

УДК.616.-006.484.04.48404-0928

Лисяний Н.И.¹, Ключникова А.И.¹, Лисяний А.Н.², Семенова В.М.³, Бельская Л.Н.¹¹ Отдел нейроиммунологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины, г. Киев, Украина² Отделение субтенториальной нейроонкологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины, г. Киев, Украина³ Лаборатория культивирования тканей, Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины, г. Киев, Украина

Изучение противоопухолевого действия метформина в эксперименте у крыс с глиомой головного мозга

Вступление. Метформин, известный как препарат для лечения сахарного диабета, сегодня достаточно широко используют в онкологии в качестве средства, тормозящего рост различных злокачественных опухолей в экспериментах на животных. Его влияние на опухоли головного мозга не изучено.

Материалы и методы. Противоопухолевое действие метформина изучено у крыс с глиомой 101.8, которым вводили метформин изолированно или в сочетании с химиопрепаратами цисплатином или доксорубицином. У животных с глиомой мозга определяли продолжительность жизни, рассчитывали среднюю продолжительность жизни для каждой группы крыс.

Результаты. В эксперименте изучено прямое и комбинированное влияние метформина на опухоли мозга у крыс. Установлено, что метформин, введенный в дозе 50–150 мг/кг массы тела животных, не тормозил рост глиомы мозга; введенный вместе с цисплатином или доксорубицином — тормозил рост глиомы значительно чаще, чем при отдельном введении этих препаратов.

Выводы. На основе анализа результатов экспериментального исследования рекомендовано использование метформина в нейроонкологической клинике при лечении злокачественных глиом головного мозга.

Ключевые слова: *глиома мозга, метформин, цисплатин, доксорубицин, эксперимент.*

В последние годы проводятся исследования по изучению противоопухолевого действия антигликемического препарата метформина [1–4]. В культуре клеток метформин тормозит пролиферацию клеток рака легкого, предстательной железы, меланомы, грудной железы [3–6]. Имеются данные о его влиянии на свойства стволовых опухолевых клеток рака легкого как *in vitro*, так и *in vivo* [6, 7]. Механизм действия метформина не изучен, предполагают два механизма действия: прямой — непосредственно на опухолевые клетки с индукцией в них апоптоза или блокированием пролиферации клеток, и непрямой, связанный с гликогликемическим действием и созданием дефицита глюкозы как энергетического субстрата, что способствует торможению пролиферации клеток [8–12]. Наряду с рекомендациями о возможности применения метформина в качестве синергичного препарата при комбинированной химиотерапии различных типов опухолей человека, предполагают целесообразность использования этого препарата для профилактики онкогенеза, предупреждения возникновения опухолей в организме. Такие предложения возникли после установления факта, что у пациентов, страдающих сахарным диабетом II типа и в течение многих лет применяющих метформин, реже возникают онкологические заболевания, чем у больных, которым назначают другие препараты, в том числе инсулин [13, 14].

Влияние метформина на рост опухолей головного мозга практически не изучено, лишь в одной работе указано на возможность его применения на фоне химиотерапии при лечении злокачественной глиомы [5].

Целью работы было оценить влияние метформина в сочетании с другими химиопрепаратами на рост экспериментальной глиомы головного мозга у крыс.

Материалы и методы исследования. Испытания проводили на крысах, выращенных в виварии Института нейрохирургии, массой тела 80–120 г, которым внутричерепально в область левой теменной доли вводили взвесь опухолевых клеток в объеме 50 мкл на глубину 2–3 мм с помощью шприца объемом 10 мл. После введения опухолевых клеток в мозг животных содержали на обычном водно-пищевом режиме. Метформин и другие препараты, в частности, цисплатин и доксорубицин вводили внутримышечно в различных дозах в зависимости от схемы лечения.

Взвесь опухолевых клеток экспериментальной глиомы 101.8 готовили из головного мозга крыс, у которых поддерживали рост этого штамма опухоли. Заболевших, парализованных животных с глиомой мозга усыпляли с помощью эфира, обрабатывали кожу головы растворами спирта и йода, стерильно делали разрез, вскрывали череп, извлекали головной мозг и переносили его в стерильную чашку Петри со средой 199 [15]. Полушария большого мозга разрезали ножницами, извлекали опухолевый узел, измельчали его ножницами в 3 мл стерильной среды 199. Приготовленную взвесь клеток фильтровали через капроновый фильтр, подсчитывали количество клеток, готовили взвесь 2×10^7 в 1 мл, которую вводили в объеме 50 мкл в мозг крысам.

Результаты и их обсуждение. В первой серии опытов изучали сочетанное влияние цисплатина и метформина на продолжительность жизни животных с экспериментальной глиомой, вводили метформин в дозе 50 мг/кг и оксиплатин в дозе 100 мкг/кг четыре раза — на 5, 7, 8-е и 11-е сутки после перевивки опухоли. Продолжительность жизни животных с опухолью составляла в среднем (**рис. 1**) в контроле — $(14,5 \pm 0,4)$ сут, после введения отдельно метформина или цисплатина — соответственно $(15,0 \pm 0,6)$ и

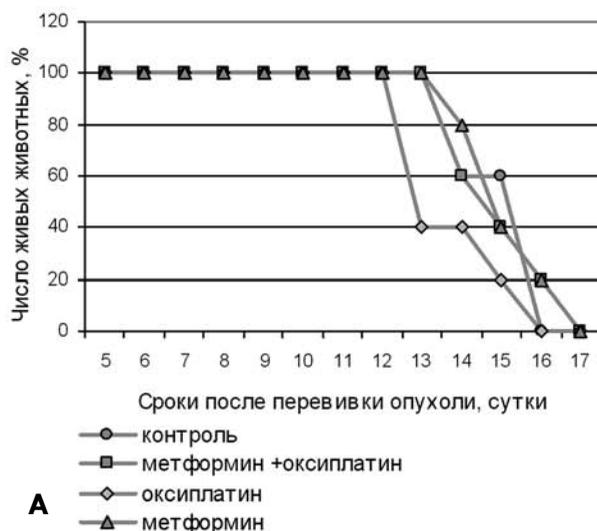


Рис. 1. Влияние метформина и оксиплатина на продолжительность жизни крыс с глиомой головного мозга. А — введение препаратов на 5, 7, 8-е и 11-е сутки после перевивки опухоли (серия 1); Б — ведение препаратов на 8, 10, 11, 14-е и 16-е сутки после перевивки опухоли (серия 2).

14,6 сут. При сочетании метформина и цисплатина продолжительность жизни животных изменялась несущественно, в среднем она составляла $(15,0 \pm 0,6)$ сут. Следовательно, применение в этих дозах в эти сроки цисплатина и метформина не оказывало достоверного противоопухолевого действия на рост глиомы головного мозга.

Во второй серии опытов было три группы животных по 6 крыс в каждой. Животным 1-й группы вводили на 8, 10, 11, 14-е и 16-е сутки метформин в дозе 150 мг/кг, цисплатин — в дозе 200 мкг/кг; 2-й группы — только цисплатин; 3-й группы (контрольной) — 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. При увеличении дозы препаратов и сроков начала терапии продолжительность жизни животных увеличивалась: в контроле — в среднем $(13,5 \pm 0,83)$ сут, у животных, которым вводили цисплатин — $(16,3 \pm 1,0)$ сут, цисплатин в сочетании с метформином — $(18,0 \pm 1,3)$ сут, что достоверно больше, чем в контроле ($P < 0,05$). Следовательно, по мере увеличения дозы препаратов удается достичь достоверного увеличения продолжительности жизни животных, хотя различия ее незначительны, всего 3–4 сут по сравнению с таковой в контроле. Обращает на себя внимание и то, что оксиплатин — препарат, обладающий значительным противоопухолевым действием при различных видах опухолей, несущественно влиял на этот штамм экспериментальной глиомы. Так, после пятикратного введения препарата в достаточно большой дозе продолжительность жизни животных увеличивалась на 1–2 сут, иными словами, этот штамм опухоли был устойчив к действию цисплатина. При применении метформина в сочетании с цисплатином этот показатель увеличивался, т.е. метформин потенцировал противоопухолевое действие цисплатина. Учитывая слабое противоопухолевое действие цисплатина, в следующей серии опытов использовали доксорубицин, который оказался высоко эффективным при сочетанном введении с метформином при раке легких [14]. Метформин и доксорубицин вводили по длительной схеме через 1, 4, 7, 8, 11 и 14 сут после перевивки — в дозах соответственно 200 мг/кг и 1 мг/кг (рис. 2).

Продолжительность жизни животных, которым вводили только метформин, составляла в среднем $(18,02 \pm 0,8)$ сут, что сопоставимо с этим показателем в контрольной группе $(17,1 \pm 0,1)$ сут. Доксорубицин обладал несколько более выраженным противоопухолевым действием на экспериментальную глиому, продолжительность жизни при его применении составляла в среднем $(19,4 \pm 0,8)$ сут. При применении метформина в сочетании с доксорубицином она увеличивалась до $(20,1 \pm 2,4)$ сут, что на 3 дня больше, чем в контроле. Полученные в этой серии результаты свидетельствуют, что доксорубицин несколько более эффективен, чем цисплатин, а также то, что метформин в такой дозе (200 мг/кг) не в состоянии самостоятельно повлиять на рост глиомы у крыс, и только при его сочетании с доксорубицином продолжительность жизни животных увеличивалась.

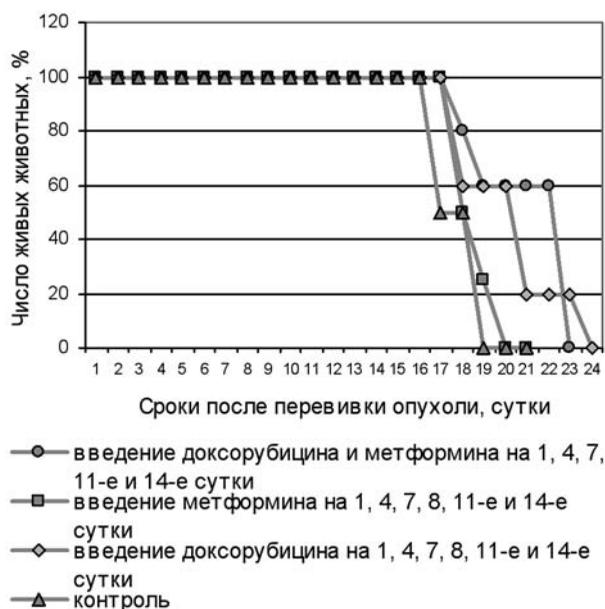


Рис. 2. Влияние метформина и доксорубицина на продолжительность жизни крыс с глиомой головного мозга.

Результаты проведенных исследований в эксперименте на животных с опухолью мозга свидетельствуют об определенном влиянии метформина на рост злокачественной глиомы у крыс. Это влияние более выражено при его сочетанном применении с другими противоопухолевыми препаратами. В то же время следует отметить, что глиома мозга штамма 101.8 обладает очень высокой резистентностью к действию оксисициплатина и доксорубина. При увеличении дозы доксорубина отмечены проявления общего нейротоксического действия и гибель животных от побочных реакций, а не от опухоли, что установлено в следующей серии опытов. При введении на 5, 10-е и 13-е сутки доксорубина в дозе 2,5 мг/кг наблюдали гибель большей части животных (4 из 6) на 8–10-е сутки от начала эксперимента, тогда как у животных контрольной группы с глиомой мозга продолжительность жизни составила в среднем (18,4±1,4) сут. Результаты этих экспериментов свидетельствуют, что стремление к увеличению дозы химиопрепарата чревато возникновением осложнений без влияния на рост резистентной к этому препарату опухоли.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что экспериментальная глиома 101.8 в значительной степени устойчива к действию метформина, оксисициплатина и доксорубина. При сочетанном применении метформина с этими химиопрепаратами удается достичь достаточного увеличения продолжительности жизни животных и повысить чувствительность опухоли к действию препаратов цисплатина и доксорубина. Полученные нами результаты несколько отличаются от данных других исследователей о влиянии метформина на рак легкого, грудной железы и меланомы, в которых отмечено существенное увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных [7, 14]. Эти различия, возможно, обусловлены тем, что глиома 101.8 резистентна к действию препаратов, поэтому эффективность химиотерапии недостаточна, а также с тем, что в приведенных исследованиях изучали опухоли человека, которые перевивали трансгенным мышам, тогда как в нашей работе исследовали глиому мозга крыс, менее чувствительную к доксорубину. Кроме того, важное значение имеет доза метформина. По данным литературы, у мышей препарат использовали в дозе 100–300 мг/кг массы тела, поскольку они в 3–4 раза меньше крыс. Следовательно, в наших экспериментах доза метформина у крыс была в 3–4 раза меньше доз, использованных исследователями у мышей, что, возможно, недостаточно для проявления прямого действия на опухоль. Применительно к опухолям мозга человека, целесообразно проведение исследований в культуре опухолевых клеток *in vitro*, а также на трансгенных мышах [5, 7].

Метформин снижает порог резистентности опухоли и делает ее более чувствительной к действию химиопрепаратов с различным механизмом действия. Метформин, введенный самостоятельно или в сочетании с химиопрепаратом, не стимулирует рост глиомы у крыс, то есть противопоказаний к его изучению в клинической нейроонкологии нет.

Выводы. 1. Экспериментальная глиома 101.8 крыс высокорезистентна к действию цисплатина и доксорубина. При многократном применении этих

препаратов не наблюдали существенного увеличения продолжительности жизни животных с опухолью.

2. Метформин, применяемый в дозах от 50 до 200 мг/кг самостоятельно, не способствовал достоверному увеличению продолжительности жизни животных с глиомой головного мозга, что свидетельствовало о резистентности этой глиомы к действию препарата.

3. При сочетанном применении метформина и химиопрепаратов достигнуто достоверное увеличение продолжительности жизни животных с глиомой мозга, что подтверждает как синергичное противоопухолевое действие метформина и химиопрепаратов, так и снижение порога резистентности опухоли к этим препаратам.

4. Полученные в эксперименте данные позволяют рекомендовать метформин к клиническому применению при глиальных опухолях мозга человека в сочетании с другими химиопрепаратами.

Список литературы

1. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells / R.J. Dowling, M. Zakikhani, I.G. Fantus [et al.] // *Cancer Res.* — 2007. — V.67. — P.10804–10812.
2. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells / M. Zakikhani, R. Dowling, I.G. Fantus [et al.] // *Cancer Res.* — 2006. — V.66. — P.10269–10273.
3. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect *in vitro* and *in vivo* through a decrease of cyclin D1 level / I. Ben Sahra, K. Laurent, A. Loubat [et al.] // *Oncogene.* — 2008. — V.27. — P.3576–3586.
4. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth / M. Buzzai, R.G. Jones, R.K. Amaravadi [et al.] // *Cancer Res.* — 2007. — V.67. — P.6745–6752.
5. Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis / A. Isakovic, L. Harhaji, D. Stevanovic [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2007. — V.64. — P.1290–1302.
6. *In vitro* metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer / W.H. Gotlieb, J. Saumet, M.C. Beauchamp [et al.] // *Gynecol. Oncol.* — 2008. — V.110. — P.246–250.
7. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission / H.A. Hirsch, D. Iliopoulos, P.N. Tsichlis, K. Struhl // *Cancer Res.* — 2009. — V.69. — P.7507–7511.
8. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells / B. Liu, Z. Fan, S.M. Edgerton [et al.] // *Cell. Cycle J.* — 2009. — V.8. — P.2031–2040.
9. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment BMC / J.O. Ryan, I. Dowling, J. Pamela [et al.] // *Med. J.* — 2011. — V.9. — P.33–43.
10. Belfiore A. IGF and insulin receptor signaling in breast cancer / A. Belfiore, F. Frasca // *Mamm. Gland. Biol. Neoplas. J.* — 2008. — V.13. — P.381–406.
11. Abnormal glucose tolerance and the risk of cancer death in the United States / S.H. Saydah, C.M. Loria, M.S. Eberhardt, F.L. Brancati // *Am. J. Epidemiol.* — 2003. — V.157. — P.1092–1100.
12. Diabetes mellitus and breast cancer, a retrospective population-based cohort study / L.L. Lipscombe, P.J. Goodwin, B. Zinman [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2006. — V.98. — P.349–356.
13. Metformin plus temozolomide-based chemotherapy as adjuvant treatment for WHO grade III and IV malignant gliomas / O. Soritau, C. Tomuleasa, M. Aldea [et al.] // *J.*

BUON. — 2011. — V.16, N2. — P.282–289.

14. Лісяний М.І. Імуномодуюча та протиухлина дія препаратів чистотіла на пухлини головного мозку / М.І. Лісяний, Л.М. Бельська, А.І. Ключникова // Укр. нейрохірург. журн. — 2011. — №1. — С.23–28.
15. Metformin in cancer therapy: A new perspective for an old antidiabetic drug? / I.B. Saha, B.Y. Le Marchand, J.F. Tanti [et al.] // Mol. Cancer Ther. — 2010. — V.9. — P.1092–1099.

Поступила в редакцію 05.03.12

Принята к публікації 11.04.12

Адрес для переписки:

Лісяний Николай Иванович
04050, Киев, ул. Платона Майбороды, 32
Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины,
отдел нейроиммунологии
e-mail: nimun.neuro@gmail.com

Лісяний М.І.¹, Ключникова А.І.¹, Лісяний О.М.², Семенова В.М.³, Бельська Л.М.¹

¹ Відділ нейроімунології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ, Україна

² Відділення субтенторіальної нейроонкології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ, Україна

³ Лабораторія культивування тканин, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ, Україна

Вивчення протиухлинної дії метформіну в експерименті у щурів з гліомою головного мозку

Вступ. Метформін, відомий як препарат для лікування цукрового діабету, сьогодні досить широко вивчають в онкології як засіб, що гальмує ріст різних злоякісних пухлин в експериментах на тваринах. Вплив препарату на пухлини головного мозку не вивчений.

Матеріали і методи. Протиухлинну дію метформіну вивчали у щурів з гліомою 101.8, у яких застосовували метформін ізольовано або в поєднанні з хіміопрепаратами цисплатином чи доксорубіцином. У тварин з гліомою мозку визначали тривалість життя, обчислювали середню тривалість життя у кожній групі щурів.

Результати. В експерименті вивчений прямий та комбінований вплив метформіну на пухлини мозку у щурів. Встановлено, що метформін, введений в дозі 50–150 мг/кг маси тіла тварин, не гальмував ріст гліоми мозку; введений разом з цисплатином або доксорубіцином, гальмував ріст гліоми значно частіше, ніж при окремому введенні цих препаратів.

Висновки. На основі аналізу результатів цих експериментів рекомендоване використання метформіну в нейроонкологічній клініці під час лікування злоякісних гліом мозку.

Ключові слова: гліома мозку, метформін, цисплатин, доксорубіцин, експеримент.

Надійшла до редакції 05.03.12
Прийнята до публікації 11.04.12

Адреса для листування:

Лісяний Микола Іванович
04050, Київ, вул. Платона Майбороди, 32
Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины,
відділ нейроімунології
e-mail: nimun.neuro@gmail.com

Lisyanii N.I.¹, Klyuchnikova A.I.¹, Lisyanii A.N.², Semenova V.M.³, Behlskaya L.N.¹

¹ Neuroimmunology Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

² Infratentorial Neurooncology Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

³ Tissue Culture Laboratory, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

The experimental study of metformin's antitumor action in rats with brain glioma

Introduction. Metformin, known as medicine for diabetes mellitus treatment, today is widely studied in oncology as drug for suppressing growth of different malignant tumors in experiments on animals.

Materials and methods. Metformin's antitumor effect was studied on rats with glioma 101.8, treated with metformin or it's combination with chemomedicines cisplatin or doxorubicin. The duration of animals' life with brain glioma and it's average rate in each group of rats were determined.

Results. The direct and combined influence of metformin on rats' brain tumor was studied in experiment. It was determined that metformin in doses 50–150 mg/kg not influence on the growth of brain glioma. Metformin an injection with cisplatin or doxorubicin more often suppressed glioma's growth then used separately.

Conclusion. On the base of experiments' results analysis the use of metformin is recommended in neurooncology clinic during malignant gliomas treatment.

Key words: brain glioma, metformin, cisplatin, doxorubicin, experiment.

Received March 05, 2012

Accepted April 11, 2012

Address for correspondence:

Nikolay Lisyanii
04050, 32 Platon Mayboroda St, Kiev, Ukraine
Institute of Neurosurgery
named after acad. A.P. Romodanov NAMS Ukraine,
Neuroimmunology Department
e-mail: nimun.neuro@gmail.com