winn RA, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for African American/Black People 2022. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2022;72(3):202-229.*
2. *Xie F, Ye L, Ta M, Zhang L, Jiang WG. MTSS1: a multifunctional protein and its role in cancer invasion and metastasis. Front Biosci (Schol Ed). Jan 1 2011;3(2):621-31. doi:10.2741/s175*
3. *ME, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, M. D. Isabelle Soerjomataram, and D. V. M. Ahmedin Jemal. "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." (2024).*
4. *Эрүүл мэндийн хөгжлийн төвийн эрүүл мэндийн статистикийн нэгдсэн сан 2022 он*
5. *Zhang B, Zhang J, Li Y, et al. In Situ STING-Activating Nanovaccination with TIGIT Blockade for Enhanced Immunotherapy of Anti-PD-1-Resistant Tumors. Adv Mater. Apr 13 2023:e2300171. doi:10.1002/adma.202300171*
6. *Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood. May 1 2007;109(9):3812-9. doi:10.1182/blood-2006-07-035972*
7. *Haas R, Smith J, Rocher-Ros V, et al. Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T Cell Migration and Effector Functions. PLoS Biol. Jul 2015;13(7):e1002202. doi:10.1371/journal.pbio.1002202*
8. *Rundqvist, Helene, Pedro Veliça, Laura Barbieri, Paulo A. Gameiro, David Bargiela, Milos Gojkovic, Sara Mijwel et al. "Cytotoxic T-cells mediate exercise-induced reductions in tumor growth." Elife 9 (2020): e59996.*
9. *Delgoffe GM, Powell JD. Sugar, fat, and protein: new insights into what T cells crave. Curr Opin Immunol. Apr 2015;33:49-54. doi:10.1016/j.coi.2015.01.015*
10. *Brand A, Singer K, Koehl GE, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. Cell Metab. Nov 8 2016;24(5):657-671. doi:10.1016/j.cmet.2016.08.011*
11. *Watson MJ, Vignali PDA, Mullett SJ, et al. Metabolic support of*

tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. Nature. Mar 2021;591(7851):645-651. doi:10.1038/s41586-020-03045-2
12. Feng Q, Liu Z, Yu X, et al. Lactate increases stemness of CD8 + T cells to augment anti-tumor immunity. Nat Commun. Sep 6 2022;13(1):4981. doi:10.1038/s41467-022-32521-8
13. Hui S, Cowan AJ, Zeng X, et al. Quantitative Fluxomics of Circulating Metabolites. Cell Metab. Oct 6 2020;32(4):676-688 e4. doi:10.1016/j.cmet.2020.07.013
14. Ohashi T, Aoki M, Tomita H, et al. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer. Cancer Sci. Jun 2017;108(6):1128-1134. doi:10.1111/cas.13244
15. Kumagai S, Koyama S, Itahashi K, et al. Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments. Cancer Cell. Feb 14 2022;40(2):201-218 e9. doi:10.1016/j.ccell.2022.01.001
16. Lee TY. Lactate: a multifunctional signaling molecule. Yeungnam Univ J Med. Jul 2021;38(3):183-193. doi:10.12701/yujm.2020.00892

Results of sodium lactate and cyclophosphamide treatment in C57BL/6 mouse tumor model

Enkhdulguun E[1], Enkhtushig G[1], Gansukh Ch[1], Enkhsaikhan Lkh[1], Ariunzaya B[1,2]

[1]Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Central Clinical Laboratory, Mongol-Japan Hospital, MNUMS
E-mail: e.enkee1108@gmail.com, Tel: +976-99684547

Background: In the tumor microenvironment, lactate, rather than glucose, serves as a source of energy for immune cells. Researchers at Southwestern Simmons Cancer Center have shown that lactate, a metabolic byproduct produced during vigorous exercise, enhances antitumor immune responses by increasing tumor-specific CD8+ T cells within the tumor microenvironment. The effects of lactate on T-regulatory cells are currently unknown, and there is interest in exploring the potential synergistic action with cyclophosphamide therapy, one of the main chemotherapeutic agents known to inhibit T-regulatory cells. This research is motivated by the absence of studies testing the combined effect of lactate and cyclophosphamide treatment in mouse tumor models.
Aim: To investigate the combined effect of sodium lactate and cyclophosphamide treatment on a tumor model induced in C57BL/6 experimental mice.
Materials and Methods: Experimental animals: Female C57BL/6 mice aged 6-8 weeks were utilized for the experiment. Cell culture: Mouse colon tumor cells (MC-38) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 0.5% antifungal and antibiotic mixture (Amphotericin B, Penicillin G, Streptomycin) under 5% CO_2 at 37°C. Tumor model generation method: MS38 tumor cells were diluted with phosphate-buffered saline solution, and $1x10^6$ cells in 100 µl were subcutaneously injected into the right abdomen of experimental animals to induce cancer. Methods of combined treatment with lactate and cyclophosphamide: On the 8th day after tumor cell injection, when the tumor volume reached 150 mm^3, mice were divided into 5 groups and treatment was initiated. Tumor size measurement method: using an automatic caliper, the length and width of the tumor were measured three times daily. Results: The mean tumor volume in the lactate isotonic solution group was statistically significantly reduced compared to the glucose and PBS treatment groups ($p<0.01$). Additionally, the mean tumor volume in the combined lactate and cyclophosphamide treatment group was significantly reduced compared to either lactate or cyclophosphamide treatment alone ($p<0.05$). Therefore, combined treatment effectively inhibits tumor growth. All animals tested (n=20) were observed for 30 days post-treatment, with 65% mortality occurring within 20 days post-treatment. Mice treated with the combination of lactate and cyclophosphamide exhibited statistically significant ($p<0.001$) longer survival compared to both other treatment groups and the control group.
Conclusion: Combined treatment effectively suppresses tumor growth and enhances the probability of survival in experimental animals. This synergistic effect is attributed to the antitumor properties of lactate, which promotes lymphocyte activation within the tumor microenvironment, coupled with the inhibitory action of cyclophosphamide on T regulatory cells.

Keywords: Sodium Lactate, MC38, C57BL/6, Tumor model