

Государственное
бюджетное учреждение
здравоохранения «Санкт-
Петербургский клинический
научно-практический
центр специализированных
видов медицинской помощи
(онкологический)»

им. Н.П. Напалкова»
(Санкт-Петербург, Россия)

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ IN VIVO И ВЛИЯНИЕ ОЩЕЛАЧИВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ГИДРОКАРБОНАТА НАТРИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И МЕТАБОЛИЗМ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК СТ26

А.А. Богданов, А.А. Богданов, Л.С. Ляпунова, В.С. Бурдаков,
Н.А. Верлов, В.М. Моисеенко

ANTITUMOR EFFECT IN VIVO AND THE IMPACT OF ALKALIZATION USING SODIUM BICARBONATE ON VIABILITY AND METABOLISM OF CT26 TUMOR CELLS

А.А. Богданов

Кандидат физико-математических наук,
заместитель директора по научной работе
ГБУЗ «СПбКНнЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова»,
197758, Санкт-Петербург, Песочный, ул. Ленинградская, д. 68а, Лит.А.
Orcid: 0000-0002-7887-4635.

А.А. Богданов

научный сотрудник «СПбКНнЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова».
Orcid: 0000-0002-0824-6633.

Л.С. Ляпунова

Младший научный сотрудник ГБУЗ «СПбКНнЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова».

В.С. Бурдаков

Научный сотрудник ГБУЗ «СПбКНнЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова».

Н.А. Верлов

Ведущий научный сотрудник ГБУЗ «СПбКНнЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова».

В.М. Моисеенко

Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор,
директор СПбКНнЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова».
Orcid: 0000-0003-4807-7915.

А.А. Bogdanov

PhD, Deputy director for science, St. Petersburg Clinical Research and Practical Center
of Specialized Types for Medical Care (Oncological) named after N.P. Napalkov,
197758, Saint Petersburg, Pesochny, Leningradskaya str., 68A, lit. A, 68A.
Orcid: 0000-0002-7887-4635.

А.А. Bogdanov

Researcher, St. Petersburg Clinical Research and Practical Center of Specialized Types
for Medical Care (Oncological) named after N.P. Napalkov.
Orcid: 0000-0002-0824-6633.

L.S. Lyapunova

Junior Researcher, St. Petersburg Clinical Research and Practical Center of Specialized Types
for Medical Care (Oncological) named after N.P. Napalkov.

V.S. Burdakov

Researcher, St. Petersburg Clinical Research and Practical Center of Specialized Types for
Medical Care (Oncological) named after N.P. Napalkov.

N.A. Verlov

Leading Researcher, St. Petersburg Clinical Research and Practical Center of Specialized
Types for Medical Care (Oncological) named after N.P. Napalkov.

V.M. Moiseyenko

Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, DSc, PhD, MD, Director,
St. Petersburg Clinical Research and Practical Center of Specialized Types for Medical Care
(Oncological) named after N.P. Napalkov.
Orcid: 0000-0003-4807-7915.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-15-00297,
<https://rscf.ru/project/24-15-00297/>.

В данной статье рассматривается влияние ощелачивания с помощью гидрокарбоната натрия на выживаемость и рост опухолевых клеток, что имеет важное значение для терапии рака. Исследования подтверждают, что закисленное микроокружение опухоли является критическим фактором в прогрессировании рака, способствуя инвазии и метастазированию, а также подавляя иммунные реакции.

В рамках экспериментов *in vivo* на животных с перевитой аденокарциномой толстой кишки мыши CT26 было установлено, что парентеральное введение 4% раствора гидрокарбоната натрия приводит к системному ощелачиванию и, хоть и не увеличивает медиану выживаемости по сравнению с контрольной группой, но может приводить к торможению и даже к регрессу опухолевого процесса у некоторых животных. В то же время пероральное применение гидрокарбоната натрия не приводит к системному ощелачиванию и не оказывает такого влияния.

Исследования *in vitro* показали, что применение гидрокарбоната натрия приводит к снижению пролиферации клеток и увеличению цитотоксичности. Ощелачивание среды, предположительно, активирует аутофагию, а также достоверно снижает миграционный потенциал опухолевых клеток. Эти изменения в метаболизме клеток могут ослабить их адаптацию к кислой среде и улучшить эффективность стандартных методов лечения.

Полученные результаты подчеркивают потенциал ощелачивающей терапии как дополнения к традиционным методам лечения рака. Дальнейшие исследования в этой области могут привести к более глубокому пониманию молекулярных и клеточных механизмов, связанных с ощелачиванием, и открытию новых направлений в разработке эффективных терапевтических стратегий для борьбы с онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: *Закисленность опухоли, ощелачивающая терапия, гидрокарбонат натрия, цитотоксичность, антипролиферативный эффект, изменение метаболизма опухолевых клеток.*

In this article, the impact of alkalization using sodium bicarbonate on the survival and growth of tumor cells is examined, which is of significant importance for cancer therapy. The studies confirm that the acidic tumor microenvironment is a critical factor in cancer progression, facilitating invasion and metastasis while also suppressing immune responses.

In vivo experiments on animals with transplanted colon adenocarcinoma CT26 revealed that parenteral administration of a 4% sodium bicarbonate solution leads to systemic alkalization. Although it does not increase the median survival compared to the control group, it can result in the inhibition and even regression of tumor growth in some animals. In contrast, oral administration of sodium bicarbonate does not lead to systemic alkalization and does not exert such effects.

In vitro studies demonstrated that the application of sodium bicarbonate results in reduced cell proliferation and increased cytotoxicity. Alkalization of the medium presumably activates autophagy and significantly decreases the migratory potential of tumor cells. These metabolic changes may weaken their adaptation to the acidic environment and enhance the effectiveness of standard treatment methods.

The results obtained highlight the potential of alkalizing therapy as an adjunct to traditional cancer treatment methods. Further research in this area may lead to a deeper understanding of the molecular and cellular mechanisms associated with alkalization and open new avenues for developing effective therapeutic strategies against oncological diseases.

Key words: *Tumor acidosis, Alkalizing therapy, Sodium bicarbonate, Cytotoxicity, Antiproliferative effect, Change in tumor cell metabolism.*

Введение

Закисленное микроокружение опухоли является критически важным фактором в прогрессировании рака. На этот фактор влияют несколько взаимосвязанных механизмов [1–4]. Раковые клетки демонстрируют повышенную метаболическую активность, особенно через аэробный гликолиз (эффект Варбурга), что приводит к накоплению кислых метаболитов, таких как молочная кислота. Кислая среда оказывает влияние на различные аспекты биологии опухоли, способствуя локальной инвазии и увеличивая подвижность раковых клеток через ремоделирование тканей [5]. Кроме того, низкий уровень pH может подавлять иммунные реакции, что позволяет опухолям избегать обнаружения и уничтожения со стороны иммунных клеток [6]. Хроническое воздействие кислой среды может вызывать геномные мутации и нестабильность, что способствует дальнейшему прогрессированию рака [7]. Также кислота разрушает внеклеточный матрикс за счет активации

протеолитических ферментов, что облегчает инвазию опухоли и метастазирование [8].

Закисленное микроокружение опухоли создает положительную обратную связь, способствующую канцерогенезу и отбору специфических клеточных фенотипов, способных выживать в этих условиях. Ацидоз признан одной из ключевых химических характеристик опухолевого микроокружения, и адаптация раковых клеток к ацидозу предоставляет им конкурентное преимущество по отношению к организму [9]. Ощелачивающую терапию рака, направленную на нейтрализацию или подщелачивание кислого микроокружения опухоли с помощью перорального или парентерального введения алкализующих агентов, можно эффективно сочетать со стандартными методами противоопухолевой терапии, причем этот метод обладает значительным потенциалом [9–12].

В наших исследованиях было показано, что однократная изолированная перфузия 4% раство-

ром гидрокарбоната натрия конечности крысы с трансплантатом лимфосаркомы Плисса приводит к увеличению медианы выживаемости животных до 17 дней с момента перевивки опухоли по сравнению с 13 днями для животных, не получавших перфузию или получавших перфузию физиологическим раствором хлорида натрия [13]. Также мы показали, что однократная интраперитонеальная перфузия мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха 1% раствором гидрокарбоната натрия приводит к увеличению медианы выживаемости животных до 30 дней с момента перевивки опухоли по сравнению с 18 днями для животных, получивших перфузию физиологическим раствором хлорида натрия и 14 днями у животных, не получивших перфузии [14]. Также нами был описан клинический случай успешной терапии путем серии интраперитонеальных перфузий 1% раствором гидрокарбоната натрия у пациентки с распространенным раком яичников, канцероматозом и злокачественным асцитом, резистентной к предыдущим линиям химиотерапии. Успех терапии заключался в значимом снижении уровня онкомаркера СА-125 и исчезновении асцита [14].

В то же время на текущий момент в литературе нет данных о системном парентеральном введении гидрокарбоната натрия или других ощелачивающих агентов с целью влияния на развитие опухолевого процесса. В настоящей работе мы провели такое исследование на животных, используя модель перевивной аденокарциномы толстой кишки мыши СТ26. Также мы выполнили оценку влияния защелачивания среды гидрокарбонатом натрия на жизнеспособность клеток СТ26 *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования *in vivo*

Использовали самцов лабораторных мышей Balb/c в возрасте 6–8 недель (масса 20–22 г), полученных из одного питомника. На момент начала эксперимента все животные были клинически здоровы и прошли осмотр ветеринарного врача. Мыши содержались в одинаковых условиях вивария: в клетках по 7–8 особей, с двенадцатичасовым циклом день-ночь, при температуре 22°C и получали стандартный рацион питания.

В день 0 эксперимента каждому животному подкожно в правое заднее бедро вводили $5 \cdot 10^5$ жизнеспособных клеток аденокарциномы толстой кишки мыши СТ26, содержащихся в 100 мкл 1х фосфатно-солевого буфера. После этого животные были рандомизированы на 4 группы. Контрольная группа состояла из интактных животных ($n=7$), а группы рН– ($n=8$) и рН+ ($n=8$) с седьмого дня эксперимента получали по 5 внутривенных введений с интервалом в 2 дня: 0,2 мл 2,78% (0,476 М) раствора хлорида натрия или 0,2 мл 4% (0,476 М) раствора гидрокарбоната натрия соответственно. Концентрация раствора хлорида

натрия была выбрана с учетом равенства теоретической осмолярности раствору гидрокарбоната натрия. Животные группы рН+ ($n=8$) с седьмого дня эксперимента на протяжении 10 дней безальтернативно получали 1% (0,119 М) раствор гидрокарбоната натрия вместо питьевой воды. Такая концентрация была выбрана, исходя из максимально переносимой для удовлетворения жажды.

Измерение рН мочи проводили с использованием рН-метра рНep+ (Hanna, Германия) и тест-полосок рН-indicator strips рН 5.0 – 10.0 (Merck Millipore, Германия). Все исследования на лабораторных животных проводились на базе Ресурсного центра ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ. Содержание животных и манипуляции с ними соответствовали российским и международным нормативным актам, регулирующим работу с лабораторными животными, а также правилам биоэтики.

Исследования *in vitro*

Для экспериментов использовали клетки аденокарциномы толстой кишки мыши СТ26 (собственная коллекция, первоначальный источник – Ресурсный центр ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия или Servicebio, КНР) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (BioWest, Франция или Gibco, Великобритания) и 40 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) в инкубаторе с увлажненной средой и содержанием 5% CO₂ при температуре 37°C. Стандартная концентрация гидрокарбоната натрия в среде RPMI-1640 составляет 0,024 М; ее защелачивание осуществляли путем добавления гидрокарбоната натрия до необходимой концентрации.

Для определения жизнеспособности клеток, путей клеточной гибели (апоптоз/некроз) и образования лизосом в условиях защелачивания среды клетки рассеивали за 2 дня до начала эксперимента по 100 000 клеток на лунку в двадцатичетырехлуночной планшете (SPL, Южная Корея). В экспериментах по определению рН клеточной среды, концентраций метаболитов и тесту восстановления монослоя в условиях защелачивания среды клетки рассеивали за сутки до начала эксперимента по 250 000 клеток на лунку. После этого клетки продолжали культивирование в указанных условиях.

В день начала эксперимента производили замену культуральной среды на стандартную свежую или с повышенным содержанием гидрокарбоната натрия. Если условия эксперимента это требовали, осуществляли замену среды на свежую с соответствующими концентрациями гидрокарбоната натрия.

Жизнеспособность клеток и пути клеточной гибели определяли методом проточной цитометрии на цитометре Longcyte (Challenbio, КНР). Количество живых клеток вычисляли по формуле: общее число событий, деленное на объем пробы и умноженное

на процент живых клеток, не окрашенных йодистым пропидием (PI). Оценку путей клеточной гибели проводили с использованием набора для обнаружения апоптоза Annexin V-FITC/PI (Servicebio, Китай) согласно инструкции производителя. Образование лизосом оценивали с помощью специфического к лизосомам красителя LumiTracker Lyso Green (Lumiprobe, Россия) согласно инструкции производителя. Результаты проточной цитометрии анализировали при помощи программы FlowJo X 10.0.7r2 (BD Biosciences, США).

Определение pH культуральной среды проводили непрямой методом на основе изменения спектральных свойств индикатора pH – фенолового красного. Спектры поглощения фенолового красного при низком и высоком pH отличаются максимумами на длинах волн 435 нм и 560 нм соответственно. Соотношение поглощений при этих длинах волн использовали для создания калибровочной кривой титрования и расчета pH культуральной среды. Измерения оптической плотности проводили на многофункциональном планшетном анализаторе EnSpire Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, США) и спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Определение концентраций метаболитов осуществляли с использованием биохимического анализатора M-1000 Bioprocess Biochemistry Analyzer (Siemanbio, Китай). Подсчет жизнеспособных клеток в этих случаях проводили на счетчике клеток Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея). Тест восстановления монослы выполняли на системе визуализации клеточных культур EVOS FL Auto (Thermo Fisher Scientific, США), оборудованной CO₂ инкубатором. Результаты анализировали с помощью свободно распространяемой программы ImageJ.

Все измерения проводили не менее чем для трех биологических повторов. Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли с использованием указанных выше программ или программ Excel (Microsoft Corporation, США) и OriginLab (OriginLab Corporation, США).

Результаты

Исследование применения раствора гидрокарбоната натрия у животных с перевитой аденокарциномой толстой кишки мыши СТ26

Мы провели исследование перорального и парентерального применения раствора гидрокарбоната натрия у мышей с перевивной моделью аденокарциномы толстой кишки СТ26. У всех животных во время терапии контролировали pH мочи. Среднее по времени значение pH мочи в группах Контроль и pH+ составило $5,0 \pm 0,2$. Значение pH мочи в группах pH- и pH+ до введения используемого раствора также составило $5,0 \pm 0,2$. При этом значение pH мочи в группе pH- через 4 и 8 часов после введения используемого раствора не изменилось, в то время как в группе pH+ через 4 и 8 часов после введения составило $8,7 \pm 0,2$. Таким образом, только парентеральное введение раствора гидрокарбоната натрия привело к системному ощелачиванию в условиях нашего эксперимента.

Кривые выживаемости животных представлены на рисунке 1(а). Статистический анализ показал, что медианы выживаемости составили в группах Контроль, pH-, pH+ и pH+п значения $29,0 \pm 1,3$, $30,0 \pm 0,9$, $30,0 \pm 2,8$, $30,0 \pm 0,7$ соответственно, и статистически не отличаются. Графики изменения объема опухолевого узла представлены на рисунке 1(б). Видно, что в группе pH+ по всей выборке животных наблюдается

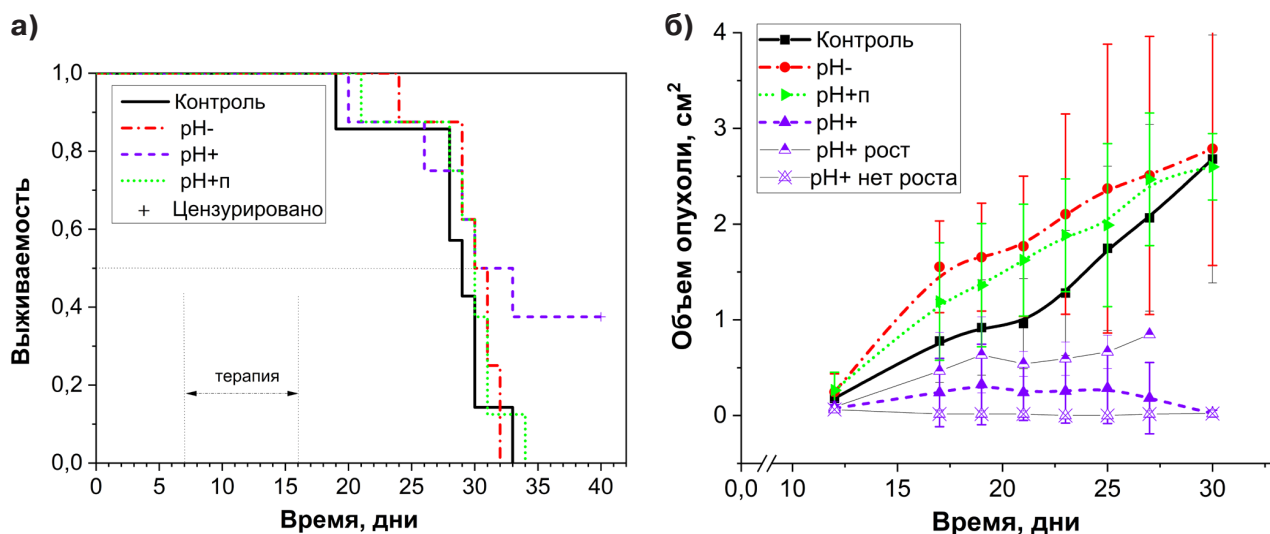


Рис. 1. Графики выживаемости (а) и изменения объема опухолевого узла (б) у животных с перевитой аденокарциномой толстой кишки мыши СТ26, получавших пероральное или парентеральное введение раствора гидрокарбоната натрия. Группы: Контроль – интактная; pH- – внутрибрюшинное введение раствора хлорида натрия; pH+ – внутрибрюшинное введение раствора гидрокарбоната натрия; pH+p – пероральное применение раствора гидрокарбоната натрия в качестве источника щелочи. Период терапии указан на рисунке. Для группы pH+ по всей выборке животных наблюдается достоверное отличие объема опухолевого узла по сравнению с остальными группами ($p < 0,05$, двухвыборочный t-тест).

достоверное замедление роста опухолевого узла по сравнению с остальными группами ($p < 0,05$). Однако этот результат складывается из совокупности данных для 4 животных, которые не отреагировали на терапию (на рисунке 1(а) эта группа обозначена как pH+ рост), и для 4 животных, у которых наблюдали тотальное торможение роста опухоли (на рисунке 1(а) эта группа обозначена как pH+ нет роста). Одно из животных в подгруппе pH+ рост, у которого после тридцатых суток наблюдался минимальный опухолевый узел, в итоге погибло на тридцать третьи сутки эксперимента, однако 3 остальных животных, у которых сформировавшийся узел не пальпировался и полностью исчез, были выведены из эксперимента на сороковой день без признаков опухолевого процесса. Полученные результаты свидетельствуют, что в условиях нашего эксперимента мы не наблюдали влияния перорального применения раствора гидрокарбоната натрия на рост модельной опухоли СТ26 и выживаемость животных. В то же время парентеральное, внутрибрюшинное введение раствора гидрокарбоната натрия может приводить к замедлению роста/регрессу опухоли, а также к увеличению выживаемости по крайней мере для некоторых животных.

Исследование воздействия гидрокарбоната натрия на опухолевые клетки аденокарциномой толстой кишки мыши СТ26 *in vitro*

На рисунке 2(а) представлены относительные количества живых клеток СТ26 по сравнению с контрольным значением на начальный момент времени для различных концентраций гидрокарбоната натрия в процессе культивирования. Концентрация NaHCO_3 , равная 0,024 М, соответствует условиям стандартной культуральной среды RPMI 1640. Она была использована в качестве контрольной. Из полученных данных видно, что с увеличением концентрации гидрокарбоната натрия наблюдается снижение пролиферации клеток и/или увеличение токсичности. При этом для концентраций NaHCO_3 выше 0,95 М не фиксируется увеличение количества клеток.

На рисунке 2(б) представлено процентное распределение клеток, окрашенных маркерами клеточной гибели: PI, Аннексин V-FITC и комбинация Аннексин V-FITC/PI, которые соответствуют некрозу, раннему апоптозу и позднему апоптозу/некрозу. Результаты показывают, что количество некротических клеток для всех исследованных концентраций и временных точек не превышает 1% и не отличается от контроля. В то же время в случае повышенных концентраций NaHCO_3 наблюдается увеличение процента клеток в состоянии раннего апоптоза и позднего апоптоза/некроза.

На рисунке 3 представлены данные об изменении pH культуральной среды в зависимости от увеличения концентрации гидрокарбоната натрия, а также в процессе культивирования клеток СТ26. Как и ожидалось,

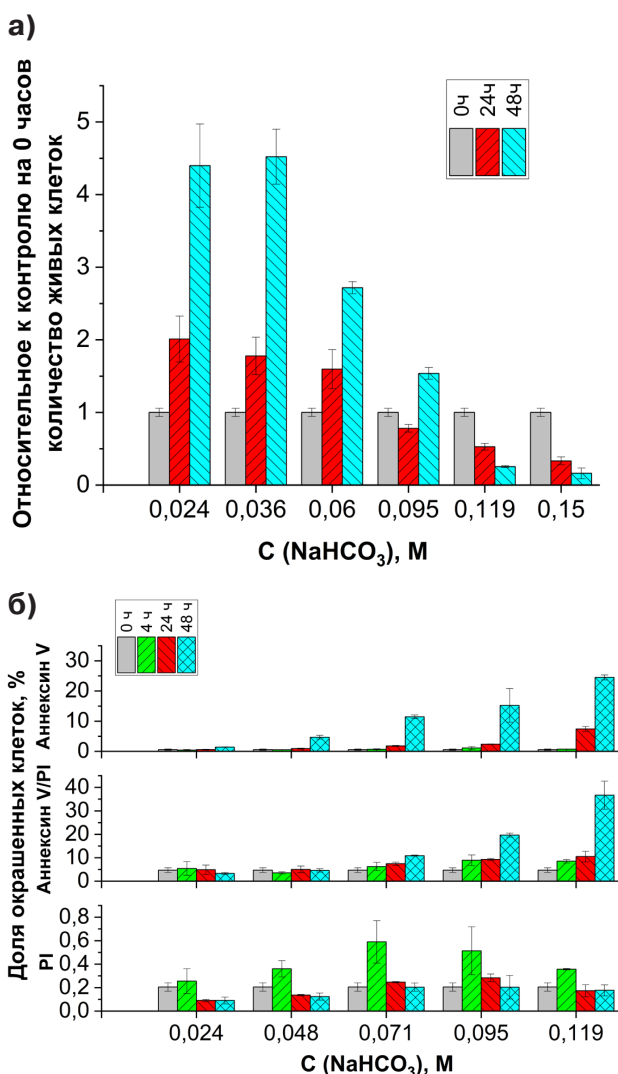


Рис. 2. Полученные методом проточной цитометрии зависимости: (а) относительного количества живых клеток СТ26; (б) процентного распределения окраски маркерами типа клеточной гибели в пробах (ранний апоптоз – окраска Аннексин V-FITC, поздний апоптоз/некроз – окраска Аннексин V-FITC/PI, некроз – окраска PI) от использованных концентраций NaHCO_3 для указанных на рисунке моментов времени. По отношению к контролю изменения достоверны, $p < 0,01$, двухвыборочный t-тест: (а) – для всех отличающихся значений; (б) – окраска Аннексин V-FITC – для всех концентраций NaHCO_3 для 48 часов, для концентрации NaHCO_3 0,119 М для 24 часов, окраска Аннексин V-FITC/PI – для концентраций NaHCO_3 0,071–0,119 М для 48 часов, 0,095–0,119 – для 24 часов.

наблюдается пропорциональное увеличение значений pH с ростом концентрации NaHCO_3 . Однако как для контрольной группы, так и для образцов с повышенной концентрацией гидрокарбоната натрия со временем фиксируется снижение pH – закисление среды клетками. Важно отметить, что если культуральная среда не обновлялась, изменения pH были минимальны в промежутках между 24–48 часами и 48–72 часами культивирования. В случае замены культуральной среды на свежую с такой же концентрацией гидрокарбоната натрия закисление клетками

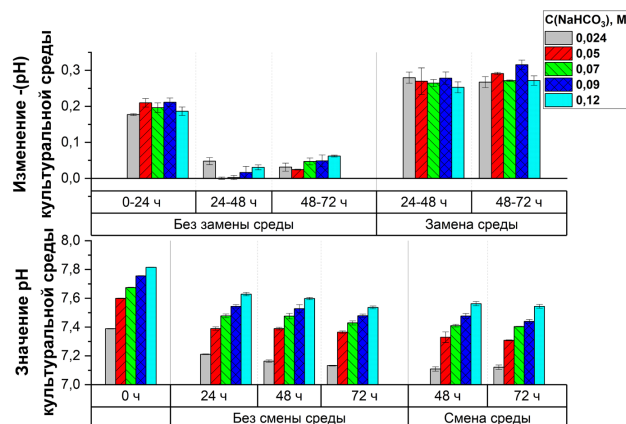


Рис. 3. Временные зависимости рН культуральной среды (нижний график) с клетками СТ26 и рассчитанного сдвига рН культуральной среды (верхний график) для указанных использованных концентраций NaHCO_3 . По отношению к контролю изменения значения рН достоверны, $p < 0,01$, двухвыборочный t-тест.

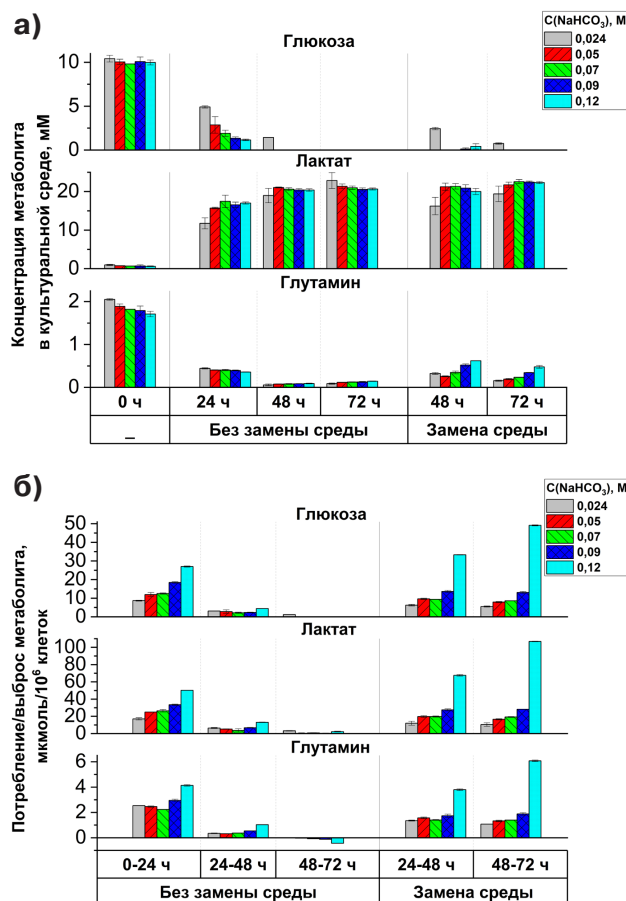


Рис. 4. Временные зависимости концентрации метаболитов в культуральной среде с клетками СТ26:

(а) – рассчитанного потребления/выброса метаболитов клетками; (б) – для указанных использованных концентраций NaHCO_3 в условиях без замены или с заменой культуральной среды через 24 и 48 часов культивирования. По отношению к контролю на 0 часов изменения концентраций метаболитов достоверны, $p < 0,01$, двухвыборочный t-тест.

среды продолжалось, уменьшая ее рН по сравнению с рН свежей среды.

На рисунке 4(а) представлены данные о динамике изменения концентрации метаболитов в культуральной среде в зависимости от увеличения концентрации гидрокарбоната натрия, а также в процессе культивирования клеток СТ26. Результаты наблюдений показывают, что со временем концентрации глюкозы и глутамин уменьшаются, в то время как уровень молочной кислоты (лактата) возрастает. В условиях, когда не происходит замена культуральной среды, к

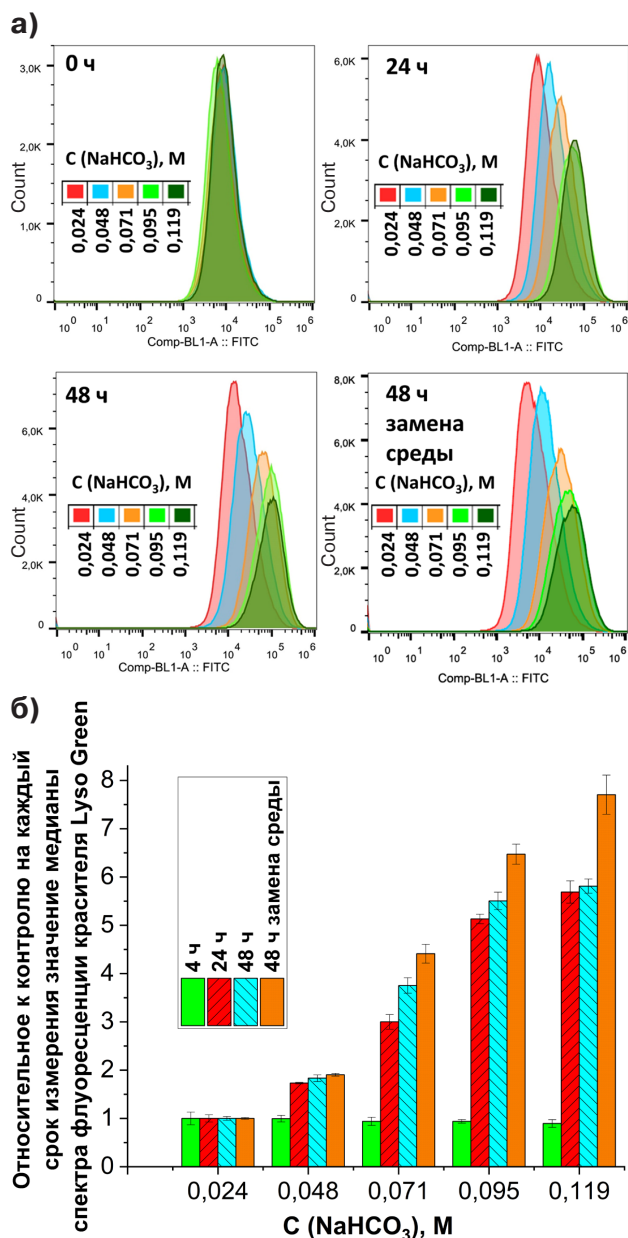


Рис. 5. (а) – пример гистограмм флуоресценции красителя Lyso Green в клетках СТ26; (б) – пример относительного к контролю на каждый срок измерения значения медианы спектра флуоресценции красителя Lyso Green от использованных концентраций NaHCO_3 в культуральной среде для указанных на рисунке моментов времени. По отношению к контролю изменения достоверны, $p < 0,01$, двухвыборочный t-тест.

48 часам концентрация глюкозы при повышенном содержании гидрокарбоната натрия достигает нуля. На рисунке 4(б) представлены рассчитанные значения потребления и выброса клетками метаболитов. Данные показывают, что клетки СТ26 увеличивают потребление глюкозы и глутамина, а также производство лактата пропорционально увеличению концентрации NaHCO_3 .

На рисунке 5 отображены изменения флуоресценции красителя Lyso Green, специфичного для лизосом. Наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции, что отражается в сдвиге гистограмм флуоресценции вправо и в увеличении медианы интенсивности флуоресценции с ростом концентрации NaHCO_3 и продолжительности культивирования.

На рисунке 6 представлены данные, полученные в ходе теста восстановления монослоя клеток СТ26.

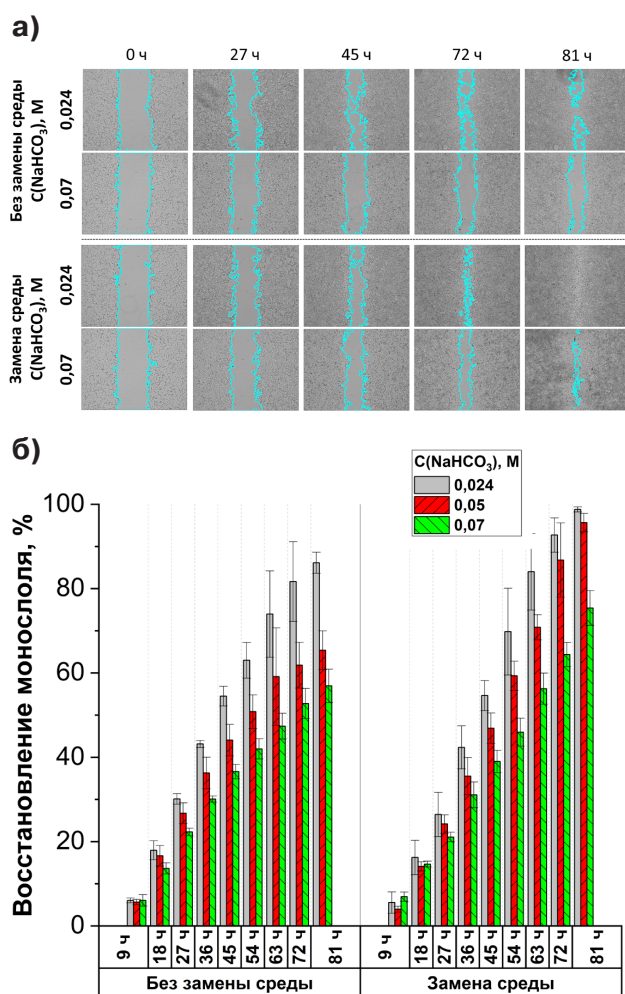


Рис. 6. (а) – пример микроскопических изображений клеток СТ26 в тесте восстановления монослоя (объектив 20х) в разные моменты времени; (б) – результаты обработки результатов теста восстановления монослоя для указанных использованных концентраций NaHCO_3 в условиях без замены культуральной среды или с ее заменой через каждые 24 часа культивирования. По отношению к контролю изменения достоверны для концентрации NaHCO_3 0,07 М, $p < 0,01$, двухвыборочный t-тест.

Результаты наблюдений показывают, что увеличение концентрации гидрокарбоната натрия в культуральной среде приводит к замедлению процесса восстановления монослоя: царапина зарастает медленнее.

Обсуждение

Полученные нами результаты *in vivo* свидетельствуют о том, что в условиях нашего эксперимента пероральное применение раствора гидрокарбоната натрия не приводит к системному ощелачиванию, а также не способствует увеличению выживаемости и замедлению роста модельной опухоли СТ26 у животных. Напротив, парентеральное введение гидрокарбоната натрия вызывает системное ощелачивание и, хотя медиана выживаемости не изменяется, может приводить к замедлению роста опухоли и способствует ее элиминации. Это отражается на выживаемости животных, отреагировавших на данное лечение (рис. 1).

Анализ выживаемости клеток СТ26 *in vitro* показывает, что применение гидрокарбоната натрия вызывает защелачивание среды и приводит к снижению пролиферации и увеличению гибели опухолевых клеток, преимущественно через механизм апоптоза (рис. 2 и рис. 3). При этом наблюдается истощение глюкозы и глутамина, а также увеличение концентрации лактата в культуральной среде, что коррелирует с повышенными концентрациями гидрокарбоната натрия. Это указывает на еще большую активацию гликолитической активности клеток СТ26, что в свою очередь приводит к закислению среды (рис. 3 и рис. 4). Мы также наблюдаем увеличение сигнала флуоресценции красителя, специфичного для лизосом (рис. 5). Можно сделать обоснованное предположение о том, что защелачивание культуральной среды, приводя к увеличению гликолиза и истощению питательных веществ, активирует процессы аутофагии.

Результаты теста восстановления монослоя свидетельствуют о том, что увеличение концентрации гидрокарбоната натрия приводит к снижению миграционной активности клеток СТ26 в процессе культивирования (рис. 6).

Полученные нами результаты хорошо согласуются с немногочисленными исследованиями других авторов по данной тематике, имеющимися на сегодняшний день [9]. В частности, было показано, что ощелачивание внеклеточной среды приводит к увеличению внутриклеточного pH опухолевых клеток, что делает внутриклеточную среду еще более щелочной по сравнению с внеклеточной и может способствовать гибели опухолевых клеток. Сверхощелачивание внутриклеточного пространства снижает градиент pH и мембранный потенциал, что нарушает окислительное фосфорилирование и приводит к повышению уровня аденозинмонофосфата (АМФ). АМФ активирует аутофагию через АМФ-активируемую протеинкиназу, однако этот процесс может блокироваться высоким

внутриклеточным рН и снижением окислительного фосфорилирования. Гидрокарбонат натрия также вызывает повреждение митохондрий, что может приводить к прямому цитотоксическому эффекту только за счет изменений во внутриклеточной среде [15].

Концепция алкалптоза, нового типа клеточной гибели, согласуется с этим механизмом. Химически индуцированный алкалптоз – это форма клеточной гибели, вызванная внутриклеточной алкализацией, которая не требует активации традиционных каспаз и других эффекторов [16, 17]. Внутриклеточная алкализация с использованием гидрокарбоната натрия приводит к клеточной гибели, аналогичной химически индуцированному алкалптозу, однако без активации предшествующих биохимических реакций. Это указывает на то, что наблюдаемые противоопухолевые и цитотоксические/антипролиферативные эффекты применения гидрокарбоната натрия могут быть результатом прямого цитотоксического действия, вызванного индукцией этого типа регулируемой клеточной гибели.

Гидрокарбонат натрия или алкализация также снижают ацидоз, индуцированный молочной кислотой, и приводят к лактозису, то есть избытку не самой молочной кислоты, а ее солей (таких, как лактат натрия, калия и пр.). Это нарушает функциональность пары лактат-протон и снижает транспорт молочной кислоты через транспортеры, что может увеличить гликолитическую активность раковых клеток и привести к истощению глюкозы в опухоли. В конечном итоге это способствует гибели злокачественных клеток [18, 19].

Таким образом, ощелачивание с помощью гидрокарбоната натрия может оказывать противоопухолевый эффект через изменение метаболизма опухолевых клеток и индукцию регулируемой клеточной гибели.

Список литературы

1. Богданов А., Богданов А. А., Моисеенко В. Алкализация опухолевого микроокружения: есть ли перспективы в качестве мишени терапии? // Практическая онкология. – 2022. – Т. 23, № 3. – С. 143–159.
2. Богданов А.А., Богданов А.А. Кислотно-основное состояние в регуляции опухолевого роста: значение для клинициста // Практическая онкология. – 2021. – Т. 22, № 3. – С. 193–203.
3. Bogdanov A., Bogdanov A., Chubenko V., Volkov N., Moiseenko F., Moiseyenko V. Tumor acidity: From hallmark of cancer to target of treatment // Front Oncol. – 2022. – Т. 12. – С. 979154.
4. Corbet C., Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat // Nature Reviews Cancer. – 2017. – Т. 17, № 10. – С. 577–593.
5. Estrella V., Chen T., Lloyd M., Wojtkowiak J., Cornnell H.H., Ibrahim-Hashim A., Bailey K., Balagurunathan Y., Rothberg J.M., Sloane B.F., Johnson J., Gatenby R.A., Gillies R.J. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion // Cancer Res. – 2013. – Т. 73, № 5. – С. 1524–35.
6. Boedtker E., Pedersen S.F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer // Annu Rev Physiol. – 2020. – Т. 82. – С. 103–126.
7. Andreucci E., Peppicelli S., Ruzzolini J., Bianchini F., Biagioni A., Papucci L., Magnelli L., Mazzanti B., Stecca B., Calorini L. The acidic tumor microenvironment drives a stem-like phenotype in melanoma cells // J Mol Med (Berl). – 2020. – Т. 98, № 10. – С. 1431–1446.
8. Kato Y., Ozawa S., Miyamoto C., Maebata Y., Suzuki A., Maeda T., Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer // Cancer Cell Int. – 2013. – Т. 13, № 1. – С. 89.
9. Богданов А.А., Богданов А.А., Моисеенко В.М. Ощелачивающая терапия в лечении рака // Практическая онкология. – 2024. – Т. 25, № 3. – С. 272–280.

Заключение

В ходе настоящего исследования мы продемонстрировали, что ощелачивание с помощью гидрокарбоната натрия способно существенно влиять на рост модельной опухоли и выживаемость животных. Полученные результаты подчеркивают важность кислотно-щелочного баланса в патогенезе рака, где закисленное микроокружение способствует прогрессированию опухолей и снижению эффективности стандартных методов лечения.

Мы показали замедление роста опухоли, включая полный регресс у части экспериментальных животных с перевитой аденокарциномой толстой кишки мыши СТ26 после парентерального применения раствора гидрокарбоната натрия. Исследования на клетках СТ26 подтвердили, что применение гидрокарбоната натрия приводит к снижению пролиферации клеток и обладает цитотоксичностью.

Кроме того, ощелачивание среды способствует изменению метаболического состояния опухолевых клеток, включая, предположительно, активацию аутофагии, что может ослабить их адаптивность и снизить инвазивность. Наблюдаемое замедление миграции клеток в условиях ощелачивания также указывает на возможность изменения таким образом микросреды опухоли, что может повысить эффективность стандартных методов лечения.

Эти результаты подчеркивают необходимость дальнейших исследований в области применения ощелачивающей терапии как дополнения к традиционным методам лечения рака. Глубокое понимание молекулярных и клеточных механизмов, связанных с ощелачиванием, может открыть новые горизонты для разработки более целенаправленных и эффективных терапевтических стратегий в борьбе с онкологическими заболеваниями.

10. Alfarouk K.O., Muddathir A.K., Shayoub M.E.A. Tumor Acidity as Evolutionary Spite // *Cancers*. – 2011. – Т. 3, № 1. – С. 408–414.
11. Blaszczyk W., Swietach P. What do cellular responses to acidity tell us about cancer? // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2021. – Т. 40, № 4. – С. 1159–1176.
12. Isowa M., Hamaguchi R., Narui R., Morikawa H., Okamoto T., Wada H. Potential of Alkalinization Therapy for the Management of Metastatic Pancreatic Cancer: A Retrospective Study // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Т. 16, № 1.
13. Богданов А.А., Егоренков В.В., Волков Н.М., Моисеенко Ф.В., Молчанов М.С., Верлов Н.А., Гулина Л.С., Моисеенко В.М. Противоопухолевая эффективность перфузии изолированной нижней конечности раствором с повышенным рН на крысиной модели перевивной опухоли лимфосаркомы Плисса // *Альманах клинической медицины*. – 2021. – Т. 49, № 8. – С. 541–549.
14. Bogdanov A., Verlov N., Bogdanov A., Burdakov V., Semiletov V., Egorenkov V., Volkov N., Moiseyenko V. Tumor alkalization therapy: misconception or good therapeutics perspective? – the case of malignant ascites // *Frontiers in Oncology*. – 2024. – Т. 14.
15. Ying C., Jin C., Zeng S., Chao M., Hu X. Alkalinization of cellular pH leads to cancer cell death by disrupting autophagy and mitochondrial function // *Oncogene*. – 2022. – Т. 41, № 31. – С. 3886–3897.
16. Liu J., Kuang F., Kang R., Tang D. Alkalptosis: a new weapon for cancer therapy // *Cancer Gene Therapy*. – 2020. – Т. 27, № 5. – С. 267–269.
17. Song X., Zhu S., Xie Y., Liu J., Sun L., Zeng D., Wang P., Ma X., Kroemer G., Bartlett D.L., Billiar T.R., Lotze M.T., Zeh H.J., Kang R., Tang D. JTC801 Induces pH-dependent Death Specifically in Cancer Cells and Slows Growth of Tumors in Mice // *Gastroenterology*. – 2018. – Т. 154, № 5. – С. 1480–1493.
18. Hu X., Chao M., Wu H. Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2017. – Т. 2, № 1. – С. 16047.
19. Xie J., Wu H., Dai C., Pan Q., Ding Z., Hu D., Ji B., Luo Y., Hu X. Beyond Warburg effect – dual metabolic nature of cancer cells // *Scientific Reports*. – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 4927.

References

1. [Bogdanov A., Bogdanov An., Moiseyenko V. Alkalinization of the tumor microenvironment: are there prospects as a therapeutic objective? *Practical Oncology*. 2022; 23(3): 143-59 (In Russ)].
2. [Bogdanov A., Bogdanov An. Acid-base balance in the regulation of tumor growth: value for the clinicians. *Practical Oncology*. 2021; 22(3): 193-203 (In Russ)].
3. Bogdanov A., Bogdanov A., Chubenko V., Volkov N., Moiseenko F., Moiseyenko V. Tumor acidity: From hallmark of cancer to target of treatment. *Front Oncol*. 2022; 12: 979154.
4. Corbet C., Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17(10): 577-93.
5. Estrella V., Chen T., Lloyd M., Wojtkowiak J., Cormell H.H., Ibrahim-Hashim A., et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res*. 2013; 73(5): 1524-35.
6. Boedtker E., Pedersen S.F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu Rev Physiol*. 2020; 82: 103-26.
7. Andreucci E., Peppicelli S., Ruzzolini J., Bianchini F., Biagioni A., Papucci L., et al. The acidic tumor microenvironment drives a stem-like phenotype in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)*. 2020; 98(10): 1431-46.
8. Kato Y., Ozawa S., Miyamoto C., Maebata Y., Suzuki A., Maeda T., et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int*. 2013; 13(1): 89.
9. [Bogdanov A., Bogdanov An., Moiseyenko V. Alkalinization therapy in cancer treatment. *Practical Oncology*. 2024; 25(3): 272-80 (In Russ)].
10. Alfarouk K.O., Muddathir A.K., Shayoub M.E.A. Tumor Acidity as Evolutionary Spite. *Cancers*. 2011; 3(1): 408-14.
11. Blaszczyk W., Swietach P. What do cellular responses to acidity tell us about cancer? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2021; 40(4): 1159-76.
12. Isowa M., Hamaguchi R., Narui R., Morikawa H., Okamoto T., Wada H. Potential of Alkalinization Therapy for the Management of Metastatic Pancreatic Cancer: A Retrospective Study. *Cancers (Basel)*. 2023; 16(1).
13. [Bogdanov A.A., Egorenkov V.V., Volkov N.M., Moiseenko F.V., Molchanov M.S., Verlov N.A., et al. Antitumor efficacy of an isolated hind legperfusion with a pH-increased solution in the Pliss' lymphosarcoma graft rat model. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021; 49(8): 541-9 (In Russ)].
14. Bogdanov A., Verlov N., Bogdanov A., Burdakov V., Semiletov V., Egorenkov V., et al. Tumor alkalization therapy: misconception or good therapeutics perspective? – the case of malignant ascites. *Front Oncol*. 2024; 14.
15. Ying C., Jin C., Zeng S., Chao M., Hu X. Alkalinization of cellular pH leads to cancer cell death by disrupting autophagy and mitochondrial function. *Oncogene*. 2022; 41(31): 3886-97.
16. Liu J., Kuang F., Kang R., Tang D. Alkalptosis: a new weapon for cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*. 2020; 27(5): 267-9.
17. Song X., Zhu S., Xie Y., Liu J., Sun L., Zeng D., et al. JTC801 Induces pH-dependent Death Specifically in Cancer Cells and Slows Growth of Tumors in Mice. *Gastroenterology*. 2018; 154(5): 1480-93.
18. Hu X., Chao M., Wu H. Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017; 2(1): 16047.
19. Xie J., Wu H., Dai C., Pan Q., Ding Z., Hu D., et al. Beyond Warburg effect – dual metabolic nature of cancer cells. *Scientific Reports*. 2014; 4(1): 4927.