IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۲ (۱)، ۵۰-۴۳ بهار ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثر متفورمین بر آپوپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های اندوتلیال انسانی جدا شده از سیاهرگ بند ناف

آزاده امین زاده

گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان
مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان

دریافت: ۱۶ شهریور ۹۵ پذیرش: ۳ آذر ۹۵

چکیده

مقدمه: متفورمین یک داروی ضد دیابت است که ممکن است یک گزینه درمانی جدید برای مداوای آترواسکلروز باشد. مطالعه حاضر اثر محافظتی متفورمین را بر استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلول های اندوتلیال انسانی جدا شده از سیاهرگ بند ناف (Human umbilical vein endothelial cells یا HUVECs) بررسی می نماید.

روش‌ها: سلول های اندوتلیال به مدت ۲۴ ساعت با متفورمین تیمار شده و سپس به مدت ۲ ساعت در معرض پراکسید هیدروژن با غلظت ۰/۵ میلی مولار قرار گرفتند. زنده مانی سلول ها با استفاده از ۳- (۴و۵ دی متیل تیازول ۲ - ایل)- ۲و۵ - دی فنیل تترازولیوم بروماید (روش MTT) اندازه گیری شد. سطح گونه های فعال اکسیژن (ROS) با ۲و۷ دی کلرو دی هیدروفلورسین دی استات (DCF -DA) بررسی شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی، گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAP) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: متفورمین در غلظت ۲۰ میکرومولار توانست آسیب سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن را جلوگیری نماید. سطوح ROS و پراکسیداسیون لیپیدی در سلول های تحت درمان با پراکسید هیدروژن افزایش یافت. متفورمین توانست به طور قابل ملاحظه ای سطح ROS و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهد. این دارو همچنین توانست گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری: متفورمین سلول های HUVECs را از استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن محافظت می کند.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، پراکسید هیدروژن، سلول های اندوتلیال انسانی، متفورمین

مقدمه

سلول های اندوتلیال نقش اساسی در حفظ هموستاز عروقی دارند و در بسیاری از فرایندهای عروقی از جمله انقباض عروق، رگ زایی، پاسخ های التهابی و اتساع عروقی درگیر می شوند. مطالعات نشان داده است که اختلال عملکرد اندوتلیال در پاتوژنز بیماری های مختلف قلبی عروقی نقش دارد. بسیاری از ریسک فاکتورها می توانند سبب اختلال در سلول های اندوتلیال شوند و در نتیجه آپوپتوز ایجاد نمایند. آپوپتوز سلول های اندوتلیال به عنوان یک ویژگی مشترک اختلال عملکرد اندوتلیال در نظر گرفته شده است [۱]. افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و استرس اکسیداتیو یک فاکتور پاتوژن بسیار مهم در اختلال عملکرد سلول های اندوتلیال و پیشرفت بیماری های قلبی عروقی مانند فشار خون بالا، آترواسکلروز و اختلال عروقی در دیابت می باشد. استرس اکسیداتیو در نتیجه ی عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: azadehaminzadeh@yahoo.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

گونه های فعال اکسیژن از یک سو و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می شود. در شرایط نرمال؛ استرس اکسیداتیو از طریق زنجیره انتقال الکترون تولید می شود و به طور طبیعی بوسیله آنتی اکسیدان های سلولی مثل سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون برداشته می شود. تولید زیاد استرس اکسیداتیو به ترکیبات مختلف سلول از جمله پروتئین ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب وارد می کند [۲].

افزایش استرس اکسیداتیو و شکل‌گیری گونه های فعال اکسیژن مانند سوپراکساید به عنوان تعدیل کننده کلیدی در پیشرفت پروسه های پرو آترواسکلروز و آنتی آترواسکلروز در دیواره سلول های اندوتلیال عمل می کنند. تعدادی از مطالعات جدید مزایای قابل توجهی از آنتی اکسیدان ها را برای رویکرد کنترل و درمان آترواسکلروز گزارش کرده اند [۳].

پراکسید هیدروژن، به عنوان یک مولد ROS، نقش بسیار مهمی در اختلالات عروقی ایفا می کند. بسیاری از مطالعات نشان داده است که پراکسید هیدروژن می تواند باعث صدمه و القاء آپوپتوز در سلول های اندوتلیال شود [۴]. متفورمین داروی انتخابی خوراکی دیابت نوع دو است و با اثر بر کبد و سلول های پانکراس موجب افزایش حساسیت به انسولین و کاهش سطح اسید چرب و تری گلیسرید می شود. متفورمین گلیکولیز را در بافت های محیطی تحریک می کند. این دارو تولید گلوکز کبدی را از طریق مهار گلوکونئوژنز کاهش داده و میزان جذب گلوکز را با تحریک انسولین در عضله و بافت چربی افزایش می‌دهد. این دارو همچنین از طریق کند کردن جذب گلوکز از دستگاه گوارش به همراه افزایش تبدیل گلوکز به لاکتات سبب وقوع مکانیسمی شده که نتیجه آن جلوگیری از افزایش قند خون است [۵].

با وجود اینکه اثرات ضد دیابتی متفورمین به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است اما مطالعات محدودی، توانایی ضد آترواسکلروزی و اثرات محافظتی متفورمین را بر اختلال اندوتلیال نشان داده اند. در این مطالعه، اثرات محافظتی متفورمین بر استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط پراکسید هیدروژن در سلول های اندوتلیال انسانی جدا شده از سیاهرگ بند ناف (HUVECs) که بیشترین شباهت را به سلولهای اندوتلیال عروق دارند و دارای قدرت تکثیر به نسبت خوبی هستند و به خوبی به محرک های خارج سلولی پاسخ می دهند، مورد بررسی و ارزیابی قرار می گیرد.

مواد و روش‌ها

سلول های HUVECs از انستیتو پاستور تهیه شده و در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتی گراد با CO_2 ۵ درصد و O_2 ۹۵ درصد کشت داده شدند. محیط کشت سلولها هر ۴۸ ساعت تعویض می شد. گروه های مورد مطالعه عبارت بودند از: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه پراکسید هیدروژن، ۳- گروه پراکسید هیدروژن به علاوه متفورمین با غلظت µM ۵، ۴- گروه پراکسید هیدروژن به علاوه متفورمین با غلظت µM ۱۰، ۵- گروه پراکسید هیدروژن به علاوه متفورمین با غلظت µM ۲۰. میزان حیات سلولی توسط تست MTT بررسی شد. در این روش در حدود ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای قرار گرفت. بعد از گذراندن زمان ۲۴ ساعت، سلول ها با غلظت های مختلف متفورمین به مدت ۲۴ ساعت پرانکوبه شده و به مدت ۲ ساعت در معرض پراکسید هیدروژن با غلظت ۰/۵ میلی مولار قرار گرفتند. سپس ۱۰ میکرو لیتر از محلول MTT (۵ mg/ml) به چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۴-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفتند. سپس محیط داخل چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر کدام اضافه شد و در نهایت جذب نوری آن بوسیله الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

میزان داخل سلولی ROS با استفاده از DCF-DA اندازه گیری شد. در این روش، سلول ها به پلیت ۲۴ خانه ای منتقل شدند. این سلول ها پس از چسبیدن به کف چاهک و رسیدن به ۷۰٪ confluence؛ با متفورمین پرانکوبه شدند و سپس در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفتند. سپس محیط داخل چاهک‌ها خالی گردید و سلول ها با PBS شسته شدند و به مدت ۳۰ دقیقه با DCF-DA انکوبه شدند و سپس با PBS شسته شدند. اندازه گیری میزان فلورسنس با استفاده از excitation ۴۸۵/۲۰ و emission ۵۲۸/۲۰ توسط الیزا ریدر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گردید.

برای تعیین فرآورده‌ی نهایی پراکسیداسیون لیپیدها، میزان مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

اندازه‌گیری می شود. سلولها در فلاسک cm^2 ۲۵ کشت داده شدند و بعد از گذراندن زمان ۲۴ ساعت با متفورمین پرانکوبه شده و سپس در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفتند. سپس مایع رویی آن ها برداشته شد و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰ ×g و به مدت ۶ دقیقه تا انجام آزمایش های اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی، گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در دمای ۸۰- نگهداری شد. مولکول های مالون دی آلدئید (MDA) در شرایط اسیدی و دمای بالا با تیوباربیتوریک اسید (TBA) واکنش داده و کمپلکس (TBA-MDA-TBA) تشکیل می گردد. کمپلکس تشکیل شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارای حداکثر جذب است.

سنجش میزان گروه های تیول موجود در پروتئین ها می تواند در بررسی میزان استرس اکسیداتیو ایجاد شده مفید باشد. هر چه میزان رادیکال های آزاد بیشتر باشد به همان مقدار از میزان گروه های تیول کاسته می شود. جهت اندازه گیری گروه های تیول از روش HU و معرف ۲و۲ دی تیونیتروبنزوئیک اسید (DTNB) استفاده شد. در این روش گروه های تیول با احیای معرف DTNB، کمپلکس زرد رنگ ایجاد می نمایند که در طول موج ۴۱۲ نانومتر قابل اندازه گیری است.

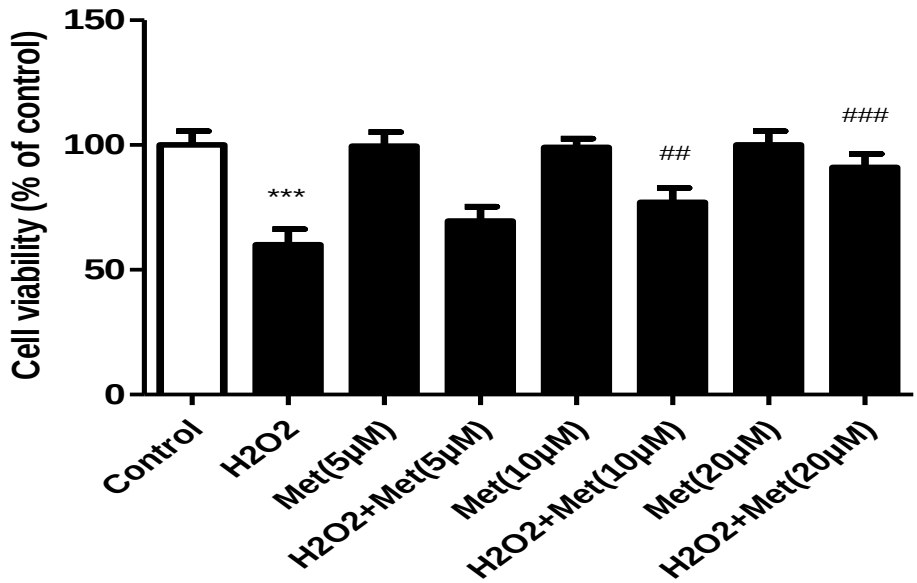
ظرفیت آنتی اکسیدانی تام با روش FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) مورد ارزیابی قرار گرفت. این روش بر اساس توانایی احیاکنندگی یون‌های Fe^{3+} (فریک) به Fe^{2+} (فرو) در حضور ماده‌ای به نام تری پیریدیل تری آزین (TPTZ) که به عنوان معرف مورد استفاده قرار می گیرد استوار است. با احیای یون های فریک و تبدیل آن به یون های فرو در PH اسیدی کمپلکس آبی رنگ -Fe^{2+} TPTZ ایجاد می شود که در طول موج ۵۹۳ نانومتر دارای حداکثر جذب است. در این پژوهش، ملاحظات اخلاقی مطابق اصول کار با انسان مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمان رعایت شد.

داده های جمع آوری شده به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده اند و با آزمون آماری one way ANOVA و با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $p <$ ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

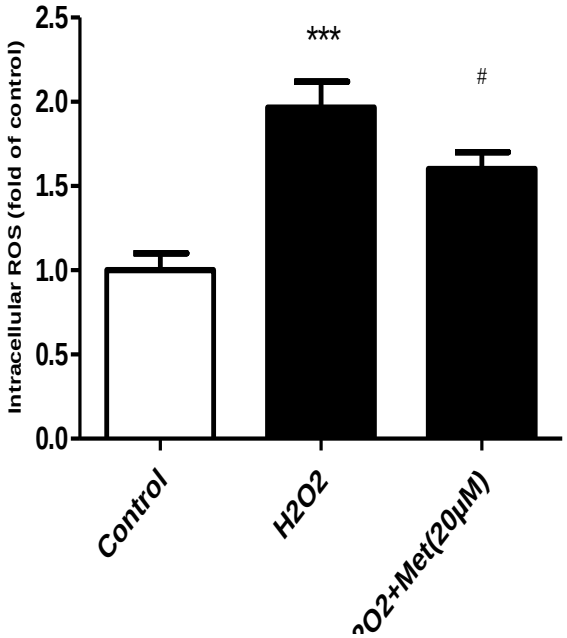
نمودار ۱ نشان دهنده اثر متفورمین بر مرگ سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول های HUVECs می باشد.

متفورمین در غلظت های مورد استفاده در این مطالعه، حیات سلولی را تحت تاثیر قرار نداده است. پراکسید هیدروژن، به طور معنی داری باعث القای مرگ سلولی شده است. پرانکوباسیون با متفورمین به صورت وابسته به غلظت، توانست



نمودار ۱- اثرات غلظت های مختلف متفورمین (۲۰-۵ میکرو مولار) بر کاهش حیات سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلولهای HUVECs. حیات سلولی بوسیله روش MTT اندازه گیری شد. نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند. ***: ۰/۰۰۱ > p در مقایسه با گروه کنترل. ## ۰/۰۱ > p و ###: ۰/۰۰۱ > p در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]



نمودار ۲- اثرات متفورمین بر تولید ROS ناشی از پراکسید هیدروژن. میزان ROS بوسیله DCF-DA اندازه گیری شد. نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند. ***: $p <$ ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل. #: $p <$ ۰/۰۵ در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن.

از آسیب سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن جلوگیری نماید. غلظت ۲۰ میکرو مولار متفورمین برای این مطالعه انتخاب شد.

همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود، پراکسید هیدروژن سبب افزایش ROS شده است و متفورمین به طور معنی داری افزایش ROS را مهار می کند ($p <$۰/۰۵).

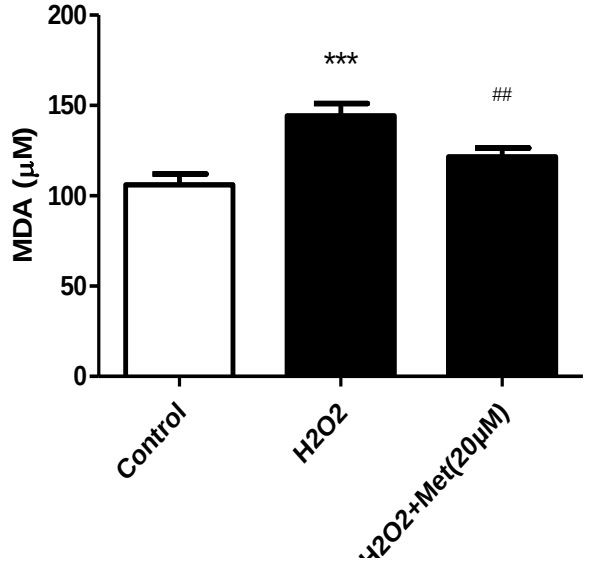
در نمودار ۳، پراکسید هیدروژن در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در سلول های HUVECs شده است. در حالیکه پرانکوباسیون با متفورمین در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن توانسته به میزان چشمگیری از این افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری کند ($p <$۰/۰۱).

میزان گروه های تیول به عنوان شاخص دیگری از استرس اکسیداتیو، در گروه پراکسید هیدروژن به طور معناداری کاهش یافته بود. پرانکوباسیون با متفورمین در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن توانست به میزان معناداری ($p <$۰/۰۵) از این کاهش میزان گروه های تیول جلوگیری کند و میزان گروه های تیول را افزایش دهد (نمودار ۴).

نتایج حاصل از اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام نشان داد که در گروه پراکسید هیدروژن در مقایسه با گروه کنترل، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام به میزان معنی داری کاهش یافت. همانطور که در نمودار ۵ نشان داده شده است متفورمین در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن توانست به میزان معنی داری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را افزایش دهد (۰/۰۰۱ > p).

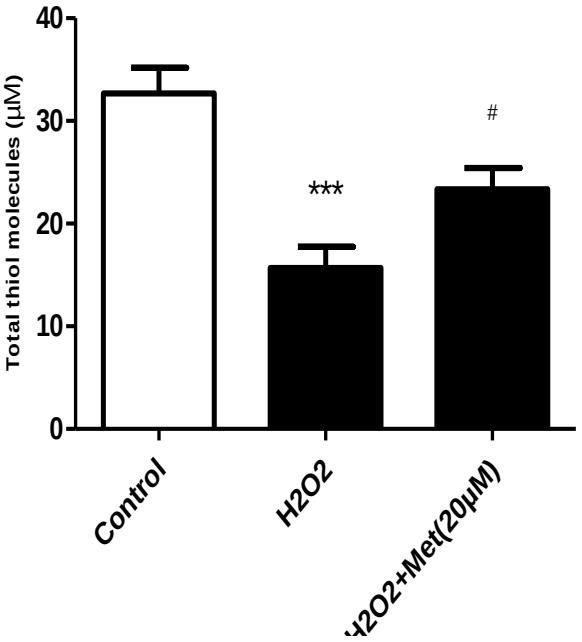
بحث

در مطالعه حاضر استفاده از داروی متفورمین توانست از استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن جلوگیری نماید. متفورمین یکی از گسترده ترین داروهای مورد استفاده در دیابت است که حساسیت به انسولین را در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ افزایش می دهد. این دارو در طی استفاده بالینی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، به صورت خوراکی در دوزهای ۸۵۰–۵۰۰ میلی گرم سه بار در روز استفاده می شود و غلظت های خونی بین ۵۰–۱ میکرومولار گزارش شده است [۶]. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که در این مدل سلولی؛ متفورمین در غلظت ۲۰ میکرومولار که در شرایط بالینی نیز برای درمان دیابت مورد تایید قرار گرفته است، توانسته از مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری نماید. متفورمین همچنین خطر آتروترومبوز را در دیابت کاهش می دهد. در مطالعه‌ای که روی ۳۵۳ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام شد. نشان داد که درمان با متفورمین سبب بهبود عملکرد اندوتلیوم می شود که مستقل از اثرات آن در کاهش قند خون می باشد



نمودار ۳- اثرات متفورمین بر افزایش MDA ناشی از پراکسید هیدروژن. میزان پراکسیداسیون لیپیدی بوسیله روش TBARS اندازه گیری شد. نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند. ***: $p <$ ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل. ##: $p <$ ۰/۰۱در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

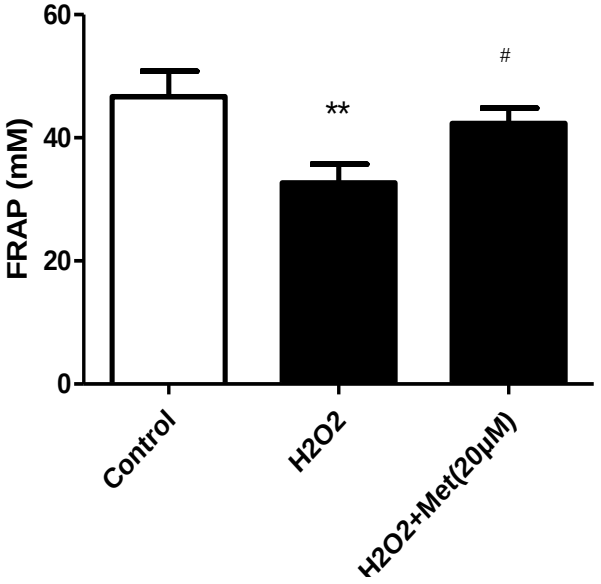


نمودار ٤- اثرات متفورمین بر کاهش گروه های تیول ناشی از پراکسید هیدروژن. نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند. ***: ۰/۰۰۱ > p در مقایسه با گروه کنترل. #: ۰/۰۵ > p در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن.

[۷]. در مطالعه دیگری که در ۴۴ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و مقاوم به انسولین انجام شد مشاهده شد که درمان با متفورمین سبب بهبود عملکرد اندوتلیوم و کاهش مقاومت به انسولین می شود [۸].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در سلول های HUVECs، پراکسید هیدروژن سبب افزایش میزان ROS شده است و متفورمین به طور قابل توجهی توانسته از افزایش میزان ROS و مرگ سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن جلوگیری نماید. این موافق با مطالعات قبلی است که نشان می دهند متفورمین می‌تواند سبب جمع‌آوری و پاکسازی مستقیم یون های هیدروکسیل شود [۹]. مهمترین منبع تولید ROS، NADPH اکسیداز (NOX)ها می باشند. در سیستم عروقی NOX1, NOX2 ,NOX4 و NOX5 بیان شده اند. در سال های اخیر NOX4، به دلیل اینکه در سلول های عضله صاف عروقی بیشتر از سایر NOX ها بیان شده است و با آنژیوتانسین II القا می شود بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده است که در موش سوری، متفورمین با کاهش بیان NOX4 و فاکتور نکروز دهنده توموری-آلفا (TNF-α) از آسیب کلیه ناشی از رژیم غذایی با چربی زیاد جلوگیری می کند [۱۰]. علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که اثر متفورمین بر عملکرد اندوتلیال ممکن است ناشی از کاهش استرس اکسیداتیو، التهاب عروقی و همچنین تثبیت پلاک های آترواسکلروتیک، مهار تکثیر سلول های عضله صاف و کاهش مقاومت به انسولین باشد [۱۱]. تحقیقات نشان داده است که در سلول های اندوتلیال آئورت، متفورمین فعال سازی NOX را مهار می کند و از تشکیل استرس اکسیداتیو ناشی از غلظت بالای گلوکز جلوگیری می کند [۱۲]. مطالعه دیگری نشان داد که متفورمین از طریق فعال سازی آنزیم نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS)، تولید نیتریک اکسید (NO) را افزایش می دهد و از این طریق عملکرد اندوتلیال را بهبود می بخشد [۱۳].

لیپیدها از حساس ترین ترکیبات در مقابل استرس اکسیداتیو هستند. در اثر اکسیداسیون لیپیدها ترکیبات مختلفی ایجاد می شوند. مالون دی آلدئید متداول ترین شاخص استرس اکسیداتیو لیپیدها می باشد [۱۴]. نتایج ما نشان داد که پراکسید هیدروژن، میزان مالون دی آلدئید را افزایش داده است و متفورمین به طور قابل توجهی توانست از افزایش میزان مالون دی آلدئید جلوگیری کند. در توافق با یافته ما در مطالعه ای نشان داده شده است که در سلول های مزانژیال گلومرولی، متفورمین استرس اکسیداتیو ناشی از غلظت بالای گلوکز را تخفیف می دهد و میزان مالون دی آلدئید را کاهش می دهد [۱۵].



نمودار ٥- اثرات متفورمین بر کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام ناشی از پراکسید هیدروژن. نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند. **: ۰/۰۱ > p در مقایسه با گروه کنترل. #: ۰/۰۵ > p در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

گروه های تیول در ساختمان پروتئین ها و تعدادی از ترکیبات غیر پروتئینی وجود دارند. در شرایط استرس اکسیداتیو؛ این گروه ها با خنثی کردن مواد اکسیدان، دچار اکسیداسیون شده و میزان گروه های تیول احیا کاهش می یابد [۲]. نتایج این مطالعه نشان داد که پراکسید هیدروژن میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی و گروه های تیول را کاهش داده است.

متفورمین به طور قابل توجهی توانست ظرفیت آنتی اکسیدانی و گروه های تیول را افزایش دهد. این موافق با مطالعات قبلی است که نشان می دهند در موش صحرایی، متفورمین اریتروسیت ها را از استرس اکسیداتیو ناشی از پیری محافظت می کند و گروه های تیول و میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی را افزایش می دهد [۱۶].

متفورمین همچنین مکانیسم های محافظتی دیگری نیز دارد این دارو از طریق مهار TNF-α سبب کاهش تولید mRNA مربوط به پروتئین‌های چسبنده دیواره اندوتلیال مانند VCAM (vascular cell adhesion molecule) و ICAM-1 (intercellular adhesion molecules-1) می‌گردد. این پروتئین‌ها، اتصال لکوسیت ها را به سلول های اندوتلیال میانجی گری می کنند و در پیشرفت آترواسکلروز نقش دارند [۱۷].

فرایند endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) یکی از فرایندهای مهم در ایجاد فیبروز بافتی پاتولوژیک می باشد که در آن سلول های اندوتلیال، مارکرهای اختصاصی خود از جمله cadherin اندوتلیال عروقی (VE cadherin) را از دست داده و فنوتیپ سلول‌های مزانشیمی را بدست می‌آورند و موادی مانند vimentin و کلاژن نوع I را بیان می کنند. این سلول‌های مزانشیمی با منشأ اندوتلیال، به فضای میان بافتی مهاجرت می کنند و در تشکیل فیبروز بافتی نقش دارند. فاکتور رشد تغییر دهنده بتا (TGF-β) در القاء EndoMT نقش مؤثری دارد [۱۸]. مطالعات نشان داده است که متفورمین می تواند از فیبروز قلبی جلوگیری نماید. مکانیسم ضد فیبروزی دارو ممکن است ناشی از مهار سنتز کلاژن باشد همچنین این دارو مسیر سیگنالینگ TGF-β را مهار می کند که این اثرات مستقل از اثرات آنتی اکسیدانی این دارو می باشد [۱۹].

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که در شرایط استرس اکسیداتیو، متفورمین میزان ROS و لیپید پراکسیداسیون را کاهش داده است و از کاهش گروه های تیول ناشی از پراکسید هیدروژن جلوگیری نموده است. به علاوه این دارو توانسته ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را افزایش دهد. در پایان می توان نتیجه گیری کرد که متفورمین اثرات محافظتی بر استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول های HUVECs دارد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

[1] Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R, Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. ***Biomed Res Int*** (2014) 801896.

[2] Colak E, New markers of oxidative damage to macromolecules. ***JMB*** 27 (2008) 1-16.

[3] Jain AK, Mehra NK, Swarnakar NK, Role of antioxidants for the treatment of cardiovascular diseases: Challenges and opportunities. ***Curr Pharm Des*** 21 (2015) 4441-4455.

[4] Cai H, Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. ***Cardiovasc Res*** 68 (2005) 26-36.

[5] Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, Leverve X, Metformin prevents high-glucose–induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. ***Diabetes*** 54 (2005) 2179-2187.

[6] Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF, Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. ***Br J Clin Pharmacol*** 12 (1981) 235–246.

[7] De Jager J, Kooy A, Lehert P Bets D, Wulffele MG, Teerlink T, Scheffer PG, Schalkwijk CG, Donker AJ, Stehouwer CD, Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. ***J Intern Med*** 257 (2005) 100-109.

[8] Mather KJ, Verma S, Anderson TJ, Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. ***J Am Coll Cardiol*** 37 (2001) 1344-1350.

[9] Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardes-Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J, Vasson MP,

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. ***Metabolism*** 52 (2003) 586-589.

[10] Zhang SQ, Sun YT, Xu TH, Zhang XF, Liu YZ, Ma MJ, Wang LN, Yao L, Protective effect of metformin on renal injury of C57BL/6J mouse treated with high fat diet. ***Pharmazie*** 69 (2014) 904-908.

[11] Chen H, Li J, Yang O, Kong J, Lin G, Effect of metformin on insulin resistant endothelial cell function. ***Oncol Lett*** 9 (2015) 1149-1153.

[12] Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, Sasaki S, Inoue, T, Fujimura Y, Miura D, Takayanagi R, Metformin and liraglutide ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKC-NADPH oxidase pathway in human aortic endothelial cells. ***Atherosclerosis*** 232 (2014) 156–164.

[13] Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH, Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. ***Diabetes*** 55 (2006) 496–505.

[14] Porter NA, Chemistry of lipid peroxidation. ***Methods Enzymol*** 105 (1984) 273-282.

[15] Yao XM, Ye SD, Xiao CC, Gu JF, Yang D, Wang S, Metformin alleviates high glucose-mediated oxidative stress in rat glomerular mesangial cells by modulation of p38 mitogen-activated protein kinase expression in vitro. ***Mol Med Rep*** 12 (2015) 520-526.

[16] Garg G, Singh S, Singh AK, Rizvi SI, Metformin alleviates altered erythrocyte redox status during aging in rats. ***Rejuvenation Res*** (2016) [Epub ahead of print].

[17] Hansson GK, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. ***N Engl J Med*** 352 (2005) 1685-1695.

[18] Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA, Role of Endothelial-Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Fibrotic Disorders. ***Am J Pathol*** 179 (2011) 1074-1080.

[19] Xiao H, Ma X, Feng W, Fu Y, Lu Z, Xu M, Shen Q, Zhu Y, Zhang Y, Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway. ***Cardiovasc Res*** 87 (2010) 504-513.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

Research paper

Effect of metformin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human vascular endothelial cells

Azadeh Aminzadeh

Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: 6 September 2016 Accepted: 23 November 2016

Abstract

Introduction: Metformin is an anti-diabetic drug, which may be a novel therapeutic option for treatment of atherosclerosis. The current study evaluates protective capacity of metformin in hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Methods: Endothelial cells were treated with metformin for 24 h. Then they were treated with 0.5 mM H_2O_2 for 2h. Cell viability was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Reactive oxygen species (ROS) levels were measured using 2, 7 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. Lipid peroxidation (LPO), total thiol groups and total antioxidant power (TAP) were also evaluated.

Results: Metformin at concentration of 20 μM increased survival of HUVECs exposed to H_2O_2. ROS and MDA levels increased in H_2O_2-treated endothelial cells. Metformin could significantly decrease H_2O_2-induced ROS and MDA elevation. It also increased total thiol groups and TAP.

Conclusion: Metformin protects HUVECs against the oxidative stress and apoptosis induced by H_2O_2.

Keywords: Apoptosis, HUVECs, Hydrogen peroxide Metformin

Please cite this article as follows:
Aminzadeh A, Effect of metformin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human vascular endothelial cells. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 1 (2018) 43-50.

*Corresponding author e-mail: azadehaminzadeh@yahoo.com
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]