

Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Aminoguanidine on HepG-2 Hepatocellular Carcinoma Cell Line

Amir Najafi¹,
Behzad Behnam²,
Somayyeh Karami-Mohajeri³

¹ MSc in Toxicology, Pharmaceutics Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

² Assistant Professor, Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

³ Assistant Professor, Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received September 1, 2018 ; Accepted January 15, 2019)

Abstract

Background and purpose: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most fatal cancers, so, proposing new anticancer agents is highly valuable. Production of reactive oxygen species (ROS) is increased in majority of cancers. Increase in ROS leads to cell damage and death. Aminoguanidine (AG) (pimagedine) is one of the compounds that can produce ROS at high concentrations. The present study was conducted to evaluate the effect of aminoguanidine on HepG-2 cell survival and ROS production.

Materials and methods: HepG-2 cell were cultured in complete culture medium. To evaluate the viability, MTT assay was done through spectrophotometry. ROS production was measured by fluorimetry using DCFDA dye, and photographs were taken using fluorescent microscope.

Results: MTT assay showed 50% decrease in metabolic activity in the cells treated with aminoguanidine 40 mM (54.8±5.2) after 24 hours. Additionally, the results of ROS measurements showed that ROS formation increased by the elevation of aminoguanidine at concentrations above 40 mM.

Conclusion: Aminoguanidine could increase ROS production and decrease the cell viability at 40 mM and higher concentrations, therefore, it can induce other cellular pathways including oxidative and nitrosative stress, apoptosis, and necrosis in HepG-2 cells. Interestingly, AG showed antioxidant potentials in concentrations lower than 40 mM and further investigations are needed to clarify this pattern.

Keywords: pimagedine, aminoguanidine, apoptosis, hepatocellular carcinoma, HepG-2

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (172): 127-134 (Persian).

* **Corresponding Author:** Somayyeh Karami-Mohajeri , Behzad Behnam - Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran (E-mail: s_mohajeri@kmu.ac.ir , behnamb@kmu.ac.ir)

تأثیر آنتی اکسیدانی و پرواکسیدانی آمینوگوانیدین بر رده سلولی سرطان کبد انسان (HepG-2)

امیر نجفی^۱

بهزاد بهنام^۲

سمیه کرمی مهاجری^۳

چکیده

سابقه و هدف: HCC (هپاتوسلولار کارسینوما) یکی از کشنده ترین سرطان‌ها است و به همین دلیل یافتن مکانیسم‌های جدید ضد سرطان برای آن بسیار مهم می‌باشد. با افزایش ROS (گونه‌های واکنش گر اکسیژن) سلول به سمت آسیب و مرگ سلولی می‌رود. آمینوگوانیدین (پیماگدین) ترکیبی است که می‌تواند در غلظت‌های بالا باعث تولید ROS شود. مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر آمینوگوانیدین بر میزان تولید ROS و زنده ماندن سلول‌های کبدی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، میزان زنده ماندن سلول‌های HepG-2 با روش MTT بررسی شد. میزان ROS با روش فلوریمتری و با استفاده از رنگ DCFDA اندازه گیری و با میکروسکوپ فلورسانس عکس برداری شد.

یافته‌ها: آزمون MTT تقریباً ۵۰ درصد کاهش، در فعالیت متابولیکی سلول‌ها را در غلظت ۴۰ میلی‌مولار (۵/۲) ± ۴۰/۸ (۵۴/۸) آمینوگوانیدین بعد از ۲۴ ساعت نشان داد. نتایج آزمون ROS نشان داد که آمینوگوانیدین در دوزهای بالاتر از ۴۰ میلی‌مولار با الگوی وابسته به غلظت، قادر به افزایش میزان تولید ROS در مقایسه با کنترل می‌باشد.

استنتاج: با توجه به این که آمینوگوانیدین موجب افزایش میزان تولید ROS و کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت ۴۰ میلی‌مولار و بالاتر شد، لذا می‌تواند باعث القای مسیرهای دیگر سلولی شامل اکسیداتیو و نیتروزیو استرس، آپوپتوز و نکروز در سلول شود. از طرفی مشاهده شد که آمینوگوانیدین در غلظت‌های پایین‌تر از ۴۰ میلی‌مولار می‌تواند به صورت آنتی اکسیدان نیز عمل کند که بررسی این رفتار جالب دو گانه نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد.

واژه های کلیدی: پیماگدین، آمینوگوانیدین، آپوپتوز، هپاتوسلولار کارسینوما، HepG-2

مقدمه

HCC، هپاتکتومی است (۳). با این حال، میزان عود تومور بعد از برداشتن آن تقریباً ۷۰ درصد می‌باشد (۳). از آنجایی که هنوز مکانیسم‌های مولکولی اساسی که منجر به HCC می‌شوند، کاملاً مشخص نشده است، بنابراین شناسایی مسیرهای مولکولی مرتبط با HCC که

HCC (هپاتوسلولار کارسینوما) پنجمین نوع شایع سرطان و سومین عامل مرگ و میر ناشی از آن در جهان می‌باشد (۱). بیماری‌های مزمن کبدی و سیروز کبدی از جمله فاکتورهای خطر برای توسعه این سرطان محسوب می‌شوند (۲). در حال حاضر موثرترین درمان برای

Email: s_mohajeri@kmu.ac.ir ,
behnam@kmu.ac.ir

مؤلف مسئول: سمیه کرمی مهاجری و بهزاد بهنام - کرمان: ابتدای جاده هفت باغ علوی، پردیس دانشگاه علوم پزشکی

۱. کارشناسی ارشد سم شناسی، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، انجمن نوروفارماکولوژی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، انجمن نوروفارماکولوژی، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۶/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

پرواکسیدانی نیز می‌باشد و قادر به تولید هیدروژن پراکسید و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتالاز می‌شود (۱۶-۱۸). با وجود مطالعات بالا به نظر می‌رسد هنوز اطلاعات کافی در خصوص نحوه دقیق عملکرد AG در شرایط مختلف وجود ندارد، لذا در مطالعه حاضر، رده سلولی HepG-2 (سرطان هپاتوسلولار انسانی) به عنوان مدل کارسینوم هپاتوسلولار انتخاب شد و تاثیر آمینوگوانیدین بر میزان تولید ROS در سلول‌ها و میزان زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های مختلف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار سلول

HepG-2 (رده سلولی سرطان کبد انسان) از انستیتو باستور ایران، تهران تهیه شد. تمام مراحل کار مورد تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان قرار گرفت (کد اخلاق: IR.KMU.REC.1394.588). سلول‌ها در محیط کشت DMEM با مقدار پائین گلوکز (Atocel Hungary)، حاوی ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Atocel Hungary) و ۱۰% FBS (Atocel Hungary)، تحت شرایط دمایی 37°C و ۵% CO_2 کشت داده شد. غلظت‌های مختلف AG در محیط کشت بدون FBS و بدون آنتی‌بیوتیک تهیه شد. سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه به تعداد 1×10^4 سلول در هر چاهک کشت داده شدند و با غلظت‌های (۰/۱، ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰) mM) تحت تیمار به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. برای هر غلظت ۳ بار تکرار و از محیط کشت بدون FBS و بدون آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل منفی و از داروی دوکسورویسین با غلظت‌های (۴، ۸ و ۱۶) $\mu\text{g}/\text{cc}$ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

اندازه‌گیری درصد سلول‌های زنده با استفاده از تست رنگ سنجی

برای انجام این تست، پس از سپری شدن مدت

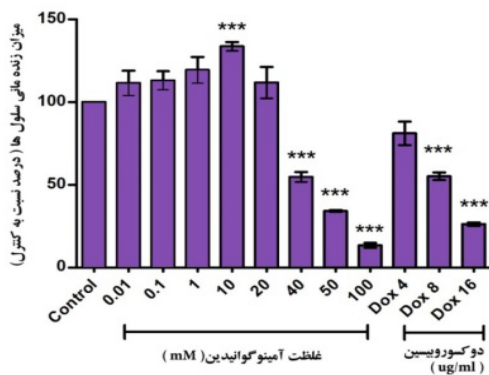
ممکن است به یافتن استراتژی‌های مناسب جهت پیشگیری و درمان HCC کمک کند، از اهمیت بالایی برخوردار است (۳). در حال حاضر هزاران سر نخ وجود دارد که نشان می‌دهد گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن ROS- Reactive oxygen species مولکول‌های سیگنالینگ پلئوتروپیک و مهمی هستند که به عنوان یک شمشیر دولبه در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند کارسینوژنز عمل می‌نمایند (۴) و نقش مهمی در تعیین سرنوشت سلول (رشد، بقا، تمایز و مرگ سلولی) بازی می‌کنند. میزان ROS داخل سلولی در حد غلظت فیزیولوژیک به عنوان ناقل پیام‌های بین سلولی عمل می‌کند ولی افزایش بیش از حد آن منجر به القای استرس اکسیداتیو و آسیب به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله DNA و در نهایت القای آپوپتوز می‌شود (۵،۴). بنابراین استفاده از ترکیبات و داروهایی که باعث افزایش میزان ROS در سلول‌های سرطانی شود می‌تواند در کشتن سلول‌ها نقش اساسی داشته باشد (۶).

AG (آمینوگوانیدین) با نام تجاری پیمادین ترکیبی نوکلئوفیل و بسیار واکنش پذیر بوده که دارای دو مرکز واکنشی گروه هیدرازین و گروه دی‌کربنیل واکنش دهنده با گوانیدین می‌باشد و با مولکول‌های بیولوژیک بسیاری (پیریدوکسال فسفات، پیرووات، گلوکز، مالون دی‌آلدید و غیره) واکنش می‌دهد (۷-۹). دارای ساختاری شبیه به ال-آرژینین می‌باشد که هم خاصیت آنتی‌اکسیدانی و هم پرواکسیدانی دارد (۱۰،۱۱). AG دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی خوبی برای محافظت کبد در برابر سمیت اکسیدان‌هایی مثل کربن تتراکلرید، آزاتیوپورین و استامیوفن است (۱۲-۱۴). هم‌چنین مهارکننده تشکیل محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون می‌باشد که سبب کنترل یا جلوگیری از عوارض ناشی از دیابت می‌شود (۱۵). AG در دوزهای بالا فعالیت نیتریک اکساید سنتاز القایی را مهار و منجر به کاهش تولید نیتریک اکسید می‌شود (۱۰). به علاوه، نشان داده شده است که AG در شرایط *in vitro* دارای فعالیت

و با استفاده از آزمون‌های آماری One-way ANOVA و تست تعقیبی Tukey انجام گردید. مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها و بحث

نتایج سمیت سلولی نشان داد که در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌مولار از AG به تدریج میزان رشد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل (۱۰۰) افزایش می‌یابد، هر چند که این افزایش به غیر از غلظت‌های ۱۰ میلی‌مولار معنی‌دار نمی‌باشد. اما در غلظت‌های ۴۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌مولار معنی‌دار شد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: درصد زنده ماندن سلول‌های HepG-2 تیمار شده با غلظت‌های مختلف آمینوگوانیدین (۰/۰۱ تا ۱۰۰) به مدت ۲۴ ساعت. * $P < 0/05$ ، ** $P < 0/01$ ، *** $P < 0/001$

تیمار به هر چاهک میزان ۲۰ μl محلول (5mg/cc) MTT (Gold Biotechnology, USA) اضافه شد و سپس سلول‌ها برای طی مرحله انکوباسیون به مدت ۴ ساعت در تاریکی و انکوباتور در دمای 37°C قرار داده شدند. پس از این مدت و بعد از خالی نمودن محتویات هر چاهک، ۱۰۰ μl DMSO به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۲ دقیقه، چاهک‌ها توسط دستگاه Elisa reader در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شدند. میزان فعالیت متابولیک سلول‌های تیمار شده به شکل نسبت درصد جذب نوری نمونه در مقایسه با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در نمونه کنترل منفی محاسبه شد (۱۹).

$$\text{میانگین جذب نمونه} \times 100 = \frac{\text{میزان پتانسیل سلولی}}{\text{کنترل جذب کنترل}}$$

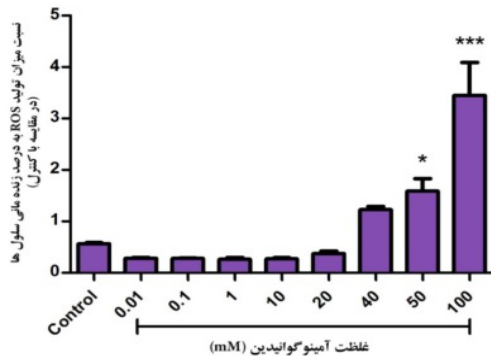
اندازه‌گیری ROS به روش فلوریمتری و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس

به منظور تعیین میزان تولید ROS، تعداد $10^4 \times 2/5$ سلول در پلیت ۹۶ خانه در هر چاهک کشت داده شدند. ۲۴ ساعت بعد از کشت سلول‌ها، محیط رویی کاملاً برداشته شد و سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در معرض ۲۰۰ μl محلول (DCFDA $10 \mu\text{M}$) (Sigma, USA) (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) قرار گرفتند. بعد از خالی نمودن چاهک‌ها، سلول‌های کف چاهک به مدت ۲ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف AG قرار گرفتند. شدت جذب نوری نمونه‌ها به صورت کینتیک با برانگیختگی در ۴۸۵ nm و تابش ۵۲۸ nm با دستگاه فلوریمتری اندازه‌گیری و به صورت تغییرات واحد نسبی شدت نور فلورسانس در دقیقه بیان شد. میزان تولید ROS در نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسانس (Nikon, Japan) نیز بررسی شد.

آنالیز آماری

در این مطالعه، همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 5

میلی مولار و بالاتر افزایش نشان داد. که این افزایش در غلظت ۵۰ (۴۳/۰ ± ۱/۵۸، $P < ۰/۰۵$) و در غلظت ۱۰۰ (۱۱/۳ ± ۳/۳۱، $P < ۰/۰۰۱$) معنی دار بود.

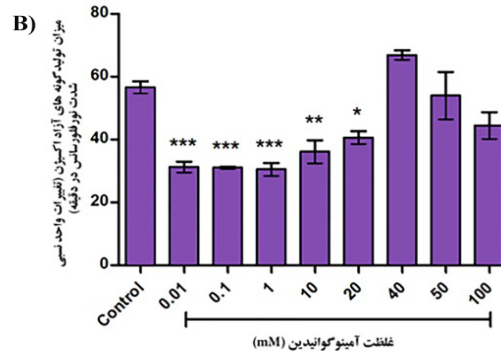
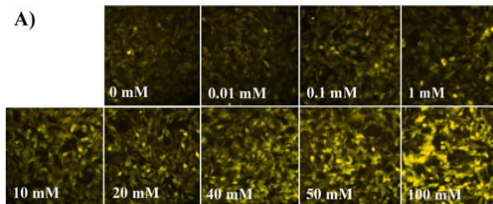


نمودار شماره ۳: نسبت میزان تولید گونه های آزاد اکسیژن (ROS) به درصد سلول های زنده در سلول های HepG-2 تیمار شده با غلظت های مختلف آمینوگوانیدین (۰،۰۱ تا ۱۰۰) * $P < ۰/۰۵$ ، $P < ۰/۰۱$ **، $P < ۰/۰۰۱$ ***

بنابراین کاهش این نسبت بیان گر خاصیت آنتی اکسیدانی و بالعکس، افزایش آن در غلظت های بالا در مقایسه با گروه کنترل نشان دهنده خاصیت پرواکسیدانی AG می باشد. در مطالعه ای که Giardino در سال ۱۹۹۸ انجام داد نیز نشان داد که AG در غلظت های پایین تر از ۱۰ میلی مولار خاصیت آنتی اکسیدانی و در غلظت های بالاتر از ۱۰ میلی مولار با مهار فعالیت کاتالاز و افزایش تولید ROS خاصیت پرواکسیدانی دارد (۱۰).

هم چنین در مطالعه ای دیگر که روی DNA پلاسمیدی انجام شد نشان داده شد که AG با افزایش غلظت (۰ تا ۱۰۰ میلی مولار) منجر به افزایش تولید پرواکسید هیدروژن و در نتیجه آسیب به DNA می شود که نشان دهنده اثر پرواکسیدانی آمینوگوانیدین می باشد (۲۰). تولید بیش از حد ROS باعث افزایش نفوذپذیری دیواره میتو کندری و آزادسازی سیتوکروم C و شروع مسیر داخلی آپوپتوز می شود (۲۳-۲۱). هم چنین ROS میتو کندریایی می تواند به عنوان سرکوب گر تومور عمل نماید که این کار را از طریق

(۲/۵۸ ± ۶۶/۸۷، $P > ۰/۰۵$) میلی مولار AG مشاهده شد که از نظر آماری معنی دار نبود. هم چنین در غلظت های پایین تر از ۴۰، غلظت های ۰/۰۱ تا ۲۰ میلی مولار (به ترتیب، $۳۱/۲۳ ± ۰/۰۲$ ، $۳۱/۰۲ ± ۰/۰۵$ ، $۳۰/۴۹ ± ۳/۵۲$ ، $۳۶/۰۹ ± ۶/۳۵$) به طور معنی داری کاهش میزان تولید ROS مشاهده شد (نمودار شماره ۲-B). از طرفی دیگر عکس های گرفته شده توسط میکروسکوپ حاکی از افزایش شدت نور فلورسانس متعاقب افزایش ROS داخل سلولی در دوزهای بالا می باشد (نمودار شماره ۲-A).



نمودار شماره ۴: (A) عکس های تهیه شده با میکروسکوپ فلورسانس، (B) میزان تولید گونه های آزاد اکسیژن (ROS) در سلول های HepG-2 تیمار شده با غلظت های مختلف آمینوگوانیدین (۰،۰۱ تا ۱۰۰) * $P < ۰/۰۵$ ، $P < ۰/۰۱$ **، $P < ۰/۰۰۱$ ***

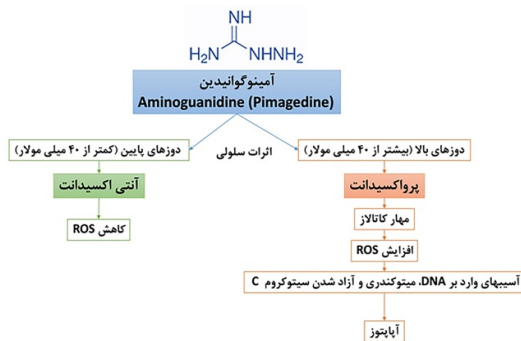
به جهت تفسیر بهتر نتایج می توان میزان تولید ROS نسبت به تعداد سلول های زنده را به عنوان شاخصی از میزان متوسط تولید ROS سلولی با در نظر گرفتن درصد سلول های زنده اندازه گیری نمود لذا این نمودار نمودار شماره ۳ رسم شد. همان طور که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است این نسبت در دوزهای ۲۰ میلی مولار و پایین تر AG کاهش و در دوز ۴۰

فعال کردن ژن‌های پرو-اتوفاژی و مهار ژن‌های آنتی-اتوفاژی انجام می‌دهد (۲۴).

از سوی دیگر در یک مطالعه *in vivo* مشخص شد که AG در دوزهای ۲۵ mg/kg تا ۱۰۰ وزن موش سوری به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، توانایی قابل ملاحظه‌ای برای کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی را دارا می‌باشد و با کاهش تولید نیتریک اکساید، پراکسیداسیون لیپید را کاهش داده و باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چون گلوکاتیون پراکسیداز، گلوکاتیون ردوکتاز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود (۲۵). غلظت $100 \mu\text{M}$ AG در سلول‌های شبکیه چشم موش صحرایی باعث جلوگیری از تشکیل ROS، پراکسیداسیون لیپید و آپوپتوز ناشی از اکسیداسیون شد و در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر خوراکی AG در مابع زجاجیه خرگوش‌های دیابتی از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری کرد (۱۰). علاوه بر مطالعات حیوانی، توانایی درمانی AG در مطالعات بالینی از جمله بررسی فارماکوکینتیک آن مثبت ارزیابی شده است. AG به صورت نمک هیدروکلریک موجود می‌باشد. تقریباً به صورت کامل از طریق فیلتراسیون گلومرولی حذف می‌شود. نیمه عمر AG در افراد با عملکرد کلیوی نرمال حدود ۴/۴ ساعت می‌باشد که در بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیه با تک دوز ۳۰۰ میلی‌گرم (۷) و نفروپاتی ناشی از دیابت نوع دو (۹) مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از محدودیت‌های آمینوگوانیدین طیف اثر گسترده و وسیع آن است چون می‌تواند در عملکرد آنزیمی به ویژه نیتریک اکسید سنتاز اختلال ایجاد نماید (۲۶).

نتایج مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که آمینوگوانیدین در دوزهای بالاتر از دوزی که اثرات

آنتی‌اکسیدانی دارد، قادر به افزایش میزان ROS و القای آپوپتوز می‌باشد (تصویر شماره ۱). این مطالعه، می‌تواند برای بررسی‌های بیش‌تر اثرات AG به عنوان داروی ضد سرطان، یک آغاز باشد و با انجام مطالعات و آزمایش‌های بیش‌تر در این زمینه، می‌توان به عوامل بازدارنده رشد سلول‌های سرطانی، میزان بیان ژن‌های دخیل در القای آپوپتوز و به دنبال آن میزان تولید پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز و نیز مسیرهای درگیر در آن دست یافت. هم‌چنین مشاهده اثرات آنتی‌اکسیدانی AG در غلظت‌های پایین (تصویر شماره ۱) می‌تواند مقدمه‌ای باشد برای یافتن دوز مناسب آمینوگوانیدین جهت استفاده به عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانت و لذا مطالعات بیش‌تری جهت تعیین دوز و مکانیسم‌های محتمل در کارهای حیوانی و بالینی پیشنهاد می‌شود.



تصویر شماره ۱: دیاگرام مسیرهای پیشنهادی جهت بررسی مکانیسم‌های دوگانه آمینوگوانیدین

سپاسگزاری

این مطالعه در دانشکده داروسازی و با همکاری مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد که به این وسیله از همکاری آن مرکز تشکر می‌شود.

References

1. Shokrzadeh M, Ebrahimnejad P, Omidi M, Shadboorestan A, Zaalzar Z. Cytotoxicity Evaluation of Docetaxel Nanoparticles by

Culturing HepG2 Carcinoma Cell Lines. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 22(90): 2-10 (Persian).

2. Amann T, Bataille F, Spruss T, Mühlbauer M, Gäbele E, Schölmerich J, et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100(4): 646-653.
3. Yu SJ. A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world: 2010-2016. *Clin Mol Hepatol* 2016; 22(1): 7-17.
4. de Sá Junior PL, Câmara DAD, Porcacchia AS, Fonseca PMM, Jorge SD, Araldi RP, et al. The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 2467940.
5. Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
6. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 2006; 10(3): 241-252.
7. Foote EF, Look ZM, Giles P, Keane WF, Halstenson CE. The pharmacokinetics of aminoguanidine in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1995; 25(3): 420-425.
8. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419(1): 31-40.
9. Freedman BI, Wuerth J-P, Cartwright K, Bain RP, Dippe S, Hershon K, et al. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II) Control Clin Trials 1999; 20(5): 493-510.
10. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998; 47(7): 1114-1120.
11. Saad EI, El-Gowilly SM, Sherhaa MO, Bistawroos AE. Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of α -lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(7): 1869-1875.
12. Raza M, Ahmad M, Gado A, Al-Shabanah O. A comparison of hepatoprotective activities of aminoguanidine and N-acetylcysteine in rat against the toxic damage induced by azathioprine. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003; 134(4): 451-456.
13. Al-Shabanah OA, Alam K, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Life Sci* 1999; 66(3): 265-270.
14. Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MM, Hafez MM, Omran FM. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology* 2007; 234(1-2): 124-134.
15. Nilsson B-O. Biological effects of aminoguanidine: an update. *Inflamm Res* 1999; 48(10): 509-515.
16. Skamarauskas JT, McKay AG, Hunt JV. Aminoguanidine and its pro-oxidant effects on an experimental model of protein glycation. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(6): 801-812.
17. Ou P, Wolff SP. Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide

- in vitro. *Biochem Pharmacol* 1993; 46(7): 1139-1144.
18. Margoliash E, Novogrodsky A, Schejter A. Irreversible reaction of 3-amino-1: 2: 4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem J* 1960; 74(2): 339-348.
19. Jana P, Mitra T, Selvaraj TKR, Gnanamani A, Kundu P. Preparation of guar gum scaffold film grafted with ethylenediamine and fish scale collagen, cross-linked with ceftazidime for wound healing application. *Carbohydr Polym* 2016; 153: 573-581.
20. Suji G, Sivakami S. DNA damage by free radical production by aminoguanidine. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067(1): 191-199.
21. Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(2): 157-170.
22. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(6): 2129-2144.
23. Chen L, Gong MW, Peng ZF, Zhou T, Ying MG, Zheng QH, et al. The marine fungal metabolite, dicitrinone B, induces A375 cell apoptosis through the ROS-related caspase pathway. *Mar Drugs* 2014; 12(4): 1939-1958.
24. Li ZY, Yang Y, Ming M, Liu B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414(1): 5-8.
25. Alamri MA, Alomar NF, Albukairy A, Alqahtani SJ, Mohammed AG. Aminoguanidine Attenuates Allyl Alcohol Induced Hepatotoxicity in Mice. *American Journal of Experimental Biology* 2014; 1(2): 103-113.
26. Borg DJ, Forbes JM. Targeting advanced glycation with pharmaceutical agents: where are we now? *Glycoconj J* 2016; 33(4): 653-670.