

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Kristina D. Janjetović

**Uticaj metformina na apoptozu ćelija  
glioma i melanoma *in vitro* i na rast  
melanoma *in vivo***

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Kristina D. Janjetović

**The Effect of Metformin on Glioma and  
Melanoma Cell Apoptosis *in vitro* and  
Melanoma Growth *in vivo***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

## **PODACI O MENTORU I KOMISIJI**

### **Mentor**

Prof. dr Vladimir Trajković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

### **KOMISIJA**

1. Akademik Prof. dr Dragan Micić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Aleksandra Isaković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Viši naučni saradnik dr Miljana Momčilović, Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“
4. Prof. dr Vera Pravica, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
5. Doc. dr Vladislav Volarević, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u  
Kragujevcu

## **ZAHVALNICA**

*Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji za imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*

*Zahvaljujem se*

*prof. dr Vladimiru Trajkoviću i dr Ljubici Harhaji-Trajković na neposrednom rukovođenju pri izradi i pisanju doktorske teze i radova koji su iz nje proistekli,*

*akademiku prof. dr Draganu Miciću na korisnim savetima pri pisanju teze,*

*prof. dr Aleksandri Isaković i dr Miljani Momčilović na korisnim savetima pri pisanju teze,*

*dr Ljubici Vučićević i Maji Misirkić-Marjanović na pomoći pri eksperimentalnoj izradi i iskrenoj podršci pri pisanju disertacije,*

*dr Verici Paunović, dr Neveni Zogović, dr Gordani Tovilović, dr Aleksandru Pantoviću dr Marini Milenković, Biljani Ristić i Katarini Arsikin na iskrenoj podršci pri pisanju disertacije,*

*svim koleginicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije*

*i mojim roditeljima koji su mi pružili bezgraničnu podršku i razumevanje prilikom izrade disertacije.*

## REZIME

### Uticaj metformina na apoptozu ćelija glioma i melanoma *in vitro* i rast melanoma *in vivo*

U ovoj disertaciji ispitivan je efekat antidijabetskog leka metformina na apoptozu ćelijskih linija melanoma i glioma *in vitro*, u odsustvu i prisustvu hemoterapeutika cisplatina. Takođe smo bili zainteresovani za uticaj metformina na rast melanoma *in vivo*.

U odsustvu cisplatina po prvi put je pokazan dvojan antiglioma efekat metformina na ćelijskoj liniji glioma pacova C6. U ćelijskim kulturama glioma pacova C6 male gustine metformin je zaustavio progresiju ćelijskog ciklusa u G0/G1 fazi, bez značajnog povećanja ćelijske smrti. Sa druge strane, u konfluentnim kulturama C6 ćelija metformin je izazvao izuzetno povećanje apoptoze koja je zavisna od kaspaza, depolarizacije mitohondrija, oksidativnog stresa i povezana sa aktivacijom JNK (*engl. c-Jun N-terminal kinase*). Apoptoza indukovana metforminom je u potpunosti sprečena supstancama koje blokiraju promenu propustljivosti membrane mitohondrija (ciklosporin A) i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (N-acetilcistein), dok su je inhibitori aktivacije JNK (SP600125) ili glikolize (natrijumfluorid, jodoacetat) delimično sprečili. Supstanca C, koja je inhibitor adenozin monofosfatom aktivirane protein kinaze AMPK (*engl. AMPactivated protein kinase*), je smanjila antiglioma efekat metformina dok je AMPK agonista AICAR (*engl. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide*) imitirao pomenuti efekat. Primarni astrociti pacova su bili u potpunosti otporni na antiproliferativno i proapoptotsko dejstvo metformina.

Dalje je ispitivan *in vitro* uticaj metformina na antikancersku aktivnost dobro poznatog hemoterapeutika cisplatina. Iako je sam metformin smanjio broj tumorskih ćelija, iznenađujuće antagonizovao je citotoksičnost cisplatina u U251 ćelijama glioma. Metformin je smanjio apoptotsku ćelijsku smrt indukovanu cisplatinom u U251 ćelijama glioma, tako što je smanjio oksidativni stres i aktivaciju kaspaza. Zapažena citoprotekcija je očigledno nezavisna od AMPK, jer metformin nije dalje povećao aktivaciju AMPK indukovanu cisplatinom i drugi farmakološki aktivatori AMPK nisu

uspeli da inhibiraju apoptozu indukovanu cisplatinom. Sa druge strane, metformin je indukovao aktivaciju Akt u ćelijama tretiranim cisplatinom, a inhibitor Akt (10-DEBC hidrohlorid) ili fosfoinozimid 3-kinaza/Akt inhibitor (LY294002) su poništili antioksidantna i antiapoptotska dejstva posredovana metforminom.

U odsustvu cisplatina *in vitro* i *in vivo* antimelanoma efekat metformina je ispitivan, koristeći B16 ćelijsku liniju melanoma miša. Metformin je izazvao zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi, koje je povezano sa apoptotskom smrću ćelija melanoma. Indukcija oksidativnog stresa i depolarizacija membrane mitohondrija su prethodili apoptozi posredovanoj metforminom za koju je pokazano, da je zavisna od kaspaza. Metformin je povećao ekspresiju tumor supresornog proteina p53, dok je smanjio nivo iRNK antiapoptotskog proteina Bcl-2. Tretman metforminom nije stimulisao ekspresiju inhibitora ćelijskog ciklusa p21, dajući indicaciju da p21 nije neophodan za zapaženi blok ćelijskog ciklusa. Za antimelanoma delovanje metformina izgleda da nije potrebna aktivacija AMPK, jer supstanca C nije uspjela da povрати vijabilitet B16 ćelija tretiranih metforminom. Metformin je indukovao autofagiju u B16 ćelijama, dok su inhibitori autofagije amonijum hlorid i wortmanin delimično povratili vijabilitet ćelija melanoma tretiranih metforminom, što ukazuje da je autofagija indukovana metforminom citotoksična. Konačno, oralna upotreba metformina dovela je do značajnog smanjenja veličine tumora u mišijem B16 melanoma modelu.

Rezultati dobijeni u odsustvu cisplatina na ćelijskim linijama melanoma i glioma *in vitro*, kao i na mišijem modelu *in vivo*, ukazuju na potencijalnu primenu metformina kao antikancerskog agensa u navedenim tumorima. Sa druge strane, u prisustvu cisplatina pokazalo se da treba veoma pažljivo uzeti u razmatranje upotrebu metformina kod pacijenata koji boluju od dijabetesa i kancera i primaju cisplatin, ili kao potencijalne adjuvantne terapije u hemoterapeutskim protokolima baziranim na cisplatinu.

**Ključne reči:** metformin, kancer, cisplatin, AMPK, apoptoza, autofagija, oksidativni stres

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

**UDK broj:**

## SUMMARY

### **The Effect of Metformin on Glioma and Melanoma Cell Apoptosis *in vitro* and Melanoma Growth *in vivo***

We investigated the effect of the well known antidiabetic drug metformin on the viability of melanoma and glioma cell lines *in vitro*, in the absence and presence of cisplatin. Also, we were interested in the effect of metformin on melanoma growth *in vivo*.

In the absence of cisplatin on rat glioma cell line C6, we have shown for the first time a dual antiglioma effect of metformin. In low-density cultures of the C6 rat glioma cell line, metformin blocked the cell cycle progression in G0/G1 phase without inducing significant cell death. In confluent C6 cultures, on the otherhand, metformin caused massive induction of caspase dependent apoptosis associated with c-JunN-terminalkinase (JNK) activation, mitochondrial depolarization and oxidative stress. Metformin-triggered apoptosis was completely prevented by agents that block mitochondrial permeability transition (cyclosporin A) and oxygen radical production (N-acetylcysteine), while the inhibitors of JNK activation (SP600125) or glycolysis (sodium fluoride, iodoacetate) provided partial protection. The antiglioma effect of metformin was reduced by compound C, an inhibitor of AMP activated protein kinase (AMPK), and was mimicked by the AMPK agonist AICAR. Rat primary astrocytes were completely resistant to the antiproliferative and proapoptotic action of metformin.

Further, it was investigated the influence of metformin on the *in vitro* anticancer activity of the well-known chemotherapeutic agent cisplatin. Although metformin reduced the number of tumour cells when applied alone, it surprisingly antagonized the cytotoxicity of cisplatin towards U251 human glioma. In U251 glioma cells metformin suppressed cisplatin-induced apoptotic cell death through inhibition of oxidative stress and caspase activation. The observed cytoprotection was apparently AMPK-independent, as metformin did not further increase cisplatin-induced AMPK activation in U251 cells and other pharmacological AMPK activators failed to block cisplatin-mediated apoptosis. On the other hand, metformin induced Akt activation in cisplatin-treated cells and Akt inhibitor 10-DEBC hydrochloride or phosphoinositide 3-

kinase/Akt inhibitor LY294002 abolished metformin-mediated antioxidant and antiapoptotic effects.

In the absence of cisplatin, *in vitro* and *in vivo* anti-melanoma effect of antidiabetic drug metformin was investigated using B16 mouse melanoma cell line. Metformin caused a G2/M cell cycle arrest associated with apoptotic death of melanoma cells. Metformin-mediated apoptosis of melanoma cells was preceded by the induction of oxidative stress and mitochondrial membrane depolarization. Metformin caused an increase in the expression of tumor suppressor protein p53 with concomitant decrease of anti-apoptotic Bcl-2 mRNA levels. However, the treatment with metformin did not stimulate expression of the cycle blocker p21, indicating that p21 was dispensable for the observed cell cycle arrest. The activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) was not required for the anti-melanoma action of metformin, as AMPK inhibitor compound C completely failed to restore viability of metformin-treated B16 cells. Metformin induced autophagy in B16 cells, autophagy inhibitors ammonium chloride and wortmannin partly restored the viability of metformin-treated melanoma cells, indicating that metformin-induced autophagy is cytotoxic. Finally, oral administration of metformin led to a significant reduction in tumor size in a B16 mouse melanoma model.

Results obtained in cisplatin absence on melanoma and glioma cell lines *in vitro* and mouse melanoma model *in vivo*, indicate the potential metformin application as anticancer therapeutic in melanoma and glioma tumor. On the other hand, data in the cisplatin presence warrant caution when considering metformin for treatment of diabetic cancer patients receiving cisplatin, or as a potential adjuvant in cisplatin-based chemotherapeutic regimens.

**Keywords:** metformin, cancer, cisplatin, AMPK, apoptosis, autophagy, oxidative stress

**Research area:** Medicine

**Research field:** Molecular medicine

**UDC number:**



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	9
3. MATERIJAL I METODE.....	10
3.1. ĆELIJE I ĆELIJSKE KULTURE .....	10
3.2. RASTVORI I REAGENSI .....	10
3.3. TESTOVI VIJABILITETA .....	11
3.3.1. MTT test.....	11
3.3.2. Kristal violet test.....	12
3.3.3. LDH test .....	12
3.4. ANALIZA PARAMETARA ĆELIJSKE SMRTI I PRODUKCIJE REAKTIVNIH KISEONIČNIH VRSTA METODOM PROTOČNE CITOFLUORIMETRIJE.....	13
3.4.1. Određivanje apoptoze i nekroze .....	14
3.4.2. Određivanje fragmentacije DNK.....	14
3.4.3. Određivanje aktivacije kaspaza .....	15
3.4.4. Određivanje autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom .....	16
3.4.5. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta .....	16
3.4.6. Određivanje potencijala mitohondrijalne membrane .....	17
3.5. IMUNOBLOT ANALIZA .....	17
3.6. ELISA TEST ZA ADHERENTNE ĆELIJE (c-ELISA).....	18
3.7. FOTOGRAFISANJE ĆELIJSKIH KULTURA .....	19
3.8. ODREĐIVANJE NIVOVA EKSPRESIJE iRNK ZA Bax, Bcl-2 i p21.....	20
3.8.1. Izolacija RNK .....	20
3.8.2. Reverzna transkripcija .....	20
3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR, real time polymerase chain reaction).....	21
3.9. <i>IN VIVO</i> INDUKCIJA I TRETMAN MELANOMA .....	21
3.10. USPOSTAVLJANJE PRIMARNE KULTURE ASTROCITA PACOVA .....	22
3.10.1. Uzimanje tkiva za postavljanje ćelijske kulture.....	22
3.10.2. Izdvajanje frakcije ćelija iz moždanog tkiva i njihovo zasejavanje.....	23
3.10.3. Održavanje primarne kulture astrocita .....	23

3.11.	CHOU TALALAY METOD .....	24
3.12.	STATISTIČKA ANALIZA .....	25
4.	REZULTATI .....	26
4.1.	Metformin smanjuje proliferaciju C6 i U251 ćelija glioma, ali ne i primarnih astrocita.....	26
4.2.	Metformin menja ćelijsku morfologiju i ćelijski ciklus u kulturama glioma ..	26
4.3.	Metformin indukuje morfološke promene i apoptozu u konfluentnim ćelijama glioma <sup>28</sup>	
4.4.	Metformin indukuje aktivaciju kaspaza u konfluentnim ćelijama glioma .....	29
4.5.	U konfluentnim ćelijama glioma metformin indukuje depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres .....	29
4.6.	Apoptoza indukovana metforminom posredovana je depolarizacijom mitohondrija i oksidativnim stresom u glioma ćelijama.....	32
4.7.	Antigliomski efekat metformina posredovan je aktivacijom JNK ( <i>engl. c-Jun N-terminal kinase</i> ).....	33
4.8.	Glikoliza učestvuje u antiglioma efektu metformina .....	35
4.9.	AMPK aktivator AICAR indukuje apoptozu ćelija glioma .....	36
4.10.	AMPK učestvuje u antigliomskom dejstvu metformina.....	36
4.11.	Sinergizam metformina i supstanci koje indukuju oksidativni stres u ubijanju ćelija glioma.....	37
4.12.	Metformin inhibira citotoksično dejstvo cisplatina na U251 ćelije glioma ..	40
4.13.	Metformin redukuje apoptozu indukovanu cisplatinom.....	42
4.14.	Metformin redukuje cisplatinom indukovanu aktivaciju kaspaza i oksidativni stres .....	43
4.15.	Citoprotektivno delovanje metformina na ćelije glioma tretirane cisplatinom zavisi od aktivacije Akt.....	45
4.16.	Metformin redukuje antitumorsku aktivnost cisplatina nezavisno od modulacije ERK i autofagije .....	47
4.17.	Modulacija AMPK ne učestvuje u citoprotektivnom dejstvu metformina ..	48
4.18.	Metformin inhibira proliferaciju B16 ćelija melanoma.....	49
4.19.	Metformin indukuje blok ćelijskog ciklusa i apoptozu u ćelijama melanoma	49
4.20.	Apoptoza ćelija melanoma indukovana metforminom zavisi od aktivacije kaspaza, depolarizacije mitohondrija i oksidativnog stresa.....	51
4.21.	Metformin povećava odnos Bax/Bcl-2 i ekspresiju p53, ali ne i ekspresiju p21 u ćelijama melanoma .....	52

4.22.	Autofagija učestvuje u toksičnom dejstvu metformina na ćelije melanoma	53
4.23.	Toksičnost metformina prema melanomskim ćelijama ne zavisi od aktivnosti AMPK.....	56
4.24.	Metformin smanjuje rast melanoma <i>in vivo</i> .....	57
5.	DISKUSIJA .....	58
6.	ZAKLJUČAK.....	70
7.	LITERATURA .....	71

## 1. UVOD

Tumor predstavlja masu izmenjenih ćelija, nesposobnih da regulišu sopstvenu deobu. Usled akumulacije velikog broja mutacija ćelije tumora su izgubile diferenciranost, i nisu u stanju da obavljaju svoje specifične ćelijske funkcije. Nekontrolisane deobe tumorskih ćelija nastaju kao posledica nagomilanih mutacija koje uzrokuju povećanu aktivnost protoonkogeni ili smanjenu aktivnost tumor supresor gena. Protoonkogeni i tumor supresor geni učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa i programirane ćelijske smrti, apoptoze. Oni takođe kodiraju i gene za faktore rasta, receptore faktora rasta i molekule uključene u njihovu unutarćelijsku signalizaciju. Smatra se da je potrebno da dođe do akumulacije bar 10 mutacija da bi ćelija ispoljila maligni karakter (Schreiber i sar., 1999; Kumar i sar., 2010). Proces transformacije normalne u malignu ćeliju naziva se karcinogeneza. Karcinogeneza može trajati i više desetina godina, a sastoji se od tri osnovne faze (Nowell i Croce 1986):

- Inicijacija (ireverzibilne genetičke promene koju su nasleđene ili nastale pod uticajem kancerogena)
- Promocija (deobe inicirane ćelije pod uticajem mitogena i formiranje tumora)
- Progresija (brz rast, angiogeneza i metastaze, odnosno formiranje malignog tumora).

Pošto tumori mogu nastati od normalne ćelije bilo kog tkiva, postoji širok spektar tumora koji se razlikuju po svom poreklu. Prema agresivnosti rasta tumori se dele na benigne i maligne. Za razliku od benignih, maligni tumori nisu inkapsulirani i sposobni su da metastaziraju. Metastaziranje predstavlja proces odvajanja male grupe ćelija sa mesta nastanka i njihovo odlaženje putem krvi i limfe u druga tkiva i organe, gde se infiltriraju i formiraju sekundarne tumore, uzrokujući propadanje normalnog tkiva (Schreiber i sar., 1999). U krajnjim stadijumima kod osoba obolelih od tumora nastupa teško iscrpljujuće stanje celokupnog organizma, koje se naziva kaheksija, karakterisano padom telesne težine i opštom slabošću. Uprkos opsežnim istraživanjima, za pojedine tumore, kao što su melanomi i gliomi, koje odlikuje velika agresivnost,

metastatski potencijal i rezistentnost na hemoterapeutike, još uvek ne postoji efikasna hemoterapija.

Maligni melanom je maligni tumor melanocita i predstavlja najzloćudniji tumor kože i sluzokože. Nastanku melanoma doprinose UV zračenje i genetska predispozicija. Smatra se da se broj obolelih udvostručuje svakih 10-15 godina (Rastrelli i sar., 2013). Primarna lezija melanoma javlja se kao bilo koji od četiri glavna podtipa: površinski melanom koji se širi (SSM, *engl. superficial spreading melanoma*), nodularni melanom (NM, *engl. nodular melanoma*), lentigo maligni melanom (LMM, *engl. lentigo maligna melanoma*) i akralni lentigo melanoma (ALM, *engl. acral lentiginous melanoma*) (Clark i sar., 1969; Arrington i sar., 1977).

Biološki zloćudno ponašanje melanoma ne ogleda se toliko u lokalnoj agresivnosti, koliko u njegovoj izrazitoj sklonosti ka ranom limfogenom i hematogenom metastaziranju. Rana detekcija melanoma bi bila ključna strategija za redukovanje morbiditeta i mortaliteta (Friedman i sar., 1985). Tretman melanoma podrazumeva hirurško otklanjanje, koje je najefikasnije, kao i radio-, imuno- i hemoterapiju. U poslednjih 30 godina sintetisan je veliki broj hemoterapeutika, koji nisu uspeli da daju značajno poboljšanje kod pacijenata sa metastazama. Iako su delimični uspesi postignuti korišćenjem nitrozouree, alkilirajućih agenasa, taksana, platinskih analoga i citokina (interleukin-2 i interferon- $\gamma$ ) (Bajetta i sar., 2002), efektivna hemoterapija melanoma još uvek ne postoji (Flaherty 2006; Gogas i sar., 2007).

Druga klasa tumora koja je veoma zahtevna za lečenje su gliomi, tumori mozga i kičmene moždine nastali od ćelija glije. Prema Svetskoj Zdravstvenoj Organizaciji-SZO (*engl. World Health Organisation-WHO*), humani tumori mozga su podeljeni u četiri stadijuma u zavisnosti od maligniteta, koji je određen histopatološkim karakteristikama tumora (Louis i sar., 2007). Prvi stepen čine benigni tumori koji se mogu izlečiti hirurškom intervencijom. Tumori niskog stepena (drugi stepen) pokazuju difuznu infiltraciju u okolno tkivo, dok tumore trećeg stepena karakteriše povećana proliferacija, anaplazija i brži smrtni ishod. Četvrti stepen tumora su najagresivniji i maligni, koji pokazuju umnožavanje krvnih sudova, nekrozu i otpornost na zračenje i hemoterapiju. Glioblastoma multiforme (GBM) spada u četvrti stepen i takvi tumori nastaju na najmanje dva različita načina: iz prethodnog astrocitoma nižeg stepena (sekundarni GBM) ili *de novo*, iz prekursorskih ćelija (primarni GBM) (Arjona i sar., 2006). Snažna

invazivnost malignih glioma posledica je velike pokretljivosti ovih ćelija (Giese i sar., 2003). Za razliku od tumorskih ćelija koje su veoma rezistentne na konvencionalnu terapiju, zdrave ćelije mozga su jako osetljive što čini ove tumore gotovo neizlečivim. Dodatni problem u terapiji glioma je činjenica, da su zbog svoje specifične pozicije ovi tumori teško operabilni. Osim toga, mnogi lekovi ne mogu da prođu krvno-moždanu barijeru. Trenutna standardna terapija novih dijagnostifikovanih malignih glioma uključuje hiruršku intervenciju, terapiju zračenjem i temozolomid, koji se primenjuje za vreme i posle terapije zračenjem. Iako ovakva terapija značajno poboljšava preživljavanje i kvalitet života pacijenata (Stupp i sar., 2005; Taphoorn i sar., 2005), većina pacijenata razvije nove tumore u okviru godinu dana od početka tretmana (Anton i sar., 2012).

Cilj svake antitumorske terapije je ubijanje tumorskih ćelija. Tumorske ćelije najčešće umiru apoptozom, nekrozom ili autofagijom. Nekroza je ćelijska smrt koja uglavnom nije programirana i koju najčešće indukuju spoljašnji faktori kao što su različite infekcije, toksini ili traume koje za posledicu imaju nepravilnu digestiju ćelijskih delova. Karakteriše je jonski disbalans, bubrenje organela, naročito mitohondrija, kao i same ćelije. Ćelijska membrana nekrotične ćelije puca, a sadržaj ćelije izliva se u vanćelijski prostor. Ovo može dovesti do oštećenja okolnog zdravog tkiva i do aktivacije imunskog odgovora (Walker i sar., 1988).

Za razliku od nekroze koja nastupa u uslovima niskog energetskeg statusa ćelije, u programiranoj ćelijskoj smrti tipa I – apoptozi, ćelija aktivno, uz utrošak energije, pokreće sopstvenu smrt. Proces apoptoze indukovan je različitim fiziološkim i patološkim stanjima (Duronio 2008). Postoje dva glavna apoptotska puta: spoljašnji, ili put receptora smrti i unutrašnji, ili put mitohondrija. Međutim, postoje brojni dokazi da su ova dva puta povezana (Igney i Krammer 2002). Mnogobrojni, kako spoljašnji, tako i unutrašnji faktori mogu indukovati unutrašnji put apoptoze: hemoterapija, zračenje, toksini, hipoksija, hipertermija, virusna infekcija i slobodni radikali. Svi ovi stimuli izazivaju promene na unutrašnjoj membrani mitohondrija, što za posledicu ima otvaranje mitohondrijalnih pora prolazne propustljivosti (MPTP, *engl. mitochondrial permeability transition pore*) i gubitak transmembranskog potencijala mitohondrija (Saelens i sar., 2004). U kontroli propustljivosti mitohondrijalne membrane učestvuju brojni proteini Bcl-2 familije proteina (*engl. B cell lymphoma*) (Cory i Adams 2002),

čiji je ključni regulator tumor supresor protein p53 (Schuler i Green 2001). Članovi Bcl-2 porodice mogu biti antiapoptotski, npr. Bcl-2 (*engl. B cell lymphoma-2*), Bcl-x (*engl. B cell lymphoma-x*), Bcl-w (*engl. B cell lymphoma-w*), kao i proapoptotski: Bax (*engl. Bcl-2-associated X protein*), Bad (*engl. Bcl-2-associated death promoter*), Bim (*engl. Bcl-2-like protein 11*), Puma (*engl. p53 upregulated modulator of apoptosis*) i Noxa. Proapoptotski proteini Bcl-2 familije dovode do depolarizacije membrane mitohondrija (Schuler i Green 2001; Cory i Adams 2002; Saelens i sar., 2004), a iz depolarisanih mitohondrija zatim izlazi citohrom-C, koji u saradnji sa Apaf-1 (*engl. apoptotic protease activating factor 1*), pokreće kaskadnu aktivaciju kaspaza. Prvo se aktivira inicijatorska kaspaza 9 koja aktivira efektorske kaspaze 3, 6 i 7, proteolitičke enzime koji zatim uništavaju osnovne ćelijske strukture, uključujući i genetski materijal. Kao posledica ovih događaja dolazi do specifičnih morfoloških promena u ćeliji kao što su: smanjenje ćelijskog volumena (piknoza), kondenzacija i fragmentacija hromatina, pupljenje delova ćelijske membrane i stvaranje apoptotskih tela. Na kraju apoptotične ćelije bivaju fagocitovane od strane antigen prezentujućih ćelija, koje prepoznaju fosfatidilserin na spoljašnjoj strani membrane ćelija koje umiru apoptozom (Bogner i sar., 2010).

Kao što je prethodno rečeno, usled akumulacije mnogobrojnih mutacija u tumorskim ćelijama, mogu biti poremećeni normalni mehanizmi apoptoze. Tako je na primer, pokazano da u ovim ćelijama često dolazi do prekomerne ekspresije antiapoptotskih proteina (na primer Bcl-2), ili smanjene ekspresije ili mutacija proapoptotskih proteina (Bax, p53) (Kerr i sar., 1994). Tumorske ćelije koje nisu sposobne da umiru apoptozom pod određenim uslovima mogu umreti programiranom ćelijskom smrću tipa II, autofagijom (Debnath i sar., 2005; Maiuri i sar., 2007).

Autofagija predstavlja proces razgradnje proteinskih agregata i oštećenih organela u autofagolizozomima. U procesu autofagije mali delovi citoplazme se pakuju u dvoslojnu membranu i tako formiraju autofagozom. Autofagozom se zatim spaja sa lizozomom, formirajući autofagolizozom u kome se makromolekulski sadržaj degradira pomoću kiselih proteaza (Yorimitsu i Klionsky 2005; Mizushima i sar., 2008). Autofagija može predstavljati mehanizam ćelijskog umiranja u slučajevima kada je neadekvatno i preterano aktivirana ili kod ćelija sa mutiranim genima za apoptozu. Sa druge strane, autofagija može biti i mehanizam preživljavanja ćelije, jer omogućava

uklanjanje oštećenih unutarćelijskih proteina i očuvanje energije u nepovoljnim uslovima kao što su: gladovanje, hipoksija, zračenje, tretman određenim citostaticima (He i Klionsky 2009).

U aktivaciji i regulaciji procesa autofagije učestvuju produkti Atg (*engl. autophagy related*) gena, među kojima su najbitniji i najčešće korišćeni kao markeri ovog procesa Atg6 ili beclin-1 i Atg8 ili LC3 (*engl. light chain of the microtubule-associated protein 1*). Beclin je neophodan za formiranje autofagozoma, dok LC3 učestvuje u sazrevanju autofagozoma, pri čemu prelazi iz solubilne citoplazmatske forme LC3-I u LC3-II formu koja se ugrađuje u membranu autofagozoma (Xie i sar., 2008). Glavni negativni regulator ekspresije i aktivacije Atg proteina, i samog procesa autofagije je serin/treonin kinaza mTOR (*engl. mammalian target of rapamycin*), čija je aktivnost regulisana pomoću dve druge serin/treonin kinaze: Akt/PKB (*engl. protein Kinase B*) i AMPK (*engl. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*). Akt je serin-treonin kinaza zavisna od PI3K (*engl. phosphatidylinositide 3-kinase*) i osnovni je aktivator mTOR-a. Osim što učestvuje u inhibiciji autofagije, aktivacija Akt/mTOR je jedan od osnovnih signala za preživljavanje ćelije koji ima bitnu ulogu u regulaciji ćelijske proliferacija, apoptoze, metabolizma glukoze, kao i transkripcije i translacije (Yang i Klionsky 2010). S druge strane, AMPK, osnovni energetske senzor ćelije, predstavlja najvažniji inhibitor mTOR. AMPK je heterotrimerni protein sastavljen od  $\alpha$  katalitičke,  $\beta$  i  $\gamma$  regulatornih subjedinica. U uslovima niskog energetskog statusa, kada je u ćeliji smanjen nivo ATP, a povećana koncentracija AMP, AMP se vezuje za  $\gamma$  subjedinicu, što dovodi do konformacione promene enzima i njegovog aktiviranja (Memmott i Dennis 2009). U svom aktivnom stanju AMPK čuva energiju tako što zaustavlja ATP-zavisne anaboličke procese, kao što su glukoneogeneza i sinteza proteina, glikogena, holesterola i masnih kiselina, a aktivira kataboličke procese koji generišu ATP, kao što su preuzimanje glukoze, glikoliza, oksidacija masnih kiselina i biogeneza mitohondrija (Vucicevic i sar., 2009)

Aktivacija AMPK predstavlja i osnovni mehanizam delovanja antidijabetičkog leka metformina. Metformin (N, N-dimetilbiguanidin) predstavlja prvi lek izbora u tretmanu dijabetesa tipa II, naročito kod gojaznih pacijenata sa očuvanom funkcijom bubrega (Ben Saha i sar., 2010a). Iako sintetisan još dvadesetih godina prošlog veka, metformin je za tretman dijabetesa počeo da se koristi tek 40 godina kasnije. Iako ga



pacijenti generalno dobro podnose, njegova upotreba može dovesti i do neželjenih efekata, među kojima su najčešće gastrointestinalne tegobe, laktična acidoza i hipoglikemija. Osnovni mehanizam antidijabetičnog delovanja ovaj lek ostvaruje preko aktivacije AMPK, koja zatim stimuliše preuzimanje glukoze u skeletnim mišićima istovremeno smanjujući glukoneogenezu u jetri, što za krajnju posledicu ima smanjenje nivoa šećera u krvi (Zhou i sar., 2001). Osim u dijabetesu tipa II i predijabetesu, metformin je takođe efikasan u tretmanu sindroma policističnih jajnika, preuranjenog puberteta, a trenutno se ispituje se kao potencijalni antivirusni i antitumorski agens (Diamanti-Kandarakis i sar., ; Rotella i sar., 2006 ; Ben Sahra i sar., 2010a).

Brojne *in vitro* studije su pokazale da metformin inhibira proliferaciju i indukuje apoptozu ćelija različitih tumorskih linija (Zakikhani i sar., 2006; Buzzai i sar., 2007; Dowling i sar., 2007; Ben Sahra i sar., 2008; Cantrell i sar., 2010; Hadad i sar., 2010; Niraula i sar., 2010). Pokazano je da metformin zaustavlja proliferaciju ćelija karcinoma jajnika u G1 fazi ćelijskog ciklusa. Ovaj blok u proliferaciji bio je posredovan smanjenom ekspresijom ciklina D1 i povećanom ekspresijom ciklin-zavisne kinaze p21. Pomenuti efekti su bili zavisni od aktivnosti AMPK (Rattan i sar., 2011). Metformin je takođe redukovao ekspresiju ciklina D1 i zaustavio proliferaciju ćelija karcinoma dojke u G1 fazi ciklusa. Međutim, ovi efekti nisu zavisili od aktivnosti p21 kao kod tumorskih ćelija ovarijuma, već su bili posredovani inhibicijom MAPK (*eng. mitogen-activated protein kinase*), Akt i mTOR (Alimova i sar., 2009). I u ćelijama tumora endometrijuma metformin je blokirao ćelijski ciklus u G<sub>1</sub> fazi. Blok ćelijskog ciklusa zavisio je bar delimično od aktivacije AMPK i posledične inhibicije mTOR signalnog puta (Cantrell i sar., 2010). Za razliku od prethodno pomenutih ćelijskih linija tumora, metformin je u saradnji sa inhibitorom glikolize 2-deoksiglukozom (*eng. 2-Deoxy-D-glucose*) blokirao proliferaciju ćelija tumora prostate u G<sub>2</sub>/M fazi ćelijskog ciklusa (Ben Sahra i sar., 2010b).

Osim antiproliferativnog delovanja, brojne studije su pokazale da metformin ispoljava i snažan citotoksični efekat na različitim tumorskim ćelijama. U ćelijama karcinoma endometrijuma metformin je indukovao apoptozu zavisnu od aktivnosti kaspaze 3 (Cantrell i sar., 2010). Osim apoptoze, metformin je u ćelijama karcinoma dojke indukovao ubijanje nezavisno od aktivnosti kaspaza, koje je koreliralo sa povećanom aktivnošću enzima PARP (*eng. Poly (ADP-ribose) polymerase*) i snažnim

uvećanjem mitohondrija. Važno je pomenuti da su netransformisane ćelije epitela dojke bile otporne na citotoksično delovanje metformina (Zhuang 2011). Metforminom indukovana apoptoza kod trostruko negativnih ćelija karcinoma dojke bila je posredovana aktivacijom unutrašnjeg i spoljašnjeg signalnog puta apoptoze (Liu i sar., 2009). U ćelijskoj liniji karcinoma prostate kombinacija metformina i 2-deoksiglukoze indukovala je AMPK-zavisnu apoptozu posredovanu aktivacijom p53 (Ben Sahra i sar., 2010b). Zanimljivo je da je u p53-deficijentnim ćelijama tumora prostate kombinovani tretman indukovao ponovnu ekspresiju ovog proapoptotskog molekula, praćenu aktivacijom kaspaze 3 i apoptozom. Netransformisane ćelije prostate bile su skoro u potpunosti otporne na tretman metforminom i 2-deoksiglukozom (Ben Sahra i sar., 2010b). U ubijanju progenitorskih ćelija karcinoma dojke metformin je delovao sinergistički sa trastuzumabom, monoklonalnim antitelom na protoonkogen i marker tumorskih ćelija HER2 (*engl. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) (Vazquez-Martin i sar., 2011).

Brojne studije su pokazale da metformin inhibira rast tumora *in vivo*. Osim što je *in vitro* inhibirao proliferaciju i indukovao apoptozu, metformin je zaustavio i rast tumorskog ksenografta humanih ćelija karcinoma dojke u mišu (Zakikhani i sar., 2006; Liu i sar., 2009). Pokazano je da je metformin selektivno toksičan prema p53-negativnim humanim ćelijama karcinoma debelog creva, kao i da inhibira njihov rast u mišjem ksenograftu (Buzzai i sar., 2007). Ovaj antidijabetik je takođe suprimirao rast tumora u HER-2/neu transgenim miševima koji spontano razvijaju karcinom dojke (Anisimov i sar., 2005). Osim toga, metformin je zaustavio razvoj hemijski indukovanih tumora pluća i preneoplastične lezije kolona u miševima (Hosono i sar., 2010a; Memmott i sar., 2010).

Potencijal primene metformina u onkologiji primećen je i u retrospektivnim epidemiološkim studijama dijabetičara koji boluju od tumora. Pokazano je da postoji smanjena učestalost obolevanja i smanjena stopa mortaliteta vezanog za tumore kod dijabetičara koji kao terapiju primaju metformin (Dilman i sar., 1988; Bowker i sar., 2006; Libby i sar., 2009; Monami i sar., 2009; Decensi i sar., 2010; Landman i sar., 2010). Takođe, metformin je kod dijabetičnih žena sa karcinomom dojke poboljšao odgovor na hemoterapiju (Jiralerspong i sar., 2009). U prospektivnim kliničkim studijama na pacijentima obolelim od tumora koji nisu dijabetičari, pokazano je da su

niske doze metformina (250 mg dnevno) redukovale brojne rektalne aberantne kriptične fokuse kao surogat markere kolorektalnog karcinoma i smanjile proliferativnu aktivnost epitela kolona (Hosono i sar., 2010b).

Različite studije pokazale su da metformin stimuliše delovanje konvencionalnih i eksperimentalnih citostatika *in vitro* (Ben Saha i sar., 2010b; Vazquez-Martin i sar., 2011). U studiji Gotliba i saradnika, pokazano je da metformin u humanim ćelijama kancera ovarijuma pospešuje antikancersko delovanje cisplatina (cis-diamindihloroplatinum), iako su mehanizmi ovakvog delovanja ostali u potpunosti nerazjašnjeni (Gotlieb i sar., 2008). Cisplatin je jedan od najčešće primenjivanih hemoterapeutika koji se koristi kao adjuvantna i neoadjuvantna terapija kod različitih tumora, uključujući i teško izlečive tumore kakvi su gliomi i melanomi (Díaz i sar., 2005; Wolff i sar., 2010). Osnovni mehanizam antitumorske aktivnosti cisplatina je interakcija sa purinskim bazama u DNK, što vodi ka formiranju DNK-protein i DNK-DNK međulančanih i unutarlančanih unakrsnih veza, koje izazivaju blok u proliferaciji tumorskih ćelija i apoptozu (Jordan i Carmo-Fonseca 2000). Iako predstavlja veoma snažan citostatik, nakon dugotrajne terapije ćelije tumora često postaju rezistentne na cisplatin. Pretpostavlja se da rezistentnost tumorskih ćelija na cisplatin nastaje kao posledica njegovog smanjenog unošenja u ćeliju, povećanog izbacivanja, kao i pojačane reparacije DNK, što zajedno rezultira u smanjenoj apoptozi malignih ćelija. U cilju prevazilaženja otpornosti tumorskih ćelija, ovaj lek se kombinuje sa drugim hemoterapeuticima kao što su gemcitabin, pakslitaksel ili Glivek (Locke i sar., 2003; Zhang i sar., 2003; Smith i sar., 2006). Jedan od kandidata za kombinovanu terapiju sa cisplatinom mogao bi biti i metformin, imajući u vidu da je *in vitro* već pokazano da pospešuje antikancersko delovanje cisplatina (Gotlieb i sar., 2008).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Dakle, iako je antitumorska aktivnost metformina pokazana na brojnim tumorskim ćelijama *in vitro* i *in vivo*, do sada nije ispitivano delovanje metformina na ćelije glioma. Osim toga, iako je skorašnja studija pokazala da metformin ispoljava antimelanomsku aktivnost *in vitro*, mehanizmi ovog delovanja ostali su u potpunosti nerazjašnjeni, a nije ispitan ni uticaj metformina na rast melanoma *in vivo*. Takođe, nedovoljno je ispitan uticaj metformina na antitumorsko dejstvo cisplatina. S tim u vidu, postavljeni su sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati uticaj metformina, u odsustvu i prisustvu cisplatina, na vijabilitet i proliferaciju ćelija glioma i melanoma *in vitro*
2. Ispitati koje tipove i mehanizme smrti tumorskih ćelija metformin indukuje samostalno i u kombinaciji sa cisplatinom
3. Ispitati uticaj metformina na rast melanoma *in vivo*

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. ĆELIJE I ĆELIJSKE KULTURE

Delovanje metformina i cisplatina ispitivano je na humanim i pacovskim ćelijskim linijama glioma, primarnim pacovskim astrocitima, kao i mišijoj ćelijskoj liniji melanoma. Ćelijske linije pacovskog astrocitoma C6 (ATCC CCL-107) i humanog glioma U251 dobijene su ljubaznošću Dr Pedra Tranque (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Španija). Ćelije mišijeg melanoma B16 su dobijene od Evropske kolekcije ćelijskih kultura (*European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, UK). Primarni pacovski astrociti su izolovani iz mozga mladunaca Albino Oxford pacova. Ćelijske linije glioma, pacovskog astrocitoma i mišijeg melanoma inkubirane su u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37 °C, u HEPES-om (20 mM) puferizovanom medijumu RPMI 1640 sa 5 % fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina i 1 % rastvora antibiotik/antimikotik (sve od PAA, Pasching, Austria). Navedene ćelijske linije su po odmrzavanju iz tečnog azota propagirane u plastičnim bocama od 25 cm<sup>3</sup>. Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su odlepljivane tripsinom i korišćene u eksperimentima. U cilju ispitivanja vijabiliteta ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunara (5x10<sup>3</sup> ćelija/bunaru za ćelijske linije glioma male gustine, 2x10<sup>4</sup> ćelija/bunaru ćelijske linije glioma velike gustine i 1x10<sup>4</sup> ćelija/bunaru ćelijske linije mišijeg melanoma). Za analize na protočnom citofluorimetru, ćelije su zasejavane u ploče sa 24 bunara, i to 5x10<sup>4</sup> ćelija/bunaru za ćelijske linije glioma male gustine, 2x10<sup>5</sup> ćelija/bunaru za ćelijske linije glioma velike gustine i 1x10<sup>5</sup> za ćelijsku liniju mišijeg melanoma. Ploče sa bunarima su nabavljene od Sarstedt, Nümbrecht, Germany. Sve ćelije su tretirane 24 sata nakon zasejavanja.

#### 3.2. RASTVORI I REAGENSI

Cisplatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) je rastvaran u dimetil sulfoksidu (DMSO), a metformin hidrohlorid (99.9 %; Hemofarm, Vršac, Srbija) u fiziološkom

rastvoru sa fosfatnim puferom (PBS) i to neposredno pre eksperimenta. Kontrola kultura tretiranih cisplatinom bile su ćelije tretirane sa identičnom koncentracijom DMSO čija finalna koncentracija nikada nije bila veća od 0,5 %. U eksperimentima su korišćeni i ciklosporin A (CsA) (Novartis, Basel, Switzerland), pankaspazni inhibitor zVAD-fmk (R&D Systems, Minneapolis, MN), Akt inhibitor 10-[4'-(N,N-dietilamino) butil]-2-hlorofenoksazin hidrohlorid (10-DEBC hidrohlorid) i inhibitor fosfoinositid 3-kinaze (PI3K) 2-(4-morfolino)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-one (LY294002) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO), antioksidativni agens N-acetilcistein, inhibitor autofagije bafilomicin A1, antagonist kinaze regulisane vanćelijskim signalima (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) 2'-amino-3'-metoksiflavon (PD98059), inhibitor AMPK 6-[4-(2-Piperidin-1-iletoksi)fenil]-3-piridin-4-ilpirazolo[1,5-a]pirimidin (supstanca C), agonist AMPK aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (AICAR), inhibitor sinteze proteina cikloheksimid i inhibitor mitohondrijalne F1F0-ATPaze oligomicin A (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Metformin i svi drugi farmakološki modulatori su dodavani 30 min. pre tretmana cisplatinom. Fulerenske nanočestice (nano-C<sub>60</sub>) pripremljene su kao što je prethodno opisano (Isakovic i sar., 2006b)

### **3.3. TESTOVI VIJABILITETA**

Uticaj metformina i cisplatina na vijabilitet ćelijskih linija glioma i melanoma je određivan kolorimetrijskim metodama zasnovanim na merenju aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze, laktat dehidrogenaze i određivanjem adherentnosti ćelija nakon 24 h od tretmana.

#### **3.3.1. MTT test**

MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) test je zasnovan na redukciji tetrazolijumske soli MTT dehidrogenazama ćelijskih mitohondrija. Pri ovome dolazi do cepanja tetrazolijumskog prstena i pojave formazana, koji poseduje karakterističnu boju. MTT mogu da redukuju samo aktivne mitohondrije živih ćelija te je ovaj kolorimetrijski test pogodan za merenje broja vijabilnih ćelija, njihove aktivnosti i proliferacije. Nakon završetka kultivacije i uklanjanja medijuma u bunare je nalivano

po 50 µl rastvora MTT (0,5 mg/ml), da bi potom bila nastavljena inkubacija u periodu od 1 sata. Supernatanti su zatim odlivani, a ćelije lizirane sa DMSO. Ova tečnost je ujedno služila i za rastvaranje nagrađenog formazana, tako da se u bunarima razvijala karakteristična crveno-ljubičasta boja, čiji je intenzitet određivan na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost absorbancije proporcionalno su odgovarali broju živih ćelija.

### **3.3.2. Kristal violet test**

Kristal violet test omogućava određivanje relativnog broja adherentnih ćelija (Flick i Gifford, 1984). Nakon odgovarajućeg tretmana kulture su tri puta ispirane sa PBS da bi se odstranile neadherentne ćelije. Usledila je fiksacija zalepljenih ćelija metanolom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom i bojenje tako fiksiranih ćelija rastvorom kristal violeta (1 %) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga bunari su intenzivno ispirani vodom, da bi se odstranila boja koju nisu primile fiksirane ćelije. Boja ugrađena u ćelije koja je zaostajala nakon ovakvog pranja rastvarana je 33 % rastvorom sirćetne kiseline, a intenzitet oslobođene boje određivan je merenjem absorbancije svetlosti od 570 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju. Izmerene absorbancije odgovarale su intenzitetu boje, a intenzitet boje broju adherentnih ćelija. Rezultati MTT i kristal violet testa su predstavljeni kao % vijabiliteta u odnosu na kontrolne kulture.

### **3.3.3. LDH test**

Ćelijska smrt okarakterisana gubljenjem integriteta ćelijske membrane utvrđivana je primenom testa koji meri aktivnost citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH), koji se nakon oštećenja ćelijske membrane oslobađa u supernatant po prethodno opisanoj proceduri (Raicevic i sar., 2005). Za potrebe testa je bilo neophodno pored kontrole netretiranih ćelija (žive ćelije) obezbediti i pozitivnu kontrolu (100 % mrtve ćelije). Nju su činile ćelije lizirane nejonskim deterdžentom Triton X-100 (3 %) koje usled potpunog narušavanja integriteta ćelijske membrane

maksimalno oslobađaju citosolnu LDH. Princip LDH testa se zasniva na dve oksido-redukcije. U prvoj se laktat oksiduje u piruvat, pri čemu se  $\text{NAD}^+$  redukuje u  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . U narednoj reakciji fenazin-metosulfat posreduje u reoksidaciji  $\text{NADH} + \text{H}^+$  u  $\text{NAD}^+$  pri čemu se tetrazolijum hlorid redukuje u obojeni formazan. Protokol ovog testa podrazumeva dodavanje 100  $\mu\text{l}$  supstrata za LDH na 100  $\mu\text{l}$  supernatanta. Za pripremu supstrata za LDH korišćen je 54 mM L(+) laktat, 0,66 mM tetrazolijum hlorid, 0,28 mM fenazin-metosulfat i 1,3 mM  $\text{NAD}^+$  (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), koji su rastvoreni u 0,2 M Tris-puferu pH 8,2. Po isteku 10 min. inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbanca su merene na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču za mikrotitar ploče. Rezultati su predstavljeni u procentima citotoksičnosti u odnosu na ćelije lizirane sa Triton X-100 (pozitivna kontrola, 100% mrtve ćelije) koja je izračunata pomoću prikazane formule:

$$\% C = [(E-S)/(M-S)] \times 100, \text{ gde je:}$$

E – apsorbanca tretiranih ćelija

S – apsorbanca kontrolnih (netretiranih) ćelija

M – apsorbanca mrtvih ćelija dobijenih liziranjem sa Triton X-100

C – citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

### **3.4. ANALIZA PARAMETARA ĆELIJSKE SMRTI I PRODUKCIJE REAKTIVNIH KISEONIČNIH VRSTA METODOM PROTOČNE CITOFLUORIMETRIJE**

Parametri ćelijske smrti su analizirani metodom protočne citofluorimetrije na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Svaka analiza je obuhvatila 10 000 događaja tj. ćelija po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplicatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro.



### 3.4.1. Određivanje apoptoze i nekroze

Da bi se utvrdio udeo apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u kulturi nakon odgovarajućih tretmana ćelije su bojene sa aneksin V-fluorescein izotiocijanatom (aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI), a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Aneksin V-FITC je protein mase 35-36 kDa obeležen fluorescein izotiocijanatom (FITC) koji nakon pobuđivanja svetlošću argonskog lasera FACSCalibur aparata (talasna dužina 488 nm) emituje zelenu fluorescencu (FL1). Aneksin V ima veliki afinitet za vezivanje za fosfatidil-serin koji se nalazi u spoljašnjem delu fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane ćelija u apoptozi. PI je fluorescentna boja koja se umeće između nukleobaza dvolančane DNK i po pobuđivanju laserskom svetlošću protočnog citofluorimetra emituje crvenu fluorescencu (FL2) koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji. PI ne može da prođe kroz očuvanu ćelijsku membranu. Međutim, prilikom smrti ćelije dolazi do oštećenja ćelijske membrane tako da PI može da uđe u ćeliju i reaguje sa DNK. Dvostrukim bojenjem sa aneksin V-FITC i PI se tako mogu razlikovati populacije ćelija koje se na tačkastom dijagramu prikazuju u kvadratnoj raspodeli kao: žive (aneksin<sup>-</sup>/PI), apoptotične (aneksin<sup>+</sup>/PI) i nekrotične ćelije (aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Ukratko, bojenje ćelija je sprovedeno prema instrukcijama proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA). Po isteku inkubacije, ćelije iz bunara ploče sa 24 bunara su tripsinizirane, prebacivane u odgovarajuće FACS epruvete. Nakon centrifugiranja (500 g/5 min) i pranja (1 ml PBS), talog ćelija je resuspendovan u 100 µl 10x razblaženog originalnog pufera (aneksin-vezujući pufer) u koji je dodato 10 µl PI i 0,2 µl aneksin V-FITC. Po završetku inkubacije (30 minuta, 37 °C), u svaku epruvetu je dodato po 400 µl razblaženog pufera. Svaki uzorak je zatim analiziran na protočnom citofluorimetru. Rezultati su izraženi kao udeo odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija.

### 3.4.2. Određivanje fragmentacije DNK

Fragmentacija DNK je ispitivana protočnom citofluorimetrijom nakon fiksacije ćelija u etanolu i bojenja propidijum jodidom, po prethodno opisanom protokolu (Raicevic i sar., 2005). Ova metoda omogućava razlikovanje faza ćelijskog ciklusa, a

može se koristiti i za određivanje broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK, odnosno fragmentisanom DNK, kao parametrom apoptoze. Ukratko, po isteku tretmana, ćelije su tripsinizirane, 2x oprane u 1 ml PBS i finalno resuspendovane u 300 µl PBS i 700 µl hladnog apsolutnog etanola. Sadržaj svake epruvete je zatim pažljivo resuspendovan, a epruvete ostavljene na +4 °C preko noći. Zatim su ćelije centrifugirane (800 g/5 minuta/22 °C), oprane 1x1 ml PBS, a talog ćelija je finalno resuspendovan u 300 µl PBS uz dodatak 0,1 % Triton X-100 i 1 mg/ml RNA-ze (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku 15 minuta inkubacije na 37 °C, u svaku epruvetu je dodavano 0,05 mg/ml PI. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C, usledila je analiza na protočnom citometru. Ćelije sa hipodiploidnim sadržajem se na histogramu distribucije intenziteta FL2 fluorescence vide u sub-G<sub>0</sub> segmentu, koji prethodi G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa. Rezultati su izraženi kao % ćelija u sub-G<sub>0</sub> fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

### **3.4.3. Određivanje aktivacije kaspaza**

Aktivacija kaspaza, enzima odgovornih za pokretanje i izvršavanje apoptotskog mehanizma ćelijske smrti, ispitivana je na protočnom citofluorimetru nakon bojenja ćelija fluorescentno obeleženim pankaspaznim inhibitorom, koji se specifično vezuje za aktivirane kaspaze, prema instrukcijama proizvođača (ApoStat; R&D Systems, Minneapolis, MN). Ukratko, nakon odgovarajućih tretmana ćelije su tripsinizirane, centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C) i oprane u PBS. Zatim je talog ćelija resuspendovan u 300 µl medijuma koji je sadržao 3 µl fluorescentno obeleženog (FITC) pan-kaspaznog inhibitora (finalna koncentracija 0.5 µg/ml, čitanje u FL1). Po isteku 30 minuta inkubacije na 37 °C, ćelije su oprane i finalno resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta FL1 fluorescence, pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolu ukazuje na povećanje aktivnosti kaspaza.

### **3.4.4. Određivanje autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom**

Zakišeljavanje citoplazme kao pokazatelj porasta broja ili zapremine kiselih vezikula autofagolizozoma, analiziran je protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija pH senzitivnom bojom akridin oranžom. Akridin oranž emituje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL3) u kontaktu sa kiselim autofagolizozomima, dok na neutralnom pH kakav je u citoplazmi fluorescira zeleno (FL1). Ukratko, po isteku tretmana, ćelije su tripsinizirane, centrifugirane (500 g/5 min/22 °C) i oprane 2 puta sa 1 ml PBS. Talog ćelija je zatim resuspendovan u 300 µl medijuma koji je sadržao 1 µM boju akridin-oranž (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku 30 min inkubacije na 37 °C ćelije su oprane, resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane protočnim citofluorimetrom. Izračunavanjem relativnog odnosa intenziteta narandžasto-crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1) prema njihovom odnosu u kontrolnim ćelijama (arbitrarno uzet za jedan) procenjuje se da li je došlo do zakišeljavanja citoplazme, odnosno autofagije.

### **3.4.5. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta**

Da bi se odredila ukupna produkcija RKV ćelije su bojene neselektivnim redoks senzitivnim bojama dihidrorodamin 123 (DHR) i dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFDA) (oba od Invitrogen, Paisley, UK), dok je za detekciju produkcije superoksidnog anjona korišćena fluorescentna boja dihidroetidijumom (DHE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Ćelije su bojene prema instrukcijama proizvođača. Ukratko, DHR i DCFDA su dodavane u ćelijske kulture na početku tretmana i to DHR u finalnoj koncentraciji 2 µM, a DCFDA 10 µM, dok je DHE po isteku tretmana dodavan u finalnoj koncentraciji 20 µM i inkubiran 30 minuta na 37°C. Nakon toga, ćelije su tripsinizirane, prebačene u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C), a zatim oprane sa 1 ml PBS. Ćelije su finalno resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence (FL1 za DHR i DCFDA bojenje, a FL2 za DHE bojenje), pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolu ukazuje na povećanje produkcije RKV, odnosno superoksidnog anjona.

### 3.4.6. Određivanje potencijala mitohondrijalne membrane

Potencijal membrane mitohondrija određivan je uz pomoć lipofilne katjonske boje DePsipher (R&D Systems, Minneapolis, MN), koja pri hiperpolarizaciji unutrašnje membrane mitohondrija stvara agregate fluorescentno crvene boje (FL2). Međutim, pri depolarizaciji membrane mitohondrija ne dolazi do stvaranja agregata molekula boje i ona ostaje u svojoj fluorescentno zelenoj monomernoj formi (FL1). Ukratko, ćelije su po isteku tretmana bojene u skladu sa instrukcijama proizvođača. Nakon tripsinizacije, centrifugiranja i pranja, talog ćelija je resuspendovan u 300  $\mu$ l 10 x razblaženog pufera za DePsipher u koga je dodata boja (finalna koncentracija 5  $\mu$ g/ml). Nakon inkubacije (37 °C, 30 minuta) ćelije su centrifugirane, oprane u 1 ml PBS i finalno resuspendovane u 500  $\mu$ l PBS, a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani kao odnos intenziteta zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2), pri čemu porast u odnosu na kontrolu (arbitrarno uzetu kao 1) predstavlja depolarizaciju, dok smanjenje ukazuje na hiperpolarizaciju membrane mitohondrija.

### 3.5. IMUNOBLOT ANALIZA

Po isteku odgovarajućih tretmana U251 i B16 ćelije su lizirane u odgovarajućem puferu (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF i 10  $\mu$ l proteaza inhibitornog koktela) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na ledu, u trajanju od 30 minuta, centrifugirane na 14 000 g/15 minuta/+4°C, a supernatanti su izdvojeni za dalju analizu.

Sadržaj proteina u svakom uzorku utvrđivan je metodom po Bradfordu. Princip ove metode je da proteini reaguju sa bojom *Coomassie Brilliant Blue* i prevode je u anjonski oblik, što uzrokuje promenu boje od smeđe-crvene u plavu. Absorbanca je očitavana na čitaču za mikrotitarske ploče na 570 nm. Intenzitet dobijene plave boje je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku, pri čemu su koncentracije proteina u uzorcima određene na osnovu standardne krive. Standardna kriva je konstruisana nakon očitavanja apsorbanci iz reakcije standardnih rastvora albumina iz seruma govečeta (eng. *bovine serum albumin*; BSA) u koncentracijama: 5, 10, 15 i 20 mg/ml sa bojom.

Ista količina proteina iz svakog uzorka je razdvojena tehnikom denaturišuće gel elektroforeze (SDS-PAGE) na 10-12 % gelu od poliakrilamida. Razdvojeni proteini su sa poliakrilamidnog gela prebačeni na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Preko noći membrane su inkubirane na +4 °C sa primarnim zečjim antitelima na humanu kaspazu-3 (1:500, AnaSpec, Fremont, CA, USA), LC3 (1:900), fosfo-Akt (1:1000), Akt (1:1000), fosfo-AMPK (1:1000), AMPK (1:1000), fosfo-ERK1/2 (1:1000), ERK1/2 (1:1000) (sve od Cell Signaling Technology, Beverly, MA) ili  $\beta$ - aktin (1:5000) (Abcam, Cambridge, MA). Nakon 1,5 h inkubacije (+21 °C) sa HRP obeleženim anti-zečjim IgG antitelom (1:1000; od Cell Signaling Technology, Beverly, MA) trake izdvojenih proteina su vizuelizovane pomoću reagensa za pojačavanje hemiluminescence (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) na rendgenskom filmu (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK). Ekspresija proteina kvantifikovana je denzitometrijom pomoću ImageJ softvera i izražena relativno u odnosu na  $\beta$ -aktin (LC3-II) ili odgovarajuće totalne proteine (fosfo-AMPK, fosfo-Akt, fosfo-ERK). Rezultati su predstavljeni u odnosu na kontrolu kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost jedinice.

### **3.6. ELISA TEST ZA ADHERENTNE ĆELIJE (c-ELISA)**

Ovaj test zasniva se na interakciji antigena i antitela, i modifikacija je klasične metode ELISA (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) u kojoj se određuje nivo određenog antigena prisutnog u supernatantu kulture, lizatu ćelija ili telesnoj tečnosti. Modifikacija se sastoji u tome što se ćelije, zalepljene za dno bunarčića ploča za kultivaciju ćelija, fiksiraju i direktno izlažu odgovarajućim antitelima (Versteeg i sar., 2000). Na ovaj način se mogu određivati relativne količine antigena vezanih za ćelije (membranski ili unutarćelijski molekuli). Za izvođenje ove metode, korišćene su ploče sa 96 bunara (Maxisorp, Nunc, Rochild, Danska) čiji su bunarčići za kultivaciju pre razlivanja ćelija oblagani poli-L-lizinom (10  $\mu$ g/ml). Nakon 30 minuta inkubiranja na 37 °C, iz ploča je odlivan poli-L-lizin, a bunarčići 2 puta prani sa PBS. Tek nakon ovog postupka, koji je neophodan za efikasnije lepljenje ćelija, konfluentne B16 ćelije su tretirane određenom dozom metformina u terminima naznačenim u rezultatima, a zatim je usledila fiksacija. Fiksacija ćelija je vršena izlaganjem 4 % paraformaldehidu u

trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Čelije su potom prane 3 puta u 0,1 % rastvoru Tritona X-100 u PBS (u daljem tekstu PBST), da bi se čelije permeabilizovale i tako obezbedilo bojenje unutar ćelija, te su nakon toga izlagane 1 % rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u PBST u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Time je blokirano dejstvo endogenih peroksidaza. Nakon toga čelije su opet oprane tri puta sa PBST, a zatim blokirane sa 10 % rastvorom FCS u PBST u trajanju od 3 sata na sobnoj temperaturi. Sledilo je pranje sa PBST, a potom i izlaganje primarnom antitelu na ispitivani antigen, koje je trajalo 1 sat na 37 °C. Potom su čelije 4 puta prane sa PBST, i izlagane odgovarajućem sekundarnom antitelu vezanom sa peroksidazom rena, specifičnom za primarno antitelo, opet u trajanju od 1 sat na 37 °C. Nakon 4 pranja sa PBST, u bunarčiče je nalivan supstrat za peroksidazu rena - TMB. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, sledilo je zaustavljanje reakcije sa 0,1 M HCl. Absorbancija je merena na 450 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju. Absorbancija očitana u kulturama koje su izlagane samo sekundarnom, a ne i primarnom antitelu, smatrana je nespecifičnom i oduzimana je od odgovarajućih vrednosti absorbancije u kulturama izloženim i primarnom i sekundarnom antitelu. Konačno, krajnji rezultat je predstavljao ekspresiju konkretnog proteina u ćeliji iskazanu indeksom absorbancije i relativnog broja živih ćelija u kulturi dobijenog kristal violet testom. Primarna antitela korišćena su u koncentracijama 1:250 za anti-ERK1/2, anti-IκB, anti-p38, anti-JNK, 1:500 za p53 i AMPK (Santa Cruz Biotechnology, USA). Sekundarna antitela bila su konjugovana sa peroksidazom rena (HRP) i korišćena su u sledećim koncentracijama anti-mišiji IgG 1:2500, anti-mišiji IgM 1:4000 i anti-zečiji IgG 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, USA).

### **3.7. FOTOGRAFISANJE ĆELIJSKIH KULTURA**

Različite ćelijske kulture fotografisane su Kodak MDS 100 digitalnom kamerom za svetlosni mikroskop.

### **3.8. ODREĐIVANJE NIVOA EKSPRESIJE iRNK ZA Bax, Bcl-2 i p21**

#### **3.8.1. Izolacija RNK**

Da bi se iz B16 ćelija izolovala RNK tumorske ćelije su lizirane RNA Isolatorom (Invitrogen, Paisley, UK). Iz kultura je odlivan supernatant, a ćelije prelivane sa 250  $\mu$ l izolatora u kome su resuspendovane provlačenjem nekoliko puta kroz nastavak pipete. Dobijeni ćelijski lizati skupljani su u plastične epruvete (1,5 ml), a nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodavano im je po 50  $\mu$ L hloroforma. Nakon intenzivnog vorteksiranja uzorci su inkubirani 10 minuta na +4 °C, a zatim centrifugirani 15 minuta na 12000 g na + 4 °C. Nakon centrifugiranja jasno su se izdvajale gornja vodena faza koja je sadržavala RNK, donja hloroformska faza sa proteinima i lipidima, i intermedijarna faza sa DNK. Vodena faza je skupljana u plastične epruvete, a zatim joj je dodavana istovetna zapremina izopropanola. Nakon mešanja sadržaja epruveta, ćelije su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirane 15 minuta na 12000 g na + 4 °C. Posle centrifugiranja na dnu epruveta formirao se talog RNK. Supernatant je odlivan, a talog opran dva puta po 5 minuta na 7500 g u 1 ml 70 % etanola. Nakon odlivanja etanola, pipetom je skupljan preostali etanol. Talog RNK sušen je oko 5 minuta (dok ne ispari sav etanol), i konačno rastvaran u 20  $\mu$ l destilovane vode.

#### **3.8.2. Reverzna transkripcija**

Nakon merenja RNK koncentracije na Gene Quant kolorimetru 1  $\mu$ g RNK rastvaran je u 15  $\mu$ l vode sa 0,2  $\mu$ g nasumičnih prajmera (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania) u finalnoj koncentraciji 1 mM. Kao kontrola za eventualnu kontaminaciju služila je voda korišćena umesto RNK. Rastvori su inkubirani 10 minuta na 70 °C pri čemu su se heksamerni nasumično vezivali za RNK, posle čega su uzorci stavljeni 5 minuta na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4  $\mu$ l pufera za reverznu transkripciju (5 x First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 1  $\mu$ l (200 U/ $\mu$ l, Fermentas, Vilnius, Lithuania) reverzne transkriptaze, a zatim su uzorci inkubirani 10 minuta na 25 °C, pa 60 minuta na temperaturi 42 °C na kojoj se odigravala reakcija

reverzne transkripcije. Reakcija je prekinuta inkubacijom uzoraka 10 minuta na 70 °C. Na ovaj način dobijana je cDNK koja je u rastvorenom stanju čuvana na + 4 °C do upotrebe u reakciji lančanog umnožavanja.

### **3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR, real time polymerase chain reaction)**

Real-time PCR rađen je na aparatu ABI Prism 7500 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reakcije su pripremane prema standardnom protokolu za QuantiTectSYBR Green RT-PCR u jednom koraku (Applied Biosystems, Cheshire, UK), koristeći komercijalno dostupne prajmere za p21, Bax- $\alpha$  ili Bcl-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Prajmeri za  $\beta$  aktin (sens 5'-TCCTTCTTGGGTATGG-3' i antisens 5'-ACGCAGCTCAGTAACAG-3') su dizajnirani koristeći Primer Express® software v2.0 (Applied Biosystems, Cheshire, UK). Inicijalni korak RT-PCR je bio 2 minuta na 50 °C koji je praćen zadržavanjem od 10 minuta na 95 °C. U reakciji je bilo 40 ciklusa koji su se sastojali od 15 s topljenja na 95 °C, za kojim je sledio 1 minut vezivanja prajmera za DNK i sinteze DNK lanaca na 60 °C. Završni korak je bio inkubacija na 60 °C u trajanju od 1 minuta. Sve reakcije su rađene u triplikatu. Prag analize ciklusa (*Ct, cycle of threshold*) je bio podešen na 0.1 relativnih fluorescentnih jedinica. Prosečne *Ct* vrednosti kontrolnih triplikata ( $\beta$ -aktin) su oduzete od prosečnih *Ct* vrednosti triplikata gena od interesa i na taj način je dobijen  $\Delta C_t$ , dok je relativna ekspresija gena izražena kao  $2^{-\Delta C_t}$ . Rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na 1. Vrednosti standardnih devijacija za Bax/Bcl-2 odnos su izračunate na sledeći način:  $Cx\sqrt{(a^2/A^2+b^2/B^2)}$ , gde je  $C=Bax/Bcl-2$  odnos, dok je  $a$  standardna devijacija vrednosti Bax ( $A$ ) i  $b$  standardna devijacija Bcl-2 vrednosti ( $B$ ).

### **3.9. IN VIVO INDUKCIJA I TRETMAN MELANOMA**

C57BL/6 miševi su nabavljeni od Charles River Laboratories (L'Arbresle Cedex, France) i gajeni pod uobičajenim uslovima u odgajalištu za životinje na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju (Beograd, Srbija). Životinje su gajene u zasebnim kavezima za vreme eksperimenta. B16 ćelije melanoma su sakupljene iz ćelijskih



kultura tripsinizacijom i subkutano implantirane ( $2.5 \times 10^5$  ćelija u 100  $\mu$ l PBS) u dorzalni lumbosakralni region C57Bl/6 miševa starih 8-10 nedelja. Metformin se odmah apsorbuje kada se daje oralno (Sambol i sar., 1996). Stoga, životinje kod kojih se razvio melanom su oralno primale metformin u vodi za piće (600 mg/kg/dnevno) sedmog dana od inokulacije tumora tokom narednih 14 dana. Kontrolna grupa je primala vodu bez dodatka metformina. Koncentracija metformina koja je neophodna da bi se postigao dnevni unos od 600mg/kg/dnevno, je procenjena za svakog miša na osnovu prosečne dnevne potrošnje vode u prvih 6 dana eksperimenta (od inokulacije tumora do dodavanja metformina). Voda koja sadrži metformin je sveže pripremana svakog ponedeljka, srede i petka, kada je proveravana potrošnja vode i zahtevana količina metformina ponovo izračunata. Životinje su žrtvovane 21-og dana nakon implantacije tumora, tumori su izvađeni i izmerene su njihove težine. Svi eksperimenti na životinjama su urađeni prema principima dobre laboratorijske prakse Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### **3.10. USPOSTAVLJANJE PRIMARNE KULTURE ASTROCITA PACOVA**

#### **3.10.1. Uzimanje tkiva za postavljanje ćelijske kulture**

Za uspostavljanje ćelijske kulture astrocita korišćeni su Wistar pacovi oba pola starosti 1-3 dana. Životinje su dobijene iz uzgajališta ICN Galenike u Beogradu.

Kulture astrocita pripremane su prema modifikovanoj metodi (McCarthy i deVellis 1980). Pacovi soja Wistar stari 1-3 dana žrtvovani su u etarskoj anesteziji, (u skladu sa etičkim principima rada sa eksperimentalnim životinjama i po standardima dobre laboratorijske prakse), posle čega su pomoću sterilnih instrumenata pod aseptičnim uslovima otvarane lobanje i vađeni mozgovi.

Lobanja je otvarana sa zadnje strane, tako da se maksimalno poštedi tvrda moždanica (*dura mater*), a zatim je tentorijum presečen sa obe strane. Mali mozak i moždano stablo su presečeni i ceo mali mozak odstranjen je iz lobanjske duplje. Time je otvoren put za manipulaciju na bazi velikog mozga. Pošto je ceo veliki mozak pažljivo odvojen od tvrde moždanice, baza mozga je pažljivo špatulom odignuta od baze lobanje i veliki mozak je zatim vađen u celini i stavljan u sterilne staklene Petri-jeve šolje koje

su sadržale medijum obogaćen glukozom (u svim kasnijim postupcima dobijanja i kultivacije astrocita je korišćen medijum obogaćen glukozom, u daljem tekstu, medijum).

### **3.10.2. Izdvajanje frakcije ćelija iz moždanog tkiva i njihovo zasejavanje**

Moždano tkivo je prvo nekoliko puta isprano u medijumu, a potom usitnjeno oštrim makazama do veličine komadića od nekoliko milimetara. Ovako dobijeni komadići moždanog tkiva su dalje homogenizovani mehanički, pomoću sterilnih plastičnih nastavaka i automatske pipete, naizmeničnom aspiracijom i energičnim istiskivanjem sadržaja kroz pipete različite zapremine (počevši od najveće ka najmanjoj). Tako dobijeni homogenat moždanog tkiva centrifugiran je na 1400 obrtaja po minutu (rpm) tokom 10 minuta, a zatim je izdvojen talog resuspendovan u medijumu. Dobijena suspenzija ćelija je potom prenetu u pripremljen flask (25 cm<sup>3</sup>, Flow Laboratories) za kultivisanje ćelija (prethodno presvučen poly-L-lysinom, PLL, aminokiselinom koja formira želatinozni film pozitivno naelektrisan sloj mikroskopske debljine na površini flaska i omogućava lakšu i bolju adherenciju ćelija na površinu flaska). Tako pripremljene ćelije su inkubirane 24 sata u vlažnoj atmosferi na 37 °C sa 5 % CO<sub>2</sub>. Ćelije su uzgajane u medijumu RPMI- 1640 koji je obogaćen 10%-tnim fetalnim goveđim serumom (engl. *fetal bovine serum*, FBS), 2 mM glutaminom i smešom antibiotika (ICN Galenika) koju čine: penicilin (100 IJ/ml), gentamicin (100 µg/ml) i nistatin (25 µg/ml). Medijum je za potrebe rada sa primarnom kulturom astrocita pacova dodatno obogaćen glukozom (finalna koncentracija od 6 g/l). Ćelije su nakon toga ostavljene na pokretnoj platformi (šejkeru) preko noći, kako bi se obezbedilo bolje selektovanje astrocita.

### **3.10.3. Održavanje primarne kulture astrocita**

Po isteku 24 sata od uspostavljanja primarne kulture astrocita, ćelijama je zamenjen medijum, kako bi se uklonile i ćelije koje nisu adherirale za podlogu. Po ispiranju adherentnih ćelija sa PBS-om, ćelijama je dodat svež medijum (istog sastava kao i medijum koji je korišćen pri uspostavljanju primarne kulture). Ista procedura

zamene starog medijuma sa svežim je ponavljana svaka 48-72 sata, s tim što je koncentracija FBS-a u medijumu posle 4-5 dana od zasejavanja smanjena sa 10 % na 5 %.

Sedmog dana od uspostavljanja primarne kulture, ćelije su tokom 24 sata u uslovima vlažne atmosfere na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> ostavljene na rotirajućoj platformi preko noći. Cilj ovog koraka jeste da se izdvoji što je moguće čistija primarna kultura astrocita pacova, obzirom da ostale moždane ćelije (mikroglia i oligodendrociti) u odnosu na astrocite imaju slabiji potencijal da adheriraju za podlogu. Naknadnim tretmanom preostalih adherentnih ćelija (astrociti) 0,05 % tripsinom dobijena je kultura astrocita. Ove ćelije su dalje kultivisane u flaskovima koji nisu bili presvučeni PLL-om. Zamena medijuma u kulturama je i dalje vršena svakog trećeg dana, a po postizanju konfluentnosti (80 % površine flaska), ćelije su tretirane tripsinom (standardna procedura tripsinizacije sa Tripsin- EDTA 0.05%) kako bi se adherentni astrociti preveli u ćelijsku suspenziju. Određivani su broj i vijabilitet ćelija supravitalnim bojenjem tripan plavim i astrociti rasejavani u nove flaskove. Osobina astrocita da adheriraju za podlogu iskorišćena je za njihovu separaciju od ostalih ćelija CNS-a, tako da se smatra da u ćelijskoj populaciji koja je kao adherentna ostala u flasku više od 97 % čine astrociti, što je potvrđeno bojenjem ovih ćelija monoklonskim antitelom specifičnim za glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP; engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*; razblaženje 1:400).

Za potrebe eksperimenta ćelije su u odgovarajućem broju zasejavane u ploče sa dvadeset četiri i devedeset šest bunara (Libro Inc.). Sve ćelijske kulture gajene su u inkubatoru na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi koja je sadržala 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.11. CHOU TALALAY METHOD**

Da bi se analizirao tip interakcije (aditivni, sinergistički ili antagonistički) između metformina i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ili n-C<sub>60</sub>, ćelije su tretirane različitim dozama svake supstance zasebno, i u odgovarajućim kombinacijama. Ćelijski vijabilitet je ispitan upotrebom kristal violet testa. Vrednosti kombinatnog indeksa koji odražava aditivnu (=1), sinergističku (<1) ili antagonističku (>1) interakciju su izračunate prema Chou-Talalay metodu.

### 3.12. STATISTIČKA ANALIZA

U statističkoj obradi podataka korišćene su metode analitičke statistike. Za procenu značajnosti razlike nezavisnih uzoraka korišćeni su parametarski test – Studentov t-test, a za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poredjenja. Vrednost  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

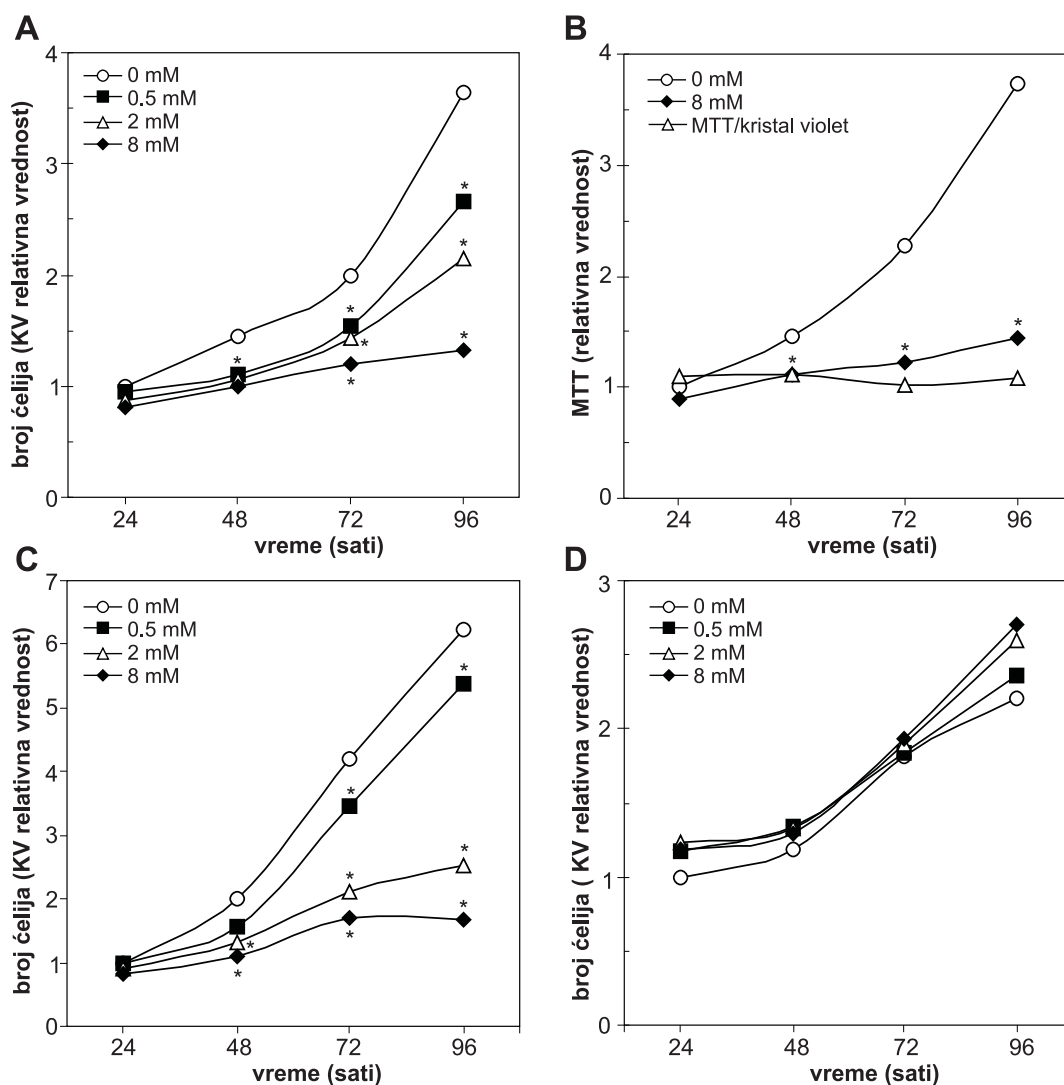
### 4.1. Metformin smanjuje proliferaciju C6 i U251 ćelija glioma, ali ne i primarnih astrocita

Da bi se ispitaio efekat metformina na proliferaciju ćelija glioma, C6 i U251 ćelije glioma su zasejane u maloj gustini (3000/po bunariću) i njihov broj je određen kristal violet testom nakon inkubacije od 4 dana. Metformin je inhibirao porast u broju ćelija glioma na dozno zavisani način (Slika 1A, C), a najveća koncentracija leka (8 mM) u potpunosti je zaustavila proliferaciju ćelija glioma. Slični rezultati su dobijeni MTT testom koji meri aktivnost mitohondrijalnih dehidrogenaza (Slika 1B). Imajući u vidu da se vrednosti mitohondrijalne respiracije po ćeliji (izražene kao MTT/kristal violet odnos) nisu značajno promenile u kulturama ćelija glioma tretiranih metforminom (Slika 1B), zaključili smo da funkcija mitohondrija nije narušena. Za razliku od transformisanih gliomskih ćelija, primarni pacovski astrociti su bili u potpunosti otporni na antiproliferativno dejstvo metformina, kao što se vidi na kristal violet testu (Slika 1D). Dakle, antiproliferativno delovanje metformina specifično je za tumorske glijalne ćelije.

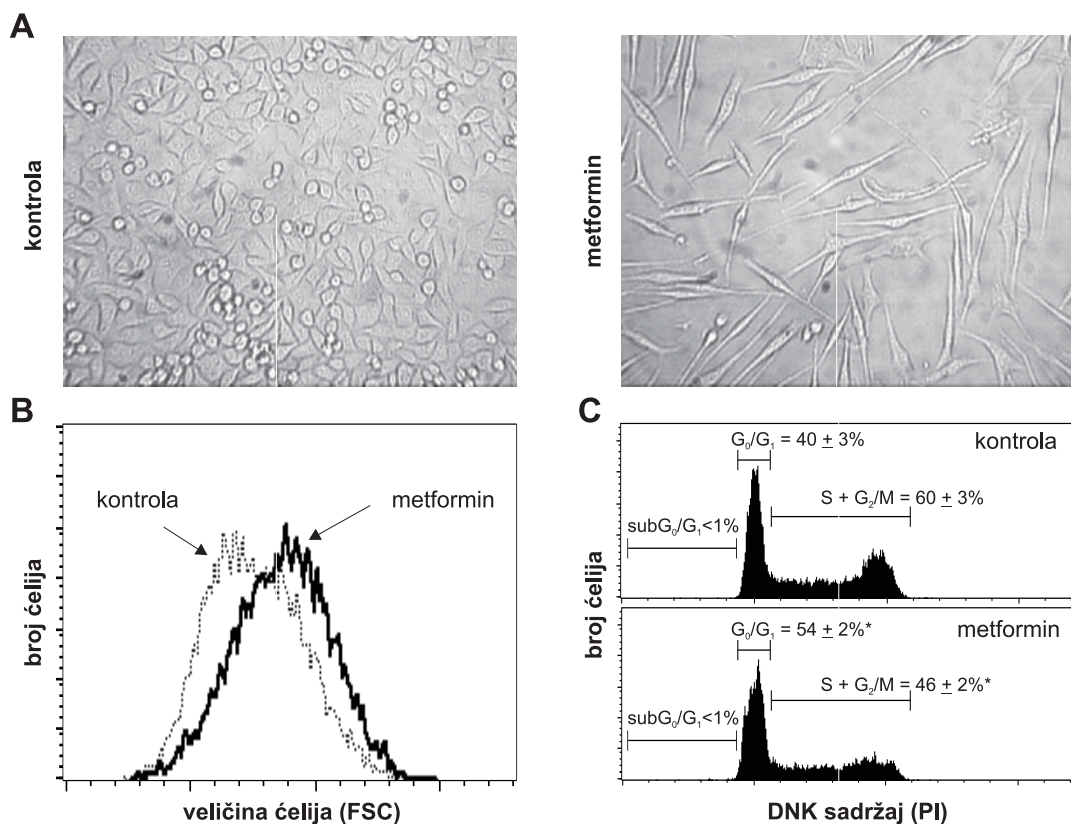
### 4.2. Metformin menja ćelijsku morfologiju i ćelijski ciklus u kulturama glioma

Da bi se ispitaio uticaj metformina na morfologiju, veličinu i ćelijski ciklus nekonfluentnih gliomskih ćelija, urađene su mikroskopija i analiza protočnom citofluorimetrijom. Mikroskopska analiza je pokazala dramatične promene u morfologiji ćelija glioma, koje su postale veće i poprimile vretenasti oblik sa značajno produženim nastavcima (Slika 2A). Međutim, ove morfološke promene nisu bile povezane sa diferencijacijom ćelija glioma u zrele astrocite, budući da je pokazano da se ekspresija astrocitnog markera GFAP značajno smanjila nakon tretmana metforminom na  $61 \pm 5.9\%$  od vrednosti zapažene u netretiranim ćelijama ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ). Analiza protočnom citofluorimetrijom pokazala je da ćelije glioma tretirane metforminom pokazuju veće FSC (forward scatter) vrednosti, u poređenju sa kontrolnim ćelijama

(Slika 2B), potvrđujući porast u veličini ćelije. Procenat ćelija u  $G_0/G_1$  fazi ćelijskog ciklusa je bio značajno povećan, dok apoptotične ćelije sa fragmentisanom DNK (sub- $G_0/G_1$ ) nisu primećene nakon tretmana metforminom (Slika 2C). Ovi rezultati pokazuju da je efekat metformina na nekonfluentne ćelije glioma posledica zaustavljanja ćelijskog ciklusa i proliferacije ćelija, a ne njegovog citotoksičnog delovanja.



**Slika 1. Metformin blokira proliferaciju glioma ćelija male gustine.** (A-D) C6 ćelije niske gustine (A, B), U251 ćelije (C) ili primarni astrociti (D) su inkubirani sa metforminom, a broj ćelija (kristal violet, KV) ili mitohondrijalna aktivnost (MTT) su mereni u navedenim vremenskim intervalima. Prikazan je reprezentativan od tri eksperimenta, a rezultati su srednja vrednost triplikata. (SD < 15% srednje vrednosti; \*p < 0.05 odnosi se na netretirane ćelije)



**Slika 2. Metformin menja morfologiju, veličinu i zaustavlja ćelijski ciklus ćelija glioma.** Nakon 96 sati tretmana metforminom (4 mM) morfologija C6 ćelija je ispitivana svetlosnom mikroskopijom (A), dok su veličina ćelije (B) i faze ćelijskog ciklusa (C) analizirane koristeći protočnu citofluorimetriju. Prikazane su reprezentativne fotografije i histogrami. Procenti u fazama ćelijskog ciklusa su srednje vrednosti ± SD iz tri nezavisna eksperimenta (\*p < 0.05)

#### 4.3. Metformin indukuje morfološke promene i apoptozu u konfluentnim ćelijama glioma

Dalje je ispitivan uticaj metformina na konfluentne ćelije glioma, očekujući slabiji efekat usled smanjene stope proliferacije konfluentnih ćelija. Međutim, broj početnih konfluentnih ćelija glioma nakon 48 sati inkubacije sa metforminom (4 mM), je smanjen na <30% kontrolnih vrednosti. Ovoliko smanjenje broja ćelija nije moglo biti posledica samo zaustavljanja proliferacije. U skladu sa tim, analize protočnom citofluorimetrijom su pokazale da je metformin prouzrokovao značajan porast u broju gliomskih ćelija u ranim (annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) ili kasnim (annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) fazama apoptoze

(Slika 3A). Sa druge strane, konfluentni primarni astrociti su ostali otporni na proapoptotsko delovanje metformina (Slika 3B). U skladu sa indukcijom apoptoze, C6 gliomske ćelije tretirane metforminom izgubile su svoju poligonalnu morfologiju i postale manje sa granuliranim izgledom i slabo definisanim granicama (slika 3C). Nasuprot njima, primarni astrociti su u potpunosti sačuvali svoju normalnu morfologiju u prisustvu metformina (Slika 3D). Dakle, metformin indukuje apoptozu u konfluentnim ćelijama glioma, ali ne u primarnim astrocitima.

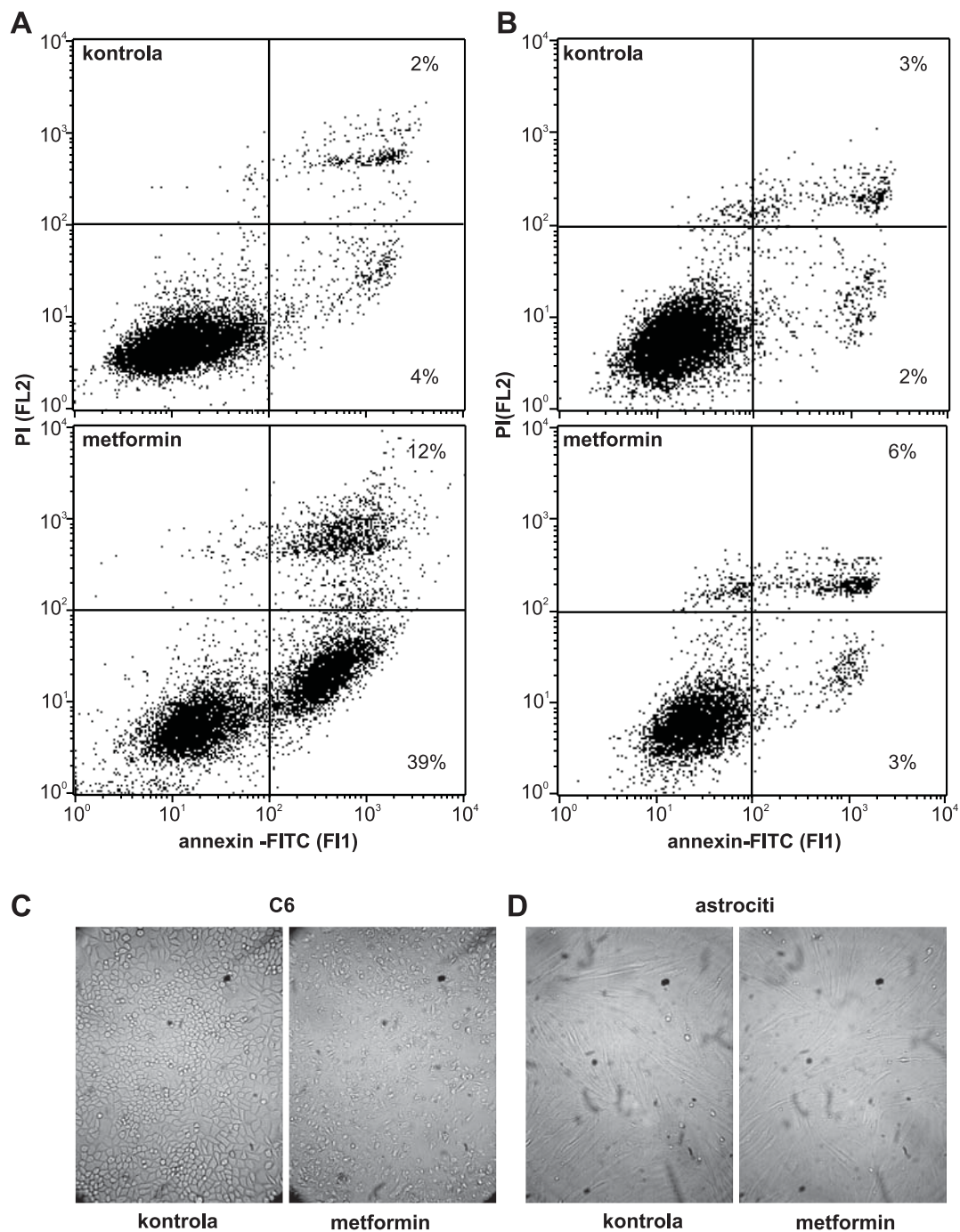
#### **4.4. Metformin indukuje aktivaciju kaspaza u konfluentnim ćelijama glioma**

U narednim eksperimentima ispitivano je da li je apoptoza indukovana metforminom u konfluentnim ćelijama glioma zavisna od aktivacije kaspaza. Analiza protočnom citofluorimetrijom pokazala je značajnu vremenski zavisnu aktivaciju kaspaza u konfluentnim C6 ćelijama tretiranih metforminom (Slika 4A), dok je samo neznatna aktivacija kaspaza primećena u primarnim astrocitima pod istim uslovima kultivacije (Slika 4B). Aktivacija kaspaza, porast u broju apoptotičnih ćelija i fragmentacija DNK su bile efikasno sprečene pan-kaspaznim inhibitorom zVAD-fmk i inhibitorom sinteze proteina cikloheksimidom (CHX) (Slika 4C). Navedeni podaci potvrđuju da je toksičnost metformina prema konfluentnim ćelijama glioma posledica indukcije apoptoze zavisne od kaspaza i sinteze proteina.

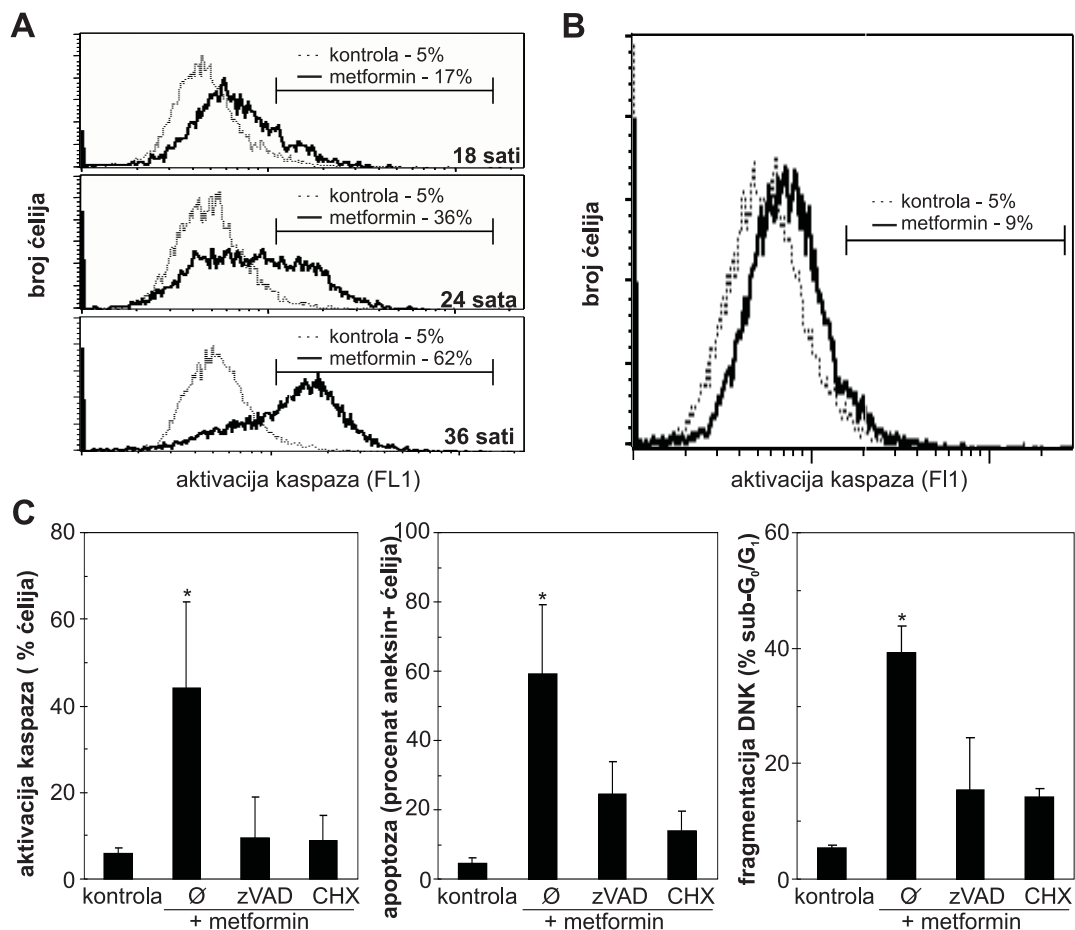
#### **4.5. U konfluentnim ćelijama glioma metformin indukuje depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres**

Da bi se razjasnili mehanizmi koji dovode do apoptoze indukovane metforminom u konfluentnim ćelijama glioma, ispitivano je da li metformin može da izazove depolarizaciju mitohondrija i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, događaje koji su često povezani sa otpočinjanjem apoptotske kaskade. Konfluentne C6 ćelije obojene fluorescentnom bojom DePsipher, koja detektuje promenu membranskog potencijala mitohondrija, analizirane su na protočnom citofluorimetru. Pokazano je da tretman metforminom indukuje depolarizaciju membrane mitohondrija (Slika 5A).



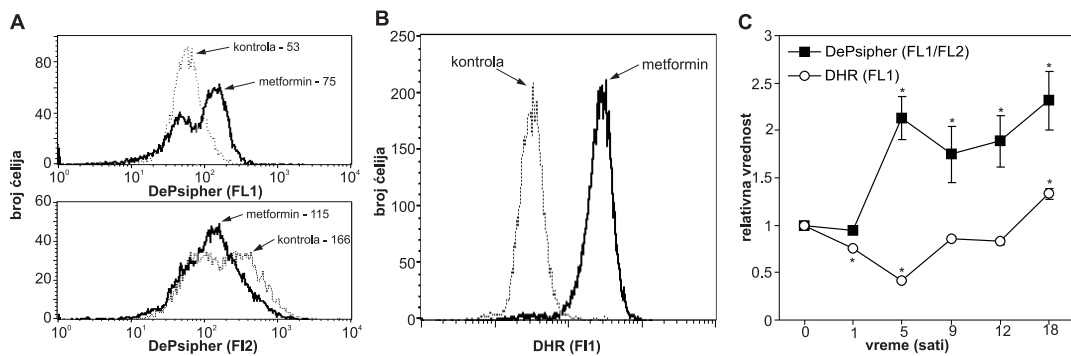


**Slika 3. Metformin indukuje apoptozu u konfluentnim glioma ćelijama.** (A-D) Konfluentne C6 ćelije (A, C) ili konfluentni primarni astrociti (B, D) su inkubirani sa metforminom (4 mM). Nakon 48h prisustvo apoptoze analizirano je protočnim citofluorimetrom (A, B), dok su promene u ćelijskoj morfologiji posmatrane pod svetlosnim mikroskopom (C, D). Prikazane su reprezentativne fotografije i dot plotovi.



**Slika 4. Metformin indukuje apoptozu zavisnu od kaspaza u konfluentnim glioma ćelijama.** (A, B) Konfluentne C6 glioma ćelije (A) ili astrociti (B) su tretirani metforminom (4 mM), a zatim je protočnom citofluorimetrijom ispitivana aktivacija kaspaza u navedenim vremenskim intervalima (A) ili nakon 36 sati (B). (C) Konfluentne C6 ćelije su inkubirane sa metforminom (4 mM) u odsustvu ili prisustvu pankaspaznog inhibitora zVAD-fmk (50 mM) ili blokatora sinteze proteina cikloheksimida (5 mg/ml). Aktivacija kaspaza, apoptoza i DNK fragmentacija su analizirane nakon 48 sati protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su reprezentivni histogrami (A, B). Podaci u (C) su srednje vrednosti $\pm$ SD iz tri nezavisna eksperimenta (\* $p$ <0.05 odnosi se i na kontrolu i zVAD-fmk/CHX tretirane ćelije).

Depolarizacija membrane mitohondrija je korelirala sa oslobađanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV), koje je detektovano redoks senzitivnom bojom DHR (Slika 5B). Vremenska analiza je pokazala da se depolarizacija mitohondrija indukovana metforminom javlja nekoliko sati pre produkcije RKV (Slika 5C), što sugerise da oksidativni stres nije inicijalni uzrok oštećenja mitohondrija. Dakle, metformin indukuje depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres u konfluentnim ćelijama glioma.

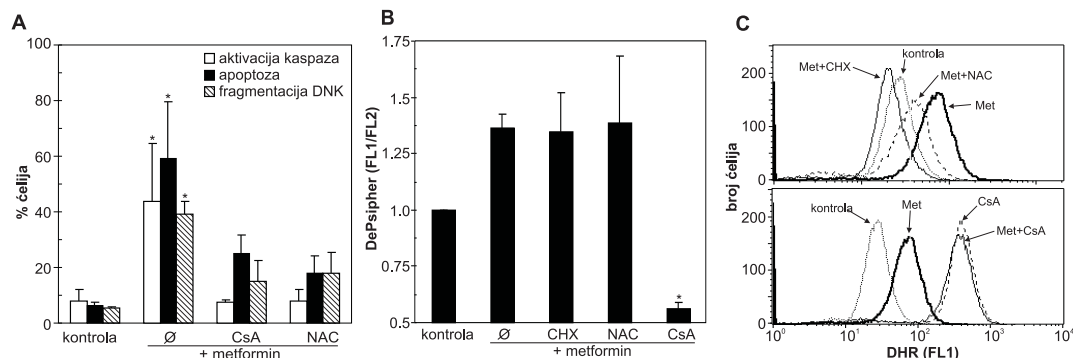


**Slika 5. Metformin izaziva depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres u ćelijama glioma.** (A, B) Konfluentne C6 ćelije su tretirane metforminom (4 mM), nakon 24 sata ispitivana je depolarizacija mitohondrija merenjem DePsipher (A) i produkcija RKV merenjem DHR fluorescence (B) (vrednosti u A su geomean fluorescence). (C) Depolarizacija mitohondrija i produkcija RKV su analizirane u navedenim vremenskim intervalima u konfluentnim C6 ćelijama tretiranih metforminom (4 mM). Prikazani su reprezentivni podaci iz 4 eksperimenata (A) ili tri eksperimenata (B). Podaci iz (C) su srednje vrednosti $\pm$ SD tripplikata reprezentativnog od dva nezavisna eksperimenata. Vrednost \* $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne ćelije (C).

#### 4.6. Apoptoza indukovana metforminom posredovana je depolarizacijom mitohondrija i oksidativnim stresom u glioma ćelijama

U daljim eksperimentima ispitivano je u kakvom su međusobnom odnosu oksidativni stres i depolarizacija mitohondrija, i da li su oni odgovorni za indukciju apoptoze metforminom. Ciklosporin A (CsA), inhibitor otvaranja mitohondrijalnih pora, koje prethodi depolarizaciji membrane mitohondrija, (Loeffler i Kroemer 2000), kao i antioksidant N-acetil cistein (NAC) (Zafarullah i sar., 2003), sprečili su aktivaciju kaspaza, fragmentaciju DNK i apoptozu u konfluentnim C6 ćelijama tretiranim metformin (Slika 6A). Sa druge strane, NAC ili CHX, za razliku od CsA, nisu sprečili depolarizaciju mitohondrija u konfluentnim ćelijama glioma (Slika 6B), iako su efikasno smanjili metforminom indukovano oslobađanje RKV (Slika 6C), sugerišući da oštećenje membrane mitohondrija nije prouzrokovano oksidativnim stresom. Takođe, CsA koji je efikasno hiperpolarisao membrane mitohondrija C6 ćelija tretiranih metforminom (slika 6B), nije uspeo da spreči nastajanje RKV (Slika 6C). Štaviše, CsA je značajno povećao produkciju RKV u C6 ćelijama čak i u odsustvu metformina (Slika

6C). Ovi podaci ukazuju da mitohondrijalna depolarizacija i oksidativni stres nezavisno učestvuju u apoptozi ćelija glioma indukovanoj metforminom.

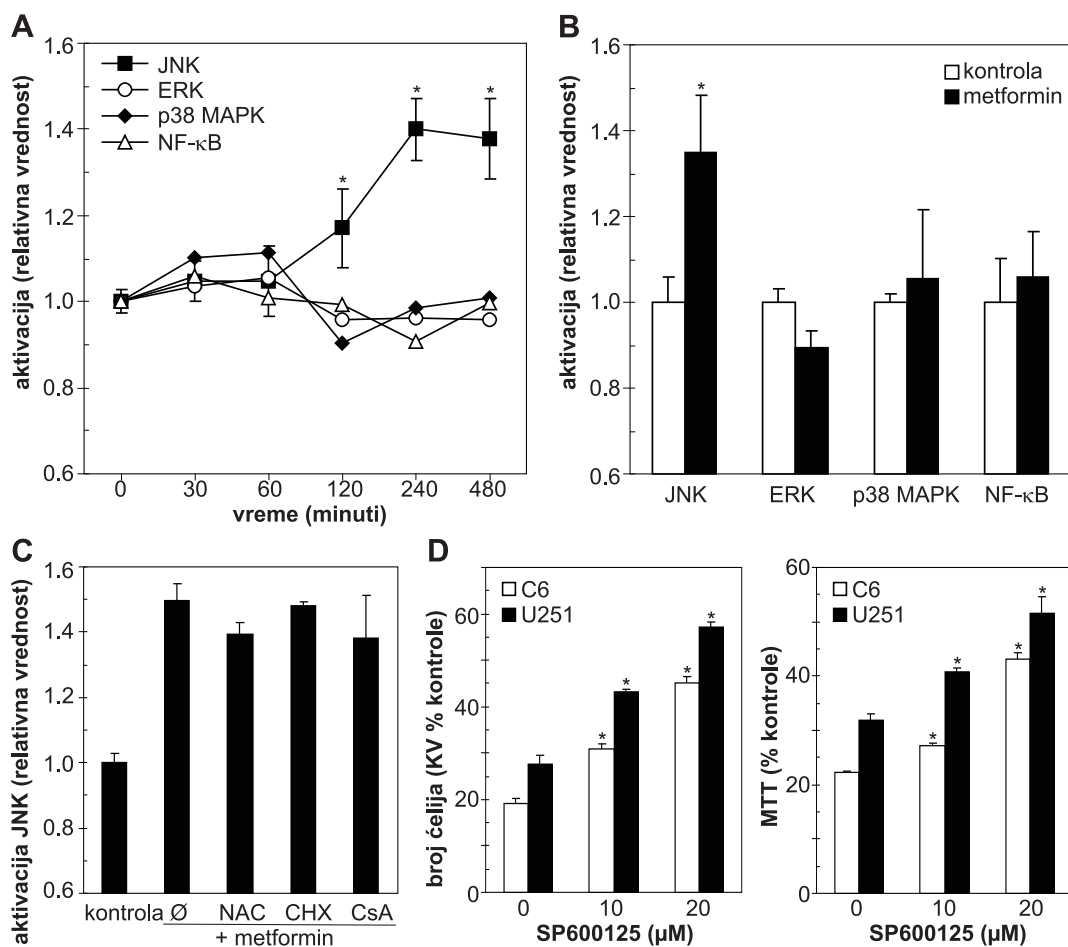


**Slika 6. Uticaj NAC, CsA, CHX na depolarizaciju mitohondrija i RPKV produkciju u ćelijama glioma.** (A) Konfluentne C6 ćelije su inkubirane sa metforminom (4 mM) u odsustvu ili prisustvu MPT blokatora ciklosporina A (2 mM) ili antioksidansa N-acetilcisteina (4 mM), nakon čega su aktivacija kaspaza (36 sati), apoptoza (% aneksin<sup>+</sup>-ćelija, 48 sati) i fragmentacija DNK (% subG<sub>0</sub>G<sub>1</sub> ćelije, 48 sati) analizirane na protočnom citofluorimetru. (B) Depolarizacija mitohondrija je analizirana u C6 ćelijama koje su tretirane 24 sata metforminom (4 mM) u odsustvu ili prisustvu cikloheksimida (2 mg/ml), NAC (4 mM) ili CsA (2 mM). (C) Produkcija RPKV je analizirana u odsustvu ili prisustvu cikloheksimida CHX (2 mg/ml), NAC (4 mM) gornji histogram ili CsA (2 mM) donji histogram u ćelijama tretiranim 24 h metforminom (4 mM). Prikazani su reprezentativni podaci iz dva eksperimenta (C). Rezultati (A, B) su srednje vrednosti triplikata iz reprezentativnog od dva nezavisna eksperimenta. Vrednost \*p<0.05 odnosi se na kontrolne i metforminom tretirane ćelije (B), kontrolne i CsA/NAC tretirane ćelije (A).

#### 4.7. Antigliomski efekat metformina posredovan je aktivacijom JNK (*engl. c-Jun N-terminal kinase*)

U narednim eksperimentima ispitivan je uticaj metformina na signalni put MAP kinaza i transkripcioni faktor NF-κB (*engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), koji su bitni za regulaciju proliferacije i smrti ćelije (Sebolt-Leopold i Herrera 2004; Viatour i sar., 2005). ELISA test na fiksiranim ćelijama pokazao je da metformin tokom 8 sati nije aktivirao ERK (*engl. extracellular signal-regulated kinase*), p38 MAPK ili NF-κB u C6 ili U251 ćelijama (Slika 7A, B). S druge

strane, u konfluentnim C6 ćelijama tretiranim metforminom primećen je značajan vremenski-zavisani porast u fosforilaciji trećeg člana MAPK porodice, JNK (Slika 7A).

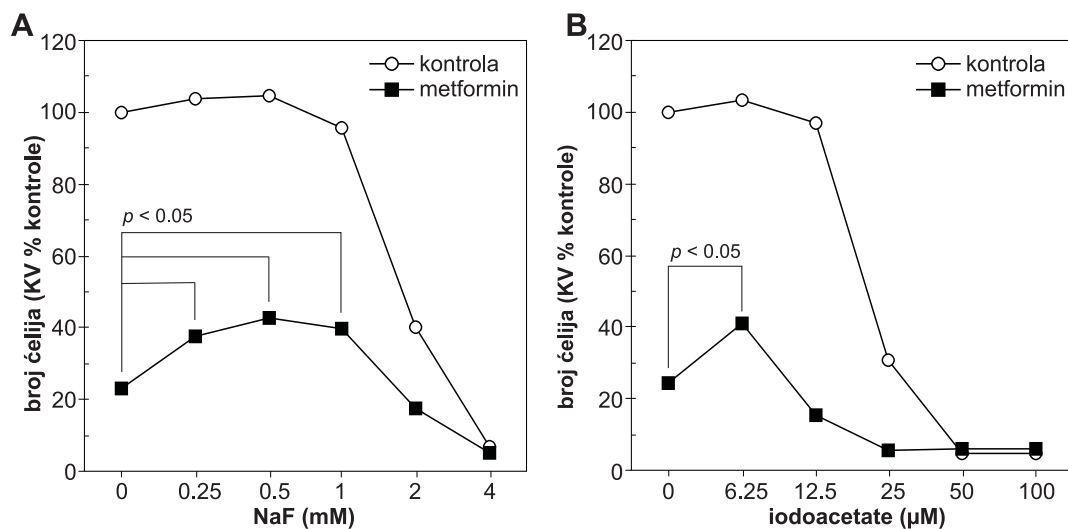


**Slika 7. Uloga c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) u anti glioma efektima metformina.** Konfluentne C6 (A) ili U251 (B) ćelije su inkubirane sa metforminom (4 mM), a aktivacija JNK, ERK, p38 MAPK i NF-κB je ispitivana u različitim vremenskim intervalima (A), ili nakon 8 sati (B) koristeći ELISA test na fiksiranim ćelijama. (C) Konfluentne C6 ćelije su inkubirane sa metforminom (4 mM) u prisustvu ili odsustvu N-acetilcisteina (4 mM), cikloheksimida (2 mg/ml) ili ciklosporina A (2 mM), a aktivacija JNK je merena nakon 6 sati inkubacije. (D) Broj (kristal violet) ili mitohondrijalna aktivnost (MTT) konfluentnih C6 ćelija tretiranih 48 sati sa metforminom (4 mM) i antagonistom JNK SP600125. (A-D) Podaci su srednje vrednosti±SD iz reprezentativnog od tri odvojena eksperimenta. Vrednost \* $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne (B) i metforminom tretirane ćelije (D).

Takođe, aktivacija JNK nakon 8 sati tretmana metforminom pokazana je i na U251 ćelijama (Slika 7B). Tretmani sa NAC i CHX koji efikasno blokiraju metforminom indukovanu produkciju RKV, ili sa CsA koji inhibira depolarizaciju mitohondrija, nisu uticali na metforminom indukovanu aktivaciju JNK u C6 ćelijama (Slika 7C), što sugeriše da JNK aktivacija prethodi depolarizaciji mitohondrija i produkciji RKV. SP600125, selektivni inhibitor JNK, delimično je redukovao smrt C6 i U251 ćelija indukovanu metforminom (slika 7D). Dakle, citotoksično delovanje metformina je bar delimično posredovano aktivnošću JNK.

#### 4.8. Glikoliza učestvuje u antiangioma efektu metformina

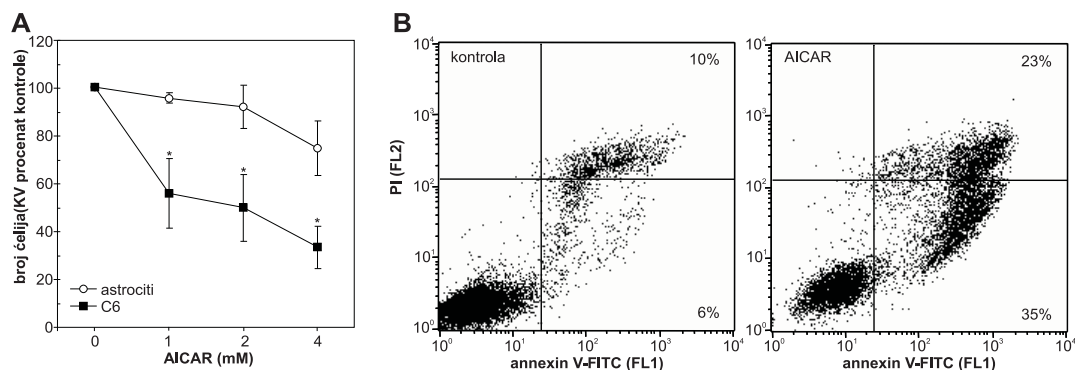
Imajući u vidu da metformin aktivira glikolizu i da je snizio pH vrednost medijuma sa pH 7.35 na pH 6.95 (što ukazuje na porast glikolize), ispitivano je da li inhibicija glikolize utiče na antiangioma dejstvo metformina. Rezultati kristal violet testa su pokazali da su niske, netoksične koncentracije inhibitora glikolize natrijum fluorida (inhibitor enolaze) ili jodoacetata (inhibitor gliceraldehid fosfat dehidrogenaze) delimično, ali značajno oporavile vijabilnost C6 ćelija tretiranih metforminom (slika 8A, B). Dakle, glikoliza je delimično uključena u antiangioma delovanje metformina.



**Slika 8. Uloga glikolize u antiangioma efektu metformina.** Konfluentne C6 ćelija tretirane su metforminom (4mM), inhibitorima glikolize natrijum fluoridom NaF (A) i iodoacetatom (B) i nakon 48 sati urađen je kristal violet test. Podaci su srednje vrednosti±SD iz reprezentativnog od tri odvojena eksperimenta. Vrednosti standardne devijacije za (A) i (B) se nalaze u okviru simbola.

#### 4.9. AMPK aktivator AICAR indukuje apoptozu ćelija glioma

Da bi se ispitala uloga AMPK u antigliomskom delovanju metformina, prvo je ispitano kako AICAR, analog AMP i aktivator AMPK, utiče na proliferaciju i vijabilitet ćelija glioma. Slično metforminu, AICAR je značajno redukovao broj nekonfluentnih C6 glioma ćelija, ali ne i primarnih pacovskih astrocita (slika 9A). Osim toga, u konfluentnim C6 ćelijama AICAR je značajno povećao udeo i ranih apoptotičnih, (annexin<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) i kasnih apoptotično/nekrotičnih (annexin<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) ćelija (Slika 9B). Dakle, AMPK aktivator AICAR, kao i metformin, indukuje apoptozu u konfluentnim ćelijama glioma.



**Slika 9. AMPK aktivator AICAR indukuje apoptozu ćelija glioma.** (A) C6 ćelije niske gustine ili primarni astrociti su inkubirani sa AMPK agonistom AICAR-om, a broj ćelija je ispitivan nakon 48 sati kristal violet bojenjem (KV). (B) Analiza apoptoze protočnom citofluorimetrijom na konfluentnim C6 ćelijama tretiranim AICAR-om (4 mM) nakon 48 sati. Podaci (A) su srednje vrednosti $\pm$ SD triplikata reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. FACS dot plotovi (B) su jedan od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima.

#### 4.10. AMPK učestvuje u antigliomskom dejstvu metformina

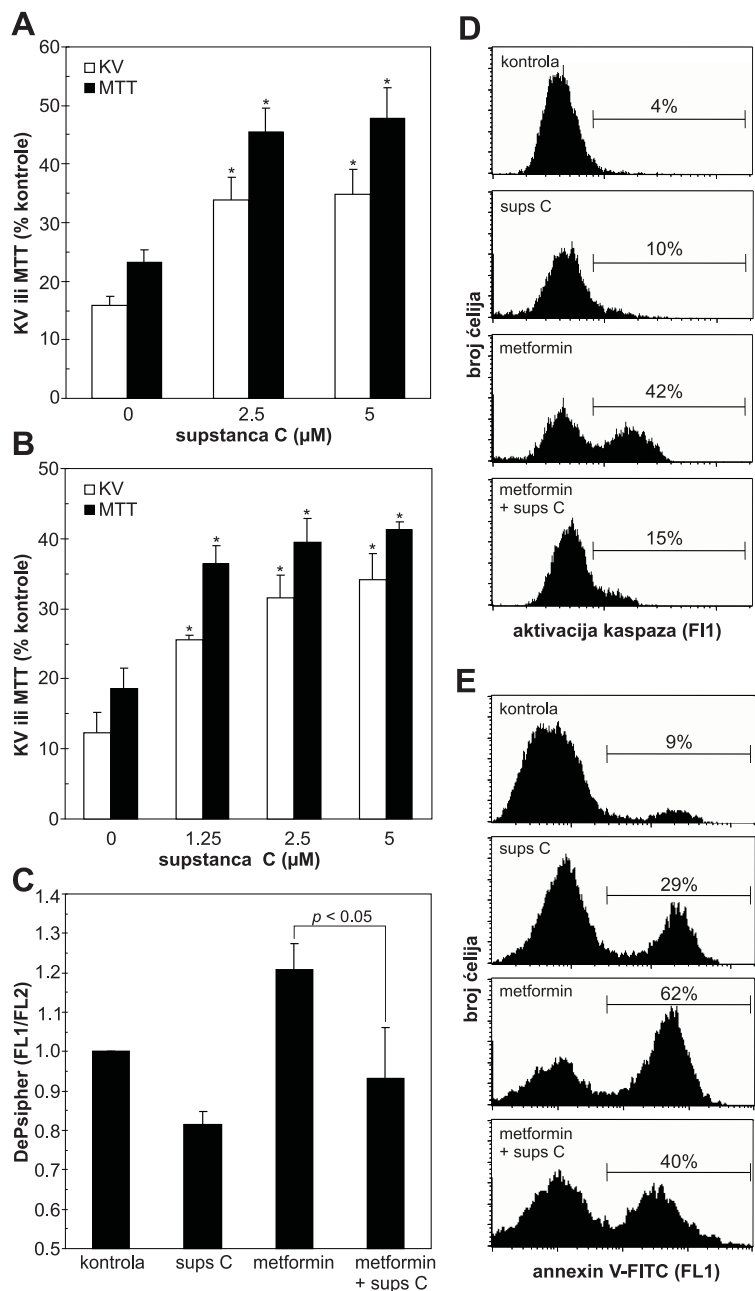
Da bi se dalje ispitala uloga AMPK u antigliomskom dejstvu metformina, korišćena je supstanca C, poznati farmakološki inhibitor AMPK (Zhou i sar., 2001). Supstanca C je delimično sprečila smanjenje broja ćelija i aktivnost mitohondrija u konfluentnim C6 kulturama tretiranim metforminom ili AICAR-om (Slika 10 A, B). U

skladu sa tim, supstanca C je efikasno inhibirala metforminom indukovanu depolarizaciju mitohondrija, posledičnu aktivaciju kaspaza i apoptozu u konfluentnim C6 ćelijskim kulturama (Slika 10 C-E). Trebalo bi naglasiti da je sama supstanca C izuzetno toksična za nekonfluentne C6 ćelije, što je sprečilo detaljnije ispitivanje njenih protektivnih osobina pod ovim uslovima. Bez obzira na to, ovi rezultati, zajedno sa citotoksičnim dejstvom AICAR-a, ukazuju na to da je antigliomski efekat metformina bar delimično posredovan aktivacijom AMPK.

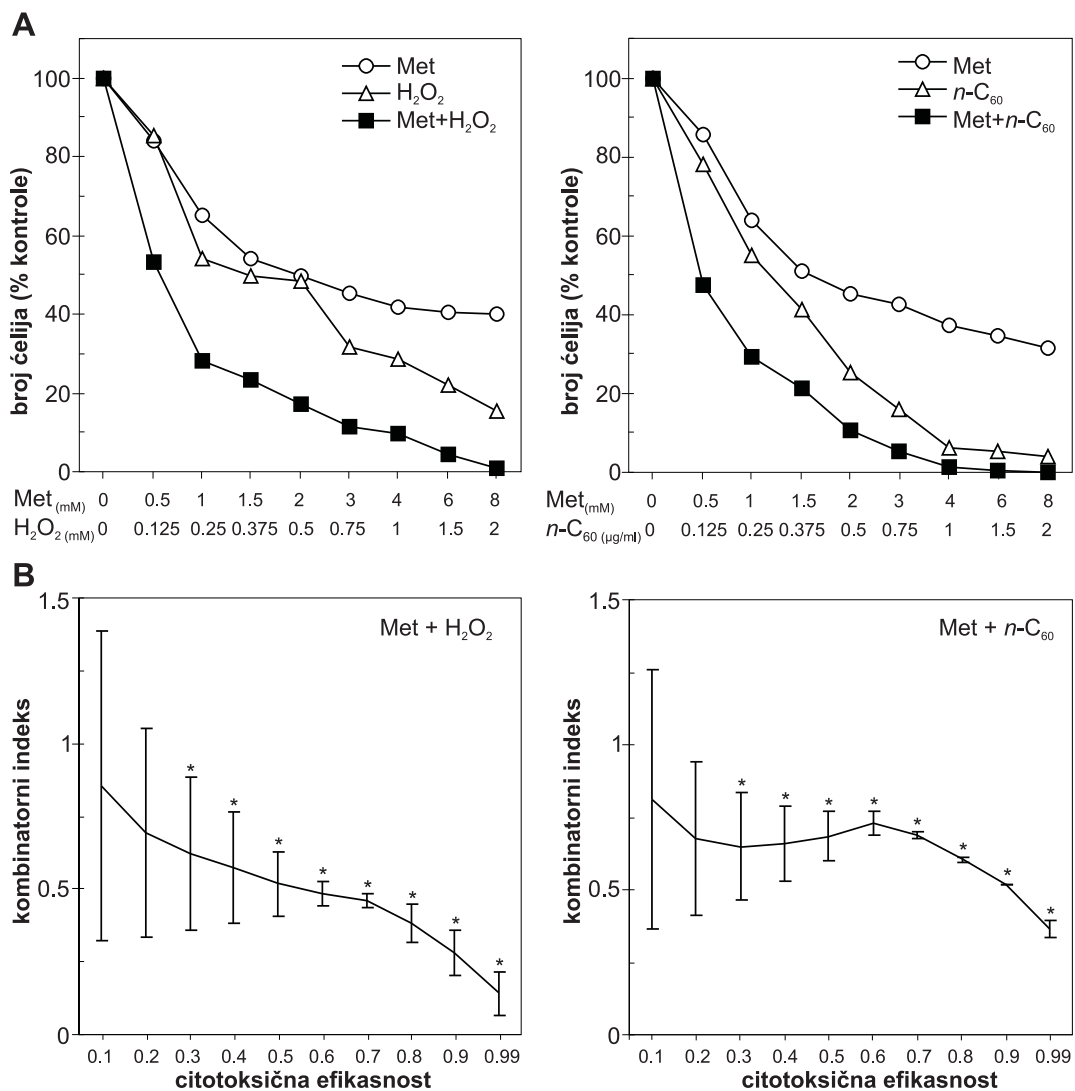
#### **4.11. Sinergizam metformina i supstanci koje indukuju oksidativni stres u ubijanju ćelija glioma**

S obzirom da je citotoksični efekat metformina na ćelijama glioma zavisao od produkcije RKV, ispitivano je da li metformin saraduje sa drugim supstancama koje indukuju oksidativni stres u ubijanju ćelija glioma. U tom cilju koristili smo citotoksične supstance koje stvaraju RKV - vodonik peroksid i nanofuleren ( $n\text{-C}_{60}$ ) (Isakovic i sar., 2006a). C6 ćelije glioma su tretirane različitim koncentracijama metformina i  $\text{H}_2\text{O}_2/n\text{-C}_{60}$ , pojedinačno ili u kombinaciji. Chou-Talalay metod je iskorišćen da bi se utvrdile aditivne, sinergističke ili antagonističke interakcije. Kombinacija metformina sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  ili  $n\text{-C}_{60}$  pokazala je veću citotoksičnost nego svaka supstanca zasebno (Slika 11A). Iako je Chou-Talalay kombinatorni indeks za citotoksičnu efikasnost do 20% manji od 1 za obe kombinacije, primećena razlika nije statistički značajna, što ukazuje na aditivne interakcije u ovom opsegu. Međutim, kombinatorni indeks za obe kombinacije je bio značajno niži od 1 u opsegu citotoksične efikasnosti 30-99% (Slika 11B), potvrđujući sinergistički efekat metformina i supstanci koje indukuju oksidativni stres u ubijanju gliomskih ćelija.





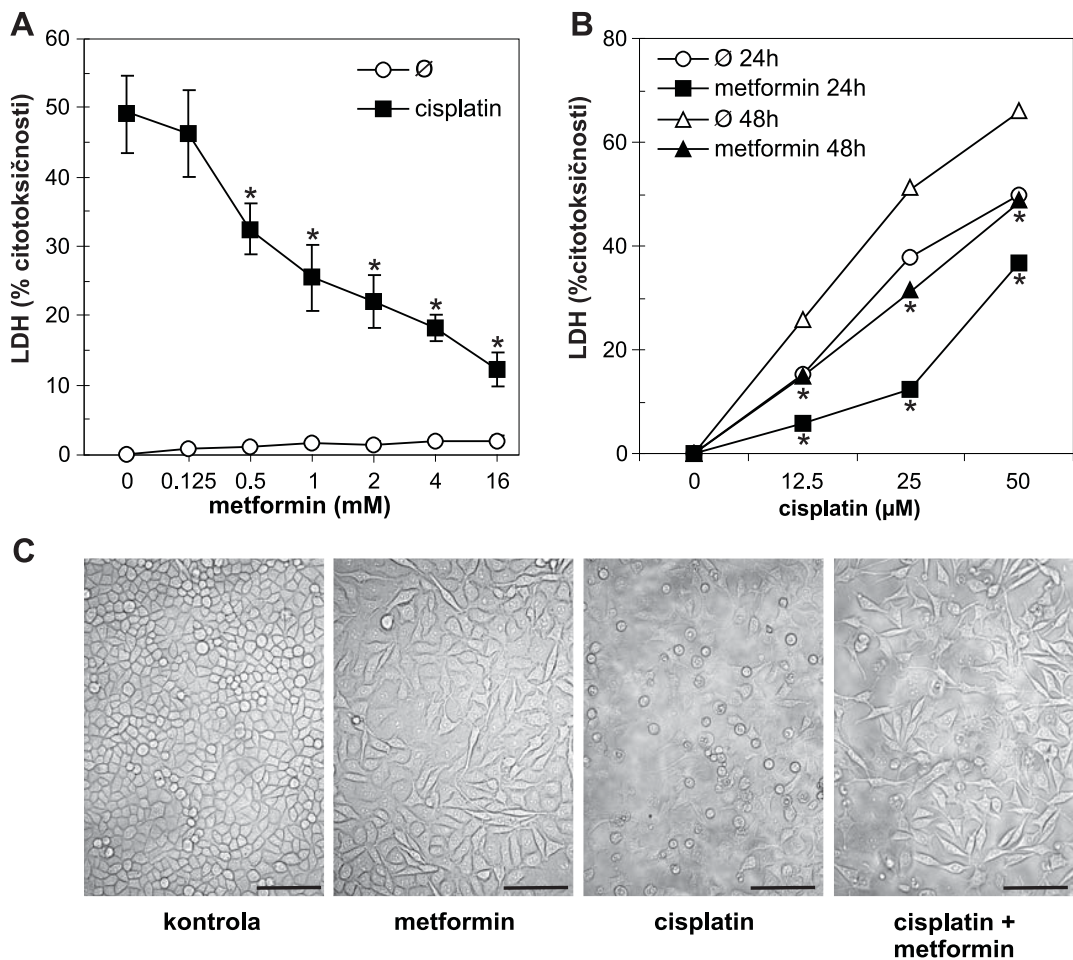
**Slika 10. Uloga AMP-om aktivirane protein kinaze u antiglioma delovanju metformina.** (A, B) Konfluentne C6 ćelije su inkubirane sa AICAR-om (4 mM) (A) ili metforminom (B) u odsustvu ili prisustvu supstance C, a broj ćelija (kristal violet, KV) ili mitohondrijalna aktivnost (MTT) je određena nakon 48 sati. (C-E) Konfluentne C6 ćelije su inkubirane sa metforminom (4 mM) i/ili supstancom C (2.5 μM). Depolarizacija mitohondrija (C) je analizirana nakon 24 sata, aktivacija kaspaza (D) nakon 36 sati, a broj aneksin<sup>+</sup> (apoptotičnih) ćelija (E) je analiziran nakon 48 sati na protočnom citofluorimetru. Podaci su srednje vrednosti ± SD triplikata reprezentativnog eksperimenta (A, B), ili srednje vrednosti ± SD iz dva nezavisna eksperimenta (C). FACS histogrami (D, E) su iz jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima.



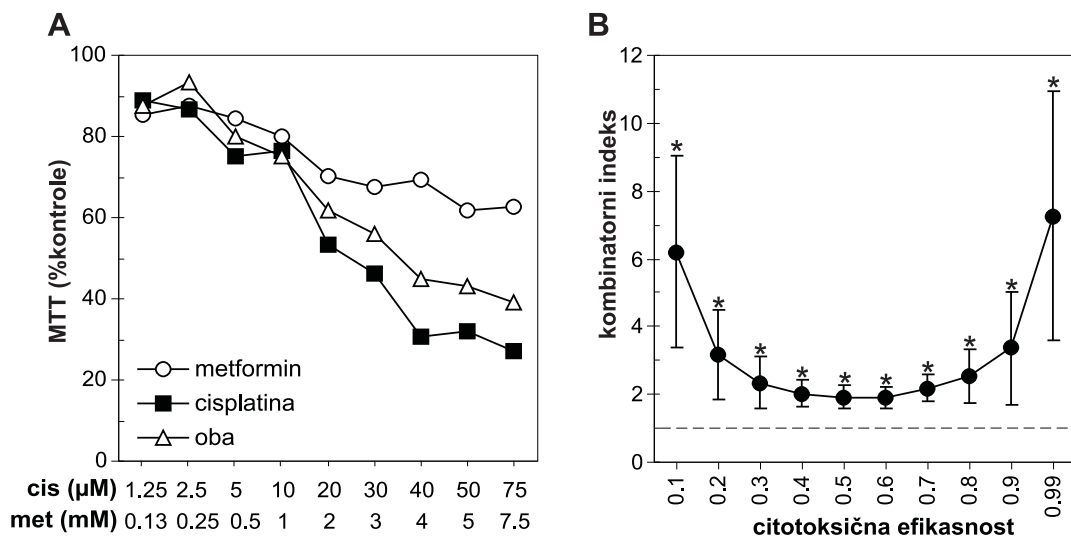
**Slika 11. Sinergistički anti glioma efekti metformina i supstanci koje indukuju oksidativni stres.** (A) Konfluentne C6 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama metformina (Met), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, n-C<sub>60</sub> i njihovim kombinacijama (metformin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i metformin + n-C<sub>60</sub>). Vijabilnost ćelija je ispitana nakon 24 sata koristeći kristal violet test. Prikazan je reprezentativni od tri eksperimenta, a podaci su srednje vrednosti triplicate. (SD<15% srednje vrednosti). (B) Kombinatorni indeks za odgovarajuće kombinacije je izračunat koristeći Chou-Talalay metod, a rezultati su prezentovani kao srednja vrednost±SD iz tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti značajno manje od 1 (\*p<0.05) ukazuju na sinergističku interakciju.

#### **4.12. Metformin inhibira citotoksično dejstvo cisplatina na U251 ćelije glioma**

Imajući u vidu snažno antigliomsko delovanje metformina pokazano u prethodnim eksperimentima, ispitivano je da li bi ovaj lek mogao da potencira ubijanje ćelija glioma poznatim citostatikom cisplatinom, čija je efikasnost kompromitovana rezistentnošću tumorskih ćelija koja se javlja nakon dugotrajne terapijske primene (Smith i sar., 2006). U tom cilju, U251 ćelije su tretirane sa konstantnom dozom cisplatina i različitim dozama metformina, i obrnuto, a zatim je nakon 24 i 48 sati njihov vijabilitet određivan LDH testom. Nasuprot našim očekivanjima, rezultati su pokazali da metformin štiti ćelije glioma od citotoksičnosti cisplatina (Slika 12A, B). Ovi rezultati se slažu sa morfološkim promenama u kulturama U251 ćelija (Slika 12C). U skladu sa indukcijom ćelijske smrti, ćelije glioma tretirane cisplatinom izgubile su svoje nastavke, postale okrugle, manje i odvojile se od dna bunara za kultivaciju ćelija (Slika 12C). S druge strane, metformin je prouzrokovao izduživanje i povećanje ćelija, a delimično je sprečio morfološke promene indukovane tretmanom sa cisplatinom (slika 12C). Sposobnost metformina da inhibira citotoksičnost cisplatina u kulturi U251 ćelija potvrđena je i MTT testom (slika 13A). Matematičkom analizom rezultata MTT testa dobijen je Chou-Talalay kombinatorni indeks koji je veći od 1 u opsegu efikasnosti 0.1-0.99 (Slika 13B), što je definitivno potvrdilo sposobnost metformina da antagonizuje citotoksični efekat cisplatina. Da bi ispitali da li je citoprotektivni efekat metformina posledica njegove direktne interakcije sa cisplatinom, urađene su ultravioletne spektrofotometrijske analize vodenih rastvora cisplatina (1 mM ili 0.1mM), metformina (1 mM ili 0.1mM) ili njihove mešavine (1mM:1mM ili 0.1mM:0.1mM). Imajući u vidu da u mešavini cisplatina i metformina nije primećen bilo kakav pomeraj u talasnoj dužini pikova apsorbanace (303 nm za cisplatin i 232 nm za metformin) (Khoury i sar., 2004; Videhult i sar., 2006), zaključeno je da nema hemijske interakcije između lekova, te da metformin zaista inhibira citotoksično delovanje cisplatina.



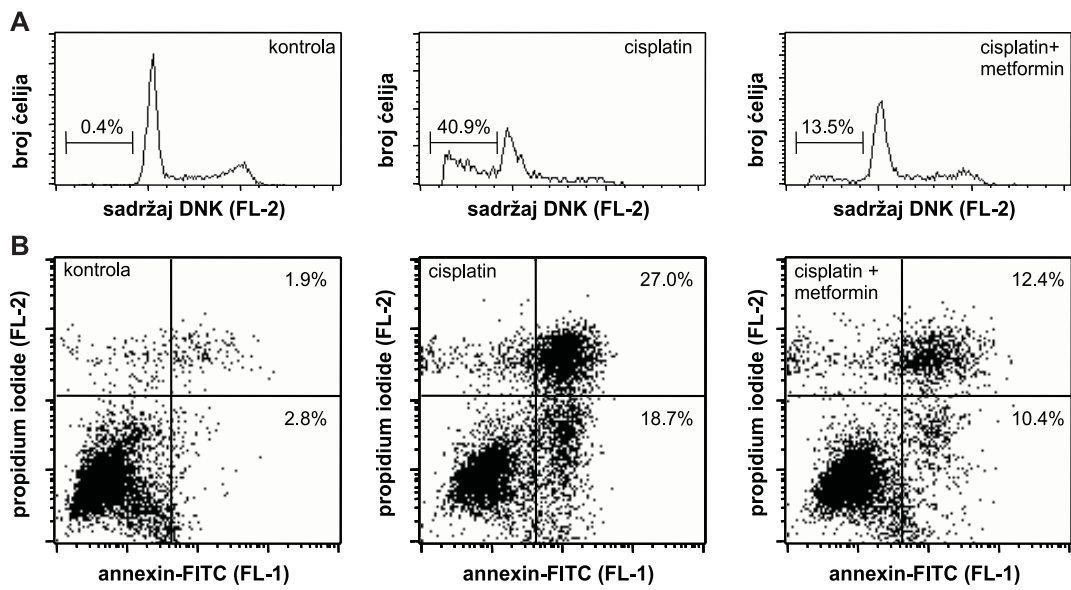
**Slika 12. Metformin inhibira citotoksični efekat cisplatina u U251 glioma ćelijama.** (A, B) U251 ćelije su inkubirane u prisustvu cisplatina (25 µM) i različitim koncentracijama metformina (A), metformina (4 mM) i različitim koncentracijama cisplatina (B). Vijabilitet ćelija je određen LDH testom (A, B) nakon 24 sata (A) ili 48 sati (B). Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost ± SD triplikata. (\*p < 0.05 se odnosi na ćelije tretirane samo cisplatinom; SD vrednosti pod (B) su uklonjene zbog jasnoće). (C) Morfologija ćelija tretiranih 24 sata sa ili bez cisplatina (25 µM) i/ili metformina (4 mM) je analizirana invertnom mikroskopijom (razmernik = 100 µm).



**Slika 13. Metformin antagonizuje citotoksični efekat cisplatina u U251 ćelijama.** (A) U251 ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama cisplatina i metformina odvojeno ili u kombinaciji. Ćelijski vijabilitet je određen MTT testom (A) nakon 24 sata. Rezultati za (A) su srednje vrednosti $\pm$ SD triplikata reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. (B) Chou-Talalay kombinatorni indeks je izračunat iz rezultata pod (A) i rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD iz tri nezavisna eksperimenta (\* $p$ <0.05 označava vrednosti značajno različite od 1).

#### 4.13. Metformin redukuje apoptozu indukovanu cisplatinom

U narednim eksperimentima ispitivani su mehanizmi citoprotektivnog delovanja metformina. Analiza protočnim citoflourimetrom propidijum jodidom obojenih U251 ćelija pokazala je da tretman cisplatinom (25 μM) indukuje nagomilavanje ćelija u sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, odnosno fragmentaciju DNK (slika 14A). Istovremeni tretman sa metforminom značajno je smanjio udeo hipodiploidnih ćelija. U skladu sa tim zapažanjem, metformin je smanjio udeo ranih (aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) i kasnih apoptotičnih ćelija (aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) u ćelijskim kulturama U251 ćelija glioma tretiranih cisplatinom (Slika 14B). Dakle, metformin inhibira apoptozu ćelija glioma indukovanu cisplatinom.

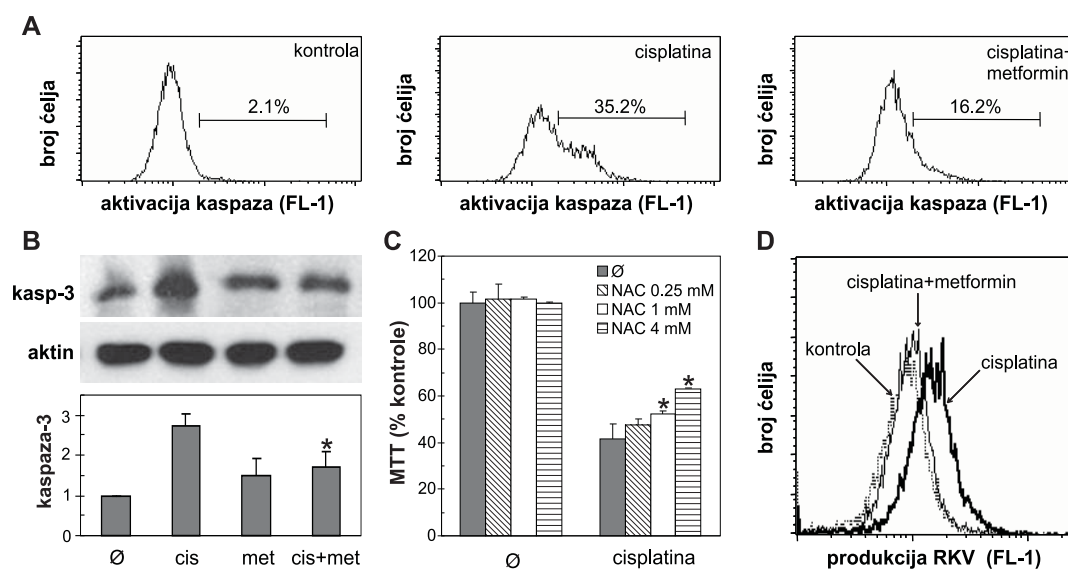


**Slika 14. Metformin redukuje cisplatinom indukovanu apoptozu.** (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa ili bez cisplatina (25  $\mu$ M) i/ili metformina (4 mM). Nakon 24 sata protočnom citofluorimetrijom analiziran je ćelijski ciklus ćelija obojenih sa PI (A), i eksternalizacija fosfatidilserina ćelija obojenih aneksinom V- FITC/PI (B). (A, B) Rezultati su prikazani kao reprezentativni dot plotovi/histogrami iz najmanje tri eksperimenata.

#### 4.14. Metformin redukuje aktivaciju kaspaza i oksidativni stres indukovane cisplatinom

Pošto je pokazano da metformin redukuje apoptozu indukovanu cisplatinom, ispitivano je kakav je njegov uticaj na aktivaciju kaspaza, enzima sa značajnom ulogom u apoptozi (Kolenko i sar., 2000). Bojenje sa pan-kaspaznim inhibitorom obeleženim fluorescentnom bojom (ApoStat) pokazalo je da metformin značajno redukuje aktivaciju kaspaza indukovanu cisplatinom (Slika 15A). Aktivacija kaspaze 3, glavne egzekutorske kaspaze, u U251 ćelijama tretiranih cisplatinom, kao i redukcija njene aktivnosti u ćelijama tretiranih cisplatinom i metforminom, potvrđena je imunoblot analizom isečenog fragmenta kaspaze 3 (Slika 15B). Citotoksično delovanje cisplatina delimično je posredovano indukcijom oksidativnog stresa, jer je antioksidant N-acetilcistein (NAC) u izvesnoj meri oporavio vijabilitet ćelija tretiranih cisplatinom

(Slika 15C). U skladu sa tim, analiza protočnom citofluorimetrijom ćelija obojenih redoks-senzitivnom bojom dihidrorodaminom, pokazala je da cisplatin izaziva značajno unutarćelijsko nagomilavanje RKV, dok je tretman metforminom potpuno značajno smanjio oksidativni stres indukovano cisplatinom (Slika 15D). Dakle, moglo bi se zaključiti da je citoprotektivni efekat metformina posredovan inhibicijom oksidativnog stresa i aktivacije kaspaza indukovane cisplatinom.

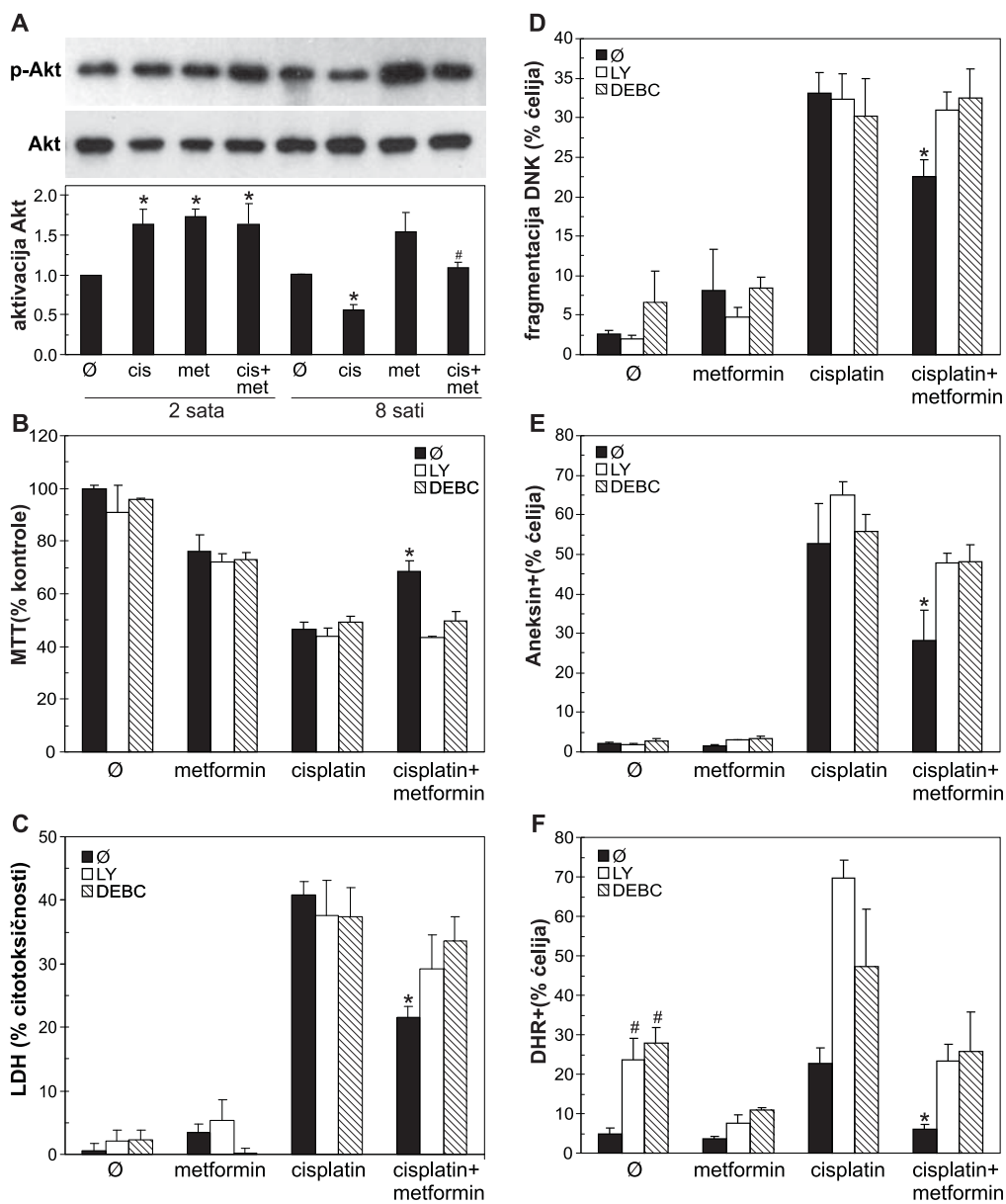


**Slika 15. Metformin redukuje aktivaciju kaspaza i oksidativni stres.** (A) U251 ćelijska linija je inkubirana sa ili bez cisplatina (25  $\mu$ M) i/ ili metformina (4 mM). Ćelije su bojene Apostatom (A; 18 sati), i aktivacija kaspaza je ispitivana protočnom citofluorimetrijom. Aktivacija kaspaze 3 je ispitana imunoblot metodom nakon 8 sati (B). (C) U251 ćelije su inkubirane sa ili bez cisplatina (25  $\mu$ M) i antioksidansa N-acetylcysteina (NAC), nakon 24 sata ćelijska vijabilnost je određena MTT testom. (D) U251 ćelije su tretirane u odsustvu ili prisustvu cisplatina (25  $\mu$ M) i/ ili metformina (4 mM). Nakon 18 sati merena je produkcija RKV protočnom citofluorimetrijom u DHR obojenim ćelijama. (A, D) Rezultati su prikazani kao reprezentivni histogrami iz najmanje tri eksperimenta. Prikazana je srednja vrednost $\pm$ SD iz tri nezavisna eksperimenta (B) ili srednja vrednost+SD triplikata iz reprezentativnog eksperimenta (C) (\* $p$ <0.05odnosi se na cisplatinom tretirane ćelije)

#### **4.15. Citoprotektivno delovanje metformina na ćelije glioma tretirane cisplatinom zavisi od aktivacije Akt**

U cilju rasvetljavanja mehanizama citoprotektivne aktivnosti metformina, proučavan je efekat metformina na aktivaciju Akt, anti-apoptotski signal koji je između ostalog uključen i u otpornost tumorskih ćelija na cisplatin (Hayakawa i sar., 2000; Viniegra i sar., 2002; Winograd-Katz i Levitzki 2006; Wangpaichitr i sar., 2008). Rezultati imunoblot analize pokazuju da i cisplatin i metformin nakon 2 sata povećavaju fosforilaciju Akt, koja nije dodatno pojačana kombinovanim tretmanom (Slika 16A). Međutim, nakon 8 sati cisplatin je značajno redukovao aktivaciju Akt, dok je dodavanje metformina u potpunosti vratilo nivo fosforilacije Akt na nivo zapažen u netretiranim ćelijama (Slika 16A). Da bi smo potvrdili hipotezu da je aktivacija Akt odgovorna za citoprotektivno dejstvo metformina, koristili smo selektivni Akt inhibitor 10-DEBC dihidrohlorid i LY294002, inhibitor PI3K, ushodnog aktivatora Akt. U koncentracijama koje same nisu uticale na vijabilitet ćelija, 10-DEBC dihidrohlorid (10  $\mu$ M) i LY294002 (25  $\mu$ M) su inhibirali citoprotektivni efekat metformina u U251 ćelijama tretiranih cisplatinom, što je pokazano MTT i LDH testom (Slika 16B, C). U skladu sa tim, oba inhibitora neutralisala su antiapoptotsku aktivnost metformina, što je potvrđeno značajnim povećanjem fragmentacije DNK i ekspresije fosfatidilserina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane (Slika 16D, E). Inihibitori Akt su indukovali oksidativni stres u U251 ćelijama i tako redukovali antioksidativni efekat metformina u tretmanu cisplatinom (Slika 16F). Ovi podaci ukazuju da metformin smanjuje antitumorsku aktivnost cisplatina bar delimično aktivacijom Akt.

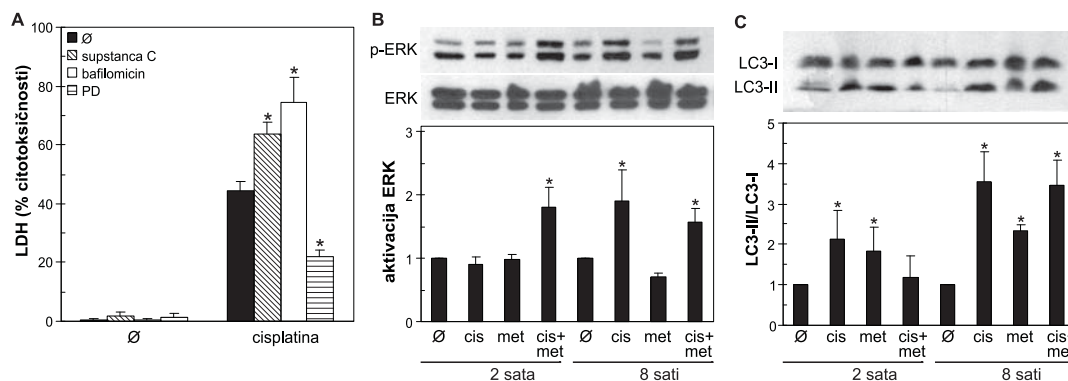




**Slika 16. Metformin redukuje citotoksičnost cisplatina preko aktivacije Akt.** (A) U251 ćelije su inkubirane sa ili bez cisplatina (25  $\mu$ M) i/ili metformina (4 mM) i fosforilacija Akt je ispitana imunoblotom. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD iz tri odvojena eksperimenta (\* $p$ <0.05 odnosi se na netretirane, a # $p$ <0.05 na ćelije tretirane cisplatinom). (B-F) U251 ćelije su inkubirane sa ili bez cisplatina (25  $\mu$ M) i/ili metformina (4 mM), u odsustvu ili prisustvu Akt inhibitora LY 294002 (25  $\mu$ M) ili 10-DEBC hidrohlorida (10  $\mu$ M). Ćelijska vijabilnost je ispitana nakon 24 sata MTT (B) ili LDH testom (C), dok su ćelijski ciklus (24 sata, PI bojenje; D), apoptoza (24 sata, aneksin V - FITC/PI bojenje; E) i ukupna produkcija RKV (18 sati, DHR bojenje; F) analizirani protočnom citofluorimetrijom. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD iz tri odvojena eksperimenta (\* $p$ <0.05 odnosi se na cisplatinom tretirane ćelije i ćelije tretirane cisplatinom, metforminom i Akt inhibitorima zajedno ili # $p$ <0.05 se odnosi na netretirane i ćelije tretirane metforminom i Akt inhibitorima zajedno).

#### 4.16. Metformin redukuje antitumorsku aktivnost cisplatina nezavisno od modulacije ERK i autofagije

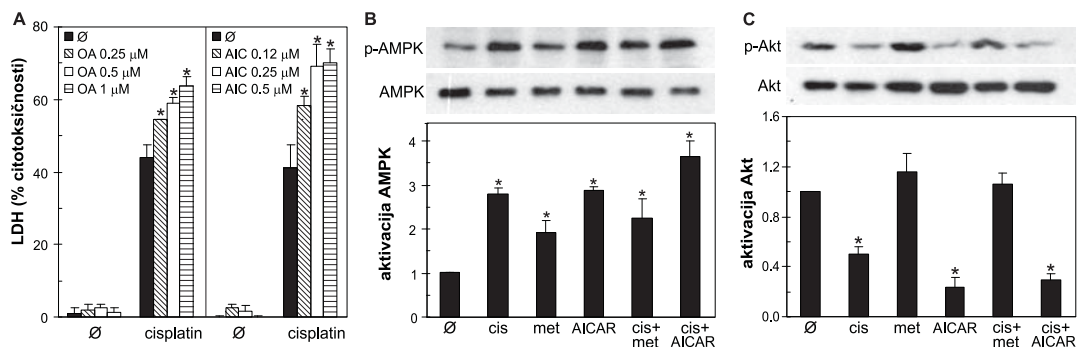
Prethodno je pokazano da toksičnost cisplatina može biti redukovana inhibicijom ERK ili pojačana inhibicijom autofagije i AMPK (Schweyer i sar., 2004a; Schweyer i sar., 2004b; Mijatovic i sar., 2005; Kim i sar., 2008; Harhaji-Trajkovic i sar., 2009). Da bi se ispitalo da li je to slučaj i u našim eksperimentalnim uslovima, ćelije tretirane cisplatinom inkubirane su u prisustvu ili odsustvu inhibitora ERK (PD98059), inhibitora autofagije (bafilomicin A1) i inhibitora AMPK (supstanca C). LDH testom je pokazano da inhibicija ERK smanjuje, dok inhibicija autofagije i AMPK povećavaju toksičnost cisplatina (Slika 17A). Ispitano je i da li je modulacija autofagije, ERK ili AMPK odgovorna za citoprotektivne efekte metformina. Metformin nije uspeo da smanji fosforilaciju ERK indukovanu cisplatinom (Slika 17B), što ukazuje da inhibicija ERK nije uključena u protekciju ćelija posredovanu metforminom. I pored sposobnosti da sam indukuje autofagiju (LC3-I/LC3-II konverzija), metformin nije povećao LC3 konverziju izazvanu cisplatinom (Slika 17C), što govori protiv učešća autofagije u citoprotektivnoj aktivnosti metformina.



**Slika 17. Metformin redukuje antitumorsku aktivnost cisplatina nezavisno od modulacije ERK i autofagije.** (A) U251 ćelije su inkubirane sa ili bez cisplatina (25  $\mu$ M), u prisustvu ili odsustvu PD98059 (20  $\mu$ M), bafilomicina A1 (100 nM) ili supstance C (4  $\mu$ M), a oslobađanje LDH je ispitano nakon 24 sata. (B, C) U251 ćelije su tretirane sa ili bez cisplatina (25  $\mu$ M) i/ili metformina (4 mM), a ERK fosforilacija (B) ili LC3 konverzija (C) su ispitane imunoblot metodom nakon 2 i 8 sati. Podaci su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SD triplikata iz reprezentativnog od tri eksperimenta (A), ili kao srednja vrednost $\pm$ SD iz tri različita eksperimenta (B, C) (\* $p$ <0.05 se odnosi na netretirane ćelije (B, C) ili cisplatinom tretirane ćelije (A)).

#### 4.17. Modulacija AMPK ne učestvuje u citoprotektivnom dejstvu metformina

Pošto je prethodno pokazano da inhibicija AMPK, ključnog unutarćelijskog medijatora dejstva metformina, potencira antitumorsko delovanje cisplatina (Harhaji-Trajkovic i sar., 2009), urađeni su eksperimenti u cilju ispitivanja uloge AMPK u smanjenju antitumorske aktivnosti cisplatina metforminom. Za razliku od metformina, druga dva aktivatora AMPK, AICAR i oligomicin A, nisu spasili U251 ćelije od toksičnosti cisplatina (Slika 18A). Osim toga, iako je AICAR aktivirao AMPK u U251 ćelijama (Slika 18B), to nije bilo praćeno povećanjem fosforilacije Akt ni u odsustvu ni u prisustvu cisplatina (Slika 18C), što ukazuje da AMPK ne učestvuje u aktivaciji Akt i protekciji tumorskih ćelija metforminom. Ova pretpostavka je potvrđena i činjenicom da metformin, koji je sam stimulisao AMPK, nije dodatno povećao aktivaciju AMPK stimulisanu cisplatinom (Slika 18B). Dakle, aktivacija AMPK nije uključena u citoprotektivno delovanje metformina.

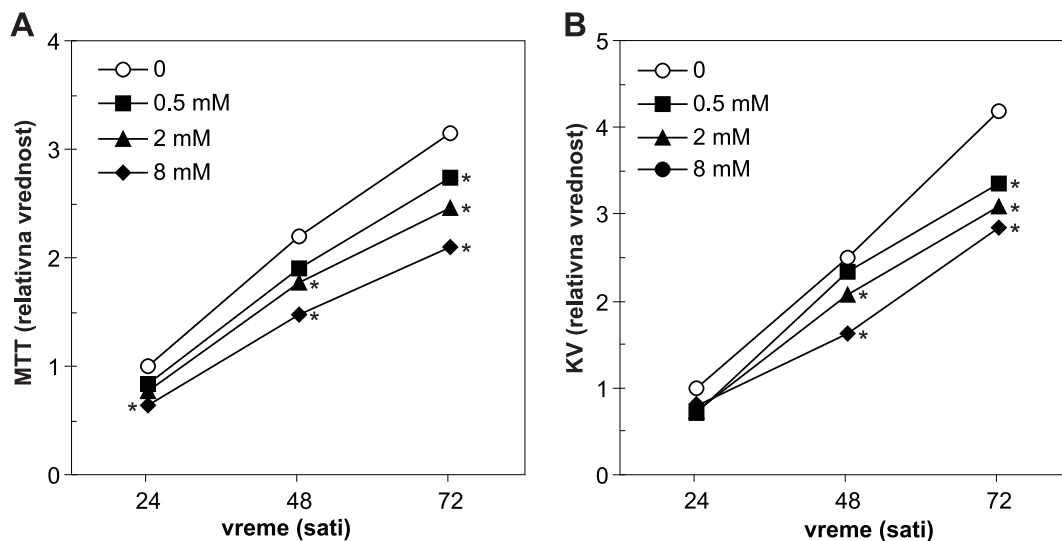


**Slika 18. Metformin redukuje antitumorsku aktivnost cisplatina nezavisno od aktivacije AMPK.**

(A) U251 ćelije su inkubirane sa ili bez cisplatina (25 μM) i/ili AMPK aktivirajućih supstanci oligomicina A (OA) ili AICAR-a (AIC) i oslobađanje LDH je izmereno nakon 24 sata. (B, C) U251 ćelije su inkubirane sa ili bez cisplatina (25 μM) i/ili metformina (4 mM) ili AICAR-a (0.5 mM). Aktivacija AMPK (B) ili Akt (C) su ispitane imunoblotom nakon 8 sati. (\*p<0.05) odnosi se na netretirane ćelije (B, C) ili cisplatinom tretirane ćelije (A). Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD iz tri eksperimenta (B, C) ili triplikata iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (A).

#### 4.18. Metformin inhibira proliferaciju B16 ćelija melanoma

Da bi se ispitao uticaj metformina na rast B16 ćelija melanoma, praćena je aktivnost mitohondrijalne dehidrogenaze MTT testom i broj ćelija kristal violet testom, u vremenskom periodu od tri dana. Metformin je na dozno zavisnan način inhibirao porast u broju B16 ćelija i aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze (Slika 19 A, B).

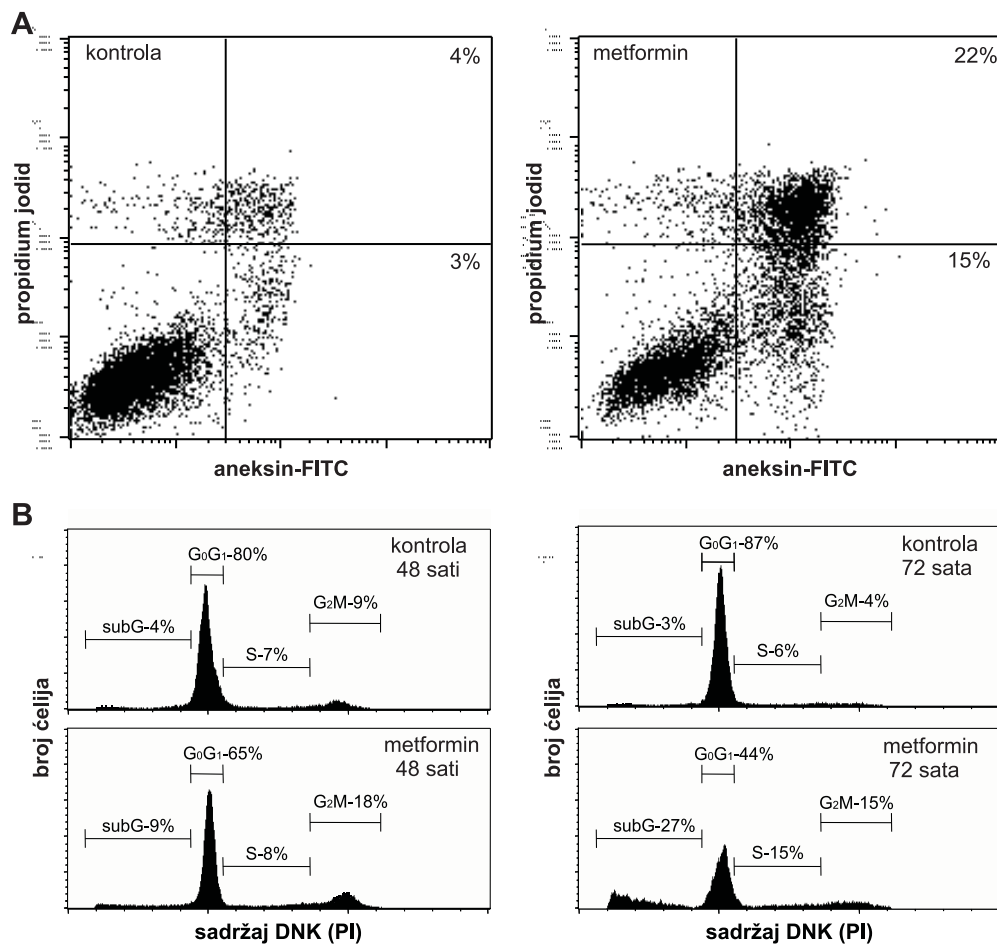


**Slika 19. Metformin inhibira rast B16 ćelija melanoma.** (A) B16 ćelije melanoma su inkubirane sa različitim koncentracijama metformina, a ćelijski vijabilitet je određen MTT ili kristal violet testom nakon naznačenih vremenskih perioda. Rezultati su prikazani kao porast vijabiliteta ćelija u odnosu na kontrolnu vrednosti pre tretmana. Podaci su srednje vrednosti triplikata iz reprezentativnog od tri eksperimenta (vrednosti SD nisu prikazane zbog jasnoće; \* $p < 0.05$ ).

#### 4.19. Metformin indukuje blok ćelijskog ciklusa i apoptozu u ćelijama melanoma

Da bi se utvrdilo da li je indukcija ćelijske smrti uključena u inhibiciju proliferacije B16 ćelija metforminom, analiziran je ćelijski ciklus i eksternalizacija fosfatidil serina. Protočna citofluorimetrija pokazala je da metformin indukuje značajan porast u broju i ranih (Aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) i kasnih apoptotičnih ćelija (Aneksin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) nakon 48 sati (slika 20A). Analiza ćelijskog ciklusa nakon 48 i 72 sata pokazala je, da metformin povećava udeo B16 ćelija u G<sub>2</sub>/M fazi (Slika 20B). Nakon 72 sata primećen je i porast broja ćelija u S fazi. Imajući u vidu da porast broja ćelija u S fazi nije detektovan nakon 48 sati, moguće je da je primećeno povećanje u S fazi nakon 72 sata

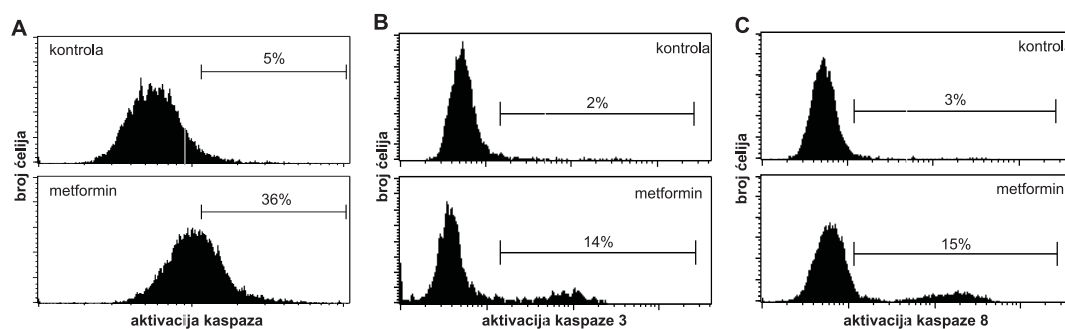
nastalo kao posledica fragmentacije ćelija iz  $G_2/M$  faze (slika 20B). Zaista, procenat ćelija sa fragmentisanom DNK (sub- $G_0/G_1$ ), je značajno povećan u ćelijskim kulturama tretiranim metforminom u periodu od 72 sata (slika 20B), na taj način potvrđujući proapoptotsku sposobnost metformina. Međutim, indukcija ćelijske smrti u metforminom tretiranim ćelijama melanoma javlja se u kasnijim vremenskim intervalima, jer se fosfatidilserin pojavljuje na spoljašnjoj strani ćelijske membrane tek nakon 48 sati, a fragmentacija DNK tek nakon 72 sata. Dakle, izgleda da *in vitro* toksičnost metformina prema ćelijama melanoma zavisi od rane inhibicije proliferacije, koja je praćena kasnom indukcijom apoptotske smrti.



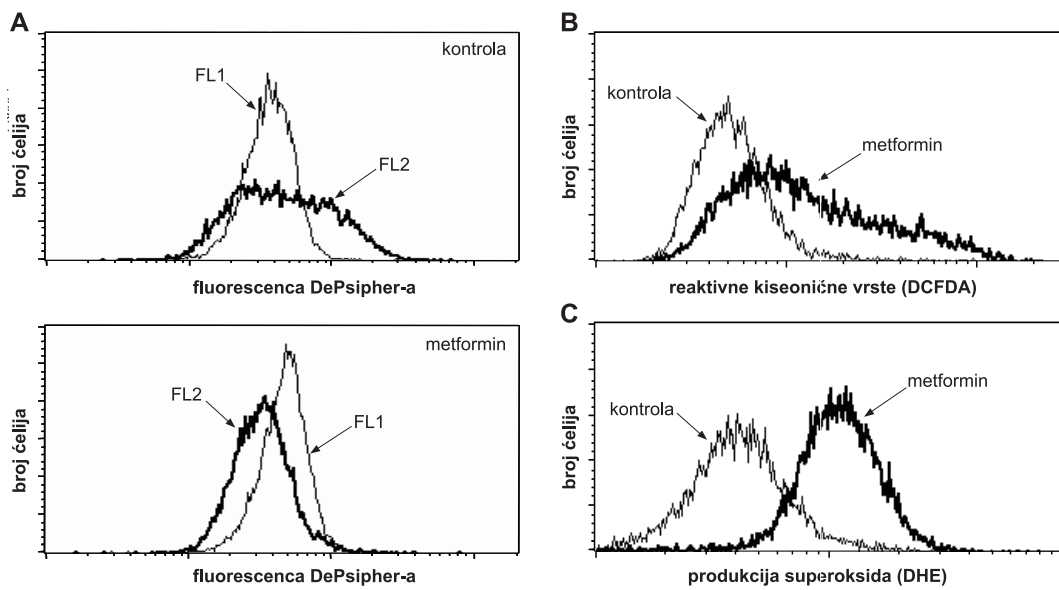
**Slika 20. Metformin indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa i apoptozu u ćelijama melanoma.** (A, B) B16 ćelije su inkubirane sa metforminom (8 mM) i izlaganje fosfatidil serina na spoljašnju stranu ćelijske membrane (A) ili ćelijski ciklus (B) analizirani su protočnom citofluorimetrijom nakon 48 ili 72 sata. Prikazani su reprezentativni histogrami i dot plotovi iz reprezentativnog od najmanje tri odvojena eksperimenta.

#### 4.20. Apoptoza ćelija melanoma indukovana metforminom zavisi od aktivacije kaspaza, depolarizacije mitohondrija i oksidativnog stresa

Dalje, u ćelijama melanoma ispitivani su mehanizmi proapoptotskog delovanja metformina. Analiza na protočnom citofluorimetru ćelija obojenih ApoStat-om pokazala je da tretman metforminom indukuje aktivaciju kaspaza (Slika 21A). Osim toga, pokazano je da metformin izaziva aktivaciju kaspaze 3 i kaspaze 8, ključnih članova ove porodice enzima (21B, C). S obzirom da su aktivacija kaspaza i apoptoza često povezane sa depolarizacijom mitohondrija i oksidativnim stresom, ispitivan je uticaj metformina na potencijal mitohondrijane membrane i nastajanje RKV u B16 ćelijama. Analiza ćelija melanoma protočnom citofluorimetrijom pokazala je smanjenje odnosa narandžaste prema zelenoj fluorescenci (FL2/FL1) u ćelija obojenim fluorescentnom bojom DePsipher, koja se vezuje za mitohondrije, što odražava smanjenje mitohondrijalnog membranskog potencijala (Slika 22A). Korišćenjem redoks senzitivnog fluorohroma DCFDA pokazan je porast u produkciji RKV u B16 ćelijama tretiranim metforminom (Slika 22B). Produkcija RKV indukovana metforminom može biti delimično pripisana superoksidu, pošto je pokazano da metformin povećava fluorescencu ćelija obojenih sa DHE, bojom koja selektivno fluorescira u prisustvu superoksida (Slika 22C). Ovi podaci ukazuju da je apoptotsko dejstvo metformina u ćelijama melanoma povezano sa aktivacijom kaspaza, depolarizacijom mitohondrija i oksidativnim stresom.



**Slika 21. Metformin indukuje aktivaciju kaspaza.** B16 ćelije su inkubirane sa metforminom (8 mM) u trajanju od 48 sati (A-C). Protočna citofluorimetrija je korišćena da bi se odredila aktivacija svih kaspaza (A), kaspaze-3 (B), ili kaspaze 8 (C). Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog od najmanje tri nezavisna eksperimenta.



**Slika 22. Metformin indukuje depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres.** (A-C) B16 ćelije su inkubirane sa metforminom (8 mM) u trajanju od 24 sata. Korišćena je protočna citofluorimetrija da bi se odredila depolarizacija mitohondrija (A), i nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (B) ili superoksida (C). Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog od najmanje tri nezavisna eksperimenta.

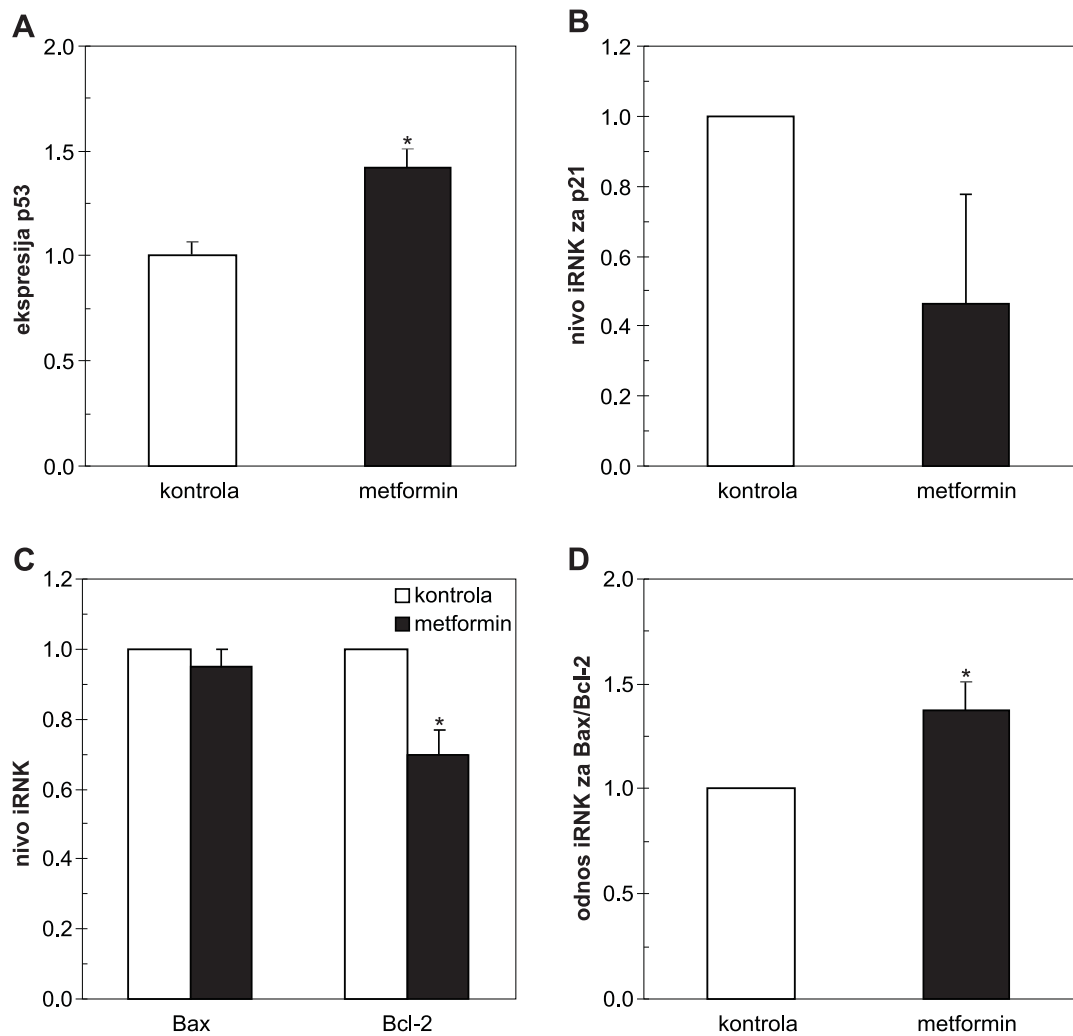
#### 4.21. Metformin povećava odnos Bax/Bcl-2 i ekspresiju p53, ali ne i ekspresiju p21 u ćelijama melanoma

Da bi se dodatno razjasnili mehanizmi pro-apoptotskog dejstva metformina na ćelije melanoma, ispitivani su njegovi efekti na ekspresiju tumor supresora p53, inhibitora ćelijskog ciklusa p21, kao i na glavne članove porodice Bcl-2 proteina koji regulišu apoptozu - proapoptotskog Bax i antiapoptotskog Bcl-2. Tretman metforminom u trajanju od 8 sati povećao je unutarćelijsku koncentraciju tumor supresora p53, što je potvrđeno ELISA testom na fiksiranim ćelijama (Slika 23A). „Real time RT-PCR“ analiza urađena nakon 24 sata pokazala je da metformin nije povećao ekspresiju iRNK za inhibitor ćelijskog ciklusa p21 (Slika 23B). Nivo iRNK za Bax takođe nije bio promenjen, dok je nakon 24 sata značajno smanjena ekspresija iRNK za anti-apoptotski medijator Bcl-2 (Slika 23C), što je dovelo do povećanja odnosa Bax/Bcl-2 (Slika 23D). Dakle, antiproliferativno/proapoptotsko delovanje metformina u ćelijama melanoma je povezano sa modulacijom ekspresije p53 i Bcl-2, ali ne i p21 ili Bax.

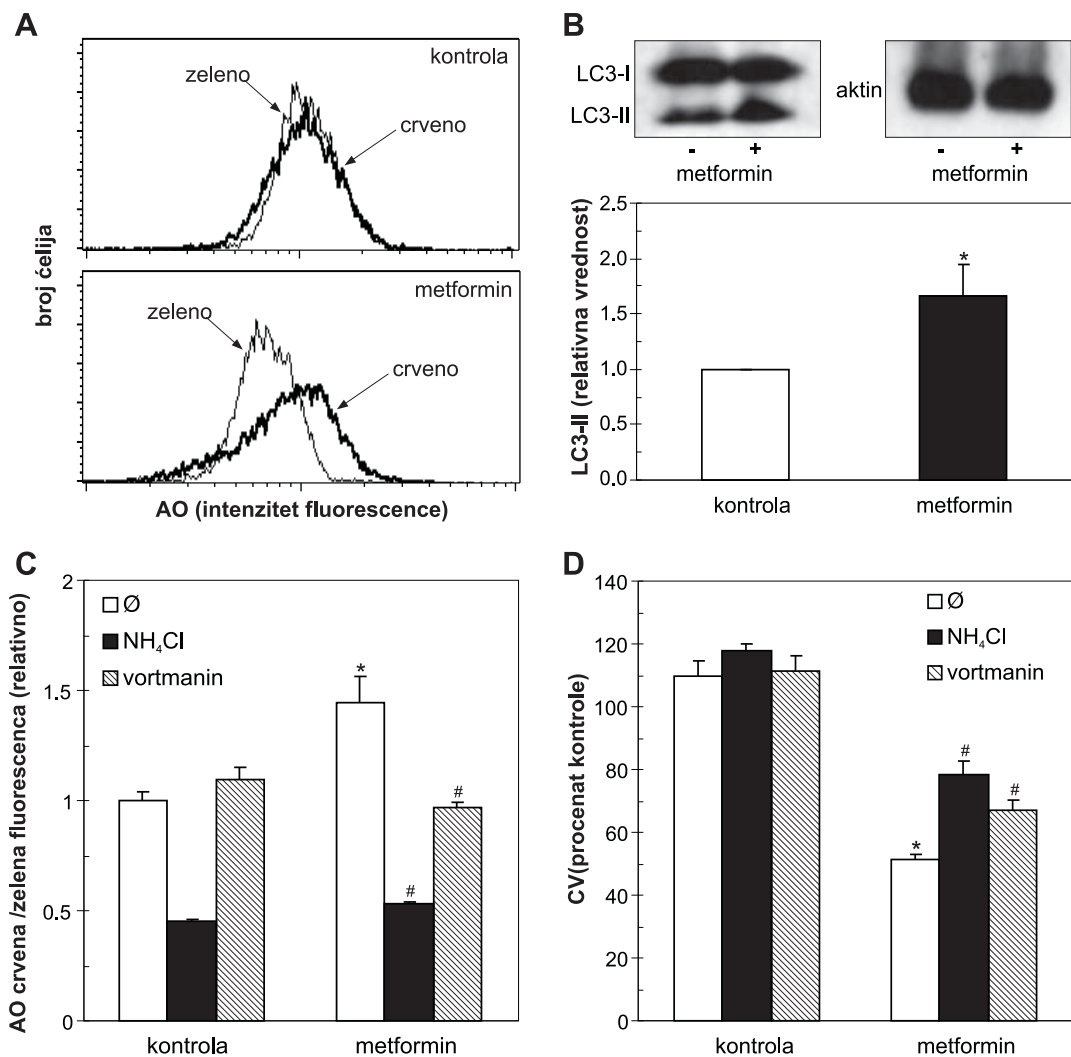
#### **4.22. Autofagija učestvuje u toksičnom dejstvu metformina na ćelije melanoma**

U cilju ispitivanja uloge autofagije u toksičnom efektu metformina na melanomske ćelije, prvo je ispitana njegova sposobnost da indukuje autofagiju u B16 ćelijama. Analiza na protočnom citofluorimetru ćelija obojenih akridin oranžom pokazala je da metformin povećava kiselost citoplazme, što je u skladu sa povećanim prisustvom autofagolizozoma (slika 24A). Osim toga, metformin je indukovao i porast nivoa LC3-II proteina, koji predstavlja marker formiranja autofagozoma (Slika 24B). Vortmanin, koji inhibicijom klase III PI3K sprečava formiranje autofagozoma, kao i amonijum hlorid, koji smanjuje kiselost lizozoma i tako inhibira proteolitičku funkciju autofagolizozoma (Blommaart et al., 1997; Seglen, 1983), smanjili su unutarćelijsko zakišeljavanje indukovano metforminom (Slika 24C). Inhibicija autofagije, bilo u ranim fazama vortmaninom ili kasnim fazama amonijum hloridom, značajno je povećala vijabilitet B16 ćelija melanoma tretiranih metforminom (Slika 24D), što ukazuje da je autofagija uključena u citotoksičnost metformina prema melanomskim ćelijama. Dakle, metformin indukuje citotoksičnu autofagiju u B16 ćelijama melanoma.





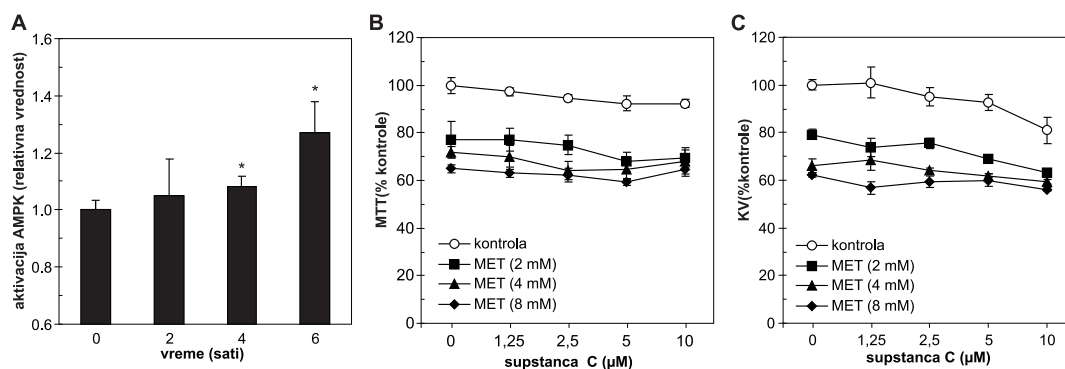
**Slika 23. Metformin povećava odnos Bax/Bcl-2 i ekspresiju p53, ali ne p21.** (A-D) B16 ćelije su tretirane metforminom (8 mM). Ekspresija p53 proteina je određena ELISA testom na fiksiranim ćelijama nakon 8 sati (A), dok su nivoi p21 (B) ili Bax i Bcl-2 iRNK (C) mereni RT-PCR nakon 24 sata i izračunat je odnos Bax/Bcl-2 (D). Podaci su predstavljani kao srednja vrednost $\pm$ SD triplikata reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (A) ili kao srednja vrednost $\pm$ SD iz tri nezavisna eksperimenta (B-D) ( $p < 0.05$  se odnosi na netretirane ćelije)



**Slika 24. Autofagija je uključena u anti-melanoma delovanje metformina.** (A-D) B16 ćelije su inkubirane sa metforminom (8 mM) u odsustvu (A, B) ili prisustvu NH<sub>4</sub>Cl (10 mM) i vortmanina (100 nM) (C, D). Unutarćelijsko zakišeljavanje u akridin oranž obojenim ćelijama, izmereno je nakon 24 sata na protočnom citoflouorimetru (A, C), nivoi LC3-II su određeni nakon 16 sati imunoblotom (B), dok je broj ćelija ispitan nakon 24 sata bojenjem kristal violetom (D). Prikazani su reprezentivni histogrami (A) i imunoblotovi (B). Podaci su prikazani kao srednja vrednost±SD iz tri nezavisna eksperimenta (B, C) ili kao srednja vrednost±SD triplikata iz jednog od tri eksperimenta sa sličnim rezultatima (D) (\*p<0.05 se odnosi na netretirane kontrole i #p<0.05 se odnosi na ćelije tretirane metforminom).

#### 4.23. Toksičnost metformina prema melanomskim ćelijama ne zavisi od aktivnosti AMPK

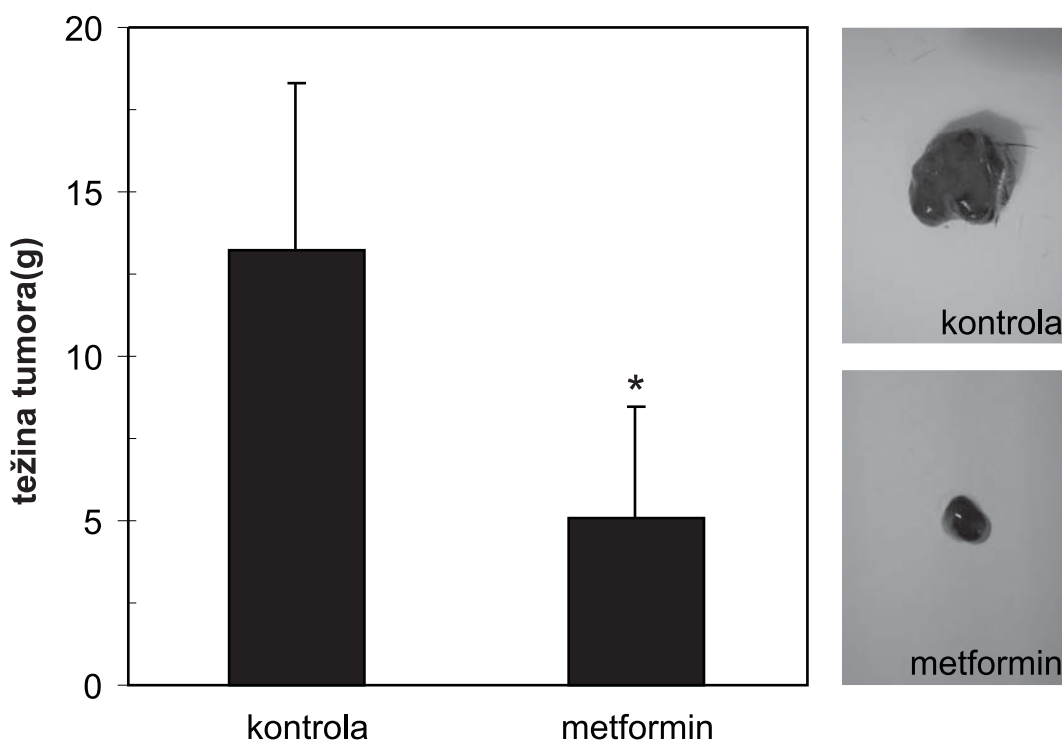
Imajući u vidu da je većina bioloških aktivnosti metformina posredovana delovanjem AMPK (Zhou i sar., 2001), ispitivano je da li je AMPK uključena i u njegovo apoptotsko dejstvo na melanomske ćelije. Kao što je očekivano, metformin je značajno povećao fosforilaciju AMPK nakon 4 i 6 sati, što je potvrđeno ELISA testom na fiksiranim ćelijama (Slika 25A). Međutim, iako je AMPK inhibitor supstanca C (1.25-10  $\mu$ M) efikasno suprimirala metforminom indukovanu aktivaciju AMPK u B16 ćelijama, kristal violet i MTT test su pokazali da to nije bilo praćeno smanjenjem citotoksičnosti metformina (Slika 25 B, C). Ovi rezultati ukazuju da citotoksičnost metformina prema ćelijama melanoma ne zavisi od aktivnosti AMPK.



**Slika 25. Metforminom posredovan anti-melanoma efekat je nezavisan od AMPK.** (A) B16 ćelije su inkubirane sa metforminom (8 mM) i nakon naznačenih vremenskih perioda unutarćelijska koncentracija fosfo-AMPK je određena ELISA testom na fiksiranim ćelijama. (B, C) B16 ćelije su inkubirane različitim koncentracijama metformina (2-8 mM) u odsustvu ili prisustvu različitih koncentracija supstance C (1.25-10  $\mu$ M). Ćelijski vijabilitet je određen nakon 48 sati MTT (B) ili kristal violet testom (C), a rezultati su prikazani kao % odgovarajuće netretirane kontrole. (A-C) Rezultati su srednja vrednost $\pm$ SD triplikata iz reprezentativnog od tri eksperimenta (\* $p$ <0.05 se odnosi na netretirane kontrole).

#### 4.24. Metformin smanjuje rast melanoma *in vivo*

Konačno, da bi se ispitalo da li metformin može da spreči rast melanoma *in vivo*, metformin je dodavan u vodu za piće (600 mg/kg/dnevno) od 7-mog do 21-og dana posle potkožne implantacije B16 melanoma ćelija u singene C57Bl/6 miševе. Sve životinje u kontrolnoj grupi, kao i u grupi tretiranoj metforminom, su razvile tumore. Međutim, prosečna težina tumora izolovanih 21-og dana iz miševa tretiranih metforminom bila je značajno niža nego u kontrolnoj grupi (Slika 26). Ovi rezultati pokazuju da metformin inhibira rast melanoma *in vivo*.



**Slika 26. Metformin redukuje rast melanoma *in vivo*.** C57Bl/6 miševima je subkutano inokulisano  $2.5 \times 10^5$  B16 melanoma ćelija u 100  $\mu$ l PBS. Nakon 7 dana metformin su primali oralno (600 mg/kg/danu; n=17) u vodi koju su pili narednih 14 dana, dok je kontrolna grupa nastavila da pije vodu bez ikakvih dodataka (n=17). Nakon 21 dana od inokulacije melanoma ćelija miševi su žrtvovani i izmerena je težina izolovanih tumora (levo). Fotografije tipičnih tumora iz netretiranih (kontrola) i metforminom tretiranih miševa (desno). Rezultati su prezentovani kao srednja vrednost  $\pm$ SD (\*p< 0.05). Slični rezultati su dobijeni i u drugom eksperimentu.

## 5. DISKUSIJA

U ovoj disertaciji pokazano je citotoksično dejstvo antidijabetičnog leka metformina prema ćelijama glioma i melanoma u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Bitno je naglasiti da metformin nije uticao na vijabilitet primarnih astrocita, što ukazuje na relativno selektivno antigliomsko dejstvo. Rezultati disertacije pokazali su po prvi put dvojni antitumorski efekat metformina, koji zavisi od gustine ćelija. Ovo dvojno dejstvo se manifestuje kao blok ćelijskog ciklusa kod ćelija glioma niske gustine, ili kao apoptotska smrt zavisna od indukcije oksidativnog stresa, depolarizacije mitohondrija i aktivacije kaspaza kod konfluentnih gliomskih ćelija. Iako zaustavlja rast gliomskih ćelija *in vitro*, metformin aktivacijom protektivne kinaze Akt, inhibicijom oksidativnog stresa i blokiranjem aktivacije kaspaza, inhibira toksičnost citostatika cisplatina prema gliomskim ćelijama. Sa druge strane, u ćelijama B16 melanoma, nezavisno od gustine, metformin pored apoptoze posredovane aktivacijom kaspaza, depolarizacijom mitohondrija i oksidativnim stresom, indukuje i citotoksičnu autofagiju. Konačno, oralna administracija metformina značajno je smanjila veličinu tumora u B16 mišjem modelu melanoma.

Prvi deo diskusije baviće se prevashodno citotoksičnim dejstvom metformina na ćelija glioma. Kao što je prethodno pomenuto, metformin je zaustavio proliferaciju humanih i pacovskih gliomskih ćelija niske gustine. Ćelijska proliferacija bila je zaustavljena u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa, što se slaže sa objavljenim podacima na ljudskim ćelijskim linijama karcinoma dojke, prostate, ovarijuma i endometrijuma (Zakikhani i sar., 2006; Ben Saha i sar., 2010b; Cantrell i sar., 2010; Rattan i sar., 2011). Zanimljivo je da metformin blokira rast netransformisanih ćelija dojke (Zakikhani i sar., 2006), ali ne i proliferaciju primarnih astrocita u našem radu, ukazujući na to da različiti mehanizmi regulišu rast ova dva tipa ćelija. Blok ćelijskog ciklusa i morfološke promene indukovane metforminom nisu povezane sa sazrevanjem ćelija glioma u astrocite, jer je metformin značajno smanjio ekspresiju markera astrocita GFAP u C6 ćelijama glioma. Međutim, opisano je da C6 ćelije takođe mogu da se diferenciraju prema oligodendrocitnoj liniji (Lee i sar., 1992), pa je potrebno ispitati da li i metformin izaziva sličan efekat.

Zanimljivo je da metformin nije ubijao ćelije glioma niske gustine, kao ni konfluentne primarne astrocite, dok je u konfluentnim ćelijama glioma i u ćelijama melanoma nezavisno od gustine indukovao apoptozu. Proapoptotsko delovanje metformina opisano u ovoj disertaciji u skladu je studijama koje pokazuju da metformin indukuje apoptozu u ćelijama tumora dojke, endometrijuma i pankreasa (Kefas i sar., 2004; Bae i sar., 2007; Wang i sar., 2008; Liu i sar., 2009). Prekomerna produkcija RKV može da izazove otvaranje mitohondrijalnih pora (OMP), što je povezano sa depolarizacijom mitohondrija i posledičnim oslobađanjem malih molekula kao što je citohrom C. Oslobađanje citohroma C dovodi do kaskadne aktivacije kaspaza (Loeffler i Kroemer 2000; Zorov i sar., 2006). Sa druge strane, kolaps potencijala mitohondrijalne membrane aktivira nastanak RKV u mitohondrijskom lancu elektrona, na taj način obezbeđujući pozitivnu povratnu spregu za pojačanu produkciju RKV koja vodi daljem oštećenju mitohondrija i ćelije (Zorov i sar., 2006). Protektivni efekti OMP inhibitora ciklosporina i antioksidativnog agensa N-acetilcisteina potvrdili su da je apoptoza indukovana metforminom u ćelijama glioma posredovana depolarizacijom mitohondrijalne membrane i oksidativnim stresom. Imajući u vidu da depolarizacija mitohondrijane membrane prethodi pojavi oksidativnog stresa, kao i činjenicu da agensi koji sprečavaju oksidativni stres ne mogu da obnove potencijal membrane mitohondrija u ćelijama glioma tretiranim metforminom, čini se da produkcija RKV nije odgovorna za zapaženu depolarizaciju mitohondrija. Stoga, štetni efekti RKV pokazani u ovoj studiji su verovatno ograničeni na održavanje i potenciranje oštećenja mitohondrija primarno nastalog nezavisno od oksidativnog stresa, kao i na aktivaciju kaspaza nezavisnu od mitohondrija. Dok vremenska kinetika ispitivanih događaja podržava ulogu mitohondrija kao izvora RKV, nije bilo moguće da se direktno dokaže ova pretpostavka, jer je hiperpolarizacija mitohondrija sa CsA bila paradoksalno povezana sa porastom u unutarćelijskom nivou RKV. Ovaj efekat je verovatno nezavisan od mitohondrija i može da nastane zbog prekomernog formiranja superoksida i/ili vodonik peroksida za vreme unutarćelijskog metabolizma CsA (Nguyen i sar., 1999). Treba primetiti da su podaci iz ove disertacije očigledno kontradiktorni sa nalazima da metformin inhibira OMP indukovano visokim koncentracijama glukoze ili oksidativnim stresom. Ova inhibicija depolarizacije mitohondrija metforminom inhibira i ćelijsku smrt u humanim endotelnim ćelijama i ćelijskoj liniji epidermalnog karcinoma (Guigas i

sar., 2004; Daille i sar., 2005; Gallo i sar., 2005). Moguće je da je ovo neslaganje posledica upotrebe različitih tipova ćelija, različitih koncentracija metformina ili nekih drugih razlika u uslovima kultivisanja. Tako je, na primer, metformin sprečio smrt pacovskih kardiomiocita i humanih beta ćelija pankreasa indukovanu zasićenim masnim kiselinama i/ili glukozom (El-Assaad i sar., 2003; An i sar., 2006), dok je u visokim koncentracijama potencirao toksičnost indukovanu palmitinskom kiselinom u kardiomiocitima i indukovao apoptozu u primarnim beta ćelijama pacova (Kefas i sar., 2004; An i sar., 2006). Dok mehanizmi modulacije ćelijske smrti metforminom, koji očigledno zavise od eksperimentalnih uslova i tipa ćelija, tek treba da budu u potpunosti razjašnjeni, predložen je sledeći model delovanja metformina na ćelije glioma: trajna depolarizacija mitohondrija posredovana metforminom i oksidativni stres indukuju apoptozu zavisnu od sinteze proteina i aktivacije kaspaza u konfluentnim ćelijama, dok su prolazni gubitak potencijala membrane mitohondrija i odsustvo oksidativnog stresa povezani sa blokom ćelijskog ciklusa u gliomskim ćelijama niske gustine (Shema 1).

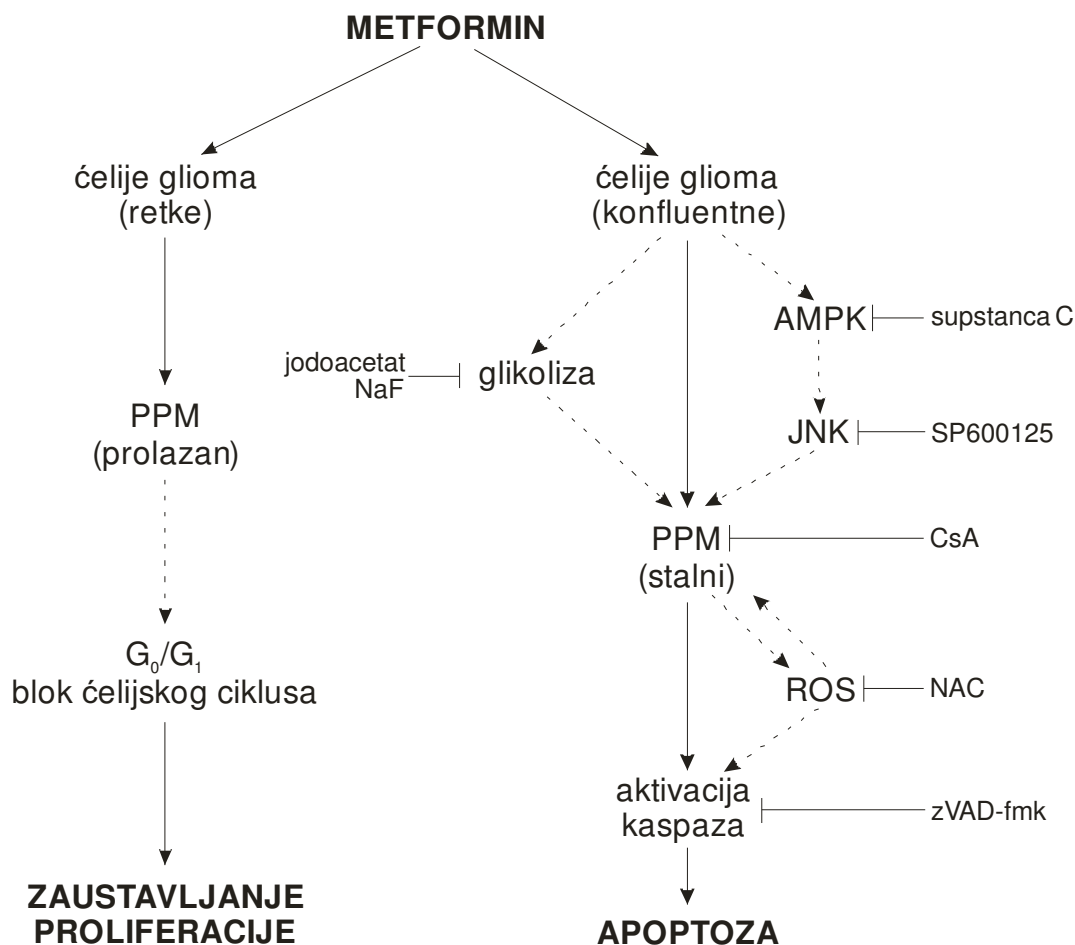
U ovoj disertaciji pokazano je i da apoptoza indukovana metforminom delimično zavisi od aktivacije MAP kinaze JNK, koja prethodi depolarizaciji mitohondrija i oksidativnom stresu (Shema 1). Indukcija JNK metforminom u beta ćelijama pacova i MIN6 ćelijama insulinoma usledila je nakon aktivacije AMPK (Kefas i sar., 2004), što ukazuje da bi JNK mogla da bude jedan od nishodnih posrednika apoptotičnog programa koji inicira AMPK. Eksperimenti sa agonistom AMPK (AICAR) i inhibitorom AMPK (supstanca C) podržavaju ulogu AMPK u citotoksičnom dejstvu metformina na gliomske ćelije. Uloga AMPK u inhibiciji proliferacije i umiranju tumorskih, ali i primarnih ćelija, već je prethodno pokazana. Tako, na primer, AMPK aktivirana od strane tumor supresor kinaze LKB1 dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi stimulacijom p53/p21 ose i inhibicijom mTOR puta (Inoki i sar., 2003; Jones i sar., 2005) i aktivira apoptozu zavisnu od kaspaza u brojnim tipovima primarnih i tumorskih ćelija (Meisse i sar., 2002; Campas i sar., 2003; Kefas i sar., 2003). Studija na pacovskim kardiomiocitima pokazala je da metformin, slično ostalim aktivatorima AMPK, indukuje translokaciju citosolnog proteina Bax u mitohondrije (Capano i Crompton 2006), što predstavlja jedan od mehanizama za permeabilizaciju membrane mitohondrija i aktivaciju apoptoze. Osim toga, inhibicija aktivnosti AMPK spasila je ćelije karcinoma dojke i beta ćelije pankreasa od inhibicije

rasta ili apoptotične ćelijske smrti posredovane metforminom (Kefas i sar., 2004; Zakikhani i sar., 2006), što potvrđuje ulogu AMPK u zapaženim efektima. Zanimljivo je da su rezultati ove disertacije pokazali da metformin i AICAR nisu toksični za primarne astrocite pacova. Takođe, pokazano je da prekomerna aktivacija AMPK štiti astrocite od apoptoze indukovane masnim kiselinama (Blazquez i sar., 2001). Stoga, trebalo bi ispitati da li bi se različiti efekti metformina na proliferaciju i vijabilitet primarnih astrocita u poređenju sa transformisanim ćelijama mogli pripisati razlici u njihovom odgovoru na aktivaciju AMPK. U svakom slučaju, selektivno ubijanje transformisanih astrocita ukazuje da bi metformin mogao da bude dobar kandidat za tretman glioma.

U zavisnosti od ispitivanog tipa ćelija opisano je da metformin ili potencira ili inhibira glikolizu (An i sar., 2006; Guigas i sar., 2006). Pad pH vrednosti u supernatantima ćelijskih kultura, koji najverovatnije potiče od stvaranja mlečne kiseline, ukazuje da je u našim eksperimentalnim uslovima metformin stimulisao glikolizu. Ovaj porast u glikolizi verovatno je posledica inhibicije kompleksa I mitohondrija od strane metformina i pokušaja ćelija da glikolizom obezbede energiju. Citotoksičnost visokih doza jodoacetata i NaF pokazanih u ovoj disertaciji u skladu je sa ranijim istraživanjima na različitim tumorskim ćelijama (Xu i sar., 2005). S druge strane, sposobnost niskih doza inhibitora glikolize da smanje citotoksično delovanje metformina ukazuje da je glikoliza indukovana metforminom uključena u njegovo citotoksično delovanje (Shema 1). Ovo zapažanje je u skladu sa činjenicom, da je citotoksičnost metformina prema kardiomiocitima povezana sa snažnim porastom u glikolizi (An i sar., 2006). Nasuprot navedenim, kao i podacima dobijenim u ovoj disertaciji, inhibitor glikolize 2-deoksiglukoza potencirao je citotoksično delovanje metformina na ćelije humanog karcinoma želuca i ezofagusa (Cheong i sar., 2011). Pomenuto neslaganje moglo bi da se objasni korišćenjem različitih ćelijskih linija i/ili mogućem efektu 2-dezoksiglukoze nezavisnom od inhibicije glikolize. Zanimljivo je da u našim eksperimentalnim uslovima metformin nije doveo do zakišeljavanja kultura primarnih astrocita, što ukazuje da bi njihova rezistentnost na apoptozu mogla bar delimično da bude rezultat nemogućnosti da u prisustvu metformina aktiviraju glikolizu, koja inače prevashodno karakteriše tumorske ćelije (Pelicano i sar., 2006). Definitivna uloga glikolize u



citotoksičnosti metformina, uključujući moguću vezu sa aktivacijom AMPK, JNK i drugim apoptotskim putevima tek treba da bude detaljno ispitana.



Shema 1. Hipotetički model toksičnog dejstva metformina prema ćelijama glioma. Metformin dovodi do zaustavljanja proliferacije kod retkih ćelija glioma ili apoptozu kod konfluentnih ćelija glioma. PPM-promena propustljivosti mitohondrija. Istačkane linije prikazuju pretpostavljene, ali ne i direktno potvrđene odnose. Prikazana su i mesta delovanja farmakoloških inhibitora.

Iako je prvobitna ideja bila da se metforminom potencira antigliomsko delovanje hemoterapeutika cisplatina, čija je široka upotreba kompromitovana otpornošću koja se kod tumorskih ćelija javlja nako dugotrajnog korišćenja, pokazali smo da metformin smanjuje njegovu citotoksičnost. Imajući u vidu antitumorsko dejstvo metformina pokazano u ovoj studiji i studijama drugih autora (Anisimov i sar., 2005; Evans i sar., 2005; Bowker i sar., 2006; Buzzai i sar., 2007; Ben Saha i sar., 2008; Huang i sar.,

2008), ali i činjenice da metformin potencira dejstvo cisplatina na epitelnim ćelijama karcinoma jajnika (Gotlieb i sar., 2008), njegova sposobnost da poboljša preživljavanje ćelija glioma tretiranih cisplatinom može delovati iznenađujuće. Međutim, trebalo bi imati na umu da je citoprotektivna uloga metformina već pokazana u normalnim ćelijama i tkivima. Naime, metformin sprečava smrt endotelnih ćelija indukovanu visokim koncentracijama glukoze (Detaille i sar., 2005), redukuje lipotoksičnost u humanim ostrvcima pankreasa (Lupi i sar., 2002) i štiti mozak u pacovskom modelu oksidativnog oštećenja CNS (Correia i sar., 2008a; Correia i sar., 2008b). Takođe je pokazano da metformin štiti srčani mišić od ishemije (Bhamra i sar., 2008) i tkivo jetre od hepatotoksičnosti izazvane ugljen-tetrahloridom (Poon i sar., 2003). Uzimajući u obzir prethodno pokazanu sposobnost metformina da potencira cisplatinom indukovano ubijanje ćelija karcinoma jajnika (Gotlieb i sar., 2008), izgleda da efekat metformina na smrt tumorskih ćelija posredovanu cisplatinom zavisi od tipa tumorskih ćelija.

Podaci dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju da citoprotektivno dejstvo metformina u U251 ćelijama zavisi od aktivacije serin/treonin kinaze Akt, koja predstavlja supstrat za PI3K. Ovaj signalni put ima bitnu ulogu u kontroli preživljavanja ćelija i zaustavljanju apoptoze. Akt inhibira apoptozu direktno preko fosforilacije i inaktivacije nekoliko proapoptotskih meta, kao što su Bad, *forkhead* transkripcioni faktori, c-Raf (*engl. cellular Rapidly accelerated fibrosarcoma*) i kaspaza 9 (Datta i sar., 1997; Cardone i sar., 1998; Brunet i sar., 1999; Zimmermann i Moelling 1999), ili indirektno preko aktivacije NF- $\kappa$ B i posledične transkripcije gena koji utiču na preživljavanje (Romashkova i Makarov 1999). U skladu sa tim, zna se da je ekspresija mnogih komponenti PI3K/Akt signalnog puta povećana u tumorima otpornim na hemoterapiju (Yuan i Cantley 2008). Takođe, pokazano je da inhibicija Akt povećava osetljivost tumorskih ćelija na cisplatin (Hayakawa i sar., 2000; Viniegra i sar., 2002; Winograd-Katz i Levitzki 2006). U skladu sa navedenim činjenicama, pokazano je da antiapoptotska aktivnost metformina u U251 ćelijama povezana sa blokadom inhibicije Akt koju izaziva cisplatin. Hipoteza da citoprotektivna aktivnost metformina zavisi od Akt signalnog puta podržana je i sposobnošću Akt inhibitora da ponište antiapoptotski efekat metformina.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji potvrđuju prethodne nalaze da je oksidativni stres bitan za citotoksično dejstvo cisplatina (Schweyer i sar., 2004a; Schweyer i sar.,

2004b; Simons i sar., 2007). Iako nije direktno ispitana moguća veza između aktivnosti Akt i oksidativnog stresa izazvanog cisplatinom, sposobnost inhibitora Akt da sami indukuju produkciju RKV ukazuje da i cisplatinom indukovana inhibicija Akt doprinosi indukciji oksidativnog stresa i apoptoze. Ta pretpostavka je u skladu sa činjenicom da je aktivacija Akt metforminom povezana sa smanjenom produkcijom RKV u ćelijama tretiranim cisplatinom. Shodno tome, pokazano je da aktivacija Akt sprečava indukciju OMP oksidativnim stresom i štiti kardiomiocyte, mezenhimalne stem ćelije i ćelije karcinoma prostate od oksidativnog stresa (Bhamra i sar., 2008; Muders i sar., 2009; Wang i sar., 2009). Pored toga, imajući u vidu kompleksnu ulogu Akt u regulaciji ćelijske smrti, razumljivo je pretpostaviti da pored antioksidativne aktivnosti i neki drugi mehanizmi zavisni od aktivacije Akt mogu doprineti inhibitornom dejstvu metformina na antitumorsku aktivnost cisplatina.

Prethodno je pokazano da aktivacija AMPK u ćelijama tretiranim cisplatinom predstavlja protektivni signal (Kim i sar., 2008; Harhaji-Trajkovic i sar., 2009), kao i da je većina dejstava metformina posredovana ovim enzimom (Zhou i sar., 2001; Correia i sar., 2008a; Correia i sar., 2008b). Dakle, logično je pretpostaviti da bi AMPK mogla da učestvuje i u aktivaciji Akt metforminom i posledičnoj inhibiciji citotoksičnog dejstva cisplatina u ovoj disertaciji. Iako se AMPK i Akt signalni putevi smatraju nezavisnim, AMPK je uključena u aktivaciju Akt indukovanu faktorom rasta vaskularnog endotelijuma u ćelijama karcinoma dojke (Levine i sar., 2007). Međutim, podaci ove studije pokazuju da su aktivacija Akt i posledično antiapoptotsko dejstvo metformina nezavisni od AMPK. Naime, metformin nije dodatno povećao aktivaciju AMPK u ćelijama U251 glioma tretiranim cisplatinom. Osim toga, drugi inhibitori AMPK nisu kao metformin aktivirali Akt, niti su delovali citoprotektivno. Takođe, ranije je pokazano da inhibicija ekspresije AMPK RNK interferencijom ne utiče na aktivnost Akt u U251 ćelijama (Vucicevic i sar., 2011). Ova činjenica nije neobična ukoliko se uzme u obzir da su mnogi efekti metformina nezavisni od aktivnosti AMPK, kao npr. supresija ekspresije glukozo-6-fosfataze u ćelijama hepatoma pacova (Ota i sar., 2009), inhibicija ekspresije HER2 onkoproteina u ćelijama kancera dojke (Vazquez-Martin i sar., 2009), kao i oksidacija masnih kiselina i iskorišćenje glukoze u srcu (Saeedi i sar., 2008). U prethodnom istraživanju pokazano je da autofagija zavisna od AMPK štiti tumorske ćelije od apoptotske smrti indukovane cisplatinom (Harhaji-Trajkovic i sar.,

2009). U skladu sa predloženim AMPK-nezavisnim antiapoptotskim delovanjem metformina, nalaz da metformin ne pojačava autofagiju u ćelijama tretiranim cisplatinom ukazuje da protektivna autofagija ne učestvuje u smanjenju citotoksičnosti cisplatina. Konačno, aktivacija različitih članova signalnog puta familije MAP kinaza, uključujući i ERK, jedan je od glavnih unutarćelijskih događaja indukovanih u tumorskim ćelijama tretiranim cisplatinom (Schweyer i sar., 2004a; Schweyer i sar., 2004b; Mijatovic i sar., 2005). Međutim, pošto metformin nije uspeo da inhibira cisplatinom indukovanu aktivaciju ERK, zaključeno je da njegova citoprotektivna aktivnost ne zavisi od ERK. Dakle, iako toksičan za gliomske ćelije kada se koristi sam, metformin inhibira ubijanje U251 ćelija cisplatinom. Zapaženi antiapoptotski efekat metformina u U251 ćelijama izloženim cisplatinu ne zavisi od autofagije i aktivnosti ERK. Protektivni efekat metformina posredovan je aktivacijom Akt i posledičnom inhibicijom oksidativnog stresa, aktivnosti kaspaza i indukcije apoptoze.

Pored toksičnog efekta prema ćelijama glioma, pokazano je i da metformin ubija ćelije melanoma u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Metformin je u *in vitro* uslovima blokirao proliferaciju B16 ćelija u G<sub>2</sub>/M fazi ćelijskog ciklusa i indukovao apoptozu i autofagiju povezanu sa modulacijom p53 i Bcl-2, depolarizacijom mitohondrija i oksidativnim stresom (Shema 2). Među brojnim studijama u kojima je ispitivano anti-proliferativno i/ili proapoptotsko dejstvo metformina na različitim tumorskim ćelijskim linijama (Kourelis i Siegel in press), pokazana je citotoksičnost metformina prema ćelijama melanoma u *in vitro* uslovima (Woodard i Plataniias 2010), kao i u *in vivo* uslovima (Tomic i sar., 2011). Iako mehanizmi citotoksičnosti metformina prema ćelijskim linijama humanog melanoma SK-MEL-2 i SK-MEL-28 nisu bili direktno ispitivani, predložena je moguća uloga AMPK, s obzirom da je drugi aktivator AMPK (AICAR) imitirao efekat metformina (Woodard i Plataniias 2010). U drugoj studiji je pokazano da metformin aktivira AMPK, što dovodi do aktivacije autofagije koja je citotoksična za humane ćelije melanoma A375 (Tomic i sar., 2011). Međutim, citotoksično dejstvo metformina u ovoj disertaciji nije zavisilo od AMPK, s obzirom da inhibicija AMPK supstancom C nije uspjela čak ni delimično da poveća vijabilitet B16 ćelije melanoma tretiranin metforminom. Ovakva pretpostavka u skladu je sa brojnim studijama koje pokazuju da i AICAR i metformin ograničavaju rast i/ili indukuju smrt različitih

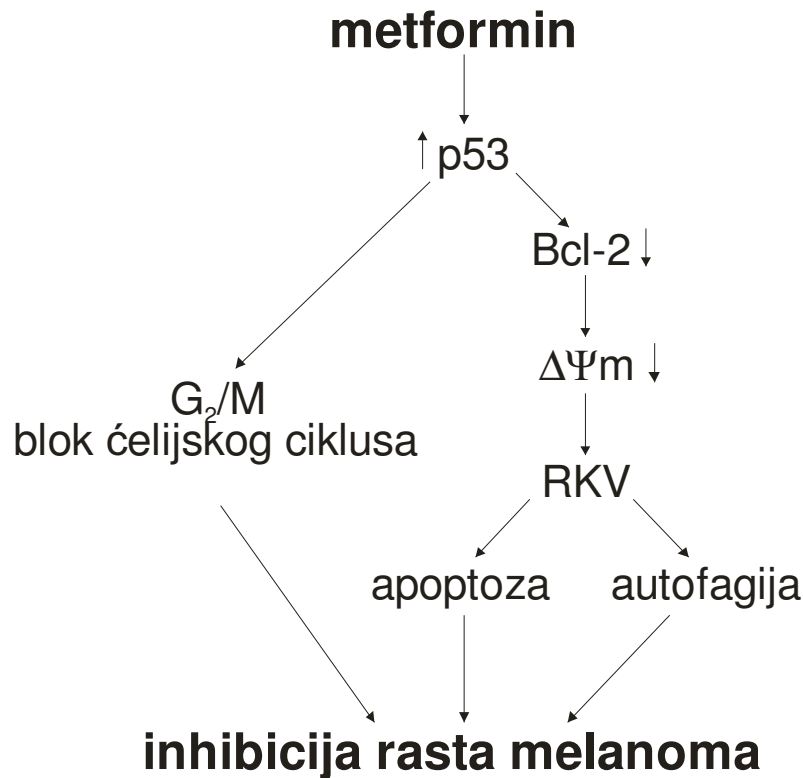
tumorskih ćelijskih linija nezavisno od aktivacije AMPK (Ben Sahra i sar., 2008; Robert i sar., 2009; Santidrián i sar., 2010; Rattan i sar., 2011).

Rezultat ove disertacije da metformin blokira progresiju ćelijskog ciklusa u B16 ćelijama melanoma u G<sub>2</sub>/M fazi ne slaže sa podacima dobijenim za ćelije glioma, kao ni sa prethodnim studijama koje su pokazale G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> blok ćelijskog ciklusa u ćelijama karcinoma jajnika i endometrijuma (Cantrell i sar., 2010; Rattan i sar., 2011). S druge strane, naši podaci su u skladu sa sposobnošću metformina, samog ili kombinovanog sa 2-deoksiglukozom ili pakslitakselom, da indukuje G<sub>2</sub>/M blok ćelijskog ciklusa u ćelijama karcinoma prostate i jajnika (Ben Sahra i sar., 2010b; Rocha i sar., 2011; Yasmeen i sar., 2011). Ovo neslaganje može biti objašnjeno ćelijskom specifičnošću antiproliferativnog delovanja metformina i/ili razlikama u eksperimentalnim uslovima. Pokazano je da blok ćelijskog ciklusa u G<sub>2</sub>/M fazi može biti posredovan inhibitorom ćelijskog ciklusa p21 (Gartel i Radhakrishnan 2005; Wong i sar., 2008), kao i nezavisan od aktivacije p21 (Miyamoto-Yamasaki i sar., 2007; Hemmati i sar., 2008). Prema rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji antiproliferativno dejstvo metformina izgleda da ne zavisi od p21, s obzirom da metformin nije povećao njegovu ekspresiju u B16 ćelijama melanoma. Metformin takođe nije povećao ekspresiju p21 u ćelijama karcinoma dojke (Alimova i sar., 2009; Liu i sar., 2009). S druge strane, primećen je rani porast ekspresije tumor supresora p53 u ćelijama melanoma tretiranih metforminom. Ova činjenica je u skladu sa ulogom p53 u blokadi ćelijskog ciklusa u G<sub>2</sub>/M fazi (Taylor i Stark 2001). Pored antiproliferativnog dejstva, u ovoj disertaciji je pokazano da metformin indukuje apoptozu ćelija melanoma, povezanu sa oksidativnim stresom, depolarizacijom membrane mitohondrija i aktivacijom kaspaza. Sposobnost metformina da poveća produkciju RNV u ćelijama melanoma u skladu je sa sličnim rezultatima dobijenim na U251 ćelijama, kao i sa podacima drugih autora (Anedda i sar., 2008; Onken i Driscoll 2010). Oksidativni stres izazvan metforminom u ćelijama melanoma, kao i kod gliomskih ćelija, bio je praćen povećanom produkcijom superoksida. U skladu sa rezultatima na U251 ćelijama, ali i studijama drugih autora (Carvalho i sar., 2008), oksidativni stres indukovani metforminom korelira sa smanjenjem membranskog potencijala mitohondrija, što ukazuje na povezanost između ova dva fenomena. Takođe, u skladu sa sposobnošću citohroma C da nakon izlaska iz oštećenih mitohondrija aktivira kaskadu kaspaza (Nguyen i sar., 1999; Loeffler i

Kroemer 2000), pokazano je da i metformin u ćelijama melanoma aktivira kaspaze. Zanimljivo je da je pored aktivacije ključne efektorske kaspaze, kaspaze-3, u ćelijama melanoma metformin aktivirao i kaspazu 8 zavisnu od receptora smrti, koja pripada tzv. egzogenom putu indukcije apoptoze. Metformin je takođe aktivirao kaspazu 8 u ćelijama karcinoma pankreasa (Wang i sar., 2008). Sposobnost metformina da stimuliše egzogeni puta aktivacije kaspaza može da se objasni činjenicom da kaspaza 8 može da bude aktivirana i kaspazom 3, koja pripada endogenom, tj. mitohondrijalnom putu apoptoze (Wieder i sar., 2001).

Mitohondrijalni put apoptoze uglavnom je regulisan Bcl-2 porodicom proteina, uključujući proapoptotski Bax i antiapoptotski Bcl-2 kao tipične članove (Reed 2006). U eksperimentima dobijenim u ovoj disertaciji, tretman ćelija melanoma metforminom nije uticao na ekspresiju Bax, ali je značajno smanjio ekspresiju Bcl-2, što je povećalo proapoptotski potencijal izražen odnosom Bax/Bcl-2. Ovome je prethodio porast u ekspresiji tumor supresora p53, poznatog inhibitora transkripcije Bcl-2 (Budhram-Mahadeo i sar., 1999). Dakle, logično je pretpostaviti da je tretman ćelija melanoma metforminom aktivirao porast p53 i posledično smanjenje ekspresije Bcl-2, što je izazvalo Bax-zavisnu depolarizaciju mitohondrija i oksidativni stres, te sledstvenu inicijaciju mitohondrijalnog apoptotskog puta (Shema 2). Međutim, treba napomenuti da čak i u odsustvu porasta Bax/Bcl-2 odnosa, promena konformacije citosolnog Bax može da prouokuje njegovu ugradnju u spoljašnju membranu mitohondrija i otvaranje mitohondrijskog anjonskog kanala zavisnog od napona, što predstavlja signal za inicijaciju apoptoze (Wolter i sar., 1997). Štaviše, pokazano je da metformin indukuje translokaciju citosolnog Bax u mitohondrije pacovskih kardiomicita (Capano i Crompton 2006), što ukazuje da bi sličan mehanizam mogao da funkcioniše i u ćelijama melanoma. Takođe, pokazano je da metformin može da se veže za izolovane mitohondrije pacova i direktno poremeti njihovu funkciju (Carvalho i sar., 2008). Osim apoptoze, oksidativni stres može da aktivira i autofagiju (Kiffin i sar., 2006), a podaci iz ove disertacije ukazuju da je indukcija autofagije uključena u citotoksičnost metformina prema melanomskim ćelijama (Shema 2). Takva pretpostavka je u skladu sa sličnim podacima dobijenim sa drugim antitumorskim agensima (Mizushima i sar., 2008), kao i sa sposobnošću autofagije da potencira apoptozu (Fimia i Piacentini 2010). Sposobnost metformina da indukuje citotoksičnu autofagiju u različitim tumorskim ćelijama takođe

je prethodno pokazana (Tomic i sar., 2011; Shi i sar., 2012). Ostaje na budućim studijama da detaljno ispituju interakcije pokazane u ovoj disertaciji (Schema 2), kao i njihov doprinos citotoksičnom dejstvu metformina prema ćelijama melanoma.



Schema 2. Mehanizmi antimelanoma dejstva metformina. Veze između zapaženih efekata su isključivo hipotetičke i bazirane na prethodnim zapažanjima ( $\Delta\Psi_m$ ) potencijal membrane mitohondrija; RKV reaktivne kiseonične vrste.

Brojne studije su pokazale da metformin inhibira rast tumora *in vivo*. Osim što je inhibirao proliferaciju i indukovao apoptozu u *in vitro* uslovima, metformin je zaustavio i rast tumorskog ksenografta humanih ćelija karcinoma dojke u mišu (Zakikhani i sar., 2006; Liu i sar., 2009). Pokazano je da je metformin selektivno toksičan prema p53<sup>-</sup> humanim ćelijama karcinoma debelog creva, kao i da inhibira njihov rast u mišjem ksenograftu (Buzzai i sar., 2007). Ovaj antidiijabetik je takođe suprimirao rast tumora u HER-2/neu transgenim miševima koji spontano razvijaju karcinom dojke (Anisimov i sar., 2005). Osim toga, metformin je zaustavio i razvoj hemijski indukovanih tumora pluća i preneoplastične lezije kolona u miševima (Hosono i sar., 2010a; Memmott i sar.,

2010). U skladu sa ovim rezultatima, u ovoj disertaciji je pokazano da metformin inhibira rast melanoma *in vivo*.

Dakle, u skladu sa prethodnim rezultatima dobijenim na različitim tumorskim ćelijskim linijama, u ovoj disertaciji je pokazano da metformin ispoljava snažno citotoksično dejstvo na ćelije glioma i melanoma u *in vitro* uslovima, a prvi put je pokazana i njegova sposobnost da inhibira rast melanoma *in vivo*. Ovo istraživanje je donekle rasvetlilo mehanizme ćelijski specifičnog antitumorskog delovanja ovog antidijabetika kod glioma i melanoma. Imajući u vidu da su pomenuti tumori izuzetno agresivni i da za njih još uvek ne postoji adekvatna terapija, čini se da je metformin dobar kandidat za njihov tretman. Takođe, budući da je metformin lek koji se već u nalazi u širokoj upotrebi za tretman dijabetesa tipa 2, ne bi bile potrebne dugotrajne kliničke studije koje bi ispitivale njegova potencijalna neželjena dejstva. Bitno je napomenuti da su efekti metformina u ovoj studiji primećeni na farmakološkoj dozi od 8 mM, što je doza koja se često koristi u *in vitro* studijama (Kefas i sar., 2004; Gallo i sar., 2005; Capano i Crompton 2006; Carvalho i sar., 2008), ali koja je znatno viša od terapijskih doza u krvi pacijenata obolelih od dijabetesa (Sum i sar., 1992). Međutim, pokazano je da se nakon tretmana metformin akumulira u tkivima u koncentraciji sličnoj onoj koja je korišćena u našim eksperimentima (Wilcock i Bailey 1994). Konačno, imajući u vidu da se u hemoterapiji najčešće koristi više citostatika da bi se postigao zadovoljavajući efekat, postavlja se pitanje kakav je efekat kombinovanja metformina sa drugim citostaticima. Nasuprot očekivanjima, metformin je inhibirao antitumorsko dejstvo cisplatina na ćelijama glioma. Ovaj nalaz ukazuje da metformin verovatno nije dobar kandidat za kombinovanu terapiju sa cisplatinom, bar ne u tretmanu glioma. Osim toga, ova studija dovodi u pitanje svrsishodnost istovremenog korišćenja pomenutih lekova kod dijabetičnih pacijenata koji istovremeno imaju i tumor, što nije redak slučaj, budući da čak 7% odraslih u razvijenim zemljama ima dijabetes tipa 2, te stoga i povećani rizik za nastanak malignih tumora (Wolf i sar., 2005). Dakle, imajući na umu sposobnost metformina da smanjuje rizik obolevanja od tumora, poboljšava prognozu kod obolelih i u nekim slučajevima pojačava odgovor na hemoterapiju, kao i zadovoljavajući sigurnosni profil i niske troškove terapije metforminom, rezultati ove disertacije podržavaju dalja istraživanja ovog antidijabetika



u terapiji glioma i melanoma, uz napomenu da prethodno treba dobro ispitati njegove interakcije sa drugim lekovima koji se koriste u hemoterapiji.

## 6. ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U ćelijama glioma, ali ne i primarnim astrocitima, metformin indukuje blok u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa, kao i apoptozu povezanu sa oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza, mehanizmima koji zavise od aktivacije AMPK, JNK i glikolize. Metformin u ćelijama glioma inhibicijom oksidativnog stresa i aktivacije kaspaza smanjuje apoptozu indukovanu cisplatinom, mehanizmima koje zavise od aktivacije Akt, ali ne i od modulacije ERK, AMPK i autofagije.

2. U ćelijama melanoma, metformin indukuje G<sub>2</sub>/M blok i AMPK-nezavisnu apoptozu i citotoksičnu autofagiju, što je povezano sa povećanjem ekspresije proapoptotskog proteina p53 i odnosa Bax/Bcl-2, kao i oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i aktivacijom kaspaza 3 i 8.

3. Metformin inhibira rast melanoma *in vivo*.

## 7. LITERATURA

- Alimova, I.N., Liu, B. , Fan, Z., Edgerton, S.M., Dillon, T. , Lind, S.E. i Thor, A.D. (2009). "Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. ." *Cell Cycle* **8**: 909-915.
- An, D. , Kewalramani, G. , Chan, J. K. , Qi, D. , Ghosh, S. , Pulinilkunnil, T. , Abrahani, A. , Innis, S. M. i Rodrigues, B. (2006). "Metformin influences cardiomyocyte cell death by pathways that are dependent and independent of caspase-3. ." *Diabetologia* **49**: 2174-2184.
- Anedda, A. , Rial, E. , González-Barroso, M.M., Anedda, A. , Rial, E. i González-Barroso, M.M. (2008). "Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels. ." *J. Endocrinol* **199**: 33-40.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M. , Egormin, P.A. , Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A. , Kovalenko, I.G. , Poroshina, T.E. , Semenchenko, A.V. , Provinciali, M. , Re, F. i Franceschi, C. (2005). "Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. ." *Exp Gerontol* **40**: 685-693.
- Anton, K., Baehring, J. M. i Mayer, T. (2012). "Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives." *Hematol Oncol Clin North Am* **26**(4): 825-853.
- Arjona, D., Rey, J. A. i Taylor, S. M. (2006). "Early genetic changes involved in low-grade astrocytic tumor development." *Curr Mol Med* **6**(6): 645-650.
- Arrington, J. H., 3rd, Reed, R. J., Ichinose, H. i Kremenz, E. T. (1977). "Plantar lentiginous melanoma: a distinctive variant of human cutaneous malignant melanoma." *Am J Surg Pathol* **1**(2): 131-143.
- Bae, E.J. , Cho, M.J. i Kim, S.G. (2007). "Metformin prevents an adaptive increase in GSH and induces apoptosis under the conditions of GSH deficiency in H4IIE cells. ." *J. Toxicol. Environ. Health A* **70**: 1371-1380.
- Bajetta, E, Del Vecchio, M, Bernard-Marty, C i Khayat, D (2002). "Metastatic melanoma:chemotherapy." *Semin Oncol* **29**: 427-425.

- Ben Sahra, I. , Laurent, K. , Loubat, A. i Bost, F. (2008). "The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. ." *Oncogene* **27**: 3576-3586.
- Ben Sahra, I. , Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F. i Bost, F. (2010a). "Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? ." *Mol Cancer Ther* **9**: 1092-1099.
- Ben Sahra, I., Laurent, K. , Giuliano, S. , Larbret, F. , Ponzio, G. , Gounon, P. , Le Marchand- Brustel, Y. , Giorgetti-Peraldi, S. , Cormont, M. , Bertolotto, C. , Deckert, M. , Auberger, P. , Tanti, J.F. i Bost, F. (2010b). "Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. ." *Cancer Res* **70**: 2465-2475.
- Bhamra, G.S. , Hausenloy, D.J. , Davidson, S.M. , Carr, R.D. , Paiva, M. , Wynne, A.M. , Mocanu, M.M. i Yellon, D.M. (2008). "Metformin protects the ischemic heart by the Akt mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. ." *Basic Res. Cardiol.* **103**: 274-284.
- Blazquez, C., Geelen, M.J. , Velasco, G. i Guzman, M. (2001). "The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. ." *FEBS Lett* **489**: 149-153.
- Bogner, C., Leber, B. i Andrews, D. W. (2010). "Apoptosis: embedded in membranes." *Curr Opin Cell Biol* **22**(6): 845-851.
- Bowker, S.L. , Majumdar, S.R. , Veugelers, P. i Johnson, J.A. (2006). "Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin." *Diabetes Care* **29**: 254-258.
- Brunet, A. , Bonni, A. , Zigmond, M.J. , Lin, M.Z. , Juo, P. , Hu, L.S. , Anderson, M.J., Arden, K.C. , Blenis, J. i Greenberg, M.E. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. ." *Cell* **96**: 857-868.
- Budhram-Mahadeo, V. , Morris, P.J. , Smith, M.D. , Midgley, C.A. , Boxer, L.M. i Latchman, D.S. (1999). "p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. ." *J. Biol. Chem.* **274**: 15237-15244.

- Buzzai, M. , Jones, R.G. , Amaravadi, R.K. i Thompson, C.B. (2007). "Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. ." *Cancer Res* **67**: 6745-6752.
- Campas, C. , Lopez, J.M. , Santidrian, A.F. , Barragan, M. , Bellosillo, B. , Colomer, D. i Gil, J. (2003). "Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. ." *Blood* **101**: 3674-3680.
- Cantrell, L.A., Zhou, C., Mendivil, A., Malloy, K.M., Gehrig, P.A. i Bae-Jump, V.L. (2010). "Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation—implications for a novel treatment strategy. 116, 92–98." *Gynecol. Oncol.* **116**: 92-98.
- Capano, M. i Crompton, M. (2006). "Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. ." *Biochem. J.* **395**: 57-64.
- Cardone, M.H. , Roy, N. , Stennicke, H.R. , Salvesen, G.S. Franke, T.F. , Stanbridge, E. , Frisch, S. i Reed, J.C. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. ." *Science* **282**: 1318-1321.
- Carvalho, C. , Correia, S. , Santos, M.S. , Seïça, R. , Oliveira, C.R. i Moreira, P.I. (2008). "Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. ." *Mol. Cell. Biochem.* **308**: 75-83.
- Cheong, Jae-Ho , Park, Eun Sung , Liang, Jiyong , Dennison, Jennifer B. , Tsavachidou, Dimitra i Nguyen-Charles, Catherine (2011). "Dual Inhibition of Tumor Energy Pathway by 2-Deoxyglucose and Metformin Is Effective against a Broad Spectrum of Preclinical Cancer Models. ." *Molecular Cancer Therapeutics* **10**: 2350-2362.
- Clark, W. H., Jr., From, L., Bernardino, E. A. i Mihm, M. C. (1969). "The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin." *Cancer Res* **29**(3): 705-727.
- Correia, S. , Carvalho, C. , Santos, M.S. , Proença, T. , Nunes, E. , Duarte, A.I. , Monteiro, P. , Seïça, R. , Oliveira, C.R. i Moreira, P.I. (2008a). "Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. ." *Med. Chem.* **4**: 358-364.

- Correia, S. , Carvalho, C. , Santos, M.S. , Seica, R. , Oliveira, C.R. i Moreira, P.I. (2008b). "Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes and associated complications:an overview. ." *Mini Rev. Med. Chem.* **8**: 1343-1354.
- Cory, S. i Adams, J. M. (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* **2**: 647-656.
- Datta, S.R. , Dudek, H. , Tao, X. , Masters, S. , Fu, H. , Gotoh, Y. i Greenberg, M.E. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. ." *Cell* **91**: 231-241.
- Debnath, J. , Baehrecke, E.H. i Kroemer, G. (2005). "Does autophagy contribute to cell death?" *Autophagy* **1**(2): 66-74.
- Decensi, A. , Puntoni, M. , Goodwin, P. , Cazzaniga, M. , Gennari, A. , Bonanni, B. i Gandini, S. (2010). "Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. ." *Cancer Prev Res (Phila)* **3**: 1451-1461.
- Detaille, D. , Guigas, B. , Chauvin, C. , Batandier, C. , Fontaine, E. , Wiernsperger, N. i Leverve, X. (2005). "Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. ." *Diabetes* **54**: 2179-2187.
- Diamanti-Kandarakis, E., Economou, F., Palimeri, S. i Christakou, C. "Metformin in polycystic ovary syndrome. ." *Ann N Y Acad Sci* **1205**: 192-198.
- Díaz, R. , Jordá, M.V. , Reynés, G. , Aparicio, J. , Segura, A. , Amador, R. , Calderero, V. i Beltrán, A. (2005). "Neoadjuvant cisplatin and etoposide, with or without tamoxifen, prior to radiotherapy in high-grade gliomas: a single-center experience. ." *Anticancer Drugs* **16**(323-329).
- Dilman, V.M. , Berstein, L.M. , Yevtushenko, T.P. , Tsyrlina, Y.V. , Ostroumova, M.N. , Bobrov Yu, F., Revskoy, S. , Kovalenko, I.G. i Simonov, N.N. (1988). "Preliminary evidence on metabolic rehabilitation of cancer patients. ." *Arch Geschwulstforsch* **58**: 175-183.
- Dowling, R.J., Zakikhani, M. , Fantus, I.G. i Sonenberg, N. (2007). "Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells." *Cancer Res* **67**: 10804-10812.
- Duronio, V. (2008). "The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway." *Biochem J* **415**(3): 333-344.

- El-Assaad, W. , Buteau, J. , Peyot, M. L. , Nolan, C. , Roduit, R. , Hardy, S. , Joly, E. ,  
 Dbaibo, G. , Rosenberg, L. i Prentki, M. (2003). "Saturated fatty acids synergize  
 with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. ." *Endocrinology* **144**:  
 4154-4163.
- Evans, J.M. , Donnelly, L.A. , Emslie-Smith, A.M. , Alessi, D.R. i Morris, A.D. (2005).  
 "Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. ." *BMJ* **330**: 1304-  
 1305.
- Fimia, G.M. i Piacentini, M. (2010). "Regulation of autophagy in mammals and its  
 interplay with apoptosis. ." *Cell. Mol. Life Sci.* **67**: 1581-1588.
- Flaherty, K. T. (2006). "Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced  
 melanoma." *Clin Cancer Res* **12**(7 Pt 2): 2366s-2370s.
- Friedman, R, Rigel, D i Kopf, A (1985). "Early detection of malignant melanoma: the  
 role of physician examination and self-examination of the skin." *CA Cancer J  
 Clin* **35**(3).
- Gallo, A. , Ceolotto, G. , Pinton, P. , Iori, E., Murphy, E. , Rutter, G. A. , Rizzuto, R.,  
 Semplicini, A. i Avogaro, A. (2005). "Metformin prevents glucose-induced  
 protein kinase C-beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells  
 through an antioxidant mechanism. ." *Diabetes* **54**: 1123-1131.
- Gartel, A.L. i Radhakrishnan, S.K. (2005). "Lost in transcription: p21 repression,  
 mechanisms, and consequences. ." *Cancer Res* **65**: 3980-3985.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E. i Westphal, M. (2003). "Cost of migration:  
 invasion of malignant gliomas and implications for treatment." *J Clin Oncol*  
**21**(8): 1624-1636.
- Gogas, H. J., Kirkwood, J. M. i Sondak, V. K. (2007). "Chemotherapy for metastatic  
 melanoma: time for a change?" *Cancer* **109**(3): 455-464.
- Gotlieb, W.H. , Saumet, J. , Beauchamp, M.C. , Gu, J. , Lau, S. , Pollak, M.N. i  
 Bruchim, I. (2008). "In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial  
 ovarian cancer. ." *Gynecol Oncol* **110**: 246-250.
- Guigas, B. , Bertrand, L. , Taleux, N. , Foretz, M., Wiernsperger, N., Vertommen, D.,  
 Andreelli, F., Viollet, B. i Hue, L. (2006). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide-  
 1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation

- by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. ." *Diabetes* **55**: 865-874.
- Guigas, B. , Demaille, D. , Chauvin, C. , Batandier, C. , De Oliveira, F. , Fontaine, E. i Leverve, X. (2004). "Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. ." *Biochem. J.* **382**: 877-884.
- Hadad, S.M., Dewar, J.A. , Elseedawy, E. i Thompson, A.M. (2010). "Gene Signature of metformin actions on primary breast cancer within a window of opportunity randomized clinical trial." *J Clin Oncol* **28**.
- Harhaji-Trajkovic, L. , Vilimanovich, U. , Kravic-Stevovic, T. , Bumbasirevic, V. i Trajkovic, V. (2009). "AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells." *J. Cell. Mol. Med* **13**: 3644-3654.
- Hayakawa, J. , Ohmichi, M. , Kurachi, H. , Kanda, Y. , Hisamoto, K. , Nishio, Y. , Adachi, K., Tasaka, K. , Kanzaki, T. i Murata, Y. (2000). "Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. ." *Cancer Res.* **60**: 5988-5994.
- He, C. i Klionsky, D.J. (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." *Annu Rev Genet* **43**: 67-93.
- Hemmati, P.G. , Normand, G. , Gillissen, B. , Wendt, J. , Dörken, B. i Daniel, P.T. (2008). "Cooperative effect of p21Cip1/WAF-1 and 14-3-3 sigma on cell cycle arrest and apoptosis induction by p14ARF. ." *Oncogene* **27**: 6707-6719.
- Hosono, K. , Endo, H. , Takahashi, H. , Sugiyama, M. , Uchiyama, T. , Suzuki, K. , Nozaki, Y. , Yoneda, K. , Fujita, K. , Yoneda, M. , Inamori, M. , Tomatsu, A. , Chihara, T. , Shimpo, K. , Nakagama, H. i Nakajima, A. (2010a). "Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. ." *Mol Carcinog* **49**: 662-671.
- Hosono, K. , Endo, H. , Takahashi, H., Sugiyama, M. , Sakai, E. , Uchiyama, T. , Suzuki, K. , Iida, H. , Sakamoto, Y. , Yoneda, K. , Koide, T. , Tokoro, C. , Abe, Y. , Inamori, M. , Nakagama, H. i Nakajima, A. (2010b). "Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. ." *Cancer Prev Res (Phila)* **3**: 1077-1083.

- Huang, X., Wullschleger, S. , Shapiro, N., McGuire, V.A. , Sakamoto, K., Woods, Y.L., McBurnie, W. , Fleming, S. i Alessi, D.R. (2008). "Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumourigenesis in PTEN-deficient mice. ." *Biochem. J.* **412**: 211-221.
- Igney, F. H. i Krammer, P. H. (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-288.
- Inoki, K. , Zhu, T. i Guan, K. L. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. ." *Cell* **115**: 577-590.
- Isakovic, A. , Markovic, Z. , Todorovic-Markovic, B. , Nikolic, N. , Vranjes-Djuric, S., Mirkovic, M. , Dramicanin, M., Harhaji, L., Raicevic, N. , Nikolic, Z. i Trajkovic, V. (2006a). "Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene." *Toxicol. Sci.* **91**: 173-183.
- Isakovic, A., Markovic, Z., Nikolic, N., Todorovic-Markovic, B., Vranjes-Djuric, S., Harhaji, L., Raicevic, N., Romcevic, N., Vasiljevic-Radovic, D., Dramicanin, M. i Trajkovic, V. (2006b). "Inactivation of nanocrystalline C60 cytotoxicity by gamma-irradiation." *Biomaterials* **27**(29): 5049-5058.
- Jiralerspong, S. , Palla, S.L. , Giordano, S.H. , Meric-Bernstam, F. , Liedtke, C. , Barnett, C.M. , Hsu, L. , Hung, M.C. , Hortobagyi, G.N. i Gonzalez-Angulo, A.M. (2009). "Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. ." *J Clin Oncol* **27**: 3297-3302.
- Jones, R.G. , Plas, D.R. , Kubek, S. , Buzzai, M., Mu, J. , Xu, Y. , Birnbaum, M.J. i Thompson, C.B. (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. ." *Mol. Cell* **18**: 283-293.
- Jordan, P. i Carmo-Fonseca, M. (2000). "Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. ." *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 1229-1235.
- Kefas, B.A. , Cai, Y. , Kerckhofs, K. , Ling, Z. , Martens, G. , Heimberg, H. , Pipeleers, D. i Van de Castele, M. (2004). "Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. ." *Biochem. Pharmacol.* **68**: 409-416.
- Kefas, B.A. , Heimberg, H., Vaulont, S. , Meisse, D. , Hue, L. , Pipeleers, D. i Van de Castele, M. (2003). "AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells



- through stimulation of AMP-activated protein kinase. ." *Diabetologia* **46**: 250-254.
- Kerr, J. F. , Winterford, C. M. i Harmon, B. V. (1994). "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy." *Cancer* **73**: 2013-2026.
- Khoury, H. , Collin, F. , Bonnefont-Rousselot, D. , Legrand, A. , Jore, D. i Gardès-Albert, M. (2004). "Radical-induced oxidation of metformin." *Eur. J. Biochem.* **271**: 4745-4752.
- Kiffin, R. , Bandyopadhyay, U. i Cuervo, A.M. (2006). "Oxidative stress and autophagy. ." *Antioxid. Redox Signal.* **8**: 152-162.
- Kim, H.S., Hwang, J.T. , Yun, H. , Chi, S.G. , Lee, S.J. , Kang, I. , Yoon, K.S. , Choe, W.J. , Kim, S.S. i Ha, J. (2008). "Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53." *J. Biol. Chem.* **283**: 3731-3742.
- Kolenko, V. M., Uzzo, R. G., Bukowski, R. i Finke, J. H. (2000). "Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy." *Apoptosis* **5**(1): 17-20.
- Kourelis, T.V. i Siegel, R.D. . (in press). "Metformin and cancer: new applications for an old drug. ." *Med. Oncol.*
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. i Perkins, J.A. (2010). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, Saunders, An Imprint of Elsevier Inc
- Landman, G.W. , Kleefstra, N. , van Hateren, K.J. , Groenier, K.H. , Gans, R.O. i Bilo, H.J. (2010). "Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. ." *Diabetes Care* **33**: 322-326.
- Lee, K. , Kentroti, S. , Billie, H. , Bruce, C. i Vernadakis, A. (1992). "Comparative biochemical, morphological, and immunocytochemical studies between C-6 glial cells of early and late passages and advanced passages of glial cells derived from aged mouse cerebral hemispheres. ." *Glia* **6**: 245-257.
- Levine, Y.C. , Li, G.K. i Michel, T. (2007). "Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK -N Rac1 -N Akt -N endothelial nitric-oxide synthase pathway." *J. Biol. Chem.* **282**, 20351–20364. **282**: 20351-20364.

- Libby, G., Donnelly, L.A. , Donnan, P.T. , Alessi, D.R. , Morris, A. i Evans, J.M. (2009). "New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. ." *Diabetes Care* **32**: 1620-1625.
- Liu, B., Fan, Z. , Edgerton, S.M. , Deng, X.S. , Alimova, I.N., Lind, S.E. i Thor, A.D. (2009). "Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. ." *Cell Cycle* **8**: 2031-2040.
- Locke, V. , Davey, R. i Davey, M. (2003). "Paclitaxel sensitization of multidrug-resistant cells to chemotherapy is independent of the cell cycle." *Cytometry* **43**: 170-174.
- Loeffler, M. i Kroemer, G. (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. ." *Exp. Cell Res.* **256**: 19-26.
- Louis, DN, Ohgaki, H, Wiestler, OD, Cavenee, WK, Burger, PC, Jouvet, A, Scheithauer, BW i Kleihues, P (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." IARC Press.
- Lupi, R. , Del Guerra, S. , Fierabracci, V. , Marselli, L., Novelli, M. , Patanè, G. , Boggi, U. , Mosca, F., Piro, S. , Del Prato, S. i Marchetti, P. (2002). "Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. ." *Diabetes* **51**: 134–137.
- Maiuri, M.C. , Zalckvar, E. , Kimchi, A. i Kroemer, G. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**(9): 741-752.
- McCarthy, K.D. i deVellis, J. (1980). " Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue." *J. Cell Biol.* **85**: 890-902.
- Meisse, D. , Van de Castele, M. , Beauloye, C. , Hainault, I. , Kefas, B. A. , Rider, M. H. , Foufelle, F. i Hue, L. (2002). "Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. ." *FEBS Lett* **526**: 38-42.
- Memmott, R.M. i Dennis, P.A. (2009). "Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. ." *Cell Signal* **21**(5): 656-664.

- Memcott, R.M., Mercado, J.R. , Maier, C.R., Kawabata, S. , Fox, S.D. i Dennis, P.A. (2010). "Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. ." *Cancer Prev Res (Phila)* **3**: 1066-1076.
- Mijatovic, S. , Maksimovic-Ivanic, D. , Radovic, J. , Miljkovic, D. , Kaludjerovic, G.N. , Sabo, T.J. i Trajkovic, V. (2005). "Aloe emodin decreases the ERK-dependent anticancer activity of cisplatin. ." *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1275-1282.
- Miyamoto-Yamasaki, Y. , Yamasaki, M. , Tachibana, H. i Yamada, K. (2007). "Induction of endoreduplication by a JNK inhibitor SP600125 in human lung carcinoma A 549 cells. ." *Cell Biol. Int.* **31**: 1501-1506.
- Mizushima, N. , Levine, B. , Cuervo, A.M. i Klionsky, D.J. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion. ." *Nature* **451**: 1069-1075.
- Monami, M. , Lamanna, C. , Balzi, D. , Marchionni, N. i Mannucci, E. (2009). "Sulphonylureas and cancer: a case-control study." *Acta Diabetol* **46**: 279-284.
- Muders, M.H. , Zhang, H. , Wang, E. , Tindall, D.J. i Datta, K. (2009). "Vascular endothelial growth factor-C protects prostate cancer cells from oxidative stress by the activation of mammalian target of rapamycin complex-2 and AKT-1. ." *Cancer Res* **69**: 6042-6048.
- Nguyen, N. S. , Cottet-Maire, F. , Buetler, T. M. , Lo Russo, A., Krauskopf, A. S. , Armstrong, J. M. , Vickers, A. E. , Mace, K. i Ruegg, U. T. (1999). "Metabolism-dependent stimulation of reactive oxygen species and DNA synthesis by cyclosporin A in rat smooth muscle cells. ." *Free Radic. Biol. Med* **27**: 1267-1275.
- Niraula, S., Stambolic, V. , Dowling, R.J. i Goodwin, P.J. (2010). "Clinical and biologic effects of metformin in early stage breast cancer. 2010, 70(24, Suppl):104s." *Cancer Res* **70**(24).
- Nowell, P.C. i Croce, C.M. (1986). "Chromosomes, genes, and cancer. ." *Am J Pathol* **125**(1): 7-15.
- Onken, B. i Driscoll, M. (2010). "Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1." *PLoS One* **5**.
- Ota, S. , Horigome, K. , Ishii, T. , Nakai, M. , Hayashi, K. , Kawamura, T. , Kishino, A. , Taiji, M. i Kimura, T. (2009). "Metformin suppresses glucose-6-phosphatase

- expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. ." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**: 311-316.
- Pelicano, H. , Martin, D.S. , Xu, R.H. i Huang, P. (2006). "Glycolysis inhibition for anticancer treatment. ." *Oncogene* **25**(34): 4633-4646.
- Poon, M.K. , Chiu, P.Y. , Mak, D.H. i Ko, K.M. (2003). "Metformin protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. ." *J. Pharmacol. Sci.* **93**: 501-504.
- Raicevic, N. , Mladenovic, A. , Perovic, M. , Harhaji, L. , Miljkovic, D. i Trajkovic, V. (2005). "Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity." *Neuropharmacology* **48**: 720-731.
- Rastrelli, M., Alaibac, M., Stramare, R., Chiarion Sileni, V., Montesco, M. C., Vecchiato, A., Campana, L. G. i Rossi, C. R. (2013). "Melanoma m (zero): diagnosis and therapy." *ISRN Dermatol* **11**(616170).
- Rattan, R. , Giri, S. , Hartmann, L. i Shridhar, V. (2011). "Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner." *J. Cell Mol. Med.* **15**: 166-178.
- Reed, J.C. (2006). "Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. ." *Cell Death Differ* **13**: 1378-1386.
- Robert, G. , Ben Sahra, I. , Puissant, A. , Colosetti, P. , Belhacene, N. , Gounon, P. , Hofman, P. , Bost, F. , Cassuto, J.P. i Auberger, P. (2009). "Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death. ." *PLoS One* **4**.
- Rocha, G.Z. , Dias, M.M. , Ropelle, E.R. , Osorio-Costa, F. , Rossato, F.A. , Vercesi, A.E. , Saad, M.J. i Carvalheira, J.B. (2011). "Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. ." *Clin. Cancer Res* **17**: 3993-4005.
- Romashkova, J.A. i Makarov, S.S. (1999). "NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. ." *Nature* **401**: 86-90.
- Rotella, C.M., Monami, M. i Mannucci, E. (2006 ). "Metformin beyond diabetes: new life for an old drug." *Curr Diabetes Rev* **2**: 307-315.
- Saeedi, R. , Parsons, H.L., Wambolt, R.B. , Paulson, K. , Sharma, V. , Dyck, J.R. , Brownsey, R.W. i Allard, M.F. (2008). "Metabolic actions of metformin in the

- heart can occur by AMPK independent mechanisms. ." *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **294**: 2497-2506.
- Saelens, X., Festjens, N. , Vande Walle, L. i Vandenabeele, P. (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." *Oncogene* **23**: 2861-2874.
- Sambol, N.C. , Brookes, L.G. , Chiang, J. , Goodman, A.M. , Lin, E.T. , Liu, C.Y. i Benet, L.Z. (1996). "Food intake and dosage level, but not tablet vs solution dosage form, affect the absorption of metformin HCl in man." *Br. J. Clin. Pharmacol.* **42**: 510-512.
- Santidrián, A.F. , González-Gironès, D.M. , Iglesias-Serret, D. , Coll-Mulet, L. , Cosialls, A.M. , de Frias, M. , Campàs, C. , González-Barca, E. , Alonso, E. , Labi, V. , Viollet, B. , Benito, A. , Pons, G. , Villunger, A. i Gil, J. (2010). "AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells. ." *Blood* **116**: 3023-3032.
- Schreiber, M., Kolbus, A. , Piu, F. , Szabowski, A., Möhle-Steinlein, U. , Tian, J. , Karin, M. , Angel, P. i Wagner, E.F. (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." *Genes Dev.* **13**(5): 607-619.
- Schuler, M. i Green, D. R. (2001). "Mechanisms of p53-dependent apoptosis." *Biochem Soc Trans* **29**: 684-688.
- Schweyer, S. , Soruri, A. , Heintze, A. , Radzun, H.J. i Fayyazi, A. (2004a). "The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines. ." *Int. J. Oncol* **25**: 1671-1676.
- Schweyer, S. , Soruri, A. , Meschter, O. , Heintze, A. , Zschunke, F. , Miosge, N. , Thelen, P. , Schlott, T. , Radzun, H.J. i Fayyazi, A. (2004b). "Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. ." *Br. J. Cancer* **91**: 589-598.
- Sebolt-Leopold, J. S. i Herrera, R. (2004). "Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer." *Nat. Rev. Cancer* **4**: 937-947.
- Shi, W.Y. , Xiao, D. , Wang, L. , Dong, L.H. , Yan, Z.X. , Shen, Z.X. , Chen, S.J. , Chen, Y. i Zhao, W.L. (2012). "Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. ." *Cell Death Dis.* **3**.

- Simons, A.L. , Ahmad, I.M., Mattson, D.M. , Dornfeld, K.J. i Spitz, D.R. (2007). "2-Deoxy-Dglucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. ." *Cancer Res* **67**: 3364-3370.
- Smith, J.A. , Gaikwad, A. , Ramondetta, L.M. , Wolf, J.K. i Brown, J. (2006). "Determination of the mechanism of gemcitabine modulation of cisplatin drug resistance in panel of human endometrial cancer cell lines. ." *Gynecol Oncol* **103**: 518-522.
- Stupp, W.P., Mason, M.J., van der Bent, M. i Mirimanoff, R.O. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N. Engl. J. Med* **352**: 987-996.
- Sum, C.F. , Webster, J.M. , Johnson, A.B. , Catalano, C. , Cooper, B.G. i Taylor, R. (1992). "The effect of intravenous metformin on glucose metabolism during hyperglycaemia in type 2 diabetes. ." *Diabet. Med* **9**: 61-65.
- Taphoorn, M.J., Stupp, R., Coens, C. i Bottomley, A. (2005). "Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial." *Lancet Oncol.* **6**: 937-944.
- Taylor, W.R. i Stark, G.R. (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." *Oncogene* **20**: 1803-1815.
- Tomic, T. , Botton, T. , Cerezo, M. , Robert, G. , Luciano, F. , Puissant, A. , Gounon, P. , Allegra, M. , Bertolotto, C. , Bereder, J.M. , Tartare-Deckert, S. , Bahadoran, P. , Auberger, P. , Ballotti, R. i Rocchi, S. (2011). "Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms." *Cell Death Dis.* .
- Vazquez-Martin, A. , Oliveras-Ferraros, C. i Menendez, J.A. (2009). "The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. ." *Cell Cycle* **8**: 88-96.
- Vazquez-Martin, A. , Oliveras-Ferraros, C., Barco, S.D. , Martin-Castillo, B. i Menendez, J.A. (2011). "The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. ." *Breast Cancer Res Treat.*

- Versteeg, H. H., Nijhuis, E., van den Brink, G. R., Evertzen, M., Pynaert, G. N., van Deventer, S. J., Coffey, P. J. i Peppelenbosch, M. P. (2000). "A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein." *Biochem J* **3**: 717-722.
- Viatour, P. , Merville, M. P. , Bours, V. i Chariot, A. (2005). "Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation." *Trends Biochem. Sci.* **30**: 43-52.
- Videhult, P. , Laurell, G. , Wallin, I. i Ehrsson, H. (2006). "Kinetics of cisplatin and its monohydrated complex with sulfur-containing compounds designed for local otoprotective administration." *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **231**: 1638-1645.
- Viniegra, J.G. , Losa, J.H. , Sánchez-Arévalo, V.J. , Parada Cobo, C. , Soria, V.M. , Ramón yCajal, S. i Sánchez-Prieto, R. (2002). "Modulation of PI3K/Akt pathway by E1a mediates sensitivity to cisplatin. ." *Oncogene* **21**: 7131-7136.
- Vucicevic, L. , Misirkic, M. , Janjetovic, K. , Harhaji-Trajkovic, L. , Prica, M. , Stevanovic, D. , Isenovic, E. , Sudar, E. , Sumarac-Dumanovic, M. , Micic, D. i Trajkovic, V. (2009). "AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms underlying in vitro antiglioma action of compound C." *Biochem Pharmacol* **77**(11): 1684-1693.
- Vucicevic, L. , Misirkic, M. , Janjetovic, K. , Vilimanovich, U. , Sudar, E. , Isenovic, E. , Prica, M. , Harhaji-Trajkovic, L. , Kravic-Stevovic, T. , Bumbasirevic, V. i Trajkovic, V. (2011). "Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. ." *Autophagy* **7**(1): 40-50.
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C. i Kerr, J. F. (1988). "Patterns of cell death." *Methods Achiev Exp Pathol* **13**: 18-54.
- Wang, L.W. , Li, Z.S. , Zou, D.W. , Jin, Z.D. , Gao, J. i Xu, G.M. (2008). "Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. ." *World J. Gastroenterol* **14**: 7192-7198.
- Wang, X. , Zhao, T. , Huang, W. , Wang, T. , Qian, J. , Xu, M. , Kranias, E.G. , Wang, Y. i Fan, G.C. (2009). "Hsp20-engineered mesenchymal stem cells are resistant

- to oxidative stress via enhanced activation of Akt and increased secretion of growth factors. ." *Stem Cells* **27**: 3021-3031.
- Wangpaichitr, M. , Wu, C. , You, M. , Kuo, M.T., Feun, L. , Lampidis, T. i Savaraj, N. (2008). "Inhibition of mTOR restores cisplatin sensitivity through down-regulation of growth and anti-apoptotic proteins." *Eur. J. Pharmacol.* **591**: 124-127.
- Wieder, T. , Essmann, F. , Prokop, A. , Schmelz, K. , Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R. , Dörken, B. i Daniel, P.T. (2001). "Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. ." *Blood* **97**: 1378-1387.
- Wilcock, C. i Bailey, C.J. (1994). "Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. ." *Xenobiotica* **24**: 49-57.
- Winograd-Katz, S.E. i Levitzki, A. (2006). "Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38 (MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. ." *Oncogene* **25**: 7381-7390.
- Wolf, I. , Sadetzki, S. , Catane, R. , Karasik, A. i Kaufman, B. (2005). "Diabetes mellitus and breast cancer. ." *Lancet Oncol.* **6**: 103-111.
- Wolff, J.E., Driever, P.H., Erdlenbruch, B. , Kortmann, R.D. , Rutkowski, S. , Pietsch, T. , Parker, C. , Metz, M.W. , Gnekow, A. i Kramm, C.M. (2010). "Intensive chemotherapy improves survival in pediatric high-grade glioma after gross total resection: results of the HIT-GBM-C protocol. ." *Cancer* **116**: 705-712.
- Wolter, K.G. , Hsu, Y.T. , Smith, C.L. , Nechushtan, A. , Xi, X.G. i Youle, R.J. (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." *J. Cell Biol.* **139**: 1281-1292.
- Wong, S.H. , Shih, R.S. , Schoene, N.W. i Lei, K.Y. (2008). "Zinc-induced G2/M blockage is p53 and p21 dependent in normal human bronchial epithelial cells. ." *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**: 1342-1349.
- Woodard, J. i Plataniias, L.C. (2010). "AMP-activated kinase (AMPK)-generated signals in malignant melanoma cell growth and survival. ." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**: 135-139.
- Xie, Z. , Nair, U. i Klionsky, D.J. (2008). "Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation." *Mol Biol Cell* **19**(8): 3290-3298.



- Xu, R.H. , Pelicano, H. , Zhou, Y., Carew, J. S. , Feng, L., Bhalla, K.N. , Keating, M.J. i Huang, P. (2005). "Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. ." *Cancer Res* **65**: 613-621.
- Yang, Z. i Klionsky, D. J. (2010). "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation." *Curr Opin Cell Biol* **22**(2): 124-131.
- Yasmeen, A., Beauchamp, M.C. , Piura, E. , Segal, E. , Pollak, M. i Gotlieb, W.H. (2011). "Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: Involvement of the Bcl-2 family proteins. ." *Gynecol. Oncol.* **121**: 492-498.
- Yorimitsu, T. i Klionsky, D.J. (2005). "Autophagy: molecular machinery for self-eating." *Cell Death Differ* **12**: 1542-1552.
- Yuan, T.L. i Cantley, L.C. (2008). "PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. ." *Oncogene* **27**: 5497-5510.
- Zafarullah, M. , Li, W. Q. , Sylvester, J. i Ahmad, M. (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." *Cell. Mol. Life Sci* **60**: 6-20.
- Zakikhani, M., Dowling, R. , Fantus, I.G. i Pollak, M. (2006). "Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. ." *Cancer Res* **66**: 10269-10273.
- Zhang, P. , Gao, W.Y. , Turner, S. i Ducatman, B.S. (2003). "Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. ." *Mol Cancer* **2**.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y. i Moller, D.E. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J. Clin. Invest.* **108**: 1167-1174.
- Zhuang, Y. Miskimins, W.K. (2011). "Metformin induces both caspase-dependent and poly (ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. ." *Mol Cancer Res* **9**(5): 603-615.
- Zimmermann, S. i Moelling, K. (1999). "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). ." *Science* **286**: 1741-1744.
- Zorov, D. B. , Juhaszova, M. i Sollott, S. J. (2006). "Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. ." *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 509-517.