View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Simorgh Research Repository

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان‌نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اثر بتولینیک اسید بر سمیت سلولی ناشی از هیدروژن پراکسید در رده‌ی سلولی سرطان پستان (MCF-7)

توسط:

سیدعلی سادات‌حسینی گروه

اساتید راهنما:

دکتر سمیه کرمی مهاجری

دکتر مجتبی علی‌ملایی

دکتر بهزاد بهنام

تابستان ۱۳۹۹ شماره پایان‌نامه: ۱۱۸۸

Kerman University of Medical Sciences
Faculty of Pharmacy

Pharm. D Thesis

Title:
The effect of betulinic acid on cytotoxicity induced by hydrogen peroxide on MCF-7 cell line

By:
Seyed Ali Sadathosseini-Gorooh

Supervisors:
Dr. Somayyeh Karami-Mohajeri
Dr. Mojtaba Alimolaei
Dr. Behzad Behnam

Summer 2020 **Thesis No: 1188**

اظهارنامه و حق انتشار

اینجانب **سیدعلی سادات‌حسینی گروه** متعهد می‌شوم موارد مذکور در این پایان نامه حاصل فعالیت‌های پژوهشی خود بوده و مسئولیت صحت داده‌ها و اطلاعات گزارش شده در این پایان نامه را به عهده می‌گیرم. تمامی حقوق مادی و معنوی این پایان نامه متعلق به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان بوده و هر گونه استفاده تنها با کسب اجازه ممکن خواهد بود. استناد به مطالب و نتایج این پایان نامه در صورتیکه به نحو مناسبی ارجاع داده شود بلامانع است.

امضا دانشجو

تاریخ ۹۹/۵/۱۵

PharmD Thesis دانشگاه داروسازی کرمان

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

خلاصه فارسی IV

Abstract ٤

فهرست مطالب IV

فهرست جدول‌ها VII

فهرست شکل‌ها VIII

فهرست نمودارها IX

فهرست کوتاه‌نوشته‌ها I

فصل اول: مقدمه

۱-۱- پیشگفتار و هدف ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۱-۱- هدف اصلی تحقیق ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۱-۲- اهداف فرعی تحقیق ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۲- داروهای گیاهی ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۳- آنتی‌اکسیدان‌ها ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۳-۱- انواع آنتی‌اکسیدان‌ها ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-٤- بتولینیک اسید ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-٥- استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-٥-۱- مفهوم رادیکال‌های آزاد ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-٥-۲- اثرات رادیکال‌های آزاد ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-٦- هیدروژن پراکسید ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۷- رده‌ی سلولی MCF-7 ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۷-۱- خصوصیات سلول‌های MCF-7 ..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲- دستگاه‌ها و تجهیزات ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۳- زمان و مکان انجام مطالعه ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-٤- کشت سلول ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۵- تهیه بافر فسفات (PBS) ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-٦- تریپسین ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۷- دریافت و نگهداری سلول‌ها ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۸- از انجماد خارج نمودن و کشت سلول‌ها..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۹- شمارش سلول به روش هموسیتومتر ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۰- تهیه رنگ تریپان‌بلو ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۱- پاساژ سلول ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۲- انجماد سلول ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۳- گروه‌بندی و تیمار سلول‌ها ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱٤- اندازه‌گیری درصد سلول‌های زنده با استفاده از آزمایش رنگ‌سنجی **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۵- اندازه‌گیری میزان تولید ROS به روش فلوریمتری .... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱٦- آنالیز آماری ..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل سوم: نتایج

۳-۱- تعیین میزان IC_{50} هیدروژن پراکسید ..... **Error! Bookmark not defined.**

۳-۲- بررسی اثر بتولینیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌های در تماس با هیدروژن پراکسید با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT..... **Error! Bookmark not defined.**

۳-۳- بررسی اثر بتولینیک اسید بر میزان تولید ROS در سلول‌های در تماس با هیدروژن پراکسید با استفاده از روش فلوریمتری ..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

٤-۱- بحث ..... **Error! Bookmark not defined.**

٤-۲- نتیجه‌گیری ..... **Error! Bookmark not defined.**

٤-۳- پیشنهادات..... **Error! Bookmark not defined.**

منابع

منابع ٥

پیوست‌ها

پیوست الف: MSDS ماده Betulinic acid ..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست ب: MSDS ماده DMSO ..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست ج: MSDS ماده MTT..... **Error! Bookmark not defined.**

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- مواد مورد استفاده..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
جدول ۲-۲- دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
جدول ۲-۳- فهرست مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه بافر فسفات (PBS) **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ساختار بتولینیک اسید ..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
شکل ۱-۲- گیاه *Ziziphus mauritiana* ..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
شکل ۲-۱- لام هموسیتومتر ..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمـودار ۳-۱- تعیـین میـزان IC_{50} هیـدروژن پراکسـید (H_2O_2) روی رده‌ی سـلولی MCF-7 (Mean±SD; n=۳) ..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
نمودار ۳-۲- تأثیر غلظت‌های مختلف بتولینیک اسید بر درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 که با هیدروژن پراکسید (H_2O_2؛ ۱۰۰ میکرومولار) به مدت‌زمان ۲٤ ساعت در تماس بوده‌اند با استفاده از روش MTT..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
نمودار ۳-۳- تأثیر غلظت‌های مختلف بتولینیک اسید بر میزان تولید گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) در سلول‌های سرطانی MCF-7 که با هیدروژن پراکسید (H_2O_2؛ ۱۰۰ میکرومولار) به مدت‌زمان ۲٤ ساعت در تماس بوده‌اند با استفاده از روش فلوریمتری **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

فهرست کوتاه‌نوشته‌ها

Abbreviations	Discriptions
Akt	Protein Kinase B
BA	Betulinic Acid
Bax	Bcl-2-Associated X Protein
Bcl-2	B Cell Leukaemia-2
Cyt c	Cytochrom C
CAT	Catalase
C-Fos	Proto-Oncogene
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DCFDA	۲۰,۷۰–۰ichlorodihydroFluorecein Diacetate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
Erk	Extracellular Signal-Regulated Kinases
FBS	Fetal Bovine Serum
GSH	Glutathione
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H_2O_2	Hydrogen Peroxide
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration
JNK	C-Jun N-Terminal Kinases
Il-6	Interleukin 6
IFN- γ	Interferon-γ
LPS	Lipopolysaccharide
LD_{50}	Median Lethal Dose
MDA	Malondialdehyde
NF- kB	Nuclear Factor- kB
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKC	Protein Kinase C
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
SOD	Superoxide Dismutase
TE	Trypsin
SP	Specificity Protein
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
WHO	World Health Organization

خلاصه فارسی

مقدمه: مصرف ترکیبات گیاهی به خاطر اثرات جانبی کمتر نسبت به ترکیبات شیمیایی و همچنین به خاطر دارا بودن برخی خواص مهم در درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. از جمله این ترکیبات بتولینیک اسید است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در طی فعالیت‌های نرمال سلولی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید می‌گردد که تولید بیش‌از حد آن‌ها منجر به القای استرس اکسیداتیو می‌گردد. سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها شامل آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان قادر به مقابله با استرس اکسیداتیو می‌باشد. در این مطالعه، استرس اکسیداتیو در رده‌ی سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7) با هیدروژن پراکسید القا گردید و سپس تأثیر غلظت‌های مختلف بتولینیک اسید بر در صد زنده‌مانی سلول‌ها و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بررسی گردید.

روش‌ها: رده سلولی MCF-7 برای ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در مجاورت هیدروژن پراکسید با غلظت (۱۰۰ میکرومولار) قرار داده شد و در نهایت با غلظت‌های مختلف بتولینیک اسید تحت درمان قرار گرفت. پس از آن اثرات بتولینیک اسید بر زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمایش MTT و میزان تولید ROS اندازه‌گیری شد. در نهایت داده ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمایش تعقیبی توکی با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism5 تحلیل گردیدند. در نهایت نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شدند و p-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: میزان زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت ۵۰ µM افزایش یافت درحالی که در غلظت ۱۰۰ µM کاهش یافت. همچنین تولید ROS در سلول های تیمار شده با هیدروژن پراکسید نسبت به گروه

کنترل منفی کاهش معنی‌داری داشت. بتولینیک اسید در غلظت بیشتر از ۱۰۰ µM به صورت معنی‌داری تولید ROS را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: بتولینیک اسید در غلظت ۵۰ µM زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش داد درحالی که با افزایش غلظت بتولینیک اسید این تأثیر کاهش یافت.

کلمات کلیدی: بتولینیک اسید، هیدروژن پراکسید، گونه‌های فعال اکسیژن، MCF-7.

Abstract

Introduction: Herbal compounds have been widely used than chemical compounds in the treatment of various diseases due to their safer therapeutic properties. Betulinic acid is an herbal compound with antioxidant properties. Reactive oxygen species (ROS) are generated during normal cellular activity (mitochondrial oxidative metabolism). Overproduction of ROS leads to induction of oxidative stress. Cellular antioxidant system (as enzymes and antioxidant compounds) deal with oxidative stress. In this study, oxidative stress was induced in human breast cancer cell line (MCF-۷) □□ hydrogen peroxide. Then, the effect of different concentrations of betulinic acid on the viability of the cells and production of ROS was investigated.

Methods: MCF-7 cells were exposed to hydrogen peroxide (100 µM) to induce oxidative stress. Then, the exposed cells were treated with different concentrations of betulinic acid and its effects on cell viability were assessed using MTT and ROS production assay. Data were analyzed using One-way analysis of variance test and Touki's post hoc test by GraphPad Prism 5 software. Results showed as mean ±standard deviation and p-values less than 0.05 were considered as significant.

Results: The viability was increased in MCF-7 cells treated with betulinic acid at the concentration of 50 µM and decreased at the concentration of 100 µM. ROS generation in hydrogen peroxide treated cells were significantly lower than control group. Betulinic acid at the concentration higher than 100 µM decreased significantly the production of ROS.

Conclusion: Betulinic acid at the concentration of 50 µM increased the cell viability, while this effect was reduced by increasing the concentration of betulinic acid.

Keywords: Betulinic Acid, Hydrogen Peroxide, Reactive Oxygen Species, MCF-7

منابع

[1] Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food Bioprod Process** 2011; 89:217-33.

[2] Yi J, Xia W, Wu J, Yuan L, Wu J, Tu D, *et al.* Betulinic acid prevents alcohol-induced liver damage by improving the antioxidant system in mice. **J Vet Sci** 2014; 15:141-8.

[3] Peng J, Lv Y-C, He P-P, Tang Y-Y, Xie W, Liu X-Y, *et al.* Betulinic acid downregulates expression of oxidative stress-induced lipoprotein lipase *via* the PKC/ERK/c-Fos pathway in RAW264. 7 macrophages. **Biochimie** 2015;119:192-203.

[4] Viji V, Helen A, Luxmi VR. Betulinic acid inhibits endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and pro-inflammatory prostaglandin E2 production in human peripheral blood mononuclear cells. **Br J Pharmacol** 2011;162:1291-303.

[5] Mamedov N. Medicinal plants studies: history, challenges and prospective. **Med Aromat Plants** 2012;1:e133.

[6] Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev** 2012; 6:1-5.

[7] Sadighara P, Gharibi S, Moghadam Jafari A, Jahed Khaniki G, Salari S. The antioxidant and flavonoids contents of *Althaea officinalis L*. flowers based on their color. **Avicenna J Phytomed** 2012;2:113-7.

[8] Halliwell B, Gutteridge J. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic Biol Med** 1995; 18:125-6.

[9] Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants–a review. **J Pharm Res** 2013;7:828-35.

[10] Mathew BB, Tiwari A, Jatawa SK. Free radicals and antioxidants: a review. **J Pharm Res** 2011;4:4340-3.

[11] Packer L, Witt E, Tritschler H, Wessel K, Ulrich H. Antioxidant properties and clinical implications of alpha-lipoic acid. **Marcel Dekker, Inc** 1995:479-516.

[12] Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol** 2005;3:28.

[13] Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem** 1999;32:595-603.

[14] Pandey MK, Sung B, Aggarwal BB. Betulinic acid suppresses STAT3 activation pathway through induction of protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human multiple myeloma cells. **Int J Cancer** 2010;127:282-92.

[15] Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression. **Mol Med Rep** 2016;14:4489-95.

[16] Gheorgheosu D, Duicu O, Dehelean C, Soica C, Muntean D. Betulinic acid as a potent and complex antitumor phytochemical: a minireview. **Anti-Cancer Agents Med. Chem** 2014;14:936-45.

[17] Dehelean CA, Şoica C, Ledeţi I, Aluaş M, Zupko I, Găluşcan A, *et al.* Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. **Chem Cent J** 2012;6:137.

[18] Csuk R. Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008–2٠١٣). **Expert Opin Ther Pat** 2014;24:913-23.

[19] Mukherjee R, Kumar V, Srivastava SK, Agarwal SK, Burman AC. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: structure activity relationship. **Anti-Cancer Agents Med Chem** 2006;6:271-9.

[20] Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. **Anti-Cancer Drug** 2010;21:215-27.

[21] Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, *et al.* Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett** 2002;175:17-25.

[22] Luo R, Fang D, Chu P, Wu H, Zhang Z, Tang Z. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. **Biomed Pharmacother** 2016;84:1321-30.

[23] Jeremias I, Steiner H, Benner A, Debatin K-M, Herold-Mende C. Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. **Acta Neurochir** 2004;146:721-9.

[24] Hsu T-I, Wang M-C, Chen S-Y, Huang S-T, Yeh Y-M, Su W-C, *et al.* Betulinic acid decreases Sp1 level *via* increasing the sumoylation of Sp1 to inhibit lung cancer growth. **Mol Pharmacol** 2012. 112.078485.

[25] Tiwari R, Puthli A, Balakrishnan S, Sapra B, Mishra K. Betulinic acid-induced cytotoxicity in human breast tumor cell lines MCF-7 and T47D and its modification by tocopherol. **Cancer Invest** 2014;32:402-8.

[26] Jung GR, Kim KJ, Choi CH, Lee TB, Han SI, Han HK, *et al.* Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 2007; 101:277-85.

[27] Rabi T, Shukla S, Gupta S. Betulinic acid suppresses constitutive and TNFα-induced NF-κB activation and induces apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. **Mol Carcinog** 2008;47:964-73.

[28] Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. **Cancer Res** 2007;67:2816-23.

[29] Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression (review). **Mol Med Rep** 2016;14:4489-95.

[30] Wick W, Grimmel C, Wagenknecht B, Dichgans J, Weller M. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. **J Pharmacol Exp Ther** 1999; 289:1306-12.

[31] Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. **Int J Cancer** 1999;82:435-41.

[32]Schmidt M, Kuzmanoff K, Ling-Indeck L, Pezzuto J. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. **Eur J Cancer** 1997;33:2007-10.

[33] Thurnher D, Turhani D, Pelzmann M, Wannemacher B, Knerer B, Formanek M, *et al.* Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. **Head & Neck** 2003;25:732-40.

[34] Ehrhardt H, Fulda S, Führer M, Debatin K, Jeremias I. Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells. **Leukemia** 2004;18:1406-12.

[35] Zheng ZW, Song SZ, Wu YL, Lian LH, Wan Y, Nan JX. Betulinic acid prevention of d-galactosamine/lipopolysaccharide liver toxicity is triggered by activation of Bcl-2 and antioxidant mechanisms. **J Pharm Pharmacol** 2011;63:572-8.

[36] Fan R, Hu PC, Wang Y, Lin HY, Su K, Feng XS, *et al.* Betulinic acid protects mice from cadmium chloride-induced toxicity by inhibiting cadmium-induced apoptosis in kidney and liver. **Toxicol Lett** 2018;299:56-66.

[37] Wang X, Yuan Z, Zhu L, Yi X, Ou Z, Li R, *et al.* Protective effects of betulinic acid on intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide in mice. **Pharmacol Rep** 2019; 71:929-39.

[38] Seo BN, Ryu JM, Yun SP, Jeon JH, Park SS, Oh KB, *et al.* Delphinidin prevents hypoxia-induced mouse embryonic stem cell apoptosis through reduction of intracellular reactive oxygen species-mediated activation of JNK and NF-κB, and Akt inhibition. **Apoptosis** 2013;18:811-24.

[39] Kowalczyk T, Sitarek P, Skała E, Rijo P, Andrade JM, Synowiec E, *et al.* An evaluation of the DNA-protective effects of extracts from *Menyanthes trifoliata L*. plants derived from *in vitro* culture associated with redox balance and other biological activities. **Oxid Med Cell Longev** 2019;2019.

[40]Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. Oxidative stress in alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxid Med Cell Longev** 2014;2014.

[41]López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Anal Chim Acta** 2013; 763:1-10.

[42]Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. **Oxidative Stress** 1985;501:1-8.

[43]Maulik N, Mcfadden D, Otani H, Thirunavukkarasu M, Parinandi NL. Antioxidants in longevity and medicine. **Oxid Med Cell Longev** 2013;2013.

[44]Toda S. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. **Chin Med** 2011; 2:29.

[45]Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J Lab Clin Med** 1992;119:598-620.

[46]Cutteridhe J. Free radicals in disease processes: a compilation of causes and consequences. **Free Rad Res Commun** 1993;19:141-50.

[47]Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med** 1991; 91:S31-S8.

[48]Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxid Med Cell Longev** 2013; 212-214.

[49]Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **Eur J Med Chem** 2015;97:55-74.

[50]Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radic Res** 1996; 25:57-74.

[51]Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. **Exp Gerontol** 2001;36:1539-50.

[52]Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine** 2007;74:324-9.

[53]López-Jaén AB, Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V. Free radicals: a review. **J Pediatr** 2013;3:115-21.

[54]Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. **Chest** 2013;144:266-73.

[55]Lee SJ, Lim KT. Glycoprotein of *Zanthoxylum piperitum DC* has a hepatoprotective effect *via* anti-oxidative character *in vivo* and *in vitro*. **Toxicol *in vitro*** 2008;22:376-85.

[56]Li ZY, Yang Y, Ming M, Liu B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2011;414:5-8.

[57]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;10:241-52.

[58]Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. **J Cell Biol** 2011; 194:7-15.

[59]Richter-Landsberg C, Vollgraf U. Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. **Exp Cell Res** 1998;244:218-29.

[60]Lingaraju MC, Pathak NN, Begum J, Balaganur V, Bhat RA, Ram M, *et al.* Betulinic acid negates oxidative lung injury in surgical sepsis model. **J Surg Res** 2015; 193:856-67.

[61]Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett** 2000;486:10-3.

[62]Levenson AS, Catherino WH, Jordan VC. Estrogenic activity is increased for an antiestrogen by a natural mutation of the estrogen receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1997; 60:261-8.

[63]Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Res** 1997;57:3071-8.

[64]Gassen M, Gross A, Youdim MB. Apomorphine enantiomers protect cultured pheochromocytoma (PC12) cells from oxidative stress induced by H_2O_2 and 6-hydroxydopamine. **Mov Disord** 1998;13:661-7.

[65]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;153:573-81.

[66]Storz G, Imlayt JA. Oxidative stress. **Curr Opin Microbiol** 1999;2:188-94.

[67]Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol** 1997;82:291-5.

[68]Tang X-Q, Feng J-Q, Chen J, Chen P-X, Zhi J-L, Cui Y, *et al.* Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H_2O_2 in PC12 cells: mechanisms *via* MMP, ROS, and Bcl-2. **Brain Res** 2005;1057:57-64.

[69]Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, *et al.* Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. **Antioxid Redox Signal** 2002;4:845-54.

[70]Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszeñ M. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. **Pharmacol Rep** 2005; 57:588.

[71]Yi J, Zhu R, Wu J, Tan Z. Ameliorative effect of betulinic acid on oxidative damage and apoptosis in the splenocytes of dexamethasone treated mice. **Int Immunopharmacol** 2015;27:85-94.

[72] Wang X, Lu X, Zhu R, Zhang K, Li S, Chen Z, *et al.* Betulinic acid induces apoptosis in differentiated PC12 cells *via* ROS-mediated mitochondrial pathway. **Neurochem Res** 2017; 42:1130-40.

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی

پایان نامه آقای سیدعلی سادات حسینی گروه دانشجوی داروسازی ورودی ۹۲ به شماره ۱۱۸۸

تحت عنوان:

بررسی اثر بتولینیک اسید بر سمیت سلولی ناشی از هیدروژن پراکسید در رده ی سلولی سرطان پستان (MCF-7)

استاد (اساتید) راهنما:

دکتر سمیه کرمی مهاجری

دکتر مجتبی علی

دکتر بهزاد بهنام

هیئت محترم داوران:

۱- دکتر آزاده امین زاده ۲-دکتر محمودرضا حیدری ۳-دکتر صالحه صبوری

در تاریخ ۹۹/۰۵/۱۵ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۸,۹۶

(با حروف) ..... به تصویب رسید.

دکتر مصطفی پورنامداری
رئیس اداره پایان‌نامه

محمدرضا نخعی
کارشناس اداره پایان‌نامه

دکتر باقر امیر حیدری
رئیس دانشکده

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان کرمان
دانشکده داروسازی