

## THE EFFECT OF METFORMIN ON VIABILITY AND MITOCHONDRIAL STATUS OF TUMOR AND NON-TUMOR CELL LINE

### EFEKAT METFORMINA NA VIJABILITET I MITOHONDRIJALNI STATUS TUMORSKE I NETUMORSKE ĆELIJSKE LINIJE

Jelena Ljubičić<sup>1</sup>, Andrej Pešić<sup>2</sup>, Anđelka Isaković<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd, Srbija

<sup>3</sup> Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

**Correspondence:** jelena.ljubicic.mfub@gmail.com

#### Abstract

**Introduction:** Metformin is a drug of choice in the therapy of type II *Diabetes mellitus*. There is a growing evidence of metformin's antitumor activity, but the suggested mechanisms of such activity are still not fully elucidated.

**Aim:** To investigate the effect of therapeutic doses of metformin on viability and mitochondrial status of human non-small cell lung carcinoma (NCI-H460) and human immortalized lung fibroblasts (MRC-5) cell lines.

**Material and methods:** Acid phosphatase and Crystal Violet assays were used for the determination of NCI-H460 and MRC-5 cell viability after the treatment with metformin (10-60  $\mu$ M) for 1-7 days. Mitochondrial membrane potential, production of reactive oxygen species and superoxide anion, as well as mitochondrial mass were measured using flow cytometry after the treatment of the cells for 3, 24 and 120 h, followed by staining with appropriate fluorochromes: JC-1, DHR, DHE and Mitotracker Red.

**Results:** Metformin did not change the viability of both NCI-H460 and MRC-5 cells in all investigated time-points and all used concentrations. Depolarization of mitochondrial membrane was observed 3 h post-treatment in MRC-5 cells. Prolonged treatment (120 h) increased superoxide anion production and mitochondrial mass in NCI-H460 cells. No significant changes in production of reactive oxygen species were observed in both cells lines after short or extended exposure to metformin.

**Conclusion:** : Therapeutic concentrations of metformin do not influence the viability of NCI-H460 and MRC-5 cells, but induce mitochondrial depolarization after short-term exposure in lung fibroblasts and increase production of superoxide anion and mitochondrial mass in lung carcinoma cells after prolonged treatment.

#### Keywords:

metformin,  
lung carcinoma,  
mitochondria

## Sažetak

**Uvod:** Metformin predstavlja lek izbora u terapiji tipa 2 dijabetesa melitusa, ali se u poslednjoj deceniji ističe njegov značajan antitumorski efekat u brojnim malignitetima. Mehanizam ovog efekta metformina je i dalje nedovoljno razjašnjen i predstavlja veliko polje istraživanja.

**Cilj:** Cilj rada je ispitivanje terapijskih koncentracija metformina na vijabilitet i mitohondrijalnu funkciju ćelija humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460), kao i netumorskih imortalizovanih plućnih fibroblasta (MRC-5) u *in vitro* uslovima.

**Materijal i metode:** Vijabilitet ćelijskih linija NCI-H460 i MRC-5 nakon tretmana metforminom (10-60  $\mu$ M) u trajanju 1-7 dana određivan je testom aktivnosti kisele fosfataze i *Crystal Violet* metodom. Efekat metformina na parametre mitohondrijalne funkcije: depolarizaciju mitohondrija, produkciju superoksidnog anjona, reaktivnih kiseoničnih vrsta i na ukupnu masu mitohondrija ispitivan je pomoću protočnog citofluorimetra, uz korišćenje *JC-1*, *DHE*, *DHR* i *Mito Tracker* fluorescentnih proba nakon 3, 24 i 120 h tretmana.

**Rezultati:** Metformin nije doveo do promene vijabiliteta kako tumorske, tako i netumorske ćelijske linije ni u jednoj terapijskoj koncentraciji, nezavisno od dužine trajanja tretmana. Povećanje depolarizacije mitohondrijalne membrane uočeno je nakon 3 h tretmana kod netumorske MRC-5 ćelijske linije. Produžena ekspozicija metforminu (120 h) u tumorskoj NCI-H460 ćelijskoj liniji dovela je do povećanja produkcije superoksidnog anjona, kao i ukupne mase mitohondrija. Promene u produkciji ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta nisu primećene ni kod NCI-H460, ni kod MRC-5 ćelijske linije tokom kratkotrajne ili produžene ekspozicije.

**Zaključak:** Metformin u terapijskim koncentracijama ne menja vijabilitet NCI-H460 i MRC-5 ćelija, ali indukuje akutnu depolarizaciju mitohondrijalne membrane u plućnim fibroblastima i povećanje produkcije superoksidnog anjona i mase mitohondrija u ćelijama plućnog karcinoma nakon produženog delovanja.

### Ključne reči:

metformin,  
karcinom pluća,  
mitohondrije

## Uvod

Metformin predstavlja dimetil-bigvanidin koji zbog svoje efikasnosti, velike terapijske širine i povoljnosti predstavlja lek izbora u terapiji osoba obolelih od tipa 2 dijabetesa melitusa (DM). Efekat metformina zasniva se na smanjenju apsorpcije glukoze na nivou intestinalnog trakta, povećanju preuzimanja glukoze od strane perifernih tkiva, kao i na većoj osetljivosti insulinskog receptora, što sve zajedno rezultira redukovanjem koncentracije glukoze u krvi, dovodeći do normoglikemije (1). Prema istraživanjima Američke uprave za hranu i lekove, metformin predstavlja siguran i efikasan lek čija se malobrojna neželjena dejstva u vidu intolerancije i metaboličke acidoze javljaju uglavnom kod osoba sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom ili hroničnom opstruktivnom bolešću pluća, kod kojih se preporučuje oprezna i prilagođena primena ovog leka (2).

Metformin se takođe koristi u terapiji sindroma policističnih jajnika, a odnedavno se veliki broj pretkliničkih studija bavi ispitivanjem kardioprotektivnog i antitumorskog efekta ovog leka (3). Brojna *in vivo* istraživanja, počevši od rada Šnajdera (*Schneider*) i saradnika iz 2001. godine (4), ukazuju na značajan antitumorski efekat metformina kod maligniteta ovarijuma, dojke, prostate i pluća (5,6).

Nedovoljno ispitani mehanizmi dejstva metformina na maligno izmenjene ćelije ukazuju na potencijalni antitumorski efekat ovog leka blokiranjem prvog kompleksa

respiratornog lanca, što primarno dovodi do smanjenja produkcije adenozin trifosfata (ATP) i povećanja ćelijskog odnosa AMP/ATP. Povećano vezivanje adenozin monofosfata (AMP) za protein kinazu aktiviranu AMP-om (AMPK) dovodi do fosforilacije katalitičke subjedine ovog enzima i njegove aktivacije. Tako aktivirana AMPK dovodi do inhibicije proonkogenih signalnih puteva za preživljavanje ćelija poput AKT/mTOR i MAPK/ERK, čime se smanjuje stepen proliferacije i preživljavanja ćelija. Naime, inhibicija aktivnosti mTOR-a redukuje fosforilaciju nishodnih molekula, što dovodi do smanjenja sinteze proteina, progresije ćelijskog ciklusa i procesa angiogeneze. S druge strane, AMPK nishodnom fosforilacijom aktivira tumor supresorske molekule poput p53 i ULK-1, indikujući na taj način zastoj u ćelijskom ciklusu, koji može da progredira do ćelijske smrti po tipu apoptoze ili autofagije (7). U radu Ejkava (*Eikaw*) i saradnika iz 2015. godine (8) navodi se stimulatorno dejstvo metformina na tumor infiltrirajuće citotoksične T-limfocite, što predstavlja još jedno od potencijalnih objašnjenja antitumorskog efekta ovog leka. Smatra se da skup ovih mehanizama dovodi do antitumorskog dejstva kod pacijenata obolelih od malignih bolesti, kako onih sa DM2, tako i onih sa dobrom regulacijom glikemije (9).

Uprkos velikom broju naučnih radova u kojima se u eksperimentalnim uslovima ispituje efekat metformina na tumorske ćelije u kulturi, mehanizam antitumorskog dejstva metformina i dalje nije u potpunosti razjašnjen. Iako postoje indicije da metformin svoj antitumorski efekat

ostvaruje putem inhibicije prvog kompleksa lanca oksidativne fosforilacije, ovaj mehanizam nije pokazan kod terapijskih doza metformina.

Cilj ovog rada bio je *in vitro* ispitivanje efekta terapijskih koncentracija metformina na vijabilitet i mitohondrijalnu funkciju ćelija humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća, kao i netumorskih imortalizovanih plućnih fibroblasta.

## Materijal i metode

### Ćelijske linije i reagensi

Sve hemikalije i reagensi koji su se koristili tokom ovog eksperimenta kupljeni su od *Capricorn Scientific* (SAD), ukoliko nije drugačije naznačeno. Ćelijske linije humanih plućnih fibroblasta MRC-5 i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (engl. *Non-small Cell Lung Cancer*, NSCLC) NCI-H460 nabavljene su od *American Type Culture Collection-ATCC* i gajene u *DMEM*, odnosno *RPMI* medijumu. Oba medijuma su sadržala glukozu u finalnoj koncentraciji od 4,5 g/L, 10% fetalni goveđi serum, 2 mM glutamin i 1% rastvor antibiotika/antimikotika. Ćelije su gajene na vlažnom vazduhu temperature 37°C i koncentracije CO<sub>2</sub> 5%. Obe ćelijske linije pripremane su za eksperimente standardizovanom metodom tripsinizacije (0,05% tripsin/EDTA rastvorom). Metformin-hidrohlorid (Mr = 165,625 g/mol, *ICN Galenika*, Srbija) koncentracije 20 mM rastvaran je u fiziološkom rastvoru sa dodatkom fosfata (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS), a zatim je razblaživan u medijumu za gajenje ćelija.

### Ćelijski vijabilitet

Za ispitivanje ćelijskog vijabiliteta ćelije su zasejane u mikrotitarske ploče sa 96 bunarića. Ćelijska linija NCI-H460 zasejavana je u broju od 10 x 10<sup>3</sup>, 6 x 10<sup>3</sup>, 3 x 10<sup>3</sup>, 1,5 x 10<sup>3</sup>, 0,75 x 10<sup>3</sup> i 0,185 x 10<sup>3</sup>, za tretmane u trajanju od 24, 48, 72, 96, 120 i 168 h, dok je ćelijska linija MRC-5 zasejavana u broju od 6 x 10<sup>3</sup>, 3 x 10<sup>3</sup>, 1,6 x 10<sup>3</sup>, 0,8 x 10<sup>3</sup>, 0,4 x 10<sup>3</sup> i 0,1 x 10<sup>3</sup> ćelija po bunaru, za tretmane istog trajanja. Ćelije su dan nakon zasejavanja tretirane metforminom u koncentracijama od 10, 20, 30, 40, 50 i 60 μM, uz zamenu medijuma posle 48 h za duža trajanja tretmana. Svaki eksperiment je urađen u šest primeraka u 2 ili 3 nezavisna ponavljanja. Rezultati testova vijabiliteta prikazani su kao procenat živih ćelija u odnosu na netretiranu grupu, koja je predstavljala 100% živih ćelija.

### Određivanje aktivnosti kisele fosfataze

Merenje aktivnosti kisele fosfataze je urađeno tačno kako je ranije opisano (10) i zasniva se na hidrolizi *p*-nitrofenil fosfata u kiseloj sredini dejstvom unutarćelijske kisele fosfataze, pri čemu se u živim ćelijama razvija žuto obojen rastvor porekla *p*-nitrofenola čija se apsorbancija meri na 405 nm automatskim čitačem mikrotitar ploča (*Tecan*

*Sunrise*, Švajcarska) i direktno je proporcionalna broju živih ćelija.

### Određivanje ćelijskog vijabiliteta *Crystal Violet* testom

*Crystal Violet* (CV) test predstavlja metodu u kojoj dolazi do vezivanja CV boje za proteinske strukture živih ćelija, a apsorbancija plavoljubičaste boje očitavana je na talasnoj dužini od 570 nm pomoću prethodno pomenutog automatskog čitača. Esej je urađen tačno kako je prethodno opisano (11).

### Analiza mitohondrijalnog statusa protočnim citofluorimetrom

Ćelije su za potrebe analize protočnim citofluorimetrom uzgajane u pločama sa 24 bunarića. Ćelijska linija H460 zasejavana je u broju od 70 x 10<sup>3</sup>, 40 x 10<sup>3</sup> i 3 x 10<sup>3</sup> ćelija po bunariću za tretmane u trajanju od 3, 24 i 120 h, dok je ćelijska linija MRC-5 zasejavana u broju od 30 x 10<sup>3</sup>, 20 x 10<sup>3</sup> i 1,5 x 10<sup>3</sup> ćelija po bunariću za tretmane istog trajanja. Obe ćelijske linije su tretirane metforminom u koncentraciji od 50 μM i nakon odgovarajućih bojenja analizirane protočnim citofluorimetrom *FACS Calibur*, uz korišćenje programa *Cell Quest Pro* (BD, Nemačka). Svi eksperimenti su urađeni u duplikatu u dva nezavisna ponavljanja. Rezultati ovih analiza izraženi su u odnosu na kontrolu, gde je stepen registrovane fluorescence postavljen kao jedinična vrednost.

### Priprema ćelijskih suspenzija za protočnu citofluorimetriju

Po završetku tretmana ćelije su tripsinizovane, centrifugirane (1500 rpm, 23°C, 5 minuta), a ćelijski talog je zatim resuspendovan u odgovarajućoj zapremini prethodno pripremljene boje po uputstvu proizvođača. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta, ćelijske suspenzije su vorteksovane, isprane u 1 mL PBS-a i centrifugirane kako je prethodno navedeno, a ćelijski talog je resuspendovan u 300 μL PBS-a. Pre svakog merenja epruvete sa uzorcima su vorteksovane, kako bi rastvor predstavljao homogenu ćelijsku suspenziju.

### Analiza mitohondrijalnog membranskog potencijala

Za potrebe ove analize korišćen je *Mitochondria Staining Kit* (*Sigma Aldrich*, SAD) koji sadrži tetraetil benzimidazol karbocijanin jodid (JC-1), katjonsku lipofilnu boju koja se akumulira u mitohondrijalnom matriksu u vidu agregata koji crveno fluorescira (FL2 kanal protočnog citofluorimetra). Pri smanjenju mitohondrijalnog membranskog potencijala, JC-1 formira monomere koji emituju zelenu fluorescenciju (FL1). Posledično, povećanje odnosa zelene i crvene fluorescencije (FL1/FL2) ukazuje na smanjenje mitohondrijalnog membranskog potencijala, tj. na mitohondrijalnu depolarizaciju (12). Kao pozitivna kontrola korišćen je mitohondrijalni uncoupler karbonil

cijanid hlórfenil hidrazon (CCCP) u koncentraciji od 20  $\mu\text{M}$  u trajanju od 3h.

### Analiza produkcije slobodnih kiseoničnih radikala

Produkcija slobodnih kiseoničnih radikala (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) određivana je pomoću eseja koji se bazira na oksidativnoj konverziji dihidrorodamina (DHR, *Sigma Aldrich*, SAD) u njegov proizvod rodamin, koji zeleno fluorescira (FL1). Ovaj test predstavlja nespecifični pokazatelj intracelularne koncentracije jednelektronskih oksidansa, poput peroksinitrita i hipohlorita (13). Povećanje zelene fluorescencije je stoga pokazatelj povećanja produkcije ROS. Pozitivnu kontrolu predstavljao je vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  u trajanju od 3h.

### Analiza produkcije superoksidnog anjona

Za određivanje produkcije superoksidnog anjona ( $\text{O}_2^-$ ) korišćen je dihidroetidijum (DHE, *Sigma Aldrich*, SAD) koji u redukovanoj formi u citosolu emituje plavu, a u oksidovanoj formi crvenu fluorescenciju (FL2). Stepenn povećanja crvene fluorescencije ukazuje na povećanje koncentracije superoksidnog anjona (14). Kao pozitivna kontrola korišćen je bakar-sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  u trajanju od 3h.

### Analiza mase mitohondrija u ćeliji

*MitoTracker Red* (*ThermoFischer Scientific*, SAD) predstavlja crvenu fluorescentnu boju (FL2) koja se vezuje za tiol grupe proteina i peptida mitohondrija, nezavisno od promene potencijala mitohondrijalne membrane. Povećanje stepena fluorescencije ove boje ukazuje na povećanje mase mitohondrija (16).

### Statistička analiza

Vrednosti vijabiliteta i rezultati protočne citofluorimetrije izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (sd). Svi dobijeni rezultati su izraženi u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). Statistička značajnost razlike vijabiliteta analizirana je dvofaktorskim ANOVA testom, dok su rezultati protočne citofluorimetrije analizirani t-testom za dva nezavisna uzorka. Statistički podaci analizirani su računarskim programom *GraphPad Prism 4*. Statistički značajnom razlikom smatrane su p vrednosti manje od 0,05.

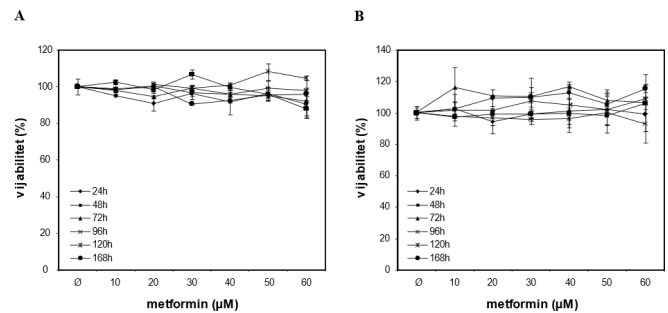
## Rezultati

### Uticaj metformina na vijabilitet tumorske i netumorske ćelijske linije

#### Uticaj metformina na vijabilitet ćelija karcinoma pluća

Ćelije humanog karcinoma pluća su tretirane metformin-hidrohloridom u koncentracijama od 10, 20, 30, 40, 50 i 60  $\mu\text{M}$  u šest vremenskih intervala (24, 48, 72, 96, 120, 168 h) i ispitivan je njihov vijabilitet testom aktivnosti

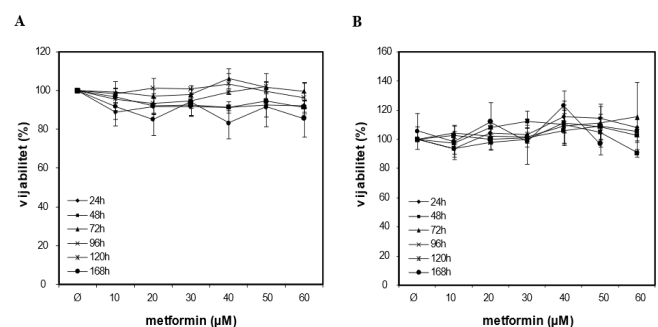
kisele fosfataze (**slika 1A**) i *Crystal Violet* metodom (**slika 1B**). Nisu pokazane statistički značajne razlike u procentu vijabiliteta ćelija tretiranih metforminom u odnosu na kontrolu, kao ni između različitih trajanja tretmana. Nisu postojale ni statistički značajne razlike između dva korišćena testa vijabiliteta za sve vremenske intervale i za sve ispitivane koncentracije metformina.



**Slika 1.** Metformin ne dovodi do promene vijabiliteta ćelija karcinoma pluća. Rezultati testa aktivnosti kisele fosfataze (A) i *Crystal Violet* metode (B). Vijabilitet ćelija prikazan je kao procenat u odnosu na netretirane ćelije ( $\emptyset$ ).

### Uticaj metformina na vijabilitet plućnih fibroblasta

Vijabilitet ćelija humanih plućnih fibroblasta (MRC-5), određen testom aktivnosti kisele fosfataze (**slika 2A**) i *Crystal Violet* metodom (**slika 2B**), nakon tretmana različitim koncentracijama metformina i u različitim dužinama trajanja tretmana nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na vijabilitet netretiranih ćelija, bez obzira na to koji je test vijabiliteta korišćen.

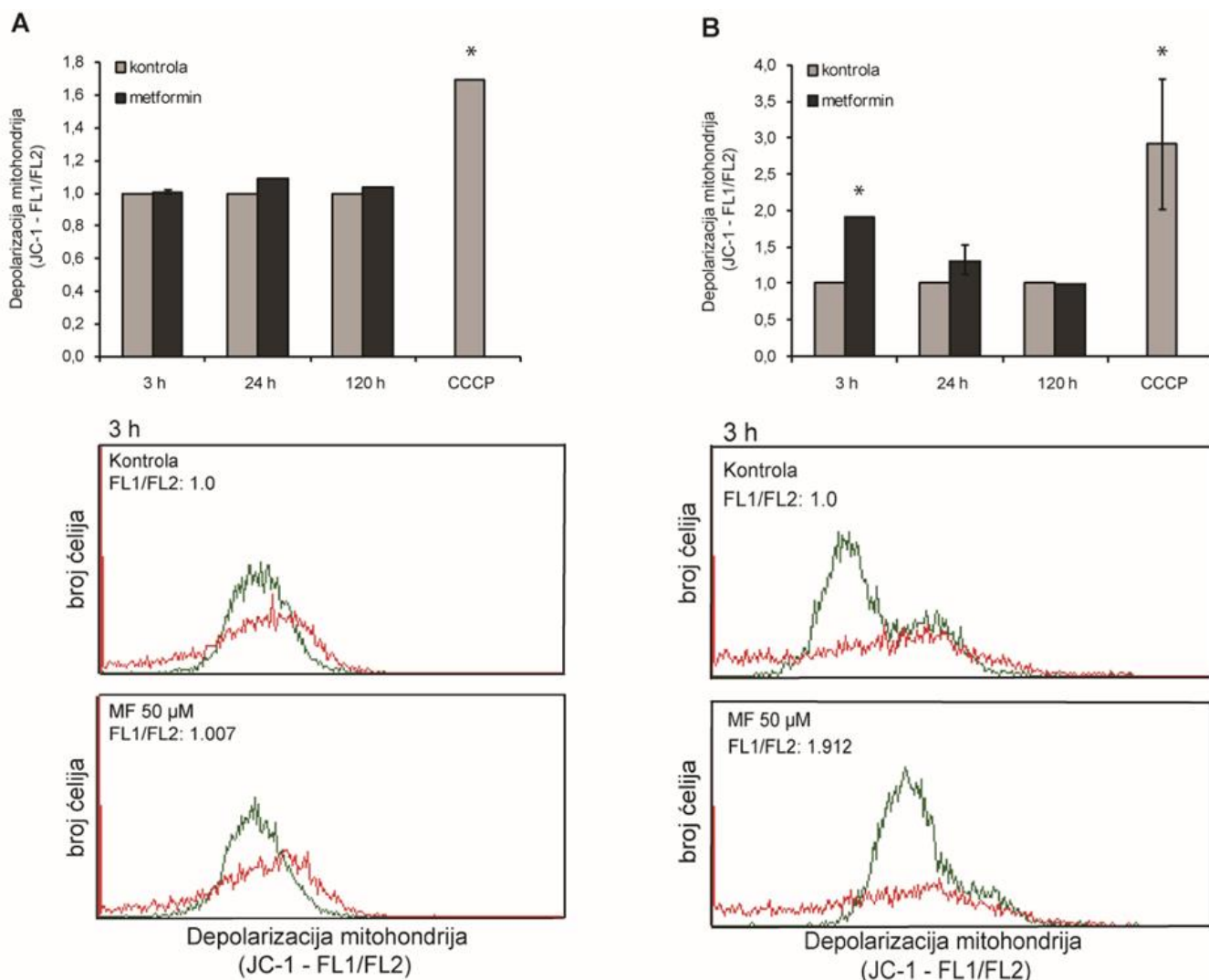


**Slika 2.** Metformin ne dovodi do promene vijabiliteta plućnih fibroblasta. Rezultati testa aktivnosti kisele fosfataze (A) i *Crystal Violet* metode (B). Vijabilitet ćelija prikazan je kao procenat u odnosu na netretirane ćelije ( $\emptyset$ ).

### Efekat metformina na parametre mitohondrijalnog statusa ćelijskih linija NCI-H460 i MRC-5

#### Membranski potencijal mitohondrija

Promene u mitohondrijalnom membranskom potencijalu ćelija tretiranih metforminom prikazane su kao stepen promene odnosa zelene/crvene fluorescencije (FL1/



**Slika 3.** Uticaj metformina na mitohondrijalni membranski potencijal. Ispod grafika prikazani su reprezentativni histogrami za datu analizu ćelijskih linija NCI-H460 (A) i MRC-5 (B), pre i nakon tretmana metforminom u trajanju od 3 h.

\* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu

FL2) na **slici 3**. Metformin (50 µM) nije uticao na stepen polarisanosti mitohondrijalne membrane NCI-H460 ni u jednom ispitivanom vremenu u odnosu na kontrolu (**slika 3A**). Tretman metforminom imortalisanih plućnih fibroblasta (MRC-5) u trajanju od 3 h (**slika 3B**) doveo je do statistički značajnog, gotovo dvostrukog povećanja odnosa FL1/FL2, što ukazuje na depolarizaciju mitohondrijalne membrane. Duži tretmani metforminom nisu značajno uticali na membranski mitohondrijalni potencijal MRC-5 ćelija. Pozitivnu kontrolu predstavljao je mitohondrijalni ankapler karbonil cijanid hlorfenil hidrazon (CCCP) u koncentraciji od 20 µM u trajanju od 3h.

#### Produkcija slobodnih kiseoničnih radikala

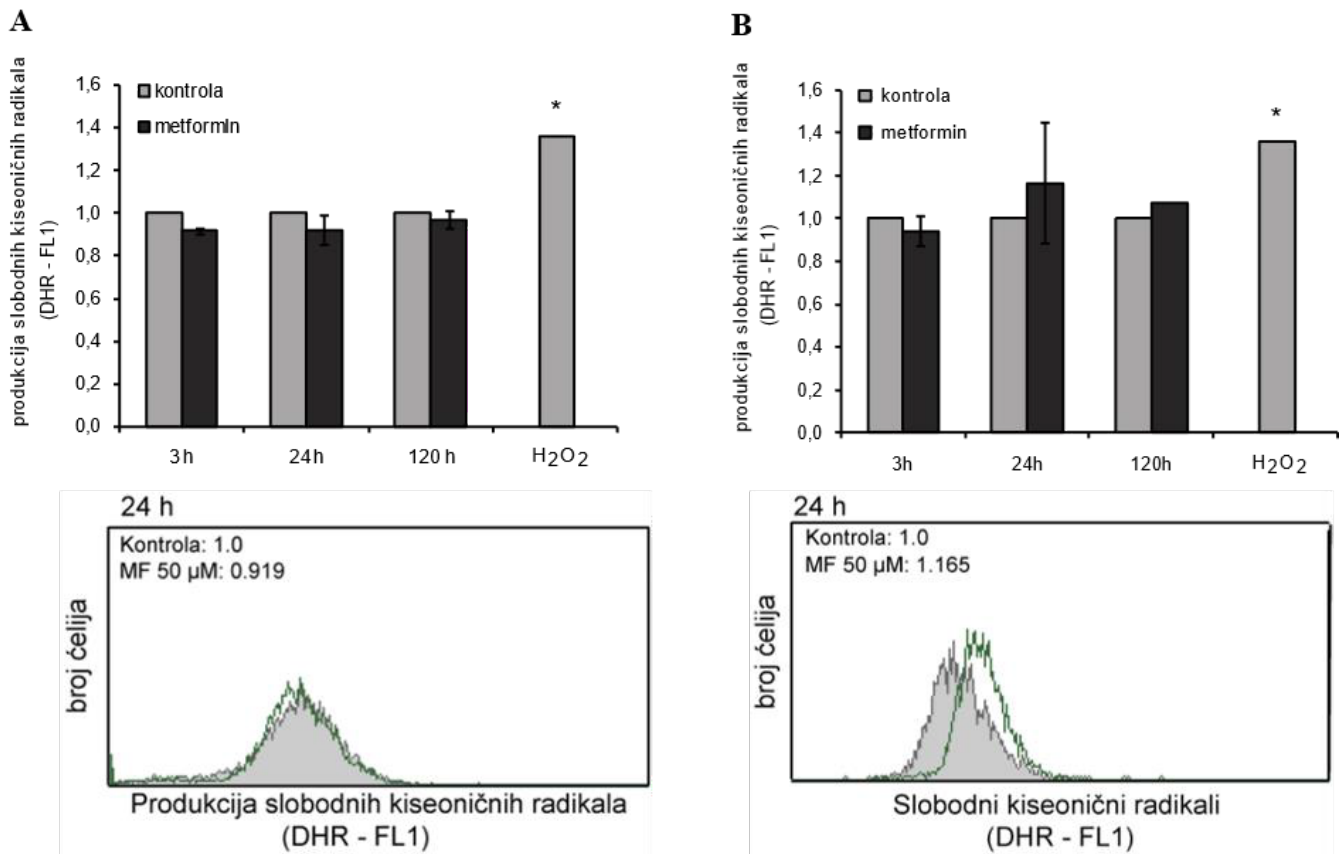
Nivo produkcije ROS, kao stepen zelene fluorescencije rodamina u tretiranim ćelijama, prikazan je na **slici 4**. Dati rezultati ukazuju da ne postoje statistički značajne promene pri različitim trajanjima tretmana metforminom (50 µM), kako kod ćelijske linije NCI-460, tako i kod MRC-5 ćelijske linije u odnosu na netretirane ćelije. Pozitivnu kontrolu predstavljao je vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) u koncentraciji 50 µM u trajanju od 3 h.

#### Produkcija superoksidnog anjona

Analiza tretiranih ćelija nakon bojenja dihidroeti-dijumom (DHE) pokazala je da ne postoji razlika u produkciji superoksidnog anjona u tretmanima metforminom (50 µM) od 3 h i 24 h u obe ćelijske linije (**slika 5**). U ćelijama nesitnoćelijskog plućnog karcinoma (NCI-H460) nakon 120 h tretmana uočava se statistički značajno povećanje fluorescencije u odnosu na kontrolu, što ukazuje na povećan stepen produkcije superoksidnog anjona (**slika 5A**). Pozitivnu kontrolu predstavljao je  $CuSO_4$  (Cu) u koncentraciji od 100 µM u trajanju od 3 h.

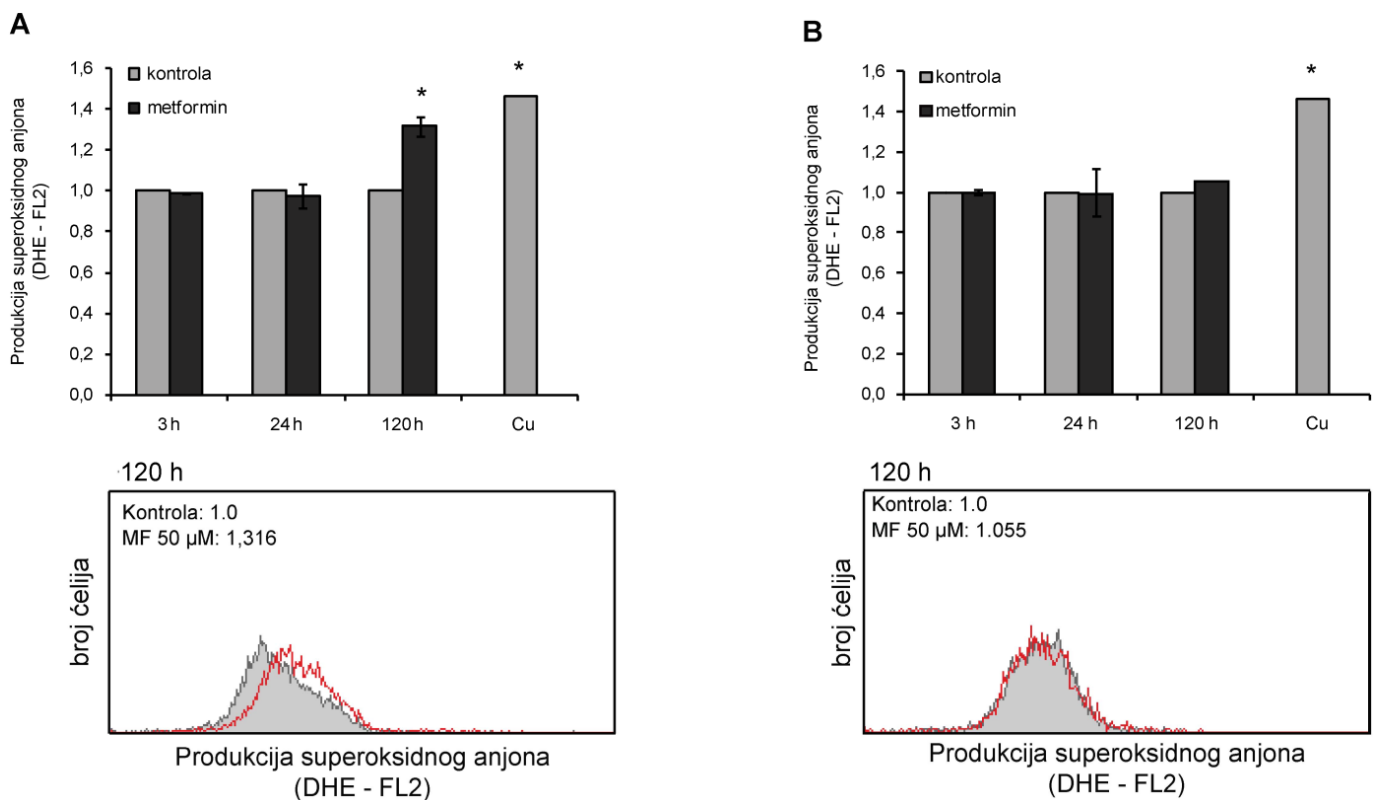
#### Efekat metformina na ukupnu masu mitohondrija

Pokazano je da se ukupna masa mitohondrija, predstavljena promenom crvene fluorescencije, nije značajno promenila nakon tretmana metforminom (50 µM) u trajanju od 3 h i 24 h u obe ćelijske linije, u odnosu na kontrolu (**slika 6**). Statistički značajno povećanje fluorescencije, koje ukazuje na povećanje ukupne mase mitohondrija, uočava se u ćelijama NCI-H460 nakon produženog tretmana metforminom u trajanju od 120 h (**slika 6A**).



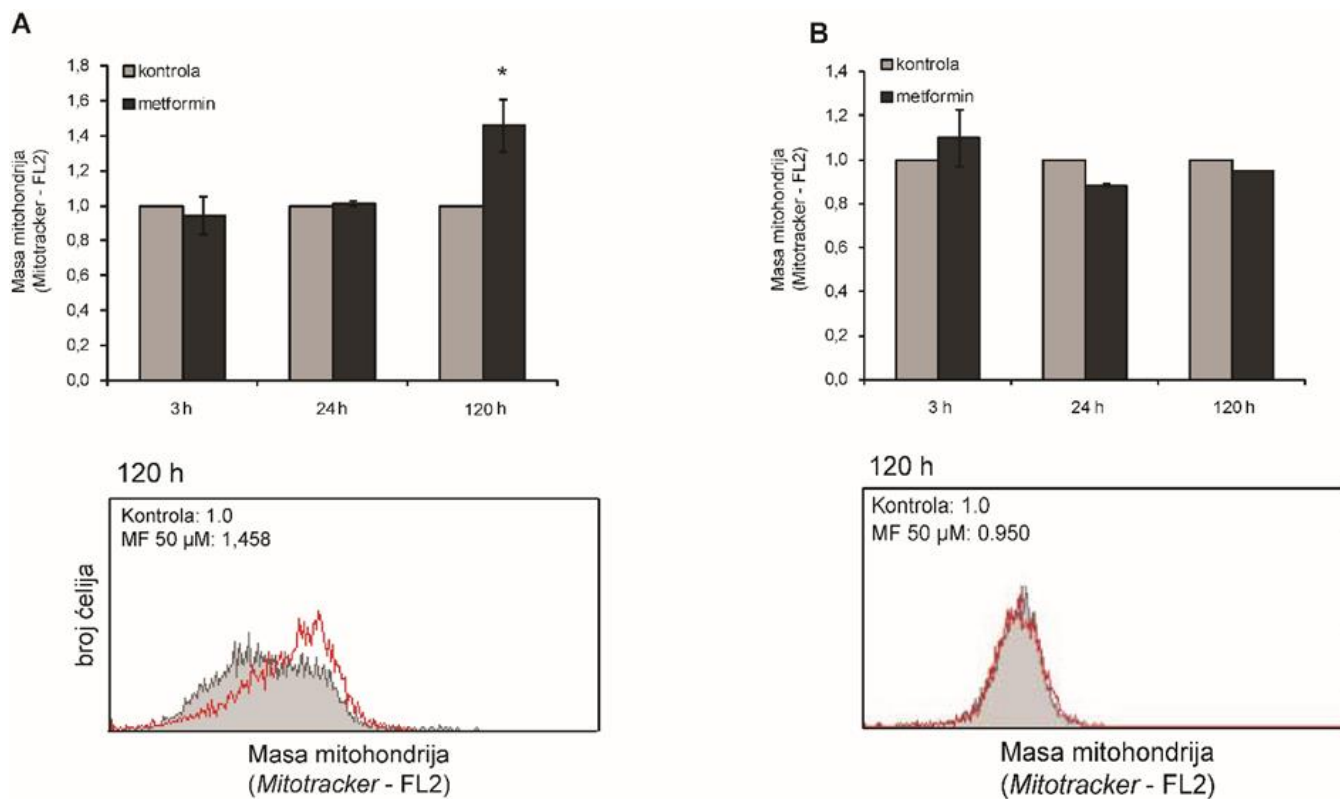
**Slika 4.** Uticaj metformina na produkciju slobodnih kiseoničnih radikala. Ispod grafika NCI-H460 (A) i MRC-5 (B) prikazani su odgovarajući reprezentativni histogrami sa prikazom odnosa stepena fluorescencije i broja ćelija za tretman metforminom od 24 h.

\* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu



**Slika 5.** Uticaj metformina na produkciju superoksidnog anjona. Histogrami ispod grafika NCI-H460 (A) i MRC-5 (B) prikazuju odgovarajuća reprezentativna merenja stepena fluorescencije nakon tretmana u trajanju od 120 h.

\* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu



**Slika 6.** Uticaj metformina na masu mitohondrija. Reprezentativni histogrami ispod grafika NCI-H460 (A) i MRC-5 (B) prikazuju odnos fluorescencije i broja ćelija nakon 120 h tretmana metforminom.

\* -  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu

## Diskusija

U ovom radu ispitan je uticaj terapijskih doza metformina na vijabilitet i mitohondrijalni status ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća i netumorske linije humanih plućnih fibroblasta. Dobijeni rezultati ukazuju da metformin ne utiče na promenu vijabiliteta kako tumorske, tako i netumorske ćelijske linije, ali da ostvaruje različit efekat na parametre njihovog mitohondrijalnog statusa.

Metformin predstavlja lek izbora u terapiji insulinske rezistencije još od 1995. godine, ali se poslednjih godina pojavljuje veliki broj kliničkih studija koje ukazuju na njegov antitumorski efekat kod različitih malignih bolesti (16). Uzimajući u obzir opsežne metaanalize koje ističu efekat ovog leka na povećanje opšte stope preživljavanja, kao i na produženje perioda preživljavanja bez progresije bolesti kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (17, 18), u ovom istraživanju je korišćena upravo humana ćelijska linija NSCLC, NCI-H460. Istovremeno, za ispitivanje efekta metformina korišćena je i netumorska ćelijska linija imortalisanih plućnih fibroblasta, MRC-5.

Terapijske doze metformina nalaze se u opsegu od 500-2500 mg po danu, što je ekvivalentno koncentraciji od 40-70  $\mu$ M, koliko se okvirno i beleži u portnoj cirkulaciji, dok su koncentracije izmerene u sistemskom krvotoku osoba koje su na ovoj terapiji između 10 i 40  $\mu$ M (19). Značajniji efekti terapije metforminom kod osoba sa insulinskom rezistencijom se javljaju nakon 10 do 15 dana primene metformina (20). Stoga smo za adekvatnu dužinu tretmana ćelija u *in vitro* okolnostima, u cilju produžene

ekspozicije, odabrali period do 7 dana (168 h), dok su za koncentracije tretmana uzete upravo one iz terapijskog opsega (10-60  $\mu$ M).

Rezultati naših eksperimenata ukazuju da metformin ne utiče na vijabilitet ispitivanih ćelija ni u jednoj korišćenoj koncentraciji i ni u jednom ispitanom vremenskom periodu. Kako je ovo potvrđeno različitim testovima (21, 22), može se zaključiti da metformin u terapijskim koncentracijama ne dovodi do promena vijabiliteta ćelija nesitnoćelijskog plućnog karcinoma, kao ni imortalizovanih plućnih fibroblasta. Druga istraživanja, koja opisuju antitumorski efekat i mehanizam delovanja metformina, najčešće navode koncentracije u opsegu od 10 do 60 mM, koje su oko hiljadu puta veće od onih koje se nalaze u organizmu osoba tokom adekvatne terapije metforminom (23). Tako metformin ostvaruje citotoksičan efekat na NCI-H460 ćelije indukujući ćelijsku smrt po tipu apoptoze u koncentracijama koje se kreću od 10 mM do 80 mM, u zavisnosti od istraživanja (24-26). Pretragom dostupne literature nismo pronašli prethodno publikovane radove u kojima se ispituje dejstvo metformina u terapijskim dozama na ove ćelije.

U ovom radu ispitan je i efekat metformina na mitohondrijalnu funkciju ćelija jer se trenutno poznati mehanizmi njegovog antitumorskog dejstva objašnjavaju upravo izazivanjem energetskog stresa i poremećajem redoks-potencijala, koji za posledicu mogu imati pokretanje mitohondrijalnog puta apoptoze (26, 27). Metformin u terapijskoj dozi (50  $\mu$ M) u našim eksperimentima ni tokom produžene ekspozicije od 120 h nije menjao potencijal

mitohondrijalne membrane, kao ni produkciju ROS u NCI-H460 ćelijama. Nasuprot našim podacima, depolarizacija mitohondrija i povećana produkcija ROS prilikom tretmana metforminom od najviše 48 h, a u dozama od 10 do 40 mM, zabeležene su u ćelijama melanoma, glioma i karcinoma dojke (28-30). U jedinom dostupnom istraživanju koje je ove parametre ispitalo na liniji plućnog adenokarcinoma govori se o depolarizaciji mitohondrija, ali nakon 24-časovnog tretmana metforminom (10 mM) (31). Iako se kod netumorske linije MRC-5 ne uočava promena u produkciji ROS, nakon 3 h tretmana metforminom dolazi do depolarizacije mitohondrijalne membrane, koja se ne beleži u dužim tretmanima od 24 i 120 h. Akutna depolarizacija mitohondrijalne membrane nakon kratkotrajnog dejstva metformina fenomen je ranije poznat iz literature (32).

Inhibicija respiratornog lanca i remećenje mitohondrijalne funkcije, što je jedan od pretpostavljenih mehanizama dejstva metformina (7), može dovesti do nastanka superoksidnog anjona. Naši eksperimenti su pokazali da produženi tretman metforminom od 120 h indukuje povećanje produkcije  $O_2^-$  kod tumorske ćelijske linije NCI-H460, dok linija plućnih fibroblasta ne pokazuje promene u produkciji  $O_2^-$ . U literaturi se navode podaci koji ukazuju da metformin i fenformin, takođe iz klase bigvanida, dovode do dozno zavisnog povećanja produkcije ROS, uključujući i  $O_2^-$  (33). Od značaja je podatak da oksidativni stres i smanjeni nivoi oksidativne fosforilacije mogu indukovati biogenezu mitohondrija kao kompenzatorni mehanizam zaštite (34). Ovime bi se mogao objasniti rezultat našeg istraživanja, u kome metformin nakon 120 h tretmana povećava masu mitohondrija u NCI-H460 ćelijama, što zapravo korelira sa povećanjem produkcije superoksidnog anjona. Očekivano, ovakav efekat na netumorske humane fibroblaste je izostao. S druge strane, poznato je da visoke koncentracije metformina smanjuju masu, funkcionalnost i međusobne veze mitohondrija (34). Kako uticaj terapijskih doza metformina na mitohondrije tumorskih ćelija do sada nije posebno ispitan i kako značaj našeg nalaza u kontekstu antitumorskog dejstva ovog leka nije dovoljno jasan iz do sada urađenih eksperimenata, naredno istraživanje bi trebalo da obuhvati merenje potrošnje kiseonika i respiraciju NSCLC ćelija u produženom tretmanu metforminom. Potrebno je izmeriti i nivoe produkcije ATP, kao i eventualnu aktivaciju AMPK, čiji je direktni supstrat glavni pokretač procesa mitohondrijalne biogeneze, PGC1  $\alpha$ .

## Zaključak

Na osnovu svih rezultata u ovom istraživanju može se zaključiti da terapijske doze metformina ne menjaju vijabilitet ćelijske linije humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća, kao ni imortalizovanih humanih plućnih fibroblasta. Efekat metformina na mitohondrije netumorskih i tumorskih ćelija je različit i to tako da on samo akutno izaziva depolarizaciju mitohondrija MRC-5 ćelija, dok produženo izlaganje njegovom dejstvu povećava

produkciju superoksidnog anjona i mitohondrijalnu masu u NCI-H460 ćelijama.

## Literatura

1. Wang YW, He SJ, Feng X, Cheng J, Luo YT, Tian L. et al. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11:2421-9.
2. The U.S. Food and Drug Administration. Safety announcement for Metformin; Washington (DC). (pristupljeno: 28. 2. 2019) dostupno na: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm493244>.
3. De Groot PC, Dekkers OM, Romijn JA, Dieben SW, Helmerhorst FM. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2011; 17(4):495-500.
4. Schneider MB, Matsuzaki H, Haorah J, Ulrich A, Standop J, Ding XZ et al. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology.* 2001; 120(5):1263-1270.
5. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 2005; 330(7503):1304-5.
6. Lee MS, Hsu CC, Wahlqvist ML, Tsai HN, Chang YH, Huang YC. Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. *BMC Cancer.* 2011; 11:20.
7. Levy A, Doyen J. Metformin for non-small cell lung cancer patients: opportunities and pitfalls. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018; 125:41-7.
8. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. 112, 1809-14.
9. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009; 32(9):1620-5.
10. Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isaković AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S. Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: comparison of the representative novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 90(2):262-71.
11. Kaludjerović GN, Miljković D, Momčilović M, Djinović VM, Mostarica Stojković M, Sabo TJ et al. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer.* 2005; 116:479-86.
12. Shapiro M. H. Cell Membrane Potential Analysis. *Methods Cell Biol.* 1994; 41: 121-33.
13. Jourdeheuil D, Jourdeheuil FL, Kutchukian PS, Musah RA, Wink DA, Grisham MB. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo. *J Biol Chem.* 2001; 276(31):28799-805
14. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med.* 2011; 52(1):1-6.
15. Xiao B, Xiao D, Zhou W, Tan E-K. Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker. *Front. Cell. Neuroscience.* 2016; 76 (10).
16. Mallik R, Chowdhury TA. Metformin in cancer. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 143:409-19.
17. Cao X, Wen ZS, Wang XD, Li Y, Liu KY, Wang X. The Clinical Effect of Metformin on the Survival of Lung Cancer Patients with Diabetes: A Comprehensive Systematic Review and Meta-analysis of Retrospective Studies. *J Cancer.* 2017; 8:2532-41
18. Tian RH, Zhang YG, Wu Z, Liu X, Yang JW, Ji HL. Effects of metformin on survival outcomes of lung cancer patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Clin Transl Oncol.* 2016; 18:6419.
19. He L, Wondisford FE. Metformin action: concentrations matter. *Cell Metab.* 2015; 21:159-62.



20. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 93:56-62.
21. Yang T, Sinai P, Kain S. An Acid Phosphatase Assay for Quantifying the Growth of Adherent and Nonadherent Cells. *Anal. Biochem.* 1996; 241:104-8.
22. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K. et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS ONE.* 2016; 11(5): e0155772.
23. Chandel NS, Avizonis D, Reczek CR, Weinberg SE, Menz S, Neuhaus R. et al. Are Metformin Doses Used in Murine Cancer Models Clinically Relevant? *Cell Metab.* 2016; 23:569-70.
24. Guo Q, Liu Z, Jiang L, Liu M, Ma J, Yang C. et al. Metformin inhibits growth of human non-small cell lung cancer cells via liver kinase B-1-independent activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Mol Med Rep.* 2016; 13:2590-6.
25. Teixeira SF, Guimarães Idos S, Madeira KP, Daltoé RD, Silva IV, Rangel LB. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. *J Bras Pneumol.* 2013; 39:644-9.
26. Luo Z, Zhu T, Luo W, Lv Y, Zhang L, Wang C. et al. Metformin induces apoptotic cytotoxicity depending on AMPK/PKA/GSK-3 $\beta$ -mediated c-FLIPL degradation in non-small cell lung cancer. *Cancer Manag Res.* 2019; 11:681-9.
27. Luengo A, Sullivan LB, Heiden MG. Understanding the complexity of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC. Biol.* 2014; 12:82-4.
28. Janjetović K, Harhaji-Trajković Lj, Misirkić-Marjanović M, Vučićević Lj, Stevanović D, Zogović N. et al. In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 668: 373-82.
29. Isakovic A, Harhaji Lj, Stevanovic D, Markovic Z, Sumarac-Dumanovic M, Starcevic V. et al Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007; 64: 1290-1302.
30. Gao Z-Y, Liu Z, Bi M-H, Zhang J-J, Han Z-Q, Han X. et al. Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro. *Exp. Ther. Med.* 2016; 11: 1700-1706.
31. Salani B, Marini C, Rio AD, Ravera S, Massollo M, Orengo AM, et al. Metformin impairs glucose consumption and survival in Calu-1 cells by direct inhibition of hexokinase-II. *Sci Rep.* 2013; 3:2070-8.
32. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab.* 2014; 2:12-5.
33. Pecinova A, Drahota Z, Kovalcikova J, Kovarova N, Pecina P, Alan L. et al. Pleiotropic effects of biguanides on mitochondrial reactive oxygen species production. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 26:65-75.
34. Suliman HB, Piantadosi CA. Mitochondrial biogenesis: regulation by endogenous gases during inflammation and organ stress. *Curr Pharm Des.* 2014; 20:5653-62.
35. Uehara T, Mitsuhashi A, Tsuruoka N, Shozu M. Metformin potentiates the anticancer effects of cisplatin under normoxic conditions in vitro. *Oncol Rep.* 2015; 33:744-50