

**Ministry of High Education
and Scientific Research
University of Mosul
College of Medicine**



The Possible Cytotoxic Effect of Metformin; An Old Drug in New Application

A Thesis

**Submitted to the Committee of Postgraduate Studies/ Department of
Pharmacology / College of Medicine/ University of Mosul
as Partial Fulfillment of the Requirements the Degree of Doctor of
Philosophy in Pharmacology**

By

Abeer Mansour Abdel Rasool Hasoon

M.Sc (Pharmacology)

Supervised

Prof. Dr. Isam Hamo Mahmood

Professor of Pharmacology

July 2022 A.D

Dhul- Hijja 1443 A.H

Summary

Metformin is one of the most widely prescribed anti-hyperglycemia agents from the biguanides group used in diabetes mellitus. Metformin pleiotropic effects have recently received increased attention because of its potential cytotoxic effects on a variety of cancers. Cancer is the uncontrolled growth and spread of abnormal cells. There is a growing body of evidence about a link between D.M and the risk of some types of cancer, mainly because diabetes is a state with increased oxidative stress and inflammation, all of which can, in turn, promote carcinogenesis

Aim of study is to evaluate the effects of metformin (different doses and times) on inflammatory markers (IL-1 β and TNF- α) and oxidative stress on diabetes models and to major aim is to study the cytotoxic effect of metformin on the growth of cancer cell lines and possible mechanisms of cytotoxic impact.

Method designed in two parts, part one an experimental/intervention study design related to the induction of diabetes models of albino male rats by alloxan 200 mg/kg/dose, to do so, total number 75 rats(15 rat /each) was divided into five groups: control, diabetes, and metformin taking 100, 200, and 300 mg/kg/day after a period of 21, 35 days in order to evaluate the pro-inflammatory and antioxidant effects of different doses of metformin. After the current study's major aim, part two is the laboratory study designs related to the cancer study, the IRAQ Biotech Cell Bank provided cancer cell lines (HeLa, AMJ13,HCAM, A172, HBL100) by the maintenance of cell cultures. All cells were kept in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine, 100 units/mL penicillin, and 100 g/mL streptomycin, trypsin-EDTA was used to passage the cells. Reseeded at 50% confluence twice a week and incubated at 37°C with 5% CO₂, then MTT assay was used to determine cytotoxicity of metformin IC₅₀ for all cancer lines studying

cytomorphological death apoptosis assay, reactive oxygen species(ROS) and gene expression cellular study.

Result From part one, where metformin-treated diabetic rats showed significant changes observed in terms of body weight and food intake behavior. Metformin treatment dropped serum blood glucose levels in diabetes rats. The metformin groups showed a reduction of blood glucose level at day 35 as compared with day 7 of the three groups $P=0.000$. Serum TNF- α level showed significant difference among the three groups at day 7, 21 and 35 day with a difference in dose 300,200 mg/kg /day than 100 mg /kg /day. TNF- α tissue liver showed significant difference related to dose and time. Comparison of IL-1 β related to serum and liver value of five groups showed significantly difference of five groups support by histological study.

Regarding oxidative stress the present study showed a significant elevation of Total antioxidant status (TAOS) in metformin-treated groups at 21 and 35 days compared to a diabetes group that matched the result of histopath picture pancreas with reduction of MDA significantly after treatment with metformin, DPPH increased in a concentration- time dependent manner reflect antioxidant activity, IC₅₀ of metformin (498.0 $\mu\text{g/ml}$) while ascorbic acid IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$ 29.62) respectively at 60 min in different concentration reflected weak antioxidant in vitro.

About part two the results revealed significantly reduced viability of cancer cell line and highly cytotoxic effects of levels within HeLa significantly than, AMJ3, HCAM, A172 when compare with normal cell HBL00 in dose (130 μM) supported by assessment of apoptosis immunohistochemistry with morphological changes when compare cytotoxic effect of metformin with drug paclitaxel injection significant result on the same cancer cells lines (Hela) but non-significant with normal cells (HBL00). After that showed significant decreased in ROS production

after adding metformin at dose (130 μ M)on Hela cancers cells line. Result of gene expression of the PIK3CA gene was slightly increased, but this was not significant. Unlike the PIK3CA gene, the expression of the mTOR gene was significantly down-regulated whereas the expression of AKT1 was significantly up-regulated. This indicates that treatment of metformin had effects on both mTOR and AKT1 genes but not PIK3CA.

The current study concludes that metformin has beneficial addition of metformin in cancer chemotherapy drugs regmain will potentiate the effects of cytotoxic drugs partly due to counteraction of hyperglycemia and oxidative stress because of pancreatic hypofunction and particularly through metformin impact on mTOR to modify the resistance to chemotherapy agents ,these points summarized the novelty of current study.



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية الطب

احتمالية التأثير السمي للميتفورمين على الخلايا ; عقار قديم في تطبيق جديد

اطروحة

مقدمة لمجلس فرع الادوية كلية الطب / جامعة الموصل كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه
فلسفة في علم الادوية

من قبل

عبير منصور عبد الرسول حسون

(ماجستير ادوية)

بإشراف

الاستاذ الدكتور عصام حمو محمود

(استاذ - علم الادوية)

الملخص

الميتفورمين هو دواء يستخدم على نطاق واسع لعلاج مرض السكري الذي يتميز بفرط سكر الدم وهو من الأدوية التي يتم وصفها عن طريق الفم من مجموعة البيجوانيدات حظيت بالتأثيرات المتعددة للميتفورمين مؤخرًا باهتمام متزايد بسبب تأثيره السام للخلايا المتنوعة السرطانية وتأثيره على نمو وتكاثر الخلايا السرطانية حيث تناولت العديد من الأبحاث في هذا المجال حول وجود علاقة بين داء السكري وخطر الإصابة ببعض أنواع السرطان، ويرجع ذلك أساسًا إلى حقيقة أن مرض السكري هو حالة من ارتفاع السكر والإجهاد التأكسدي وارتفاع مستويات الالتهاب والتي بدورها يمكن أن تزيد من فرص الإصابة بالسرطان الذي يعرف أنه انتشار ونمو غير طبيعي للخلايا.

تهدف الدراسة إلى تقييم تأثير الميتفورمين (بجرع مختلفة وفترات زمنية مختلفة) على علامات الالتهاب إنترلوكين 1 بيتا ($IL-1\beta$) وعامل نخر الورم ($TNF-\alpha$) والإجهاد التأكسدي السعة الكلية لمضادات الأكسدة (TAOS) ومالونديالدهيد (MDA) بالإضافة إلى تقييم الهدف الرئيسي من الدراسة الحالية هو دراسة احتمالية الفعالية السمية للميتفورمين على الخلايا السرطانية ومسلك تلك السمية .

تم تقسيم طرق العمل في الدراسة الحالية إلى محورين المحور الأول دراسة النموذج المخبري / التداخلي المتعلق باستحداث مرض السكري في ذكور الجرذان البيضاء عن طريق استخدام الوكسان بجرعة 200 مجم / كجم تم تقسيم إجمالي العدد 75 (15 جرذ/ مجموعة) ثم قسمت إلى خمس مجموعات المجموعة الضابطة، ومجموعة مرض السكري و مجاميع العلاج المستحدث بالميتفورمين بجرع 100، 200، 300 ملغم / كلغم / يوم بعد 21 و 35 يوما لتقييم التأثيرات المضاد للالتهابات والأكسدة لجرعات مختلفة من الميتفورمين

المحور الثاني من الدراسة اجري في بنك العراق للتكنولوجيا الحيوية تناول تأثير الميتفورمين على خلايا الخطوط الخلوية السرطانية (HeLa, HCAM, HBL100, A172) باستخدام اختبار MTT التي تم تجهيزها في بنك المختبر العراقي البايولوجي IRAQ (AMJ13 Biotech Cell Bank حيث ان جميع الخلايا محفوظة في RPMI-1640 مع 10% Fetal bovine) و (streptomycin 100 g/mL) ثم Trypsin-EDTA. وحضنت عند 37 درجة مئوية و 5٪ من ثاني أكسيد الكربون تمت دراسة نسبة السمية الخلوية عن طريق مقايسة MTT وتم حساب نصف تركيز الجرعة المثبطة IC_{50} لجميع خطوط السرطان مع دراسة فحص

موت الخلايا المبرمج للموت الخلوي ، والاجهاد التأكسدي للخلايا السرطانية والدراسة الخلوية للتعبير الجيني .

أظهرت نتائج المحور الأول أن الفئران المصابة بداء السكري التي عولجت بالميتفورمين أظهرت تغيرات كبيرة من حيث وزن الجسم والسلوك الفسلجية من حيث التغذية وشرب الماء وادى علاج الميتفورمين الى خفض مستويات السكر في الدم لدى الفئران المصابة بداء السكري في اليوم 21 و 35 مقارنة باليوم 7 للمجموعات الثلاث $P = 0.000$ وبالنسبة لمستويات TNF- α في مصل الدم وانسجة الكبد أظهرت فرق معنوي بين المجموعات الثلاث في اليوم 7 و 21 و 35 مع اختلاف الجرع بالإضافة الى دراسة مستويات IL-1 β المتعلقة بالمصل والكبد أظهرت فرقا معنويا للمجاميع العلاجية بالجرع المختلفة. فيما يتعلق بالإجهاد التأكسدي أظهرت الدراسة الحالية ارتفاعا ملحوظا في TAOS في المجموعات المعالجة بالميتفورمين في الفترات يوم 21 و 35 مقارنة بمجموعة السكري التي تطابقت مع درجة البنكرياس المرضية النسيجية مع انخفاض MDA بشكل ملحوظ بعد العلاج بالميتفورمين وان للميتفورمين تأثير مضاد للالتهاب والاكسدة معتمدا على الجرعة والوقت.

أشارت النتائج إلى ان دواء الميتفورمين كانت له فعالية ضعيفة كمضاد للأكسدة خارج الجسم الحي وكانت الفعالية متدرجة اعتمادا على زيادة تركيز الدواء حيث ان نصف جرعة التثبيط IC₅₀ للميتفورمين (498.0 ميكروغرام / مل) بينما IC₅₀ حمض الأسكوربيك (29.62 ميكروغرام / مل) على التوالي عند 60 دقيقة .

بالنسبة لنتائج المحور الثاني التي تضمنت تأثير الميتفورمين على خلايا خطوط السرطانية تبين ان هناك انخفاضا كبيرا ملحوظا في قابلية بقاء الخلايا حية في الخط السرطاني HeLa مقارنة بـ AMJ3 و HCAM و A172 علاوة على ذلك، كان هذا العلاج آمن نسبيا للخلايا الطبيعية HB100 في جرعة 130 μ M ولوحظ ايضا موت الخلايا المبرمج مع تغيير الشكل المورفولوجي

وعند مقارنة التأثير السام للخلايا للميتفورمين مع حقن عقار باكليتاكسيل ، تكون النتيجة مختلفة معنويا على نفس خطوط الخلايا السرطانية (HeLa) ولكنها لاتظهر اختلافا معنويا مع الخلايا الطبيعية (HBL00) وأظهرت الدراسة الحالية ايضا انخفاضا كبيرا في إنتاج ROS بعد إضافة الميتفورمين بالنسبة لدراسة تأثير الميتفورمين على الخط السرطاني HeLa لوحظ زيادة غير معنوية في التعبير الجيني PIK3CA وتغير معنويا في جين AKT1, لوحظ ايضا تغير معنوي

بشكل كبير mTOR يشير هذا إلى أن علاج الميتفورمين كان له تأثيرات على كل من جينات mTOR و AKT1 ولكن ليس على PIK3CA .

استنتجت الدراسة الحالية أن للميتفورمين تأثير مفيد على مرض السكري من خلال خفض نسبة السكر في الدم والإجهاد التأكسدي والالتهابات علاوة على تأثيره الوقائي للأنسجة إلى جانب حمايته من التأثير المسرطن الناجم عن مرض السكري، وبالجانب الآخر كان للميتفورمين فعالية سمية للخلايا على مجموعة متنوعة من الخلايا السرطانية وخصوصا سرطان Hela وامكانية استخدام الميتفورمين لتقليل الآثار الجانبية للعلاج الكيميائي حيث ان معظم الآثار الجانبية هي ارتفاع سكر الدم نتيجة تحطم خلايا البنكرياس بعد العلاج الكيميائي بالإضافة الى قابليته على تقليل مقاومة العلاج الكيميائي عن طريق التأثير على mTOR ويعتبر علاجاً مستقبلياً للخلايا السرطانية وطريقة استراتيجية جديدة لاستخدامه كعلاج فعال عند إضافته مع الادوية المضادة للسرطان.