

Received: 2013.03.01
Accepted: 2014.01.10
Published: 2014.03.07

Metformina kluczem do alternatywnej aktywacji mikrogleju?

Metformin as a key to alternative activation of microglia?

Krzysztof Łabuzek^{1*}, Bożena Gabryel², Bogusław Okopień¹

¹ Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Katedry Farmakologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

² Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Wyniki ostatnich badań wskazują, że metformina (niezależnie od działania antyhiperglikemicznego) może hamować procesy neurozapalne i bezpośrednio wpływać na ośrodkowy układ nerwowy. Mechanizmy molekularne, przez które metformina działa przeciwzapalnie w mózgu są stosunkowo mało poznane. Obecnie przyjmuje się, że mechanizm działania metforminy polega głównie na aktywacji kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK). Udowodniono jednak, że pewne ośrodkowe działania biologiczne metforminy (np. uwalnianie cytokin, ekspresja arginazy I lub PGC-1 α) nie zależą od aktywacji AMPK, ale zachodzą poprzez mechanizmy AMPK-niezależne. W artykule omówiono aktualne dane wskazujące, iż korzystny wpływ metforminy obserwowany w eksperymentalnych modelach chorób neurodegeneracyjnych może być skutkiem promowania w mózgu tzw. alternatywnej aktywacji mikrogleju.

Słowa kluczowe:

metformina • AMPK • mikroglej • cytokiny • neurodegeneracja • mózg

Summary

The results of recent studies suggest that metformin, in addition to its antihyperglycemic efficacy, may also attenuate neuroinflammation and directly act on the central nervous system. However, the molecular mechanisms by which metformin exerts its anti-inflammatory effects in the brain remain largely unknown. Adenosine-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation is the most well-known mechanism of metformin action. However, some of the biological responses to metformin (e.g. the release of cytokines and the expression of arginase I or PGC-1 α) are not limited to AMPK activation but also are mediated by AMPK-independent mechanisms. This article reviews current evidence supporting the hypothesis that the shift of microglia toward alternative activation may underlie the beneficial effects of metformin observed in animal models of neurological disorders.

Key words:

metformin • AMPK • microglia • cytokines • neurodegeneration • brain

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1093217>

Word count: 3652

Tables: –

Figures: 1

References: 111

Adres autora: dr hab. n. med. Krzysztof Łabuzek, Katedra Farmakologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice; e-mail: labuzek@labuzek.com

Wykaz skrótów: **ACC** – karboksylaza acetylo-CoA; **AGEs** – końcowe produkty zaawansowanej glikacji; **AICAR** – 5-aminoimidazol-4-karboksyamid-1-beta-D-rybofuranosyd; **AMP** – adenylozomono-fosforan; **AMPK** – kinaza aktywowana AMP; **ATP** – adenylozotrifosforan; **BBB** – bariera krew-mózg; **CaMKK** – kinaza kinaz kalmodulinozależnych; **eNOS** – endotelialna syntaza tlenu azotu; **iNOS** – indukowalna syntaza tlenu azotu; **LKB1** – serynowo-treoninowa kinaza 1; **LOX-1** – lektynopodobne receptory dla oksydowanych cząsteczek LDL-1; **LPS** – lipopolisacharyd; **MCAO** – całkowita okluzja tętnicy środkowej mózgu; **MnSOD** – manganowa dysmutaza ponadtlenująca; **mTOR** – ssaczy cel rapamycyny; **OGD** – jednoczesna depriwacja tlenu i glikozy; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **PKC** – kinaza białkowa zależna od fosfatydyloinozytoli; **PGC-1α** – koaktywator-1α receptora gamma aktywowanego proliferatorami peroksyosomów; **PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytoli; **PKC** – kinaza białkowa C; **RFA** – reaktywne formy azotu; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **TAK1** – kinaza 1 aktywowana transformującym czynnikiem wzrostu β.

WSTĘP

Metformina (N1,N1-dimetylobiguanid) jest pochodną guanidyny o dwóch metylowych podstawnikach bocznych. Wartości stałej dysocjacji (pKa) wynoszą 2,8 i 11,5, co powoduje, iż w warunkach fizjologicznych metformina występuje głównie w postaci kationowej (>99,9%) o dużej hydrofilności [47]. Postać niejonizowaną metforminy (<0,01%), ze względu na obecność grup metylowych, charakteryzuje bardzo mała rozpuszczalność w tłuszczach o czym świadczy wartość współczynnika podziału n-oktanol/woda wynoszący -1,43. Dlatego też jej transport bierny przez błony komórkowe jest ograniczony [47]. Całkowita biodostępność po podaniu doustnym mieści się w zakresie 50-60%. Metformina nie wiąże się z białkami osocza, a jej objętość dystrybucji (Vd) wynosi około 4 L/kg [100]. W organizmie człowieka (w przeciwieństwie do szczura) metformina właściwie nie podlega biotransformacji i jest wydalana głównie z moczem [3,4]. Czas połowicznej eliminacji leku wynosi około 4-5 godzin [100].

Metformina weszła w skład leków przeciwcukrzycowych w latach 50 ub.w. i do dzisiaj, w USA i w większości krajów europejskich, jest jedyną pochodną biguanidu stosowaną w leczeniu. W oparciu o wyniki badania United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) opublikowanego w 1998 r. oraz zgodnie z aktualnymi wytycznymi polskich i światowych towarzystw diabetologicznych metformina jako jedyna, wraz z odpowiednią dietą, powinna być lekiem pierwszego rzutu w cukrzycy typu 2 [38]. Badanie UKPDS wykazało m.in., że metformina obniża ryzyko wystąpienia incydentów sercowo-naczy-

niowych niezależnie od działania antyhiperglikemicznego [66]. Obserwacje te skłoniły badaczy do określenia bezpośredniego wpływu metforminy na różne typy komórek, zwłaszcza budujące ściany naczyń krwionośnych. Przeprowadzone doświadczenia udowodniły, że metformina hamuje odpowiedź zapalną w komórkach śródbłonna naczyniowego [46], monocytach/makrofagach [66] oraz proliferację mięśni gładkich w ścianie naczyniowej [61]. Odkryte właściwości przeciwzapalne i antyproliferacyjne były podstawą do określenia częstotliwości występowania chorób nowotworowych u pacjentów z cukrzycą typu 2 leczonych metforminą. Wyniki badań obserwacyjnych wykazały, że stosowanie leku w tej grupie chorych istotnie redukuje ryzyko rozwoju nowotworów, niezależnie od jej działania antyhiperglikemicznego [14,31,63]. Antymitotyczne i przeciwnowotworowe właściwości metforminy potwierdzono w licznych eksperymentach zarówno na zwierzętach doświadczalnych, jak i na liniach ludzkich komórek nowotworowych [1,2,3,7,39,45,50,90,111]. Sugeruje się zatem, że metformina w przyszłości może być lekiem stosowanym w terapii adiuwantowej (uzupełniającej) nowotworów. Tym bardziej że działanie przeciwnowotworowe leku obserwowano w stężeniach terapeutycznych osiąganych u pacjentów z cukrzycą typu 2 po podaniu standardowych dawek i wobec komórek nowotworowych pochodzących z różnych narządów (mózgu, płuc, nerek, jelita i prostaty) [69]. Wyniki prób klinicznych w bliskiej perspektywie powinny ostatecznie zweryfikować hipotezę o istotnej antyneoplastycznej aktywności metforminy.

Badania przeprowadzone w ostatnich latach na zwierzęcych modelach chorób neurozapalnych i neurodegene-

racyjnych dowodzą, że metformina również wyraźnie korzystnie wpływa na naturalny ich przebieg. Podawanie metforminy istotnie poprawia funkcje motoryczne u myszy R6/2, stanowiących transgeniczny model choroby Huntingтона, oceniane testami behawioralnymi [64] i powoduje wydłużenie czasu przeżycia szczurów w modelu anoreksji wywołanej chorobą nowotworową [85]. Lek wykazuje działanie neuroprotektoryjne hamując apoptozę neuronów korowych szczura w modelu stresu oksydacyjnego związanego z cukrzycą [22,29] oraz apoptozę w hodowli pierwotnej szczurzych neuronów hipokampa w warunkach jednoczesnej deprywacji tlenu i glukozy (oxygen and glucose deprivation, OGD) [70]. Metformina poprawia też naturalny przebieg eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu u myszy [73]. Ponadto skutecznie przeciwdziała nadmiernej aktywacji szlaku sygnałowego mTOR (mammalian target of rapamycin) zaangażowanego w regulację licznych procesów komórkowych zarówno w rozwijającym się, jak i dojrzałym mózgu [102]. Ponieważ nasilona aktywacja ścieżki sygnałowej mTOR może prowadzić do zaburzeń neuroplastyczności, zatem działanie hamujące metforminy może mieć znaczenie terapeutyczne w chorobach neurologicznych (np. w padaczce) lub łagodzeniu bólu przewlekłego, w przebiegu których dochodzi do utrwalenia nieprawidłowych połączeń neuronalnych [79]. Antymitotyczny, przeciwzapalny i neuroprotektoryny wpływ metforminy został ostatecznie potwierdzony w hodowli ludzkich neuronów i komórek neuroblastoma [18].

CZY METFORMINA PRZENIKA BARIERĘ KREW-MÓZG?

Badania farmakokinetyczne wskazują, że metformina kumuluje się w ścianie jelita cienkiego oraz wątrobie, osiągając tam stężenia ponad dziesięć razy wyższe niż w surowicy krwi obwodowej [104]. Do kumulacji metforminy dochodzi również w niektórych strukturach wewnątrzkomórkowych. Udowodniono np., że jej poziom w mitochondriach może przekraczać stężenie osocze nawet tysiąc razy [105]. Dla oceny wpływu metforminy na procesy zachodzące w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) istotne jest czy przechodzi ona - oraz w jakim stopniu - przez barierę krew-mózg (blood brain barrier, BBB). Według nielicznych badań metformina z łatwością przenika przez nieuszkodzoną BBB, zarówno po jednorazowym, jak i przewlekłym podawaniu [18,104]. Co więcej, wielokrotne podawanie leku powoduje jego kumulację w przysadce mózgowej i płynie mózgowo-rdzeniowym [56].

Dodatkowo, indukcja ostrego uogólnionego stanu zapalnego u szczurów za pomocą lipopolisacharydu (LPS) znacząco zwiększa stężenie metforminy nie tylko w surowicy krwi tętniczej, ale również w podwzgórzach i przysadce mózgowej. Na podstawie wyników uzyskanych przez Cho i wsp. [19] nie należy tego tłumaczyć bezpośrednim uszkodzeniem BBB pod wpływem stosunkowo wysokiej dawki LPS (125 mg/kg/dzień). Nie można natomiast wykluczyć niekorzystnego wpływu na BBB dużych stężeń cytokin prozapalnych, obecnych we krwi obwodowej zwierząt traktowanych LPS [19].

Nieco inną dystrybucję w mózgu wykazuje metformina podczas jej długotrwałego stosowania z jednoczesną indukcją (przez wielokrotne, dootrzewnowe podawanie niskich dawek LPS) przewlekłego, uogólnionego stanu zapalnego o niewielkim nasileniu. Stan taki można traktować z pewnym przybliżeniem jako surogat chorób neurodegeneracyjnych. Wskazują na to wyniki badań, w których u zwierząt doświadczalnych chronicznie traktowanych LPS stwierdzono m.in. znaczne upośledzenie funkcji kognitywnych, aktywację apoptozy i autofagii neuronów oraz znaczną utratę komórek nerwowych w śródmózgowiu (zwłaszcza istocie czarnej), korze mózgu, móżdżku, prążkowie i hipokampie [24]. Wykazano także zmiany elektrofizjologiczne, metaboliczne i morfologiczne neuronów wraz ze znacznym zmniejszeniem ich liczby w korze i hipokampie szczurów, którym wielokrotnie podawano dootrzewnowo LPS [91]. W takim modelu doświadczalnym metformina kumuluje się w szczurzej przysadce mózgowej, opuszce węchowej, podwzgórzach oraz prążkowie [56]. Strukturą mózgu, która obfituje w największą liczbę komórek mikroglejowych jest właśnie prążkowie [51]. Wiadomo też, iż degeneracja neuronów dopaminergicznych tego regionu mózgu, powodująca przewagę układu hamującego nad pobudzającym, jest główną przyczyną choroby Parkinsona [43]. Przysadka mózgowa odgrywa natomiast fundamentalną rolę w regulacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej, której dysfunkcja występuje m.in. w zespole policystycznych jajników (polycystic ovary syndrome, PCOS). Według doniesień wielu autorów właśnie metformina okazuje się pomocna w zwalczaniu tej patologii [9,34,59,98].

Podsumowując tę niewielką liczbę danych dotyczących dystrybucji metforminy w mózgu należy zachować ostrożność, ponieważ w jej ocenie nie uwzględnia się roli błonowych transporterów kationów organicznych (organic cation transporters, OCT), dla których metformina pozostaje substratem, a ekspresja może różnić się osobniczo [20].

CZY METFORMINA I AMPK ZAWSZE STANOWIĄ DUET?

Obecnie przyjmuje się, że pleiotropowe (wielokierunkowe) działanie metforminy jest głównie skutkiem aktywacji kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMP-activated protein kinases, AMPK, EC 2.7.11.31). AMPK jest konserwowaną ewolucyjnie heterotrimeryczną kinazą serynowo-treoninową zbudowaną z katalitycznej podjednostki α występującej w dwóch izoformach ($\alpha 1$, $\alpha 2$) oraz dwóch podjednostek regulatorowych β ($\beta 1$, $\beta 2$) i γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) [32]. Poziom ekspresji genów kodujących poszczególne izoformy wykazuje istotną swoistość tkankową i jest odmienny w hepatocytach, komórkach mięśnia sercowego, mięśniach poprzecznie prążkowanych, adypocytach, enterocytach, makrofagach czy mikrogleju, a także zależny od umiejscowienia w konkretnych kompartmentach wewnątrzkomórkowych [32].

AMPK odgrywa ważną rolę w regulacji szlaków metabolicznych i optymalizacji wewnątrzkomórkowych

procesów energetycznych przez włączanie procesów wytwarzających energię, a wyłączenie procesów ją zużywających [99]. AMPK spełnia zatem rolę swoistego „czujnika” statusu energetycznego komórki uruchamiającego w przypadku deficytu energetycznego i dlatego jej wzmożoną aktywność obserwuje się w komórkach narażonych na szeroko rozumiany stres metaboliczny, objawiający się m.in. zwiększoną ekspresją licznych cytokin, tlenku azotu (NO), reaktywnych form tlenu (RFT) oraz podwyższonym stężeniem w cytosolu wewnątrzkomórkowego wolnego wapnia ($[Ca^{2+}]$) [99]. Udowodniono, iż wymienione czynniki bezpośrednio odpowiadają za aktywację kinaz nadrzędnych do AMPK, co doprowadza do jej fosforylacji i spowolnienia procesów energetycznych.

Na obecnym etapie wiedzy przyjmuje się, że aktywność AMPK podlega trójstopniowej regulacji pozwalającej na szybką reakcję komórki w odpowiedzi na niewielkie nawet zmiany statusu energetycznego, którego wskaźnikiem jest stosunek AMP/ATP [27]. Pierwszy z nich polega na odwracalnym związaniu dwóch cząsteczek AMP do swoistej domeny podjednostki γ (zwanej motywem CBS), wywołując jej zmiany konformacyjne i prowadzi do allosterycznej aktywacji. W obrębie podjednostki γ znajdują się bowiem trzy miejsca wiązania AMP. W stanie nieaktywnym przyłączona jest do niej na stałe jedna cząsteczka tego nukleotydu [27]. Połączenie dwóch dodatkowych cząsteczek AMP do podjednostki γ skutkuje 5-krotnym wzrostem aktywności enzymu. Następnie możliwa staje się fosforylacja treoniny (Thr172), umiejscowionej w podjednostce α , przez kinazy nadrzędne wobec AMPK i w efekcie dochodzi nawet do stukrotnego wzrostu jej aktywności enzymatycznej [27]. Obecnie znane są trzy kinazy regulujące poprzez fosforylację aktywność AMPK: serynowo/treoninowa kinaza 11 (liver kinase B1/serine threonine kinase 11, LKB1) (zaangażowana w mechanizm działania metforminy, patrz niżej), kinaza 1 aktywowana transformującym czynnikiem wzrostu β (TGF- β -activated kinase-1, TAK1) oraz serynowo-treoninowa kinaza kinazy β zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase β , CaMKK) [108,113]. Ponadto, w trzecim mechanizmie regulacyjnym, związanie AMP przez podjednostkę γ uniemożliwia defosforylację, a tym samym inhibicję AMPK przez fosfatazy [82].

Aktywna AMPK reguluje natomiast aktywność różnorodnych podległych jej substratów. Wśród nich jednym z najbardziej istotnych jest enzym karboksylaza acetylo-CoA (acety-CoA carboxylase, ACC), biorący udział zarówno w syntezie, jak i utlenianiu kwasów tłuszczowych [27]. ACC katalizuje reakcję karboksylacji acetylo-CoA do malonylo-CoA [41]. Fosforylacja ACC w pozycji seryny 79 przez AMPK powoduje jej inaktywację. To zmniejsza ilość wytwarzanego malonylo-CoA, aktywację acylotransferazy karnitynowej 1 (carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1) oraz zwiększa transport kwasów tłuszczowych do mitochondriów, gdzie ulegają utlenieniu [27]. Jednocześnie aktywacja AMPK nasila biogenezę mitochondrialną na

skutek aktywacji PGC-1 α i syntezę ATP. AMPK reguluje również aktywność reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylokoenzymu A (HMG-CoA), hamuje syntezę cholesterolu, lipolizę i lipogenezę w adipocytach, stymuluje wydzielanie insuliny przez trzustkę oraz zwiększa ekspresję heksokinazy i transportera glukozy GLUT4 w mięśniach poprzecznie prążkowanych, co z kolei nasila wychwyt glukozy i obniża glikemię [41,112]. Doniesienia ostatnich lat świadczą o tym, że wzrost ekspresji i aktywności AMPK w warunkach niedoborów energetycznych ma także związek z jej regulacyjnym wpływem na ścieżki sygnałowe wyzwalające proces kataboliczny jakim jest autofagia [71]. Wyniki wielu doświadczeń wskazują na związek między aktywnością AMPK, a działaniem antymitotycznym i przeciwnowotworowym jej aktywatorów, w tym metforminy [44,71,83].

Rola aktywacji AMPK w mózgu jest obecnie poddawana szczególnie dogłębnej analizie. W mózgu wykryto ekspresję mRNA i białek zarówno izoform podjednostki katalitycznej α ($\alpha 1$, $\alpha 2$), jak i podjednostek regulatorowych β i γ [95]. Ekspresję AMPK stwierdzono w neuronach, astrocytach, oligodendrocytach i mikrogleju [36,53,95]. Szczególnie wysoki jej poziom występuje w neuronach mózdzku i podwzgórza [77]. AMPK pełni ważną rolę już w czasie rozwoju mózgu ssaków, integrując, poprzez fosforylację białka retinoblastoma (Rb), sygnały pochodzące od czynników wzrostu i kontrolując cykl komórkowy. U myszy z delecją genu kodującego podjednostkę regulatorową β stwierdzono atrofię mózdzku oraz znaczną utratę neuronów i oligodendrocytów [25].

Na podstawie badań prowadzonych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* zaburzenia w ekspresji i aktywności AMPK łączy się obecnie także z etiologią i przebiegiem chorób neurodegeneracyjnych. Według ostatnich doniesień aktywacja AMPK obniża pozakomórkową akumulację β -amyloidu przez wpływ na autofagię i degradację tego białka w korze mózgowej szczura. Vingtreux i wsp. sugerują, iż aktywacja AMPK w OUN może stanowić w przyszłości ważny cel w terapii choroby Alzheimera [103]. Culmsee i wsp. wskazują z kolei na udział AMPK w mechanizmach cytoprotekcyjnych, ponieważ farmakologiczny jej aktywator, AICAR (5-aminoimidazol-4-karboksyamid-1-beta-D-rybofuranosyd), chroni neurony hipokampa przed apoptozą wywołaną *in vitro* przez OGD, glutaminian i β -amyloid [23].

W badaniach *in vitro* wykazano także, że aktywacja AMPK zapobiega wejściu astrocytów na ścieżkę apoptozy wywołaną depriacją glukozy lub obecnością w medium hodowlanym 2-deoksyglukozy [23], kwasami tłuszczowymi oraz wysokim stężeniem tlenku azotu [12]. Ponadto, AICAR działa przeciwzapalnie poprzez hamowanie wydzielania prozapalnych cytokin w hodowli pierwotnej astrocytów ekspozowanych na glikosfingolipid psychozynę lub LPS [32].

Jednak w dostępnym piśmiennictwie można również znaleźć liczne dane sugerujące, iż nadmierna aktywacja

AMPK w mózgu może być szkodliwa [35]. Wykazano bowiem, że nasiloną aktywacją AMPK i związane z nią zaburzenia angiogenezy, polegające na nasileniu proliferacji komórek śródbłonna i wytwarzaniu czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor, VEGF), mogą być przyczyną dysfunkcji krążenia mózgowego w chorobie Alzheimera [6]. Wzrost aktywności AMPK α 1 w jądrach komórek neuronalnych przyspiesza neurodegenerację zarówno w mysim modelu choroby Huntingтона, jak i u ludzi z tym schorzeniem [6]. Nasiloną aktywność enzymatyczną AMPK w mózgu stwierdza się także w następstwie stresu ischemicznego, hipoksji i/lub niedoborów glukozy. Wzrost fosforylacji AMPK α obserwowano w modelach *in vitro*, w tym m.in. w hodowli neuronów szczurzych narażonych na hipoksję [23] oraz *in vivo* u szczurów z całkowitą okluzją tętnicy środkowej mózgu (middle cerebral artery occlusion, MCAO) [62]. Molekularny mechanizm aktywacji AMPK w niedokrwieniu jest skutkiem znacznego ograniczenia dokomórkowej podaży tlenu i glukozy, co prowadzi do zatrzymania aktywności enzymów łańcucha oddechowego, wyczerpania zasobów ATP i załamania homeostazy energetycznej w komórce [67]. Wzrost współczynnika AMP/ATP indukuje zmiany konformacyjne AMPK, zwiększające jej podatność na fosforylację przez LKB1. Uzupełnianie niedoborów ATP za pośrednictwem glikolizy beztlenowej skutkuje gromadzeniem się kwasu mlekowego w przestrzeni wewnątrz- i międzykomórkowej i kwasicy. W takich warunkach mitochondria tracą zdolność do prawidłowej sekwestracji jonów Ca^{2+} [67]. Dodatkowo, pulę $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zwiększają jony Ca^{2+} napływające z zewnątrz oraz uwalniane z zasobów komórki. Aktywacji ulega kolejna kinaza nadrzędna wobec AMPK – CaMKK, co w konsekwencji nasila aktywność AMPK [62]. Mimo, iż aktywacja AMPK w niedokrwieniu mózgu ma na celu przywrócenie równowagi energetycznej, to jednak ostateczne jej konsekwencje pozostają niewyjaśnione. Biorąc pod rozważę przytoczone wyżej dane należy zatem stwierdzić, iż wyniki dotychczasowych badań dotyczących udziału AMPK w neuropatologii są niejednoznaczne, a nawet sprzeczne i wzajemnie wykluczające się. Niektórzy bowiem badacze wskazują na istotny udział AMPK w mechanizmach cytoprotekcyjnych, a inni postulują jej zaangażowanie w cytotoksyczność i procesy prowadzące do neurodegeneracji [82].

Dokładny mechanizm działania metforminy nie został jak dotąd w pełni określony. Do niedawna uważano, iż metformina może aktywować AMPK przez dwa równoległe zachodzące procesy: (i) zahamowanie kompleksu I łańcucha oddechowego (reduktaza dinukleotydu nikotynoadeninowego – koenzym Q) i związany z nim wzrost stosunku AMP/ATP oraz (ii) bezpośrednią aktywację LKB1 [5,26,113]. W niektórych badaniach metformina aktywowała jednak AMPK przy prawidłowym stosunku AMP/ATP w komórce, a więc przy niezmiennym wewnętrznym stanie energetycznym [42]. Próba wyjaśnienia przyczyny tego zjawiska doprowadziła do odkrycia roli nadtlendioazotynu (ONOO $^-$) w mechanizmie zależnej od LKB1 aktywacji AMPK przez metforminę [8,42]. Zahamowanie aktywności

kompleksu I łańcucha oddechowego przez lek prowadzi do nasilenia generowania anionorodnika nadadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [42]. Powstały $\text{O}_2^{\cdot-}$ reaguje z tlenkiem azotu (NO), dając jako produkt ONOO $^-$. W wysokich stężeniach (100 μM) nadtlendioazotyn działa niekorzystnie przez rozpręganie endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS) i inaktywację syntazy prostacykliny [109]. Wykazano natomiast, że niższe stężenia nadtlendioazotynu (1–10 μM) mogą aktywować AMPK [109], a usunięcie niezbędnych do jego syntezy substratów, przez wyciszenie ekspresji genu eNOS lub nadekspresję SOD, doprowadza do zahamowania aktywacji AMPK po metforminie [42]. Nadtlendioazotyn indukuje kaskadę kinaz, obejmującą kolejno: kinazę c-Src, PI3K, PDK1 i PKC ζ . Ta ostatnia fosforyluje LKB1 i nasila jej wiązanie z pseudokinazą STRAD i białkiem MO25 [16,113]. Odmienne od większości innych kinaz, aktywność LKB1 nie jest regulowana przez fosforylację, lecz w mechanizmie allosterycznym, warunkowanym utworzeniem kompleksu LKB1-STRAD-MO25. Białka STRAD i MO25 regulują stabilność i subkomórkowe rozmieszczenie LKB1 oraz są niezbędne do jej pełnej aktywności biologicznej, w tym aktywacji AMPK [16].

Od niedawna wiadomo, że skutki działania metforminy wynikają również z jej wpływu na inne niż kontrolowane przez AMPK, wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. Udowodniono, że metformina zwiększa aktywność kinazy białkowej p38 aktywowanej przez mitogeny (p38 mitogen-activated protein kinases, p38 MAPK) oraz kinazy białkowej C (protein kinase C, PKC) w linii komórkowej mięśnia sercowego szczura H9C2 [88]. Aktywna postać p38 MAPK jednocześnie stabilizuje mRNA dla TNF- α , przez co nasila jego syntezę i zwiększa ekspresję koaktywatora-1 α receptora gamma aktywowanego proliferatorami peroksysomów (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α , PGC-1 α), który stymuluje biogenezę mitochondriów w mikrogleju i jest wskaźnikiem alternatywnej aktywacji tych komórek (patrz niżej) [58,80,88]. Metformina wpływa również na szlak mTOR hamując aktywność kinazy p70S6K, głównego regulatora syntezy białek, w linii komórkowej ludzkiego raka piersi HER2 [102]. Jej właściwości antyoksydacyjne są skutkiem nasilenia ekspresji manganowej dysmutazy nadadtlenkowej (Mn-SOD) i zmniejszenia wytwarzania RFT w mitochondriach [15,52]. Metformina dezaktywuje również reaktywne dwuwęglowe produkty pośrednie glikolizy, zapobiegając powstawaniu końcowych produktów zaawansowanej glikacji (advanced glycation endproducts, AGEs) [87] oraz hamuje ekspresję lektynopodobnych receptorów oksydowanych cząsteczek LDL-1 (lectin-like oxidized receptor-1, LOX-1) [74].

MIKROGLEJ, AMPK I METFORMINA – PRZYSZŁOŚĆ NEUROFARMAKOLOGII?

Mikroglej stanowi 10–20% wszystkich komórek mózgu, a jego rola w utrzymywaniu prawidłowej funkcji neuronów jest niepodważalna [68,86]. Komórki mikrogleju wykazują zdolność do migracji, proliferacji oraz fagocytozy, biorąc udział w prezentacji antygenów, wytwarza-

ją cytokiny, prostaglandyny, leukotrieny, wydzielają NO, RFT, składniki dopełniacza, lizozym i aktywator plazminogenu [40]. Wiadomo również, że zmieniona reaktywność mikrogleju oraz zaburzenia komunikacji międzykomórkowej odpowiadają po części za patogenezę chorób neurologicznych, takich jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, płasawica Huntingtona, stwardnienie rozsiane, ośłupienie związane z infekcją wirusem HIV, choroby prionowe, uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne mózgu i encefalopatie metaboliczne [10,13,72,93]. Podobnie jak w przypadku makrofagów tkanek obwodowych, rodzaj pełnionej przez mikroglej aktywności podlega cyklicznym zmianom, którym towarzyszy nie tylko zmiana funkcji, ale również biochemicznej charakterystyki, co przekłada się na zmienność fenotypu [21,40]. Na podstawie analizy profilu ekspresji genów mikrogleju w pośmiertnych badaniach mózgów chorych na chorobę Alzheimera oraz mysich modelach neurodegeneracji, oprócz klasycznie aktywowanego mikrogleju ustalono istnienie mikrogleju aktywowanego alternatywnie lub hybrydy obu tych fenotypów. Patrząc na mikroglej przez pryzmat możliwości płynnego przekształcania się jednego fenotypu w drugi, warto zauważyć, że zaburzenia w regulacji cyklu wzajemnych przemian oraz w równowadze między komórkami reprezentującymi różne fenotypy mogą być przyczyną chorób neurodegeneracyjnych [21,37,40].

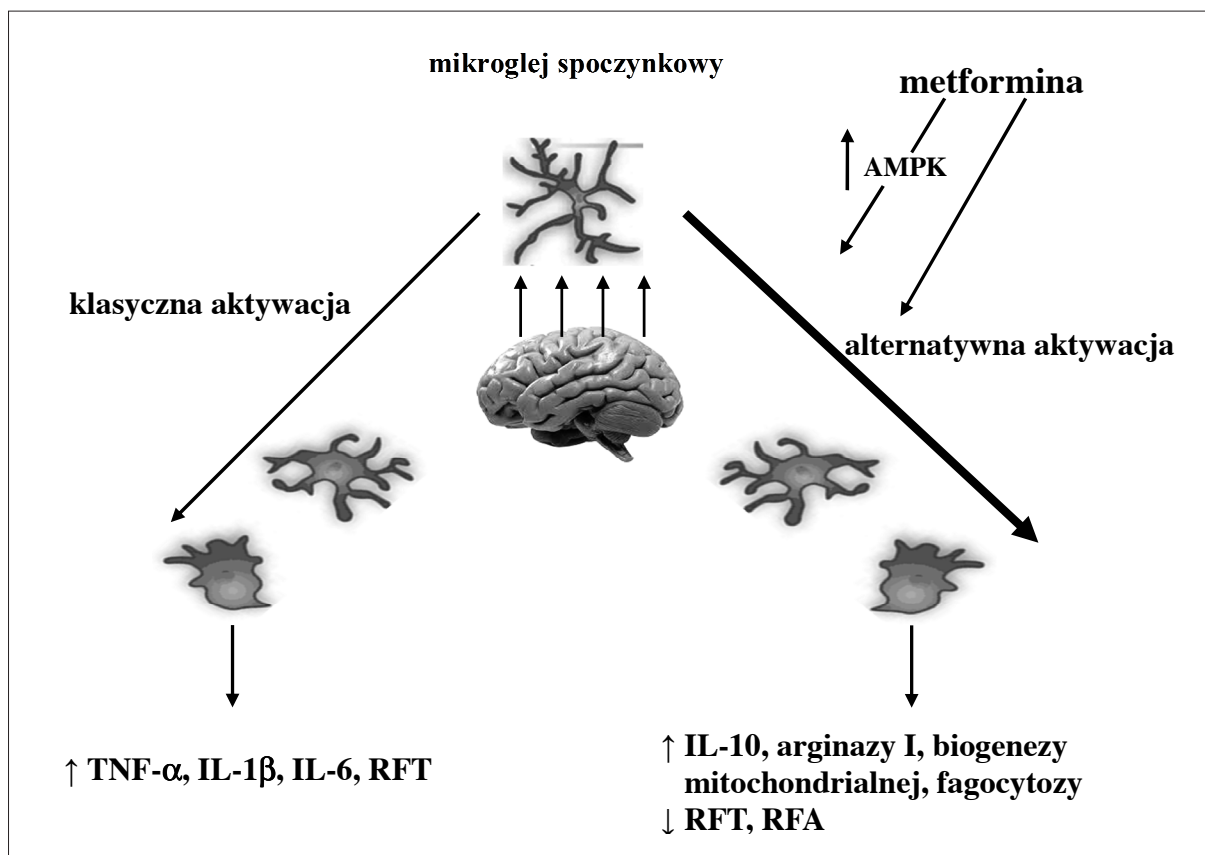
Z punktu widzenia farmakologii szczególnie interesujące są wzajemne relacje skrajnie odmiennych fenotypów tych komórek ze względu na to, że dodanie metforminy do pierwotnych hodowli mikrogleju promuje fenotyp alternatywny i przeciwzapalny. Udowodniono, że metformina w hodowli mikrogleju zmniejsza ekspresję indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) i wydzielanie NO, zwiększa ekspresję cytokin przeciwzapalnych (IL-10 i TGF- β), a co najbardziej zaskakujące, nasila również wydzielanie cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Nie wszystkim wymienionym działaniom towarzyszy wzrost aktywności AMPK lub translokacja do jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. To sugeruje, że metformina może wywierać niektóre działania poprzez wpływ na cytokiny na poziomie potranskrypcyjnym lub może nasilać ich wydzielanie również w mechanizmie niezależnym od AMPK [55]. Pobudzający wpływ metforminy na wydzielanie cytokin prozapalnych stwierdzono w badaniach własnych [55]. Istotny w tym kontekście jest również pojawianie się coraz większej liczby publikacji donoszących o neuroprotekcyjnych właściwościach cytokin prozapalnych, tj. IL-1, IL-6 i TNF- α [17,60,89,92,96,97]. Ponadto, Xie i wsp. [110] oraz Li i wsp. [61] udowodnili, że w mikrośrodkowisku mózgu nadtlendioazotyn (ONOO $^-$) wraz z cytokinami przeciwzapalnymi wpływają na efekt końcowy cytokin prozapalnych, które (w określonych warunkach) mogą działać właśnie neuroprotekcynie. Stres nitrozyacyjny, w którym powstają RFA (w tym ONOO $^-$) jest ściśle związany ze stresem oksydacyjnym, czyli zaburzeniem równowagi między ciągłym wytwarzaniem RFT, a ich likwidacją w enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcjach neutralizacji. Spośród RFT szkodliwe są zwłaszcza anion ponadtlenkowy (O $_2^{\cdot-}$), nadtlendioek wodoru (H $_2$ O $_2$)

oraz rodnik hydroksylowy (OH $^\cdot$) [81]. W komórkach stymulowanych LPS źródłem RFT są reakcje katalizowane przez oksydazę NADPH, ksantynową, cyklooksygenazy, lipooksygenazy oraz mitochondrialny i mikrosomalny łańcuch transportu elektronów [6,94,106].

Badania z użyciem bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolowego (MTT) wskazują, że stymulacja mikrogleju samym lipopolisacharydem powoduje wzrost aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej, natomiast łączne zastosowanie metforminy i LPS tego nie wywołuje. W innych modelach doświadczalnych obserwowano wyraźny hamujący wpływ metforminy na aktywność NADPH oksydazy [8,75,78]. Metformina istotnie zwiększa natomiast ekspresję mitochondrialnej MnSOD i hamuje wydzielanie RFT i RFA [52,55]. Działanie antyoksydacyjne leku potwierdzono również w badaniach własnych na pierwotnych hodowlach mikrogleju stymulowanych za pomocą LPS [55].

Metformina jest uznanym inhibitorem kompleksu I łańcucha oddechowego [76]. Co więcej, kumuluje się w znacznych ilościach w mitochondriach [105], których znaczną ilość i aktywność stwierdza się w komórkach mikroglejowych [4]. Według niektórych autorów metformina nie działa w komórkach ubogich w mitochondria lub ich pozbawionych. To sugeruje, że działanie leku jest wręcz zależne od obecności tych organelli [26,30,49]. Wydaje się, że zmniejszenie wydzielania RFT przez metforminę wynikać może z hamującego wpływu na enzymy mitochondrialne [55]. Jednak metformina wyraźnie nasila biogenezę mitochondrialną w mikrogleju [101]. Wyniki uzyskane przez zespół Vatsa i wsp. [101] wskazują, że zwiększenie ekspresji PGC-1 β indukuje ekspresję arginazy I. W związku z tym, iż PGC-1 α i PGC-1 β pełnią w komórce podobne funkcje, przypuszcza się, że również PGC-1 α pobudza ekspresję arginazy I [57]. Można zatem przyjąć, że metformina poprzez PGC-1 α nasila biogenezę mitochondrialną, w mechanizmie niezależnym od AMPK.

Wspomniane wyżej PGC-1 α i arginaza I stanowią uznane markery tzw. alternatywnej drogi pobudzenia mikrogleju [28]. Mikroglej aktywowany alternatywnie, w badaniach *in vitro* za pomocą IL-4 lub IL-13, cechuje się podwyższonym wytwarzaniem cytokin przeciwzapalnych (tj. IL-10, TGF- β), podwyższoną ekspresją arginazy I oraz receptorów mannozy (CD11 β). Cechą alternatywnie pobudzonego mikrogleju jest również zwiększona biogeneza mitochondrialna, której wskaźnikami są PGC-1 α i PGC-1 β [28,101]. PGC-1 β , poprzez nasilenie ekspresji jądrowych czynników transkrypcyjnych, takich jak NRF-1 i NRF-2 (nuclear respiratory factors 1 and 2), TFAM (mitochondrial transcription factor A) aktywuje transkrypcję genów mitochondrialnych [11,107]. Jej skutkiem jest nasilenie replikacji mitochondrialnego DNA (mtDNA), wzrost liczby i masy mitochondriów, nasilenie aktywności enzymów łańcucha oddechowego i intensywny metabolizm tlenowy [21,28,33,84,101]. Promowanie przez metforminę alternatywnej, przeciwzapalnej drogi aktywacji mikrogleju jest szczególnie istotne, bo właśnie taka jego „przeciwzapal-



Ryc. 1. Wpływ metforminy na alternatywną aktywację mikrogleju

na” postać odgrywa korzystną rolę. Potwierdziły to eksperymenty na mysich komórkach mikrogleju BV2, mysim modelu choroby Alzheimera oraz mózgach ludzi dotkniętych chorobą Alzheimera [21]. Udowodniono, że nasilenie objawów neurodegeneracji u myszy transgenicznych PS1M146L/APP751SL jest odwrotnie proporcjonalne do liczby alternatywnie aktywowanych komórek mikrogleju [48]. W hodowli mikrogleju po podaniu metforminy obserwuje się, zależne od aktywności AMPK, wyraźne cechy alternatywnego fenotypu tych komórek [54]. Zmiany te zachodzą równolegle do wzrostu ich aktywności fagocytarnej, stanowiącej kolejny wskaźnik funkcji alternatywnej. W badaniach *in vitro* wykazano bowiem, że metformina wyraźnie intensyfikuje fagocytozę mikrosfer opłaszczonych β -amyloidem [56]. Ponieważ metformina po przewlekłym podawaniu kumuluje się w OUN, być może jej stosowanie może polepszać właściwości fagocytarne mikrogleju również *in vivo*. Enzymatyczny rozkład pochłanianego β -amyloidu przez komórki mikrogleju zachodzi znacznie intensywniej w niższym pH lizosomów i endosomów. Jest to związane z większą aktywnością proteaz lizosomalnych, takich jak: dipeptydylopeptydaza I, tripeptydylopeptydaza I, katepsyna B i katepsyna D [65]. W badaniach *in vitro* oceniających zdolności fagocytarne mikrogleju zaobserwowano, że odpowiednio obniżone pH lizosomów istotnie zwiększa degradację pochłoniętego β -amyloidu, w porównaniu do hodowli kontrolnych,

w których β -amyloid nie był rozkładany tylko wydalany na zewnątrz komórek [65]. W badaniach własnych prowadzonych na komórkach mikrogleju również obserwowano, że metformina nasila właściwości fagocytarne przy jednoczesnym obniżeniu pH przedziału endosomalno/lizosomalnego [54]. Warto podkreślić, iż fagocytoza i wewnątrzkomórkowa degradacja peptydów β -amyloidu stanowi główny mechanizm ograniczający ich akumulację i neurotoksyczność w mózgu, a metformina poprzez obniżenie pH układu endosomalno/lizosomalnego może go dodatkowo wzmacniać [65].

PODSUMOWANIE

Przedstawione wyżej naukowe fakty wskazują na nowe właściwości metforminy oraz nieznane dotąd, niezależne od AMPK, mechanizmy jej działania. Co interesujące, metformina nasila wydzielanie cytokin prozapalnych przez mikroglej i jednocześnie promuje jego alternatywny fenotyp, zaangażowany niewątpliwie w endogenne mechanizmy neuroprotektoryjne. Należy jednak pamiętać, że skutki aktywacji AMPK przez metforminę w komórkach mikrogleju, są jak dotąd słabo poznane. Niemniej jednak przedstawiona zależność: metformina-AMPK-mikroglej (ryc. 1) staje się coraz bardziej obiecującym celem badań nad mechanizmami chorób neurodegeneracyjnych i neurozapalnych oraz możliwościami farmakologicznego ich leczenia.

PÍSMIENICTWO

- [1] Alimova I.N., Liu B., Fan Z., Edgerton S.M., Dillon T., Lind S.E., Thor A.D.: Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest *in vitro*. *Cell Cycle*, 2009; 8: 909-915
- [2] Anisimov V.N., Berstein L.M., Egormin P.A., Piskunova T.S., Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Kovalenko I.G., Poroshina T.E., Semenchenko A.V., Provinciali M., Re F., Franceschi C.: Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp. Gerontol.*, 2005; 40: 685-693
- [3] Bailey C.J.: Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care*, 1992; 15: 755-772
- [4] Batandier C., Guigas B., Demaille D., El-Mir M.Y., Fontaine E., Rigoulet M., Leverve X.M.: The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2006; 38: 33-42
- [5] Beal M.F.: Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.*, 2000; 23: 298-304
- [6] Beckner M.E., Gobel G.T., Abounader R., Burovic F., Agostino N.R., Laterra J., Pollack I.F.: Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Lab. Invest.*, 2005; 85: 1457-1470
- [7] Bellin C., de Wiza D.H., Wiernsperger N.F., Rösen P.: Generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells: influence of hyperglycemia and metformin. *Horm. Metab. Res.*, 2006; 38: 732-739
- [8] Ben Ayed B., Dammak dit Mlik S., Ben Arab H., Trabelssi H., Chah-tour H., Mathlouthi N., Dhuib M., Kassiss M., Saiidane D., Trabelssi K., Guermazi M.: Metformin effects on clomifene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *Tunis. Med.*, 2009; 87: 43-49
- [9] Benveniste E.N.: Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J. Mol. Med.*, 1997; 75: 165-173
- [10] Bergeron R., Ren J.M., Cadman K.S., Moore I.K., Perret P., Pypaert M., Young L.H., Semenkovich C.F., Shulman G.I.: Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001; 281: E1340-E1346
- [11] Blázquez C., Geelen M. J., Velasco G., Guzmán M.: The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS Lett.*, 2001; 489: 149-153
- [12] Block M.L., Hong J.S.: Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007; 35: 1127-1132
- [13] Bonnefont-Rousselot D., Raji B., Walrand S., Gardès-Albert M., Jore D., Legrand A., Peynet J., Vasson M.P.: An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, 2003; 52: 586-589
- [14] Boudeau J., Scott J.W., Resta N., Deak M., Kieloch A., Komander D., Hardie D.G., Prescott A.R., van Aalten D.M., Alessi D.R.: Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 6365-6375
- [15] Bowker S.L., Majumdar S.R., Veugelers P., Johnson J.A.: Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care*, 2006; 29: 254-258
- [16] Carlson N.G., Wiegand W.A., Chen J., Bacchi A., Rogers S.W., Gahring L.C.: Inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J. Immunol.*, 1999; 163: 3963-3968
- [17] Chen Y., Zhou K., Wang R., Liu Y., Kwak Y.D., Ma T., Thompson R.C., Zhao Y., Smith L., Gasparini L., Luo Z., Xu H., Liao F.F.: Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 3907-3912
- [18] Cho Y.K., Choi Y.H., Kim S.H., Lee M.G.: Effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on the metformin pharmacokinetics in rats. *Xenobiotica*, 2009; 39: 946-954
- [19] Choi M.K., Song I.S.: Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2008; 23: 243-253
- [20] Colton C.A., Mott R.T., Sharpe H., Xu Q., Van Nostrand W.E., Vittek M.P.: Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J. Neuroinflammation*, 2006; 3: 27
- [21] Correia S., Carvalho C., Santos M.S., Proença T., Nunes E., Duarte A.I., Monteiro P., Seica R., Oliveira C.R., Moreira P.I.: Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Med. Chem.*, 2008; 4: 358-364
- [22] Culmsee C., Monnig J., Kemp B.E., Mattson M.P.: AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J. Mol. Neurosci.*, 2001; 17: 45-58
- [23] Czapski G.A., Gajkowska B., Strosznajder J.B.: Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus. *Brain Res.*, 2010; 1356: 85-94
- [24] Dasgupta B., Milbrandt J.: AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Dev. Cell*, 2009; 16: 256-270
- [25] Demaille D., Guigas B., Leverve X., Wiernsperger N., Devos P.: Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 63: 1259-1272
- [26] Dziewulska A., Dobrzyń P., Dobrzyń A.: Rola kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) w regulacji metabolizmu mięśni szkieletowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 513-521
- [27] Edwards J.P., Zhang X., Frauwirth K.A., Mosser D.M.: Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.*, 2006; 80: 1298-1307
- [28] El-Mir M.Y., Demaille D., R-Villanueva G., Delgado-Esteban M., Guigas B., Attia S., Fontaine E., Almeida A., Leverve X.: Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J. Mol. Neurosci.*, 2008; 34: 77-87
- [29] El-Mir M.Y., Nogueira V., Fontaine E., Avéret N., Rigoulet M., Leverve X.: Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 223-228
- [30] Evans J.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M., Alessi D.R., Morris A.D.: Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, 2005; 330: 1304-1305
- [31] Fijałkowski F., Jarzyna R.: Rola podwzgórzowej kinazy białkowej aktywowanej przez AMP w kontroli pobierania pokarmu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 231-243
- [32] Fu X., Wan S., Lyu Y.L., Liu L.F., Qi H.: Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS One*, 2008; 23: 3: e2009
- [33] Gambineri A., Semple R.K., Forlani G., Genghini S., Grassi I., Hyden C.S., Pagotto U., O'Rahilly S., Pasquali R.: Monogenic polycystic ovary syndrome due to a mutation in the lamin A/C gene is sensitive to thiazolidinediones but not to metformin. *Eur. J. Endocrinol.*, 2008; 159: 347-353
- [34] Garcia-Gil M., Pesi R., Perna S., Allegrini S., Giannacchini M., Camici M., Tozzi M.G.: 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience*, 2003; 117: 811-820

- [35] Giri S., Nath N., Smith B., Viollet B., Singh A.K., Singh I.: 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 479-487
- [36] Giulian D., Baker T.J.: Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.*, 1986; 6: 2163-2178
- [37] Guastamacchia E., Resta F., Triggiani V., Liso A., Licchelli B., Ghiyasaldin S., Sabbà C., Tafaro E.: Evidence for a putative relationship between type 2 diabetes and neoplasia with particular reference to breast cancer: role of hormones, growth factors and specific receptors. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*, 2004; 4: 59-66
- [38] Hanisch U.K., Kettenmann H.: Microglia: active sensor and versatile effectors cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.*, 2007; 10: 1387-1394
- [39] Hardie D.G.: Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992; 1123: 231-238
- [40] Hawley S.A., Gadalla A.E., Olsen G.S., Hardie D.G.: The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 2002; 51: 2420-2425
- [41] Herrero M.T., Barcia C., Navarro J.M.: Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv. Syst.*, 2002; 18: 386-404
- [42] Imamura K., Ogura T., Kishimoto A., Kaminishi M., Esumi H.: Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 287: 562-567
- [43] Isakovic A., Harhaji L., Stevanovic D., Markovic Z., Sumarac-Dumanovic M., Starcevic V., Micic D., Trajkovic V.: Dual antiangioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 1290-1302
- [44] Isoda K., Young J.L., Zirlik A., MacFarlane L.A., Tsuboi N., Gerdes N., Schönbeck U., Libby P.: Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B in human vascular wall cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 611-617
- [45] Jack D.B.: Handbook of clinical pharmacokinetic data. Macmillan, Basingstoke 1992
- [46] Jimenez S., Baglietto-Vargas D., Caballero C., Moreno-Gonzalez I., Torres M., Sanchez-Varo R., Ruano D., Vizuet M., Gutierrez A., Vitorica J.: Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/AP-P751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J. Neurosci.*, 2008; 28: 11650-11661
- [47] Kaminski M., Kiessling M., Süß D., Krammer P.H., Gülow K.: Novel role for mitochondria: protein kinase C θ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 3625-3639
- [48] Kefas B.A., Cai Y., Kerckhofs K., Ling Z., Martens G., Heimberg H., Pipeleers D., Van de Castele M.: Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 68: 409-416
- [49] Kim W.G., Mohney R.P., Wilson B., Jeohn G.H., Liu B., Hong J.S.: Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 6309-6316
- [50] Kukidome D., Nishikawa T., Sonoda K., Imoto K., Fujisawa K., Yano M., Motoshima H., Taguchi T., Matsumura T., Araki E.: Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes*, 2006; 55: 120-127
- [51] Kuo C.L., Ho F.M., Chang M.Y., Prakash E., Lin W.W.: Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. *J. Cell. Biochem.*, 2008; 103: 931-940
- [52] Łabuzek K., Liber S., Gabryel B., Adamczyk J., Okopień B.: Metformin increases phagocytosis and acidifies lysosomal/endosomal compartments in AMPK-dependent manner in rat primary microglia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2010; 381: 171-186
- [53] Łabuzek K., Liber S., Gabryel B., Okopień B.: Metformin has adenosine-monophosphate activated protein kinase (AMPK)-independent effects on LPS-stimulated rat primary microglial cultures. *Pharmacol. Rep.*, 2010; 62: 827-848
- [54] Łabuzek K., Suchy D., Gabryel B., Bielecka A., Liber S., Okopień B.: Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol. Rep.*, 2010; 62: 956-965
- [55] Lai L., Leone T.C., Zechner C., Schaeffer P.J., Kelly S.M., Flanagan D.P., Medeiros D.M., Kovacs A., Kelly D.P.: Transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev.*, 2008; 22: 1948-1961
- [56] Lee Y.B., Schrader J.W., Kim S.U.: p38 map kinase regulates TNF- α production in human astrocytes and microglia by multiple mechanisms. *Cytokine*, 2000; 12: 874-880
- [57] Legro R.S., Myers E.R., Barnhart H.X., Carson S.A., Diamond M.P., Carr B.R., Schlaff W.D., Coutifaris C., McGovern P.G., Cataldo N.A., Steinkampf M.P., Nestler J.E., Gosman G., Guidice L.C., Leppert P.C., Reproductive Medicine Network: The pregnancy in polycystic ovary syndrome study: baseline characteristics of the randomized cohort including racial effects. *Fertil. Steril.*, 2006; 86: 914-933
- [58] Lemere C.A.: A beneficial role for IL-1 β in Alzheimer disease? *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 1483-1485
- [59] Li J., Baud O., Vartanian T., Volpe J.J., Rosenberg P.A.: Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 9936-9941
- [60] Li J., Zeng Z., Viollet B., Ronnett G.V., McCullough L.D.: Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke*, 2007; 38: 2992-2999
- [61] Libby G., Donnelly L.A., Donnan P.T., Alessi D.R., Morris A.D., Evans J.M.: New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2009; 32: 1620-1625
- [62] Ma T.C., Buescher J.L., Oatis B., Funk J.A., Nash A.J., Carrier R.L., Hoyt K.R.: Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci. Lett.*, 2007; 411: 98-103
- [63] Majumdar A., Cruz D., Asamoah N., Buxbaum A., Sohar I., Lobel P., Maxfield F.R.: Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol. Biol. Cell*, 2007; 18: 1490-1496
- [64] Mamputu J.C., Wiernsperger N.F., Renier G.: Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence. *Diabetes Metab.*, 2003; 29: 6S71-6S76
- [65] McCullough L.D., Zeng Z., Li H., Landree L.E., McFadden J., Ronnett G.V.: Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 20493-20502
- [66] McGeer P.L., Kawamata T., Walker D.G., Akiyama H., Tooyama I., McGeer E.G.: Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*, 1993; 7: 84-92
- [67] Micic D., Cvijovic G., Trajkovic V., Duntas L.H., Polovina S.: Metformin: its emerging role in oncology. *Hormones*, 2011; 10: 5-15

- [68] Mielke J.G., Taghibiglou C., Wang Y.T.: Endogenous insulin signaling protects cultured neurons from oxygen-glucose deprivation-induced cell death. *Neuroscience*, 2006; 143: 165-173
- [69] Motoshima H., Goldstein B.J., Igata M., Araki E.: AMPK and cell proliferation - AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J. Physiol.*, 2006; 574: 63-71
- [70] Müller N., Ackenheil M.: Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 1998; 22: 1-33
- [71] Nath N., Khan M., Paintlia M.K., Singh I., Hoda M.N., Giri S.: Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J. Immunol.*, 2009; 182: 8005-8014
- [72] Ouslimani N., Mahrouf M., Peynet J., Bonnefont-Rousselot D., Cosson C., Legrand A., Beaudoux J.L.: Metformin reduces endothelial cell expression of both the receptor for advanced glycation end products and lectin-like oxidized receptor 1. *Metabolism*, 2007; 56: 308-313
- [73] Ouslimani N., Peynet J., Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Legrand A., Beaudoux J.L.: Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism*, 2005; 54: 829-834
- [74] Owen M.R., Doran E., Halestrap A.P.: Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.*, 2000; 348: 607-614
- [75] Pertsch M., Duncan G.E., Stumpf W.E., Pilgrim C.: A histochemical study of the regional distribution in the rat brain of enzymatic activity hydrolyzing glucose- and 2-deoxyglucose-6-phosphate. *Histochemistry*, 1988; 88: 257-262
- [76] Piwkowska A., Rogacka D., Jankowski M., Dominiczak M.H., Stepiński J.K., Angielski S.: Metformin induces suppression of NAD(P) H oxidase activity in podocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 393: 268-273
- [77] Potter W.B., O'Riordan K.J., Barnett D., Osting S.M., Wagoner M., Burger C., Roopra A.: Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. *PLoS One*, 2010; 5: e8996
- [78] Puigserver P., Rhee J., Lin J., Wu Z., Yoon J.C., Zhang C.Y., Krauss S., Mootha V.K., Lowell B.B., Spiegelman B.M.: Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR- γ coactivator-1. *Mol. Cell*, 2001; 8: 971-982
- [79] Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M.: Reaktywne formy azotu i tlenu. *Pol. Merk. Lekarski*, 2009; 27: 338-340
- [80] Ramamurthy S., Ronnett G.: AMP-activated protein kinase (AMPK) and energy-sensing in the brain. *Exp. Neurobiol.*, 2012; 21: 52-60
- [81] Rattan R., Giri S., Singh A.K., Singh I.: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 39582-39593
- [82] Reznick R.M., Shulman G.I.: The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J. Physiol.*, 2006; 574: 33-39
- [83] Ropelle E.R., Pauli J.R., Zecchin K.G., Ueno M., de Souza C.T., Morari J., Faria M.C., Velloso L.A., Saad M.J., Carvalheira J.B.: A central role for neuronal adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in cancer-induced anorexia. *Endocrinology*, 2007; 148: 5220-5229
- [84] Rozemuller J.M., van der Valk P., Eikelenboom P.: Activated microglia and cerebral amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Res. Immunol.*, 1992; 143: 646-649
- [85] Ruggiero-Lopez D., Lecomte M., Moinet G., Patereau G., Lagarde M., Wiernsperger N.: Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem. Pharmacol.*, 1999; 58: 1765-1773
- [86] Saeedi R., Parsons H.L., Wambolt R.B., Paulson K., Sharma V., Dyck J.R., Brownsey R.W., Allard M.F.: Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2008; 294: H2497-H2506
- [87] Sawada H., Hishida R., Hirata Y., Ono K., Suzuki H., Muramatsu S., Nakano I., Nagatsu T., Sawada M.: Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurosci. Res.*, 2007; 85: 1752-1761
- [88] Schneider M.B., Matsuzaki H., Haorah J., Ulrich A., Standop J., Ding X.Z., Adrian T.E., Pour P.M.: Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology*, 2001; 120: 1263-1270
- [89] Semmler A., Hermann S., Mormann F., Weberpals M., Paxian S.A., Okulla T., Schäfers M., Kummer M.P., Klockgether T., Heneka M.T.: Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J. Neuroinflammation*, 2008; 5: 38
- [90] Shafteel S.S., Kyrkanides S., Olschowka J.A., Miller J.N., Johnson R.E., O'Banion M.K.: Sustained hippocampal IL-1 β overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 1595-1604
- [91] Skup M.: Komórka glejowa w normie i patologii. W: *Mózg a zachowanie*. T. Górski, A. Grabowska, J. Zagrodzka. PWN Warszawa. 2000, 4: 68-90
- [92] Sonoda J., Laganière J., Mehl I.R., Barish G.D., Chong L.W., Li X., Scheffler I.E., Mock D.C., Bataille A.R., Robert F., Lee C.H., Giguère V., Evans R.M.: Nuclear receptor ERR α and coactivator PGC-1 β are effectors of IFN- γ -induced host defense. *Genes Dev.*, 2007; 21: 1909-1920
- [93] Steinberg G.R., Kemp B.E.: AMPK in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2009; 89: 1025-1078
- [94] Tachida Y., Nakagawa K., Saito T., Saido T.C., Honda T., Saito Y., Murayama S., Endo T., Sakaguchi G., Kato A., Kitazume S., Hashimoto Y.: Interleukin-1 β up-regulates TACE to enhance α -cleavage of APP in neurons: resulting decrease in A β production. *J. Neurochem.*, 2008; 104: 1387-1393
- [95] Takei Y., Laskey R.: Tumor necrosis factor α regulates responses to nerve growth factor, promoting neural cell survival but suppressing differentiation of neuroblastoma cells. *Mol. Biol. Cell*, 2008; 19: 855-864
- [96] Tien J.C., Tan T.Y.: Non-surgical interventions for threatened and recurrent miscarriages. *Singapore Med. J.*, 2007; 48: 1074-1090
- [97] Towler M.C., Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.*, 2007; 100: 328-341
- [98] Tucker G.T., Casey C., Phillips P.J., Connor H., Ward J.D., Woods H.F.: Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1981; 12: 235-246
- [99] Vats D., Mukundan L., Odegaard J.I., Zhang L., Smith K.L., Morel C.R., Wagner R.A., Greaves D.R., Murray P.J., Chawla A.: Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell. Metab.*, 2006; 4: 13-24
- [100] Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraro C., Menendez J.A.: The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle*, 2009; 8: 88-96
- [101] Vingtdoux V., Giliberto L., Zhao H., Chandakkar P., Wu Q., Simon J.E., Janle E.M., Lobo J., Ferruzzi M.G., Davies P., Marambaud P.: AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid- β peptide metabolism. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 9100-9113
- [102] Wilcock C., Bailey C.J.: Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*, 1994; 24: 49-57

- [103] Wilcock C., Wyre N.D., Bailey C.J.: Subcellular distribution of metformin in rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1991; 43: 442-444
- [104] Wilkinson B.L., Landreth G.E.: The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*, 2006; 3: 30
- [105] Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G., Moortha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla R.C., Spiegelman B.M.: Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 1999; 98: 115-124
- [106] Xie M., Zhang D., Dyck J.R., Li Y., Zhang H., Morishima M., Mann D.L., Taffet G.E., Baldini A., Khoury D.S., Schneider M.D.: A pivotal role for endogenous TGF- β -activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 17378-17383
- [107] Xie Z., Dong Y., Zhang M., Cui M.Z., Cohen R.A., Riek U., Neumann D., Schlattner U., Zou M.H.: Activation of protein kinase C ζ by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 6366-6375
- [108] Xie Z., Wei M., Morgan T.E., Fabrizio P., Han D., Finch C.E., Longo V.D.: Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid β -peptide 1-42 and lipopolysaccharide-activated microglia. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 3484-3492
- [109] Zakikhani M., Dowling R., Fantus I.G., Sonenberg N., Pollak M.: Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.*, 2006; 66: 10269-10273
- [110] Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N., Hirshman M.F., Goodyear L.J., Moller D.E.: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108: 1167-1174
- [111] Zou M.H., Kirkpatrick S.S., Davis B.J., Nelson J.S., Wiles W.G.^{4th}, Schlattner U., Neumann D., Brownlee M., Freeman M.B., Goldman M.H.: Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 43940-43951

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.