

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

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИДРОКАРБОНАТА НАТРИЯ

*им. Н.П. Напалкова»,
Российская Федерация
(Санкт-Петербург)*

А.А. Богданов, Ан.А. Богданов, К.А. Митусова, В.М. Моисеенко

DOSE-DEPENDENT INHIBITION OF TUMOR SPHEROID GROWTH BY SODIUM BICARBONATE

А.А. Богданов

Кандидат физико-математических наук, заместитель директора по научной работе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) им. Н.П. Напалкова» 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., д. 68А.

ORCID: 0000-0002-7887-4635.

Ан.А. Богданов

*Старший научный сотрудник.
ORCID: 0000-0002-0824-6633.*

К.А. Митусова

*Кандидат физико-математических наук, научный сотрудник.
ORCID: 0000-0002-3820-4899*

В.М. Моисеенко

Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) им. Н.П. Напалкова».
ORCID: 0000-0003-4807-7915.

A.A. 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.
ORCID: 0000-0002-7887-4635.

An.A. Bogdanov

*Senior Researcher
ORCID: 0000-0002-0824-6633.*

K.A. Mitusova

*PhD, Researcher
ORCID: 0000-0002-3820-4899*

V.M. Moiseenko

Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, DSc, MD, Professor, 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.

Метаболизм злокачественных клеток, измененный по сравнению с нормальными клетками, приводит к закислению микроокружения солидных опухолей, создавая среду, способствующую их ускоренному развитию и агрессивности. Стратегии нейтрализации/ощелачивания микроокружения опухоли буферными агентами, такими как гидрокарбонат натрия, являются перспективным направлением метаболической терапии рака. При этом данные исследований такого

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

воздействия *in vitro* немногочисленны и выполнены на монослое клеток. Опухолевые сфероиды представляют собой трехмерные клеточные модели, которые лучше воспроизводят свойства солидных опухолей в эксперименте. В настоящей работе мы исследовали воздействие различных концентраций гидрокарбоната натрия на рост, жизнеспособность и метаболическую активность сфероидов, сформированных из клеток аденокарциномы толстой кишки мыши СТ26, карциномы молочной железы мыши 4Т1 и меланомы человека. Повышение концентрации гидрокарбоната натрия в культуральной среде вызывало дозозависимое подавление роста сфероидов всех типов. Одновременно возрастало потребление глюкозы и продукция молочной кислоты (лактата), что указывает на развитие декомпенсированного метаболического стресса. Универсальность выявленного эффекта, подтвержденная на сфероиде из трех различных опухолевых клеточных линий, подтверждает потенциал ощелачивающей терапии в лечении рака.

Ключевые слова: гидрокарбонат натрия, опухолевые сфероиды, гликолиз, метаболический стресс, ощелачивающая терапия, СТ26, 4Т1, меланома.

The altered metabolism of malignant cells compared to normal cells leads to acidification of the tumor microenvironment in solid tumors, creating conditions that promote their accelerated growth and aggressiveness. Strategies to neutralize or alkalinize the tumor microenvironment using buffering agents such as sodium bicarbonate represent a promising approach in cancer metabolic therapy. However, *in vitro* data on such effects are limited and have mainly been conducted on cell monolayers. Tumor spheroids are three-dimensional cellular models that more accurately recapitulate the properties of solid tumors in experimental settings. In the present study, we examined the effects of various sodium bicarbonate concentrations on the growth, viability, and metabolic activity of spheroids formed from mouse CT26 colon adenocarcinoma cells, mouse 4T1 breast carcinoma cells, and human melanoma cells. Increasing sodium bicarbonate concentration in the culture medium induced a dose-dependent suppression of spheroid growth across all tumor types. Simultaneously, glucose consumption and lactic acid (lactate) production increased, indicating the onset of uncompensated metabolic stress. The universality of this observed effect across spheroids derived from three distinct tumor cell lines underscores the potential of alkalinizing therapy for cancer treatment.

Key words: sodium bicarbonate, tumor spheroids, glycolysis, metabolic stress, alkalinizing therapy, CT26, 4T1, melanoma.

Введение

Опухолевое микроокружение характеризуется сложным балансом pH, который играет ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации, инвазии и метастазировании. В большинстве солидных опухолей наблюдается внеклеточный ацидоз, вызванный эффектом Варбурга и, соответственно, накоплением молочной кислоты, что способствует прогрессированию опухоли и ее резистентности к терапии [1]. В свою очередь, повышение внеклеточного pH может приводить к цитостатическому и цитотоксическому эффекту, нарушая метаболизм опухолевых клеток [2, 3]. Стратегия применения ощелачивающих агентов, в частности гидрокарбоната натрия (NaHCO_3), в последнее время рассматривается как перспективная возможность дополнения к стандартным видам терапии злокачественных опухолей. Существует большое количество доклинических подтверждений и достаточный набор клинических доказательств того, что пероральное или парентеральное применение гидрокарбоната натрия замедляет метастазирование, усиливает эффективность химиотерапии и иммунотерапии [4, 5].

Механизмы, обуславливающие *in vivo* противоопухолевые эффекты ощелачивания, изучены слабо. Например, прямое воздействие повышенных концентраций гидрокарбоната натрия было исследовано только на нескольких клеточных культурах в монослое [2, 3]. Использование в таких экспериментах клеточных сфероидов, представляющих физиоло-

гически релевантную модель по сравнению с монослоем клеточных культур, вызывает закономерный интерес ученых, поскольку сфероиды воспроизводят градиенты кислорода, питательных веществ и pH, а также зоны пролиферации, покоя и некроза злокачественного новообразования в организме человека [6]. В настоящей работе мы оценили влияние различных концентраций гидрокарбоната натрия на рост, жизнеспособность и метаболическую активность опухолевых сфероидов, сформированных из клеточных линий аденокарциномы толстой кишки мыши СТ26, карциномы молочной железы мыши 4Т1 и меланомы человека.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы 3 опухолевые клеточные линии: аденокарцинома толстой кишки мыши СТ26, карцинома молочной железы мыши 4Т1 и клеточная линия меланомы человека, полученная от пациента (собственная коллекция). Клетки СТ26 и 4Т1 культивировали в среде RPMI-1640 (БиолюТ, Россия), а меланомы – в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С. Культуральные среды содержали 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Великобритания) и 50 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия).

Сфероиды формировали в 96-луночных планшетах с низкой адгезией (Sarstedt, Германия), осуществляя посев 1000 клеток на лунку в объеме среды

100 мкл. На следующий день после посева в лунки добавляли по 100 мкл свежей среды. На третий день после посева культуральную среду полностью заменяли на среду с повышенными концентрациями NaHCO_3 или базовыми в качестве контроля (0,024 М для RPMI-1640 и 0,028 М для DMEM/F12). Планшет помещали в автоматическую станцию микроскопии JuLI Stage automated live-cell imaging system (NanoEntek, Южная Корея), находящуюся в CO_2 -инкубаторе, и осуществляли регулярное наблюдение за сфероидом. Далее культуральную среду обновляли каждые 48 часов. Для оценки жизнеспособности клеток через 160 часов культивирования применяли двухцветное окрашивание флуоресцентными красителями: Hoechst 33342 в концентрации 0,2 мг/мл и йодидом пропидия (PI) в концентрации 0,1 мг/мл. В различных регионах сфероидом проводили полуколичественную оценку жизнеспособных и мертвых клеток.

Обработку изображений клеточных сфероидов производили в программе ImageJ software (США), находящейся в свободном доступе. Объем сфероидов определяли по формуле $V=a \cdot b \cdot b/2$, где a – больший диаметральный размер сфероидом, b – меньший диаметральный размер сфероидом. Средний диаметр сфероидов и некротического ядра сфероидов определялся $D=(a \cdot b)^{0.5}$.

Метаболическую активность оценивали по потреблению глюкозы и продукции лактата в культуральной среде через 24 ч после начала эксперимента. Концентрации метаболитов определяли спектрофотометрически на планшетном спектрофотометре Multiskan FC (ThermoFisher, США) с использованием коммерческих наборов «Глюкоза-8» и «Молочная кислота» (Ольвекс Диагностикум, Россия) согласно инструкции производителя.

Также спектрофотометрически определяли рН культуральной среды путем анализа изменений спектральных свойств фенолсульфоталеина, содержащегося в культуральных средах. Фенолсульфоталеин проявляет характерные максимумы поглощения при длинах волн 435 нм, 450 нм и 560 нм, положение и интенсивность которых зависят от рН среды. Соотношения оптической плотности при этих длинах волн использовали для построения калибровочного графика титрования и последующего расчета точного значения рН культуральной среды. Для калибровки рН среды измеряли напрямую с помощью рН-метра

AB33PH-F со стеклянным электродом ST310 (Ohaus, США). Показания оптической плотности получали с использованием спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия).

Построение графиков и статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы OriginPro2019b (OriginLab Corporation, США). При сравнении опытных групп по отношению к контрольной группе использовали двухвыборочный t-тест. Уровень достоверности принимали равным 0,05.

Результаты

В таблице 1 представлены результаты изменения рН культуральной среды – RPMI-1640 (для сфероидов СТ26 и 4Т1) и DMEM/F12 (для сфероидов меланомы человека), которые логично показывают увеличение рН пропорционально увеличению концентрации NaHCO_3 . При этом через 24 часа культивирования рН снизился во всех образцах сфероидов, что может быть связано с накоплением в среде продукта гликолиза – молочной кислоты.

Как видно из рисунка 1, увеличение концентрации NaHCO_3 в культуральной среде приводит к увеличению потребления глюкозы и выработки лактата, что может быть связано с метаболической перестройкой опухолевых клеток в попытке противостоять внеклеточной алкализации.

На рисунке 2 представлены данные о влиянии повышения концентрации NaHCO_3 в культуральной среде на рост опухолевых сфероидов. Видно, что алкализация приводит к достоверному снижению скорости роста для сфероидов из всех типов клеток. На рисунке 3 представлены результаты исследования по оценке жизнеспособности сфероидов (синий цвет, окрашивание Hoechst 33342, живые клетки; красный цвет, окрашивание PI, мертвые клетки). Обработка флуоресцентных изображений показала, что с увеличением концентрации NaHCO_3 в культуральной среде диаметр некротического ядра у сфероидов остается таким же или уменьшается по сравнению с контролем, при этом происходит достоверное уменьшение толщины пролиферирующего слоя. Полученные результаты, взятые в совокупности, свидетельствуют о цитотоксическом/цитостатическом действии алкализации на сфероиды из используемых опухолевых клеток.

Таблица 1.

Значения рН культуральной среды

C(NaHCO_3), М	СТ26		4Т1		Меланома	
	0 ч	24 ч	0 ч	24 ч	0 ч	24 ч
0,06	7,59±0,02	7,39±0,02	7,59±0,02	7,35±0,02	7,63±0,02	7,47±0,01
0,08	7,67±0,02	7,45±0,02	7,67±0,02	7,30±0,01	7,67±0,01	7,53±0,01
0,0119	7,82±0,02	7,63±0,02	7,82±0,02	7,51±0,01	7,86±0,02	7,68±0,02

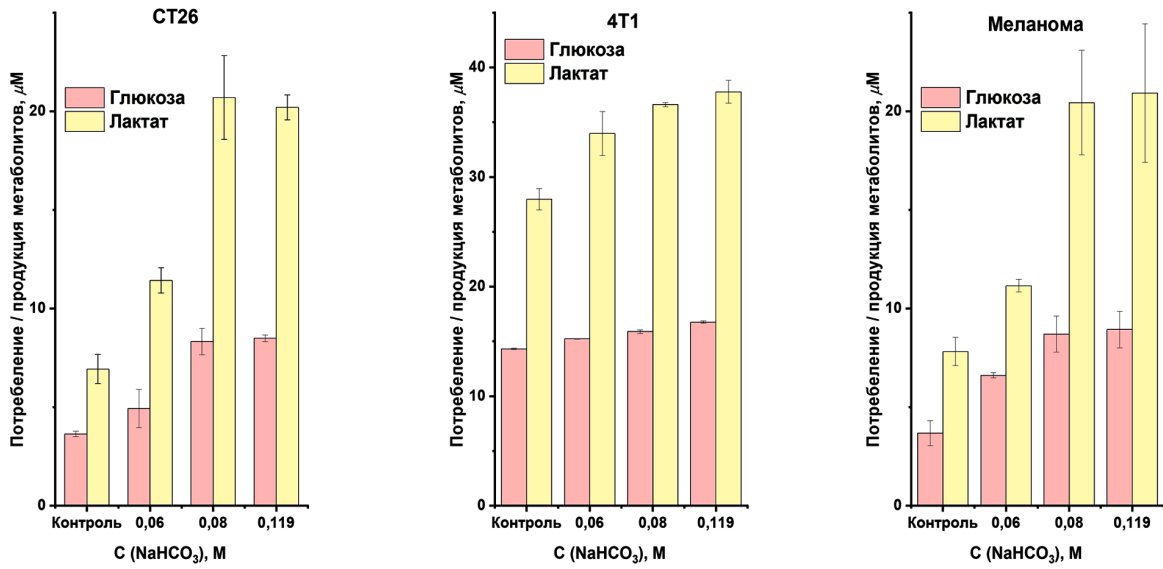


Рис. 1. Зависимость потребления глюкозы и выработки лактата сфероидами из клеток СТ26, 4Т1 и меланомы человека от концентрации гидрокарбоната натрия в культуральной среде через 24 часа культивирования. Контроль: 0,024М – сфероиды СТ26 и 4Т1, 0,028М – сфероиды меланомы. По отношению к контролю изменения достоверны, $p < 0,05$, двухвыборочный *t*-тест.

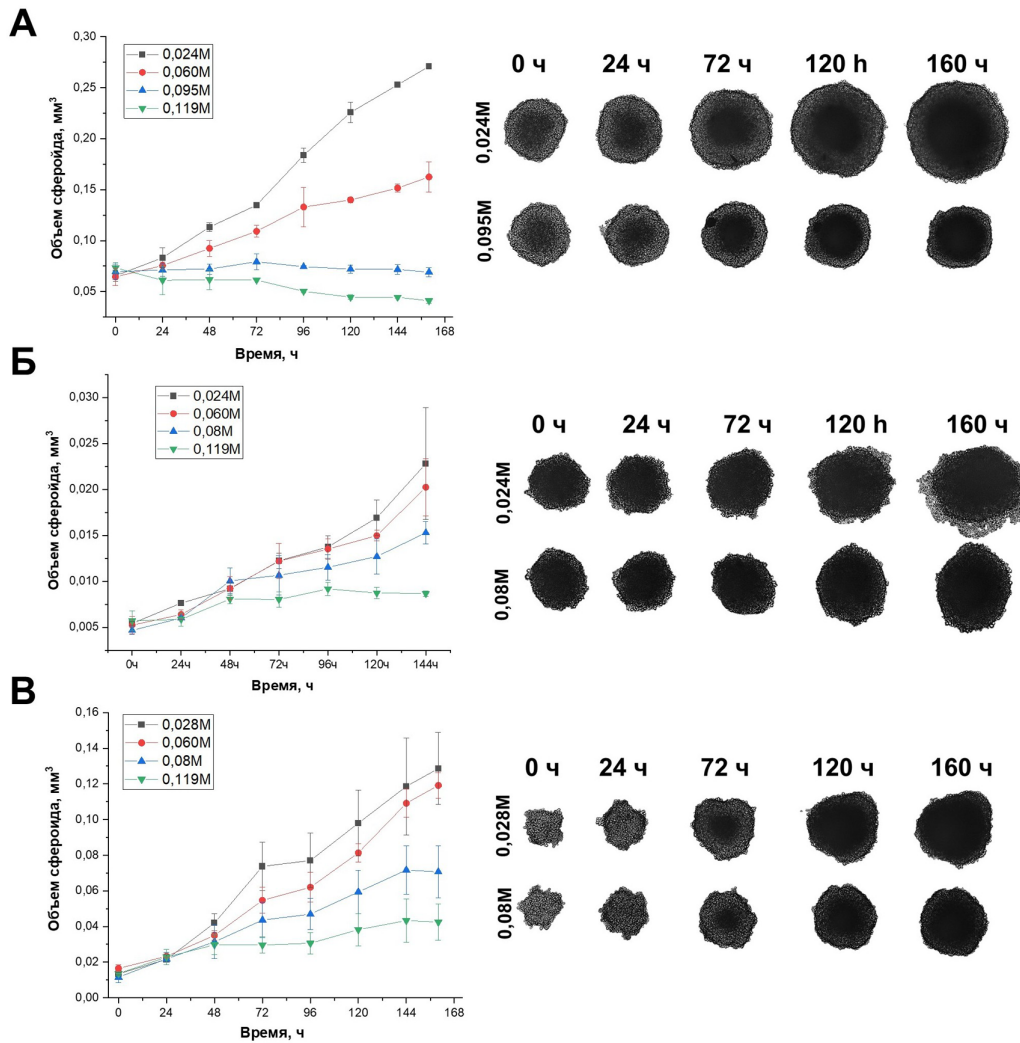


Рис. 2. Зависимость изменений объема сфероидов из клеток СТ26 (А), 4Т1 (Б) и меланомы человека (В), инкубированных с разными концентрациями гидрокарбоната натрия, от времени. По отношению к контролю изменения достоверны, $p < 0,05$, двухвыборочный *t*-тест.

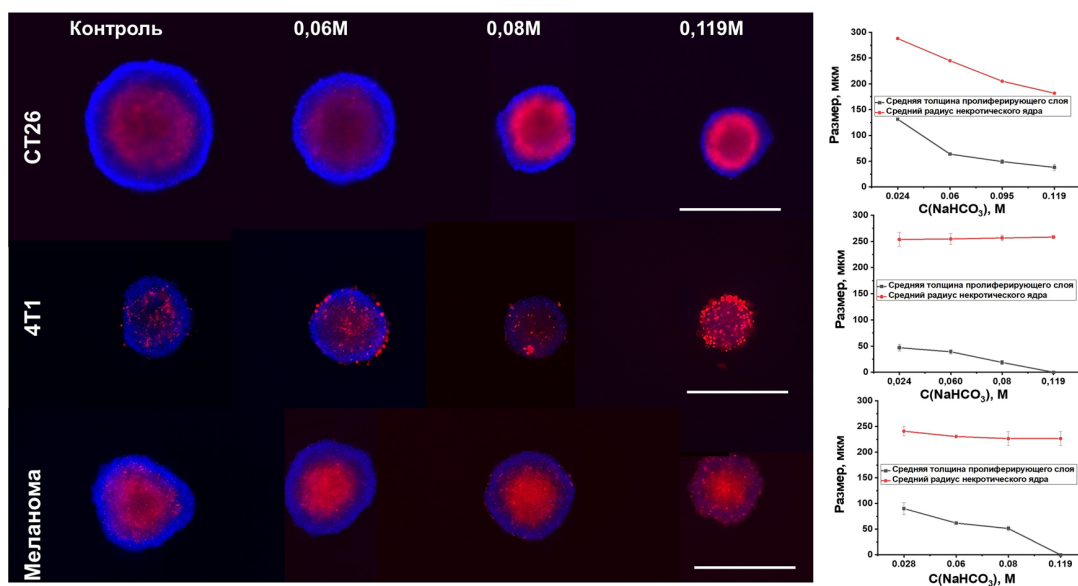


Рис. 3. Флуоресцентные изображения клеточных сфероидов через 160 ч инкубации с разными концентрациями гидрокарбоната натрия (масштабный отрезок соответствует длине 500 мкм) и результаты их обработки. По отношению к контролю изменения пролиферирующего слоя достоверны для концентраций гидрокарбоната натрия 0,08 и 0,119 М, $p < 0,05$, двухвыборочный t -тест.

Обсуждение

Данные о влиянии ощелачивания среды на рост трехмерных клеточных опухолевых моделей, впервые полученные нами, свидетельствуют о том, что повышение концентрации гидрокарбоната натрия приводит к дозозависимому подавлению роста опухолевых сфероидов независимо от их тканевого и видового происхождения. Полученный эффект цитотоксичности гидрокарбоната натрия соответствует результатам ранее опубликованных исследований *in vitro* на клеточном монослое, включающих линии гепатоцеллюлярной карциномы SK-HEP-1, рака яичников A2780 и SKOV3, аденокарциномы толстой кишки CT26. Эти результаты недвусмысленно свидетельствуют о том, что повышение концентраций гидрокарбоната натрия приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток [2, 3, 7]. Воспроизводимость этих эффектов в различных типах опухолей подчеркивает роль модуляции pH в нарушении критически важных клеточных процессов. При этом в нашей работе мы наблюдали увеличение потребления глюкозы и синтеза лактата в условиях ощелачивания, что свидетельствует об усилении гликолитической активности. Данные коррелируют с результатами, полученными ранее для клеточного монослоя CT26 [2]. Такой эффект происходит, вероятно, с целью компенсации уменьшения

концентрации протонов внутри клеток, поскольку ощелачивание внеклеточного пространства приводит и к ощелачиванию цитозоля [3]. Таким образом, применение гидрокарбоната натрия вызывает метаболический сдвиг в опухолевых клетках, что вместе с возможным запуском таких процессов как аутофагия [2, 3] и/или алкалиптоз [8, 9] приводит к несомненным цитотоксическим и/или цитостатическим эффектам.

Заключение

Впервые на модели трехмерных клеточных опухолевых объектов было показано, что повышение концентрации гидрокарбоната натрия в культуральной среде приводит к дозозависимому подавлению их роста: к деструкции структуры и к метаболическому стрессу сфероидов, выращенных из клеток аденокарциномы толстой кишки мыши CT26, карциномы молочной железы мыши 4T1 и меланомы человека. При этом происходит активация гликолиза с одновременным угнетением слоя пролиферации, что указывает на критические нарушения энергетического баланса, вероятно, связанного с поддержанием гомеостаза pH. Полученные данные подтверждают потенциальную перспективность ощелачивающей терапии в онкологии и обосновывают необходимость дальнейших исследований *in vivo*.

Список литературы

1. Bogdanov A.A., Bogdanov A.A., Chubenko V.A., Volkov N.M., Moiseenko F.V., Moiseyenko V.M. Tumor acidity: From hallmark of cancer to target of treatment // Front Oncol. – 2022. – Vol. 12. – P. 979154.
2. Богданов А.А., Богданов А.А., Ляпунова Л.С., Бурдаков В.С., Верлов Н.А., Моисеенко В.М. Противоопухолевый эффект *in vivo* и влияние ощелачивания с помощью гидрокарбоната натрия на жизнеспособность и метаболизм опухолевых клеток CT26 // Практическая онкология. – 2024. – Т. 25, № 4. – С. 327–335.

3. Ying C., Jin C., Zeng S., Chao M., Hu X. Alkalization of cellular pH leads to cancer cell death by disrupting autophagy and mitochondrial function // *Oncogene*. – 2022. – Vol. 41, № 31. – P. 3886–3897.
4. Isowa M., Hamaguchi R., Narui R., Morikawa H., Okamoto T., Wada H. Exploring the Potential Use of Natural Products Together with Alkalization in Cancer Therapy // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16, № 6. – P. 787.
5. 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. – Vol. 14.
6. Nayak P., Bentivoglio V., Varani M., Signore A. Three-Dimensional In Vitro Tumor Spheroid Models for Evaluation of Anticancer Therapy: Recent Updates // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, № 19.
7. Li X., Sun Y., Guo J., Cheng Y., Lu W., Yang W., Wang L., Cheng Z. Sodium bicarbonate potentiates the antitumor effects of Olaparib in ovarian cancer via cGMP/PKG-mediated ROS scavenging and M1 macrophage transformation // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2024. – Vol. 180. – C. 117509.
8. Liu J., Kuang F., Kang R., Tang D. Alkaliptosis: a new weapon for cancer therapy // *Cancer Gene Therapy*. – 2020. – T. 27, № 5. – P. 267–269.
9. 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. – Vol. 154, № 5. – P. 1480–1493.

References

1. Bogdanov A.A., Bogdanov A.A., Chubenko V.A., Volkov N.M., Moiseenko F.V., Moiseyenko V.M. Tumor acidity: From hallmark of cancer to target of treatment. *Front Oncol*. 2022; 12: 979154. Epub 2022/09/16. Doi: 10.3389/fonc.2022.979154. PubMed PMID: 36106097; PMCID: PMC9467452.
2. [Bogdanov A.A., Bogdanov An.A., Lyapunova L.S., Burdakov V.S., Verlov N.A., Moiseenko V.M. Antitumor effect in vivo and the impact of sodium bicarbonate-induced alkalization on viability and metabolism of CT26 tumor cells. *Prakticheskaya Onkologiya*. 2024; 25(4): 327-335 (In Russ)]. Doi: 10.31917/2504327.
3. Ying C., Jin C., Zeng S., Chao M., Hu X. Alkalization of cellular pH leads to cancer cell death by disrupting autophagy and mitochondrial function. *Oncogene*. 2022; 41(31): 3886-97. Doi: 10.1038/s41388-022-02396-6.
4. Isowa M., Hamaguchi R., Narui R., Morikawa H., Okamoto T., Wada H. Exploring the Potential Use of Natural Products Together with Alkalization in Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2024; 16(6): 787. PubMed PMID: doi:10.3390/pharmaceutics16060787.
5. 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. *Front Oncol*. 2024; 14. Doi: 10.3389/fonc.2024.1342802.
6. Nayak P., Bentivoglio V., Varani M., Signore A. Three-Dimensional In Vitro Tumor Spheroid Models for Evaluation of Anticancer Therapy: Recent Updates. *Cancers (Basel)*. 2023; 15(19). Epub 2023/10/14. Doi: 10.3390/cancers15194846. PubMed PMID: 37835541; PMCID: PMC10571930.
7. Li X., Sun Y., Guo J., Cheng Y., Lu W., Yang W., Wang L., Cheng Z. Sodium bicarbonate potentiates the antitumor effects of Olaparib in ovarian cancer via cGMP/PKG-mediated ROS scavenging and M1 macrophage transformation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024; 180: 117509. Doi: 10.1016/j.biopha.2024.117509.
8. Liu J., Kuang F., Kang R., Tang D. Alkaliptosis: a new weapon for cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*. 2020; 27(5): 267-9. Doi: 10.1038/s41417-019-0134-6.
9. 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; 154(5): 1480-93. Doi: 10.1053/j.gastro.2017.12.004.