

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urša KEŠAR

**VPLIV IZBRANIH DEJAVNIKOV NA
PROTITUMORNO DELOVANJE METFORMINA V
CELIČNI KULTURI RAKAVIH CELIC**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urša KEŠAR

**VPLIV IZBRANIH DEJAVNIKOV NA PROTITUMORNO
DELOVANJE METFORMINA V CELIČNI KULTURI RAKAVIH
CELIC**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE EFFECT OF SELECTED FACTORS ON ANTICANCER
ACTION OF METFORMIN IN CULTURED CANCER CELLS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v laboratoriju Skupine za nano in biotehnološke aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani ter v Laboratoriju za molekularno nevrobiologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Sergeja Pirkmajerja, dr. med. in za somentorico doc. dr. Mojco Pavlin. Za recenzentko je bila imenovana prof. dr. Tanja Kunej.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mojca Narat
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Sergej Pirkmajer, dr. med.
 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Laboratorij za molekularno nevrobiologijo

Član: doc. dr. Mojca Pavlin, univ. dipl. fiz.
 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biofiziko, Skupina za nano in biotehnološke aplikacije

Član: prof. dr. Tanja Kunej
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo

Datum zagovora: 13. 10. 2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Urša Kešar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:616-006(043.2)
KG	Rak dojke/sladkorna bolezen tipa 2/celice raka dojke MDA-MB-231/metformin/2-deoksi-D-glukoza/inzulin/normoksija/hipoksija
AV	KEŠAR, Urša, univ. dipl. biotehnol.
SA	PIRKMAJER, Sergej (mentor)/PAVLIN, Mojca (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	VPLIV IZBRANIH DEJAVNIKOV NA PROTITUMORNO DELOVANJE METFORMINA V CELIČNI KULTURI RAKAVIH CELIC
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	IX, 64 str., 7 pregl., 16 sl., 116 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Rak dojke je najpogostejša oblika raka pri ženskah iz zahodnih držav in je vodilni vzrok prezgodnje smrti mlajših žensk v razvitih državah. Nastanek raka dojke je povezan z motnjami presnove, še zlasti debelostjo in sladkorno boleznično tipa 2. Raziskave so pokazale, da pogosto uporabljeno antidiabetično zdravilo metformin verjetno zmanjuje rast celic raka dojke in izboljšuje prognozo bolnikov. Učinke metformina smo preučevali v kulturi celic MDA-MB-231, ki so <i>in vitro</i> model za trojno negativni tip raka dojke, ki je eden izmed najbolj agresivnih in invazivnih tipov raka dojke. V raziskovalnem delu smo se osredotočili na tri ključne dejavnike: 1) koncentracijo glukoze v gojišču, 2) koncentracijo inzulina v gojišču in 3) koncentracijo kisika v atmosferi. Število preživelih celic smo ovrednotili s testom MTS in testom Hoechst. Za statistično analizo smo uporabili eno- ali dvosmerni test ANOVA in ustrezne post hoc teste. Ugotovili smo, da je nizka koncentracija glukoze povečala občutljivost celic MDA-MB-231 na metformin, prav tako je imela enak učinek 2-deoksi-D-glukoza. Inzulin je povečal število celic po 72-urni inkubaciji, metformin pa je preprečil z inzulinom spodbujeno povečanje števila celic MDA-MB-231. Hipoksija ni zmanjšala učinka metformina na preživetje celic. Z raziskavo smo ugotovili, da imajo razmere v mikrookolju, še zlasti koncentracija glukoze, pomemben vpliv na protitumorno delovanje metformina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 606:616-006(043.2)
CX Breast cancer/type 2 diabetes/ breast cancer cells MDA-MB-231/metformin/2-deoxy-D-glucose/insulin/normoxia/hypoxia
AU KEŠAR, Urša
AA PIRKMAJER, Sergej (supervisor)/PAVLIN, Mojca (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2016
TI THE EFFECT OF SELECTED FACTORS ON ANTCANCER ACTION OF METFORMIN IN CULTURED CANCER CELL
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO IX, 64 p., 7 tab., 16 fig., 116 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Breast cancer is the commonest form of cancer in women and is the leading cause of premature death of younger women in developed countries. Breast cancer is linked to metabolic disorders, especially obesity and type 2 diabetes. Studies have shown that commonly used antidiabetic drug metformin probably decreases the risk of developing breast cancer and improves survival in patients with breast cancer. We examined the effects of metformin in cell culture of MDA-MB-231 cells, which are an *in vitro* model for triple negative breast cancer, one of the most aggressive and invasive breast cancer types. We have focused on three key factors: 1) glucose concentration in medium, 2) insulin concentration in medium, 3) oxygen concentration in the atmosphere. We examined the effects of metformin in cell culture of MDA-MB-231 cells, which are an *in vitro* model for triple negative breast cancer, one of the most aggressive and invasive breast cancer types. The survival of cancer cells was evaluated with MTS test and Hoechst staining. One- or two-way ANOVA and suitable post hoc tests were used for statistical analysis. We showed that low concentration of glucose and inhibition of glycolysis with 2-deoxy-D-glucose increases sensitivity of MDA-MB-231 cells to metformin. After 72 h incubation insulin increased the number of cancer cells, whereas metformin inhibited insulin-stimulated increase in number of MDA-MB-231 cells. Hypoxia did not decrease the effect of metformin on survival of MDA-MB-231 cells. We showed that conditions in microenvironment, especially glucose concentration, importantly affect the anticancer action of metformin.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI MAGISTRSKEGA DELA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 RAK DOJKE	4
2.1.1 Trojno negativni rak dojke in celična linija MDA-MB-231	4
2.1.2 Rak dojke in sladkorna bolezen tipa 2	5
2.2 SPREMEMBE V DELOVANJU PRESNOVE RAKAVIH CELIC.....	6
2.2.1 Warburgov efekt.....	6
2.2.2 Molekularni mehanizmi presnovnih sprememb v rakavih celicah.....	8
2.2.3 Presnovne spremembe pri celicah trojno negativnega raka dojke	10
2.3 METFORMIN IN 2-DEOKSI-D-GLUKOZA	11
2.3.1 Presnovni učinki metformina	11
2.3.2 Farmakološki mehanizmi delovanja metformina.....	11
2.3.3 Posredni in neposredni učinki metformina na rakave celice.....	13
2.3.4 Inhibicija glikolize z 2-deoksi-D-glukozo	14
2.4 RAZMERE V RAKASTEM TKIVU V PRIMERJAVI Z RAZMERAMI V KULTURI RAKAVIH CELIC	15
2.4.1 Pomen koncentracije glukoze	15
2.4.2 Pomen koncentracije inzulina	16
2.4.3 Pomen koncentracije kisika	17
2.4.4 Pomen koncentracije metformina	18
3 MATERIALI IN METODE	19

3.1 MATERIALI	19
 3.1.1 Kemikalije	19
 3.1.2 Laboratorijski material in oprema	19
3.2 METODE	20
 3.2.1 Celična linija MDA-MB-231.....	20
 3.2.2 Zasnova raziskave	21
 3.2.3 Določanje viabilnosti celic s testom MTS	22
 3.2.4 Določanje števila celic MDA-MB-231 z barvilom Hoechst 33342.....	23
3.2.4.1 Barvanje pritrjenih celic MDA-MB-231	24
3.2.4.2 Barvanje lizatov celic MDA-MB-231	24
 3.2.6 Potek poskusov v hipoksiji.....	25
 3.2.7 Statistična analiza rezultatov.....	25
4 REZULTATI.....	26
 4.1 VPLIV KONCENTRACIJE GLUKOZE NA PREŽIVETJE CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231 PRI TRETIRANJU Z METFORMINOM	26
 4.2 VPLIV 2-DEOKSI-D-GLUKOZE NA PREŽIVETJE CELIC RAKA DOJKE MDA- MB-231 PRI TRETIRANJU Z METFORMINOM	30
 4.3 VPLIV INZULINA NA DELITEV CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231	35
 4.4 VPLIV METFORMINA NA Z INZULINOM SPODBUJENO DELITEV CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231	37
 4.5 VPLIV HIPOKSIJE NA DELOVANJE METFORMINA V KULTURI CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231	39
5 RAZPRAVA.....	41
6 SKLEPI	49
7 POVZETEK (SUMMARY)	51
7.1 POVZETEK	51
7.2 SUMMARY	52
8 VIRI	53
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije in njihove koncentracije.....	19
Preglednica 2: Laboratorijska oprema.....	20
Preglednica 3: Tekoča gojišča, vsa so bila pripravljena v osnovnem gojišču RPMI-1640.	21
Preglednica 4: Shema izvedenih poskusov.....	22
Preglednica 5: Tekoče gojišče za test MTS, pripravljeno v osnovnem RPMI-1640.....	23
Preglednica 6: Pufer za določanje rasti pritrjenih celic.	24
Preglednica 7: Pufer za barvanje lizatov celic.....	24

KAZALO SLIK

Slika 1: Razlika med oksidativno fosforilacijo, anaerobno glikolizo in aerobno glikolizo (Warburgov efekt) (Vander Heiden in sod., 2009: 10).....	7
Slika 2: Molekularni mehanizmi, ki poganjajo Warburgov efekt (Cairns in sod., 2011: 88).	9
Slika 3: Dihalna veriga v mitohondriju. Metformin zavira kompleks I (Viollet in sod., 2012: 255).....	12
Slika 4: Domene tipične sesalske AMPK molekule (Hardie in sod., 2012: 253).....	13
Slika 5: Strukturna primerjava glukoze in 2-deoksiglukoze (Prijelogo po: Aft in sod., 2002: 806).....	15
Slika 6: Primer obarvanosti jamic pred merjenjem absorbance pri testu MTS.....	23
Slika 7: Vpliv metformina na presnovno aktivnost celic MDA-MB-231 v gojišču s 4,5 g/L glukoze (A), z 1 g/L glukoze (B) ter brez glukoze (0 g/L) (C)	27
Slika 8: Vpliv metformina na število celic MDA-MB-231 v gojišču s 4,5 g/L glukoze (A), z 1 g/L glukoze (B) in brez glukoze (0 g/L) (C).....	29
Slika 9: 2-DG poveča učinek metformina na celice MDA-MB-231 v gojišču z visoko (4,5 g/L) (A) in fiziološko (1 g/L) (B) koncentracijo glukoze.....	31
Slika 10: 2-DG poveča učinek metformina na celice MDA-MB-231 v gojišču z visoko (4,5 g/L) (A) in fiziološko (1 g/L) koncentracijo glukoze (B).....	33
Slika 11: Celice MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L).....	34
Slika 12: Inzulin vpliva na rast celic MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L).	36
Slika 13: Metformin zmanjša učinek inzulina na celice MDA-MB-231.....	38
Slika 14: Vpliv hipoksije na delovanje metformina in 2-DG na celice MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L)	39
Slika 15: Vpliv hipoksije na delovanje metformina in inzulina na celice MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L).	40
Slika 16: Grafičen povzetek raziskave: vpliv različnih dejavnikov na celice raka dojke MDA-MB-231.....	50

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-DG	2-deoksi-D-glukoza
AID	avto-inhibitorna domena
Akt	protein kinaza Akt ali protein kinaza B (PKB)
AMPK	z AMP-aktivirana protein kinaza
BRCA1/2	gen tipa 1/2 dovzetnosti za raka dojke
BSA	goveji serumski albumin
$\alpha/\beta/\gamma$ -CTD	karbokksi-terminalna domena podenote $\alpha/\beta/\gamma$
CBM	modul, na katerega se vežejo ogljikovi hidrati
CBS	motiv podoben cistationin- β -sintazi
ER	estrogenski receptor
FBS	fetalni goveji serum
GLUT	glukozni prenašalec
HER-2	receptor 2 za epidermalni rastni dejavnik
HIF	s hipoksijo inducirani dejavnik
HK2	heksokinaza 2
IGF	inzulinu podobni rastni dejavnik
IGF-1	inzulinu podobni rastni dejavnik-1
i.e.	mednarodne enote
LDH-A	laktat dehidrogenaza
LKB1	jetrna kinaza B1
MAPK	mitogen-aktivirana protein kinaza
MCT	monokarboksilatni prenašalec
metf.	metformin
mGPD	mitohondrijska glicerolfosfat dehidrogenaza
mTOR	tarča rapamicina pri sesalcih
mTORC1	mTOR kompleks 1
Myc	proto-onkogen Myc
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
OCT1	prenašalec organskih kationov 1
P _i	anorganski fosfat
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
p53	protein p53
PBS	fosfatni pufer v fiziološki raztopini
PDH	piruvat dehidrogenaza
PDK	piruvat dehidrogenazna kinaza
PKM2	piruvat kinaza M2
PMS	fenazin metosulfat
PR	progesteronski receptor
PTEN	fosfataza in tenzin homolog
rDNA	tehnologija rekombinantne DNA
SCO2	oksidazni kompleks citokroma c
TCA	cikel trikarboksilnih kislin (ali Krebsov cikel)
TIGAR	TP53-induciran glikolizni in apoptozni regulator
TNRD	trojno negativni rak dojke
VEGFA	vaskularni endotelni rastni dejavnik A

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Rak dojke in slatkorna bolezen tipa 2

Rak dojke sodi v skupino najpogostejših rakavih bolezni na svetu in je vodilni vzrok prezgodnje smrti mlajših žensk v razvitih državah (Tot, 2011). Na pojav raka dojke zelo vplivajo način življenja in izpostavljenost notranjim (hormonski, presnovni, genetski) in zunanjim okoljskim dejavnikom (Goodwin, 2008; Wahdan-Alaswad in sod., 2013). Hkrati se po svetu povečuje tudi pojavnost slatkorne bolezni tipa 2. Rak dojke se pogosteje pojavlja pri bolnicah s slatkorno boleznično tipa 2 (Sabatino in sod., 2014). Po dosedanjih raziskavah naj bi slatkorna bolezen tipa 2 povečevala tveganje za nastanek raka dojke ter negativno vplivala na njegovo prognozo (Stankowski-Drengler in sod., 2013).

Ker se pojavnost slatkorne bolezni tipa 2 povečuje, lahko pričakujemo, da bo naraščala tudi pojavnost raka dojke. V današnjem času se vse več ljudi srečuje s telesno neaktivnostjo in kroničnim presežkom energije, zato število ljudi s prekomerno telesno težo in debelostjo narašča. Telesna neaktivnost in debelost pa povečata tako možnost za nastanek raka dojke, kot slatkorne bolezni tipa 2 (Wahdan-Alaswad in sod., 2013). Rak dojke, telesna neaktivnost in slatkorna bolezen tipa 2 se zato pogosto pojavljajo skupaj. Pomembno je tudi, da debelost in slatkorna bolezen tipa 2 ne le povečata možnost za nastanek raka dojke, temveč tudi zmanjšuje preživetje bolnic, ki so zbolele za rakom dojke (Wahdan-Alaswad in sod., 2013; Peairs in sod., 2011).

Ker je nastanek raka dojke, kot kaže, vsaj delno povezan z motnjami v delovanju presnove, bi zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje slatkorne bolezni tipa 2, lahko preprečevala njegov nastanek (Stankowski-Drengler in sod., 2013). Morda pa bi lahko bila takšna zdravila celo uporabna za adjuvantno zdravljenje raka dojke (Cerullo in sod., 2016; El-Haggar in sod., 2016). Med temi zdravili je še posebej zanimiv metformin, ki se zelo pogosto uporablja za peroralno zdravljenje slatkorne bolezni tipa 2 (Zordoky in sod., 2014).

Podrobnejši mehanizmi, ki pospešujejo nastanek raka dojke, so zelo različni – povečano izražanje rastnih dejavnikov, vnetni citokini, steroidni hormoni, hranila, ki krožijo po telesu (vključujuč heksozne slatkorje) pa tudi slabše delovanje imunskega sistema in prisotnost kisika v tkivu (Goodwin in sod., 2009; Young in Anderson, 2008). Od presnovnih dejavnikov, ki povečujejo tveganje za nastanek raka dojke, je pomembno tudi povečanje koncentracije inzulina in inzulinu podobnih rastnih dejavnikov (IGF) (Wahdan-Alaswad in sod., 2013; Goodwin, 2008). Pomembno je, da redna telesna aktivnost zmanjšuje koncentracijo inzulina v krvi, kar zmanjša tveganje za nastanek raka dojke (Ligibel in sod., 2008).

Uporabnost metformina za preprečevanje in zdravljenje raka dojke

Dokazi, ki podpirajo uporabo metformina za preprečevanje in/ali zdravljenje raka dojke so epidemiološki in eksperimentalni. Epidemiološke študije nakazujejo, da imajo sladkorne bolnice, zdravljene z metforminom, manjšo stopnjo pojavnosti raka dojke in/ali manjšo smrtnost zaradi raka dojke (Grossmann in sod., 2015). Vse epidemiološke študije zaščitnega učinka metformina niso pokazale (Malek in sod., 2013), zato bodo potrebne dodatne raziskave, ki bodo opredelile, ali je zaščitni učinek metformina morda odvisen od tipa raka dojke. Eksperimentalne študije na kulturah celic raka dojke podpirajo protitumorno delovanje metformina (Franciosi in sod., 2013; Libby in sod., 2009; Noto in sod., 2012). Po dosedanjih raziskavah metformin namreč zavira deljenje in spodbuja apoptozo celic raka dojke v kulti (Zordoky in sod., 2014). Na protitumorno delovanje metformina kažejo tudi poskusi na živalih (Iliopoulos in sod., 2011), vendar pa mehanizem delovanja metformina še ni povsem razjasnjen, saj se zanimanje za njegove učinke na razvoj, zdravljenje in/ali napredek raka dojke, v zadnjih letih povečuje (Grossmann in sod., 2015).

Odprta vprašanja v zvezi s protitumornim delovanjem metformina

Trenutno sta odprtji dve temeljni vprašanji v zvezi z protitumornim delovanjem metformina, in sicer:

- (1) ali metformin zavira nastanek in razvoj raka dojke neposredno z delovanjem na rakave celice ali posredno prek ugodnih sistemskih učinkov na presnovo;
- (2) kakšne koncentracije metformina so potrebne, da se izrazijo njegovi protitumorni učinki?

Ad 1)

Ker je nastanek raka dojke tesno povezan s presnovnimi motnjami kot so debelost, inzulinska rezistenca in sladkorna bolezen tipa 2, bi metformin lahko zaviral nastanek in razvoj raka dojke tako, da izboljša sistemsko presnovo glukoze. Še posebej pomemben bi lahko bil učinek metformina na jetrno glukoneogenezo in inzulinsko rezistenco. Z metforminom povzročena upočasnitev glukoneogeneze in zmanjšanje inzulinske rezistence namreč vodita v znižanje koncentracij glukoze in inzulina v plazmi.

Ad 2)

Pri peroralnem zdravljenju dosežejo koncentracije metformina v plazmi vrednosti med 10 in 30 μM . Pri poskusih v celičnih kulturah pa se metformin običajno uporablja koncentracijah 1-20 mM. Ali je razlika v koncentraciji posledica razlik v bioloških lastnostih celic v kulti ali neustreznosti do sedaj uporabljenih eksperimentalnih pristopov, še ni jasno. Možen razlog za neenotne oziroma nasprotujoče si razlage v

literaturi so razmere v okolju, v katerem so pri preučevanju učinkov metformina gojili celice raka dojke.

1.2 CILJI MAGISTRSKEGA DELA

Namen magistrskega dela je bil raziskati, ali je delovanje metformina odvisno od razmer v katerih gojimo rakave celice. Pri tem smo se osredotočili na tri ključne dejavnike:

- koncentracijo glukoze v gojišču,
- koncentracijo inzulina v gojišču in
- koncentracijo kisika v atmosferi.

Na te dejavnike smo se osredotočili, ker pri večini raziskav *in vitro* protitumoratega delovanja metformina rakave celice gojijo v razmerah, ki precej odstopajo od tistih, v katerih se nahajajo rakave celice *in vivo*. V celičnih kulturah so glede na razmere *in vivo* še posebej velika odstopanja v koncentraciji glukoze, inzulina in drugih hormonov ter kisika. Rakave celice, ki se nahajajo v tumorski sredici so tako na primer izpostavljene precej nižjim koncentracijam glukoze in kisika, kot je to običajno pri gojenju celic v inkubatorju. Po drugi strani pa so lahko koncentracije inzulina v gojiščih za celične kulture tudi 10.000-krat višje kot v plazmi. Biološke lastnosti celic raka dojke so lahko v takšnih nefizioloških razmerah precej spremenjene, kar morda vpliva tudi na učinkovitost metformina pri zaviranju rasti teh celic. Če preučujemo celice raka dojke v razmerah, ki ne posnemajo razmer *in vivo*, se postavi tudi vprašanje, ali so rezultati takšnih študij primerni za ugotavljanje mehanizmov, ki so podlaga kliničnim učinkom metformina.

Cilje dela smo strnili v preučevanje petih hipotez:

1. Pri fiziološki koncentraciji glukoze metformin nima neposrednega učinka na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231.
2. Inhibicija glikolize z 2-deoksi-D-glukozo poveča občutljivost celic raka dojke MDA-MB-231 na metformin.
3. Visoke koncentracije inzulina spodbujajo delitev celic raka dojke MDA-MB-231.
4. Metformin zavira z inzulinom spodbujeno delitev celic raka dojke MDA-MB-231.
5. Hipoksija zmanjša učinek metformina na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK DOJKE

Rak dojke je najpogostejša oblika raka pri ženskah iz zahodnih držav in predstavlja 18 % vseh vrst rakov pri ženskah (Smith in Del Priore, 2009). Rak dojke je tudi v Sloveniji najpogostejši rak pri ženskah, saj se pojavi kot vsak peti nov primer raka pri ženskah (Rak v Sloveniji ..., 2015). Po podatkih Registra raka za Slovenijo je v letu 2012 zbolelo 1296 žensk in 15 moških. Največ primerov izhaja iz Osrednjeslovenske regije (424 žensk in 3 moški), najbolj pogosto pa se pojavlja pri starosti 50 do 70 let (Rak v Sloveniji ..., 2015). Zaradi raka dojke umre v Evropski uniji vsako leto 87.000 žensk, v Sloveniji pa okoli 400 (Europa ..., 2016). Rak dojke je manj pogost v Aziji in Afriki (Smith in Del Priore, 2009), kar pomeni, da so za njegov razvoj poleg genetskih dejavnikov pomembni tudi okoljski dejavniki.

Rak dojke je heterogena bolezen s širokim spektrom morfoloških podtipov in razponom kliničnih obnašanj (Smart in sod., 2011). Na njegov pojav vplivajo pridobljene spremembe v DNA, nekatere mutacije pa se lahko podedujejo iz zarodnih celic in so tako prisotne v vsaki celici v telesu, s tem pa povečujejo posameznikovo dovzetnost za to bolezen (Smart in sod., 2011). Tudi prisotnost genov *BRCA1* in *BRCA2* poveča možnosti za raka dojke (Fabbri in sod., 2008). Poleg genskih, na pojav te bolezni vplivajo tudi okoljski dejavniki (sevanje, alkohol) in dejavniki, kot so npr. zgodnji pojav menstruacije, pozna menopavza, debelost, peroralna kontracepcija in pozna prva nosečnost. Večje tveganje imajo tudi ženske, ki niso bile nikoli noseče oziroma so brez otrok (Fabbri in sod., 2008).

2.1.1 Trojno negativni rak dojke in celična linija MDA-MB-231

Rak dojke klasificiramo glede izražanje estrogenih receptorjev (ER), progesteronskih receptorjev (PR) in receptorja 2 za epidermalni rastni dejavnik (HER-2) (Tate in sod., 2012). Za celice trojno negativnega raka dojke, ki predstavlja 15 % vseh primerov raka dojke, je značilno, da ne izražajo nobenega od naštetih receptorjev (Anders in sod., 2013; Zordoky in sod., 2014). Trojno negativni rak dojke je pogostejši pri ženskah z debelostjo ali sladkorno boleznijo tipa 2 (Liu in sod., 2009; Wolf in sod., 2006). Prav tako je pogostejši pri mlajših ženskah, pri ženskah, ki nosijo mutacije v genu *BRCA1*, pri tistih z družinsko anamnezo raka dojke (Yang in sod., 2007) in pri ženskah iz nekaterih etničnih skupin (afroameriška in špansko govoreča) (Bauer in sod., 2007; Engebraaten in sod., 2013).

Ker so trojno negativne celice raka dojke slabo odzivne na zdravljenje in ker so zelo nagnjene k metastaziranju, predstavlja ta oblika raka velik izziv za zdravljenje (Griffiths in Olin, 2012).

Celice MDA-MB-231 so eden najbolj pogosto uporabljenih modelov *in vitro* za preučevanje trojno negativnega raka dojke (Gest in sod., 2013). Celice MDA-MB-231 so metastatske celice adenokarcinoma dojke, ki so jih izolirali iz plevralnega izliva belopolte bolnice (MDA-MB-231 ..., 2016). Zanje je značilna mutacija antionkogena (tumor-supresorskega gena) p53, vsaj nekaterim sevom MDA-MB-231 celic pa manjka tudi jetrna kinaza B1 (LKB1), zaradi česar so še bolj odporne na zdravljenje (Zhou in sod., 2009).

2.1.2 Rak dojke in sladkorna bolezen tipa 2

Sladkorna bolezen tipa 2 poveča tveganje za nastanek raka dojke in poslabšano prognozo pri bolnicah, ki so že zbolele za rakom dojke (Stankowski-Drengler in sod., 2013). Sladkorna bolezen je v letu 2013 prizadela skoraj 382 milijonov prebivalcev sveta (Prevalence of ..., 2013), od tega jih približno 56 milijonov živi v evropski regiji (Tamayo in sod., 2014). Po podatkih Zveze društev diabetikov Slovenije je v Sloveniji že več kot 130.000 bolnikov s sladkorno boleznijo (Miklavčič, 2016), po podatkih Mednarodnega združenja za sladkorno bolezen pa je najpogostejša starost okoli 60 let (Slovenia, 2015). Od tega ima sladkorno bolezen tipa 2 približno 90 do 95 % vseh, ki imajo sladkorno bolezen (Sladkorna ..., 2015). Sladkorna bolezen tipa 2 se pojavlja pri 16 % žensk z rakom dojke (Ahmadieh in Azar, 2013).

Hiperinzulinemija, ki je značilna za sladkorno bolezen tipa 2 (razen poznega stadija bolezni), poveča tveganja za nastanek raka dojke (Stankowski-Drengler in sod., 2013). Inzulin je glavni anabolni hormon, ki ima ključno vlogo pri uravnavanju presnove ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin (Wilcox, 2005). Po drugi strani pa inzulin in inzulinu podobni rastni dejavniki (IGF) delujejo tudi kot rastni dejavniki (Pollak, 2008). Povišana koncentracija inzulina med drugim poveča sintezo ter aktivnost estrogenskih receptorjev, kar spodbuja prekomerno rast tkiva dojk (Stankowski-Drengler in sod., 2013). Čeprav ima zvišana koncentracija inzulina pomembno vlogo pri nastanku raka dojke, so pomembni tudi drugi dejavniki tveganja, predvsem oksidativni stres in vnetje (Stankowski-Drengler in sod., 2013). Ker signalne poti, vključene v celično rast, poganjajo tudi prevzem hranil v celice ter uravnavajo encime v glikolizi, to pomeni, da imajo hormonske spremembe pomemben posreden vpliv tudi na presnovo rakavih celic (Wellen in Thompson, 2010). Pri tem je predvsem pomembno hormonsko mikrookolje, ki obdaja samo tkivo dojk, saj lahko vpliva na razvoj raka (Yaghjyan in Colditz, 2011). Hiperglikemija, ki je prav tako povezana z večjim tveganjem za nastanek raka, pa se je izkazala kot manj pomembna pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, saj se tveganje za nastanek raka pri njih ne zmanjša, kljub izboljšanemu nadzoru nad glikemijo (Johnson in Bowker, 2011).

2.2 SPREMEMBE V DELOVANJU PRESNOVE RAKAVIH CELIC

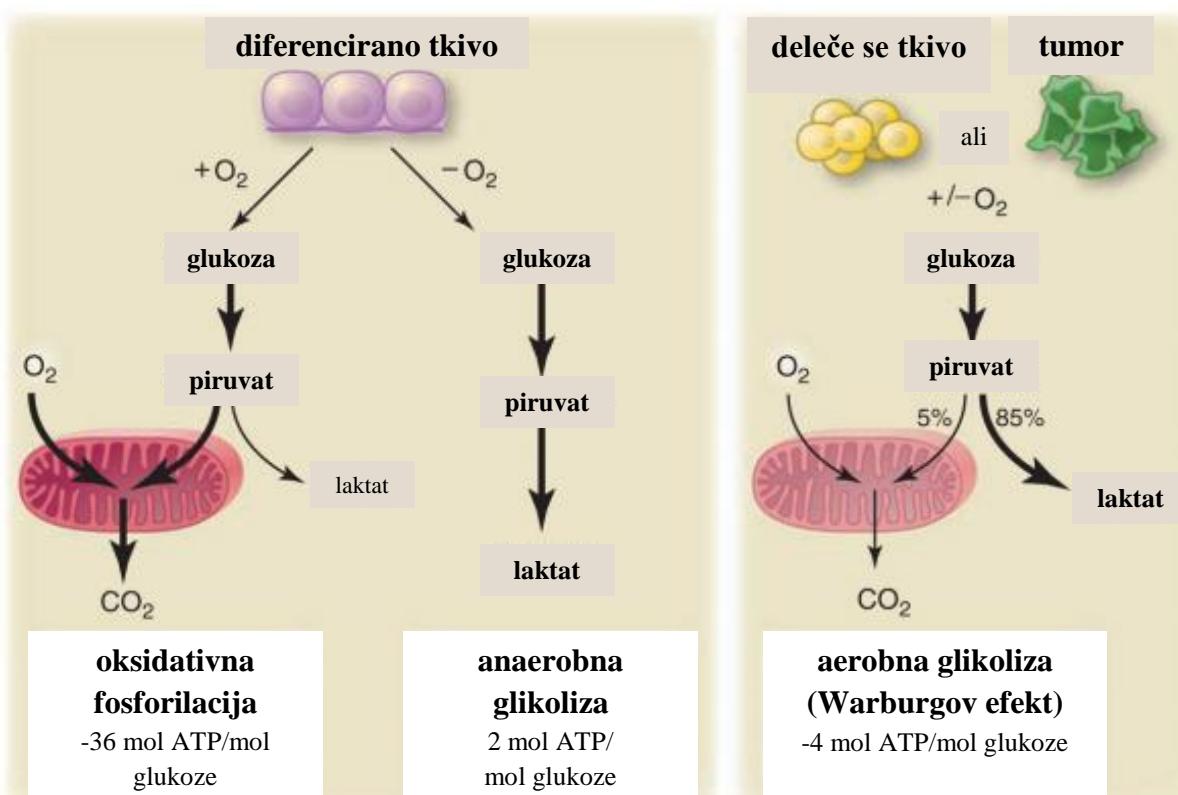
Rakave celice reprogramirajo svoje presnovne poti, da se izognejo pomembnim celičnim kontrolnim točkam, ki bi normalno zaustavile celično rast v neugodnih razmerah, ki so značilne prav za mikrookolje tumorjev (Cairns in sod., 2011). Poleg tega presnovne spremembe neposredno podpirajo rast in delitev rakavih celic. Presnovne spremembe so potrebne, ker imajo celice, ki se delijo, drugačne presnovne potrebe kot diferencirane celice. Za podpiranje visoke stopnje delitev, rakave celice privzamejo dodatna hranila (Wahdan-Alaswad in sod., 2013), ki jih le delno porabijo za sintezo ATP. Velik del privzetih hranil namreč preusmerijo v sintezo makromolekul, kot so lipidi in beljakovine (Vander Heiden, 2011), kar omogoča nastajanje novih rakavih celic in s tem rast tumorja. Kljub skupnim značilnostim pa presnovne spremembe pri različnih tipih raka niso povsem enoznačne. Celo znotraj posameznega tumorja se nahajajo celice, ki se po presnovnih značilnostih med seboj precej razlikujejo. Na splošno lahko rečemo, da so presnovne spremembe rakavih celic odvisne tako od kombinacije mutacij, ki prizadenejo onkogene, antionkogene (tumorske supresorje) in presnovne encime, kot tudi od razmer (koncentracije hranil, hormonov, rastnih dejavnikov in kisika) v mikrookolju rakavih celic (Jones in Thompson, 2009).

2.2.1 Warburgov efekt

Pomembna značilnost večine rakavih celic je, da tudi ob prisotnosti kisika uporabljajo glikolizo kot glavno sintezno pot; ta presnovni pojav imenujemo Warburgov efekt (Otto, 2016). Zgodi se preskok iz produkcije ATP z oksidativno fosforilacijo v mitohondrijih, v produkcijo ATP z glikolizo tudi pri normalnih koncentracijah kisika (Slika 1) (Cairns in sod., 2011; Vander Heiden, 2011). Za razliko od ostalih celic, rakave celice tako pridobivajo energijo z glikolizo in pretvarjanjem glukoze v laktat (Cairns in sod., 2011) z encimom laktat dehidrogenaza (LDH-A) (Zheng, 2012). Nastali laktat se ne oksidira kot v običajnih razmerah, temveč se izloči iz rakavih celic v zunajcelični prostor (Jones in Thompson, 2009). Ko iz piruvata nastane laktat, LDH-A obnovi NAD⁺, ki je potreben za vzdrževanje glikolize (Jones in Thompson, 2009; Fantin in sod., 2006).

Sinteza ATP z oksidativno fosforilacijo je bolj učinkovita od glikolize; iz 1 mol glukoze pri oksidativni fosforilaciji nastane 36 mol ATP, pri glikolizi pa le 2-3 mol ATP (Zheng, 2012). Glikoliza pa ima kar nekaj prednosti za rakave celice. Prva je ta, da je hitrost nastajanja ATP večja kot pri oksidativni fosforilaciji (Cairns in sod., 2011). Druga je ta, da omogoča nastajanje ATP tudi v hipoksični sredici tumorja. Tretja, in verjetno najpomembnejša prednost, pa je ta, da pri glikolizi nastajajo substrati, ki jih rakave celice lahko uporabijo za sintezo makromolekul (Cairns in sod., 2011; Wahdan-Alaswad in sod., 2013). Še posebej pomembna je sinteza maščobnih kislin *de novo*, ki gradijo membrane pri celični rasti ter imajo pomembno vlogo pri signaliziranju v celicah (Vander Heiden, 2011).

Pri popolni oksidaciji glukoze nastaneta ogljikov dioksid in voda, ki jih rakave celice ne morejo več uporabiti za biosintetske procese. Povečan privzem glukoze in pospešitev glikolize tako rakavim celicam omogoča, da zadostijo povečanim potrebam po energiji, biosintezi in redoks potencialu, kar je tudi biosintetska prednost rakavih celic, saj omogoča efektivno kroženje ogljika med biosintezo (Cairns in sod., 2011).



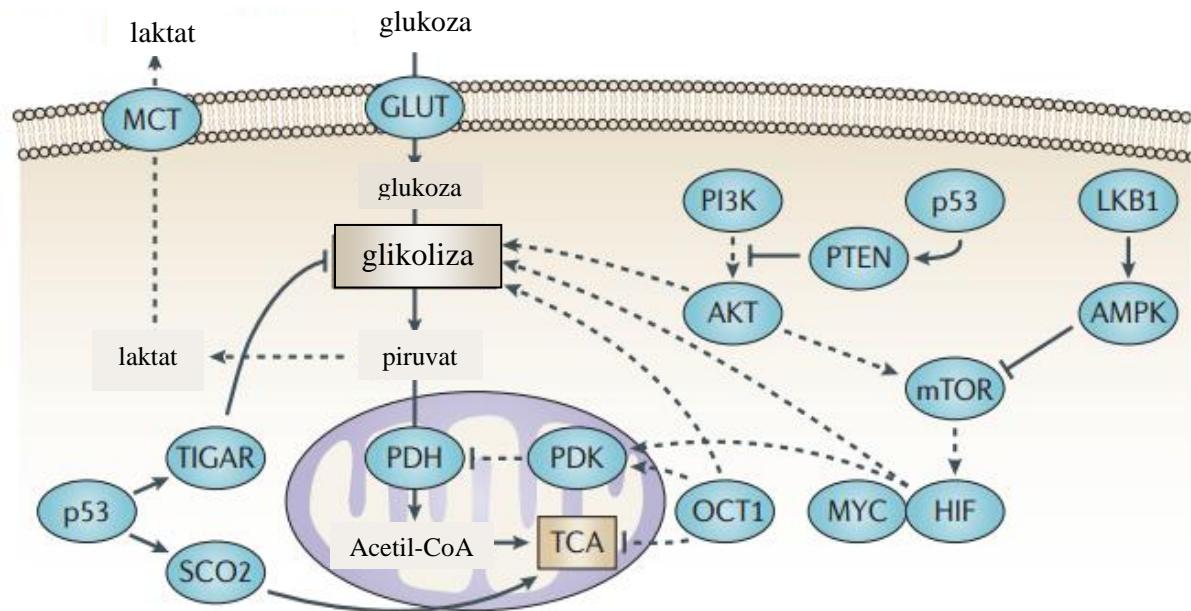
Slika 1: Razlika med oksidativno fosforilacijo, anaerobno glikolizo in aerobno glikolizo (Warburgov efekt) (Vander Heiden in sod., 2009: 10).

Pri diferenciranem tkivu se ob prisotnosti kisika glukoza z glikolizo pretvarja v piruvat, ki se nato v mitohondriju v oksidativni fosforilaciji popolno oksidira do končnega ogljikovega dioksida. Prisotnost kisika je pri tem procesu ključna, saj je kisik končni sprejemnik elektronov. Ko kisika primanjkuje, celice piruvat, ki nastane v glikolizi, pretvorijo v laktat (anaerobna glikoliza). Takšen nastanek laktata med anaerobno glikolizo dopušča, da se glikoliza nadaljuje (z regeneracijo NADH nazaj v NAD⁺), vendar je proizvodnja ATP v primerjavi z oksidativno fosforilacijo precej manjša. Warburg je opazil, da so rakave celice nagnjene k temu, da pretvorijo večino glukoze v laktat, ne glede na to, ali je kisik prisoten (aerobna glikoliza). Ta lastnost pa je skupna z normalnim delečim se tkivom. Mitohondriji ostanejo funkcionalni in tudi nekaj oksidativne fosforilacije še poteka, tako v rakavih celicah, kot normalnih delečih se celicah. Približno 85 % glukoze se tako presnovi do laktata in 5 % do ogljikovega dioksida in vode. Preostalih 10 % glukoze pa se v glikolitični poti le delno presnovi. Pri tem nastali vmesni produkti se preusmerijo v različne biosintetske poti (na sliki ni prikazano) (Vander Heiden in sod., 2009).

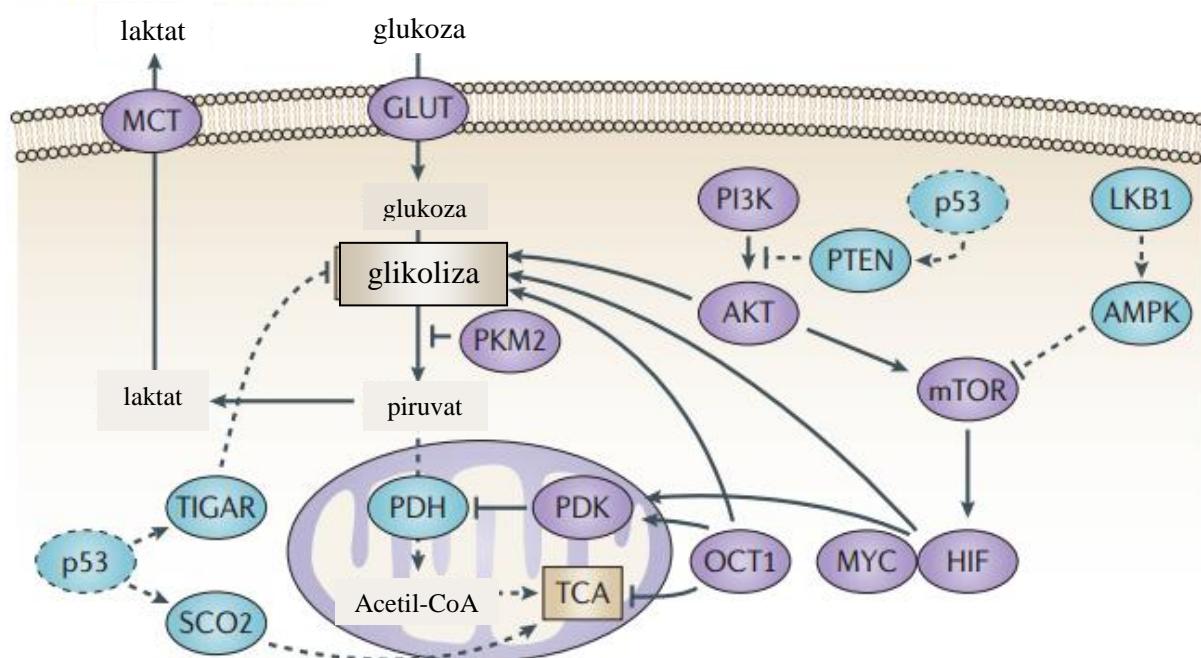
2.2.2 Molekularni mehanizmi presnovnih sprememb v rakavih celicah

Pri raku dojke je pogosto čezmerno aktivna signalna pot fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)/Akt/mTOR (Slika 2) (Ellis in Perou, 2013). Ta zelo pomembna signalna pot uravnava delitev, preživetje, presnovo in gibanje celic (Lee in sod., 2015). Akt je serin/treonin protein kinaza, ki vpliva na celično presnovo, rast in deljenje celic s fosforilacijo in spremembo aktivnosti različnih celičnih substratov, kot sta glikogen sintaza kinaza 3 in mTOR (El-Masry in sod., 2015; Lawlor in Alessi, 2001). Kinaza Akt, ki jo prek PI3K aktivirajo inzulin in drugi rastni dejavniki, vodi v aktivacijo mTOR (Calleja in sod., 2007; El-Masry in sod., 2015). mTOR signalna pot, ki je odzivna na koncentracijo rastnih dejavnikov in hranil, je pomembna pri celični rasti in deljenju (Malaguti in sod., 2013). Poenostavljeno povedano, signalna pot prek mTOR deluje tako, da spodbudi sintezo beljakovin in celično delitev, kadar imajo celice na voljo dovolj rastnih dejavnikov in hranil, kot so aminokisline (Malaguti in sod., 2013). Kadar rastnih dejavnikov ali aminokislin primanjkuje pa se njena aktivnost zmanjša, kar ustavi rast in delitev celic. Podobno se zgodi, kadar celicam primanjkuje energije; v teh razmerah se aktivira AMPK, ki nato zavre delovanje mTOR (Sorokin in sod., 2016).

a Normalna celica v mirovanju



b Rakava celica v fazi deljenja



Slika 2: Molekularni mehanizmi, ki poganjajo Warburgov efekt (Cairns in sod., 2011: 88).

Slika prikazuje normalno celico v mirujočem stanju (a) in preklop v aerobno glikolizo pri rakavih celicah (b). Ta preklop vodi več onkogenih signalnih poti (Cairns in sod., 2011). PI3K aktivira Akt, ki potem stimulira glikolizo z direktnim uravnavanjem glikoliznih encimov in aktivacijo mTOR (Cairns in sod., 2011). Ključen regulacijski efektor zmanjševanja fosfatidilinozitol 3-kinazne (PI3K)-Akt signalne poti, je tarča rapamicinskega kompleksa 1 pri sesalcih (mTORC1) se nadaljuje

nadaljevanje slike 2

(Cheong in sod., 2011). Aktivnost mTORC1 je odvisna od energijskega stanja v celici, saj regulira in spodbuja celično deljenje, sintezo proteinov ter rast in preživetje večine rakavih celic, kar zahteva veliko energije (Cheong in sod., 2011). Tako tumorski zaviralec jetrna kinaza B1 (LKB1) preko aktivacije z AMP aktivirane protein kinaze (AMPK), ki je ključni celični energijski senzor, s fosforilacijo inhibira mTORC1 (Cheong in sod., 2011; Cairns in sod., 2011). Poleg naštetih dejavnikov pa je pri rakavih celicah tudi zelo pomemben element prepisovalni dejavnik in tumorski zaviralec p53. Le-ta je znan po svojih funkcijah pri odzivu na poškodbe DNA ter apoptozi, sodeluje pa tudi pri uravnavanju presnove (Cairns in sod., 2011). Poleg aktivacije izražanja encima heksokinaze 2 (HK2), ki spremeni glukozo v glukozo-6-fosfat, inhibira tudi glikolizno pot s povečanjem izražanja TP53-induciranega glikoliznega in apoptoznega regulatorja (TIGAR) – encimom, ki zniža raven glikoliznega aktivatorja fruktoze-2,6-bifosfata, torej zavira glikolizo (Bensaad in sod., 2006; Cairns in sod., 2011). p53 povečuje tudi mitohondrijsko presnovo (oksidativno fosforilacijo) z aktivacijo proteina SCO2 (ki je potreben za združevanje oksidatznega kompleksa citokroma c na elektronski transportni verigi) in podpira izražanje PTEN (ki inhibira pot PI3K, torej zavira glikolizo) (Matoba in sod., 2006; Cairns in sod., 2011). HIF, s hipoksijo inducirani dejavnik (prepisovanje v primeru hipoksije; poveča izražanje glukoznih transporterjev); MYC, proto-onkogen (ob odsotnosti p53 povečuje tumorigenezo); OCT1, prepisovalni dejavnik (povečano izražanje pri raku); TCA, Krebsov cikel; PDK, piruvat dehidrogenaza kinaza (blokira vstop piruvata v Krebsov cikel); PDH, piruvat dehidrogenaza; PKM2, piruvat kinaza M2 (upočasni reakciji piruvat kinaze; razdeli substrate v alternativne biosintetske poti); MCT, monokarboksilatni prenosalec; črtkane linije na sliki prikazujejo izgubo funkcije prepisovalnega dejavnika p53, ki je mutiran tudi pri celicah MDA-MB-231 (Cairns in sod., 2011; Zhou in sod., 2009).

2.2.3 Presnovne spremembe pri celicah trojno negativnega raka dojke

Celice trojno negativnega raka dojke imajo mutacije, ki povzročijo okvaro mitohondrijev in spremembe v delovanju energijske presnove, zaradi česar so tudi v normoksičnih razmerah bolj odvisne od glikolize, v primerjavi z drugimi podtipi celic raka dojke (Pelicano in sod., 2014). Upočasnitev celičnega dihanja v celicah trojno negativnega raka dojke, je povezana z zmanjšanim izražanjem komponent kompleksov I in III ter s povečanim izražanjem prenosalcev za glukozo (GLUT1/4) in heksokinaze 2 (HK2). Kot smo že omenili, je za te celice značilna tudi aktivacija kinaze Akt, kar še dodatno spodbuja glikolizo (Pelicano in sod., 2014). Zaradi zmanjšane oksidativne fosforilacije so trojno negativne celice raka dojke močno odvisne od glikolize; to pa jih naredi tudi bolj občutljive na inhibitorje glikolize, kot je na primer 2-deoksi-D-glukoza (2-DG) (Pelicano in sod., 2014).

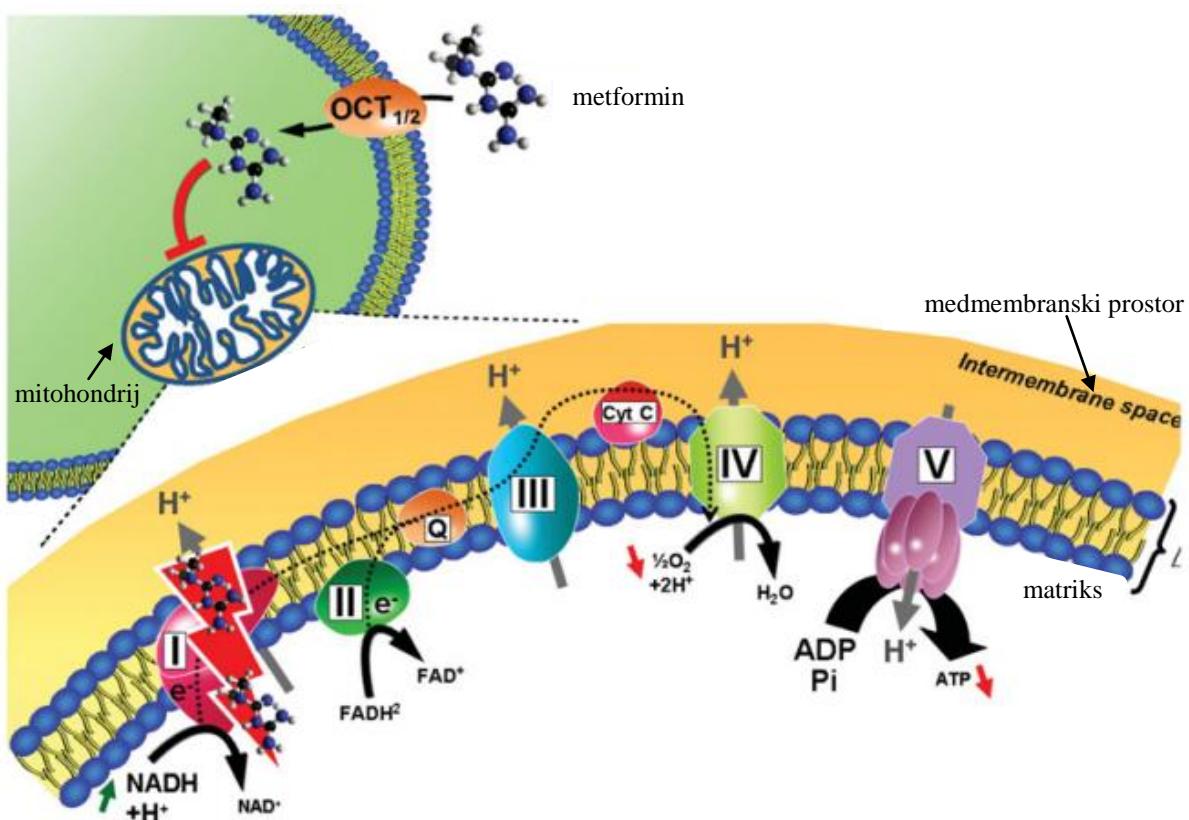
2.3 METFORMIN IN 2-DEOKSI-D-GLUKOZA

2.3.1 Presnovni učinki metformina

Metformin (1,1-dimetil bigvanid) je eno izmed najbolj pogosto predpisanih zdravil za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 (Vander Heiden, 2011; Liu in sod., 2009). Metformin zmanjšuje glukoneogenezo v jetrih, s čimer pomaga uravnavati koncentracijo glukoze v krvi (Stankowski-Drengler in sod., 2013). S spremembo v presnovi glukoze in maščobnih kislin tako izboljša izrabo glukoze, poveča občutljivost na inzulin, zmanjša izrabo prostih maščobnih kislin in spremeni profil serumskih lipidov (Liu in sod., 2009). Na splošno je znan kot ne-toksična spojina s široko terapevtsko uporabnostjo. Čeprav znižuje koncentracijo glukoze v krvi, le redko povzroči klinično pomembno hipoglikemijo (Viollet in sod., 2012). Med zelo resnimi, vendar redkimi, neželenimi učinki metformina pa je laktacidoza (Liu in sod., 2009).

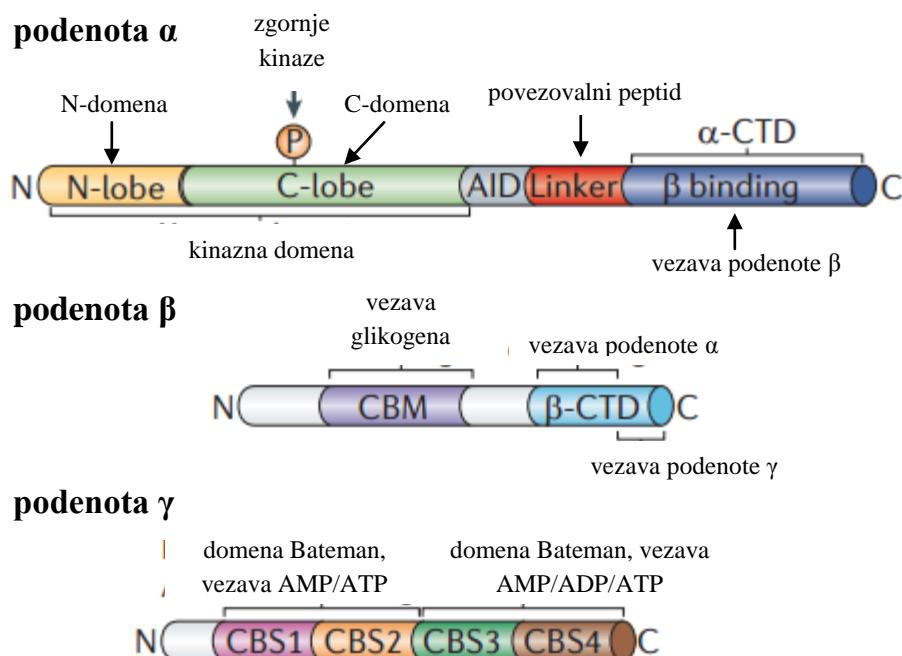
2.3.2 Farmakološki mehanizmi delovanja metformina

Metformin ima več pomembnih farmakoloških tarč. Po klasični razlagi metformin zavira kompleks I dihalne verige (NADH dehidrogenaza) (Slika 3). S tem upočasni sintezo ATP v mitohondriih in povzroči energijski stres v celici (Stephennet al., 2011; Vander Heiden, 2011; Wheaton et al., 2014). Energijski stres se pokaže z zmanjšanjem koncentracije ATP in povečanjem koncentracije AMP v citosolu (Stephennet al., 2011). Povečanje razmerja AMP/ATP sproži aktivacijo z AMP aktivirane protein-kinaze (AMPK) (Hardie et al., 2012). AMPK je filogenetsko dobro ohranjena serin/treonin protein kinaza. Deluje kot energijski senzor, ki ob pomanjkanju energije v celici sproži katabolne procese, pri katerih ATP nastaja, in zavre anabolne procese, ki ATP porabljajo (Viollet et al., 2012; Carling, 2004). Prav to pa predstavlja ključno vlogo pri varovanju celičnih funkcij ob pomanjkanju energije (Viollet et al., 2012). Kinazni kompleks AMPK je v sesalskih celicah v obliki heterotrimera in je sestavljen iz katalitične podenote α ter uravnavajočih podenot β in γ (Slika 4) (Liang et al., 2013). Pri pomanjkanju energije se AMPK aktivira alosterično ali kovalentno. Alosterična aktivacija AMPK poteka z vezavo AMP na uravnavajočo podenoto AMPK γ . Do kovalentne aktivacije pa pride s fosforilacijo treoninskega ostanka 172 na katalitični podenoti AMPK α (Thr172) (Liang et al., 2013). Fosforilacijo Thr172 katalizira tumorski zaviralec LKB1 (Shackelford et al., 2009). Vezava AMP (ali ADP) na podenoto AMPK γ zavre defosforilacijo Thr172, zato zvišana koncentracija AMP spodbuja tako alosterično kot tudi kovalentno aktivacijo AMPK.



Slika 3: Dihalna veriga v mitohondriju. Metformin zavira kompleks I (Viollet in sod., 2012: 255).

Metformin vstopi v celico preko prenašalcev OCT1 (v jetrih) ali OCT2 (v ledvicah), nato pa je prizem metformina v mitohondrij odvisen tudi od mitohondrijskega membranskega potenciala (Viollet in sod., 2012; Wheaton in sod., 2014). Ker je metformin pri fiziološkem pH v obliki kationa, se njegova akumulacija v mitohondrijskem matriksu povečuje kot funkcija mitohondrijskega membranskega potenciala (Wheaton in sod., 2014). Inhibicija kompleksa I dihalne verige poteka tako, da metformin zmanjša mitohondrijsko oksidacijo NADH v NAD⁺ (Vander Heiden, 2011). S tem se zmanjša črpanje protonov (H⁺) preko notranje membrane mitohondrija. To vodi v zmanjšanje protonskoga gradijenta, zmanjšano porabo kisika in zmanjšanje sinteze ATP iz ADP in Pi, ki ga na ravni kompleksa V (ATP sintaze) poganja vračanje protonov v mitohondrijski matriks (Viollet in sod., 2012).



Slika 4: Domene tipične sesalske AMPK molekule (Hardie in sod., 2012: 253).

AMPK je heterotrimers, sestavljen iz α -, β - in γ - podenote v razmerju 1:1:1. Karboksi-terminalna domena podenote β (β -CTD) se poveže s podenotama α in γ ter tako tvori jedro kompleksa. AID, avto-inhibitorna domena; CBM, modul, na katerega se vežejo ogljikovi hidrati; CBS1-CBS4, ponovitve CBS v podenoti γ ; C-domena, C-terminalna domena kinazne domene; N-domena, N-terminalna domena kinazne domene.

Vsi učinki metformina pa niso odvisni od aktivacije AMPK. Nedavno so na primer ugotovili, da metformin zmanjšuje jetrno glukoneogenezo z nekompetitivno inhibicijo mitohondrijske glicerolfosfat dehidrogenaze. S tem naj bi metformin spremenil redoks stanje hepatocitov ter upočasnil jetrno glukoneogenezo neodvisno od aktivacije AMPK (Madiraju in sod., 2014). Opisani pa so bili tudi drugi učinki metformina. Metformin lahko na primer zavre delovanje mTORC1 neodvisno od aktivacije AMPK (Kalender in sod., 2010). V visokih koncentracijah pa lahko metformin deluje tudi kot zaviralec AMP deaminaze (Ouyang in sod., 2011).

2.3.3 Posredni in neposredni učinki metformina na rakave celice

Metformin lahko na rakave celice deluje posredno ali neposredno. Posredni učinki so posledica sprememb v sistemski presnovni homeostazi (Campagnoli in sod., 2013). Z metforminom spodbujena upočasnitev glukoneogeneze zniža koncentracijo glukoze v krvi in posledično tudi inzulina, kar bi lahko že samo po sebi zmanjšalo možnost za razvoj raka. Ali je ravno znižanje koncentracije glukoze in inzulina ključno za protitumorno delovanje metformina, pa še ni znano (Chandel, 2014).

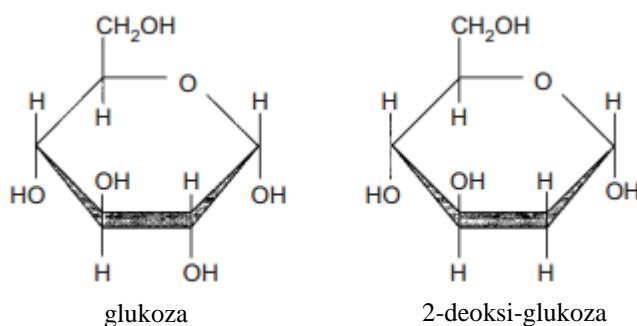
V raziskavah so pokazali tudi, da ima metformin močne protidelitvene in/ali pro-apoptozne učinke v več celičnih linijah raka dojke. Pri nizkih koncentracijah metformin predvsem zavira delitev celic, pri višjih koncentracijah pa začne prevladovati apoptoza (Zordoky in sod., 2014). Ti neposredni učinki na celice raka dojke bi lahko vključevali inhibicijo kompleksa I, povzročitev energijskega stresa in aktivacijo AMPK (Wheaton in sod., 2014). Aktivacija AMPK namreč zaustavi anabolne procese, kot je sinteza maščobnih kislin, ki so potrebni za rast in delitev celic. Eden ključnih učinkov aktivacije AMPK pa je tudi inhibicija signalne poti mTOR, s čimer ustavi sintezo beljakovin in delitev celic (Mihaylova in Shaw, 2011; Motoshima in sod., 2006; Martinez-Outschoorn in sod., 2015).

Aktivacija AMPK skoraj zagotovo ni edini mehanizem prek katerega metformin zavira razvoj raka. Kot smo opisali zgoraj, namreč metformin deluje še na več drugih znotrajceličnih tarč. Poleg tega pa je treba upoštevati, da bi aktivacija AMPK v nekaterih primerih lahko celo povečala preživetje rakavih celic. To še zlasti velja za neugodne razmere, kot so pomanjkanje hranil, kisika in rastnih dejavnikov (Liang in Mills, 2013). Ker aktivacija AMPK omogoča prilagoditev na neugodne razmere, še posebej na pomanjkanje energije, bi metformin lahko po eni strani zavrl delitev rakavih celic, po drugi strani pa povečal preživetje rakavih celic v G0 fazi celičnega cikla. Povzamemo lahko, da kljub številnim raziskavam farmakološki mehanizem protitumornega delovanja metformina, ostaja nejasen.

2.3.4 Inhibicija glikolize z 2-deoksi-D-glukozo

2-deoksi-D-glukoza (2-DG) je analog glukoze (Slika 5) in aktivator AMPK. Zaradi svojih protitumornih učinkov bi 2-DG lahko bila uporabna za zdravljenje nekaterih vrst raka. 2-DG v celico vstopi prek glukoznih prenašalcev, tam pa ga encim heksokinaza fosforilira, tako da nastane 2-DG-6-fosfat (Yamasaki in sod., 2011; Vander Heiden, 2011). 2-DG-6-fosfat je kompetitivni inhibitor encimov, ki presnavljajo glukozo-6-fosfat, in sicer sta to glukoza-6-fosfat izomeraza, ki katalizira naslednji korak v glikolizi ter glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, ki je udeležena v pentoza fosfatni poti (Yamasaki in sod., 2011; Vander Heiden, 2011). 2-DG s svojim delovanjem inhibira glikolizo, saj se ne presnavlja v glikolitični poti, s čimer oponaša učinek pomanjkanja glukoze (Zhang in sod., 2016). Pomembno je tudi, da celica za fosforilacijo 2-DG porabi ATP, iz 2-DG-6-fosfat pa v nadaljnjih korakih ATP ne more ponovno pridobiti. Ker 2-DG zaustavi prve ključne korake glikolize in hkrati porablja ATP (Robinson in sod., 2012), vodi tretiranje z 2-DG v pomanjkanje ATP, zaustavitev celičnega cikla, zmanjšano in zaustavljeni celično rast ter tudi celično smrt (Zagorodna in sod., 2012; Golding in sod., 2013; Giannarioli in sod., 2011). Celice, ki so izpostavljene zadostnim količinam 2-DG tako preidejo v apoptozo (Aft in sod., 2002). Zmanjšana znotrajcelična koncentracija ATP in dvig koncentracije AMP spodbudi aktivacijo AMPK (Kim in sod., 2013).

Ker AMPK spodbuja anabolne procese, pri katerih nastaja ATP, in hkrati zavira katabolne procese, pri katerih se ATP porablja, aktivacija AMPK pomaga ublažiti energijski stres (Wu in sod., 2015). Ker aktivacija AMPK prepreči celično smrt, ko primanjkuje glukoze, je zaviralni učinek 2-DG na rast rakavih celic manjši, kot bi bil, če bi ob tretiranju z 2-DG inhibirali AMPK (Cheong in sod., 2011; Wu in sod., 2015). Inhibicija AMPK namreč nasprotuje presnovnim prilagoditvam pri pomanjkanju energije in tako podpira učinkovitost 2-DG pri sprožitvi smrti rakavih celic (Wu in sod., 2015).



Slika 5: Struktura primerjava glukoze in 2-deoksiglukoze (Aft in sod., 2002: 806).
2-deoksiglukozu na drugem ogljikovem atomu manjka OH skupina, ki jo zamenja vodik.

2.4 RAZMERE V RAKASTEM TKIVU V PRIMERJAVI Z RAZMERAMI V KULTURI RAKAVIH CELIC

Poleg genetskih sprememb, ki spremenjajo presnovo rakavih celic, ima tudi patološko spremenjeno mikrookolje v tumorju in njegovi okolici velik vpliv na presnovni fenotip rakavih celic (Cairns in sod., 2011). Tako kot zdrave celice tudi rakave celice dobijo kisik in hranila po arterijski krvi. Ker pa rast tumorja pogosto ni usklajena z rastjo novih žil (Wilson in Hay, 2011), je sredica tumorja pogosto izpostavljena precej drugačnim razmeram kot zdrava tkiva. Zaradi slabe prekrvitve so za sredico tumorja značilni:

- znižana koncentracija glukoze in drugih hranil;
- znižana koncentracija hormonov in rastnih dejavnikov;
- pomanjkanje kisika (hipoksija) in
- zmanjšano prodiranje farmakoloških učinkovin v tkivo.

2.4.1 Pomen koncentracije glukoze

Običajna koncentracija glukoze v gojiščih za celične kulture je 1 g/L (5,6 mM) ali 4,5 g/L (25 mM). Celice raka dojke MDA-MB-231 zelo pogosto gojijo pri koncentraciji glukoze 4,5 g/L. Fiziološka koncentracija glukoze v krvi na tešče je 3,6-6,0 mM. Pri zdravem človeku pa je tudi po večjem obroku koncentracija glukoze v krvi vedno nižja od 11 mM

(American ..., 2011). To pomeni, da je bila večina raziskav o delovanju metformina do sedaj narejena v razmerah, ki posnemajo hiperglikemijo pri hudem poslabšanju sladkorne bolezni (Sinnett-Smith in sod., 2013). Ker imajo tudi sladkorni bolniki tako visoke koncentracije le občasno, na podlagi takšnih poskusov težko sklepamo, kakšen bi lahko bil pravi učinek metformina na rakave celice. Koncentracija glukoze zagotovo pomembno vpliva na delovanje metformina. Gojenje celic MDA-MB-231 pri 1 g/L glukoze je na primer, vsaj v nekaterih študijah, izrazito povečalo njihovo občutljivost na metformin (Zordoky in sod., 2014). Ko je koncentracija glukoze visoka (~25 mM), rakave celice ATP pridobivajo večinoma z glikolizo, ko pa je koncentracija glukoze nižja (~5 mM), pa je privzem le-te v celice nižji, del ATP pa pridobivajo z oksidativno fosforilacijo (Vazquez in sod., 2010). V takšnih razmerah postanejo bolj občutljive na blage inhibitorje mitohondrijskih funkcij, kot je na primer metformin (Sinnett-Smith in sod., 2013).

2.4.2 Pomen koncentracije inzulina

Koncentracija inzulina v gojiščih za celične kulture je zelo raznolika. Pogosto pa je inzulin dodan gojiščem v zelo visoki koncentraciji. Nekatera gojišča tako vsebujejo inzulin tudi v koncentraciji 1-10 µM (na primer Advanced MEM proizvajalca Invitrogen). Poudariti je potrebno, da je koncentracija inzulina na teče okoli 20-50 pM, posprandialna koncentracija pa običajno ne preseže 1 nM. To pomeni, da so koncentracije inzulina v gojiščih za celične kulture lahko tudi 10.000-krat višje kot v krvi. Inzulin bi lahko pomembno vplival na rezultate študij v celičnih kulturah iz več razlogov.

Inzulin in njemu sorodni dejavniki, kot je IGF-1, delujejo mitogeno in povečajo preživetje celic preko receptorske fosforilacije ter aktivacije signalnih poti, kot sta npr. mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK) in Akt (Chandran in sod., 2012). Učinki metformina v rakavih celicah po vsej verjetnosti vsaj deloma nastanejo zaradi njegovih hipoglikemičnih učinkov pri posameznikih z inzulinsko odpornostjo ali sladkorno boleznijo tipa 2. Pomembno je, da se pri zdravljenju z metforminom zniža tudi plazemska koncentracija inzulina (Pollak, 2010), kar je verjetno zelo pomembno za protitumorni učinek inzulina; zdravila za sladkorno bolezen, ki tega učinka nimajo, namreč ne delujejo zaščitno pred rakom (Vander Heiden, 2011). Prav nasprotno: eksogeni inzulin in sekretagogi inzulina, kot so sulfonilsečnine, ki zvišujejo koncentracijo inzulina v krvi, lahko tako vodita do slabših kliničnih rezultatov pri bolnikih z rakom (Vander Heiden, 2011). Ugotovili so tudi, da metformin s svojim delovanjem tako zagotavlja posredne prednosti pacientom z visoko koncentracijo IGF v krvi (Vander Heiden, 2011).

Inzulin poveča citotoksičnost 2-DG v celicah kolorektalnega karcinoma (Zhang in sod., 2016). Raziskav, ki bi obravnavale kombinacijo inzulina in 2-DG na raku dojke, še posebej na celicah MDA-MB-231, trenutno še ni, so pa dobljeni rezultati na celicah kolorektalnega karcinoma spodbudni za nadaljnje raziskave na drugih tipih rakavih celic. Ker inzulin

stimulira celični privzem glukoze, vključno z 2-DG, se tako citotoksičnost izboljša, premaga pa tudi spodbujajoče učinke inzulina na rakave celice (Zhang in sod., 2016). Ta kombinacija se je pokazala za bolj učinkovito pri zaustavitvi celičnih delitev, kot samo uporaba 2-DG, prav tako pa pri nizkih koncentracijah 2-DG ni zadost učinkovita, da bi sprožila celično smrt in apoptozo (Zhang in sod., 2016).

2.4.3 Pomen koncentracije kisika

Pomanjkanje kisika oziroma hipoksija je pomembna značilnost rakavih tkiv in ima različne učinke na biologijo raka ter njegov odziv na zdravljenje (Guzy in sod., 2005). Obstajala naj bi v približno 50 % primerov raka dojk (Tavaluc in sod., 2007) in je negativen napovedni dejavnik, ker prispeva k odpornosti na kemo- in radioterapijo in spodbuja angiogenezo, invazivnost in metastaziranje (Wilson in Hay, 2011). Poleg tega hipoksija pomembno vpliva na presnovne lastnosti celic in njihovo genomsko nestabilnost (Wilson in Hay, 2011). Prav nasprotno pa je v celičnih kulturah koncentracija kisika pogosto ne le normalna, temveč bistveno višja, kot bi jo lahko izmerili v zdravem tkivu. Medtem ko celične kulture gojimo pri koncentraciji kisika okoli 20 %, so običajne koncentracije kisika v zdravih tkivih (odvisno od tkiva) med 1 in 10 % (Tiede in sod., 2011).

Hipoksija nastane, kadar je dostava kisika manjša od porabe kisika v tkivu. Torej zaradi neravnovežja med dostavo kisika po krvi ter porabo v neožiljenih tumorjih ali njihovih metastazah (Pries in sod., 2009; Wilson in Hay, 2011). Pretok krvi se ob pomanjkanju kisika zaradi spremenjene mikrovaskulature pogosto ne more ustrezno povečati (Pries in sod., 2009; Wilson in Hay, 2011). Hipoksija lahko spremeni presnovne poti in spodbuja celično preživetje s prilagajanjem na lokalno mikrookolje (Yotnda in sod., 2010). Presnovne poti se spremenijo s spremembami transkripcije, ki jo povzroči stabilizacija s hipoksijo inducirane dejavnike (HIF) v hipoksičnih razmerah (Denko, 2008). HIF uravnava prepisovanje genov za beljakovine, ki so vpleteni v uravnavanje različnih dejavnikov v tumorjih in vključujejo prenos kisika in glukoze, presnovo železa, glikolizo, celično preživetje (IGF-1) in deljenje, angiogenezo (vaskularni endotelni rastni dejavnik A (VEGFA)), invazijo ter metastaziranje (Wilson in Hay, 2011; Poon in sod., 2009). Njegova aktivnost je patološko povečana pri veliko vrstah raka, najpogosteje zaradi prekomernega izražanja HIF- α , ki je uravnavač podenota heterodimerne kompleksa HIF. Čezmerno delovanje dejavnika HIF je po navadi povezano s povečano gostoto žil, neuspešnim zdravljenjem in slabšo prognozo (Poon in sod., 2009). Prav oziljenje tumorskega tkiva pa je velik dejavnik pri prilagoditvi tumorjev na hipoksijo, saj vpliva na zmanjšanje hipoksičnih razmer v tumorju in ustvarja optimalne razmere za njegovo rast (Sorokin in sod., 2016).

V hipoksičnih razmerah se poleg HIF aktivira tudi AMPK (Sorokin in sod., 2016). Aktivacija AMPK v hipoksičnih ali drugih neugodnih razmerah vodi do inhibicije mTOR

signalne poti in posledično do zaustavitve prepisovalnih in prevajalnih procesov, saj mTOR nadzoruje sintezo proteinov in s tem spodbuja rast in delitev celic (Park in sod., 2015; Sorokin in sod., 2016). Vendar pa lahko dolgotrajna hipoksija sproži delno prilagoditev, ki omogoči relativno stabilno rast celic raka dojke pri nizki koncentraciji kisika (Sorokin in sod., 2016). Pri tem ima pomembno vlogo sprememba ključnih signalnih poti, ki regulirajo mTOR, med njimi pa je tudi prekomerno izražanje mTOR, ki lahko inducira takšno relativno toleranco (Sorokin in sod., 2016; DeYoung in sod., 2008; Koo in Jung, 2010).

Hipoksija sproži tudi izražanje površinskih označevalcev (markerjev), značilnih za matične celice, na celicah MDA-MB-231, kar nakazuje na to, da lahko hipoksija sproži dediferenciacijo celic trojno negativnega raka dojke, ki s tem pridobijo fenotip matičnih celic (Xie in sod., 2016). Hkrati pa tudi inhibira apoptozo celic MDA-MB-231. Te ugotovitve imajo lahko velik vpliv na razumevanje, zakaj so metastaze tako pogoste, oziroma zakaj so nekateri tipi raka bolj invazivni kot drugi (Xie in sod., 2016), še posebej celice trojno negativnega raka dojke. Hipoksija pa bi lahko pomembno vplivala tudi na delovanje metformina. Metformin namreč zavira poti, ki so vpletene v prilagoditve na hipoksične razmere (Wheaton in sod., 2014).

2.4.4 Pomen koncentracije metformina

Glede delovanja metformina je bilo narejenih veliko raziskav *in vitro*, v katerih so večinoma uporabljali visoke koncentracije metformina (~10 mM), kar je pripeljalo do vprašanja klinične pomembnosti teh raziskav (Sinnott-Smith in sod., 2013). Za razumevanje delovanja metformina pa je pomembno prav to, ali ima metformin tudi v okviru terapevtskih koncentracij neposredne učinke na rakavo celico (Sinnott-Smith in sod., 2013). Klinično pomembne koncentracije metformina za *in vitro* študije se nahajajo med 10 µM in 30 µM. Višje koncentracije metformin doseže samo v portalni venski krvi, ki teče od prebavil k jetrom, vendar tudi te koncentracije običajno ne presežejo 80-100 µM. Velik razkorak med koncentracijami metformina, ki so jih izmerili pri bolnikih, in koncentracijah metformina, ki so učinkovite pri poskusih v celičnih kulturah, predstavlja pomembno oviro pri razlagi mehanizmov protitumornega delovanja metformina.

Pri fiziološkem pH se metformin nahaja v obliki kationa, zato nekateri sklepajo, da se njegova koncentracija v mitohondrijskem matriksu zaradi mitohondrijskega membranskega potenciala lahko tudi za 100-krat poveča (Zordoky in sod., 2014; Wheaton in sod., 2014; Chandel, 2014). Če je ta predpostavka točna, bi to pomenilo, da bi koncentracija metformina med 10 in 100 µM lahko zadoščala za protitumorne učinke, ki so jih opazili v celični kulturi. Metformin pri koncentraciji ~1 mM namreč dokazano inhibira mitogensko signaliziranje preko AMPK-odvisne poti, če je koncentracija glukoze v gojišču v fiziološkem območju (~5 mM) (Sinnott-Smith in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju Skupine za nano in biotehnološke aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, in v Laboratoriju za molekularno nevrobiologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Metformin je bil kupljen pri proizvajalcu Calbiochem (Merck Millipore), 2-deoksi-D-glukoza pa je od proizvajalca Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ZDA). Test MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) smo izvedli po navodilih proizvajalca Promega Corp (Fitchburg, Wisconsin, ZDA). Reagent Hoechst 33342 je bil od proizvajalca Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ZDA). Proizvajalec humanega rekombinatnega inzulina Actrapid je Novo Nordisk A/S (Danska). Proizvajalec 0,9 % NaCl je B. Braun (Melsungen, Nemčija). Tripsin (Trypsin-EDTA (T4174)), barvilo fenol rdeče, goveji serumski albumin (BSA) brez maščobnih kislin, CaCl₂, MgCl₂ in PBS in vse ostale reagente, za katere ni drugače navedeno, smo kupili od proizvajalca Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ZDA).

Preglednica 1: Kemikalije in njihove koncentracije.

Kemikalije	Založna koncentracija
metformin	1 M
2-deoksi-D-glukoza	200 mM
reagent MTS*	*upoštevan protokol po navodilih proizvajalca
reagent Hoechst	1 mg/ml, 2 mg/ml
inzulin	100 i.e./ml (0,6 mM)
glukoza	1 M
L-glutamin	200 mM
manitol	1 M
TRIS-HCl	50 mM
0,9 % NaCl	100 mM
FBS	10 %
BSA	10 %
SDS	10 %
barvilo fenol rdeče	0,5 %
tripsin	10-kratna koncentracija

3.1.2 Laboratorijski material in oprema

Za gojenje smo uporabili gojitvene posodice proizvajalca TPP Techno Plastic Products AG (Trasdigen, Švica) ali proizvajalca Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ZDA). Plošče s 24

in 96 jamicami smo prav tako uporabili od proizvajalca TPP Techno Plastic Products AG (Trasadigen, Švica) ali proizvajalca Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ZDA). Za štetje celic smo uporabili števna komora (hemocitometer – Neubauerjeva komora) proizvajalca Marienfeld-Superior (Lauda-Königshofen, Nemčija), krovna stekelca, ročni potisni števec za štetje celic in mini vrtinčasto mešalo (vorteks) IKA® Lab dancer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA). Pipete različnih volumnov smo pridobili od podjetja Eppendorf (Hamburg, Nemčija), prav tako smo uporabili njihovo mini centrifugo Minispin, pipetne nastavke pa od podjetja Sarstedt (Nümbrecht, Nemčija). Vakuumsko črpalko za odsesavanje gojišča pa je naredilo podjetje Vacutech (Ljubljana, Slovenija).

Preglednica 2: Laboratorijska oprema.

Oprema	Proizvajalec
čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Infinite® 200 PRO series	Tecan Group Ltd, Männedorf, Švica
čitalec mikrotitrskih plošč Victor 3 CO ₂ inkubator (37 °C) HERAcell	PerkinElmer, Shelton, Connecticut, ZDA
vodna kopel	Kambič, Semič, Slovenija
brezprašna komora LFVP 12	Unitherm, Nemčija
hipoksična komora New Brunswick™ Galaxy® 48 R	Iskra PIO d.o.o., Šentjernej, Slovenija
analitska tehtnica	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
mikroskop Zeiss (Axiovert 25)	Mettler Toledo, Greifensee, Švica
hladilnik (+4 °C)/zamrzovalnik (-20 °C)	Zeiss, Jena, Nemčija
programska oprema za Tecan Magellan™	Gorenje, Velenje, Slovenija
programska oprema za statistično obdelavo GraphPad Prism 7	Tecan Group Ltd, Männedorf, Švica
	GraphPad Software, Kalifornija, ZDA

3.2 METODE

3.2.1 Celična linija MDA-MB-231

V raziskovalnem delu smo v vseh poskusih uporabili celično linijo MDA-MB-231 (Human Breast Adenocarcinoma), ki je bila pridobljena iz zbirke ATCC (ZDA). Celice smo gojili v osnovnem gojišču RPMI-1640 (Genaxxon bioscience, Ulm, Nemčija) z visoko koncentracijo glukoze (4,5 g/L), ki smo mu dodali 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA) in 10 % fetalni goveji serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA). Celice smo gojili v atmosferi nasičenega zraka z vodno paro in 5 % CO₂ pri 37 °C. Poskuse smo izvedli v gojišču RPMI-1640 z 10 % FBS ter s koncentracijo glukoze (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA) 0 g/L, 1 g/L (5,6 mM) ali 4,5 g/L (25 mM) (Preglednica 3). Končna koncentracija manitola (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA), ki smo ga dodali v gojišče RPMI-1640 z 1 g/L glukoze, je bila 19,4 mM in 25 mM v gojišču brez glukoze.

Preglednica 3: Tekoča gojišča, vsa so bila pripravljena v osnovnem gojišču RPMI-1640.

Koncentracija glukoze v gojišču	Sestavina	Koncentracija v gojišču
0 g/L	FBS	1 %
	Glutamin	2 mM
	Manitol	25 mM
1 g/L	FBS	1 %
	Glutamin	2 mM
	Glukoza	5,6 mM
	Manitol	19,4 mM
4,5 g/L	FBS	1 %
	Glutamin	2 mM
	Glukoza	25 mM

3.2.2 Zasnova raziskave

V prvem sklopu poskusov smo preučevali, kako metformin sam in v kombinaciji z 2-DG pri nižji ali višji koncentraciji glukoze vpliva na viabilnost in delitev celic MDA-MB-231. Pri tem smo s testom MTS merili presnovno aktivnost celic, s testom Hoechst pa smo določali viabilnost celic in tako na neodvisen način preverjali rezultate testa MTS. Celice smo večinoma nasajali v gojišče z visoko koncentracijo glukoze (4,5 g/L), na podlagi rezultatov pa smo določili vpliv metformina in 2-DG na rast celic MDA-MB-231.

V drugem sklopu poskusov smo testirali, kako inzulin in metformin vplivata na viabilnost in delitev celic MDA-MB-231. Za testiranje viabilnosti celic smo pri kombinaciji inzulina in metformina uporabili test Hoechst kot v prvem sklopu, kjer smo posredno določali število pritrjenih celic, pri poskusih s samim inzulinom pa rahlo drugačen test Hoechst, pri katerem smo barvali lizate celic. Celice MDA-MB-231 smo tudi pri teh poskusih večinoma nasajali v gojišče z visoko koncentracijo glukoze (4,5 g/L).

V zadnjem sklopu poskusov smo testirali, kako hipoksija (0,5 % O₂) vpliva na viabilnost in delitev celic MDA-MB-231 pri tretirjanju z metforminom, 2-DG in/ali inzulinom. Pri teh poskusih smo celice MDA-MB-231 nasajali v gojišče z nizko koncentracijo glukoze (1 g/L). Za določanje števila celic smo uporabili barvilo Hoechst.

Vse poskuse smo izvajali *in vitro* na celični liniji MDA-MB-231. Preden smo celice nasadili za poskus, smo jih gojili v gojitvenih posodicah T 75 (75 cm²) v inkubatorju s 5 % CO₂ pri temperaturi 37 °C. Presajanje celic je potekalo na vsake 3-4 dni, oziroma ko so dosegle 80-90 % konfluentnost. Celicam smo odsesali tekoče gojišče, jih spirali s PBS, dodali tripsin, segret na 37 °C, in inkubirali 2 minuti. Po inkubaciji smo tripsinizacijo ustavili z dodatkom gojišča z 10 % FBS, celice pa smo prešteli s hemocitometrom. Nasajali smo jih v različnih koncentracijah (Preglednica 4).

Nasajanje celic za poskuse je potekalo na mikrotitrskih ploščah s 24 jamicami v gojišču s fiziološko (1 g/L) ali visoko (4,5 g/L) koncentracijo glukoze. Začetne koncentracije celic so se razlikovale glede na tip poskusa (MTS, Hoechst ali hipoksija) in pri nekaterih poskusih tudi glede na uporabljeni gojišče (Preglednica 4). Nasajene celice smo inkubirali 24 ur, nato pa jih izpostavili različnim učinkovinam oziroma dejavnikom skozi različna časovna obdobja. Med inkubacijo smo na vsakih 24 ur odsesali staro gojišče in dodali svežega, po končani inkubaciji (zaključek poskusa) pa smo gojišče z dodatki različnih učinkovin odsesali in izvedli različne metode za analizo.

Preglednica 4: Shema izvedenih poskusov.

Tip poskusa		Uporabljeno gojišče in učinkovina	Začetno število celic (št.)/jamico	Čas inkubacije celic z učinkovino [h]
Normoksija	MTS	0 g/L + metf.	75.000	72
		1 g/L + metf.	25.000	
		1 g/L + metf. + 2-DG		
		4,5 g/L + metf.	30.000	
		4,5 g/L + metf. + 2-DG		
	Hoechst (pritrjene celice)	0 g/L + metf.	75.000	72
		1 g/L + metf.		
		1 g/L + metf. + 2-DG		
		4,5 g/L + metf.	25.000	
		4,5 g/L + metf. + 2-DG		
		1 g/L + metf. + inzulin		
Hipoksija	Hoechst (lizirane celice)	1 g/L + inzulin	25.000	0, 24, 48, 72
	Hoechst (lizirane celice)	1 g/L + metf. + 2-DG	25.000	24
		1 g/L + metf. + inzulin		

3.2.3 Določanje viabilnosti celic s testom MTS

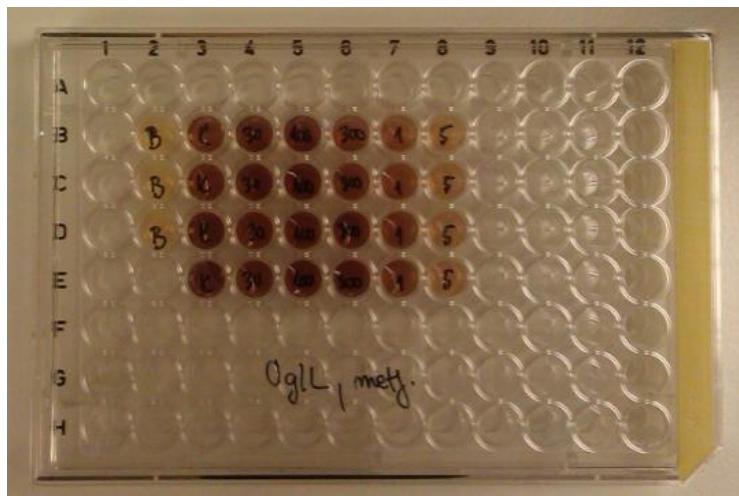
Reagent MTS vsebuje tetrazolijev sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij in reagent za skapljanje elektronov fenazin metosulfat (PMS) (Schrand in sod., 2012). Celice med inkubacijo z reagentom MTS, z dehidrogenazami, ki so prisotne v presnovno aktivnih celicah, reducirajo MTS vobarvan in v vodi topen produkt formazan, katerega absorbanco se meri pri valovni dolžini 490 nm (Schrand in sod., 2012). Koncentracija formazana je tako neposredno odvisna od števila živih celic in aktivnosti dehidrogenaz (Slika 6).

Po poteku 72 urne inkubacije smo nasajene celice MDA-MB-231 najprej spirali s 500 µL 0,9 % NaCl ali PBS, če so bile nasajene v gojišču brez glukoze, nato pa smo jim dodali 183 µL pripravljenega gojišča za test MTS (Preglednica 5). Sočasno smo v mikrotitrsko ploščo s 96 jamicami prenesli 100 µL gojišča za test MTS potem pa vse skupaj inkubirali 10 min v inkubatorju na 37 °C. Nadalje smo celicam MDA-MB-231 dodali 36,7 µL,

jamicam brez celic pa $20 \mu\text{L}$ reagenta MTS (slepi poskus). Inkubacija skupaj z reagentom MTS je potekala do obarvanja gojišča, približno 1,5-2 uri. Po pretečenem času smo odvzeli po $100 \mu\text{L}$ vsakega vzorca in ga prenesli na plošče s 96 jamicami. Za tem smo izvedli meritve absorbance s čitalcem mikrotitrskih plošč pri valovni dolžini 490 nm . Po vsaj treh bioloških ponovitvah poskusov v dvojicah smo najprej identične parametre med sabo povprečili, od dobljene vrednosti absorbance odsteli slepi poskus, rezultate pa nato preračunali glede na netretirano kontrolno skupino, da smo dobili odstotek metabolne aktivnosti.

Preglednica 5: Tekoče gojišče za test MTS, pripravljeno v osnovnem RPMI-1640.

Sestavina	Koncentracija v gojišču
Glukoza	25 mM
L-glutamin	2 mM



Slika 6: Primer obarvanosti jamic pred merjenjem absorbance pri testu MTS.

B: slepi poskus; K: kontrola; koncentracije metformina: $30 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$, 1 mM , 5 mM ; gojišče: 0 g/L glukoze. Slika 6 predstavlja primer, kako je izgledala zadnja faza poskusa pred merjenjem absorbance s čitalcem mikrotitrskih plošč. Vidimo, da je pri nižjih koncentracijah metformina število celic precej veliko, saj je intenziteta barve močnejša zaradi večje količine prisotnega formazana. Šele pri 1 in 5 mM koncentraciji pa se število celic opazno zmanjša, kar nam prikaže svetlejša oziroma manj intenzivna barvna reakcija.

3.2.4 Določanje števila celic MDA-MB-231 z barvilo Hoechst 33342

Reagent Hoechst 33342 je barvilo, ki obarva nukleinske kisline in emitira modro fluorescenco, ko se veže na dvojno-vijačno DNA (Hoechst 33342 ... , 2015). Intenziteta fluorescence je linearno odvisna od števila celic (Rajh in sod., 2016). Barvanje s Hoechstom smo opravili na dva načina.

3.2.4.1 Barvanje pritrjenih celic MDA-MB-231

Po končanem poskusu smo gojišče odsesali in dodali po 250 µL svežega gojišča z barvilo Hoechst – tudi v jamice, kjer nismo imeli celic, smo dodali to gojišče, saj je to služilo kot slepi poskus. Za tem je potekala 20-30 minutna inkubacija v inkubatorju na 37 °C, potem pa odstranitev gojišča in dodatek 100 µL pufra PBS s Ca²⁺ ter Mg²⁺ (Preglednica 6). Fluorescenco smo merili s čitalcem mikrotitrskih plošč pri vzbujajoči (ekscitacijski) valovni dolžini 350 nm in emisijski valovni dolžini 461 nm. Po vsaj treh bioloških ponovitvah poskusov v trojicah smo najprej identične parametre med sabo povprečili, od dobljene vrednosti fluorescence odšteli fluorescenco ozadja, rezultate pa nato preračunali glede na netretirano kontrolno skupino, da smo dobili odstotek viabilnosti.

Preglednica 6: Pufer za določanje rasti pritrjenih celic.

Sestavina	Koncentracija v gojišču
PBS	10-krat redčen
CaCl ₂	0,4 mM
MgCl ₂	0,4 mM

3.2.4.2 Barvanje lizatov celic MDA-MB-231

Nasajenim celicam smo po 0, 24, 48 in 72 urah inkubacije v prisotnosti učinkovin odsesali gojišče in posamezno mikrotitrsko ploščo s 24 jamicami zamrznili na -20 °C, vključno z zadnjo ploščo (72 ur), ki smo jo zamrznili za pol ure. Liziranje celic in meritve fluorescence smo opravili za vse štiri časovne točke na isti dan, torej dan, ko smo prenehali inkubirati še zadnjo ploščo (72 ur). Plošče smo odmrznili in celice lizirali s 300 µL 0,03 % SDS v sterilni vodi nato pa jih inkubirali 30 min pri sobni temperaturi, s tem da smo jih vmes večkrat pretresli, da je nastal homogen lizat. Iz posamezne jamice smo po inkubaciji prenesli po 90 µL lizata v ploščo s 96 jamicami. Lizatom smo dodali 90 µL pufra za barvanje lizatov celic (Preglednica 7), medtem ko smo za slepi poskus uporabili le pufer in 0,03 % raztopino SDS (brez lizatov). Za tem je sledila 10 min inkubacija v temi pri sobni temperaturi, nato pa merjenje fluorescence na dnu plošč s čitalcem mikrotitrskih plošč. Po vsaj treh bioloških ponovitvah poskusov v trojicah smo najprej identične parametre med sabo povprečili, od dobljene vrednosti fluorescence odšteli fluorescenco ozadja, rezultate pa nato preračunali glede na netretirane kontrolne skupine v različnih časovnih točkah, da smo dobili relativno število celic.

Preglednica 7: Pufer za barvanje lizatov celic.

Sestavina	Koncentracija v gojišču
TRIS-HCl	50 mM
NaCl	100 mM
Barvilo Hoechst	5 µg/ml

3.2.6 Potek poskusov v hipoksiji

Celice MDA-MB-231 smo nasadili, nato pa jih po 24 urah tretirali z želenimi učinkovinami in jih takoj po tretiranju postavili v hipoksični inkubator. Istočasno smo pripravili tudi kontrolne plošče, ki so bile identične tistim, ki smo jih postavili v hipoksijo, le da smo te postavili v navadni inkubator na 37 °C. Inkubacija celic je potekala 24 ur na 37 °C, tiste v hipoksičnih razmerah pa so bile izpostavljene z vodno paro nasičeni zmesi 0,5 % O₂, N₂ in 5 % CO₂. Po 24 urah inkubacije smo iz obeh inkubatorjev vzeli plošče in hitro odsesali gojišče iz vseh jamic, da smo še vedno lahko izmerili spremembe, ki so posledica prilagoditve na hipoksijo. Po končanem poskusu smo vse plošče zamrznili za vsaj pol ure, potem pa jih odmrznili in nadaljevali delo po protokolu za barvanje lizatov celic s testom Hoechst. Fluorescenco smo na koncu pomerili s čitalcem mikrotitrskih plošč. Po vsaj treh bioloških ponovitvah poskusov v dvojicah smo najprej identične parametre med sabo povprečili, od dobljene vrednosti fluorescence odšteli fluorescenco ozadja, rezultate pa nato preračunali glede na netretirano kontrolno skupino, da smo dobili odstotek viabilnosti.

3.2.7 Statistična analiza rezultatov

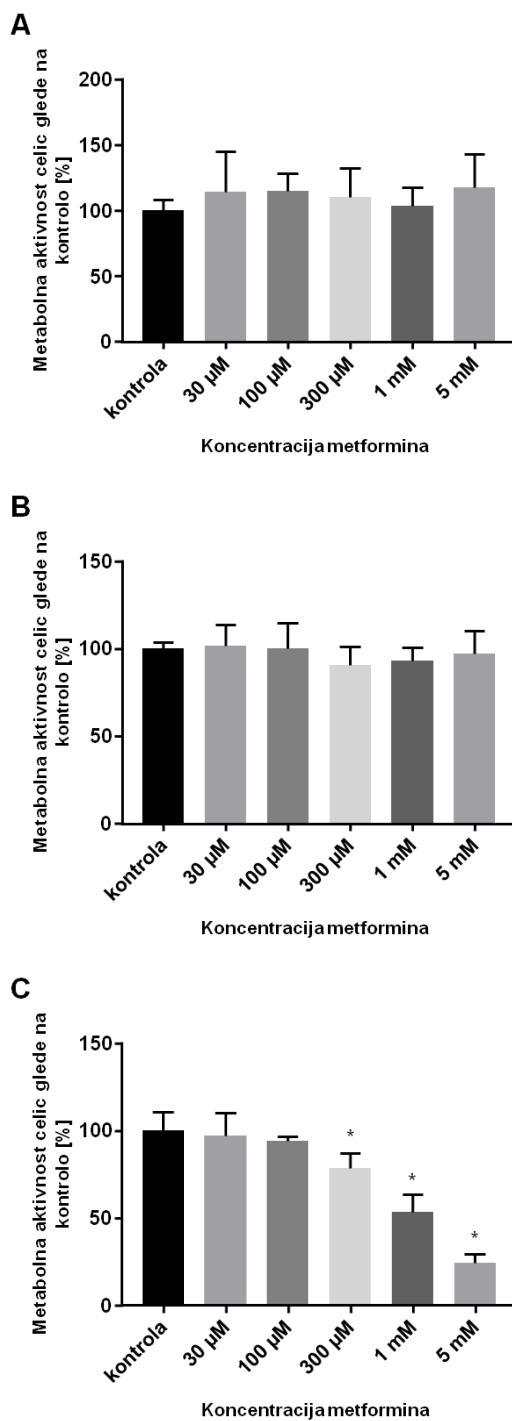
Po zaključku vsakega poskusa smo rezultate analizirali v programu Microsoft Office Excel 2007 in GraphPad Prism 7. V večini primerov smo za statistično analizo uporabili enosmerno analizo variance (enosmerni test ANOVA), ki ji je sledil ustrezен *post hoc* test. Le pri poskusih s hipoksijo smo uporabili dvosmerno analizo variance (dvosmerni test ANOVA). Enosmerna ANOVA temelji na primerjavi aritmetičnih sredin in nam pove, ali se aritmetične sredine vzorčnih skupin med sabo statistično pomembno razlikujejo (Termania ..., 2016). Če je dobljena vrednost P pri tem testu manj kot 0,05, to pomeni, da se vsaj ena vzorčna skupina statistično pomembno razlikuje od ostalih in je verjetnost, da je razlika nastala naključno zelo majhna (GraphPad ..., 2016a). Med katerimi podskupinami je prišlo do statistično pomembnih razlik smo ugotavljali s *post hoc* testom, in sicer smo uporabili Dunnettov test, ki primerja vse tretirane skupine z eno samo kontrolno skupino (IBM ..., 2016). Dvosmerna ANOVA pa določi, kako na odziv vplivata dva dejavnika (GraphPad ..., 2016b). Pomaga nam razumeti, ali obstaja interakcija med dvema neodvisnima dejavnikoma na odvisni dejavnik (Laerd ..., 2013). Vsi rezultati so predstavljeni kot povprečja s standardnim odklonom (SD).

4 REZULTATI

4.1 VPLIV KONCENTRACIJE GLUKOZE NA PREŽIVETJE CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231 PRI TRETIRANJU Z METFORMINOM

Da bi preverili, kako koncentracija glukoze vpliva na delovanje metformina v kulturi celic MDA-MB-231, smo jih 72 ur tretirali z metforminom v gojiščih z različnimi koncentracijami glukoze: 0 g/L, 1 g/L (~5,6 mM) in 4,5 g/L (25 mM). Koncentracijo 0 g/L smo izbrali, ker v ishemični sredici tumorja primanjkuje glukoze, koncentracijo 1 g/L, ker je podobna fiziološki koncentraciji glukoze v krvi, in visoko koncentracija glukoze (4,5 g/L), ker se standardno uporablja pri poskusih s celicami MDA-MB-231. S testom MTS smo nato preverili presnovno aktivnost celic MDA-MB-231 (Slika 7), ki je posreden kazalec njihove viabilnosti. Kontrolo so v vseh poskusih predstavljale netretirane celice MDA-MB-231 v gojišču z 0 g/L, 1 g/L ali 4,5 g/L glukoze. Rezultati, pridobljeni s testom MTS, so prikazani na Sliki 7 kot odstotek presnovne aktivnosti kontrolne skupine celic MDA-MB-231.

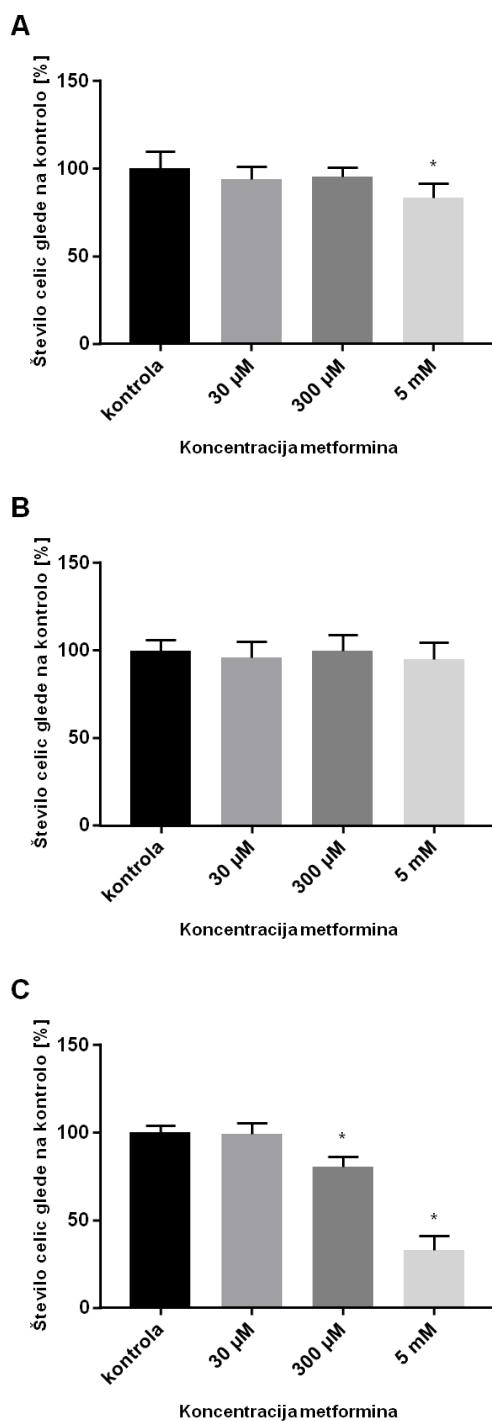
Celice MDA-MB-231 smo 72 ur tretirali z metforminom. Da bi preprečili znižanje koncentracije glukoze, smo gojišče nadomestili s svežim vsakih 24 ur. Pri visoki koncentraciji glukoze (4,5 g/L) (Slika 7A) metformin ni imel pomembnih učinkov na presnovno aktivnost celic MDA-MB-231. Podoben rezultat smo dobili tudi pri fiziološki koncentraciji glukoze (1 g/L), kjer niti visoke koncentracije metformina niso pomembno zmanjšale presnovne aktivnosti celic MDA-MB-231 (Slika 7B). Povsem drugače pa so se celice MDA-MB-231 odzivale v gojišču brez glukoze (Slika 7C). V primerjavi z visoko in fiziološko koncentracijo glukoze, je presnovna aktivnost v gojišču brez glukoze pri višjih koncentracijah ($\geq 300 \mu\text{M}$) metformina izrazito upadla. Padec metabolne aktivnosti je bil najbolj izrazit pri najvišji koncentraciji metformina (5 mM), kjer je bilo presnovno aktivnih okoli 25 % celic glede na kontrolo. Pri koncentracijah nižjih od 300 μM metformin ni imel učinka na presnovno aktivnost celic MDA-MB-231.



Slika 7: Vpliv metformina na presnovno aktivnost celic MDA-MB-231 v gojišču s 4,5 g/L glukoze (A), z 1 g/L glukoze (B) ter brez glukoze (0 g/L) (C).

Presnovno aktivnost celic, ki je posreden kazalec njihove viabilnosti, smo določili s testom MTS. Celice MDA-MB-231 smo z metforminom tretirali 72 ur, menjava gojišča je potekala vsakih 24 ur. **A:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 8$). Opravljeni so bili 4 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. **B:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 8$). Opravljeni so bili 4 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. **C:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. $*P < 0,05$.

Da bi rezultate, pridobljene s testom MTS, preverili z neodvisno metodo, smo učinek metformina na celice MDA-MB-231 ovrednotili še z barvilom Hoechst 33342 (v nadaljevanju Hoechst), ki predstavlja posredno merilo za število celic (Rajh in sod., 2016). V primerjavi s testom MTS, je barvanje s Hoechstom pokazalo bolj izrazite učinke metformina. Pri visoki koncentraciji glukoze (Slika 8A) je 5 mM metformin zmanjšal število celic za 20 % ($P<0,05$), pri koncentraciji 300 μM pa je bil učinek metformina le nakazan; število celic se je znižalo za 5 %, vendar je bil učinek statistično neznačilen ($P>0,05$). Nepričakovano so bili učinki metformina na število celic bolj izraziti pri visoki (Slika 8A) kot pa fiziološki (Slika 8B) koncentraciji glukoze. Pri fiziološki koncentraciji glukoze je 5 mM metformin znižal število celic za približno 10 % glede na kontrolo, vendar razlika ni bila statistično značilna ($P>0,05$). Največji upad števila celic pa je bil tako kot pri testu MTS v gojišču brez glukoze (Slika 8C). Podobno kot pri testu MTS, se je učinek metformina pokazal pri koncentraciji 300 μM . Pri tej koncentraciji je bilo število celic manjše za 25 % glede na kontrolo ($P<0,05$). Pri koncentraciji 5 mM pa se je število celic zmanjšalo kar za 75 % ($P<0,05$).



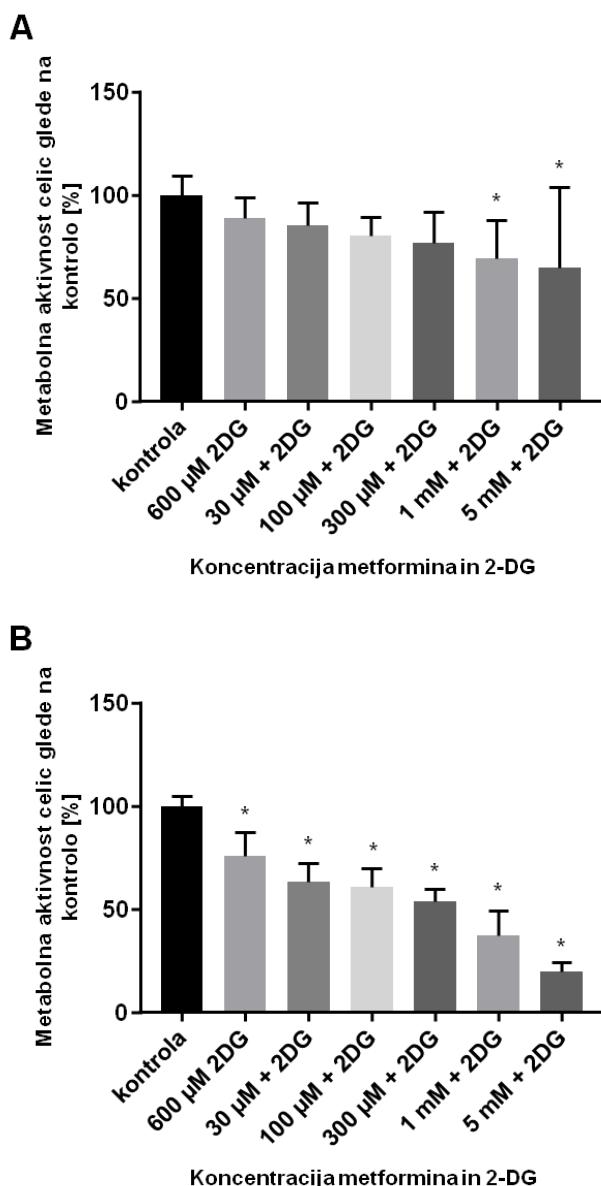
Slika 8: Vpliv metformina na število celic MDA-MB-231 v gojišču s 4,5 g/L glukoze (A), z 1 g/L glukoze (B) in brez glukoze (0 g/L) (C).

Število celic smo določili posredno z barvilom Hoechst. Celice MDA-MB-231 smo z metforminom tretirali 72 ur, menjava gojišča je potekala vsakih 24 ur. **A:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 12$). Opravljeni so bili 4 neodvisni poskusi, vsak v 3 ponovitvah. $*P < 0,05$. **B:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 9$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 3 ponovitvah. **C:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 9$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 3 ponovitvah. $*P < 0,05$.

4.2 VPLIV 2-DEOKSI-D-GLUKOZE NA PREŽIVETJE CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231 PRI TRETIRANJU Z METFORMINOM

Vpliv inhibitorja glikolize 2-DG na delovanje metformina v kulturi celic MDA-MB-231 smo preverjali v gojišču z visoko (4,5 g/L) in fiziološko (1 g/L) koncentracijo glukoze. Pri tem smo vedno uporabili enako koncentracijo 2-DG v kombinaciji z izbranimi koncentracijami metformina, ki so bile v obeh gojiščih enake. S testom MTS smo nato preverili presnovno aktivnost celic, ki smo jo izrazili relativno glede na presnovno aktivnost v kontrolni skupini (Slika 9).

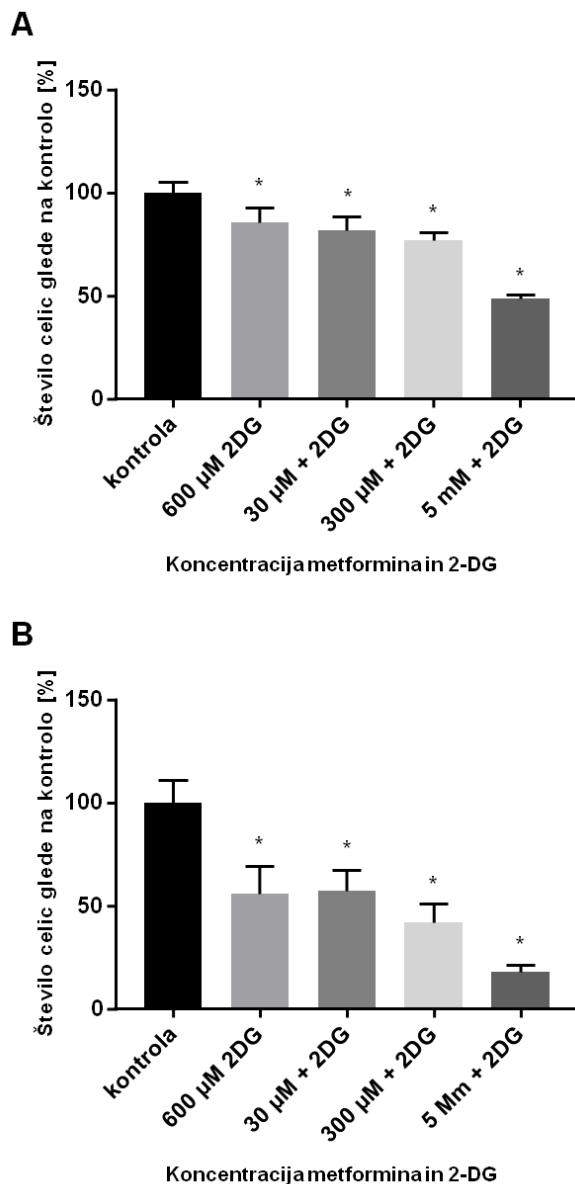
Da bi preverili, ali 2-DG spremeni občutljivost celic MDA-MB-231 na metformin, smo jih tretirali 72 ur s 600 µM 2-DG in različnimi koncentracijami metformina. Pri visoki koncentraciji glukoze tretiranje samo z 2-DG ni imelo večjega vpliva na presnovno aktivnost celic MDA-MB-231 (Slika 9 A). Pri fiziološki koncentraciji glukoze pa je tretiranje z 2-DG znižalo presnovno aktivnost za približno 25 % ($P<0,05$). Tretiranje z 2-DG je povečalo učinek metformina pri visoki in fiziološki koncentraciji glukoze v gojišču (Slika 9 A, B). V nasprotju s poskusi brez 2-DG (Slika 7 A, B in Slika 8 A, B) je presnovna aktivnost celic MDA-MB-231 padala sorazmerno z naraščanjem koncentracije metformina. Najnižjo presnovno aktivnost smo izmerili pri celicah, ki so bile izpostavljene 2-DG in 5 mM metforminu; v gojišču z visoko koncentracijo glukoze je bilo v tem primeru presnovno aktivnih okoli 70 % celic glede na netretirano kontrolo ($P<0,05$) (Slika 9 A), v gojišču s fiziološko koncentracijo pa le še okoli 20 % celic ($P<0,05$) (Slika 9 B). Standardni odklon je v gojišču z visoko koncentracijo glukoze precej večji kot pri prejšnjih poskusih, in to ravno pri statistično značilnih rezultatih, ki ju predstavlja 1 mM in 5 mM metformin z dodatkom 2-DG. V gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze je standardni odklon majhen, glede na kontrolo pa so statistično značilni prav vsi rezultati.



Slika 9: 2-DG poveča učinek metformina na celice MDA-MB-231 v gojišču z visoko (4,5 g/L) (A) in fiziološko (1 g/L) (B) koncentracijo glukoze.

Presnovno aktivnost celic smo določili s testom MTS. Celice MDA-MB-231 smo 72 ur sočasno tretirali z metforminom in 2-DG v gojišču z visoko ali fiziološko koncentracijo glukoze. Menjava gojišča je potekala vsakih 24 ur. **A:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. $*P < 0,05$. **B:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 8$). Opravljeni so bili 4 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. $*P < 0,05$.

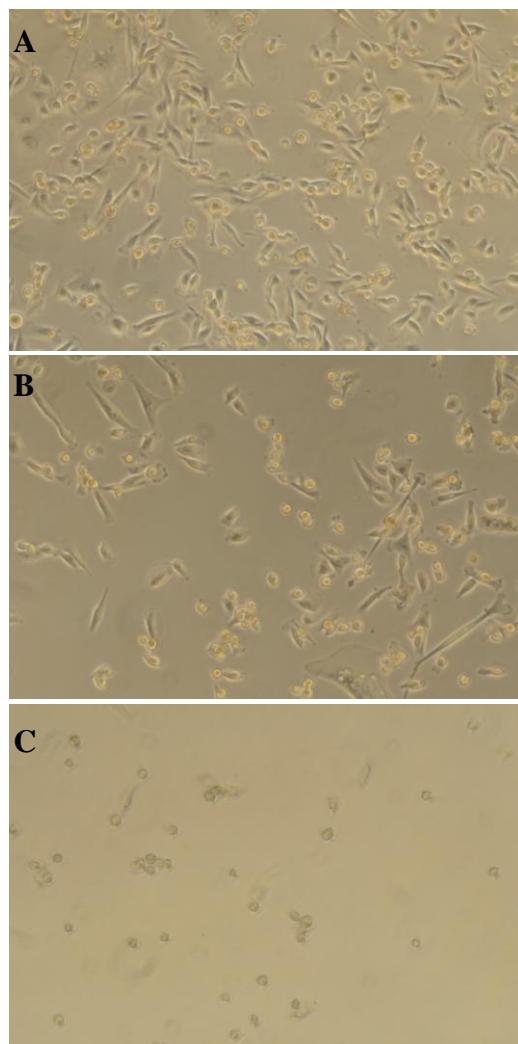
Učinke tretiranja z 2-DG smo preverili še z barvanjem jeder z barvilm Hoechst, s katerim smo ocenili število pritrjenih celic MDA-MB-231. Tretiranje s 600 µM 2-DG je zmanjšalo število celic MDA-MB-231 pri visoki (Slika 10A) in fiziološki (Slika 10B) koncentraciji glukoze v gojišču. Sočasno tretiranje s 600 µM 2-DG in različnimi koncentracijami metformina je število celic še dodatno zmanjšalo. Učinek kombinacije 2-DG in metformina na število pritrjenih celic MDA-MB-231 je prav tako kot pri testu MTS (Slika 9) bolj izrazit pri fiziološki koncentraciji glukoze v gojišču (Slika 10). Število celic se je pri sočasnem tretiranju z 2-DG in metforminom v obeh gojiščih zmanjševalo sorazmerno z naraščanjem koncentracije metformina. V gojišču z visoko koncentracijo glukoze se je število celic MDA-MB-231 pri tretiranju z 2-DG in 5 mM zmanjšalo za 50 % glede na netretirano kontrolo ($P<0,05$) (Slika 10A). V gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze pa se je v teh razmerah število celic zmanjšalo za 80 % ($P<0,05$). Barvanje s Hoechstom (Slika 10) je pri vseh tretiranjih pokazalo bolj izrazite spremembe kot pri merjenju presnovne aktivnosti s testom MTS (Slika 9).



Slika 10: 2-DG poveča učinek metformina na celice MDA-MB-231 v gojišču z visoko (4,5 g/L) (A) in fiziološko (1 g/L) koncentracijo glukoze (B).

Število celic smo določili z barvilom Hoechst. Celice MDA-MB-231 smo sočasno tretirali z metforminom in 2-DG 72 ur v gojišču z nizko koncentracijo glukoze. Menjava gojišča je potekala vsakih 24 ur. **A:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 9$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 3 ponovitvah. $*P < 0,05$. **B:** Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 9$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 3 ponovitvah. $*P < 0,05$.

Da bi učinke 2-DG in metformina, ki smo jih ovrednotili s testom MTS in barvilo Hoechst še dodatno preverili, smo med poskusom pri fiziološki koncentraciji glukoze naredili tudi nekaj fotografij celic MDA-MB-231 (Slika 11), da lahko vidimo kako metformin in 2-DG vplivata na razrast in obliko celic. V primerjavi z netretiranimi celicami MDA-MB-231 (Slika 11A) smo pri tretiranju s $600 \mu\text{M}$ 2-DG (Slika 11B) opazili zmanjšano gostoto celic. Celice pa so se tudi morfološko spremenile. Najbolj izrazita sprememba je bila pojav okroglih celic, ki verjetno predstavljajo mrtve celice v procesu odstopanja od podlage. Sočasno tretiranje s 5 mM metforminom in $600 \mu\text{M}$ 2-DG je število celic močno zmanjšalo (Slika 11C). Pri mikroskopskem pregledu so v večini vidnih polj prevladovale okroglo oblikovane celice, kar nakazuje, da je le malo celic preživelno tretiranje. Čeprav nismo naredili natančnejše kvantitativne morfološke analize preparatov celičnih kultur pa so ti rezultati skladni z rezultati testa MTS in barvanja s Hoechstom.



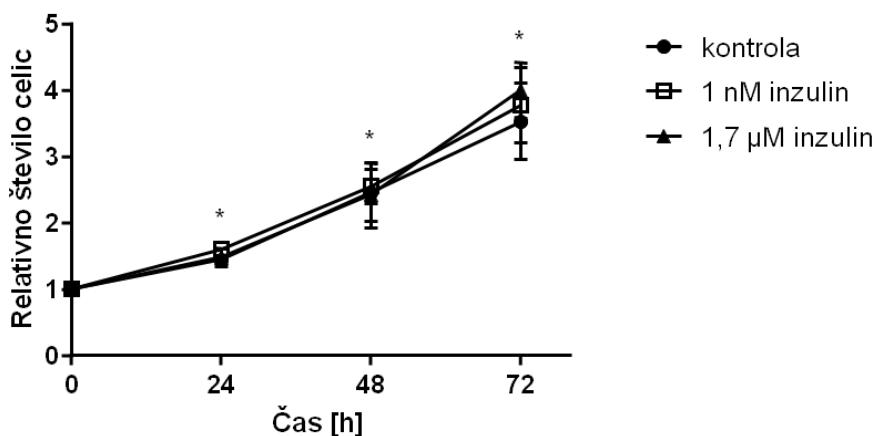
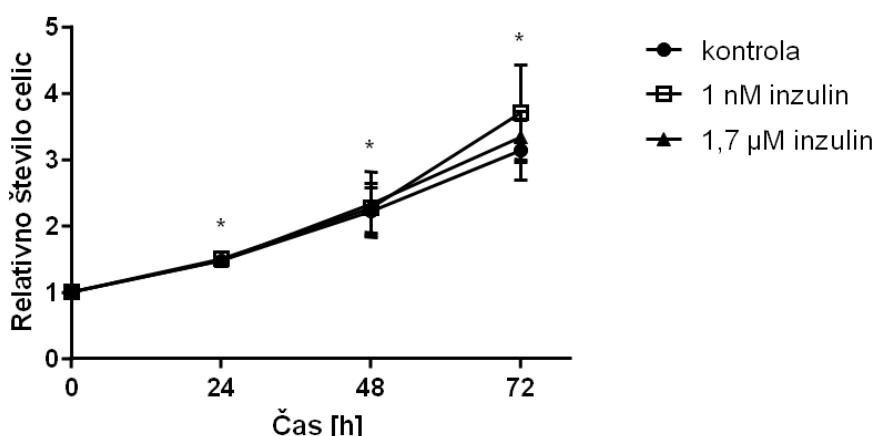
Slika 11: Celice MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L).

Celice smo fotografirali pri 100-kratni povečavi mikroskopa, slike pa so bile posnete po 72 urah inkubacije z ali brez dodatka metformina in 2-DG. **A:** Netretirana kontrolna skupina. **B:** Celicam smo dodali $600 \mu\text{M}$ 2-DG. **C:** Celicam smo dodali 5 mM metformin ter 2-DG.

4.3 VPLIV INZULINA NA DELITEV CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231

Da bi preverili, ali inzulin vpliva na delitev celic raka dojke MDA-MB-231, smo jih gojili v prisotnosti ali odsotnosti inzulina. Preverili smo vpliv visoke ($1,7 \mu\text{M}$) in nizke (1 nM) koncentracije inzulina na število celic MDA-MB-231, ki smo jih gojili pri fiziološki koncentraciji glukoze. Preverjali pa smo tudi, kako menjava gojišča vpliva na delitev celic. Poskuse smo zato razdelili na dve skupini: v prvi skupini smo celicam vsakih 24 ur zamenjali gojišče, v drugi skupini pa celicam gojišče čez celotno časovno obdobje inkubacije (72 ur) nismo zamenjali. Tako smo pridobili rastno krivuljo celic ob prisotnosti inzulina. Kontrolo so predstavljale netretirane celice v gojišču z 1 g/L glukoze, rezultati pa so predstavljeni kot relativno število celic glede na netretirano kontrolno skupino.

Relativno število celic MDA-MB-231, ki jim gojišča nismo menjali (Slika 12A), je bilo po 48 in 72 urah nekoliko večje kot število celic, ki smo jim gojišče menjali (Slika 12B). To nakazuje, da bi pogosto menjanje gojišča lahko neugodno vplivalo na rast celic, vendar tega učinka nismo natančneje preučili. Nizka in visoka koncentracija inzulina nista pomembno vplivali na število celic po 24 in 48 urah tretiranja. Manjša in nekonsistentna razlika v številu celic pa se je pokazala pri 72-urnem tretiranju. Če gojišča nismo menjali, se je število celic MDA-MB-231 pri tretiranju z $1,7 \mu\text{M}$ inzulinom povečalo za 14 % v primerjavi z netretirano, kontrolno skupino ($P<0,05$) (Slika 12A). Pri redni menjavi gojišča pa se je število celic MDA-MB-231 pri tretiranju z 1 nM inzulinom povečalo za 18 % ($P<0,05$), medtem ko $1,7 \mu\text{M}$ inzulin ni imel pomembnega učinka. Rezultati tako kažejo, da bi dolgotrajnejša izpostavitev inzulinu lahko neposredno povečala število celic. Za zanesljivejšo opredelitev koncentracijske odvisnosti bi bilo potrebno narediti še dodatne poskuse.

A**B**

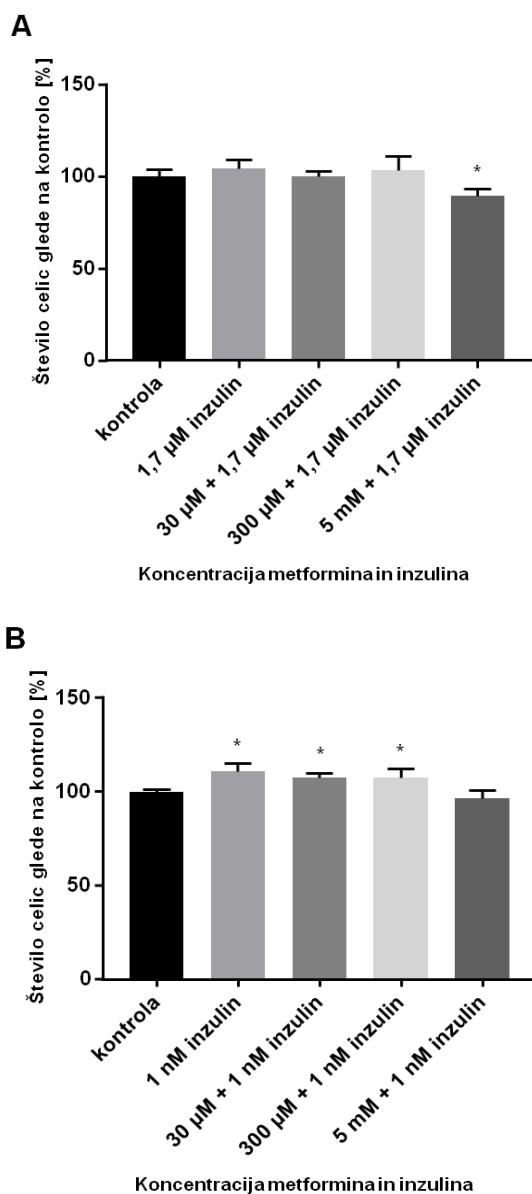
Slika 12: Inzulin vpliva na rast celic MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L).

Celice MDA-MB-231 smo z inzulino tretirali 72 ur v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1g/L). Relativno število celic smo določili z barvilom Hoechst. **A:** Brez menjave gojišča. Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. Dvosmerni test ANOVA. $*P < 0,05$ v primerjavi z 0 h. **B:** Menjava gojišča je potekala vsakih 24 ur. Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. Dvosmerni test ANOVA. $*P < 0,05$ v primerjavi z 0 h.

4.4 VPLIV METFORMINA NA Z INZULINOM SPODBUJENO DELITEV CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231

Vpliv metformina na z inzulinom spodbujeno delitev celic raka dojke MDA-MB-231 smo preverjali v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L). Testirali smo učinek izbranih koncentracij metformina pri visoki (1,7 μ M) ter nizki (1 nM) koncentraciji inzulina, število celic MDA-MB-231 pa smo določili z barvilom Hoechst. Prvo kontrolo so predstavljale netretirane celice v gojišču z 1 g/L glukoze, drugo kontrolo pa celice z dodatkom inzulina. Rezultati so predstavljeni kot odstotek števila celic različnih vzorcev glede na netretirano kontrolno skupino.

Namen teh poskusov je bil preveriti, ali metformin zmanjša z inzulinom spodbujeno delitev celic raka dojke. Celice MDA-MB-231 smo za 72 ur izpostavili visoki (1,7 μ M) ali nizki (1 nM) koncentraciji inzulina in različnim koncentracijam metformina. Gojišče smo menjali vsakih 24 ur. Skladno s prejšnjimi poskusi (Slika 12) 1,7 μ M inzulin ni imel pomembnega učinka na število celic MDA-MB-231 (Slika 13A), medtem ko je 1 nM inzulin povečal število za približno 10 % ($P<0,05$). Tretiranje z 1,7 μ M inzulinom in 5 mM metforminom je zmanjšalo število celic v primerjavi s kontrolo za 11 % ($P<0,05$). Tretiranje z 1 nM inzulinom ni povečalo števila celic MDA-MB-231 pri sočasnem tretiranju s 5 mM metforminom. Ta rezultat nakazuje, da metformin preprečuje učinke nizkih koncentracij inzulina na delitev celic MDA-MB-231.

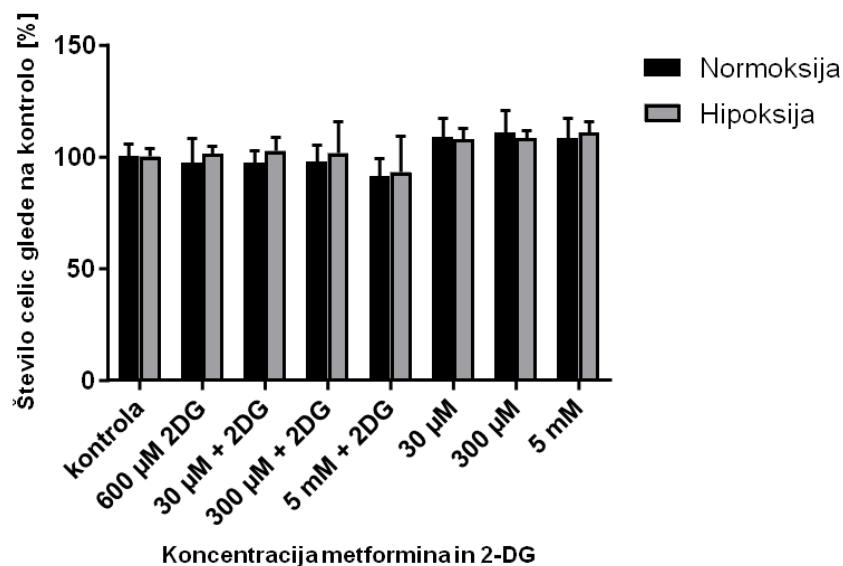


Slika 13: Metformin zmanjša učinek inzulina na celice MDA-MB-231.

Celice MDA-MB-231 smo 72 ur sočasno tretirali z metforminom in inzulino v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L). Menjava gojišča je potekala vsakih 24 ur. Število celic smo določili z barvilom Hoechst. **A:** Uporabili smo visoko koncentracijo inzulina (1,7 μ M) v kombinaciji z metforminom. Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. * $P < 0,05$. **B:** Uporabili smo fiziološko koncentracijo inzulina (1 nM) v kombinaciji z metforminom. Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. * $P < 0,05$.

4.5 VPLIV HIPOKSIJE NA DELOVANJE METFORMINA V KULTURI CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231

S poskusi v hipoksiji smo želeli preveriti učinek metformina na celice raka dojke MDA-MB-231, saj je hipoksija pomembna značilnost rakavih tkiv in se pogosto pojavlja pri raku dojke. Ker je tudi v zdravih tkivih koncentracija kisika lahko zelo nizka (1 %) v primerjavi s koncentracijo kisika v celičnih kulturah (18-20 %), smo celice MDA-MB-231 izpostavili 0,5 % koncentraciji kisika, ki se zanesljivo nahaja v patološkem območju. V splošnem smo opazili, da je bilo relativno število celic MDA-MB-231 po 24-urni izpostavitvi hipoksičnim razmeram zelo podobno kot v normoksičnih razmerah (Slika 14). Pomembnih razlik v delovanju metformina ali 2-DG v hipoksičnih in normoksičnih razmerah nismo opazili.



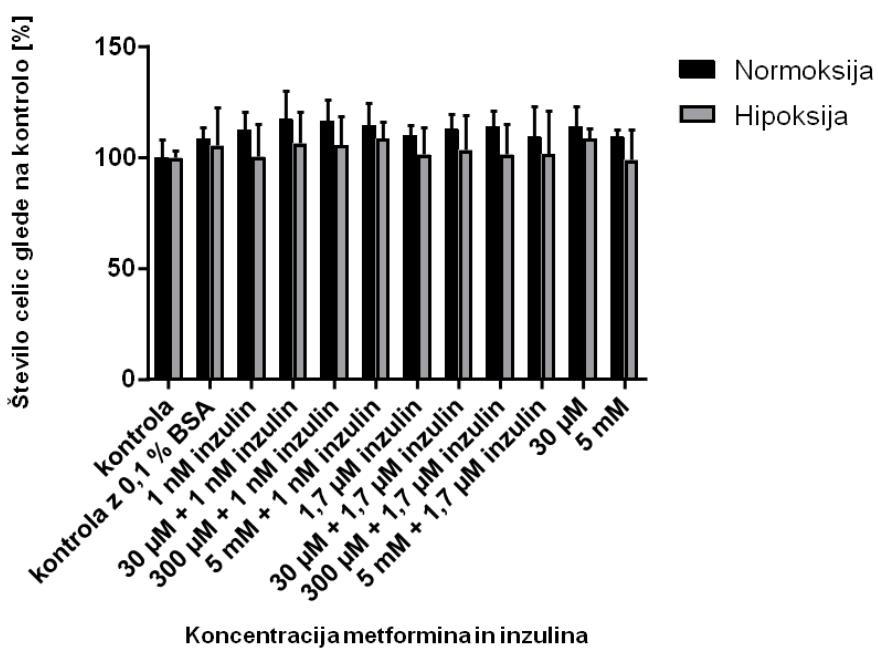
Slika 14: Vpliv hipoksije na delovanje metformina in 2-DG na celice MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L).

Celice MDA-MB-231 smo 24 ur sočasno tretirali z metforminom in 2-DG ter samo z metforminom v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze. Število celic smo določili z barvilom Hoechst. **Normoksija:** Kontrolni poskus, ki je potekal v standardnih razmerah (18-19 % kisika). Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 8$). Opravljeni so bili 4 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. **Hipoksija:** Poskus v hipoksiji (0,5 % O₂). Na grafu je prikazan standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah.

Preverili smo tudi, kako 24-urna hipoksija vpliva na delovanje metformina v prisotnosti inzulina. Število celic je bilo pri vseh tretiranjih nekoliko večje v normoksičnih kot hipoksičnih razmerah (Slika 15). Pri tretiranju z nizko koncentracijo inzulina (1 nM) se je pokazal trend k povečanju števila celic, če smo jih gojili v normoksičnih razmerah. V hipoksiji tega trenda nismo opazili, kar nakazuje, da bi hipoksija lahko zavirala rastne

učinke inzulina. Statistično značilnih razlik med tretiranji ni bilo, kar pa je verjetno vsaj delno posledica velike biološke variabilnosti rezultatov. Metformin ni imel pomembnih učinkov na število celic MDA-MB-231 niti v normoksičnih niti v hipoksičnih razmerah. Sočasno tretiranje z inzulinom prav tako ni imelo pomembnega učinka na število celic.

Tudi v tako kratkem času inzulin v normoksičnih razmerah nima vpliva na delitev celic, s tem da je število celic večje tam, kjer smo dodali nizko (1 nM) in ne visoko (1,7 μ M) koncentracijo inzulina. Vpliv samega metformina je podoben kot na Sliki 14, saj niti v normoksičnih niti v hipoksičnih razmerah njegov vpliv na zmanjšanje rasti celic ni velik, se pa opazi zmanjšanje pri koncentraciji 5 mM v primerjavi s 30 μ M metforminom. Vendar pa statistično značilnih razlik ni bilo ne v normoksiji ne v hipoksiji. Tudi odstopanje rezultatov med biološkimi ponovitvami je bilo precej veliko, kar vodi do večjega standardnega odklona.



Slika 15: Vpliv hipoksije na delovanje metformina in inzulina na celice MDA-MB-231 v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze (1 g/L).

Celice MDA-MB-231 smo 24 ur sočasno tretirali z metforminom in inzulinom ter samo z metforminom v gojišču s fiziološko koncentracijo glukoze. Število celic smo določili z barvilom Hoechst. **Normoksija:** Kontrolni poskus, ki je potekal v standardnih razmerah (18-19 % kisika). Na grafu sta prikazana povprečna vrednost in standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah. **Hipoksija:** Poskus v hipoksiji. Na grafu sta prikazana povprečna vrednost in standardni odklon ($n = 6$). Opravljeni so bili 3 neodvisni poskusi, vsak v 2 ponovitvah.

5 RAZPRAVA

Metformin, ki se zelo pogosto uporablja za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2, bi lahko bil uporaben za preprečevanje in/ali za adjuvantno zdravljenje raka dojke. Molekularni mehanizmi protitumornega delovanja metformina niso povsem jasni. Po dosedanjih raziskavah bi lahko zaviral nastanek raka dojke zaradi ugodnih sistemskih učinkov na presnovo glukoze. Po drugi strani pa raziskave nakazujejo, da bi lahko imel tudi neposredne protitumorne učinke na rakaste celice. Kljub številnim raziskavam zaenkrat še nimamo enoznačnega odgovora glede neposrednih učinkov metformina na celice raka dojke. V naši raziskavi smo preučili vpliv koncentracije glukoze, inzulina in kisika na protitumorno delovanje metformina v kulturi celic MDA-MB-231, ki so eden izmed najbolj pogosto uporabljenih *in vitro* modelov za preučevanje raka dojke. Ugotovili smo, da pri nizki koncentraciji glukoze v gojišču celice MDA-MB-231 postanejo zelo občutljive na metformin. Podobno kot pri nizki koncentraciji glukoze se občutljivost celic MDA-MB-231 na metformin poveča, če inhibiramo glikolizo z 2-DG. Ugotovili smo tudi, da metformin prepreči z inzulinom spodbujeno delitev celic MDA-MB-231. Hipoksija pa ni imela pomembnega vpliva na protitumorno delovanje metformina.

Koncentracija glukoze v gojišču je imela velik vpliv na protitumorno delovanje metformina v kulturi celic MDA-MB-231. Največji učinek metformina je bil v gojišču, kjer glukoza ni bila prisotna, učinek pa je bil najmanjši pri visoki koncentraciji glukoze v gojišču (Sliki 7 in 8). Dobljeni rezultati niso povsem skladni s prejšnjimi raziskavami, kjer so ugotovili, da metformin dobro učinkuje na celice MDA-MB-231 pri fiziološki koncentraciji glukoze v gojišču (Zordoky in sod., 2014; Sinnott-Smith in sod., 2013; Vazquez in sod., 2010). V naši raziskavi pa metformin ni zmanjšal preživetja MDA-MB-231 pri fiziološki koncentraciji glukoze. Razlika v učinku je po vsej verjetnosti posledica razlik v protokolu menjav gojišča. Celice MDA-MB-231 so velik porabnik glukoze in njena koncentracija pri inkubacijah daljših od 24 ur hitro pada na nizke vrednosti (Rajh in sod., 2016). Da bi se izognili prevelikim spremembam v koncentraciji glukoze smo gojišče menjali vsakih 24 ur. V drugih raziskavah pa so pogosto celice inkubirali skupaj z metforminom več kot 48 ur brez menjave gojišča. Na podlagi tega lahko sklepamo, da se je pri teh raziskavah učinek metformina pokazal, ker je bila koncentracija glukoze (zaradi porabe) zelo nizka. Tej hipotezi pritrjujejo naši rezultati, ki kažejo, da postanejo celice MDA-MB-231 bistveno bolj občutljive na metformin, če so izpostavljeni nizkim koncentracijam glukoze ali inhibitorjem glikolize, kot je 2-DG.

Pri nizki koncentraciji glukoze v gojišču je privzem glukoze v celice manjši, kar pomeni, da verjetno ne zadošča za sintezo ATP. Del ATP se zato pridobiva z oksidativno fosforilacijo v mitohondrijih. Metfomin inhibira kompleks I dihalne verige (NADH dehidrogenaza), s čimer upočasni sintezo ATP v mitohondrijih in povzroči rahel energijski stres v celici (Stephenne in sod., 2011; Vander Heiden, 2011; Wheaton in sod., 2014). Ker

so pri nizki koncentraciji glukoze celice bolj odvisne od oksidativne fosforilacije, metformin v teh razmerah povzroči pomanjkanje energije. Zaradi tega se aktivira AMPK, ki nadzoruje energijsko homeostazo v celici. Aktivacija AMPK zavre signalno pot mTOR (Sorokin in sod., 2016), kar zaustavi rast in delitev rakastih celic (Malaguti in sod., 2013).

Za celice MDA-MB-231 so značilne tudi različne mutacije, ki povzročijo okvaro v delovanju mitohondrijev, zaradi česar se oksidativna fosforilacija zmanjša (Pellicano in sod., 2014). Majhna kapaciteta za oksidativno fosforilacijo še dodatno pojasnjuje, zakaj so celice MDA-MB-231 v primerjavi z drugimi podtipi celic raka dojke bolj odvisne od glikolize in ustrezne koncentracije glukoze v gojišču. Razumljiva je tudi njihova večja občutljivost na inhibitorje glikolize, kot je 2-DG (Pellicano in sod., 2014). Naši rezultati tako potrjujejo, da je delovanje metformina na celice MDA-MB-231 odvisno od koncentracije glukoze v gojišču. Hkrati pa nakazujejo, da ob vzdrževanju koncentracije glukoze v fiziološkem območju, metformin nima pomembnih protitumornih učinkov na celice MDA-MB-231. To je pomembna ugotovitev tudi zato, ker imajo bolniki s sladkorno boleznijo kronično hiperglikemijo, metformin pa je pogosto uporabljen antidiabetično zdravilo, ki koncentracijo glukoze v krvi z inhibicijo jetrne glukoneogeneze niža. Ker je razvoj raka dojke povezan tudi s kronično hiperglikemijo in hiperinzulinemijo, bi lahko metformin, ki zniža koncentracijo glukoze in inzulina, posredno zmanjšal možnost nastanka ali nadaljnega razvoja raka dojke.

Vsaj teoretično bi lahko protitumorne učinke metformina dodatno povečali ob sočasnem farmakološkem znižanju koncentracije glukoze. Praktično težavo pri tem pa predstavlja homeostaza presnove glukoze v razmerah *in vivo*. Po eni strani homeostatični mehanizmi nasprotujejo znižanju koncentracije glukoze, zaradi česar se v telesu koncentracija glukoze v normalnih razmerah ne more dovolj znižati, da bi bilo s tem delovanje metformina učinkovitejše. Po drugi strani pa izrazito znižanje koncentracije glukoze ni zaželeno, čeprav bi povečalo neposredne protitumorne učinke metformina. Hipoglikemija namreč lahko življenjsko ogrozi bolnika zaradi motenj v delovanju možganov.

Za testiranje učinka 2-DG smo se odločili, ker bi metformin lahko bil uporaben tudi v kombinaciji z inhibitorji glikolize. Zaradi inhibicije glikolize 2-DG posnema učinek pomanjkanja glukoze (Zhang in sod., 2016). Zaradi upočasnjene presnove glukoze se zmanjša sinteza ATP, kar posredno ali neposredno zmanjša oziroma zaustavi celično rast in spodbudi celično smrt (Zagorodna in sod., 2012; Golding in sod., 2013; Giammarioli in sod., 2011). 2-DG torej podobno kot metformin povzroči energijski stres v celici. Sočasno tretiranje z metforminom in 2-DG pa deluje sinergistično, ker skupaj zavrejo tako oksidativno fosforilacijo kot tudi glikolizo. Prav iz tega vidika pa je kombinacija 2-DG in metformina učinkovitejša kot samo tretiranje celic z eno ali drugo učinkovino posebej. To potrjujejo tudi naši rezultati. Rakave celice, ki so izpostavljene le metforminu, se na inhibicijo oksidativne fosforilacije prilagodijo tako, da pospešijo glikolizo. Ob sočasni

izpostavitvi 2-DG pa ta prilagoditev ni možna, kar celice vodi v hud energijski stres ali celo propad. Zato je razumljivo, da so se učinki sočasnega tretiranja celic raka dojke MDA-MB-231 z metforminom in 2-DG v naših poskusih pokazali že pri visoki koncentraciji glukoze v gojišču, pri kateri tretiranje s samim metforminom ni imelo nobenega učinka. Pomembno je, da se tudi pri visoki koncentraciji glukoze protitumorni učinek kombinacije teh dveh učinkovin pokaže že pri koncentraciji metformina ($30 \mu\text{M}$), ki jo lahko dosežemo v razmerah *in vivo*. Naši rezultati torej nakazujejo, da bi 2-DG lahko okreplila protitumorne učinke metformina na celice raka dojke tudi pri bolnicah s sladkorno boleznijo tipa 2, ki imajo kronično hiperglikemijo.

Da so celice MDA-MB-231 res zelo občutljive na pomanjkanje glukoze, se je še dodatno pokazalo pri poskusih s fiziološko koncentracijo glukoze. Pri tej koncentraciji glukoze je tretiranje z metforminom in 2-DG povzročilo obsežen propad celic. To lahko pripisemo vsaj trem dejavnikom: pomanjkanju substrata (glukoze), inhibiciji glikolize in inhibiciji kompleksa I dihalne verige. V tem primeru lahko celice MDA-MB-231 pridobijo energijo samo še z vstopanjem redukcijskih ekvivalentov prek kompleksa II dihalne verige (Dröse, 2013). Gledano v celoti, naši rezultati nakazujejo, da bi kombinacija metformina in 2-DG lahko imela neposreden učinek na celice raka dojke. Seveda pa bi bilo potrebno opraviti še dodatne raziskave, kjer bi dodatno preučili učinek nižjih koncentracij metformin. Klinično pomembno koncentracijo v naših poskusih predstavlja le $30 \mu\text{M}$ metformin, pri kateri pa je bil učinek na rakave celice skoraj neopazen.

Treba bi bilo narediti tudi več dodatnih raziskav, ki bi vključevale še druge tipe celic raka dojke. Poskusi z drugimi celičnimi modeli za rak dojke so pomembni, ker so celice MDA-MB-231 *in vitro* model za trojno negativni rak dojke, ki se po svojih značilnostih precej razlikuje od drugih tipov raka dojke. Poleg tega so celično linijo MDA-MB-231 pridobili iz plevralnega izliva, v katerem so se nahajale metastatske celice adnokarcinoma dojke. Zaradi svoje agresivnosti in metastatskega potenciala so mnoge biološke lastnosti celic MDA-MB-231, precej drugačne od rakavih celic v zgodnejših fazah razvoja raka dojke. Ali se razlikujejo tudi po svoji občutljivosti na metformin na podlagi naših poskusov ne moremo sklepati; za to bi bile potrebne dodatne raziskave. Zato menimo, da je pri kakršnikoli ekstrapolaciji rezultatov, pridobljenih v kulturi celic MDA-MB-231, na druge tipe celic raka dojke potrebna precejšnja mera previdnosti.

Inzulin ni le presnovni hormon, ampak deluje tudi kot rastni dejavnik, ki spodbuja celične delitve in celično preživetje (Chandran in sod., 2012; Pollak, 2008). V naši raziskavi smo preverili, ali inzulin vpliva na rast celic MDA-MB-231 pri fiziološki koncentraciji glukoze v gojišču. Ker smo se pri poskusih že zelo bolj približati fiziološki koncentraciji inzulina v krvi, smo izbrali koncentracijo 1 nM , ker je zelo podobna normalni postprandialni koncentraciji inzulina ($\sim 600 \text{ pM}$) in je v območju koncentracij, ki jih lahko srečamo pri bolnicah s sladkorno boleznijo tipa 2. Ugotovili smo, da ima inzulin majhen vpliv na

število celic, ampak le pri daljših izpostavitvah (72 ur). Da ima inzulin tako majhen učinek nismo pričakovali, ker celice MDA-MB-231 izražajo receptor za IGF-1 (Chandran in sod., 2012), prek katerega bi inzulin lahko spodbujal njihovo rast in preživetje. Verjetno je tako majhen učinek inzulina tudi posledica spremenjenih bioloških lastnosti celic MDA-MB-231. Ker so bile celice MDA-MB-231 pripravljene iz metastatskega plevralnega izliva bolnice z adenokarcinomom dojke, lahko sklepamo, da imajo kot metastatske celice visoko stopnjo avtonomije in so manj občutljive na vse zunanje dražljaje, vključno z inzulinom.

Kljub temu, da je bila pri obeh poskusih z inzulinom rast celic MDA-MB-231 počasnejša v kontrolnih (netretiranih) skupinah (Slika 12), je bil učinek inzulina na rast celic nekonsistenten in precej raznolik. Med drugim smo na primer opazili, da je bilo v poskusu brez menjave gojišča število celic MDA-MB-231 večje pri tretiranju z $1,7 \mu\text{M}$ inzulinom, pri poskusu z menjavo gojišča pa pri tretiranju z 1nM inzulinom. Vzroka za razkorak v učinkih inzulina z našimi rezultati ne moremo pojasniti. K povečani rasti celic, ki smo jim dodali inzulin, je lahko pomembno prispeval tudi goveji serumski albumin, ki je bil vedno dodan raztopini inzulina. Albumin smo dodajali, ker prepreči vezavo inzulina na steno epruvete ali mikrotitrsko plošče. Ugotovitev, da tretiranje z albuminom nekoliko poveča število celic (Slika 15), lahko vsaj delno razloži pojav, da je število celic večje glede na kontrolo, statistično pa inzulin ni imel vpliva. Spodbujevalen učinek albumina bi lahko bil posledica njegovega antioksidativnega delovanja. Druga možnost pa je, da so celice albumin uporabile kot dodaten vir aminokislin.

Hiperinzulinemija in hiperglikemija pri sladkorni bolezni tipa 2 povečujeta stopnjo tveganja za nastanek raka dojke (Stankowski-Drengler in sod., 2013). Čeprav so naši rezultati, ki kažejo le zelo blag in neprepričljiv učinek inzulina na delitev celic MDA-MB-231, na videz paradoksnii, pa moramo pri razlagi rezultatov upoštevati tudi molekularne mehanizme, prek katerih inzulin deluje na celice žlezno tkivo dojke. Povišane ravni inzulina naj bi se med drugim izrazile v povečani sintezi ter aktivnosti estrogenskih receptorjev, kar spodbuja prekomerno rast tkiva dojk (Stankowski-Drengler in sod., 2013). Če izhajamo iz te ugotovitve, lahko naše rezultate pojasnimo vsaj na dva načina. Prvič: v gojišču nismo dodajali estrogena. Da bi preverili, ali je inzulin vplival na preživetje celic MDA-MB-231 prek učinka na izražanje estrogenskih receptorjev, bi morali narediti dodatne poskuse, pri katerih bi celice izpostavili estrogenu. Določiti pa bi morali tudi izražanje estrogenskih receptorjev. Drugič: celice MDA-MB-231 so model za trojno negativni rak dojke, za katerega je značilno, da ne izraža estrogenskih receptorjev. Če upoštevamo to lastnost celic MDA-MB-231, ugotovitev, da inzulin nima večjega učinka na njihovo delitev, ni tako presenetljiva. Bolj nenavadno je, da je menjava gojišča nekoliko upočasnila rast celic MDA-MB-231. Ker z menjavo gojišča vzdržujemo konstantno koncentracijo glukoze (Rajh in sod., 2016), bi namreč lahko pričakovali, da se bodo celice MDA-MB-231 hitreje delile ob rednih menjavah gojišča. Manjšo rast pri menjavi gojišča bi morda lahko pojasnili z mehaničnimi poškodbami celic pri odstranjevanju starega in

dodajanju svežega gojišča. Redna menjava gojišča pa bi lahko tudi znižala koncentracijo rastnih dejavnikov, ki jih izločajo celice v gojišče. Da bi preverili te predpostavke, bi seveda morali narediti dodatne poskuse.

Hipoksija je pomembna značilnost rakavih tkiv in ima različne učinke na biologijo raka (Guzy in sod., 2005). Je tudi negativen napovedni dejavnik, saj spreminja presnovne poti in povzroča genomsko nestabilnost, kar lahko vpliva na prilagoditev rakavih celic na dane razmere v mikrookolju in s tem povzroči večjo odpornost na zdravljenje. Hipoksija tudi inhibira apoptozo celic MDA-MB-231 ter sproži njihovo dediferenciacijo, s katero pridobijo fenotip matičnih celic, kar je lahko tudi eden izmed razlogov njihove invazivnosti (Xie in sod., 2016). Hipoksija v naših poskusih ni imela pomembnega učinka na delovanje metformina in 2-DG. Na podlagi tega lahko sklepamo, da bi metformin in 2-DG lahko delovala tudi v hipoksičnem rakastem tkivu. Seveda je treba upoštevati, da je takšno tkivo običajno tudi ishemično. Ishemija ne povzroča samo pomanjkanja kisika in glukoze, ampak zaradi nizkega ali povsem odsotnega toka krvi zmanjša tudi prodiranje metformina v tkivo. Čeprav naši poskusi lepo kažejo, da so rakaste celice v takšnih razmerah občutljive na delovanje metformina, bi se v razmerah *in vivo* lahko zgodilo, da metformin sploh ne doseže svojega cilja. Upoštevati je treba tudi sam čas tretiranja celic v hipoksiji, saj smo pri testiranju hipoksije celice tretirali 24 ur, medtem ko smo jih pri prejšnjih poskusih tretirali 72 ur. Daljsa prisotnost učinkovine naj bi bolje vplivala na zmanjšanje rasti rakavih celic, kar je razvidno iz naših rezultatov. Možno pa je tudi, da bi se celice pri daljšem tretiranju s hipoksijo na hipoksične razmere prilagodile in tako onemogočile delovanje obeh učinkovin.

Ena izmed ključnih ugotovitev naše raziskave je, da sestava gojišča zelo pomembno vpliva na rezultate poskusov. V osnovno gojišče RPMI-160 smo dodajali 10 % FBS, ki, predvsem zaradi vsebnosti rastnih in drugih pomembnih dejavnikov, pripomore k preživetju celic *in vitro*. Celice so pri takem načinu gojenja zelo občutljive na okoliške dejavnike, FBS pa predstavlja pomembno sestavino, ki poveča njihovo preživetje. Za preživetje, rast in delitev celic v razmerah *in vitro* je še posebej pomemben goveji serumski albumin, ki predstavlja 60 % celokupnih beljakovin v FBS (Francis, 2010). Celice tako že od samega začetka rastejo v razmerah, ki spodbujajo njihovo rast, s tem pa lahko pripomorejo tudi h končnemu izidu samih poskusov. To smo na primer opazili pri inzulinu, kjer bi dodatek albumina lahko spodbujal rast celic MDA-MB-231. Ker pa je albumin (zaradi FBS) prisoten tudi v gojišču netretiranih celic MDA-MB-231, bi bilo treba ta učinek še dodatno ovrednotiti.

Na rezultate poskusov pri različnih koncentracijah glukoze bi lahko vplivale tudi razlike v osmolarnosti. Gojišče s 4,5 g/L glukoze ima namreč v primerjavi z gojiščem brez glukoze osmolarnost višjo za 25 mOsmol/L. V primerjavi z gojiščem s fiziološko koncentracijo glukoze pa ima osmolarnost višjo za 19,4 mOsmol/L. Da bi izključili to možnost smo v

gojišče brez glukoze in v gojišče s fiziološko koncentracijo glukoze dodajali ustreznou koncentracijo manitola, s čimer smo izenačili osmolarnost vseh treh gojišč. Čeprav smo se na ta način izognili učinku osmolarnosti na naše rezultate, pa smo vnesli novo spremenljivko. Manitol namreč ni povsem inerten in lahko deluje antioksidativno, kar bi lahko vplivalo na protitumorno delovanje metformina in 2-DG.

Na rezultate poskusov bi lahko vplival tudi protokol menjave gojišč (Rajh in sod., 2016). Z menjavo gojišča smo vzdrževali stalno koncentracijo glukoze v gojišču, zaradi česar so celice ves čas imele na voljo dovolj glukoze, ki so jo uporabile za rast in preživetje. Na tak način smo poskušali razmere v kulturi približati razmeram *in vivo*, kjer se glukoza spreminja le v zelo ozkih mejah. Če gojišča ne bi redno menjali, bi koncentracija glukoze po 48 ali 72 urah padla na zelo nizke vrednosti (Rajh in sod., 2016). Posledično bi to lahko izrazito vplivalo na izide poskusov z metforminom, saj metformin najboljše deluje pri nizkih koncentracijah glukoze, kot so to dokazali že pri drugih raziskavah (Zordoky in sod., 2014; Sinnett-Smith in sod., 2013; Vazquez in sod., 2010).

Izbor ustrezne koncentracije farmakoloških učinkovin je pri načrtovanju poskusov zelo pomemben. Ko se preizkuša učinkovitost delovanja posameznih učinkovin, se pogosto na začetku v *in vitro* poskusih uporablajo višje koncentracije, da učinkovina pokaže svoj potencial. Vendar pa je zelo pomembno, da se v nadalnjih raziskovanjih uporablajo tudi nižje koncentracije, ki so primerne za uporabo pri človeku. Uporaba previsokih koncentracij učinkovin *in vitro* lahko pokaže učinke, ki se pri nižjih koncentracijah *in vivo* potem ne pokažejo. Pogosto se pri visokih koncentracijah izrazijo predvsem toksični učinki, zato lahko napačno predvidimo, da bo učinkovina delovala citotoksično tudi *in vivo*. Zato je pomembno, da smo v naših poskusih uporabili 2-DG v koncentraciji 600 µM. To je namreč koncentracija, ki jo lahko dosežemo pri človeku *in vivo* (Rajh in sod., 2016). Zelo visoke koncentracije 2-DG (~20 mM), kot so jih uporabljali pri nekaterih raziskavah (Wu in sod., 2010), so s kliničnega stališča manj relevantne. Tako visokih koncentracij brez hude sistemsko toksičnosti pri človeku namreč ni mogoče doseči (Dwarakanath in sod., 2009). Poleg tega ima pri takšnih koncentracijah 2-DG zelo verjetno tudi učinke, ki se pri nizkih koncentracijah na celični ravni ne izrazijo. Rezultate raziskav, kjer uporablajo visoke koncentracije 2-DG, je zato težko vrednotiti v kontekstu klinične uporabnosti 2-DG. Čeprav je na podlagi poskusov *in vitro* vedno tvegano sklepati o klinično uporabnosti farmakoloških učinkovin, pa naši rezultati vendarle kažejo, da ima 2-DG protitumorne učinke že v koncentracijah, ki jih lahko dosežemo pri človeku.

Velik problem pri preučevanju nizkih, klinično in fiziološko relevantnih, koncentracij učinkovin je, da se pogosto učinki v celični kulturi ne pokažejo. Primer za takšno učinkovino je tudi metformin, ki pri nizkih koncentracijah, ki so jih izmerili pri človeku, v celični kulturi praktično nima učinkov. Razkorak je lahko posledica spremenjenih bioloških lastnosti celic v kulturi. Če se celice v kulturi dediferencirajo in zmanjšajo

izražanje receptorjev, prenašalcev in drugih farmakoloških tarč, postanejo manj občutljive na delovanje testne učinkovine. V tem primeru lahko z uporabo nizkih koncentracij testne učinkovine zgrešimo pomemben farmakološki učinek, ki se kasneje razkrije pri poskusih *in vivo*. To smo opazili tudi pri naših poskusih, v katerih je bila najmanjša uporabljeni koncentraciji metformina ($30 \mu\text{M}$) praktično brez učinkov na delitev celic MDA-MB-231. Ker *in vivo* metformin ne doseže bistveno višjih koncentracij, je težko presoditi, ali so s kliničnega vidika učinki metformina, ki smo jih opazili pri koncentracijah 0,3-5 mM, pomembni ali ne. Po eni strani bi lahko šlo za klinično pomembne učinke, ki se v celični kulturi zaradi spremenjenih fizioloških lastnosti celic pojavijo šele pri višjih koncentracijah. Po drugi strani pa ne moremo izključiti možnosti, da ima metformin neposredne protitumorne učinke tudi *in vivo* šele pri zelo visokih koncentracijah. Odgovor na to vprašanje lahko pokaže šele raziskava v živalskem modelu.

Poleg uporabe primernih koncentracij učinkovin in sestave gojišča, ki predstavlja pomembno mikrookolje rakavih celic, je pri raziskavah pomembna tudi uporaba ustreznih metodoloških pristopov za testiranje učinkov na celice ter tudi sama izbira celic. Kot smo že omenili, dobljenih rezultatov tako ne moremo posploševati na ostale tipe raka dojke. Predstavljajo pa dobro podlago za načrtovanje nadaljnjih raziskav celic MDA-MB-231 in ostalih celičnih modelov za preučevanje raka dojke. Celične linije, ki bi jih še lahko uporabili pri naši raziskavi, so tako celice raka dojk MDA-MB-157, MDA-MB-468 in BT-549 (Tate in sod., 2012). Za testiranje vplivov izbranih dejavnikov na celice raka dojke MDA-MB-231 bi lahko poleg uporabljenih testov uporabili tudi druge metode, na primer pretočno citometrijo ali odtis western. Pri pretočni citometriji bi celice suspendirali, laser pa bi zaznal število celic, pri odtisu western pa bi ovrednotili izražanje in posttranslacijske modifikacije tarčnih beljakovin.

Ker so epidemiološke študije pokazale, da zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 z metforminom ščiti pred rakom dojke, se zastavlja vprašanje, ali bi bil metformin uporaben za protitumorno zdravljenje. Takšna repozicija metformina bi imela kar nekaj prednosti pred razvojem povsem novih protitumornih učinkovin.

Te prednosti so:

- metformin je že dolgo v klinični uporabi (uporaba ni sporna, kar bi se lahko zgodilo pri novi učinkovini);
- poznavanje farmakokinetike metformina;
- dobro poznani neželeni učinki metformina;
- relativno nizka toksičnost metformina;

Ker je vse to že znano, bi bilo potrebnih manj študij kot pri novi učinkovini, ki mora skozi vse standardne faze razvoja zdravila. Poleg prednosti pa se moramo pri metforminu zavedati tudi nekaterih pomembnih slabosti oziroma odprtih vprašanj:

- farmakodinamika metformina je relativno slabo opredeljena; dobro poznamo njegove končne učinke ne pa molekularnih mehanizmov, ki do teh učinkov

pripeljejo (farmakološke tarče metformina so še vedno sporne oziroma niso do konca raziskane);

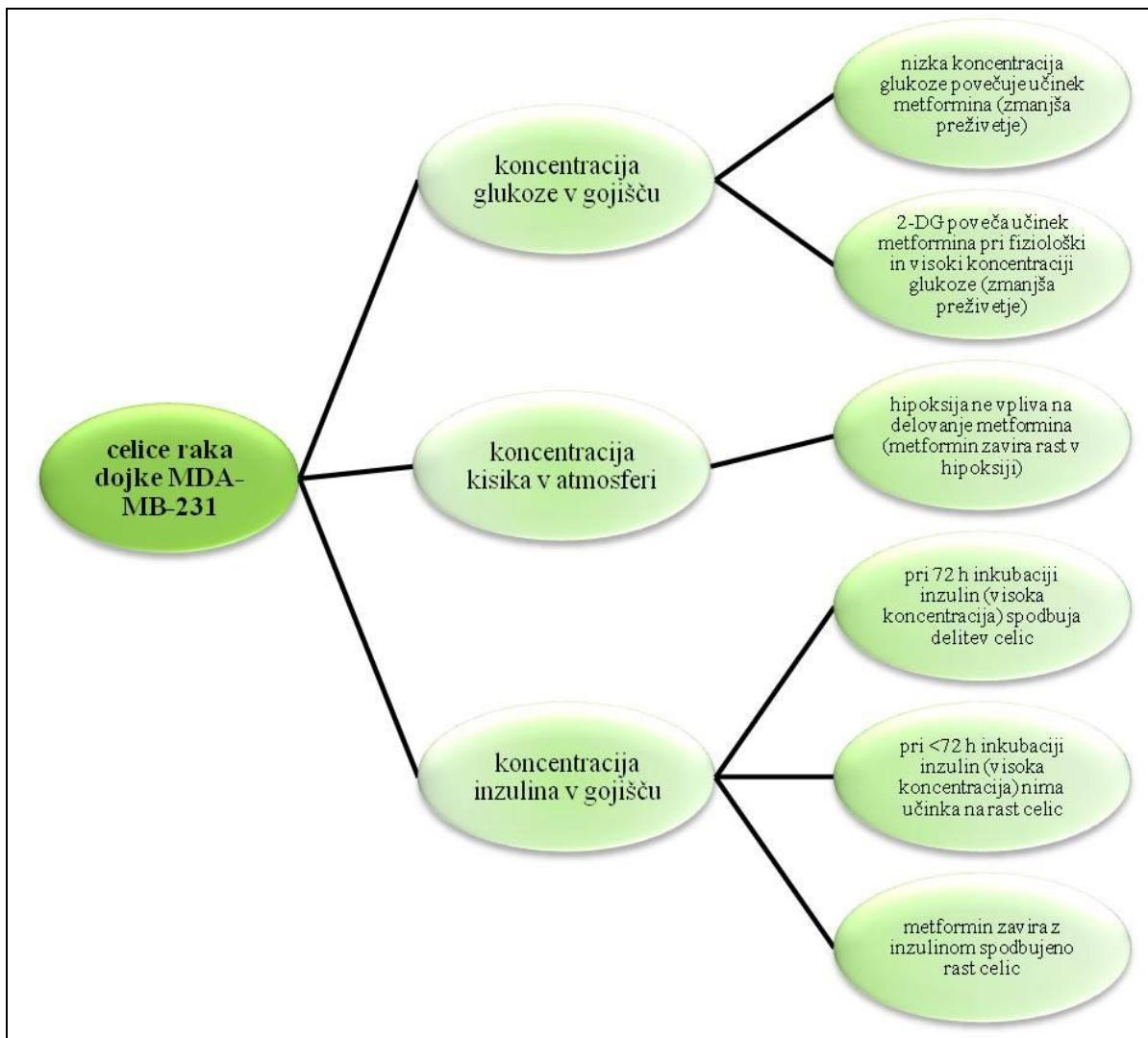
- vse študije niso pokazale zaščitnega učinka metformina; morda bi bil uporaben le pri določeni skupini bolnic z rakom dojke;
- ni jasno, ali metformin deluje protitumorno samo pri tistih bolnicah, ki imajo sladkorno bolezen ali tudi pri tistih, ki nimajo motenj presnove (potrebne so dodatne raziskave);
- ni jasno, ali je ključen sistemski učinek ali neposreden učinek na rakave celice.

Naši rezultati nakazujejo, da je neposredni učinek pomemben predvsem pri višjih koncentracijah metformina, ki jih klinično ne bi mogli doseči brez hude sistemske toksičnosti. Metformin bo verjetno uporaben kvečjemu za adjuvantno zdravljenje skupaj s standardnimi citostatiki in ne kot samostojno zdravilo proti raku. Morda pa bi lahko predstavljal izhodno učinkovino (spojino vodnico – lead compound) za razvoj novih protitumornih zdravil.

Zaključimo lahko, da je občutljivost celic MDA-MB-231 na metformin odvisna od dejavnikov v okolju (Slika 16). Od dejavnikov, ki smo jih preučevali, se je pokazala kot najbolj pomembna koncentracija glukoze v gojišču. Ključno spoznanje je, da so celice MDA-MB-231 zelo občutljive na metformin v odsotnosti glukoze ali ob sočasni inhibiciji glikolize z 2-DG. Ta rezultat je pomemben, ker nakazuje, da bi metformin lahko neposredno zaviral razrast rakavih celic v sredici tumorja, kjer primanjkuje glukoze. Pomemben je tudi, ker nakazuje, da bi 2-DG lahko uporabili za povečanje občutljivosti na metformin. Ker smo pri poskusih uporabili fiziološko koncentracijo 2-DG ($600 \mu\text{M}$), učinki hkratnega tretiranja z metforminom pa so bili prav tako dobri pri fiziološki koncentraciji metformina ($30 \mu\text{M}$), bi lahko rezultati prispevali k nadaljnjam raziskavam, ki bi vključevale takšne koncentracije učinkovin v kliničnih preizkusih. Ker se 2-DG uporablja tudi v kliničnih poskusih, je ta možnost še posebej zanimiva. Nenazadnje smo ugotovili, da hipoksija ne zmanjša učinkov metformina na celice MDA-MB-231. Metformin z ali brez 2-DG bi torej lahko zaviral razrast rakastih celic tudi, če se te nahajajo v hipoksičnih razmerah. Ta ugotovitev je pomembna, ker imajo hipoksični tumorji pogosto manj ugoden potek.

6 SKLEPI

1. Metformin pri fiziološki koncentraciji glukoze v gojišču ni imel učinka na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231, kar podpira našo prvo hipotezo. Metformin pa je zmanjšal preživetje celic MDA-MB-231, če smo jih gojili v gojišču brez glukoze. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da se neposredni protitumorni učinki metformina pokažejo šele, kadar je koncentracija glukoze v zunajcelični tekočini znižana. To bi lahko bilo pomembno tudi s stališča zdravljenja raka, saj so celice v sredici tumorja pogosto izpostavljene pomanjkanju glukoze in drugih hrani.
2. Tretiranje celic MDA-MB-231 z 2-deoksi-D-glukozo je izrazito povečalo občutljivost na metformin pri fiziološki in visoki koncentraciji glukoze v gojišču, kar podpira našo drugo hipotezo. Povečanje občutljivosti na metformin smo dosegli pri koncentracijah 2-deoksi-D-glukoze, ki jih je mogoče doseči pri človeku, zato sklepamo, da bi sočasno zdravljenje z metforminom in 2-deoksi-D-glukozo lahko učinkovito zmanjšalo preživetje celic raka dojke.
3. Inzulin je po 72-urni inkubaciji povečal število celic MDA-MB-231 za 14-18 %. Pri 24- in 48-urni inkubaciji inzulin ni imel učinka na število celic. Čeprav ti rezultati delno podpirajo našo tretjo hipotezo, bi bilo potrebno učinke inzulina na celice MDA-MB-231 še dodatno opredeliti.
4. Metformin je zmanjšal število celic MDA-MB-231, ki so bile tretirane z inzulinom pri fiziološki koncentraciji glukoze. Metformin pa ni zmanjšal števila celic MDA-MB-231, če niso bile tretirane z inzulinom. Na podlagi tega rezultata sklepamo, da metformin neposredno zavira z inzulinom spodbujeno deljenje oziroma preživetje celic MDA-MB-231, kar podpira našo četrto hipotezo. Ker imajo bolnice s sladkorno boleznjijo tipa 2 vsaj v začetnih stadijih hiperinzulinemijo, predvidevamo, da bi metformin lahko neposredno zmanjšal učinke inzulina na rast rakavih celic.
5. Hipoksija ni zmanjšala učinka metformina na preživetje celic MDA-MB-231, kar ne podpira naše pete hipoteze. Na podlagi tega rezultata sklepamo, da bi metformin lahko zaviral rast rakavih celic tudi v hipoksični sredici tumorja.



Slika 16: Grafičen povzetek raziskave: vpliv različnih dejavnikov na celice raka dojke MDA-MB-231.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Izhodišče. Rak dojke je najpogosteša oblika raka pri ženskah iz zahodnih držav. Na pojav te bolezni vplivajo genski, okoljski in hormonski dejavniki, kot je na primer pozna menopavza. Nastanek raka dojke povezujejo z motnjami presnove, še zlasti debelostjo in sladkorno boleznijo tipa 2. Raziskave so pokazale, da pogosto uporabljeno antidiabetično zdravilo metformin verjetno zmanjuje tveganje za nastanek raka dojke in izboljšuje prognozo, če se je rak dojke že razvil. Kljub dolgoletnim raziskavam pa mehanizem delovanja metformina še ni povsem razjasnjen.

Namen in hipoteze. Namen magistrskega dela je bil raziskati, ali je delovanje metformina odvisno od razmer, v katerih gojimo celice raka dojke. Osredotočili smo se na tri ključne dejavnike: 1) koncentracijo glukoze v gojišču, 2) koncentracijo inzulina v gojišču in 3) koncentracijo kisika v atmosferi. Preverjali smo pet hipotez: 1) Pri fiziološki koncentraciji glukoze metformin nima neposrednega učinka na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231; 2) Inhibicija glikolize z 2-deoksi-D-glukozo poveča občutljivost celic raka dojke MDA-MB-231 na metformin; 3) Visoke koncentracije inzulina spodbujajo delitev celic raka dojke MDA-MB-231; 4) Metformin zavira z inzulinom spodbujeno delitev celic raka dojke MDA-MB-231; 5) Hipoksija zmanjša učinek metformina na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231.

Metode. Učinke metformina smo preučevali v kulturi celic MDA-MB-231, ki so *in vitro* model za trojno negativni tip raka dojke, ki je eden izmed najbolj agresivnih in invazivnih tipov raka dojke s slabim odzivom na zdravljenje. Število preživelih celic smo ovrednotili s testom MTS in barvanjem jeder s Hoechstom 33342. Poskuse s hipoksijo smo izvajali pri 0,5 % O₂. Za statistično analizo smo uporabili eno- ali dvosmerno analizo variance (test ANOVA) in ustrezne *post hoc* teste za navzkrižne primerjave.

Rezultati. Pri visoki (4,5 g/L) in fiziološki (1 g/L) koncentraciji glukoze metformin ni imel neposrednih učinkov na preživetje celic MDA-MB-231. V gojišču brez glukoze pa je metformin močno zmanjšal njihovo preživetje. Podobno kot nizka koncentracija glukoze je tudi inhibicija glikolize z 2-deoksi-D-glukozo povečala občutljivost celic MDA-MB-231 na metformin. Inzulin je po 72-urni inkubaciji povečal število celic MDA-MB-231 za 14-18 %. Metformin pa je preprečil z inzulinom spodbujeno povečanje števila celic MDA-MB-231. Hipoksija ni zmanjšala učinka metformina na preživetje celic.

Zaključki. Pokazali smo, da imajo razmere v mikrookolju, še zlasti koncentracija glukoze, pomemben vpliv na protitumorno delovanje metformina. Naši rezultati nakazujejo, da bi metformin lahko zmanjšal preživetje celic raka dojke v sredici tumorja, kjer primanjkuje glukoze, inzulina in kisika. Pri fiziološki koncentraciji glukoze pa bi občutljivost celic raka dojke lahko povečali s sočasnim zdravljenjem z 2-deoksi-D-glukozo.

7.2 SUMMARY

Background. Breast cancer is the commonest form of cancer in women in western countries. The disease occurrence is affected by genetic, environmental and hormonal factors, such as late menopause. Breast cancer is linked to metabolic disorders, especially obesity and type 2 diabetes. Studies have shown that metformina, a commonly used antidiabetic drug, probably decreases the risk of developing breast cancer and improves survival in patients with breast cancer. Despite long-standing research the mechanisms underlying anti-cancer action of metformin are poorly defined.

Aim and hypotheses. The purpose of the Master's thesis was to determine if anti-cancer effects of metformin depend on the conditions in which cancer cells are cultivated. We have focused on three key factors: 1) glucose concentration in medium, 2) insulin concentration in medium, 3) oxygen concentration in the atmosphere. We examined five hypotheses: 1) Metformin does not reduce the survival of breast cancer cells MDA-MB-231 at physiological concentrations of glucose; 2) Glycolysis inhibition with 2-deoxy-D-glucose increases sensitivity of breast cancer cells MDA-MB-231 to metformin; 3) High insulin concentrations promote proliferation of breast cancer cells MDA-MB-231; 4) Metformin inhibits insulin-stimulated proliferation of breast cancer cells MDA-MB-231; 5) Hypoxia decreases the effect of metformin on survival of breast cancer cells MDA-MB-231.

Methods. We examined the effects of metformin in cultured MDA-MB-231 cells, which is an *in vitro* model for triple negative breast cancer, one of the most aggressive and invasive breast cancer types with poor response to therapy. Cancer cell survival was evaluated with MTS test and Hoechst staining. Hypoxia experiments were performed at 0.5 % O₂. One- or two-way ANOVA test and suitable *post hoc* tests for multiple comparisons were used for statistical analysis.

Results. At high (4.5 g/L) and physiological (1 g/L) glucose concentrations metformin did not have reduce the survival of MDA-MB-231 cells. In glucose-free medium metformin significantly reduced their survival. Glycolysis inhibition with 2-deoxy-D-glucose increased sensitivity of breast cancer cells MDA-MB-231 to metformin, similarly to low glucose concentration. After 72 h incubation insulin increased the number of MDA-MB-231 cells for 14-18 %. Metformin blocked insulin-stimulated increase in number of MDA-MB-231 cells. Hypoxia did not decrease the effect of metformin on survival of the cells.

Conclusions. We showed that conditions in microenvironment, especially glucose concentration, importantly affect the anti-cancer action of metformin. Our results indicate that metformin could reduce cancer cells survival in tumour core, where there is lack of glucose, insulin and oxygen. Sensitivity of breast cancer cells to metformin could be enhanced by simultaneous treatment with 2-deoxy-D-glucose at physiological glucose concentrations.

8 VIRI

- Aft R.L., Zhang F.W., Gius D. 2002. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *British Journal of Cancer*, 87, 7: 805-812
- Ahmadi H., Azar S.T. 2013. Type 2 diabetes mellitus, oral diabetic medications, insulin therapy, and overall breast cancer risk. *ISRN Endocrinology*: 2013, doi: 10.1155/2013/181240: 8 str.
- American Diabetes Association. 2011. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 34: Suppl 1, doi: 10.2337/dc11-S062: S62-S69
- Anders C.K., Zagar T.M., Carey L.A. 2013. The management of early-stage and metastatic triple-negative breast cancer: a review. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 27, 4: 737-749
- Bauer K.R., Brown M., Cress R.D., Parise C.A., Caggiano V. 2007. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 109, 9: 1721-1728
- Bensaad K., Tsuruta A., Selak M.A., Vidal M.N., Nakano K., Bartrons R., Gottlieb E., Vousden K.H. 2006. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 126, 1: 107-120
- Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 11, 2: 85-95
- Calleja V., Alcor D., Laguerre M., Park J., Vojnovic B., Hemmings B.A., Downward J., Parker P.J., Larijani B. 2007. Intramolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biology*, 5, 4: 780-791
- Campagnoli C., Berrino F., Venturelli E., Abbà C., Biglia N., Brucato T., Cogliati P., Danese S., Donadio M., Zito G., Pasanisi P. 2013. Metformin decreases circulating androgen and estrogen levels in nondiabetic women with breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 13, 6: 433-438
- Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, 29, 1: 18-24

Cerullo M., Gani F., Chen S.Y., Canner J., Pawlik T.M. 2016. Metformin use is associated with improved survival in patients undergoing resection for pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 20, 9: 1572-1580

Chandel N. 2014. Four key questions about metformin and cancer. *BMC Biology*, 12: 85, doi: 10.1186/s12915-014-0085-1: 3 str.

Chandran S., Harmey J.H., Toomey S. 2012. Inhibition of IGF signalling pathway in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells. *BMC Proceedings*, 6 (Suppl 4): O14, doi: 10.1186/1753-6561-6-S4-O14: 1 str.

Cheong J.-H., Park E.S., Liang J., Dennison J.B., Tsavachidov D., Nguyen-Charles C., Wa Cheng K., Hall H., Zhang D., Lu Y., Ravoori M., Kundra V., Ajani J., Lee J.S., Ki Hong W., Mills G.B. 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, 12: 2350-2362

Denko N.C. 2008. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews. Cancer*, 8, 9: 705-713

DeYoung M.P., Horak P., Sofer A., Sgroi D., Ellisen L.W. 2008. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & Development*, 22, 2: 239-251

Dröse S. 2013. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827, 5: 578-587

Dwarakanath B.S., Singh D., Banerji A.K., Sarin R., Venkataramana N.K., Jalali R., Vishwanath P.N., Mohanti B.K., Tripathi R.P., Kalia V.K., Jain V. 2009. Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 5, 9: 21-26

El-Haggar S.M., El-Shitany N.A., Mostafa M.F., El-Bassiouny N.A. 2016. Metformin may protect nondiabetic breast cancer women from metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 33, 4: 339-357

El-Masry O.S., Al-Sakkaf K., Brown B.L., Dobson P.R. 2015. Differential crosstalk between the AMPK and PI3K/Akt pathways in breast cancer cells of differing genotypes: Leptin inhibits the effectiveness of AMPK activation. *Oncology Reports*, 34, 4: 1675-1680

Ellis M.J., Perou C.M. 2013. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. *Cancer Discovery*, 3, 1: 27-34

Engebraaten O., Volland H.K., Børresen-Dale A.L. 2013. Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. *The American Journal of Pathology*, 183, 4: 1064-1074

Europa Donna – Rak dojk. 2016. Slovensko združenje za boj proti raku dojk (24. maj 2016).

http://www.europadonna-zdruzenje.si/rak/rak_dojk (31. maj 2016)

Fabbri A., Carcangiu M.L., Carbone A. 2008. Histological classification of breast cancer. V: Breast cancer: Nuclear medicine in diagnosis and therapeutic options. Bombardieri E., Bonadonna G., Gianni L. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 3-14

Fantin V.R., St-Pierre J., Leder P. 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9, 6: 425-434

Franciosi M., Lucisano G., Lapice E., Strippoli G.F., Pellegrini F., Nicolucci A. 2013. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS One*, 8: 8, doi: 10.1371/journal.pone.0071583: 12 str.

Francis G.L. 2010. Albumin in mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*, 62, 1: 1-16

Gest C., Joimel U., Huang L., Pritchard L.L., Petit A., Dulong C., Buquet C., Hu C.Q., Mirshahi P., Laurent M., Fauvel-Lafèvre F., Cazin L., Vannier J.P., Lu H., Soria J., Li H., Varin R., Soria C. 2013. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, 13: 63, doi: 10.1186/1471-2407-13-63: 14 str.

Giammarioli A.M., Gambardella L., Barbat C., Pietraforte D., Tinari A., Alberton M., Gnessi L., Griffin R.J., Minetti M., Malorni W. 2012. Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response. *International Journal of Cancer*, 131, 4: E337-E347

Golding J.P., Wardhaugh T., Patrick L., Turner M., Phillips J.B., Bruce J.I., Kimani S.G. 2013. Targeting tumour energy metabolism potentiates the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, 109, 4: 976-982

Goodwin P.J. 2008. Host-related factors in breast cancer: An underappreciated piece of the puzzle? *Journal of Clinical Oncology*, 26, 20: 3299-3300

Goodwin P.J., Ligibel J.A., Stambolic V. 2009. Metformin in breast cancer: time for action. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 20: 3271-3273

GraphPad Statistics Guide. Interpreting results: One-way ANOVA. 2016a. GraphPad Software (2015).

[http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?f_ratio_and_anova_table_\(one-way_anova\).htm](http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?f_ratio_and_anova_table_(one-way_anova).htm) (15. julij 2016)

GraphPad Statistics Guide. Interpreting results: Two-way ANOVA. 2016b. GraphPad Software (2015).

[http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?f_ratio_and_anova_table_\(one-way_anova\).htm](http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?f_ratio_and_anova_table_(one-way_anova).htm) (28. avgust 2016)

Griffiths C.L., Olin J.L. 2012. Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. *Journal of Pharmacy Practice*, 25, 3: 319-323

Grossmann M.E., Yang D.Q., Guo Z., Potter D.A., Cleary M.P. 2015. Metformin treatment for the prevention and/or treatment of breast/mammary tumorigenesis. *Current Pharmacology Reports*, 1, 5: 312-323

Guzy R.D., Hoyos B., Robin E., Chen H., Liu L., Mansfield K.D., Simon M.C., Hammerling U., Schumacker P.T. 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism*, 1, 6: 401-408

Hardie D.G., Ross F.A., Hawley S.A. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 4: 251-262

Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate – 10 mg/ml Sloution in Water. 2015. Thermo Fisher Scientific Inc (2015).

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570> (2. jun. 2016)

IBM Knowledge Center. Možnosti ANOVA. 2016. IBM.

http://www.ibm.com/support/knowledgecenter/sl/SSEP7J_10.2.0/com.ibm.swg.ba.cognos.ug_cr_rptstd.10.2.0.doc/c_id_obj_anova.html (15. julij 2016)

Iliopoulos D., Hirsch H.A., Struhl K. 2011. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Research*, 71, 9: 3196-3201

Johnson J.A., Bowker S.L. 2011. Intensive glycaemic control and cancer risk in type 2 diabetes: a meta-analysis of major trials. *Diabetologia*, 54, 1: 25-31

Jones R.G., Thompson C.B. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23, 5: 537-548

Kalender A., Selvaraj A., Kim S.Y., Gulati P., Brulé S., Viollet B., Kemp B.E., Bardeesy N., Dennis P., Schlager J.J., Marette A., Kozma S.C., Thomas G. 2010. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rap GTPase-dependent manner. *Cell Metabolism*, 11, 5: 390-401

Kim S.M., Yun M.R., Hong Y.K., Solca F., Kim J.H., Kim H.J., Cho B.C. 2013. Glycolysis inhibition sensitizes non-small cell lung cancer with T790M mutation to irreversible EGFR inhibitors via translational suppression of Mcl-1 by AMPK activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12, 10: 2145-2156

Koo J.S., Jung W. 2010. Alteration of REDD1-mediated mammalian target of rapamycin pathway and hypoxia-inducible factor-1 α regulation in human breast cancer. *Pathobiology*, 77, 6: 289-300

Laerd statistics. Two-way ANOVA in SPSS Statistics. 2013. Lund Research Ltd. <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/two-way-anova-using-spss-statistics.php> (28. avgust 2016)

Lawlor M.A., Alessi D.R. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*, 114: 2903-2910

Lee J.J., Loh K., Yap Y.S. 2015. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biology & Medicine*, 12, 4: 342-354

Liang J., Mills G.B. 2013. AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer Research*, 73, 10: 2929-2935

Libby G., Donnelly L.A., Donnan P.T., Alessi D.R., Morris A.D., Evans J.M. 2009. New uses of metformin are at low risk of incidence cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32, 9: 1620-1625

Ligibel J.A., Campbell N., Partridge A., Chen W.Y., Salinardi T., Chen T., Adloff K., Keshaviah A., Winer E.P. 2008. Impact of a mixed strength and endurance exercise intervention on insulin levels in breast cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 6: 907-912

Liu B., Fan Z., Edgerton S.M., Deng X.S., Alimova I.N., Lind S.E., Thor A.D. 2009. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle*, 8, 13: 2031-2040

Madiraju A.K., Erion D.M., Rahimi Y., Zhang X.M., Braddock D.T., Albright R.A., Prigaro B.J., Wood J.L., Bhanot S., MacDonald M.J., Jurczak M.J., Camporez J.P., Lee H.Y., Cline G.W., Samuel V.T., Kibbey R.G., Shulman G.I. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510, 7506: 542-546

Malaguti P., Vari S., Cognetti F., Fabi A. 2015. The mammalian target of rapamycin inhibitors in breast cancer: current evidence and future directions. *Anticancer Research*, 33, 1: 21-28

Malek M., Aghili R., Emami Z., Khamseh M.E. 2013. Risk of cancer in diabetes: the effect of metformin. *ISRN Endocrinology*, 2013: doi: 10.1155/2013/636927: 9 str.

Martinez-Outschoorn U.E., Goldberg A., Lin Z., Ko Y.H., Flomenberg N., Wang C., Pavlides S., Pestell R.G., Howell A., Sotgia F., Lisanti M.P. 2011. Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 12, 10: 924-938

Matoba S., Kang J.G., Patino W.D., Wragg A., Boehm M., Gavrilova O., Hurley P.J., Bunz F., Hwang P.M. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*, 312, 5780: 1650-1653

MDA-MB-231 Cell Line human. 2016. Sigma-Aldrich.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/92020424?lang=en®ion=SI>
(6. september 2016)

Miklavčič P. 2016. Predstavitev. Zveza društev diabetikov Slovenije.
<http://www.diabetes-zveza.si/sl/predstavitev> (13. avgust 2016)

Mihaylova M.M., Shaw R.J. 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, 13, 9: 1016-1023

Motoshima H., Goldstein B.J., Igata M., Araki E. 2006. AMPK and cell proliferation – AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *The Journal of Physiology*, 574, 1: 63-71

Noto H., Goto A., Tsujimoto T., Noda M. 2012. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 7: 3, doi: 10.1371/journal.pone.0033411: 9 str.

Otto A.M. 2016. Warburg effect(s) – a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer & Metabolism*, 4: 5, doi: 10.1186/s40170-016-0145-9: 8 str.

Ouyang J., Parakhia R.A., Ochs R.S. 2011. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 1: 1-11

Park S.J., Ryu J., Kim I.H., Choi Y.H., Nam T.J. 2015. Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer MCF-7 cells by a peptide derived from *Porphyra yezoensis*. *Oncology Reports*, 33, 1: 19-24

Peairs K.S., Barone B.B., Synder C.F., Yeh H.C., Stein K.B., Derr R.L., Brancati F.L., Wolff A.C. 2011. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 1: 40-46

Pellicano H., Zhang W., Liu J., Hammoudi N., Dai J., Xu R.-H., Pusztai L., Huang P. 2014. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Research*, 16: 5, doi: 10.1186/s13058-014-0434-6: 16 str.

Pollak M. 2008. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews. Cancer*, 8, 12: 915-928

Pollak M. 2010. Metformin and other biguanides in oncology: advancing the research agenda. *Cancer Prevention Research*, 3, 9: 1060-1065

Poon E., Harris A.L., Ashcroft M. 2009. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11: 26, doi: 10.1017/S1462399409001173: 23 str.

Prevalence of Diabetes in the World, 2013. Health Intelligence: Analyzing health data, generating and communicating evidence to improve population health (18. nov. 2013).

<http://healthintelligence.drupalgardens.com/content/prevalence-diabetes-world-2013>
(1. jun. 2016)

Pries A.R., Cornelissen A.J.M., Sloot A.A., Hinkeldey M., Dreher M.R., Höpfner M., Dewhirst M.W., Secomb T.W. 2009. Structural adaptation and heterogeneity of normal and tumor microvascular networks. PLOS Computational Biology, 5: 5, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000394: 11 str.

Rajh M., Dolinar K., Miš K., Pavlin M., Pirkmajer S. 2016. Medium renewal blocks anti-proliferative effects of metformin in cultured MDA-MB-231 breast cancer cells. PLoS One, 11: 5, doi: 10.1371/journal.pone.0154747: 18 str.

Rak v Sloveniji 2012. 2015. Ljubljana, Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije: 92 str.
http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2012.pdf (31. maj 2016)

Robinson G.L., Dinsdale D., Macfarlane M., Cain K. 2012. Switching from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation modulates the sensitivity of mantle cell lymphoma cells to TRAIL. Oncogene, 31, 48: 4996-5006

Sabatino S.A., Thompson T.D., Wu X.-C., Fleming S.T., Kimmick G.G., Trentham-Dietz A., Cress R., Anderson R.T. 2014. The influence of diabetes severity on receipt of guideline-concordant treatment for breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 146, 1: 199-209

Schrand A.M., Lin J.B., Hussain S.M. 2012. Assessment of cytotoxicity of carbon nanoparticles using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) cell viability assay. V: Nanoparticles in biology and medicine: Methods and protocols. Soloviev M. (ed.). Humana Press: 395-402

Shackelford D.B., Shaw R.J. 2009. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. Nature Reviews. Cancer 9, 8: 563-575

Sinnett-Smith J., Kisfalvi K., Kui R., Rozenqurt E. 2013. Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK. Biochemical and Biophysical Research Communications, 430, 1: 352-357

Sladkorna bolezen tipa 2. 2015. Sladkorna bolezen (2015).
<http://sladkorna.si/vrste-sladkorne-bolezni/sladkorna-bolezen-tipa-2/> (1. jun. 2016)

Slovenia. 2015. International Diabetes Federation (2015).
<http://www.idf.org/membership/eur/slovenia> (1. jun. 2016)

Smart C.E., Simpson P.T., Vargas A.C., Lakhani S.R. 2011. Genetic alterations in normal and malignant breast tissue. V: Breast cancer: A lobular disease. Tot T. (ed.). London, Springer-Verlag: 53-66

Smith J.R., Del Priore G. 2009. Women's cancers: Pathways to healing. A patient's guide to dealing with cancer and abnormal smears. London, Springer-Verlag: 138 str.

Sorokin D.V., Scherbakov A.M., Yakushina I.A., Semina S.E., Gudkova M.V., Krasil'nikov M.A. 2016. The mechanism of adaptation of breast cancer cells to hypoxia: role of AMPK/mTOR signaling pathway. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 160, 4: 555-559

Stankowski-Drengler T.J., Stankowski R.V., Engel J.M., Onitilo A.A. 2013. The relationship of type 2 diabetes, oral diabetes medications, and insulin therapy to risk for breast cancer. Current Nutrition Reports, 3, 1: 1-8

Stephenne X., Foretz M., Taleux N., van der Zon G.C., Sokal E., Hue L., Viollet B., Guigas B. 2011. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. Diabetologia, 54, 12: 3101-3110

Tamayo T., Rosenbauer J., Wild S.H., Spijkerman A.M., Baan C., Forouhi N.G., Herder C., Rathmann W. 2014. Diabetes in Europe: an update. Diabetes Research and Clinical Practice, 103, 2: 206-217

Tate C.R., Rhodes L.V., Segar H.C., Driver J.L., Pounder F.N., Burow M.E., Collins-Burow B.M. 2012. Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. Breast Cancer Research, 14: 3, doi: 10.1186/bcr3192: 15 str.

Tavaluc R.T., Hart L.S., Dicker D.T., El-Deiry W.S. 2007. Effect of low confluency, serum starvation and hypoxia on the side population of cancer cell lines. Cell Cycle, 6, 20: 2554-2562

Termania. Enosmerna analiza variance – ANOVA. 2016. Amebis d.o.o.
<http://www.termania.net/slovarji/terminoloski-slovar-vzgoje-in-izobrazevanja/3474669/enosmerna-analiza-variance---anova> (15. julij 2016)

Tiede L.M., Cook E.A., Morsey B., Fox H.S. 2011. Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. *Cell Death & Disease*, 2: 12, doi: 10.1038/cddis.2011: 10 str.

Tot T. 2011. The theory of the sick lobe. V: Breast cancer: A lobar disease. Tot T. (ed.). London, Springer-Verlag: 1-17

Vander Heiden M.G. 2011. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 9: 671-684

Vander Heiden M.G., Cantely L.C., Thompson C.B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 5930: 1029-1033

Vazquez A., Liu J., Zhou Y., Oltvai Z.N. 2010. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited. *BMC Systems Biology*, 4: 58, doi: 10.1186/1752-0509-4-58: 9 str.

Viollet B., Guigas B., Sanz Garcia N., Leclerc J., Foretz M., Andreelli F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, 122, 6: 253-270

Wahdan-Alaswad R., Fan Z., Edgerton S.M., Liu B., Deng X.-S., Arnadottir S.S., Richer J.K., Anderson S.M., Thor A.D. 2013. Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. *Cell Cycle*, 12, 24: 3759-3769

Wellen K.E, Thompson C.B. 2010. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Molecular Cell*, 40, 2: 323-332

Wheaton W.W., Weinberg S.E., Hamanaka R.B., Soberanes S., Sullivan L.B., Anso E., Glasauer A., Dufour E., Mutlu G.M., Budigner G.S., Chadel N.S. 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife*, 3, doi: 10.7554/eLife.02242: 18 str.

Wilcox G. 2005. Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist: Reviews*, 26, 2: 19-39

Wilson W.R., Hay M.P. 2011. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11, 6: 393-410

Wolf I., Sadetzki S., Gluck I., Oberman B., Ben-David M., Papa M.Z., Catane R., Kaufman B. 2006. Association between diabetes mellitus and adverse characteristics of breast cancer at presentation. European Journal of Cancer, 42, 8: 1077-1082

Wu Y., Sarkissyan M., Mcghee E., Lee S., Vadgama J.V. 2015. Combined inhibition of glycolysis and AMPK induces synergistic breast cancer cell killing. Breast Cancer Research and Treatment, 151, 3: 529-539

Wu H., Zhu H., Liu D.X., Niu T.K., Ren X., Patel R., Hait W.N., Yang J.M. 2010. Silencing of elongation factor-2 kinase potentiates the effect of 2-deoxy-D-glucose against human glioma cells through blunting of autophagy. Cancer Research, 69, 6: 2453-2460

Xie J., Xiao Y., Zhu X.Y., Ning Z.Y., Xu H.F., Wu H.M. 2016. Hypoxia regulates stemness of breast cancer MDA-MB-231 cells. Medical Oncology (Northwood, London, England), 33: 5, doi: 10.1007/s12032-016-0755-7: 7 str.

Yaghjyan L., Colditz G.A. 2011. Estrogens in breast tissue: a systematic review. Cancer Causes & Control, 22, 4: 529-540

Yamasaki T., Tran T.A.T., Oz O.K., Raj G.V., Schwarz R.E., DeBerardinis R.J., Zhang X., Brugarolas J. 2011. Exploring a glycolytic inhibitor for the treatment of an *FH*-deficient type-2 papillary RCC. Nature Reviews. Urology, 8, 3: 165-171

Yang X.R., Sherman M.E., Rimm D.L., Lissowska J., Brinton L.A., Peplonska B., Hewitt S.M., Anderson W.F., Szeszenia-Dabrowska N., Bardin-Mikolajczak A., Zatonski W., Cartun R., Mandich D., Rymkiewicz G., Ligaj M., Lukaszek S., Kordek R., García-Closas M. 2007. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 16, 3: 439-443

Yotnda P., Wu D., Swanson A.M. 2010. Hypoxic tumors and their effect on immune cells and cancer therapy. V: Immunotherapy of cancer: methods and protocols. Yotnda P. (ed.). Humana Press: 1-29

Young C.D., Anderson S.M. 2008. Sugar and fat – that's where it's at: metabolic changes in tumors. Breast Cancer Research, 10: 1, doi: 10.1186/bcr1852: 9 str.

Zagorodna O., Martin S.M., Rutkowski D.T., Kuwana T., Spitz D.R., Knudson C.M. 2012. 2-deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. Oncogene, 31, 22: 2738-2749

Zhang D., Fei Q., Li J., Zhang C., Sun Y., Zhu C., Wang F., Sun Y. 2016. 2-deoxyglucose reverses the promoting effect of insulin on colorectal cancer cells *in vitro*. PLoS One, 11: 3, doi: 10.1371/journal.pone.0151115: 14 str.

Zheng J. 2012. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). Oncology Letters, 4, 6: 1151-1157

Zhou J., Huang W., Tao R., Ibaragi S., Lan F., Ido Y., Wu X., Alekseyev Y.O., Lenburg M.E., Hu G.F., Luo Z. 2009. Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells. Oncogene, 28, 18: 1993-2002

Zordoky B.N.M., Bark D., Solty C.L., Sung M.M., Dyck J.R.B. 2014. The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: Implications for cancer therapy and prevention. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1840, 6: 1943-1957

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mami in očetu, ki sta mi v prvi vrsti omogočila šolanje in potem študiranje. Pomemben delež pri tem so imeli tudi Jani, Tim in Maja. Predvsem hvala vsem, ker ste vedno verjeli vame ter me podpirali v mojih odločitvah.

Hvala mentorju doc. dr. Sergeju Pirkmajerju. Čeprav sem si včasih že lela vse skupaj kar pustiti, je sedaj, ko je naloga končana, zadovoljstvo toliko večje.

Zahvaljujem se tudi fantu Jožetu, ki mi je stal ob strani in me je tekom pisanja naloge spodbujal in motiviral. Hvala tudi za potrpežljivost v trenutkih, ko mi ni šlo vse po načrtih in sem bila slabo razpoložena.

Posebna zahvala gre tudi Juliji, ki mi je s svojo nesebičnostjo omogočila dokončanje enega dela naloge. Poleg tega pa si me vedno spodbujala ter spravljala v dobro voljo s svojimi izjavami – če ne ne bilo tebe, bi bilo življenje dolgočasno.

Nenazadnje pa hvala vsem prijateljem, ki sem vas spoznala v zadnjih nekaj letih – to so bila res čudovita leta in sem vesela, da smo si lahko delili veliko lepih trenutkov. Brez vas ne bi nikoli bilo tako, kot je.