УДК 616 - 008.9 + 615.2
©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА МЕТАБОЛИЗМ ПУРИНОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.П. Шатова*, Е.В. Бутенко, Е.В. Хомутов, Д.С. Каплун, И.Е. Седаков, И.И. Зинкович

Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького,
пр. Ильича, 16, Донецк, 83003 Украина; тел.: +380666045644; эл. почта: shatova.op@gmail.com

Масштабные эпидемиологические и клинические исследования продемонстрировали эффективность применения метформина в онкологической практике. Однако до сих пор нет чёткого понимания о механизмах реализации противоопухолевого эффекта данного препарата. Цель работы – изучить влияние метформина на активность аденозиндезаминазы и на аденозинергическую иммуносупрессию в опухолях и их микроокружении. Материалом исследования служили взятые во время операции ткани аденокарцином молочных желез пациенток, терапия которых включала метформин. Пациентки контрольной группы не принимали данный препарат. Изучение активности аденозиндезаминазы и концентраций субстрата (аденозина) и продуктов (инозина, гипоксантина) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученные данные свидетельствуют, что прием метформина существенно изменяет показатели катаболизма пуриновых нуклеотидов в узле аденокарциномы молочной железы. Однако, установленного нами метформин-индуцированного повышения активности аденозиндезаминазы оказывается недостаточно для снижения уровня аденозина в ткани опухоли. На фоне приёма метформина, концентрация аденозина статистически значимо не изменяется, а инозина и гипоксантина значительно увеличиваются.

Ключевые слова: метформин, рак молочной железы, аденозиндезаминаза, аденозин, инозин, гипоксантин

DOI 10.18097/PBMC20166203302

ВВЕДЕНИЕ

В серии эпидемиологических популяционных ретроспективных исследований последнего 10-летия продемонстрирована способность известного для коррекции инсулинорезистентности бигуанида метформина [1] снижать показатели онкологической заболеваемости и смертности [2]. Это инициирует расширение показаний к его применению: разрабатываются и обосновываются схемы его использования в качестве антиметаболического противоопухолевого препарата [3].

Установлено, что метформин имеет множество мишеней в метаболических путях злокачественно трансформированных клеток. Он подавляет трансмембранный ток хлоридов [4], модифицирует мембраны митохондрий [5], ингибирует ферменты цепи транспорта электронов [6] и пр. В эксперименте *in vitro* доказана способность метформина повышать чувствительность к цитостатикам раковых (особенно стволовых раковых) клеток [7]. Способность метформина модифицировать скорость гемопоэза и направление дифференцировки лимфоцитов обосновывает использование его для лечения некоторых аутоиммунных воспалительных заболеваний. Установлено влияние метформина и на механизмы иммунного противоопухолевого "надзора" [8].

Учитывая роль аденозина в дисфункции клеток иммунной системы, целью данного исследования была оценка влияния длительного приёма метформина на катаболизм пуриновых нуклеотидов в узлах аденокарциномы молочной железы.

МЕТОДИКА

Материалом исследования были операционные биоптаты опухолевых тканей 30 женщин в возрасте 46-76 лет больных раком молочной железы (РМЖ) $T_{2\text{-}4}N_1M_0$. Все пациентки получали комплексную терапию в соответствии со стандартными протоколами. 15 женщин дополнительно в течение 2-3 месяцев до оперативного лечения получали метформин в дозе 1000 мг в день. Исследование было одобрено Комитетом по биоэтике Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького. Все пациентки дали информированное согласие на участие в исследовании.

Образцы ткани замораживали и хранили при -70°С до использования. Гомогенизацию тканей проводили на льду в фосфатном буфере (35 мМ KH_2PO_4/Na_2HPO_4, pH=7,0).

Все использованные реактивы соответствовали классу чистоты для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Методы исследования

Концентрации аденозина, инозина и гипоксантина в гомогенатах опухолей определяли методом обратно-фазовой ВЭЖХ (Konikrom Plus, "Konik Group", Испания) на приборе с PDA-детектором и хроматографической колонкой 250×4,6 мм, YMC C18 ("TriArt"). Для элюирования использовали 20 мМ раствор аммония хлорида с 2% ацетонитрилом, скорость потока элюента – 1 мл/мин. Концентрацию аналитов выражали в мкмоль/г ткани.

* - адресат для переписки

Для определения активности аденозиндезаминазы (АДА, КФ 3.5.4.4) к 200 мкл гомогената опухоли добавляли 2 мл 10 мМ раствора аденозина на KH_2PO_4/Na_2HPO_4 буфере, pH=7,0 и инкубировали при 37°С. Реакцию останавливали путём осаждения всех белков ацетонитрилом на 1, 30 и 60 мин. Ацетонитрил удаляли путём хлороформной экстракции. Расчёт активности АДА производили по степени суммарного прироста инозина и гипоксантина в реакционной смеси. Концентрацию белка в гомогенатах определяли по методу Лоури.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (“Statsoft Inc.”). В тексте статьи цифровой материал представлен значениями средних арифметических и их стандартных отклонений. Средние значения сравнивали по критерию Стьюдента, различия считали статистически достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют, что длительный прием метформина сказывается на работе ключевого фермента распада аденозина – АДА. Его активность в опухолевой ткани возрастает до 12,1±2,49 нмоль/мин·мг белка, статистически значимо ($p<0,001$) превышая соответствующий показатель у пациентов контрольной группы – 4,77±0,94 нмоль/мин·мг белка (рис. 1).

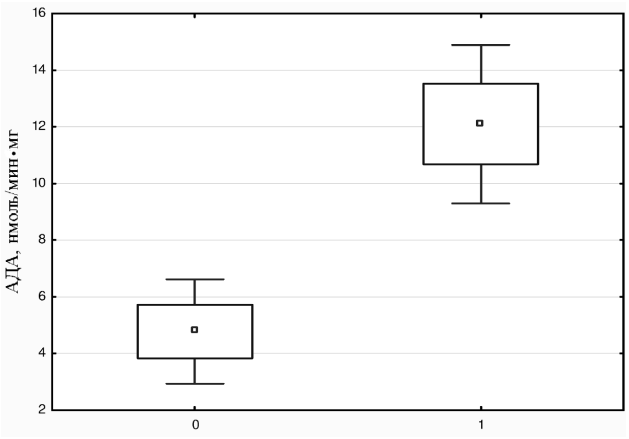

Рисунок 1. Активность аденозиндезаминазы в гомогенатах опухолевых тканей на фоне приёма метформина (1) и у пациентов контрольной группы (0).

Такое существенное повышение активности АДА должно приводить к усилению распада аденозина – снижению его концентрации и в самой опухолевой клетке, и в её микроокружении. А, как известно, характерный для злокачественных опухолей повышенный уровень аденозина [9] считается ответственным за “ускользание” опухоли из-под иммунного надзора и является одним из факторов реализации так называемой аденозинергической иммуносупрессии [10], лежащей в основе парадокса Хеллстрома. Другими словами, описанные в литературе противоопухолевые эффекты метформина могли бы быть объяснены его стимулирующим влиянием на активность АДА.

Механизмы увеличения активности АДА предстоит ещё выяснить. Так, ранее было показано, что подобными метформину влияниями на активность АДА обладает и молочная кислота (лактат). В связи с этим следует отметить доказанную способность метформина стимулировать продукцию лактата [11]. В литературе обсуждаются и возможные механизмы такой стимуляции – метформин ингибирует один или несколько ферментов цепи транспорта электронов, тем самым, тормозит утилизацию в ЦТК конечных продуктов гликолиза – лактата и пирувата [12]. Следовательно, вполне логично допустить участие метформин-индуцированного накопления лактата в качестве посредника в механизмах стимуляции активности АДА.

Однако, представленные ниже результаты оценки уровня аденозина и метаболитов его дальнейшего распада – инозина и гипоксантина (рис. 2), позволяют считать сделанное предположение о механизмах противоопухолевого эффекта метформина лишь гипотетическим, нуждающимся в дополнительных доказательствах.

По нашим данным, обнаруженное под влиянием терапии метформином статистически значимое повышение в опухоли активности АДА практически никак не сказывается на содержании её субстрата – аденозина. Показатели его концентрации во всех изученных гомогенатах были несоизмеримо выше, чем в здоровых тканях (по данным [12]: порядка 0,0005-0,001 мкмоль/г ткани) и статистически значимо не отличались у больных сравниваемых групп: у пациенток, принимавших метформин – 0,226±0,148 мкмоль/г ткани, у больных контрольной группы – 0,186±0,056 мкмоль/г ткани ($p=0,401$).

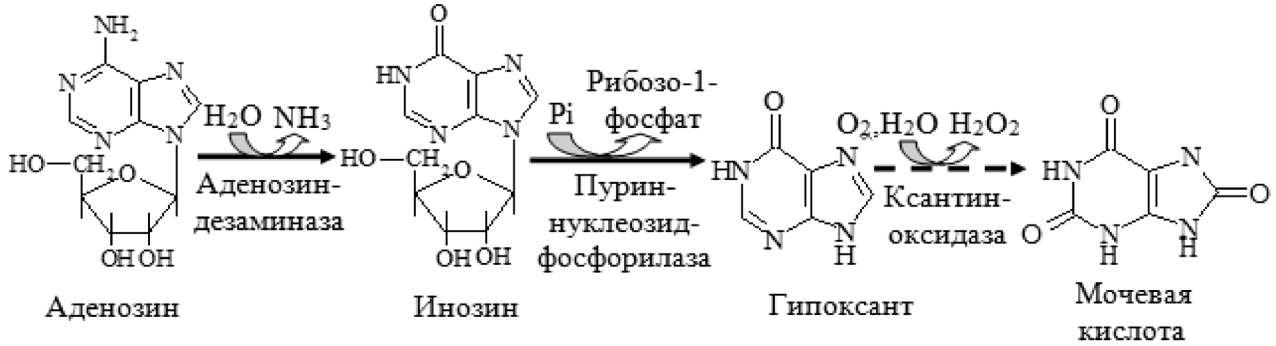

Рисунок 2. Схема распада пуриновых нуклеозидов.

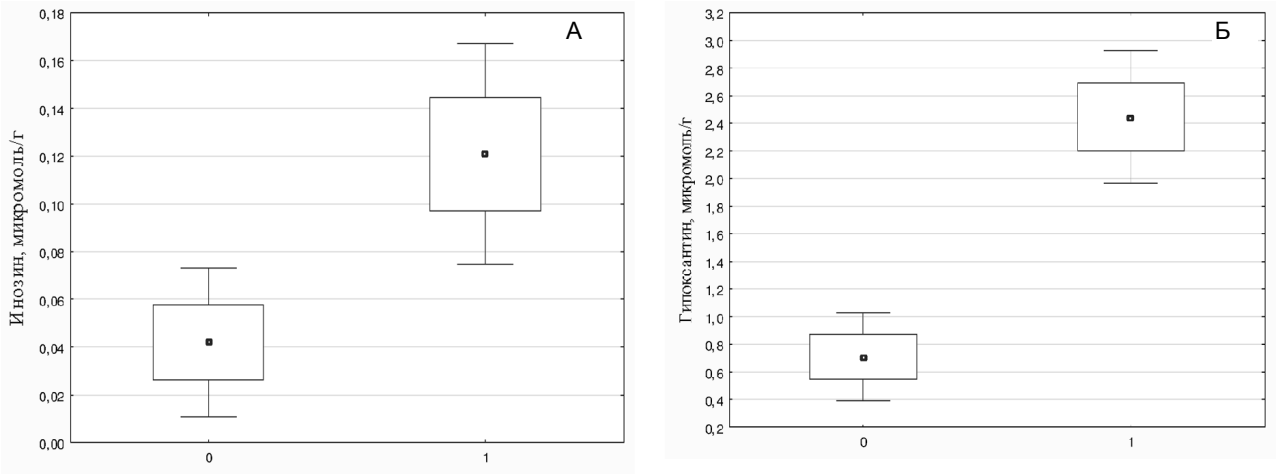

Рисунок 3. А: концентрация инозина в гомогенатах опухолевых тканей. Б: концентрация гипоксантина в гомогенатах опухолевых тканей.

Показанное отсутствие связи между активностью фермента и уровнем его субстрата позволяет допустить, что характерная для злокачественных клеток высокая продукция аденозина [9] является своего роста "гоместатической константой" опухолевого роста.

Помимо известного факта ускорения в злокачественных новообразованиях обмена (как катаболизма, так и анаболизма) пуриновых нуклеотидов [14], других причин такой стабилизации высокого уровня аденозина в опухолях пока не известно. Полученные нами данные указывают лишь, что только стимуляции активности АДА является явно недостаточно для снижения (нормализации) концентрации аденозина, а, следовательно, и для устранения феномена аденозинергической иммуносупрессии.

Вместе с тем, индуцированное метформином повышение активности АДА закономерно приводит к существенному, почти трёхкратному росту в гомогенатах опухолей продуктов аденозиндезаминазной реакции (рис. 3а).

У пациентов, принимавших метформин, средний уровень инозина в опухолях составляет 0,121±0,041 мкмоль/г ткани, что значительно превышает соответствующий показатель в контрольной группе – 0,042±0,015 мкмоль/г ткани ($p<0,001$). Примечательно, что применённая неоадъювантная терапия метформином практически нормализует уровень инозина – возвращает показатели его концентрации к значениям, характерным для здоровых, злокачественно нетрансформированных тканей – 168 мкмоль/л [13].

На фоне терапии метформином существенно (в 3,5 раза) возрастает и содержание другого изученного продукта катаболизма пуриновых нуклеозидов – гипоксантина (рис. 3б).

Среднее по этой группе пациентов значение его концентрации составило 2,45±0,43 мкмоль/г ткани, тогда как в контрольной группе – всего 0,711±0,269 мкмоль/г ткани. Различия между сравниваемыми группами достоверны при $p<0,001$.

В отличие от полученных данных по инозину, содержание которого в злокачественных опухолях оказывается ниже нормальных значений [13], концентрация гипоксантина даже в контрольной группе значительно превышает показатели, характерные тканям здоровой нелактирующей молочной железы – порядка 0,170-0,300 мкмоль/г ткани [13]. Дополнение же комплекса неоадъювантной терапии метформином ещё более увеличивает содержание гипоксантина. Причём, в абсолютных значениях его прирост существенно превышает отмеченные в этих же тканях изменения концентрации инозина. Такой дисбаланс в приросте двух промежуточных продуктов, последовательно образующихся в одном метаболическом пути, может быть объяснён ингибированием метформином ксантиноксидазы (КО) – фермента дальнейшего распада гипоксантина. Такой эффект метформина был описан в работах, посвященных изучению активности КО в сыворотке крови у больных сахарным диабетом II типа на фоне лечения сахароснижающими препаратами [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОД

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что длительный приём метформина существенно влияет на катаболизм пуриновых нуклеотидов в узле аденокарциномы молочной железы.

Показанного метформин-индуцированного повышения активности АДА недостаточно для снижения уровня аденозина в ткани опухолевого узла.

Интерпретация механизмов обнаруженного у принимавших метформин пациентов накопления в аденокарциноме инозина и гипоксантина требует проведения дополнительных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Inagaki K., Suzuki A., Nagata M., Sekiguchi S., Itoi T., Asano S., Hiroaki K., Hayakawa N., Oda N., Itoh M.* (2006) Nihon Naika Gakkai Zasshi., **95**, 2550-2552.
2. *Leone A., Di Gennaro E., Bruzzese F., Avallone A., Budillon A.* (2014) Cancer Treat. Res., **159**, 355-376.

3. *Miranda V.C., Barroso-Sousa R., Glasberg J., Riechelmann R.P.* (2014) Drugs Today (Barc.), **50**, 623-640.
4. *Gritti M., Wurth R., Angelini M., Barbieri F., Peretti M., Pizzi E., Pattarozzi A., Carra E., Sirito R., Daga A., Curmi P.M., Mazzanti M., FlorioT.* (2014) Oncotarget, **5**, 11252-11268.
5. *Choi Y.W., Choi Y.W., Lim I.K.* (2014) Cancer Lett., **346**, 300-308.
6. *Drahota Z., Palenickova E., Endlicher R., Milerova M., Brejchova J., Vosahlikova M., Svoboda P., Kazdova L., Kalous M., Cervinkova Z., Cahova M.* (2014) Physiol Res., **63**, 1-11.
7. *Pulito C., Donzelli S., Muti P., Puzzo L., Strano S., Blandino G* (2014) Ann. Transl. Med., **2**, 58.
8. *Saisho Y.* (2015) Endocr. Metab Immune. Disord. Drug Targets., **15**, 196-205.
9. *Lukashev D., Sitkovsky M., Ohta A.* (2007) Purinergic. Signal., **3**, 129-134.
10. *Ohta A., Gorelik E., Prasad S.J.* (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103**, 13132-13137.
11. *Hanatani T., Sai K., Tohkin M., Segawa K., Saito Y.* (2015) Int. J. Clin. Pharm., **37**, 537-545.
12. *Traut T.W.* (1994) Mol. Cell. Biochem., **140**, 1-22.
13. *Шатова О.П., Борзенко Б.Г., Зинкович И.И., Седаков И.Е.* (2009) Укр. мед. журнал, **81**, 88-93.
14. *Cosic V., Antic S., Pesic M., Jovanovic O., Kundalic S., Djordjevic V.B.* (2001) Clin. Chem. Lab Med., **39**, 818-821.

Поступила: 30. 06. 2015.
Принята к печати: 01. 02. 2016.

METFORMIN IMPACT ON PURINE METABOLISM IN BREAST CANCER

O.P. Shatova, Eu.V. Butenko, Eu.V. Khomutov, D.S. Kaplun, I.Eu. Sedakov, I.I. Zinkovych

[1]Gorky Donetsk National Medical University,
16 Illicha av., Donetsk, 83003 Ukraine; tel.: +380666045644; e-mail: shatova.op@gmail.com

Large-scale epidemiological and clinical studies have demonstrated the efficacy of metformin in oncology practice. However, the mechanisms of implementation of the anti-tumor effect of this drug there is still need understanding. In this study we have investigated the effect of metformin on the activity of adenosine deaminase and respectively adenosinergic immunosuppression in tumors and their microenvironment. The material of the study was taken during surgery of breast cacer patients receiveing metformin, and also patients which did not take this drug. The adenosine deaminase activity and substrate (adenosine) and products (inosine, hypoxanthine) concentrations were determined by HPLC. Results of this study suggest that metformin significantly alters catabolism of purine nucleotides in the node breast adenocarcinoma tisue. However, the metformin-induced increase in the adenosine deaminase activity is not sufficient to reduce the level of adenosine in cancer tissue. Thus, in metformin treated patients the adenosine concentration remained unchanged, and inosine and hypoxanthine concentration significantly increased.

Key words: metformin, breast cancer, adenosine deaminase, adenosine, inosine, hypoxanthine