

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА РАЗВИТИЕ САРКОМЫ WALKER-256

Г.А. Ноздрин, доктор ветеринарных наук, профессор
А.С. Гаврилович, аспирант

Новосибирский государственный аграрный универси-
тет, Новосибирск, Россия
E-mail: pharmgengpath@mail.ru

Ключевые слова: анемия, атаксия, гематурия, гемоглобин, гранулоциты, карцинома, карциносаркома, крысы, лейкоциты, моноциты, морфология новообразования, саркома Walker-256, тромбоциты, эозинофилы, эритроциты, ядерный полиморфизм

Реферат. В ветеринарной медицине большой интерес стал проявляться к препаратам, которые поддерживают организм в период химиотерапевтического лечения. Мы провели исследование влияния препарата метформина на развитие карциносаркомы в монорежиме. Изучались закономерности роста искусственно индуцированной саркомы Walker-256 у крыс линии Wistar 3-месячного возраста в постлактационный период. Исследование проводилось на кафедре фармакологии и общей патологии факультета ветеринарной медицины. Объектами исследования служили крысы линии Wistar – самки в возрасте 3 месяцев, массой 150–200 г в постлактационный период. Крысы обеих групп были заражены саркомой Walker-256 путём инъекции в бедренную мышцу в дозе 106 кл/гол. Крысам опытной группы дополнительно применяли метформин в дозе 30 мг/гол. ежедневно вместе с водой. Гистологические, цитологические и гематологические исследования проводили на 14-й и 21-й дни с момента заражения крыс опухолью. Под действием метформина у заражённых саркомой Walker-256 крыс увеличивалось количество эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов крови, уменьшалась концентрация гемоглобина и не изменялось количество тромбоцитов. В биоптате контрольных крыс по сравнению с аналогами опытных групп под воздействием метформина увеличивается концентрация моноцитов, понижается количество эозинофилов и ядерный полиморфизм. Кроме того, было выявлено, что метформин индуцирует нервно-психические отклонения у крыс, такие как извращение аппетита и каннибализм. Более выраженный воспалительный ответ в опытной группе свидетельствует о том, что необходимо дальнейшее изучение влияния препарата на развитие различных новообразований, т.к. это является важным фактором в выборе стратегии лечения.

EFFECT OF METFORMIN ON THE DEVELOPMENT OF SARCOMA WALKER-256

G.A. Nozdrin, Doctor of Veterinary Sciences, Professor
A.S. Gavrilovich, Postgraduate student

Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Keywords: anaemia, ataxia, haematuria, haemoglobin, granulocytes, carcinoma, carcinosarcoma, rats, leukocytes, monocytes, neoplasm morphology, Walker-256 sarcoma, platelets, eosinophils, erythrocytes, nuclear polymorphism

Abstract. There has been a great deal of interest in veterinary medicine in drugs that support the body during chemotherapeutic treatment. The authors conducted a study of the drug's effect on the development of carcinosarcoma in the mono regimen. The growth pattern of artificially induced Walker-256 sarcoma in 3-month-old Wistar rats in the post-lactation period was studied. The study was conducted at the Department of Pharmacology and General Pathology, Faculty of Veterinary Medicine.

The study was conducted at the Department of Pharmacology and General Pathology, Faculty of Veterinary Medicine. The objects of the study were Wistar rats, female rats of three months of age, weighing 150-200 g in the post-lactation period. Rats of both groups were infected with Walker 256 sarcoma by injection into the thigh muscle at a dose of 106 ml/head. Rats in the experimental group were additionally administered metformin at 30 mg/head daily with water. Histological, cytological and haematological studies were performed on days 14 and 21 from the time of infection of the rats with the tumour. Under the action of metformin, the number of erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes and granulocytes in Walker-256 sarcoma-infected rats increased, the concentration of haemoglobin decreased, and the number of platelets did not change. In the biopsy specimen of control rats compared to the counterparts of the experimental groups, the concentration of monocytes was increased. The number of eosinophils and nuclear polymorphism was decreased under the influence of metformin. In addition, metformin-induced neuropsychiatric abnormalities in rats, such as appetite perversion and cannibalism. The more pronounced inflammatory response in the experimental group indicates that further study of the drug's effect on the development of various neoplasms is necessary, as this is an essential factor in the choice of the treatment strategy.

Вопрос развития новообразований является одним из основных в современной медицине, молекулярной биологии и смежных с ними областях наук. Важнейшим этапом развития опухоли является ее способность индуцировать и поддерживать ангиогенез. Показано, что в опухоли образуется сосудистая сеть, которая значительно отличается от сосудов здоровой ткани [1]. Например, в протоковых аденокарциномах поджелудочной железы новых сосудов образуется мало, в них много стромальных участков, в которых отсутствуют сосуды, а, к примеру, опухоли почек высокоангиогенны, следовательно, в них развита плотная сосудистая сеть [2]. Сейчас неоангиогенез в опухолях общепризнан одной из наиболее значимых стадий опухолевой прогрессии, а усилия фармакотерапии направлены на совершенствование препаратов – блокаторов роста сосудистого эндотелия [3, 4].

В первичный очаг сосуды не прорастают, пока клетки эндотелия не получают от опухоли соответствующих сигналов. Секретируемый клетками опухолей эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) связывается со своими рецепторами на поверхности клеток эндотелия сосудов и запускает сигнал пролиферации эндотелиальных клеток. Кроме VEGF участвуют и другие члены этого семейства, например плацентарный фактор роста (PlGF), а также цитокины (трансформирующий фак-

тор роста [TGF- β], тромбоцитарный фактор роста [PDGF], эфрины, фактор роста фибробластов [FGF], Ang-1 и -2) и их соответствующие рецепторы и ингибиторы [5, 6].

Пролиферация опухолевых клеток запускается онкогенными сигналами роста, а также достаточной метаболической энергией для биогенеза клеточных компонентов. В раковых клетках нередко наблюдается расстройство, приводящее к увеличению поглощения глюкозы и гликолиза, обеспечивающему быструю избирательную пролиферацию именно опухолевых клеток, так называемому эффекту Варбурга. Чувствительный к энергии путь АМПК кажется доминирующим над стимулирующими рост эффектами пути PI3K-AKT, определяющего клеточные функциональные исходы. Поэтому пролиферация не происходит при отсутствии достаточного количества питательных веществ, энергии и клеточных строительных блоков. Следовательно, манипуляция сигнальным путём АМПК, формирующая энергетический стресс, может представлять собой терапевтическую цель, потенциально переопределяющую онкогенные эффекты пути PI3K-AKT-mTORC1 [7, 8]. Кроме того, под воздействием опухоли эндотелиоциты лимфатических сосудов способствуют развитию кровеносных сосудов в этих органах, обеспечивая экстравазацию и колонизацию раковых клеток [9, 10]. В клетках быстро растущей злокачественной опухоли уровень

гликолиза почти в 200 раз выше, чем в нормальных тканях. При этом гликолиз остаётся предпочтительным даже в условиях, когда кислород в избытке [11, 12].

Традиционно для гликолиза применяются антидиабетические бигуаниды феноформина и буформина, влияющие на продолжительность жизни и развитие спонтанных и индуцированных опухолей у крыс и мышей. Используемый в настоящее время метформин вызывает меньше осложнений по сравнению с другими аналогами [13, 14].

Первичная цель добавления препарата – это комплекс 1 митохондриальной дыхательной цепи. После его внутриклеточного транспорта в печени с помощью органических катионных транспортеров (organic cation transporter 1 – OCT1) метформин вызывает специфическое ингибирование комплекса 1 дыхательной цепи. Это уникальное свойство препарата вызывает уменьшение окисления NADH, что приводит в конечном итоге к снижению продукции АТФ из АДФ и неорганического фосфата, что, в свою очередь, активирует аденозинфосфаткиназу – АМРК (AMP-activated proteinkinase), играющую основную роль в энергетическом балансе клетки. Кроме того, снижение количества глюкозы метформином обусловлено его способностью подавлять глюконеогенез в печени через сигнальный путь от печеночной киназы В1 – LKB-1 (liverkinaseB1) [15, 16].

Метформин подавляет один из сигнальных путей, ответственный за пролиферацию клеток, так называемый mammalian target of rapamycin complex-1 (mTORC-1), что обуславливает значительное торможение пролиферации клеток [17], уменьшение уровня циклина D1, стимуляцию p53/p21 оси, синтеза жирных кислот, ангиогенез и воспаление [18].

Цель работы – выявить анатомо-морфологические закономерности развития карциносаркомы у крыс при естественном её развитии и при применении метформина.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования служили крысы линии Wistar – самки в возрасте 3 месяцев массой 150–200 г в постлактационном периоде. Исследование проводили на 16 крысах. По принципу пар-аналогов были сформированы контрольная и опытная группы животных. В виварии Института цитологии и генетики СО РАН крысы обеих групп были заражены саркомой Walker-256 путём инъекции в бедренную мышцу в дозе 106 кл/гол. Опухолевая культура Walker-256 является постоянно поддерживаемой культурой *in vivo*, в развитии которой исключено влияние онкогенных вирусов. Крысам опытной группы дополнительно применяли метформин в дозе 30 мг/гол. ежедневно вместе с водой.

Гистологические исследования проводили на 10, 14 и 21-й дни с момента заражения, цитологические и гематологические исследования – на 14-й и 21-й дни с момента заражения. Для проведения гистологического исследования отбирали кусочки поражённой бедренной мышцы с внешних её границ. После завершения фиксации в 10%-м растворе формалина осуществляли промывку материала в течение 3 суток в проточной воде с последующим обезвоживанием в этаноле возрастающей крепости, этанольно-ксилольной смеси и ксилоле, заливку в парафиново-восковые блоки и изготовление срезов с последующей ксилольно-этанольно-водной депарафинизацией. Окраску срезов производили гематоксилин-эозином.

Забор материала для цитологического исследования осуществляли инъекционными иглами 28G при помощи шприца. Окраску мазка проводили по Романовскому-Гимзе и исследовали под световым микроскопом с иммерсионно-масляным объективом.

В процессе изучения новообразования визуально контролировали клиническое состояние и поведенческие реакции крыс.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на ПЭВМ в программе Microsoft Office Excel 2007. Описательную

статистику непрерывных величин (гематологические и цитологические показатели) производили вычислением медианы (Me; встроенная функция программы); её статистической ошибки (me; произведение ошибки средней и частного от пи на удвоенное число выборки); интерквартильного размаха (IQR; разность третьего и первого квартилей (встроенные функции программы)) и коэффициента вариации (Cv, %; частное от стандартного отклонения на среднее арифметическое в процентах). Достоверность отличий проверялась по U-критерию Манна-Уитни-Уилкоксона. «Ящики с усами» построены в Excel путём адаптации биржевой диаграммы. Описательную статистику качественных величин (этологические показатели) проводили вычислением доли успехов (p; частное числа успехов на число выборки), её статистической ошибки (σ^* ; корень частного произведения доли успехов и доли неудач на число выборки). Достоверность отличий проверяли точным критерием Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У заражённых крыс контрольной группы и при применении метформина изменялись гематологические показатели крови (табл. 1). На 14-е и 21-е сутки у крыс, подвергавшихся действию метформина, медиана концентрации эритроцитов была выше на 36,90 (P<0,05) и 66,90 % (P<0,05) соответственно, чем у аналогов, не подвергавшихся воздействию. На завершающем этапе исследования этот показатель становится ниже нормы как без действия, так и под действием метформина.

В опытной группе медиана концентрации гемоглобина была выше на 21,68 (P<0,05) и 68,28% (P<0,05) соответственно, чем у аналогов из контроля. Таким образом, под действием метформина увеличивается концентрация гемоглобина крови. В условиях, когда концентрация эритроцитов крови и гемоглобина в крови увеличивается, можно сделать вывод о том, что токсические проявления

опухоли, которые могут возникать из-за масс-эффекта, снижаются.

Количество лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов на 14-е и 21-е сутки у крыс, подвергавшихся действию метформина, увеличивается. Медиана концентрации лейкоцитов была выше на 56,07 (P<0,05) и 218,19 % (P<0,05) соответственно, лимфоцитов – на 121,12 (P<0,05) и 256,89 (P<0,05), моноцитов – на 8,77 и 46,81 % (P<0,05), чем у аналогов из контроля (см. табл. 1).

На 14-е сутки исследований у крыс, подвергавшихся действию метформина, медиана концентрации гранулоцитов была выше на 26,75 (P<0,05), а на 21-е – ниже на 20,45 % (P<0,05), чем у аналогов из контроля. Таким образом, под действием метформина на 14-е сутки увеличивается, а на 21-е – уменьшается количество гранулоцитов крови. Это свидетельствует о неоднородном влиянии препарата на макропопуляцию гранулоцитов (см. табл. 1).

На 14-е и 21-е сутки у крыс, подвергавшихся действию метформина, медиана концентрации тромбоцитов была ниже на 86,05 (P<0,05) и 64,71 % (P<0,05) соответственно, чем у аналогов из контроля. Следовательно, под действием метформина практически не изменяется количество тромбоцитов крови. Однако варибельность этого показателя без действия метформина значительно выше. Это свидетельствует о диссеминации показателя под воздействием опухоли, на которую активно воздействует метформин, предотвращая резкую полихотомию популяции (см. табл. 1).

У крыс опытной и контрольной групп изменялись цитологические показатели крови (табл. 2). На 14-е сутки у опытных крыс медиана количества эозинофилов в мазке биоптата не имела отличий от животных из контроля. На 21-е сутки у опытных крыс медиана количества эозинофилов в мазке биоптата была ниже на 33,33 %, чем у животных из контроля. Таким образом, концентрация эозинофилов в биоптате животных с привитой саркомой в контрольной группе по сравнению с опытными крысами при воздействии метформина увеличивается.

Таблица 1

Изменение гематологических показателей у крыс под воздействием метформина
Changes in haematological parameters in rats exposed to metformin

Группа	14-е сутки			21-е сутки		
	Me±me	IQR	Cv, %	Me±me	IQR	Cv, %
<i>Эритроциты, 10¹²/л (норма 5,6–7,89)</i>						
Контрольная	4,20±0,43	0,20	8,45	2,18±0,46	0,38	15,89
Опытная	5,75±0,27*	0,20	3,72	3,64±0,54*	0,49	11,86
<i>Гемоглобин, 10⁹/л (норма 120–150)</i>						
Контрольная	42,50±4,69	3,00	8,70	41,40±5,90	3,74	11,51
Опытная	179,00±12,06*	11,50	5,35	73,50±9,10*	6,50	9,68
<i>Лейкоциты, 10⁹/л (норма 2,9–15,3)</i>						
Контрольная	53,50±3,69	2,50	5,55	29,20±5,70	2,70	14,59
Опытная	83,50±11,33*	13,00	10,95	93,10±4,20**	3,35	3,60
<i>Лимфоциты, 10⁹/л (норма 2,6–13,5)</i>						
Контрольная	25,10±7,59	9,00	23,86	14,15±37,35	15,48	105,21
Опытная	55,50±11,53*	10,50	17,04	50,50±6,71*	3,50	11,15
<i>Моноциты, 10⁹/л (норма 0–0,5)</i>						
Контрольная	2,85±0,67	0,80	18,46	2,35±0,37	0,25	12,27
Опытная	3,10±0,51	0,25	13,17	3,45±0,47*	0,30	11,00
<i>Гранулоциты, 10⁹/л (норма 0,4–3,3)</i>						
Контрольная	19,25±1,53	1,75	6,45	55,50±11,35	10,50	16,17
Опытная	24,40±5,28*	3,95	16,65	44,15±4,65	4,80	8,29
<i>Тромбоциты, 10⁹/л (норма 100–1600)</i>						
Контрольная	1384,00±1762,77	668,00	43,95	1351,50±2014,27	502,00	47,24
Опытная	193,00±24,81*	7,50	5,16	477,00±109,41*	48,00	9,07

Примечание. Здесь и далее: *P<0,05; **P<0,01

Таблица 2

Изменение цитологических показателей у крыс
Changes in cytological parameters in rats

Группа	14-е сутки			21-е сутки		
	Me±me	IQR	Cv, %	Me±me	IQR	Cv, %
<i>Эозинофилы, шт.</i>						
Контрольная	1,00±0,63	0,25	40,00	1,50±0,72	1,00	38,49
Опытная	1,00±0,63	0,25	66,67	1,00±0,63	0,25	66,67
<i>Ядерный полиморфизм, шт.</i>						
Контрольная	4,50±2,14	1,75	40,18	4,50±1,20	1,25	20,16
Опытная	3,50±1,20	1,25	29,46	3,50±2,14	1,75	45,54
<i>Моноциты, шт.</i>						
Контрольная	2,50±1,62	1,50	51,64	3,00±0,63	0,25	18,18
Опытная	2,50±1,20	1,25	34,82	4,00±1,02	0,50	20,41

У опытных крыс медиана частоты ядерного полиморфизма в мазке биоптата и на 14-е, и на 21-е сутки была ниже на 22,22 %, чем у аналогов из контроля. Таким образом,

под действием метформина понижается ядерный полиморфизм в мазке биоптата.

На 14-е сутки у опытных крыс медиана количества моноцитов в мазке биоптата не имела отличий от животных из контроля. На

21-е сутки у опытных крыс медиана количества моноцитов в мазке биоптата была выше на 33,33 %, чем контрольных. Это явление коррелирует с данными по моноцитам крови.

При применении метформина у крыс с привитыми саркомами изменялась этология (табл. 3). Под действием препарата анемичность, гематурия и вскрытие опухолей наблюдались в 2 раза чаще, чем у животных

из контроля, Атаксия, каннибализм и извращение аппетита регистрировались у опытных животных в 38,00; 38,00 ($P<0,01$) и 63,00 % ($P<0,01$) случаев, в то время как у контрольных животных этих явлений не наблюдали (табл. 3). Таким образом, под действием метформина наблюдаются резко выраженные нервно-психические отклонения у подопытных животных.

Таблица 3

Этология животных во время эксперимента
Ethology of animals during the experiment

Показатель	Контрольная ($p \pm \sigma p^*$)	Опытная ($p \pm \sigma p^*$)
Анемичность	0,50±0,18	1,00±0,00
Атаксия	0,01±0,04	0,18±0,17
Гематурия	0,13±0,12	0,25±0,17
Каннибализм	0,00±0,00	0,38±0,17**
Извращение аппетита	0,00±0,00	0,63±0,17**
Вскрытие опухолей	0,50±0,18	1,00±0,00

ВЫВОДЫ

1. Под действием метформина у крыс с привитой саркомой Walker регистрировали абсолютные лейкоцитоз и эритроцитоз с выраженной гипохромной анемией.

2. В биоптате животных с привитой саркомой Walker при применении метформи-

на увеличивается концентрация моноцитов, уменьшается количество эозинофилов и понижается ядерный полиморфизм.

3. Метформин индуцирует нервно-психические отклонения у крыс, такие как извращение аппетита и каннибализм.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Корман Д.Б.* Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. – М.: Практическая медицина, 2014. – 149 с.
2. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells / M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez [et al.] // Proc. Natl. Acad. – Sci USA. – 2003. – N. 7. – P. 100.*
3. *Кушлинский Н.Е., Немцова М.В.* Молекулярно-биологические характеристики злокачественных новообразований // Человек и его здоровье. – 2014. – № 1–2. – С. 5–15.
4. *Ангиогенез в раке молочной железы: клинико-морфологические и прогностические аспекты / А.А. Должиков, М.И. Чурносков, П.М. Быков [и др.] // Человек и его здоровье. – 2010. – № 2. – С. 149–155.*
5. *Виноградова Т.В., Чернов И.П., Монастырская Г.С.* Раковые стволовые клетки: пластичность против терапии // Acta naturae. – 2015. – № 4. – С. 53–63.
6. *Alfarouk K.O., Verduzco D., Rauch C.* Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question // Oncoscience. – 2014. – N. 12. – P. 777–802.
7. *Мингалева Р.Н., Мифтахова Р.Р., Ризванов А.А.* Стволовые опухолевые клетки: 20 лет позади // Гены и клетки. – 2015. – № 2. – С. 11–14.

8. *Metformin* inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/ AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state / M. Foretz, S. Hebrard, J. Leclerc [et al.] // *Ckin invest.* – 2010. – Vol. 1. – P. 2355–2369.
9. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.С. Молекулярная биология. – М.: Мед. информ. агентство. – 2007. – С. 501–503.
10. Lee E. Pre-treatment of mice with tumor-conditioned media accelerates metastasis to lymph nodes and lungs: a new spontaneous breast cancer metastasis model // *Clin Exp Metastasis.* – 2014. – Vol. 31. – P. 67–79.
11. Ангиогенез: образование, рост и развитие кровеносных сосудов / В.В. Куприянов, В.А. Миронов, А.А. Миронов, О.Ю. Гурина. – М.: НИО «Квартет». – 1993. – С. 152.
12. Liu B., Fan Z., Edgerton S.M. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8. – P. 2031–2040.
13. Воспаление как один из основных факторов развития злокачественных новообразований в организме человека / А.А. Бояхчан, А.В. Адильханов, Л.Г. Ахуба, Д.Л. Шек // *European journal of biomedical and life sciences.* – 2016. – Vol. 4. – P. 40-43.
14. Tumor cells expressing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene in the treatment of Walker 256 meningeal neoplasia in rats / F.D. Vrioni, J.K. Wu, F.D. Vrionis, P. Qi // *Neurosurg.* – 1996. – Vol. 2. – P. 250–257.
15. Целесообразность изучения опухолевого ангиогенеза как прогностического фактора развития рака / И.В. Майбородин, С.Э. Красильников, А.Е. Козьяков [и др.] // *Новости хирургии.* – 2015. – № 3. – P. 339–347.
16. Крючков А.Н., Фрейнд Г.Г. Неоангиогенез и плотность сети микрососудов в раке молочной железы // *Архив патологий.* – 2008. – Т. 70, № 1. – С. 62–65.
17. Ноздрачев А.Д. Анатомия крысы. – СПб.: Лань, 2001. – С. 237–239.
18. Шевченко Ю.Л., Кутаев В.М. «Ледяная анатомия» Н.И. Пирогова – прообраз современных лучевых изображений // *Хирургия: Журнал им. Н.И. Пирогова.* – 2010. – № 9. – С. 4–8.

REFERENCES

1. Korman D.B., Misheni i mekhanizmy deystviya protivopukholevykh preparatov (Targets and mechanisms of action of antitumor drugs), Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2014, 149 p.
2. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells / M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez [et al.], *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2003, – No. 7, pp. 100.
3. Kushlinskiy N.E., Nemtsova M.V., Chelovek i ego zdorov'e, 2014, No. 1-2, pp. 5–15 (In Russ.).
4. Dolzhikov A.A., Churnosov M.I., Bykov P.M. [i dr.], *Chelovek i ego zdorov'e*, 2010, No. 2, pp. 149–155 (In Russ.).
5. Vinogradova T.V., Chernov I.P., Monastyrskaya G.S., *Acta naturae*, 2015, No. 4, pp. 53–63.
6. Alfarouk K.O., Verduzco D., Rauch C., Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question, *Oncoscience*, 2014, No. 12, pp. 777-802.
7. Mingaleeva R.N., Miftakhova R.R., Rizvanov A.A., *Geny i kletki*, 2015, No. 2, pp. 11–14 (In Russ.).
8. Foretz M., Hebrard S., Leclerc J. [et al.], Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/ AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state, *Ckin invest*, 2010, Vol. 1, pp. 2355–2369.
9. Mushkambarov N.N., Kuznetsov S.S., *Molekulyarnaya biologiya* (Molecular Biology), Moscow: Med. inform. Agenvstvo, 2007, pp. 501–503.

10. Lee E., Pre-treatment of mice with tumor-conditioned media accelerates metastasis to lymph nodes and lungs: a new spontaneous breast cancer metastasis model, *Clin Exp Metastasis*, 2014, Vol. 31, pp. 67–79.
11. Kupriyanov V.V., Mironov V.A., Mironov A.A., Gurina O.Yu., *Angiogenez: obrazovanie, rost i razvitie krovenosnykh sosudov* (Angiogenesis: formation, growth and development of blood vessels), Moscow: NIO «Kvartet», 1993, pp. 152.
12. Liu B., Fan Z., Edgerton S.M., Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells, *Cell Cycle*, 2009, Vol. 8, pp. 2031–2040
13. Boyakhchan A.A., Adil’khanov A.V., Akhuba L.G., Shek D.L., Vospalenie kak odin iz osnovnykh faktorov razvitiya zlokachestvennykh novoobrazovaniy v organizme cheloveka, *European journal of biomedical and life sciences*, 2016, Vol. 4, pp. 40–43.
14. Vrioni F.D., Wu J.K., Vrionis F.D., Qi P., Tumor cells expressing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene in the treatment of Walker 256 meningeal neoplasia in rats, *Neurosurg*, 1996, Vol. 2, pp. 250–257.
15. Mayborodin I.V., Krasil’nikov S.E., Kozyakov A.E. [i dr.], *Novosti khirurgii*, 2015, No. 3, pp. 339–347 (In Russ.).
16. Kryuchkov A.N., Freynd G.G., *Arkhiv patologiy*, 2008, T. 70, No. 1, pp. 62–65 (In Russ.).
17. Nozdrachev A.D. *Anatomiya krysy* (Anatomy of a rat), Sankt-Peterburg: Lan’, 2001, pp. 237–239.
18. Shevchenko Yu.L., Kitaev V.M., *Khirurgiya: Zhurnal im. N.I. Pirogova*, 2010, No. 9, pp. 4–8 (In Russ.).