

Einfluss des exogenen pH-Werts auf das Zellwachstum von Brustkrebszellen

[Sungmun Lee](#)^{1,2,*} und [Aya Shanti](#)¹

Nam Deuk Kim, wissenschaftlicher Redakteur

[Autoreninformationen](#) [Artikelhinweise](#) [Urheberrechts- und Lizenzinformationen](#) [PMC-Haftungsausschluss](#)

Zugehörige Daten

[Erklärung zur Datenverfügbarkeit](#)

[Gehe zu:](#)

Abstrakt

Brustkrebs ist die häufigste Krebsart bei Frauen und die lebensbedrohlichste Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Ein wesentliches Merkmal von Krebszellen, einschließlich Brustkrebszellen, ist ein umgekehrter pH-Gradient, der dazu führt, dass der extrazelluläre pH-Wert von Krebszellen saurer ist als der von normalen Zellen. Immer mehr Fachliteratur deutet darauf hin, dass eine alkalische Therapie den pH-Gradienten wieder auf den Normalwert umkehren und den Krebs behandeln könnte; Die Beweise bleiben jedoch nicht schlüssig. In dieser Studie untersuchten wir, wie unterschiedliche exogene pH-Werte das Wachstum, das Überleben, die intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-Werte und den Zellzyklus von dreifach negativen Brustkrebszellen aus MDA-MB-231-Krebszelllinien beeinflussen. Unsere Ergebnisse zeigten, dass extrem saure Bedingungen (pH 6,0) und mäßige bis extreme basische Bedingungen (pH 8,4 und pH 9,2) das Zellwachstum verzögerten, den Zelltod durch Nekrose und Apoptose induzierten, die ROS-Werte erhöhten und den Zellzyklus vom G0/ G1-Phase. Allerdings steigerten leicht saure Bedingungen (pH 6,7) das Zellwachstum, senkten die ROS-Werte, verursachten keinen nennenswerten Zelltod und verschiebten den Zellzyklus von der G0/G1-Phase in die G2/M-Phase, was erklärt, warum Krebszellen saure Bedingungen gegenüber bevorzugten neutrale. Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse auch, dass der zelluläre pH-Verlauf das nachfolgende Zellwachstum nicht wesentlich beeinflusste, wenn der pH-Wert des Mediums geändert

wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen schlagen wir vor, dass die Kontrolle oder Aufrechterhaltung eines ungünstigen pH-Werts (z. B. eines leicht alkalischen pH-Werts) für Krebszellen in vivo das Wachstum von Krebszellen verlangsamen oder möglicherweise den Krebs behandeln könnte.

Schlüsselwörter: Brustkrebs, exogener pH-Wert, Zellzyklus, Apoptose, reaktive Sauerstoffspezies

[Gehe zu:](#)

1. Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Krebsart bei Frauen und weltweit die häufigste Krebstodesursache bei Frauen [[1](#) , [2](#)]. Brustkrebs entsteht am häufigsten in der inneren Auskleidung der Milchgänge in der Brust oder in den Lappchen, die die Milchgänge mit Milch versorgen [[3](#)]. Wie viele andere Krebszellen haben Brustkrebszellen die Fähigkeit, Metastasen zu bilden oder in nahegelegenes Gewebe einzudringen und sich in entfernte Regionen des Körpers auszubreiten, wo sie zunehmend lebensbedrohlich werden. Nicht alle Brustkrebszellen sind gleich. Einige exprimieren spezifische Rezeptoren wie Östrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) oder den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2), während andere dies nicht tun [[4](#)]. Ungefähr 70–80 Prozent der Brustkrebserkrankungen sind Hormonrezeptor-positiv und exprimieren ER oder PR [[5](#)]. Hormonrezeptor-positiver Brustkrebs kann mit Hormontherapeutika behandelt werden. Brustkrebszellen, die keinen dieser drei Rezeptoren exprimieren, werden als dreifach negativ bezeichnet und sind in der Regel sehr aggressiv. Darüber hinaus können sie nicht mit Hormontherapeutika behandelt werden [[6](#)].

Unabhängig von ihrem Typ unterscheiden sich Brustkrebszellen in vielerlei Hinsicht von normalen Zellen. Beispielsweise exprimieren sie mehr Rezeptoren als normale Zellen, beispielsweise die Rezeptortyrosinkinasen, die grundlegende Zellfunktionen wie Proliferation, Überleben, Adhäsion und Differenzierung vermitteln [[7](#) , [8](#)]. Darüber hinaus weisen sie einen veränderten Stoffwechsel auf

und neigen dazu, den extrazellulären pH-Wert (pH_e) in ihrer Umgebung zu senken [9].

Veränderungen des extrazellulären und intrazellulären pH-Werts in Geweben beeinflussen die Zellfunktion und spielen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung [9 , 10]. Normale Zellen halten den intrazellulären pH-Wert (pH_i) über Ionentransportproteine eng auf nahezu neutralen Werten [11]. Normale differenzierte adulte Zellen haben einen pH_i von $\sim 7,2$ und einen pH_e von $\sim 7,4$. Krebszellen erzeugen jedoch einen umgekehrten pH-Gradienten, da ihr pH-Wert saurer ist als bei normalen Zellen. Krebszellen haben einen höheren pH_i von $>7,4$ und einen niedrigeren pH_e von $\sim 6,7-7,1$ [9 , 10]. Es wird angenommen, dass dieser umgekehrte pH-Gradient auf einen veränderten Stoffwechsel in Krebszellen zurückzuführen ist. Otto Warburg et al. berichteten erstmals über abnormale anaerobe Glykolyse und Stoffwechseleränderungen in Krebszellen [12]. In Krebszellen wird Pyruvat (das Endprodukt der Glykolyse) trotz der Anwesenheit von Sauerstoff in Laktat (ein Endprodukt der anaeroben Atmung) anstelle von Citrat umgewandelt [13]. Die Laktatsekretion durch Krebszellen wiederum führt zu einer extrazellulären Übersäuerung [14 , 15]. Darüber hinaus erhöhen Krebszellen die Expression und Aktivierung von Transportern und Pumpen wie dem Na^+/H^+ -Austauscher (NHE-1), dem H^+ -Laktat-Cotransporter und der Protonenpumpe (H^+ -ATPase). erhöht die Sekretion von H^+ in die extrazelluläre Umgebung der Zellen und trägt so weiter zur extrazellulären Ansäuerung bei [16 , 17]. Daher weisen Krebszellen einen umgekehrten pH-Gradienten mit einem leicht erhöhten intrazellulären pH-Wert und einem leicht erniedrigten extrazellulären pH-Wert auf [18 , 19].

Ein niedriger pH-Wert von extrazellulärem Krebs spielt eine wichtige Rolle bei der Arzneimittelresistenz und bei der Förderung von invasivem Wachstum und Metastasen [20 , 21]. Insbesondere erhöht ein niedriger extrazellulärer pH-Wert die Expression von Genen, die für Matrix-abbauende Enzyme und proangiogene Faktoren kodieren, und reguliert die Aktivität metastatischer Effektoren wie Serinproteasen und angiogener Faktoren hoch [22] .

Basierend auf dem umgekehrten pH-Gradienten von Krebszellen vermuten einige Forscher, dass eine alkalische Behandlung eine

wirksame ergänzende Behandlung für Krebspatienten sein könnte [23 , 24]. Die Grundidee der alkalischen Behandlung besteht darin, dass der umgekehrte pH-Gradient von Brustkrebszellen durch die systemische Verabreichung alkalischer Verbindungen wie Natriumbicarbonat (NaHCO_3), wiederhergestellt werden kann [25]. Es gibt jedoch immer noch keine eindeutigen Beweise dafür, dass eine Ernährung mit alkalischen Lebensmitteln den pH-Wert des gesamten Körpers beeinflussen kann oder einen direkten Einfluss auf Krebs hat. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Natriumbicarbonat die Besiedelung der Lymphknoten verringerte, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Menge an zirkulierenden Tumorzellen hatte [26]. Um die alkalische Behandlung von Krebszellen effizienter durchführen zu können, ist es wichtig, die direkte Wirkung unterschiedlicher pH-Werte auf Krebszellen zu verstehen.

In dieser Studie untersuchten wir die Auswirkung des exogenen pH-Werts auf das Wachstum, den Tod (entweder durch Apoptose oder Nekrose), den Gehalt an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Zellzyklus von MDA-MB-231-Zellen, einer dreifach negativen Brustkrebszelle Linie, die sich durch hohe Aggressivität und Invasivität auszeichnet.

[Gehe zu:](#)

2. Ergebnisse

Krebszellen, einschließlich Brustkrebszellen, weisen einen umgekehrten pH-Gradienten auf. Krebszellen haben einen niedrigeren extrazellulären pH-Wert von $\sim 6,7-7,1$ und einen höheren intrazellulären pH-Wert von $7,4$, während normale Zellen einen höheren extrazellulären pH-Wert von $7,4$ und einen niedrigeren intrazellulären pH-Wert von $7,2$ haben [9 , 10]. Daher deuten einige Studien darauf hin, dass die Behandlung von Krebszellen mit alkalischen Verbindungen Krebs wirksam beseitigen kann [23]. Es gibt jedoch immer noch keine eindeutigen Beweise dafür, dass die Behandlung von Krebszellen mit alkalischen Verbindungen tatsächlich Krebszellen zerstören kann. Um die Wirkung der unterschiedlichen pH-Werte auf Brustkrebszellen zu verstehen, inkubierten wir dreifach negative Brustkrebszellen (MDA-MB-231) in verschiedenen pH-

Medien und überwachten ihr Wachstumsprofil, ihren Tod, ihre intrazellulären ROS-Werte und ihre Zellen Zyklus und extrazelluläre pH-Änderungen.

2.1. pH-Änderungen des Kulturmediums mit oder ohne MDA-MB-231-Zellen

Wir haben die pH-Änderungen des Mediums während der Inkubation der Zellen in einem befeuchteten Inkubator mit 37 °C und 5 % CO₂ überwacht. Wie gezeigt in [Abbildung 1](#) Über die fünf verschiedenen pH-Werte (pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2) senkten MDA-MB-231-Zellen den extrazellulären pH-Wert mit der Zeit, und die Umgebung der Zellen wurde saurer als im ursprünglichen Ausgangszustand. [Abbildung 1f](#) zeigte, dass das Medium im Laufe der Zeit seine Farbe änderte, wobei alle Proben ihre rosa Farbe verloren. DMEM enthält Phenolrot als pH-Indikator. Die Farbe von Phenolrot ist unterhalb eines pH-Werts von 6,8 gelb und bei pH 7,4, dem physiologischen pH-Wert, orangerot. Phenolrot verfärbt sich leuchtend rosa, wenn der pH-Wert über 8,2 liegt. DMEM enthält außerdem Natriumbicarbonat, NaHCO₃, als Puffer zur Stabilisierung des pH-Werts und erfordert eine Umgebung mit 5–10 % CO₂, um den physiologischen pH-Wert aufrechtzuerhalten.



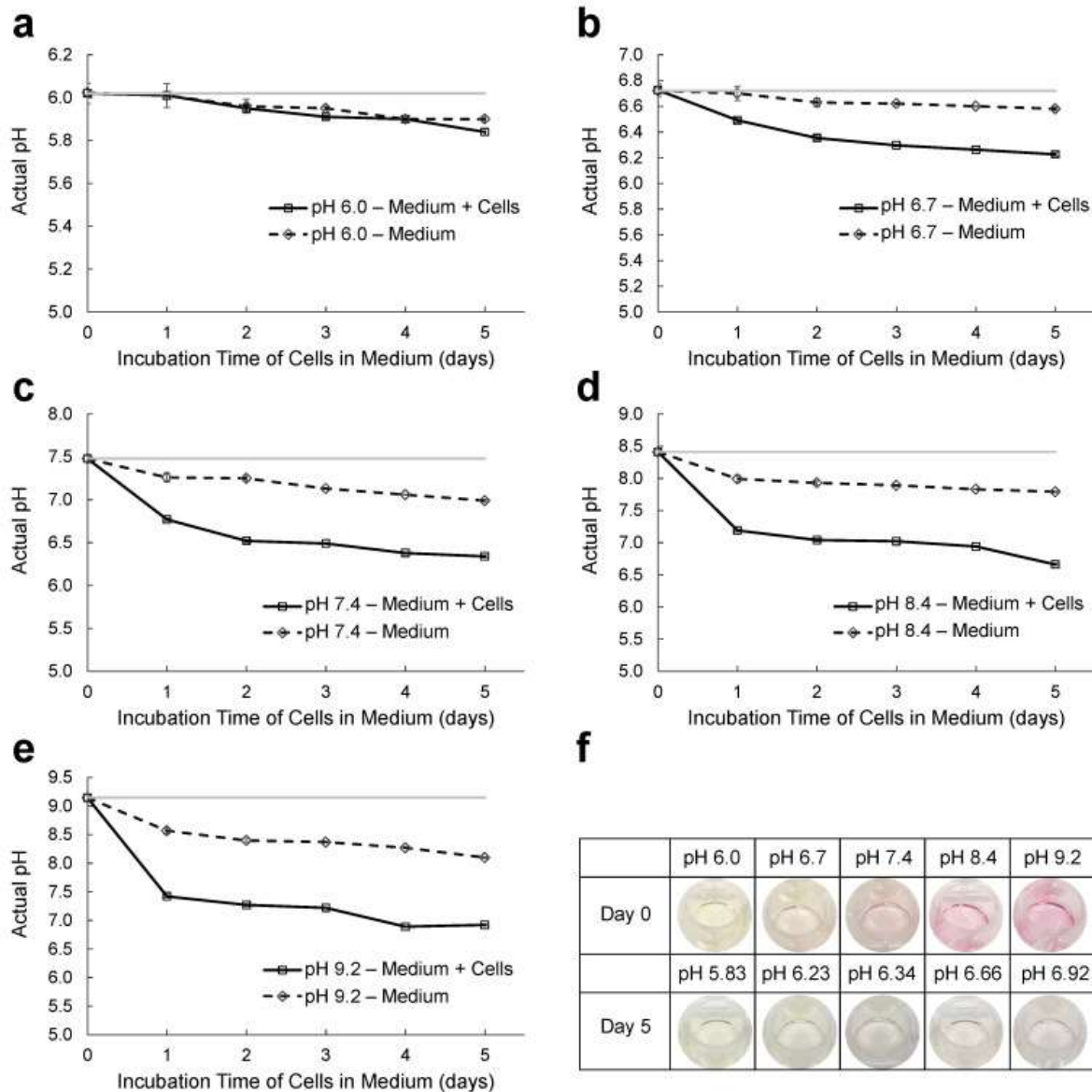


Abbildung 1

Extrazelluläre pH-Profile von MDA-MB-231-Zellen im Zeitverlauf. MDA-MB-231-Zellen wurden in eine Platte mit 12 Vertiefungen ausgesät und bei fünf verschiedenen pH-Werten inkubiert: (**a**) pH 6,0; (**b**) pH 6,7; (**c**) pH 7,4; (**d**) pH 8,4; und (**e**) pH 9,2 von DMEM. Sie wurden in einem Inkubator bei 37 °C gehalten und der pH-Wert wurde täglich gemessen. Nur Medium (gepunktete Linie), MDA-MB-231-Zellen in Medium mit unterschiedlichem pH-Wert (durchgezogene schwarze Linie) und Referenzlinie (durchgezogene graue Linie). (**f**) Mittlere Farbe von MDA-MB-231-Zellen in 12-Well-Platten am Tag 0 und Tag 5.

NaHCO₃ dissoziiert in Natriumion (Na⁺) und Bicarbonat-Ion (HCO₃⁻). Im Bicarbonat-Puffersystem wird der pH-Wert nach dem Prinzip von Le Chatelier aufrechterhalten. Wenn der pH-Wert des Systems sinkt, verschiebt die erhöhte H⁺-Ionenkonzentration die Gleichung nach links. In ähnlicher Weise verschiebt eine Abnahme der H⁺-Ionenkonzentration die Gleichung nach rechts.

Der Kohlendioxidpartialdruck ($p\text{CO}_2$) im arteriellen Blut liegt zwischen 35 mmHg und 45 mmHg. Bei der Kultivierung von Säugetierzellen wird die CO_2 -Konzentration ($p\text{CO}_2$) in einem Zellkulturinkubator normalerweise auf 5 % (v/v) oder 38 mmHg eingestellt, also 5 % von 760 mmHg.

Wenn CO_2 in Wasser gelöst wird, bildet es Kohlensäure (H_2CO_3) und H_2CO_3 dissoziiert dann frei in Ionen.

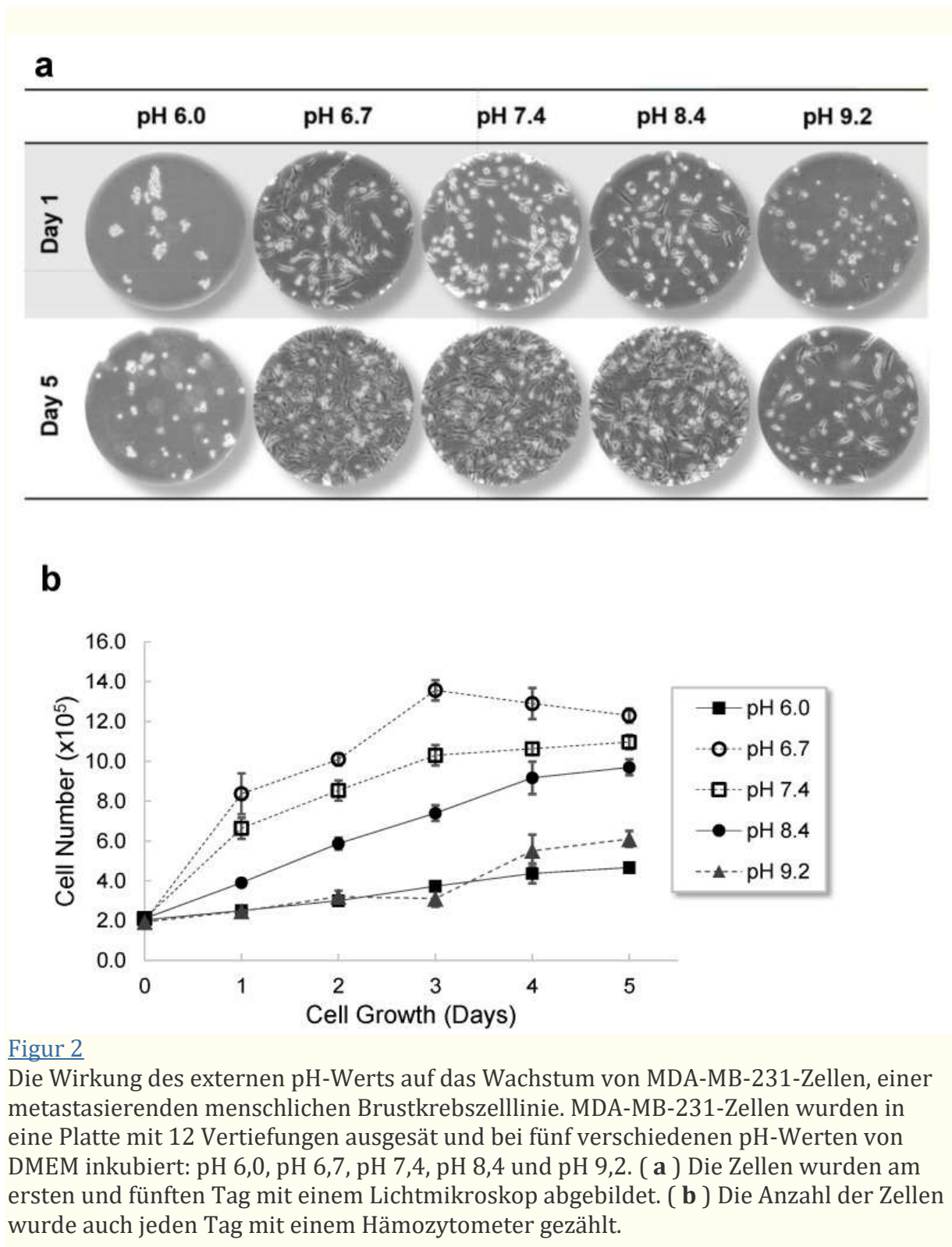


Das Puffersystem im Medium kann pH-Änderungen widerstehen und der pH-Wert des Mediums sollte stabil bleiben. Allerdings sind pH-Störungen in einem Lebendzellkultursystem aufgrund des Zellstoffwechsels unvermeidlich [27]. Wenn die Störung die Pufferkapazität überschreitet, ändert sich der pH-Wert des Mediums [27]. Die Schwankung des pH-Werts führt normalerweise zu einer Ansäuerung des Wachstumsmediums. Wie in ... gesehen [Abbildung 1](#), Medien in fünf pH-Werten – pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2 – neigten im Laufe der Zeit dazu, im Inkubator angesäuert zu werden; Allerdings wurde die Ansäuerung bei allen pH-Werten beschleunigt, wenn MDA-MB-231-Zellen vorhanden waren.

2.2. Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf das Zellwachstum von MDA-MB-231

MDA-MB-231-Zellen wurden in fünf verschiedenen pH-Werten von Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert: pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2. Die anfängliche Zelldichte betrug 2×10^5 Zellen/Well in 1 ml Medium bei fünf verschiedenen pH-Werten. Wie in ... gesehen [Figur 2a](#): MDA-MB-231-Zellen, die in Medien mit pH 6,7, pH 7,4 und pH 8,4 inkubiert wurden, konfluenten innerhalb von 5 Tagen, wenn auch mit leicht unterschiedlichen Wachstumsraten, während dies bei Zellen, die in Medien mit pH 6,0 und pH 9,2 inkubiert wurden, nicht der Fall war. Obwohl bei pH 6,0 und pH 9,2 inkubierte Zellen wuchsen, wuchsen sie nicht so schnell wie diejenigen in anderen pH-Medien ([Figur 2B](#)). Interessanterweise verhinderte ein pH-Wert von 6,0, dass sich MDA-MB-231-Zellen an der Oberfläche einer 12-Well-Platte anhefteten. Alle Zellzahlen zu

festgelegten Zeitpunkten in fünf verschiedenen pH-Werten werden in angezeigt [Figur 2B](#).

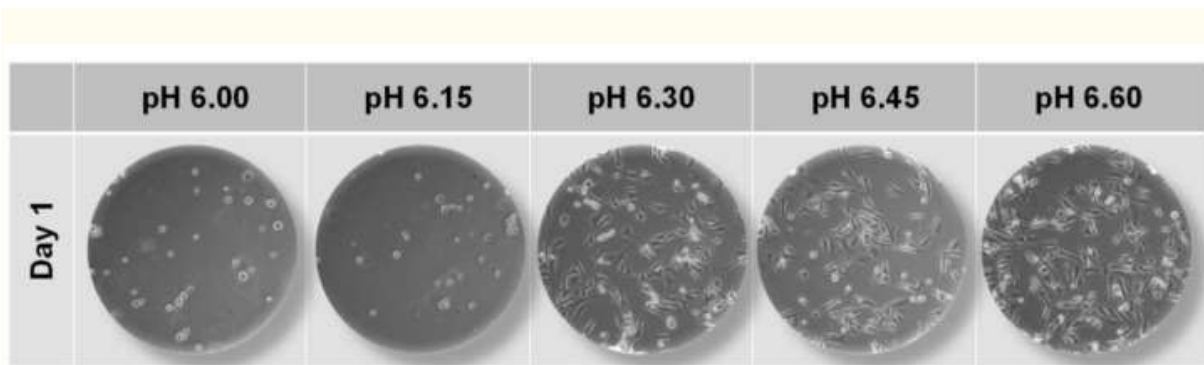


Figur 2

Die Wirkung des externen pH-Werts auf das Wachstum von MDA-MB-231-Zellen, einer metastasierenden menschlichen Brustkrebszelllinie. MDA-MB-231-Zellen wurden in eine Platte mit 12 Vertiefungen ausgesät und bei fünf verschiedenen pH-Werten von DMEM inkubiert: pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2. (a) Die Zellen wurden am ersten und fünften Tag mit einem Lichtmikroskop abgebildet. (b) Die Anzahl der Zellen wurde auch jeden Tag mit einem Hämocytometer gezählt.

Um die sauren pH-Bedingungen genau zu identifizieren, die die Anlagerung von MDA-MB-231-Zellen an die Oberfläche der

Wellplatten verhindert, wurden die Zellen in DMEM-Medium bei fünf verschiedenen pH-Werten inkubiert: pH 6,00, pH 6,15, pH 6,30, pH 6,45, und pH 6,60. Wie in ... gesehen [Figur 3](#), Zellen, die bei einem pH-Wert von 6,30 und höher inkubiert wurden, hafteten an der Oberfläche von Well-Platten, während dies bei Zellen, die bei einem pH-Wert unter 6,30 inkubiert wurden, nicht der Fall war.

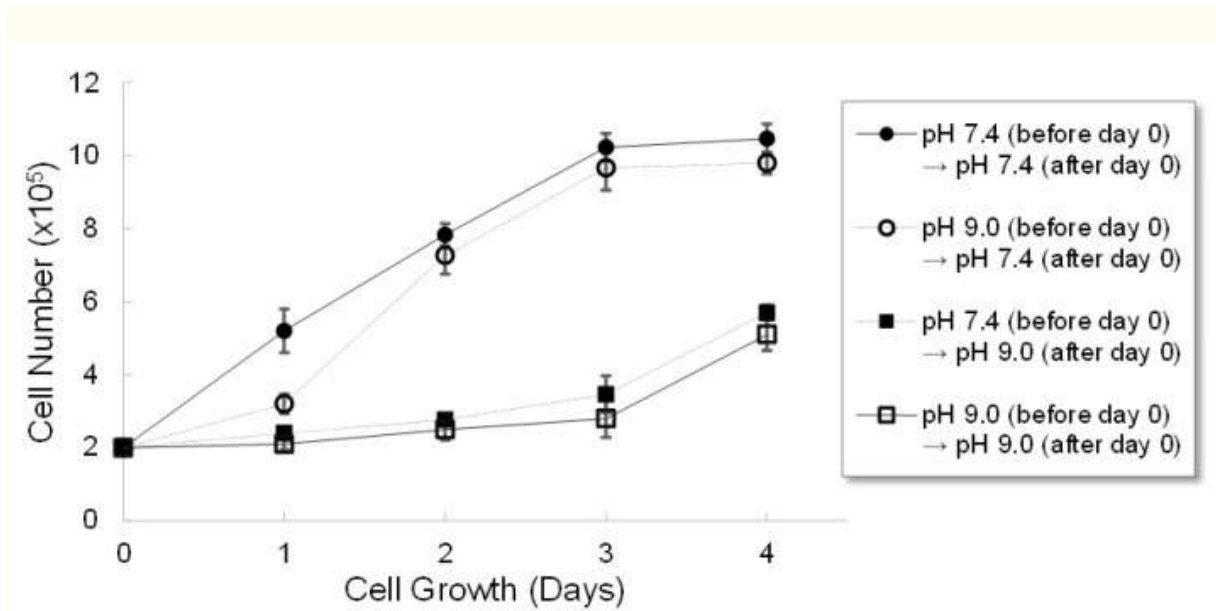


[Figur 3](#)

Die Wirkung saurer pH-Werte auf das Wachstum von MDA-MB-231-Zellen. MDA-MB-231-Zellen wurden in eine Platte mit 12 Vertiefungen ausgesät und bei fünf verschiedenen pH-Werten von DMEM inkubiert: pH 6,00, pH 6,15, pH 6,30, pH 6,45 und pH 6,60. Die Zellen wurden am ersten Tag mit einem Olympus IX70-Mikroskop unter Verwendung eines 10-fach-Objektivs abgebildet.

Wie in ... gesehen [Figur 2](#), MDA-MB-231-Zellen wuchsen in Medium mit pH 7,4 schneller als in Medium mit pH 9,2. Um herauszufinden, ob diese Änderung der Wachstumsrate umgekehrt werden kann, wurden MDA-MB-231-Zellen in Medien mit einem pH-Wert von 7,4 und 9,2 kultiviert. Sobald sie bei jedem pH-Wert stabil waren, wurden ihre pH-Werte geändert. Insbesondere wurden zwei Proben in Medien mit pH 7,4 und pH 9,2 bei den gleichen jeweiligen pH-Werten gehalten, während bei zwei anderen Proben der pH-Wert ihrer Medien von pH 7,4 auf pH 9,2 oder von pH 9,2 auf pH 7,4 umgestellt wurde. Wie in ... gesehen [Figur 4](#) Wenn Zellen eine pH-Änderung von pH 7,4 auf pH 9,2 erfuhren, zeigten sie das gleiche Zellwachstumsprofil wie diejenigen, die einen kontinuierlichen pH-Wert von 9,2 erfahren. Als die Zellen eine pH-Änderung von pH 9,2 auf pH 7,4 erfuhren, war ihr Wachstum am ersten Tag langsam; Allerdings zeigten sie nach dem ersten Tag das gleiche Wachstumsprofil wie diejenigen mit einem kontinuierlichen pH-Wert von 7,4. Diese Ergebnisse zeigten, dass der aktuelle pH-Wert des Mediums für die Bestimmung des Zellwachstums wichtiger war als das anfängliche Aussaatmedium. Der pH-Verlauf hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum. Dies deutet darauf hin,

dass die Kontrolle oder Aufrechterhaltung ungünstiger pH-Werte für Krebszellen in vivo deren Wachstum verlangsamen oder möglicherweise den Krebs behandeln könnte.



Figur 4

Die Auswirkung eines Mediumwechsels auf das Zellwachstum von MDA-MB-231-Zellen. MDA-MB-231-Zellen wurden in DMEM mit pH 7,4 oder pH 9,0 gezüchtet. Die Zellen in jedem pH-Wert wurden trypsinisiert und am Tag 0 in zwei verschiedene pH-Werte, pH 7,4 bzw. pH 9,0, aufgeteilt. Die Gesamtzahl der lebensfähigen Zellen wurde jeden Tag ohne Medienwechsel für bis zu 4 Tage durchgeführt. pH 7,4 → pH 7,4 (schwarze Kreise), pH 9,0 → pH 7,4 (weiße Kreise), pH 7,4 → pH 9,0 (schwarze Quadrate) und pH 9,0 → pH 9,0 (weiße Quadrate).

2.3. Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf den Zelltod von MDA-MB-231

Der Zelltod bei fünf verschiedenen pH-Werten wurde durch Doppelfärbung von Annexin V und PI und Nachweis der Fluoreszenz von Annexin V und PI mithilfe eines Durchflusszytometers gemessen. Apoptotische Zellen legen Phosphatidylserin auf der äußeren Packungsbeilage der Plasmamembran frei und Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin in apoptotischen Zellen [28]. PI dringt selektiv in die Zellmembranen toter Zellen ein und zeigt Fluoreszenz, wenn es an die DNA toter Zellen bindet [29]. Daher wird Annexin V zum Nachweis früher zellulärer Apoptose und PI zum Nachweis von zellulärer Nekrose oder später Apoptose verwendet.

Abbildung 5 zeigt Zelltod bei verschiedenen pH-Werten. Die Durchflusszytometriediagramme wurden in vier Regionen mit der Bezeichnung Q1, Q2, Q3 und Q4 unterteilt. Gesunde Zellen waren sowohl für Annexin V als auch für PI negativ und wurden im Durchflusszytometriediagramm mit Q1 gekennzeichnet. Frühe apoptotische Zellen waren nur positiv für Annexin V und wurden als Q2 gekennzeichnet. Nekrotische Zellen waren nur positiv für PI und wurden als Q3 gekennzeichnet. Apoptotische Zellen waren sowohl für Annexin V als auch für PI positiv und wurden mit Q4 gekennzeichnet.

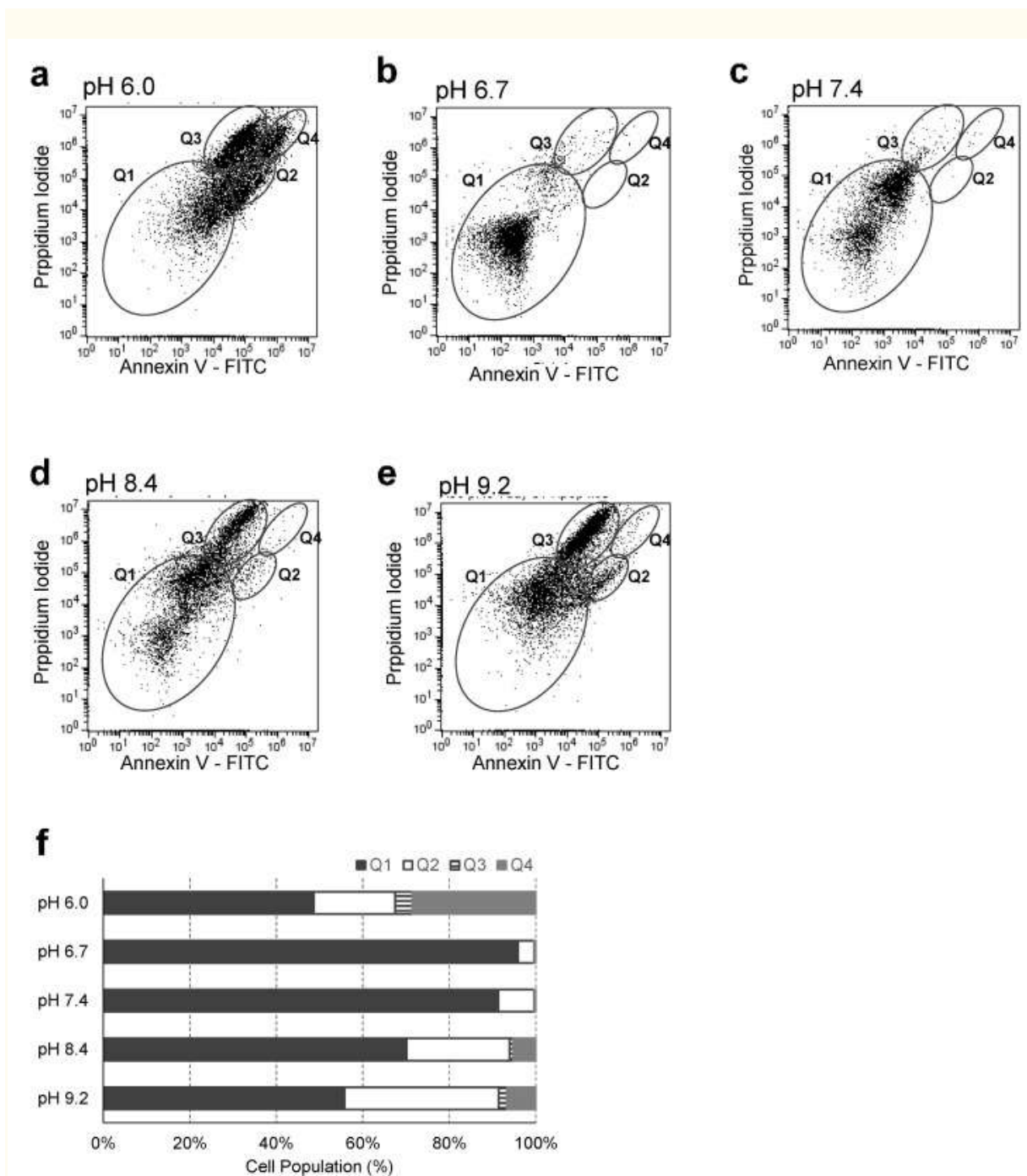


Abbildung 5


Apoptose- oder Nekroseanalyse von MDA-MB-231-Zellen bei verschiedenen pH-Werten. MDA-MB-231-Zellen wurden in eine Platte mit 12 Vertiefungen ausgesät und bei fünf verschiedenen pH-Werten von DMEM inkubiert: (**a**) pH 6,0; (**b**) pH 6,7; (**c**) pH 7,4; (**d**) pH 8,4; und (**e**) pH 9,2. Die Zellen wurden mit Annexin V-FITC und PI gefärbt und Apoptose oder Nekrose wurden mittels Durchflusszytometrie-Assay gemessen. (**f**) Die Daten in den Punktdiagrammen wurden nach Q1, Q2, Q3 und Q4 analysiert.

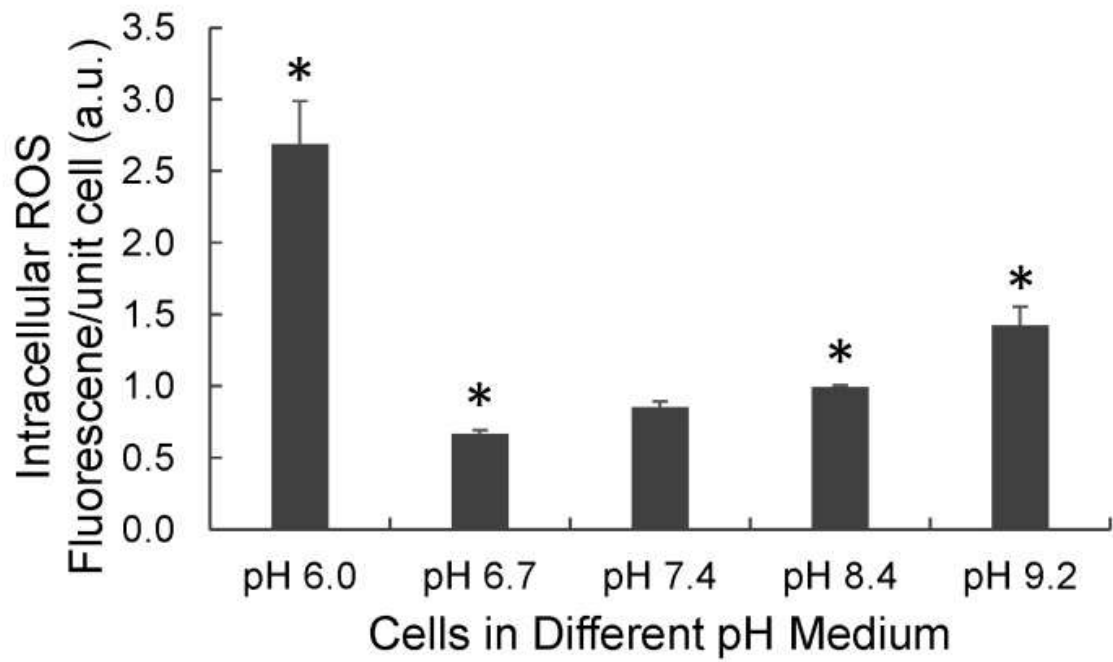
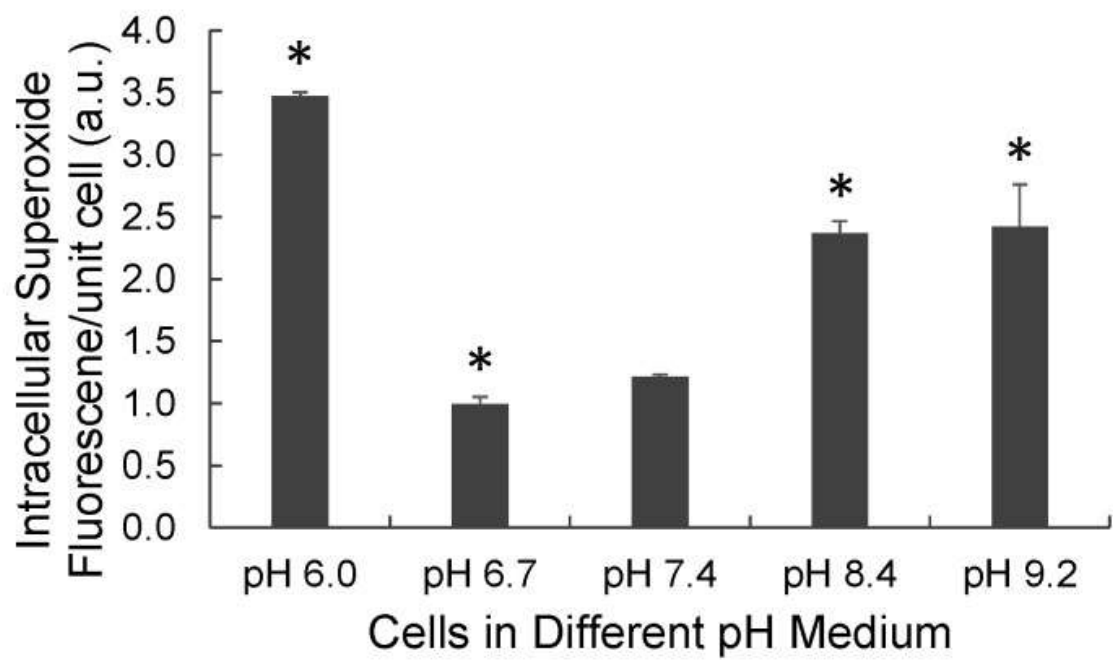
MDA-MB-231-Zellen galten als gesund, wenn sie keine Anzeichen von Apoptose oder Nekrose zeigten. Die gesunde Zellpopulation von MDA-MB-231-Zellen lag bei pH 6,7 und pH 7,4 bei über 90 %; jedoch betrug die gesunde Zellpopulation bei pH 6,0, pH 8,4 und pH 9,2 48,7 %, 70,2 % bzw. 55,7 %. Bei einem alkalischen pH-Wert (pH 8,4 und pH 9,2) waren mehr Zellen früh apoptotisch als bei einem sauren pH-Wert (pH 6,0). Bei einem sauren pH-Wert (pH 6,0) waren mehr Zellen spät apoptotisch oder nekrotisch als bei einem alkalischen pH-Wert (pH 8,4 und pH 9,2). Der Zelltodprozess von MDA-MB-231-Zellen wurde beschleunigt, wenn sie sich bei einem extrem sauren pH-Wert (pH 6,0) befanden, verglichen mit einem alkalischen pH-Wert (pH 8,4 und pH 9,2).

2.4. Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf intrazelluläre MDA-MB-231-reaktive Sauerstoffspezies

Apoptose oder Nekrose können durch viele Faktoren induziert werden, wie z. B. ROS-Spiegel, Cytochrom c, Fas und/oder die Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) [30]. Diese Faktoren sind an der Caspase-vermittelten Apoptose beteiligt [31]. ROS sind freie Radikale auf Sauerstoffbasis wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxid ($\cdot O_2^-$), Hydroxylradikal (OH) und Singulett-Sauerstoff (1O_2). Überexprimierte ROS können zum Zelltod führen, indem sie DNA, RNA und Proteine schädigen [32 , 33]. Die ROS-Werte von MDA-MB-231-Zellen bei verschiedenen pH-Werten wurden mit 5-(und-6)-Chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluoresceindiacetat, Acetylerster (CM-H₂DCFDA) und Dihydroethidium (DHE) gemessen. CM-H₂DCFDA kann ROS einschließlich H_2O_2 erkennen und DHE kann intrazelluläres Superoxid erkennen. In [Abbildung 6](#), pH 6,0 induzierte die höchsten intrazellulären ROS-Spiegel in MDA-MB-231-Zellen. Die intrazellulären ROS-Werte in MDA-MB-231-Zellen, die bei pH 8,4 und pH 9,2 inkubiert wurden, waren höher als die von Zellen, die bei pH 6,7 und pH 7,4

inkubiert wurden. MDA-MB-231-Zellen erhöhten unter sauren oder basischen Bedingungen die ROS-Werte, was zu mehr Apoptose und Nekrose führte.



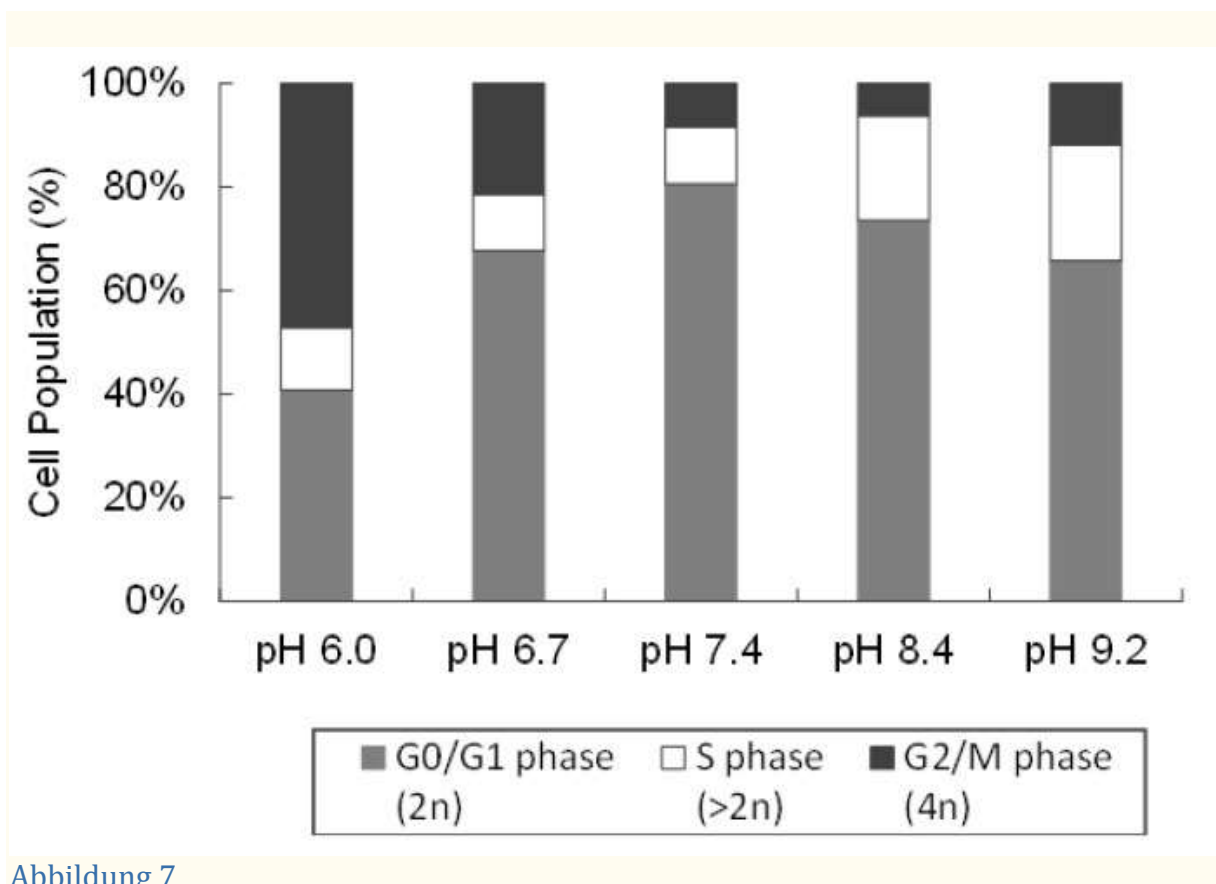
a**b**

[Abbildung 6](#)

Die Wirkung des pH-Werts auf die Konzentration intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in MDA-MB-231-Zellen. MDA-MB-231-Zellen wurden in eine Platte mit 12 Vertiefungen ausgesät und bei fünf verschiedenen pH-Werten von DMEM inkubiert: pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2. (a) Intrazellulärer ROS oder H_2O_2 wird mit CM-H2DCFDA gemessen ($p < 0,05$ (*) vom Kontroll-pH-Wert 7,4). (b) Der Gehalt an intrazellulärem Superoxid wird auch durch DHE ermittelt ($p < 0,05$ (*) vom Kontroll-pH-Wert 7,4).

2.5. Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf den MDA-MB-231-Zellzyklus

Krebs ist eine Krankheit mit unkontrollierter Zellteilung und unangemessener Zellproliferation, die mit dem Zellteilungszyklus verbunden ist. Der Zellzyklus besteht aus fünf Phasen, darunter G0 (Ruhephase), G1 (Lückenphase 1), S (DNA-Synthese), G2 (Lückenphase 2) und M (Mitose) [34]. [Abbildung 7](#) zeigt, dass sich die meisten MDA-MB-231-Zellen in einem Medium mit pH 7,4 in der G0/G1-Phase befanden. Die Zellpopulation in der S-Phase nahm bei einem alkalischen pH-Wert (pH 8,4 und pH 9,2) zu, und die Zellpopulation in der G2/M-Phase nahm bei einem sauren pH-Wert (pH 6,0 und pH 6,7) zu.



[Abbildung 7](#)

Zellzyklusanalyse von MDA-MB-231-Zellen in verschiedenen pH-Werten des Mediums. MDA-MB-231-Zellen wurden in eine Platte mit 12 Vertiefungen ausgesät und fünf Tage lang bei fünf verschiedenen pH-Werten von DMEM – pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2 – inkubiert. Der Zellzyklus (die Verteilung der Zellen in den Phasen G0/G1, S und G2/M) wurde mit einem Durchflusszytometer gemessen, nachdem die DNA mit Propidiumiodid gefärbt wurde.

[Gehe zu:](#)

3. Diskussion

Brustkrebs ist nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen bei Frauen weltweit [[1](#) , [2](#)]. Insbesondere dreifach negativer Brustkrebs ist mit einer aggressiven Histologie, einer schlechten Prognose und einem mangelnden Ansprechen auf die übliche Hormontherapie verbunden, was zu einem kurzen Überleben seiner Patientinnen führt [[35](#)]. Wie viele andere Krebsarten senkt auch dreifach negativer Brustkrebs nachweislich den pH-Wert seiner extrazellulären Umgebung, was möglicherweise seine Invasivität und Metastasierung fördert [[36](#)]. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass der leicht saure pH-Wert der extrazellulären Umgebung von Krebszellen den Übergang vom Endothel zum Mesenchym und die aktive Zellmigration fördert, den Abbau der extrazellulären Matrix induziert und die Angiogenese fördert [[37](#)]. Vor diesem Hintergrund haben einige Studien den Einsatz einer alkalischen Therapie vorgeschlagen, um den pH-Gradienten umzukehren und das Fortschreiten des Krebses zu stoppen [[38](#) , [39](#)]. Es liegen jedoch noch keine abschließenden Daten zur Wirksamkeit dieser Therapie bei der Behandlung von Krebs vor.

Um die Wirksamkeit der alkalischen Therapie zur Krebsbehandlung besser zu verstehen, sollte die Wirkung unterschiedlicher extrazellulärer pH-Werte auf Krebszellen gründlich untersucht werden. In dieser Studie untersuchten wir, wie sich unterschiedliche exogene pH-Werte auf dreifach negative MDA-MB-231-Brustkrebszellen auswirken. Wir haben MDA-MB-231-Zellen in fünf verschiedenen pH-Werten des Mediums kultiviert – pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2 – und dann im Laufe der Zeit ihr Wachstumsprofil, ihren Tod, ihre intrazellulären ROS-Werte, ihren Zellzyklus usw. untersucht extrazelluläre pH-Änderungen.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass extreme extrazelluläre saure Bedingungen (pH 6,0) das Wachstum von MDA-MB-231-Zellen verlangsamen, den intrazellulären ROS auf sehr hohe Werte erhöhen, einen erheblichen Zelltod durch Nekrose und Apoptose verursachen und den Zellzyklus aus der G0/G1-Phase verschieben zur G2/M-Phase. Interessanterweise erhöhen leicht saure Bedingungen (pH 6,7) die Wachstumsrate von MDA-MB-231-Zellen (im Vergleich zu einem physiologischen pH-Wert von 7,4), senken die intrazellulären ROS-Werte, verursachen keinen nennenswerten Zelltod und verschieben den Zellzyklus von G0 /G1-Phase in die G2/M-Phase. Diese Ergebnisse erklären insbesondere, warum Krebszellen dazu neigen, den extrazellulären pH-Wert von 7,4 auf ~6,7–7,1 zu senken; Leicht saure Bedingungen geben den Zellen die Fähigkeit, hohe Überlebens- und Wachstumsraten aufrechtzuerhalten und gleichzeitig ihren Zellzyklus in die G2/M-Phase zu verschieben, um sich zu vermehren und mehr Krebszellen zu produzieren [[9](#) , [10](#)]. Darüber hinaus zeigen einige Studien, dass leicht saure Bedingungen die Krebsmetastasierung fördern und Arzneimittelresistenzen induzieren [[20](#) , [21](#)].

Unsere Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass MDA-MB-231 keine alkalischen Bedingungen begünstigt, da Zellen, die in Medien mit pH 8,4 und pH 9,2 inkubiert wurden, eine langsamere Wachstumsrate, höhere ROS-Werte, einen erhöhten Zelltod und einen leicht verschobenen Zellzyklus vom G0/ G1-Phase zur S-Phase. Diese Ergebnisse stützen andere Studien, die behaupten, dass eine alkalische Behandlung eine potenzielle oder zumindest ergänzende Behandlung von Krebs sein könnte [[24](#) , [26](#) , [38](#) , [39](#) , [40](#) , [41](#)].

Unsere Ergebnisse zeigen auch einen sehr interessanten Aspekt der Wirkung des exogenen pH-Werts auf MDA-MB-231, nämlich den minimalen Einfluss der pH-Historie auf das Krebswachstum. Wenn Zellen eine pH-Änderung von 7,4 auf 9,2 erfuhren, zeigten sie das gleiche Wachstumsprofil wie diejenigen, die einen kontinuierlichen pH-Wert von 9,2 erfahren. Wenn Zellen eine pH-Änderung von 9,2 auf 7,4 erfuhren, zeigten sie in ähnlicher Weise das gleiche Wachstumsprofil wie diejenigen, die nach Tag 1 einen kontinuierlichen pH-Wert von 7,4 aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der aktuelle pH-Wert des Mediums für die Bestimmung des Zellwachstums wichtiger ist als der anfängliche Impfmedium verwendet werden und dass der pH-Verlauf das

nachfolgende Zellwachstum nicht wesentlich beeinflusst. Daher schlagen wir hier vor, dass wir das Wachstum von Krebszellen verzögern oder den Krebs möglicherweise behandeln könnten, wenn wir einen ungünstigen pH-Wert, beispielsweise einen leicht alkalischen pH-Wert, für Krebszellen in vivo kontrollieren oder aufrechterhalten könnten.

[Gehe zu:](#)

4. Materialien und Methoden

4.1. Zellkultur

MDA-MB-231-Zellen (ATCC, Manassas, VA, USA) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oder Rosewell Park Memorial Institute (RPMI-1640)-Medium (Gibco) kultiviert), ergänzt mit 10 % (v/v) fötalem Rinderserum (Gibco), 1 % Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (Gibco). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert .

4.2. pH-konditionierte Medienvorbereitung

Um Medien mit bestimmten pH-Werten (pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2) zu erhalten, wurden Tropfen von 0,1 M HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) oder 0,1 M NaOH (Sigma) hinzugefügt Nach und nach dem Medium zugeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (ORION STAR A211, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) überwacht.

4.3. Zellproliferationsassay und pH-Überwachung

MDA-MB-231-Zellen wurden mit Trypsin (Gibco) aus Gewebekulturflaschen gelöst, in fünf verschiedenen pH-Werten (pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2) von DMEM resuspendiert und dann auf Platten mit 12 Vertiefungen ausgesät bei einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well in 1 ml Medium. Die pH-Werte der verschiedenen DMEM-Lösungen wurden überwacht, indem der pH-Wert der verschiedenen Lösungen 5 Tage lang jeden Tag mit einem pH-Meter (ORION STAR A211, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen wurde. Das Wachstum der MDA-MB-231-Zellen wurde auch durch

tägliches Zählen der Zellen über 5 Tage mit einem Hämozytometer überwacht. Die Zellen wurden mit PBS, das 0,4 % Trypanblau (Gibco) enthielt, resuspendiert, um die Anzahl lebensfähiger Zellen mit einem Hämozytometer zu ermitteln. Die Gesamtzahl der lebensfähigen Zellen wurde bis zu 5 Tage lang jeden Tag ohne Medienwechsel durchgeführt.

4.4. Analyse von Apoptose und Nekrose mittels

Durchflusszytometrie

MDA-MB-231-Zellen wurden 5 Tage lang bei fünf verschiedenen pH-Werten (pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2) von DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit 1 ml PBS gewaschen. Zum Nachweis apoptotischer und nekrotischer MDA-MB-231-Zellen wurden die Zellen durch Zugabe von Propidiumiodid (PI) (2 µl von 1 mg/ml) und Annexin V-FITC zu jeder Probe markiert. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Zellen 5 Minuten lang bei 4 °C und 500 × g zentrifugiert, in 100 µl PBS resuspendiert und dann sofort mit einem BD Accuri C6-Durchflusszytometer analysiert (BD Accuri™ C6-Zytometer, BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Es wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert.

4.5. Messung von Wasserstoffperoxid und Superoxid

MDA-MB-231-Zellen wurden 5 Tage lang bei fünf verschiedenen pH-Werten (pH 6,0, pH 6,7, pH 7,4, pH 8,4 und pH 9,2) von DMEM inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und entweder mit 5 µM 5-(und-6)-Chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluoresceindiacetat, Acetylesther (CM-H₂DCFDA) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), angefärbt zur Messung von H₂O₂ oder 5 µM Dihydroethidium (DHE) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zur Messung von Superoxid. Nach 20 Minuten wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Infinite® 200 Pro-Mikroplattenlesegerät (Tecan Trading AG, Zürich, Schweiz) unter Verwendung eines Lasers entweder für CM-H₂DCFDA ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 488/530$ nm) oder DHE ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 518/605$ nm) gemessen.

4.6. Zellzyklusanalyse mit Durchflusszytometrie

Für die Zellzyklusanalyse wurden bei unterschiedlichen pH-Werten kultivierte MDA-MB-231-Zellen gesammelt, zwei- bis dreimal in PBS gewaschen, 30 Minuten lang bei 4 °C in kaltem 70 %igem Ethanol fixiert, erneut in PBS gewaschen und mit 50 µg/ml gefärbt. ml PI und schließlich mit einem Durchflusszytometer (BD Accuri™ C6 Zytometer, BD Bioscience) unter Verwendung eines Lasers für PI analysiert ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 488/605 \text{ nm}$). Die Zellen wurden mit 50 µL einer 100 µg/ml Ribonuklease behandelt, um sicherzustellen, dass nur DNA und keine RNA gefärbt wurde.

4.7. Statistiken

Jedes Balkendiagramm stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Analyse wurde mithilfe des Student- *t* -Tests durchgeführt, wobei jede Behandlung mit Zellen bei einem pH_{-Wert} von 7,4 verglichen wurde, sofern nicht anders angegeben. In allen statistischen Analysen wurde $p < 0,05$ (*) als signifikant angesehen.

[Gehe zu:](#)

5. Schlussfolgerungen

In dieser Studie untersuchten wir die Wirkung verschiedener exogener pH-Werte auf das Wachstum, das Überleben, die intrazellulären ROS-Werte und den Zellzyklus von dreifach negativen MDA-MB-231-Brustkrebszellen. Unsere Ergebnisse zeigten, dass extrem saure Bedingungen (pH 6,0) und mäßige bis extreme basische Bedingungen (pH 8,4 und pH 9,2) das Zellwachstum verzögerten, den Zelltod durch Nekrose und Apoptose induzierten, die ROS-Werte erhöhten und den Zellzyklus vom G0/ G1-Phase. Allerdings steigerten leicht saure Bedingungen (pH 6,7) das Zellwachstum, senkten die ROS-Werte, verursachten keinen nennenswerten Zelltod und verschiebten den Zellzyklus von der G0/G1-Phase in die G2/M-Phase. Dies scheint tatsächlich zu erklären, warum Krebszellen normalerweise saure Bedingungen gegenüber neutralen bevorzugen. Basierend auf diesen Ergebnissen schlagen wir vor, dass die Kontrolle oder Aufrechterhaltung ungünstiger exogener pH-Werte, wie z. B. eines leicht alkalischen pH-Werts, für Krebszellen in vivo das Wachstum von

Krebszellen verlangsamen oder möglicherweise den Krebs behandeln könnte.

[Gehe zu:](#)

Autorenbeiträge

Konzeptualisierung, SL; Methodik, SL; Validierung, SL; formale Analyse, SL; Untersuchung, SL und AS; Ressourcen, SL; Datenkuration, SL; Schreiben – Originalentwurfsvorbereitung, SL und AS; Schreiben – Überprüfen und Bearbeiten, SL und AS; Visualisierung, SL und AS; Aufsicht, SL; Projektverwaltung, SL; Finanzierungseinwerbung, SL
Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und sind damit einverstanden.

[Gehe zu:](#)

Finanzierung

Diese Veröffentlichung basiert auf Arbeiten, die vom Khalifa University Internal Research Fund (KUIRF) Level I (210079), Level II (8431000009) und der Khalifa University of Science and Technology unter der Auszeichnung Nr. RC2-2018-022 (Healthcare Engineering Innovation) unterstützt werden Center).

[Gehe zu:](#)

Erklärung des Institutional Review Board

Unzutreffend.

[Gehe zu:](#)

Einverständniserklärung

Unzutreffend.

[Gehe zu:](#)

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Daten auf Anfrage erhältlich.

[Gehe zu:](#)

Interessenskonflikte

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

[Gehe zu:](#)

Fußnoten

Anmerkung des Herausgebers: MDPI bleibt in Bezug auf Zuständigkeitsansprüche in veröffentlichten Karten und institutionellen Zugehörigkeiten neutral.

[Gehe zu:](#)

Verweise

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Globale Krebsstatistik 2018: GLOBOCAN-Schätzungen der Inzidenz und Mortalität weltweit für 36 Krebsarten in 185 Ländern. *CA Cancer J. Clin.* 2018; 68 :394–424. doi: 10.3322/caac.21492. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Torre LA, Islami F., Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Globaler Krebs bei Frauen: Belastung und Trends. *Krebs-Epidemiol. Biomark. Vorher.* 2017; 26 :444–457. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0858. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Sharma GN, Dave R., Sanadya J., Sharma P., Sharma KK Verschiedene Arten und Behandlung von Brustkrebs: Ein Überblick. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2010; 1 :109–126. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Francis IM, Altemaimi RA, Al-Ayadhy B., Alath P., Jaragh M., Mothafar FJ, Kapila K. Expression von Hormonrezeptoren und humanem epidermalem Wachstumsfaktor (HER2) in Feinnadelaspiraten von metastasiertem Brustkarzinom – Rolle im Patientenmanagement. *J. Cytol.* 2019; 36 :94–100. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN Brustkrebs-Subtypen basierend auf ER/PR- und Her2-Expression: Vergleich klinisch-pathologischer Merkmale und Überleben. *Klin. Med. Res.* 2009; 7 :4–13. doi: 10.3121/cm.2008.825. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Dreifach negative Brustkrebszelllinien: Ein Instrument bei der Suche nach einer besseren Behandlung von dreifach

negativem Brustkrebs. *Brustdis.* 2010; 32 :35–48. doi: 10.3233/BD-2010-0307. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

7. Butti R., Das S., Gunasekaran VP, Yadav AS, Kumar D., Kundu GC
Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) bei Brustkrebs: Signalübertragung,
therapeutische Implikationen und
Herausforderungen. *Mol. Krebs.* 2018; 17:34 . doi: 10.1186/s12943-018-0797-
x. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

8. Hsu JL, Hung MC Die Rolle von HER2, EGFR und anderen
Rezeptortyrosinkinasen bei Brustkrebs. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35 :575–
588. doi: 10.1007/s10555-016-9649-6. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

9. Persi E., Duran-Frigola M., Damaghi M., Roush WR, Aloy P., Cleveland JL, Gillies
RJ, Ruppin E. Systemanalyse intrazellulärer pH-Schwachstellen für die
Krebstherapie. *Nat. Komm.* 2018; 9 :2997. doi: 10.1038/s41467-018-05261-
x. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

10. Webb BA, Chimenti M., Jacobson MP, Barber DL Dysregulierter pH-Wert: Ein
perfekter Sturm für das Fortschreiten von Krebs. *Nat. Rev. Krebs.* 2011; 11 :671–
677. doi: 10.1038/nrc3110. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

11. White KA, Grillo-Hill BK, Barber DL Verhaltensweisen von Krebszellen, die
durch fehlregulierte pH-Dynamik vermittelt werden, auf einen Blick. *J. Cell
Sci.* 2017; 130 :663–669. doi: 10.1242/jcs.195297. [[Kostenloser PMC-
Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

12. Warburg O. Über Atemstörungen bei
Krebszellen. *Wissenschaft.* 1956; 124 :269–270. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

13. Melkonian EA, Schury MP *StatPearls*. Europa PMC; Treasure Island, FL, USA:
2020. Biochemie, anaerobe Glykolyse. [[Google Scholar](#)]

14. de la Cruz-Lopez KG, Castro-Munoz LJ, Reyes-Hernandez DO, Garcia-Carranca
A., Manzo-Merino J. Laktat in der Regulierung der Tumormikroumgebung und
therapeutische Ansätze. *Vorderseite. Oncol.* 2019; 9 :1143. doi:
10.3389/fonc.2019.01143. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)]
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

15. Swietach P. Was ist pH-Regulierung und warum brauchen Krebszellen
sie? *Krebsmetastasierung Rev.* 2019; 38 :5–15. doi: 10.1007/s10555-018-09778-
x. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

16. Counillon L., Bouret Y., Marchiq I., Pouyssegur J. Na(+)/H(+)-Antiporter
(NHE1) und Laktat/H(+)-Symporter (MCTs) bei der pH-Homöostase und dem
Krebsstoffwechsel. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1863 : 2465–2480. doi:
10.1016/j.bbamcr.2016.02.018. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

17. Koltai T. Das pH-Paradigma am Krankenbett ins Visier nehmen: Ein
praktischer Ansatz. *Int. J. Mol. Wissenschaft.* 2020; 21 :9221. doi:

10.3390/ijms21239221. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)]
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

18. Swietach P., Vaughan-Jones RD, Harris AL, Hulikova A. Die Chemie, Physiologie und Pathologie des pH-Werts bei Krebs. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Wissenschaft.* 2014; 369 :20130099. doi: 10.1098/rstb.2013.0099. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

19. Damaghi M., Wojtkowiak JW, Gillies RJ pH-Erkennung und -Regulierung bei Krebs. *Vorderseite. Physiol.* 2013; 4 :370. doi: 10.3389/fphys.2013.00370. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

20. De Milito A., Fais S. Tumorazidität, Chemoresistenz und Protonenpumpenhemmer. *Zukünftige Onkol.* 2005; 1 :779–786. doi: 10.2217/14796694.1.6.779. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

21. Raghunand N., Martinez-Zaguilan R., Wright SH, Gillies RJ pH-Wert und Arzneimittelresistenz. II. Umsatz saurer Vesikel und Resistenz gegenüber schwach basischen Chemotherapeutika. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57 :1047–1058. doi: 10.1016/S0006-2952(99)00021-0. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

22. Rofstad EK, Mathiesen B., Kindem K., Galappathi K. Saurer extrazellulärer pH-Wert fördert die experimentelle Metastasierung menschlicher Melanomzellen in athymischen Nacktmäusen. *Krebs Res.* 2006; 66 :6699–6707. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0983. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

23. Buckner CA, Lafrenie RM, Denomme JA, Caswell JM, Want DA Einsatz von Komplementär- und Alternativmedizin bei Patienten vor und nach einer Krebsdiagnose. *Curr. Oncol.* 2018; 25 :e275–e281. doi: 10.3747/co.25.3884. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

24. Silva AS, Yunes JA, Gillies RJ, Gatenby RA Die mögliche Rolle systemischer Puffer bei der Reduzierung des intratumoralen extrazellulären pH-Werts und der säurevermittelten Invasion. *Krebs Res.* 2009; 69 :2677–2684. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2394. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

25. Yang M., Zhong X., Yuan Y. Funktioniert Backpulver als Wundermittel für Krebspatienten? Eine kleine Rezension. *Integr. Krebs Ther.* 2020; 19 :1534735420922579. doi: 10.1177/1534735420922579. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

26. Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Doseescu J., Sloane BF, Hashim AI, Morse DL, Raghunand N., Gatenby RA, et al. Bikarbonat erhöht den pH-Wert des Tumors und hemmt spontane Metastasen. *Krebs Res.* 2009; 69 :2260–

2268. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5575. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Michl J., Park KC, Swietach P. Evidenzbasierte Richtlinien zur Kontrolle des pH-Werts in Kultursystemen mit lebenden Säugetierzellen. *Komm. Biol.* 2019; 2 :144. doi: 10.1038/s42003-019-0393-7. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Lee SH, Meng XW, Flatten KS, Loegering DA, Kaufmann SH Die Phosphatidylserin-Exposition während der Apoptose spiegelt den bidirektionalen Transport zwischen Plasmamembran und Zytoplasma wider. *Zelltod ist unterschiedlich.* 2013; 20 :64–76. doi: 10.1038/cdd.2012.93. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Kirchhoff C., Cypionka H. Propidiumionen gelangen während der Lebend-Tot-Färbung in lebensfähige Zellen mit hohem Membranpotential. *J. Mikrobiol. Methoden.* 2017; 142 :79–82. doi: 10.1016/j.mimet.2017.09.011. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG TNFalpha und reaktive Sauerstoffspezies beim nekrotischen Zelltod. *Zellauflösung* 2008; 18 :343–349. doi: 10.1038/cr.2008.31. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Bell RAV, Megeney LA Evolution des Caspase-vermittelten Zelltods und der Zelldifferenzierung: Zwillinge werden bei der Geburt getrennt. *Zelltod ist unterschiedlich.* 2017; 24 :1359–1368. doi: 10.1038/cdd.2017.37. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates DA Aktivierung von Apoptose-Signalwegen durch reaktive Sauerstoffspezies. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1863 : 2977–2992. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Chen K., Lu P., Beeraka NM, Sukocheva OA, Madhunapantula SV, Liu J., Sinelnikov MY, Nikolenko VN, Bulygin KV, Mikhaleva LM, et al. Mitochondriale Mutationen und Mitoepigenetik: Schwerpunkt auf der Regulierung oxidativer Stress-induzierter Reaktionen bei Brustkrebs. *Semin. Krebsbiol.* 2020 doi: 10.1016/j.semcancer.2020.09.012. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Collins K., Jacks T., Pavletich NP Der Zellzyklus und Krebs. *Proz. Natl. Acad. Wissenschaft. USA.* 1997; 94 :2776–2778. doi: 10.1073/pnas.94.7.2776. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Scott LC, Mobley LR, Kuo TM, Il'yasova D. Update zu den Unterschieden bei dreifach negativem Brustkrebs in den Vereinigten Staaten: Eine bevölkerungsbasierte Studie aus der Datenbank der United States Cancer Statistics, 2010 bis 2014. *Krebs.* 2019; 125 :3412–3417. doi: 10.1002/cncr.32207. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

36. Montcourrier P., Silver I., Farnoud R., Bird I., Rochefort H. Brustkrebszellen haben eine hohe Fähigkeit, das extrazelluläre Milieu durch einen dualen Mechanismus anzusäuern. *Klin. Exp. Metastasierung*. 1997; 15 :382–392. doi: 10.1023/A:1018446104071. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Thews O., Riemann A. Tumor-pH und Metastasierung: Ein bösartiger Prozess jenseits von Hypoxie. *Krebsmetastasierung Rev.* 2019; 38 :113–129. doi: 10.1007/s10555-018-09777-y. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
38. Estrella V., Chen T., Lloyd M., Wojtkowiak J., Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A., Bailey K., Balagurunathan Y., Rothberg JM, Sloane BF, et al. Die durch die Mikroumgebung des Tumors erzeugte Säure treibt die lokale Invasion voran. *Krebs Res.* 2013; 73 :1524–1535. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Raghunand N., He Br. *J. Krebs.* 1999; 80 :1005–1011. doi: 10.1038/sj.bjc.6690455. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Ibrahim-Hashim A., Cornnell HH, Abrahams D., Lloyd M., Bui M., Gillies RJ, Gatenby RA Systemische Puffer hemmen die Karzinogenese bei TRAMP-Mäusen. *J. Urol.* 2012; 188 :624–631. doi: 10.1016/j.juro.2012.03.113. [[Kostenloser PMC-Artikel](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Raghunand N., Mahoney B., van Sluis R., Baggett B., Gillies RJ Akute metabolische Alkalose verstärkt die Reaktion von C3H-Mäuse-Brusttumoren auf die schwache Base Mitoxantron. *Neoplasie.* 2001; 3 :227–235. doi: