

**ПРЕГЛЕД И КРИТИЧЕН АНАЛИЗ НА ДАННИ ОТ КЛИНИЧНИ ИЗПИТВАНИЯ
И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ, ДОКАЗВАЩИ СЛОЖНИЯ
МОЛЕКУЛЕН МЕХАНИЗЪМ И ПРОТИВОРЕЧИВА АНТИТУМОРОГЕННА
АКТИВНОСТ НА METFORMIN**

маг.-фарм. Т. Тенева¹ и проф. И. Гетов²

¹МБАЛ – Елин Пелин ЕООД

²Фармацевтичен факултет, МУ – София

**OVERVIEW AND CRITICAL ANALYSIS OF CLINICAL TRIALS DATA
AND EPIDEMIOLOGICAL SURVEYS PROVING COMPLEX MECHANISM
AND CONTROVERSY OF ANTI-TUMORIGENIC ACTIVITY OF METFORMIN**

T. Teneva, MSc Pharm¹ and Prof. I. Getov²

¹Multi-profile Hospital for Active Treatment – Elin Pelin

²Faculty of Pharmacy, Medical University Sofia

Резюме. Метформин може да повлияе туморогенезата чрез АМПК по два механизма – индиректно: систематично намаляване на инсулиновите нива и директно: чрез индукция на енергетичен стрес. Индиректно, метформин проявява своя антитуморогенен ефект чрез активиране на LKB1 (тумор супресорен протеин) и последващата таргетна молекула АМПК, която от своя страна потиска активността на таргет на рапамицин при бозайниците (mTOR), сигнален път с централна роля в туморния растеж и патогенеза. Доказано е, че АМПК фосфорилира tuberous sclerosis complex-2 (TSC-2), инхибиращ mTOR. Индукцията на енергетичен стрес, сигнализиращ за намаляване на необходимата за клетката енергия, активира АМПК, което резултира в инхибиция на клетъчния растеж и пролиферация. Активацията на АМПК подпомага адаптацията в условия на енергетичен стрес. Поради засиления интерес към анти-туморогенния ефект на метформин са проведени редица клинични проучвания в последното десетилетие. През 2014 г. е публикувано проучване в бюлетин на Националната академия на науките, САЩ, изказващо предположение, че активацията на АМПК може всъщност да ускорява туморния растеж. Интересен факт е, че мета-анализ на описателни проучвания показва намален риск от злокачествени заболявания сред пациенти, приемащи метформин, докато подобен анализ на данни от рандомизирани контролирани клинични изпитвания не намира връзка между употребата на метформин и редуция на риска от поява на рак. Ретроспективно кохортно проучване, сравняващо връзката между употребата на metformin с други антидиабетни лекарства, доказва че метформин не повлиява риска от злокачествени образувания.

Ключови думи: Метформин, АМПК, mTOR, LKB1, антитуморогенно действие, клинични изпитвания

Summary. Metformin might influence tumourigenesis throughout AMPK- both indirectly, through the systemic reduction of insulin levels, and directly, via the induction of energetic stress. Indirectly, metformin exerts its antitumorigenic effects by activating LKB1 (a tumor suppressor protein) and its downstream target AMPK, which, in turn, suppresses the activity of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a signaling pathway with a central role in cancer cell growth and cancer pathogenesis. Also it has been shown that AMPK phosphorylates tuberous sclerosis complex-2 (TSC-2) that in turns inhibits mTOR signaling. The induction of energetic stress, that essentially signifies lack of or decrease in available energy resources

for the cell, activates AMPK, which results in inhibition of cell growth and proliferation. AMPK activation assists in adaptation to metabolic stress. There have been many clinical trials because of the interest in anti-cancer effects of metformin. In 2014 new research appearing in Proceedings of the National Academy of Sciences, USA suggests that activation of AMPK may actually fuel cancer growth. While meta-analyses of observational studies have shown a reduced risk of cancer among patients on metformin, a similar analysis of randomized controlled trials, lately found no relationship between metformin and cancer risk. A retrospective cohort study, investigating the association between use of metformin compared with other antidiabetes medications, proves that Metformin does not affect cancer risk.

Key words: Metformin, AMPK, mTOR, LKB1, antitumorigenic effect, clinical trials

ВЪВЕДЕНИЕ

През 1957г. са публикувани първите резултати от клинично изпитване за антидиабетното действие на метформин при пациенти. Като противодиабетно средство метформин е одобрен през 70-те години на миналия век в Европа и едва през 1995 г. в САЩ. От тогава употребата на метформин постепенно нараства до 25 млн. предписания през 2000 г. и достигат до повече от 40 млн. през 2008г. в САЩ [2].

Метформин произхожда от съединения, екстрахирани от растението френски люляк (*Galega officinalis*), чиято употреба за лечение на диабет датира от Средновековието.

Механизмът на действие на метформин е уникален в сравнение с другите антихипогликемични агенти [6].

Метформин може да повлияе туморогенезата както индиректно – чрез системно понижаване на инсулиновите нива, така и директно – чрез индукция на енергетичен стрес.

КРИТИЧЕН АНАЛИЗ НА ПУБЛИКУВАНИ ДАННИ В ЛИТЕРАТУРАТА

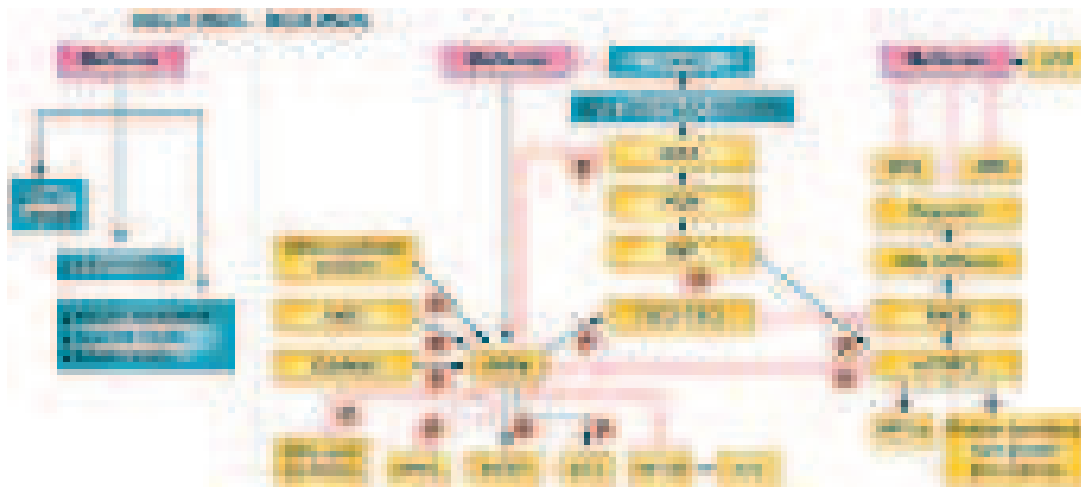
Предложени са няколко потенциални механизма за възможността на метформин да потиска растежа на туморни клетки *in vitro* and *vivo* [2]:

- (1) активация на пътищата LKB1/AMPK
- (2) индукция на арест на клетъчния цикъл и/или апоптоза
- (3) инхибиране на протеиновия синтез
- (4) редукция на нивата на циркулиращ инсулин
- (5) активиране на имунната система
- (6) ерадикация на ракови стволови клетки

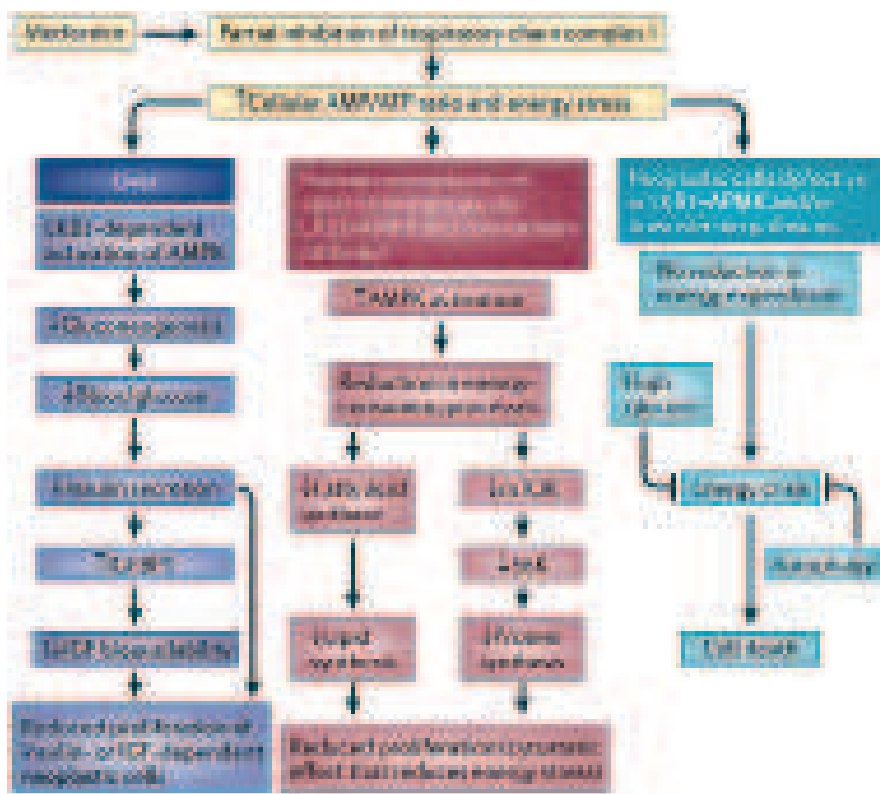
Повечето изследователи са възприели опростен модел, по който метформин проявява своя анти туморогенен ефект, активирайки LKB1 и последващата си мишена: AMPK, което води до супресия на активността на мишената на рапамицина при бо-зайниците – mTOR (сигнален път с централна роля в туморния растеж и патогенеза.) LKB1 е тумор супресивен протеин. Следователно понижените нива на глюкоза се медираат от активирането на LKB1 в черния дроб. Това е само един от многобройните пътища, по които метформин упражнява своите ефекти *in vivo*, но е възприет за главния механизъм на гликемичния контрол при пациенти с диабет (фиг. 1) [6].

AMPK-активирана протеин киназа и карце-ногенеза

Otto Warburg още през 1956г. забелязва, че туморните клетки се нуждаят от глюкоза много повече от нормалните клетки. Като резултат те са по-чувствителни към глюкозен глад спрямо нормалните клетки. AMPK е Ser/Thr протеин киназа (аденозин 5-монофосфат активирана протеин киназа) – главен регулатор на клетъчния метаболизъм. AMPK се активира от високи стойности на съотношението AMP/ATP, което сигнализира намаляване или недостиг на наличните енергийни източници за клетката. (фиг. 2) След своята активация, AMPK инхибира анаболитните пътища и активира катаболитните. Активацията на AMPK резултира в инхибиция на пътищата, в които участва mTOR. Доказано е, че AMPK фосфорилира TSC-2 (tuberous sclerosis complex-2), който от своя страна инхибира mTOR сигнализацията индиректно чрез протеинен регулатор.



Фиг. 1. Механизъм на действие на метформин при злокачествени заболявания – директно чрез активиране на AMPK, който от своя страна инхибира mTOR и фактори, регулиращи транскрипцията и фосфорилирането (NF-κβ и p53). Чрез инхибирането на mTOR се потиска протеиновия синтез и HIF, отговорен за адаптацията на клетката при хипоксични стресови условия.



Nature Reviews | Cancer

Фиг. 2. Като парциален инхибитор на комплекс 1 на митохондриалната дихателна верига метформин води до оксидативният стрес (повишава се съотношението AMP/ATP). При туморни клетки с активирана AMPK се наблюдава редукция на консумация на енергия чрез понижаване на липидния и протеиновия синтез, синтеза на мастни киселини и в следствие редукция на пролиферацията (цитостатичен ефект). При неопластични клетки с дефектен път LKB1 – AMPK не се наблюдава намаляване на енергийния разход, което води до енергийна криза и клетъчна смърт.

Активирането на АМПК подпомага адаптацията при метаболитен стрес не само като инхибира клетъчния растеж и пролиферация, но и чрез индуциране на автофагия. Автофагията е катаболичен процес, включващ деградация на клетъчните компоненти от лизозоматични механизми. Това е главният механизъм за оцеляване на клетката, при който става преразпределяне на хранителните вещества от ненужни процеси към жизнено важни. Механизмът, по който АМПК постига това, все още не е разяснен и е фокус на интензивно проучване. Например, АМПК фосфорилира циклин-зависим киназен инхибитор р27 и го стабилизира, позволявайки клетките да преживеят липсата на растежен фактор и метаболитния стрес чрез автофагия. В допълнение, активирането на АМПК индуцира фосфорилирането на р53, а това е необходимо за инициация на АМПК-зависим клетъчен арест.

В заключение, АМПК е също важен за транскрипционната активност на фактора, индуциращ хипоксия 1 (HIF-1): транскрипционен фактор, който е решаващ за хипоксичната индукция на гените, необходими за адаптация към хипоксични условия – каквито са те при солидните тумори. В допълнение mTOR е познат активатор на HIF-1; за това инхибицията на mTOR може също индиректно и независимо от АМПК да инхибира HIF-1 сигнализацията [6].

Ефект върху клетъчния цикъл и протеиновия синтез

Злокачествените образувания на гърдата са интензивно проучвани като терапевтична цел за метформин. Доказано е, че метформин инхибира растежа на злокачествени клетки *in vitro* по зависещ АМПК механизъм, който се асоциира с намаляването на mTOR активацията. Това води до арест на клетъчния цикъл и инхибира растежа на клетките [6].

Някои автори предполагат, че придобита резистентност към по-новите тирозин киназни инхибитори (TKIs) за HER2-positive ракови образувания на гърдата като lapatinib, която се медира чрез активация на пътищата с участието на mTOR, може да се забави или отслабне с употребата на метформин. Предполага се, че метформин може да предотврати или намали кардиотоксичността на HER-2 инхибиторите като trastuzumab, т.к. АМПК активация е есенциална за съхранение на нормалните сърдечни клетки след лечение с trastuzumab. Новото поколение инхибитори на HER-2, като lapatinib, в допълнение на блокирането на HER-2, могат да

активират АМПК. (trastuzumab няма такъв механизъм и лишава сърдечните клетки от жизнено важни механизми, свързани с оцеляването при стрес) [6].

АМПК активация е отговорна също за инхибицията на ароматаза

Метформин може да инхибира ароматазата в човешки мастни клетки от гърда *in vitro*, което води до инхибиция на естрогеновата продукция и потенциала за злокачествено развитие (както и при употребата му като помощник в лечението на хормонално-чувствителни клетки). При широк геномен анализ на злокачествени образувания на рак на гърдата, метформин потиска експресията на гените, кодиращи рибозомални протеини и множество митоза-свързани генни фамилии, включително кинази, тубулини, хистони и други, подчертавайки глобалния ефект, който оказва върху регулацията на гени, свързана с клетъчния растеж [8].

Освен рак на гърдата са проучвани и други злокачествени образувания *in vivo*, използвайки модели с животни. При клетъчни култури с ниска плътност от глиома при плъхове, при които клетките все още бързо пролиферират (log фаза), метформин блокира прогресията на клетъчния цикъл в G(0)/G(1) фаза без да индуцира значителна клетъчна смърт. В сливащи се култури, при които клетките са достигнали плато-фазата на растеж, метформин води до масова индукция на каспаза-зависима апоптоза. От интерес е фактът, че метформин-задействаната апоптоза е напълно възпрепятствана от агенти, които блокират митохондриалната проницаемост [2].

В ранен стадий са многобройни клинични изпитвания, изследващи потенциала на метформин да предпазва спрямо развитието на различни злокачествени образувания – колоректален рак, рак на простатата, ендометриален и рак на гърдата [2].

Малки по мащаб изпитвания за превенция при туморогенезата са многократно провеждани. Тяхната основна цел не е да заключат дали метформин има превантивна роля спрямо малигнените образувания. Изпитванията за превенция е необходимо обаче да включат голям брой участници и да обхванат голям времеви период, за да покажат дали дадено лекарство или интервенция намалява риска от злокачествени образувания. Точно тези 3 до 6 месечни изпитвания доказват дали лекарственият продукт оказва ефект върху специфични протеини и/или сигнални пътища, които се предполага, че участват в развитието на злокачествените заболявания [2].

Например в център за ракови образувания при университета в Калифорния (Irvine Chao Family Comprehensive Cancer Center) изследователят Jason Zell, DO, MPH провежда клинично изпитване в ранна фаза, при което тества ефектите на метформин върху пътищата на сигнализация, в които участва mTOR при хора с наднормено тегло, които са с премахнати пре-канцерогенни образувания на колона. В центъра за ракови образувания в Сан Диего (University of California, San Diego Moores Cancer Center) се провежда клинично проучване (във фаза II), което изпитва ефектите на метформин при участници с наднормено тегло и с изявиени биомаркери за постменопауза-свързани злокачествени образувания [2].

В изпълнение на програма: „Трансдисциплинарно проучване на енергетиката и рака“ (Transdisciplinary Research on Energetics and Cancer – TREC), финансирана от Националния институт по злокачествени образувания (NCI, САЩ), се провежда изпитване под название Reach for Health. Наблюдавана е шестмесечна употреба на метформин самостоятелно и в комбинация с програма от физически упражнения, при хора с биомаркери за злокачествени образувания. Това проучване открива, че режимът с нисък прием на мазнини и висок прием на плодове и зеленчуци не премахва риска от развитие на рак при индивиди с първа степен рак на гърдата в сравнение с тези, поддържащи нормална диета [2].

Метформин намалява растежа на панкреатично злокачествено образувание

С финансовата помощ на Hirshberg Foundation, изследователи доказват, че метформин инхибира панкреатичния клетъчен растеж на ракови клетки в предклинични животински модели и в култура от злокачествени човешки панкреатични клетки [7].

Публикувани са епидемиологични проучвания, доказващи, че приложението на метформин намалява случаите и подобрява прогнозата при пациенти със злокачествени образувания на панкреаса. Напр., приложението на метформин се свързва с 62% намаление на риска от рак на панкреаса при пациенти с диабет тип 2.

Епидемиологични проучвания от Обединеното кралство потвърждават, че терапията с метформин (без да се включват други антидиабетни лекарствени продукти) се асоциира със значително намаляване на риска от злокачествени образувания на панкреаса. Най-голям интерес засега представля-

ва информацията, че приложението на метформин подчертано инхибира растежа на туморни панкреатични клетки в животински модели [6].

Метформин блокира активността на mTOR да убива злокачествени клетки

През 2014 г. ново проучване е публикувано в бюлетин на Националната академия на науките, САЩ, което предполага, че активирането на АМПК всъщност може да поддържа растежа на злокачествени заболявания [4].

Проведени са обширни лабораторни тестове, които заключват че метформин не спира развитието на малигнени образувания. Това се осъществява не от активирането на АМПК, а в тестове с клетки от глиома, авторите откриват, че метформин инхибира различна молекула: мишена за рапамицин при бозайниците (mTOR).

В тялото метформин супресира действието на инсулин и IGF (insulin-like growth factors) – двете молекули, потискащи злокачествения растеж – най-вероятно независимо от АМПК. Откритията разкриват потенциалната роля на АМПК по-скоро като съпортер за туморния растеж, а не като супресор. АМПК е метаболитен ензим, който участва в превключването на енергийните нива в клетката. Ензимът участва в редица метаболитни пътища, подпомагащи клетъчната регулация на енергийния разход и оцеляване, когато са в условия на физиологичен стрес. Злокачествените клетки настройват метаболизма си, така че да продължат да живеят и растат при стресови условия. Изследванията откриват, че активацията на АМПК чрез използване на метформин може да спре туморния растеж, докато други автори ги отричат [4].

АМПК е високо активна при човешката и мишата тъкан от глиобластом, което води до въпроса дали антипролиферационните свойства на метформин са независими от АМПК и/или са свързани с други метаболитни пътища. Изследователите са третирали човешки клетки от глиобластом с метформин и провеждат генетичен тест, за да определят дали метформин директно инхибира пътищата на mTOR (и на злокачествените образувания) като подпомага взаимодействието на две молекули, които прекъсват тези пътища.

С цел да се докаже, че активирането на АМПК от метформин не участва в спиране на растежа на злокачествени образувания, изследователите третирали клетките от глиобластом с по-специфично АМПК-активиращо съединение (A769662), което

директно се свързва с АМРК. След прилагане на метформин, се установява, че лечението не убива клетките от глиобластом, докато блокирането на АМРК се проявява в унищожаване на значителен брой клетки от глиобластома [6].

В началото на 2014 г. в британския журнал „Медицинските новини днес“ (*Medical News Today*) се съобщава, че е проведено проучване, в което метформин проявява анти-стареее свойства. Третират се мъжки мишки на средна възраст с 0,1% доза на метформин и се сравняват физическите им показатели с контролна група, която е на стандартна диета, без метформин. Резултатите от експеримента показват, че при мишките, приемащи лекарството се наблюдава 5,83% покачване на продължителността на живота в сравнение с контролната група. Наблюдава се и редуция на телото и по-добро физическо състояние, независимо, че са консумирали повече калории в сравнение с контролната група. Повишаването на дозата до 1%, оказва токсичен ефект, водещ до бъбречна недостатъчност [6].

ДИЗАЙН НА ИЗСЛЕДВАНЕ И МЕТОДИКА НА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ

През 2014г. е извършен анализ (intention-to-treat analysis), използвайки база данни от проучвания в клиничната практика (UK Clinical Practice Research Datalink). Анализът е еквивалентен на нерандомизирано „изпитване“, което избягва редица от недостатъците на традиционните наблюдателни проучвания [1].

С подходящ статистически метод се изследва риска от злокачествени образувания сред използващите метформин спрямо тези, използващи сулфониурейни или други орални антихиперглицемични от първа линия. Докато мета-анализът от наблюдателни проучвания показва намален риск от злокачествени заболявания сред пациенти, приемащи метформин, същият анализ от рандомизирани контролни изпитвания не намира връзка между употребата на метформин и риска от поява на рак.

Анализът обхваща 95,820 пациенти, от които 51,484 (54%) са започнали да приемат метформин в рамките на година след като са били диагностицирани с диабет и 18,264 (19%), които са започнали да приемат сулфониурейни лекарства. По време на средно проследяване в продължение на 5,1 години, са диагностицирани 3805 първични случаи на злокачествени образувания сред участниците [1]. След оценка на факторите тютюнопушене, ин-

декс на телесна маса, алкохолна консумация, употреба на НСПВ, аспирин, статини, продължителност на диабет и година на първата антидиабетна прескрипция, между двете кохорти не са открити значителни различия в риска за общи злокачествени образувания или рак на колона, ректума, простатата, белите дробове, гърдата [1].

Използван е кокс модел за да се оцени коефициент на риск (hazard ratios – HR) и доверителния интервал (confidence interval – CI). Кокс моделът е статистическа техника за анализиране на преживяемостта на пациенти в проучване, позволявайки да се изолира влиянието на лекарствената терапия и други променливи. Като резултат се получава уравнение за риска като функция от няколко променливи (включително и приложеното лечение) [1].

В проучването, 51,484 (54%) участници употребявали метформин и 18,264 (18%) сулфалинурейни лекарства. Средното проследяване (median follow-up) е 5,1 години, а максималното проследяване 24 години.

3,805 първични инциденти на малигнени заболявания са идентифицирани, от които:

- 599 колоректален рак (353 метформин, 246 сулфалинурейни лекарства)
- 580 рак на простатата (339 метформин, 241 сулфалинурейни лекарства)
- 468 рак на белите дробове (249 метформин, 219 сулфалинурейни лекарства)
- 460 post-menopausal рак на гърдата (307 метформин, 153 сулфалинурейни лекарства)

С подобна честота са случаите на малигнени заболявания, наблюдавани при употреба на метформин и сулфалинурейни лекарства след максималния период на наблюдение от 24 години. (HR [95% CI])

Общи малигнени образувания: 0,96 (0,89 – 1,04)

- Колоректален рак: 0,92 (0,76 – 1,13)
- Рак на простатата: 1,02 (0,83 – 1,25)
- Рак на белия дроб: 0,85 (0,68 – 1,07)
- Постменопаузален рак на гърдата: 1,03 (0,82 – 1,31) [1].

Изводи

От проведеният критичен анализ на литературните данни и проведени проучвания могат да се направят следните по-важни изводи:

- Метформин не повлиява значимо риска от поява малигнени образувания според анализа, из-

вършен с Кокс модел. Случаи на малигнени заболявания са наблюдавани при употреба на метформин и сулфанилурейни лекарства след максимален период на наблюдение от 24 години. Пациентите, започнали своята терапия с метформин имат същия риск за общи малигнени заболявания, както групата на сулфанилурейни лекарства.

● В повечето клинични изпитвания се използват дози на метформин, в които той обичайно се предписва като противодиабетно средство. Редица изпитвания са провеждани с многократно по-високи серумни концентрации от стандартните при диабетици. Хипотетично може да се предполага, че превенцията на малигнени образувания се осъществява и от по-ниски дози. Данни за превенция на злокачествени образувания с повишени дози са ограничени, т.к. нежеланите реакции са по-чести.

● Независимо от неоспоримите епидемиологични доказателства, ако все пак се допусне, че метформин би имал превантивна роля в появата на злокачествените заболявания, то тя може да е ограничена само до няколко определени вида ракови заболявания.

Бъдещи клинични проучвания с метформин при недиабетно болни ще изведат на преден план присъщите, директни антитуморогенни ефекти на метформин. Диабетът и повишените серумни нива на инсулин са добре познат рисков фактор за редица малигнени образувания, включително панкреатичен рак, рак на простатата и на гърдата. Ако инсулин наистина директно участва в патогенезата на тези ракови образувания е основателно да се очаква по-значим ефект при диабетици в сравнение с недиабетици [5].

В заключение, независимо че, антитуморогенните ефекти на метформин се дължат на способността му да активира пътя LKB1/AMPK/mTOR, както и инхибицията на инсулин-индуцираните

растежни механизми, на практика механизмът на действие е значително по-сложен, потенциално включващ протеин кинази и други молекули, с ключова роля в клетъчния растеж и оцеляване.

Библиография:

1. Tsilidis KK, Capothanassi D, Allen NE, et al. Metformin does not affect cancer risk: a cohort study in the U.K. Clinical Practice Research Datalink analyzed like an intention-to-treat trial. *Diabetes Care*. 2014;37(9):2522-2532
2. National Cancer Institute at The National Institute of Health Metformin: Can a Diabetes Drug Help Prevent Cancer?, April 2013 www.cancer.gov.
3. Kisfalvi K, Eibl G, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Research* 2009; 69: 6539-45
4. Researchers at the National Institute of Aging (NIA), a part of the National Institutes of Health (NIH) in the US, tested the type 2 diabetes drug metformin on the mice. 2.08.2013r.
5. Interview at the Biomed Central conference on Metabolism, Diet and Disease in May 2014 with Navdeep Chandel, PhD, a Professor of Medicine and Cell Biology
6. Metformin and cancer: new applications for an old drug, Taxiarchis V. Kourelis, Robert D. Siegel, Received: 29 August 2010 / Accepted: 26 January 2011 *Med Oncol* DOI 10.1007/s12032-011-9846-7
7. Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese Gastroenterology. 2009; 137: 482-8.
8. Metformin inhibits aromatase expression in human breast adipose stromal cells via stimulation of AMP-activated protein kinase. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> march, 2010
9. WHO Model List of Essential Medicines 18th list (April 2013)
10. Could diabetes pill metformin work against aging? National Institute of Aging (NIA), a part of the National Institutes of Health (NIH) in the US, August 2, 2013

✉ Адрес за кореспонденция:
маг.-фарм. Татяна Тенева
МБАЛ – Елин Пелин ЕООД
жк. Стрелбище бл. 30, бх. А
1404 София,
tat_teneva@abv.bg