

Original Article

The Effects of Spirulina on Proliferation, Apoptosis, Nitric Oxide Release, and the Expression of Ras/MAPK Pathway Genes in Cervical Cancer Cells (CC1-PI 19)

Azita Faramarzi¹ , Mona Pazhouhi² , Fatemeh Makalani³ , Baharak Parvanehvar⁴ , Cyrus Jalili^{5*}

¹ Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

² Researcher, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³ PhD Candidate, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ Medical Student, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁵ Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

***Corresponding author:** Cyrus Jalili, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email: cjalili@yahoo.com

DOI: [10.32592/nkums.17.2.26](https://doi.org/10.32592/nkums.17.2.26)

How to Cite this Article:

Faramarzi A, Pazhouhi M, Makalani F, Parvanehvar B, Jalili C. The Effects of Spirulina on Proliferation, Apoptosis, Nitric Oxide Release, and the Expression of Ras/MAPK Pathway Genes in Cervical Cancer Cells (CC1-PI 19). J North Khorasan Univ Med Sci. 2025;17(2): 26-35. DOI: [10.32592/nkums.17.2.26](https://doi.org/10.32592/nkums.17.2.26)

Received: 22 September 2024

Accepted: 24 December 2024

Keywords:

Apoptosis
Cervical cancer
Parents' survival
Spirulina

Abstract

Introduction: Spirulina is a popular dietary supplement and its anticancer properties have been reported. Considering the significant increase in the number of cervical cancer patients in the last 30 years, the lack of efficiency of common treatments, and the need to identify treatment methods with fewer side effects, this study aimed to determine the effects of spirulina on proliferation, apoptosis, and nitric oxide secretion, as well as the expression of Ras/MAPK pathway genes on cervical cancer cells.

Method: After the preparation of hydroalcoholic extract of spirulina and treatment of cells with different concentrations of extract, survival was measured using the MTT method. The Diphenylamine test was used to measure apoptosis, and the Griess reaction was used to measure nitric oxide. Gene expression was measured and quantified by real-time PCR. Finally, the data were analyzed using SPSS software (version 16). The significance level of statistical tests was considered to be $P \leq 0.05$ for all tests.

Results: The cytotoxic effect of spirulina on cancer cells was dependent on concentration and time. The IC₅₀ value of spirulina for cancer cells was lower than that of non-cancerous fibroblast cells. Treatment with the IC₅₀ concentration of spirulina after 24 hours induced a significant increase in apoptosis ($P \leq 0.05$) and significant decrease in the expression of *Ras* (*HRAS*, *KRAS*, and *NRAS*), *Raf* (*ARAF*, *BRAF*, and *CRAF*), *MEK* (*MEK1*, *MEK2*, *MEK3*, *MEK4* and *MEK5*), and *ERK* (*ERK1* and *ERK2*) family genes ($P \leq 0.05$). Moreover, IC₅₀ concentration of spirulina significantly reduced nitric oxide production ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Spirulina may have anticancer effects through stimulation of apoptosis and inhibition of the Ras/MAPK signaling pathway.



بررسی اثرات اسپیرولینا بر میزان تکثیر، آپوپتوز، ترشح نیتریک اکساید و بیان ژن‌های مسیر Ras/MAPK در سلول‌های سرطان سرویکس (CC1-PI 19)

آریتا فرامرزی^۱، مونا پژوهی^۲، فاطمه ماکلانی^۳، بهارک پروانه‌وار^۴، سیروس جلیلی^{۵*}

^۱ دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۲ پژوهشگر گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۳ دانشجوی دکتری دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۴ دانشجوی پزشکی دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۵ استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

*نویسنده مسئول: سیروس جلیلی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: cjalili@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.17.2.26

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۴
مقدمه: اسپیرولینا یک مکمل غذایی محبوب است و خواص ضدسرطانی آن گزارش شده است. با توجه به افزایش درخور توجه تعداد مبتلایان به سرطان سرویکس در ۳۰ سال گذشته، نداشتن کارایی درمان‌های رایج و ضرورت شناسایی روش‌های درمانی با عوارض جانبی کمتر، این مطالعه با هدف تعیین اثرات اسپیرولینا بر تکثیر، آپوپتوز، ترشح نیتریک اکساید و بیان ژن‌های مسیر Ras/MAPK در سلول‌های سرطان سرویکس انجام شد.	واژگان کلیدی: سرطان سرویکس زنده‌مانی آپوپتوز اسپیرولینا
روش کار: بعد از تهیه عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا و تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره زنده‌مانی به روش MTT سنجیده شد. برای سنجش آپوپتوز از تست دی‌فنیل‌آمین و برای سنجش نیتریک اکساید از واکنش گریس استفاده شد. بیان ژن‌ها با Real time PCR سنجیده و کمی‌سازی شد. در نهایت داده‌ها با نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS آنالیز شد. سطح معناداری تست‌های آماری درباره همه تست‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.	
یافته‌ها: اثر ساینوتوکسیک اسپیرولینا بر سلول‌های سرطانی به‌صورت وابسته به غلظت و زمان بود. میزان IC50 اسپیرولینا برای سلول‌های سرطانی کمتر از سلول‌های غیرسرطانی فیروبیلاست بود. تیمار با غلظت IC50 اسپیرولینا بعد از ۲۴ ساعت افزایش معناداری را در آپوپتوز القا کرد ($P \leq 0.05$) و بیان ژن‌های خانواده Ras (<i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> , and <i>NRAS</i>)، <i>Raf</i> (<i>ARAF</i> , <i>BRAF</i> , and <i>CRAF</i>)، <i>MEK</i> (<i>MEK1</i> , <i>MEK2</i> , <i>MEK3</i> , <i>MEK4</i> and <i>MEK5</i>) و ژن‌های <i>ERK</i> (<i>ERK1</i> and <i>ERK2</i>) را به‌صورت معنادار مهار کرد ($P \leq 0.05$). همچنین، غلظت IC50 اسپیرولینا میزان تولید نیتریک اکساید را به‌صورت معنادار کاهش داد ($P \leq 0.05$). نتیجه‌گیری: اسپیرولینا احتمالاً از طریق تحریک آپوپتوز و مهار مسیر سیگنالینگ Ras/MAPK دارای اثرات ضدسرطانی است.	

مقدمه

سرویکس در سراسر جهان مشاهده شده است. در کشورهای در حال توسعه، تعداد موارد جدید سرطان سرویکس ۴۵۲۰۰۰ مورد بوده و بین بدخیمی‌ها در بیماران زن رتبه دوم را به خود اختصاص داده است. برعکس، تعداد موارد جدید سرطان سرویکس در کشورهای توسعه‌یافته ۷۷۰۰۰ مورد بوده و بین بدخیمی‌های زنان رتبه دهم را به خود اختصاص داده است [۱].

اسپیرولینا یک مکمل غذایی محبوب است که از جلبک‌های سبز آبی (سیانوباکتری‌ها) از جنس *Arthrospira* به دست می‌آید. آن‌ها آزادانه در آب شور شناور هستند. اسپیرولینا به‌طور معمول در مخازن آب

سرطان سرویکس دومین تومور بدخیم شایع زنان در سطح جهان است که سلامت زنان را به‌طور جدی تهدید می‌کند. مشخص شده است که عفونت مداوم ویروس پاپیلومای انسان پرخطر، علت ضروری سرطان سرویکس است [۱، ۲]. سرطان سرویکس یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان بین زنان است. در طول ۳۰ سال گذشته، افزایش تعداد زنان جوان مبتلا به این سرطان از ۱۰ درصد تا ۴۰ درصد متغیر بوده است. براساس برآوردهای سازمان بهداشت جهانی و آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (International Agency For Research On Cancer: IARC) در سال ۲۰۰۸، ۵۲۹۰۰۰ مورد جدید سرطان

مطالعه با هدف تعیین اثرات اسپیرولینا بر تکثیر، آپوپتوز، تشریح نیتریک اکساید و بیان ژن‌های مسیر Ras/MAPK در سلول‌های سرطان سرویکس، به منظور بررسی مکانیسم اثر ضدسرطانی این ماده طبیعی انجام شد.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و پس از اخذ کد اخلاق ۱۴۰۳۰۴۳ IR.KUMS.MED.REC. انجام شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی اسپیرولینا

مکمل اسپیرولینا از شرکت گلداسپیر خریداری شد و در دمای محیط خشک و پودر شد و ۱۵ گرم پودر در ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت، در تاریکی خیسانده شد. سپس، محلول از طریق کاغذ فیلتر (واتمن، درجه ۴۲)، فیلتر و خشک شد تا امکان تبخیر الکل در دمای اتاق فراهم شود. سرانجام، پودر در محیط کشت DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium بدون سرم (Germany, Gibco) حل شد و با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد [۲۱].

کشت سلول

رده سلولی سرطان سرویکس (CC1-PI 19) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت ۵ درصد CO₂ در فلاسک‌های کشت سلول حاوی محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین نگهداری شدند.

سنجش زنده‌مانی سلول‌ها

۱۵ هزار عدد سلول در هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهک کشت داده شد و بعد از گذشتن یک شب و چسبیدن سلول‌ها به بستر، محیط دارای غلظت‌های مدنظر از اسپیرولینا (۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲ میکروگرم / میلی‌لیتر) اضافه شد (برای هر غلظت ۶ چاهک). سلول‌های کنترل محیط فاقد سرم دریافت خواهند کرد. پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به هریک از چاهک‌ها حدود ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما، آمریکا) اضافه و به مدت ۳ ساعت در تاریکی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به هریک از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه پلیت بر شیکر در دمای اتاق قرار گرفت. در نهایت، جذب چاهک‌ها را در ۵۷۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر الایزا (بایوتک، آمریکا) خوانده شد. درصد زیست‌پذیری سلول‌ها را از رابطه زیر محاسبه شد [۲۱]:

$$(\text{cell viability}) = (\text{Abs test cells} / \text{Abs control cells}) \times 100 (\%)$$

سنجش آپوپتوز

درصد تکه‌تکه شدن DNA پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت IC₅₀ عصاره با استفاده از روش دی‌فنیل‌آمین تعیین شد. تعداد ۵ میلیون سلول در ۱ میلی‌لیتر باف TTE (سیناکلون، ایران) به حالت

قلیایی در مناطق نیمه‌گرمسیری و گرمسیری آمریکا، آسیا و آفریقای مرکزی رشد می‌کند و به‌صورت تجاری تولید می‌شود. با توجه به محتوای بالای مواد مغذی و اثرات درمانی متفاوت، اسپیرولینا بین مصرف‌کنندگان محبوب است و به‌مثابه یک مکمل غذایی مصرف می‌شود [۴]. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که اسپیرولینا دارای غلظت بالایی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه ارتقادهنده سلامتی است و منبع غنی پروتئین (۵۵ تا ۷۰ درصد وزن خشک) شناخته شده است. همچنین، حاوی لیپیدها (۵ تا ۶ درصد؛ برای مثال ۷-لینولینیک، لینولئیک، اولئیک، استریدونیک، ایکوزاپنتانوئیک، دوکوزاهگزانوئیک و اسیدهای آراشیدونیک)، ویتامین‌ها (B، D، E، اسید اسکوربیک)، مواد معدنی (عمدتاً پتاسیم و همچنین کلسیم، کروم، مس، آهن، منیزیم، منگنز، فسفر، سلنیوم، سدیم و روی) و رنگدانه‌ها (کلروفیل a، زانتوفیل، بتاکاروتن، زاگزانتین و مجتمع‌های فیکوبیلیپروتئینی) است [۵]. اخیراً گزارش شده است که برخی از فیکوبیلیپروتئین‌ها دارای فعالیت ضد سرطانی هستند. برای مثال، C-PC طبیعی (کمپلکس پروتئین-رنگدانه محلول در آب) خالص‌شده از اسپیرولینا با مهار تکثیر سلول‌های نوپلاسما و اختلال در چرخه سلولی سرطان مرتبط است [۶-۸]. نکته مهم این است که اسپیرولینا حاوی تمام آمینواسیدهای ضروری برای انسان و مقادیر کمتری متیونین، سیستئین و لیزین در مقایسه با پروتئین‌های حیوانی است. همچنین، گفتنی است که دیواره سلولی اسپیرولینا حاوی تقریباً ۶۰ درصد پروتئین است؛ بنابراین، هضم آن آسان‌تر از دیواره سلولی گیاهی است [۹]. پروتئین‌ها و پپتیدها گروه بسیار جالبی از ترکیبات زیست فعال موجود در اسپیرولینا هستند [۱۰]. مصرف اسپیرولینا با اثرات کاهش چربی خون و آنتی‌اکسیدان [۱۱] و همچنین فعالیت محافظت‌کننده عصبی [۱۲] و تعدیل‌کننده ایمنی [۱۳] مرتبط است. افزون‌براین، مصرف آن با کاهش سطح فاکتورهای نکروز تومور α (TNF-α) و β (TNF-β) و افزایش عملکرد گیرنده β-آدرنرژیک مخچه وابسته به سن [۱۴] مرتبط است. برخی از محققان گزارش کردند که متابولیت‌های تولیدشده توسط اسپیرولینا از تکثیر ویروس‌های مختلف انسانی جلوگیری می‌کند [۱۵ و ۱۶]. افزون‌براین، عصاره اسپیرولینا به‌مثابه عوامل ضد میکروبی [۱۷] و ضد سرطان [۱۸] توصیف شده است.

بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته یا عودکننده سرویکس پیش‌آگهی بدی دارند و بقای یک‌ساله آن‌ها تنها ۱۰ تا ۲۰ درصد است. شیمی‌درمانی درمان استاندارد برای بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته یا عودکننده سرویکس در نظر گرفته می‌شود. با این حال، مقاومت به درمان ممکن است ایجاد شود؛ بنابراین کارایی دارو برای درمان سرطان پیشرفته یا عودکننده سرویکس به‌طور قابل‌توجهی به خطر می‌افتد [۱۹]. به‌خوبی شناخته شده است که مصرف منظم برخی از مواد طبیعی، به‌اصطلاح عوامل شیمیایی پیشگیری‌کننده، می‌تواند خطر ابتلا به سرطان‌های خاص را کاهش دهد [۲۰]؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که اسپیرولینا به‌دلیل عملکرد مفید برای سلامتی، یک عامل شیمی‌درمانی جذاب باشد.

همان‌طور که گفته شد خواص ضدسرطانی عصاره اسپیرولینا قبلاً گزارش شده است [۱۸]. با توجه به افزایش درخور توجه تعداد مبتلایان به سرطان سرویکس در ۳۰ سال گذشته و کارایی نداشتن درمان‌های رایج، ضرورت شناسایی روش‌های درمانی با عوارض جانبی کمتر، این

دستگاه خوانشگر الیزار اندازه‌گیری شد. از غلظت‌های مختلف سدیم نیترات به‌مثابه استاندارد استفاده شد.

سنجش بیان ژن‌ها

پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت IC50 عصاره، RNA کل با استفاده از یک میلیون سلول از گروه کنترل و گروه تیمار با استفاده از معرف TRIZol (Invitrogen, Life Technologies, UK) استخراج شد. یکپارچگی RNA با استفاده از نانودراپ (USA, Scientific (Thermo) ارزیابی شد. DNA مکمل (cDNA) برطبق روش کیت Real-time (Technologies, Malaysia Vivantis) سنتز شد. PCR با SYBR Premix Ex Taq technology (Takara Bio) (Inc., Japan) و برطبق شیوه‌نامه سازنده انجام شد. تفاوت در مقادیر چرخه آستانه (Threshold Cycle: TC) ژن هدف با ژن β -اکتین (کنترل داخلی) مربوط محاسبه شد. سطح بیان نسبی ژن هدف به β -اکتین با استفاده از معادله $2^{-\Delta CT}$ توصیف شد [۲۱]. ابتدا در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه مرحله واسرشتگی اولیه انجام شد و سپس برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: مرحله واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. به‌منظور ترسیم منحنی ذوب نیز از برنامه زمانی و دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ لیست شده است.

سوسپانسیون درآمدند و در ۲۰,۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس کروماتین سالم (رسوب) از DNA آسیب‌دیده (مایع رویی) جدا شد. مایع رویی به لوله‌های جدید منتقل شد (نمونه A) و رسوب در ۱ میلی‌لیتر بافر TTE به اضافه ۱ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۲۵ درصد (مرک، آلمان) دوباره تعلیق و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، نمونه‌ها دوباره سانتریفیوژ شدند. به‌منظور تجزیه DNA، ۱۶۰ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۵ درصد (مرک، آلمان) به هر رسوب اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس ۳۲۰ میکرولیتر محلول دی‌فنیل‌آمین (مرک، آلمان) تازه‌تهیه‌شده به هر نمونه اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (نمونه B). درنهایت، جذب نمونه‌های A و B در ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. درصد DNA قطعه‌قطعه شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Percentage of DNA fragmentation} = \left[\frac{\text{OD660 (A)}}{\text{OD660 (B)} - \text{OD660 (A)}} \right] \times 100$$

سنجش میزان تولید نیتریک‌اکساید

به‌منظور سنجش نیتریک‌اکساید از اندازه‌گیری سطح متابولیت‌های نیترات در محیط کشت با روش رنگ‌سنجی برمبنای واکنش گریس استفاده شد. برای این منظور از کیت سنجش نیتریک‌اکساید (نیتروسیب، ایران) استفاده شد و جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر توسط

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Gene	Forward	Reverse
HRAS	ACGCACTGTGGAATCTCGGCAG	TCACGCACCAACGTGTAGAAGG
KRAS	CAGTAGACACAAAACAGGCTCAG	TGTCGGATCTCCCTACCAATG
NRAS	GAAACCTCAGCCAAGACCAGAC	GGCAATCCCATAACAACCTGAG
ARAF	CCCACATTCCAAGTCACCAGCA	CCTCCCAGTAATAGCCTGAGTC
BRAF	AACGAGACCGATCCTCATCAGC	GGTAGCAGACAAACCTGTGGTTG
CRAF	TCAGGAATGAGGTGGCTGTTCTG	CTCGCACCACTGGGTCAACAATT
MEK1	GGTGTTCAGGTCTCCCAACAAG	CCACGATGTACGGAGAGTTGCA
MEK2	GTGGTCACCAAAGTCCAGCACA	CACGATGTACGGCGAGTTGCAT
MEK3	CCAGTTGAAGGCTTACGGTGCT	AGAGTCTCGGAGGATGTTGGCT
MEK4	CCTTGCTTCAGGCTTAGTGCCA	GCTTCTCAGGAGCCTTTGCATC
MEK5	CCTTCCAGTTGGAGAGTTCTCG	CGGCATTCCATCATTGAAGTGC
ERK1	TGGCAAGCACTACTGGATCAG	GCAGAGACTGTAGGTAGTTTCGG
ERK2	ACACCAACCTCTCGTACATCGG	TGGCAGTAGGTCTGGTGCTCAA

زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست در شکل ۲ نشان داده شده است. زنده‌مانی سلول‌ها تنها در غلظت‌های بالا بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار کاهش پیدا می‌کند ($P \leq 0.05$). میزان IC50 برای سلول‌های سرطانی ۰/۸۷ $\pm$ ۱۴/۳۹، ۰/۳۴ $\pm$ ۵/۱۹، ۰/۰۸ $\pm$ ۱/۵۵ و ۰/۸۳ $\pm$ ۰/۰۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود. همچنین، میزان IC50 برای سلول‌های فیبروبلاست ۱۴/۲۳ $\pm$ ۳۰۷/۲۶، ۵/۱۱ $\pm$ ۱۶۴/۰۷، ۱/۵۳ $\pm$ ۱۱۳/۵۶ و ۰/۷۷ $\pm$ ۸۵/۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود.

اثر اسپیرولینا بر آپوپتوز سلول‌های سرطان سرویکس

اثر غلظت IC50 اسپیرولینا بر آپوپتوز سلول‌های سرطان سرویکس در شکل ۳ نشان داده شده است. تیمار با اسپیرولینا افزایش معنادار را در آپوپتوز را القا می‌کند ($P \leq 0.05$).

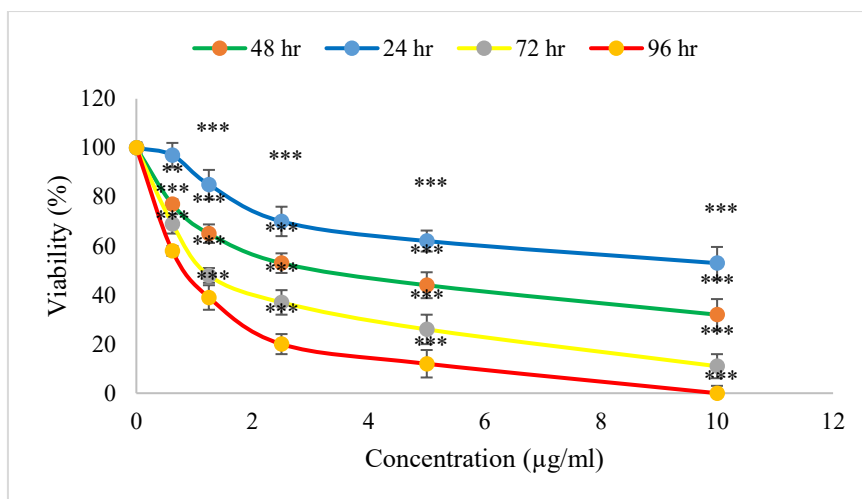
تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها از نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS استفاده شد. سطح معناداری تست‌های آماری درباره همه تست‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شدند. از آزمون T-Test به‌منظور مقایسه میانگین گروه‌ها استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از تست کولموگوروف-اسمیرنوف سنجیده شد.

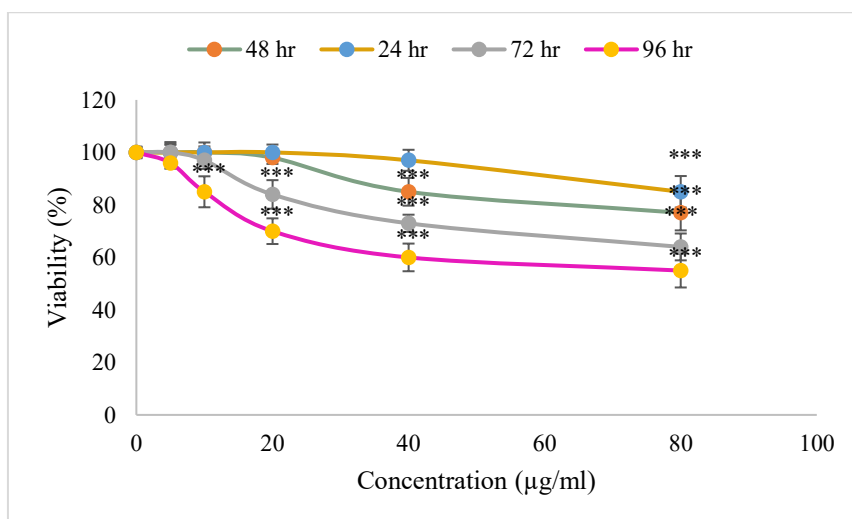
نتایج

اثر اسپیرولینا بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان سرویکس و فیبروبلاست

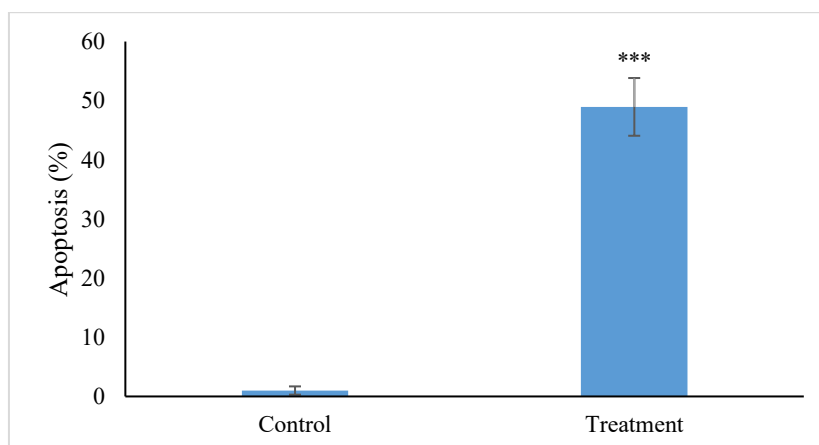
اثر غلظت‌های مختلف اسپیرولینا بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان سرویکس در شکل ۱ نشان داده شده است. زنده‌مانی سلول‌ها به‌صورت وابسته به غلظت بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار کاهش پیدا می‌کند ($P \leq 0.05$). همچنین، اثر غلظت‌های مختلف اسپیرولینا بر



شکل ۱. اثر اسپیرولینا بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان سرویکس (زنده‌مانی با روش MTT بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM. حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. *** نشان‌دهنده $P \leq 0.001$ در مقایسه با کنترل است).



شکل ۲. اثر اسپیرولینا بر زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست (زنده‌مانی با روش MTT بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM. حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. *** نشان‌دهنده $P \leq 0.001$ در مقایسه با کنترل است).



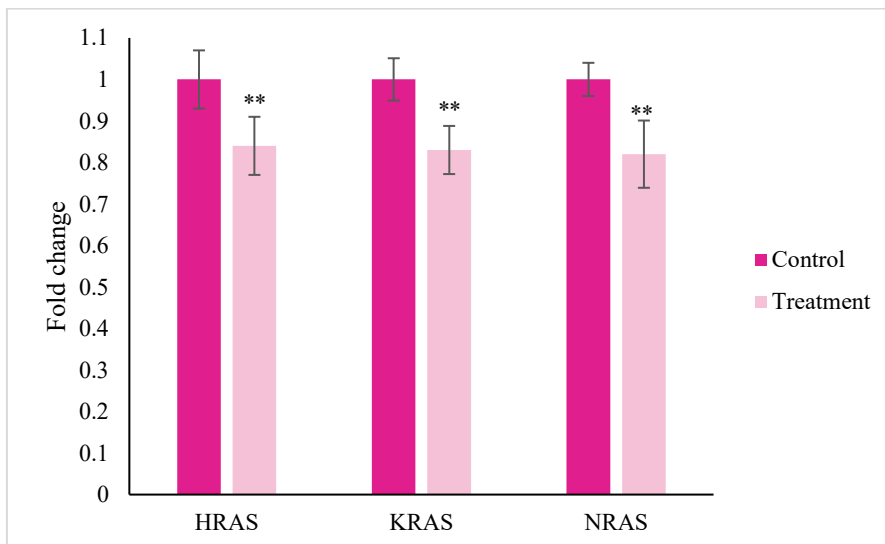
شکل ۳. اثر اسپیرولینا بر آپوپتوز سلول‌های سرطان سرویکس (آپوپتوز با رنگ آمیزی دی فنیل آمین بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM. حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. *** نشان‌دهنده $P \leq 0.001$ در مقایسه با کنترل است).

اثر اسپیرولینا بر بیان ژن‌های مسیر Ras/MAPK (KRAS, and NRAS) سلول‌های سرطان سرویکس در شکل ۴ نشان داده شده است. بیان این ژن‌ها بعد از ۲۴ ساعت تیمار به صورت معنادار

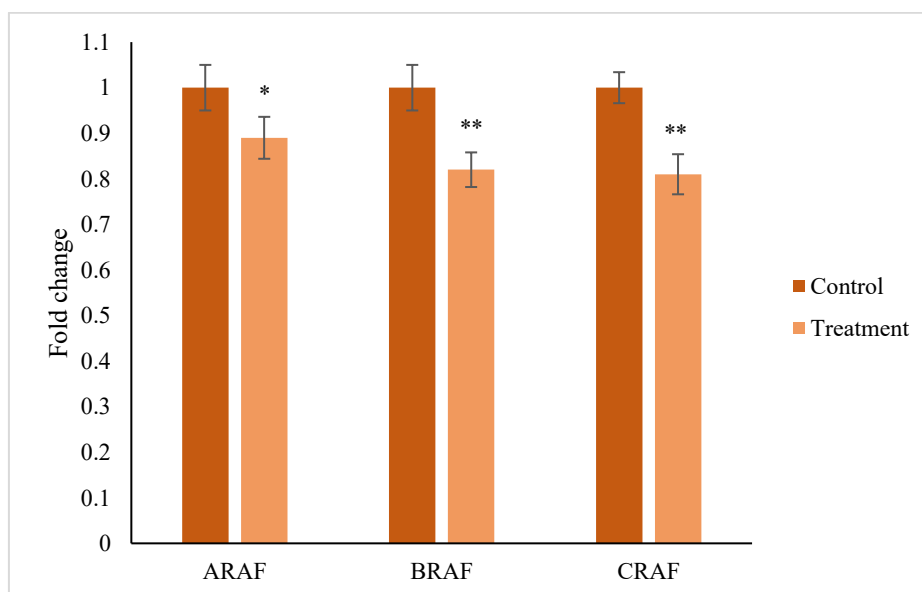
اثر اسپیرولینا بر بیان ژن‌های خانواده Ras (HRAS, Ras) معنادار است. بیان این ژن‌ها بعد از ۲۴ ساعت تیمار به صورت معنادار

کاهش پیدا کرد ($P \leq 0.05$).
 اثر غلظت IC50 اسپیرولینا بر بیان ژن‌های خانواده MEK1, MEK2, MEK3, MEK4 and MEK5) سرویکس در شکل ۶ نشان داده شده است. بیان این ژن‌ها بعد از ۲۴ ساعت تیمار به صورت معنادار کاهش پیدا کرد ($P \leq 0.05$).

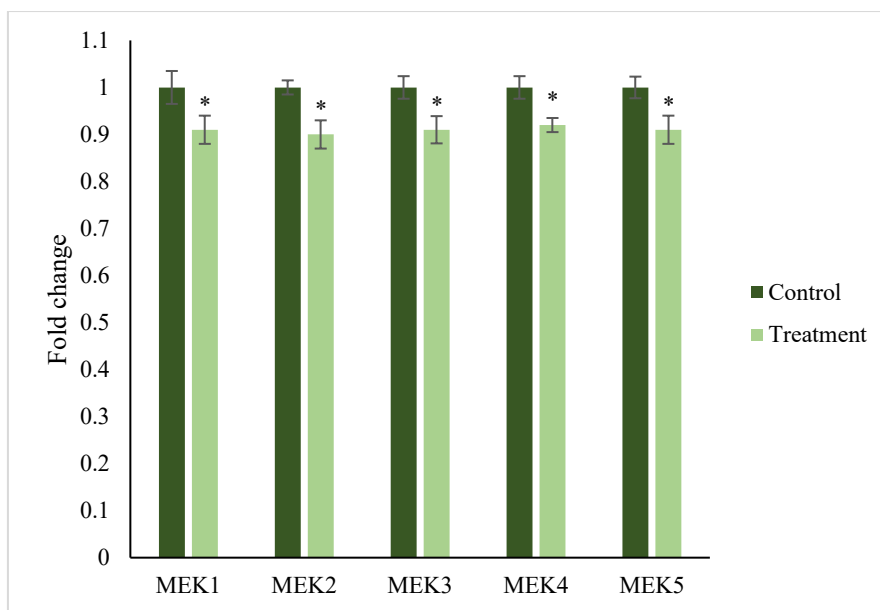
کاهش پیدا کرد ($P \leq 0.05$).
 اثر غلظت IC50 اسپیرولینا بر بیان ژن‌های خانواده ARAF, Raf (BRAF, and CRAF) سلول‌های سرطان سرویکس در شکل ۵ نشان داده شده است. بیان این ژن‌ها بعد از ۲۴ ساعت تیمار به صورت معنادار کاهش پیدا کرد ($P \leq 0.05$).



شکل ۴. اثر اسپیرولینا بر بیان ژن‌های خانواده Ras در سلول‌های سرطان سرویکس (بیان ژن با تکنیک PCR Real-time بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. ** نشان‌دهنده $P \leq 0.01$ در مقایسه با کنترل است).



شکل ۵. اثر اسپیرولینا بر بیان ژن‌های خانواده Raf در سلول‌های سرطان سرویکس (بیان ژن با تکنیک Real-time PCR بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. * نشان‌دهنده $P \leq 0.05$ و ** نشان‌دهنده $P \leq 0.01$ در مقایسه با کنترل هستند).

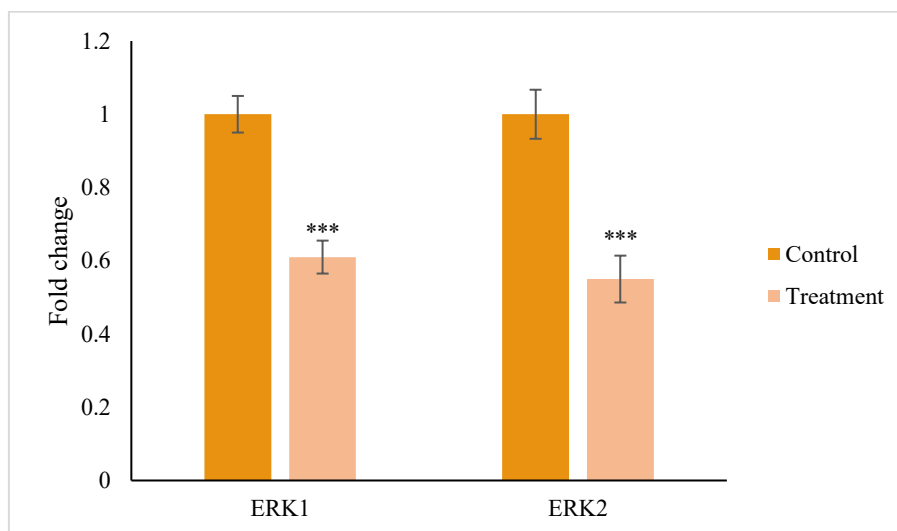


شکل ۶. اثر اسپیرولینا بر بیان ژن‌های خانواده MEK در سلول‌های سرطان سرویکس (بیان ژن با Real-time PCR بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM. حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. * نشان‌دهنده $P \leq 0.05$ در مقایسه با کنترل است).

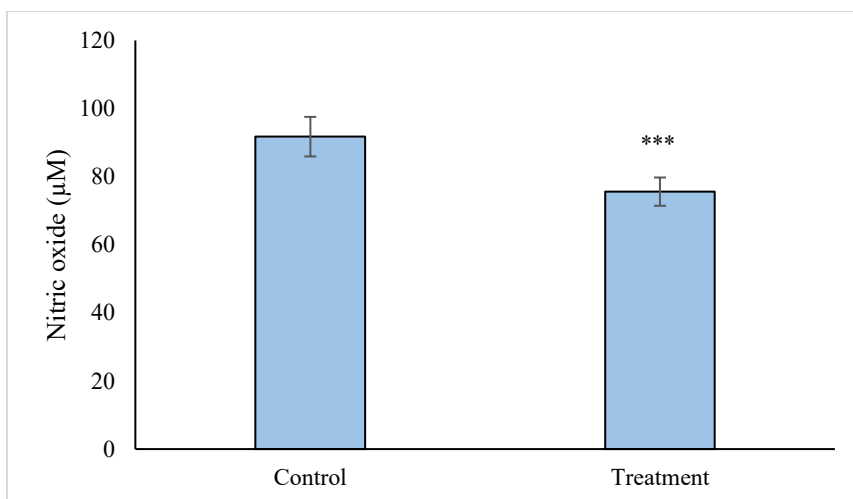
اثر اسپیرولینا بر میزان تولید نیتریک اکساید در سلول‌های سرطان سرویکس

اثر غلظت IC50 اسپیرولینا بر میزان تولید نیتریک اکساید سلول‌های سرطان سرویکس در شکل ۸ نشان داده شده است. میزان این پروتئین بعد از ۲۴ ساعت تیمار به صورت معنادار کاهش پیدا می‌کند ($P \leq 0.05$).

اثر غلظت IC50 اسپیرولینا بر بیان ژن‌های ERK1 و ERK2 سلول‌های سرطان سرویکس در شکل ۷ نشان داده شده است. بیان این ژن‌ها بعد از ۲۴ ساعت تیمار به صورت معنادار کاهش پیدا کرد ($P \leq 0.05$).



شکل ۷. اثر اسپیرولینا بر بیان ژن ERK1 و ERK2 در سلول‌های سرطان سرویکس (بیان ژن با تکنیک Real-time PCR بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM. حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. *** نشان‌دهنده $P \leq 0.001$ در مقایسه با کنترل است).



شکل ۸. اثر اسپیرولینا بر میزان تولید نیتریک اکساید در سلول‌های سرطان سرویکس (غلظت نیتریک اکساید با روش گریس بررسی شده است. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM. حاصل از سه آزمایش مستقل هستند. *** نشان دهنده $P \leq 0.001$ در مقایسه با کنترل است.)

MAX وارد شد و ناقل نوترکیب pALTER-MAX-CD59 با موفقیت ساخته شد. با استفاده از روش ترانسفکشن با واسطه لیپوزوم کاتیونی پلاسمید نوترکیب pALTER-MAX-CD59 و نشانگر انتخابی pCDNA به سلول‌های HeLa و سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) همترانسفکشن شدند. کلون‌های سلولی مثبت پایدار مرتب شده و با کنسانتره‌های مختلف PC دفع شدند. بیان پروتئین CD59 با هیبریداسیون درجا، ایمونوفلورسانس و سنجش ایمونوسورینت متصل به آنزیم (ELISA) تعیین شد. افزون‌براین، تأثیر PC بر تکثیر سلول‌های HeLa با روش MTT و بیان پروتئین Fas به روش ایمونوهیستوشیمی تعیین شد. نتایج نشان داد که PC می‌تواند بیان پروتئین CD59 را در سلول‌های HeLa تقویت کند، از تکثیر سلول‌های HeLa جلوگیری کند و افزون‌براین، یک اثر دوز بین آن‌ها پیدا شد. یعنی با افزایش غلظت PC، بیان پروتئین CD59 و پروتئین Fas القاکننده آپوپتوز افزایش یافت و فعالیت تکثیر سلول‌های HeLa کاهش یافت، درحالی‌که PC بر بیان پروتئین CD59 و Fas و تولیدمثل سلول‌های CHO طبیعی هیچ تأثیری نداشت [۲۴].

همچنین، نتایج ما نشان‌دهنده توانایی القای آپوپتوز اسپیرولینا بود. دراین‌باره نشان داده شده است که فیکوسیانین خالص‌شده از *Spirulina platensis* قادر است از تکثیر سلولی MDA-MB-231 سرطان پستان جلوگیری کرده و توانایی تشکیل کلونی سلول‌های MDA-MB-231 را کاهش دهد. افزون‌براین، فیکوسیانین باعث توقف چرخه سلولی G0/G1 با کاهش سطح بیان پروتئین Cyclin D1 و CDK-2 و افزایش سطح بیان پروتئین p21 و p27 شد. افزون‌براین، فیکوسیانین با فعال کردن مسیر گیرنده مرگ سطح غشای سلولی باعث آپوپتوز سلولی شد. ازطرفی، فیکوسیانین سطوح بیان پروتئین سیکلواکسیژناز-۲ را کاهش داده و منجر به افزایش مهار مهاجرت سلول‌های MDA-MB-231 شد [۲۵]. آپوپتوز القا شده در این مطالعه تأییدکننده نتایج مطالعه حاضر است.

همچنین، مطالعه ما نشان داد که اسپیرولینا از طریق مهار مسیر سیگنالینگ Ras-Raf-MEK-ERK قادر به کاهش تکثیر و القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی شد. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که مرگ سلولی

بحث

طی هزاران سال طبیعت منبعی از محصولات دارویی بوده است که توانسته برای درمان بیماری‌های انسانی از قبیل انواع سرطان‌ها استفاده شود. درمان‌های رایج سرطان شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی است که در اغلب موارد سلول‌های سالم را نیز از بین می‌برد و این می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. در سال‌های اخیر، به‌علت افزایش شیوع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود [۲۲ و ۲۳]. ایجاد تعادل بین اثرات درمانی و سمی یک ترکیب پارامتر مهمی است که توانایی و کاربرد داروهای جدید را مشخص می‌کند. به‌عبارت‌دیگر، در طراحی یک داروی مفید و کاربردی باید توجه شود که ویژگی‌های سمی (توکسولوژیکال) و دارویی (فارماکولوژیکال) با یکدیگر تداخل نداشته باشند.

نتایج ما نشان داد که اسپیرولینا دارای اثر سیتوتوکسیک بر رده سلولی سرطان سرویکس است. هرچند که اسپیرولینا نیز مانند بسیاری از داروهای ضد سرطان بر سلول‌های طبیعی انسان هم اثر می‌گذارد، اما یافتن دوزی که تنها بر سلول‌های سرطانی تأثیرگذار باشد، اهمیت بالایی دارد. درواقع، می‌توان با بهینه‌سازی دوز اثرات احتمالی توکسیسیته بر سلول‌های طبیعی را کاهش داد و درعین‌حال با اختصاصیت بالاتری باعث مهار و از بین رفتن سلول‌های سرطانی شد. در این مطالعه، برای اولین بار اثر سیتوتوکسیک اسپیرولینا بر رده سلولی سرطان سرویکس بررسی شد. همچنین، نتایج ما نشان داد مقدار IC50 اسپیرولینا برای سلول‌های غیرسرطانی فیبربلاست بسیار بالاتر از سلول‌های سرطانی بود و تنها در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلول‌های فیبربلاست شد.

اثر تنظیمی فیکوسیانین (PC) از *Spirulina platensis* بر بیان ژن تمایز ۵۹ (CD59) سلول‌های HeLa و مکانیسم ضد تومور PC قبلاً بررسی شده است. PC با کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون هیدروکسیل آپاتیت خالص شد. وزن مولکولی PC با الکتروفورز SDS-PAGE تعیین شد. cDNA CD59 در پلاسمید بیان یوکاریوتی pALTER-

DNA با دامیناسیون، شکستن رشته یا اصلاح DNA شده و مانع آپتوز می‌شود. تولید نیتریک‌اکساید در سرطان پروستات، آدنوکارسینوم کولون، سرطان سینه، سرطان ملانوم، کارسینوم مری، کارسینوم سلول سنگفرشی دهانه رحم، آدنوکارسینوم معده، کارسینوم سلول شفاف کلیه و کارسینوم سلول سنگفرشی ریه گزارش شده است [۳۳]. داده‌های ما کاهش تولید نیتریک‌اکساید را بعد از تیمار با اسپیرولینا در سلول‌های سرطان سرویکس نشان داد. سطح بالای نیتریک‌اکساید یک هدف بالقوه برای درمان در مراحل پیشرفته سرطان است. سرطان سرویکس بدون شک قابل درمان‌ترین سرطان است، که در آن نیتریک‌اکساید نقش مهمی در پیشرفت سرطان ایفا می‌کند و می‌تواند به‌طور مؤثر با اسپیرولینا، یک محصول طبیعی به‌مثابه یک درمان کمکی همراه با داروها و رژیم درمانی معمول درمان شود. افزون بر خواص ضدسرطانی ذکرشده، اسپیرولینا دارای ارزش غذایی بالایی است. در یک مطالعه مقطعی در کودکان (۶ ماه تا ۶ سال)، بهبود وضعیت آنتروپومتریک (کوتاهی، کاهش وزن و کمبود وزن) میان افرادی که اسپیرولینا را بر طبق مقدار توصیه‌شده در طول دوره مداخله مصرف کردند، مشاهده شد [۳۴].

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های مطالعه حاضر، می‌توان توصیه کرد که اسپیرولینا احتمالاً از طریق تحریک آپتوز دارای اثرات ضدسرطانی باشد. این یافته برای شناسایی سایر عوامل شیمی‌درمانی ارزشمند است. با این حال، مطالعات پیش‌بالینی بیشتر با مدل‌های حیوانی مناسب مورد نیاز است. افزون‌براین، قبل از آزمایش بالینی این ماده به‌مثابه یک عامل پیشگیری‌کننده از سرطان یا یک عامل درمانی، هنگام طراحی مطالعات فارماکوکینتیک باید احتیاط خاصی صورت گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه بهارک پروانه‌وار، دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد طرح پژوهشی ۴۰۳۰۱۷۱ و کد اخلاق ۱۴۰۳۰۴۳ IR.KUMS.MED.REC. است. نویسندگان مقاله از تمامی عزیزانی که در اجرای این پژوهش همکاری کرده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را می‌کنند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام کرده‌اند که در این مقاله هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله دارای کد اخلاق 1403.043 IR.KUMS.MED.REC. از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.

ناشی از C-phycoyanin از طریق مسیرهای سیگنالینگ MAPK انجام شده است. C-Phycocyanin قادر به القای آپتوز سلولی MDA-MB-231 با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ MAPK p38 و JNK بود و در عین حال مسیر ERK را مهار می‌کرد [۲۵].

نشان داده شده است که محصولات طبیعی باعث آغاز آپتوز در رده‌های سلولی می‌شوند که قبلاً به درمان‌های معمولی مقاوم بودند [۲۶-۲۸]. اما اکثر این آزمایش‌ها متمرکز بر رده سلولی و مدل‌های چوندگان بوده است و تحقیقات بالینی بیشتر در این باره ضروری است [۲۹].

از زمانی که اولین مهارکننده کیناز در دهه ۱۹۸۰ ساخته شد، بیش از ۴۰ مهارکننده کیناز توسط FDA برای درمان سلول‌های بدخیم مانند سلول‌های سرطان ریه و سینه تأیید شده است. افزون‌براین، حدود ۱۵۰ داروی هدفمند کیناز در آزمایش‌های بالینی وجود دارند و تحقیقات پیش‌بالینی نیز بر مهارکننده‌های اختصاصی کیناز متعددی در حال انجام است [۳۰]. علی‌رغم فعالیت‌های ضد توموری امیدوارکننده و بهبود بقا که با مهارکننده‌های دارای مجوز MEK، RAF و ERK به دست آمده است؛ مقاومت دارویی محدودیت اصلی توسعه مهارکننده‌های مسیر MAPK جدید است. فرایندهای زیربنایی که اغلب با بی‌ثباتی ژنومی و ناهمگنی سرطان همراه هستند، تا حد زیادی با شروع جبرانی جزء بالادستی مرتبط هستند. تحقیقات بیشتر درباره مسیر MAPK منجر به این فرضیه شده است که کیناز پایین دست ERK را هدف قرار می‌دهد و همچنین ترکیب مهار ERK با مهار MEK و RAF ممکن است سودمند باشد [۳۰].

B-Raf میان چند مهارکننده سرین / ترئونین کیناز کاربرد درمانی دارد. این مهارکننده‌های سرین / ترئونین کیناز برای استفاده درمانی در حال بررسی هستند [۳۱]. تأکید در درجه اول بر محصولات طبیعی ساخته‌شده از منابع گیاهی، به‌ویژه فلاونوئیدها است. CDK ها همچنین با استفاده از مواد شیمیایی طبیعی مشتق‌شده از منابعی غیر از گیاهان، مانند موجودات دریایی، هدف قرار گرفته‌اند. میکروارگانیزم‌های جدیدی که می‌توانند در شرایط محیطی شدید به نام «اکستروموفیل» زنده بمانند، چشم‌انداز جدیدی را در صنعت بیوتکنولوژی / داروسازی با پتانسیل درمانی ضد سرطان با مسدود کردن چرخه سلولی باز کرده‌اند. آن‌ها همچنین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند. مشاهده شده است که بیشتر میکروارگانیزم‌های اکستروموفیل نسبت به اشعه ماوراء بنفش مقاومت بیشتری دارند و می‌توان از آن‌ها برای تولید داروهای ضد سرطان استفاده کرد [۳۲]. این ممکن است منبع جدیدی برای توسعه مهارکننده‌های قوی‌تر کیناز باشد.

نیتریک‌اکساید یک مولکول سیگنال‌دهی کوتاه‌مدت درون‌زا است که در التهاب، تشکیل تومور و متاستاز نقش دارد. نیتریک‌اکساید مانند رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند و در سیستم‌های بیولوژیکی بسیار واکنش‌پذیر است و با دیگر رادیکال‌های آزاد یا اکسیژن مولکولی برای تولید گونه‌های اکسیژن فعال در تعامل است. شناخته شده است که نیتریک‌اکساید مانع تکثیر سلولی می‌شود و همچنین منجر به آسیب

References

- Sofiani VH, Veisi P, Rukerd MR, Ghazi R, Nakhaie M. The complexity of human papilloma virus in cancers: a narrative review. *Infect Agent Cancer*. 2023;18(1):13. [DOI: 10.1186/s13027-023-00488-w] [PMID: 36843070]
- Okayama K, Kimura H, Teruya K, Ishii Y, Fujita K, Fujii M, et al. Correlation between human papillomavirus codetection profiles and cervical intraepithelial neoplasia in Japanese women. *Microorganisms*. 2020;8(12):1863. [DOI: 10.3390/micro8121863]

- 10.3390/microorganisms8121863] [PMID: 33255811]
3. Torode J, Kithaka B, Chowdhury R, Simelela N, Cruz JL, Tsu VD. National action towards a world free of cervical cancer for all women. *Prev Med*. 2021;76(11):675-7. [DOI: 10.1016/j.ypmed.2020.106313] [PMID: 33678227]
4. Hosseini S, Shahbazadeh S, Khosravi-Darani K, Mozafari M. *Spirulina platensis*: food and function. *Curr Nutr Food Sci*. 2013;9(3):189-93. [DOI: 10.2174/1573401311309030003]
5. Parvin M, Habib MA, Huntington T, Hasan MR. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals. *Aquaculture*. 2008;33. [Link]
6. Li B, Zhang X, Gao M, Chu X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(10):551-60. [DOI: 10.1016/j.biopha.2005.06.012] [PMID: 16271846]
7. Jiang L, Wang Y, Liu G, Liu H, Zhu F, Ji H, et al. C-Phycocyanin exerts anticancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. *Cancer Cell Int*. 2018;18: 12. [DOI: 10.1186/s12935-018-0511-5] [PMID: 29416441]
8. Jiang L, Wang Y, Yin Q, Liu G, Liu H, Huang Y, Li B. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *J Cancer*. 2017;8(17):3416-3429. [DOI: 10.7150/jca.21058] [PMID: 29151925]
9. Small E. *Spirulina* – food for the universe. *Biodiversity*. 2011; 12(4):255-65. [DOI: 10.1080/14888386.2011.642735]
10. Lu J, Ren DF, Xue YL, Sawano Y, Miyakawa T, Tanokura M. Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. *J Agric Food Chem*. 2010;58(12):7166-71. [DOI: 10.1021/jf100193f] [PMID: 20509691]
11. Deng R, Chow TJ. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovasc Ther*. 2010;28(4):e33-45. [DOI: 10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x] [PMID: 20633020]
12. Hwang JH, Lee IT, Jeng KC, Wang MF, Hou RC, Wu SM, Chan YC. *Spirulina* prevents memory dysfunction, reduces oxidative stress damage and augments antioxidant activity in senescence-accelerated mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2011;57(2):186-91. [DOI: 10.3177/jnsv.57.186] [PMID: 21697639]
13. Cingi C, Conk-Dalay M, Cakli H, Bal C. The effects of spirulina on allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008;265(10):1219-23. [DOI: 10.1007/s00405-008-0642-8] [PMID: 18343939]
14. Gemma C, Mesches MH, Sepesi B, Choo K, Holmes DB, Bickford PC. Diets enriched in foods with high antioxidant activity reverse age-induced decreases in cerebellar beta-adrenergic function and increases in proinflammatory cytokines. *J Neurosci*. 2002;22(14):6114-20. [DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-14-06114.2002] [PMID: 12122072]
15. Rechter S, König T, Auerochs S, Thulke S, Walter H, Dörnenburg H, et al. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Res*. 2006;72(3):197-206. [DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.06.004] [PMID: 16884788]
16. Hayashi T, Hayashi K, Maeda M, Kojima I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J Nat Prod*. 1996;59(1):83-7. [DOI: 10.1021/np960017o] [PMID: 8984158]
17. El-Baz FK, El-Senousy WM, El-Sayed AB, Kamel MM. In vitro antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. *J Appl Pharm Sci*. 2013;3(12):52-6. [DOI: 10.7324/JAPS.2013.31209]
18. Mendiola JA, Jaime L, Santoyo S, Reglero G, Cifuentes A, Ibañez E, et al. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chem*. 2007;102(4):1357-67. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.06.068]
19. Chen SH, Chang JY. New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17):4136. [DOI: 10.3390/ijms20174136] [PMID: 31450627]
20. Matsuo Y. Natural Products and Cancer. *Nutrients*. 2023;15(24):5064. [DOI: 10.3390/nu15245064] [PMID: 38140322]
21. Taghadosi M, Pazhouhi M, Shahveisi K, Khani-hematabadi F, Khalvandi Z, Jalili C. Effect of Hydroalcoholic Extract of *Prosopis Farcta* Fruit on the Toxicity Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cell Line In Vitro. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2024;16(1):44-53. [DOI: 10.32592/nkums.16.1.44]
22. Liu X, Jiang H, Wang X. Advances in Cancer Research: Current and Future Diagnostic and Therapeutic Strategies. *Biosensors*. 2024;14(2):100. [DOI: 10.3390/bios14020100] [PMID: 38392019]
23. Garcia-Carbonero R, Supko JG. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clin Cancer Res*. 2002;8(3):641-61. [PMID: 11895891]
24. Li B, Zhang X, Gao M, Chu X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(10):551-60. [DOI: 10.1016/j.biopha.2005.06.012] [PMID: 16271846]
25. Jiang L, Wang Y, Liu G, Liu H, Zhu F, Ji H, Li B. C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. *Cancer Cell Int*. 2018;18:12. [DOI: 10.1186/s12935-018-0511-5] [PMID: 29416441]
26. Rajabi S, Maresca M, Yumashev AV, Chooapani R, Hajimehdipoor H. The Most Competent Plant-Derived Natural Products for Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. *Biomolecules*. 2021;11(4):534. [DOI: 10.3390/biom11040534] [PMID: 33916780]
27. Sharifi-Rad J, Kamiloglu S, Yeskalyeva B, Beyatli A, Alfred MA, Salehi B, Calina D, Docea AO, Imran M, Anil Kumar NV, Romero-Román ME, Maroyi A, Martorell M. Pharmacological Activities of Psoralidin: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms of Action. *Front Pharmacol*. 2020;11:571459. [DOI: 10.3389/fphar.2020.571459] [PMID: 33192514]
28. Baba Y, Kato Y. Deguelin, a novel anti-tumorigenic agent in human esophageal squamous cell carcinoma. *EBioMedicine*. 2017;26:10. [DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.11.010] [PMID: 29157837]
29. Ma C, Peng Y, Li H, Chen W. Organ-on-a-chip: a new paradigm for drug development. *Trends Pharmacol Sci*. 2021;42(2):119-33. [DOI: 10.1016/j.tips.2020.11.009] [PMID: 33341248]
30. Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacol Res*. 2021;165: 105463. [DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105463] [PMID: 33513356]
31. Alqathama A. BRAF in malignant melanoma progression and metastasis: potentials and challenges. *Am J Cancer Res*. 2020;10(4):1103-1114. [PMID: 32368388]
32. Gabani P, Singh OV. Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(3):993-1004. [DOI: 10.1007/s00253-012-4642-7] [PMID: 23271672]
33. Pasha A, Kumbhakar DV, Doneti R, Kumar K, Dharmapuri G, Poleboyina PK, et al. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) by Andrographolide and In Vitro Evaluation of Its Antiproliferative and Proapoptotic Effects on Cervical Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021(1):6692628. [DOI: 10.1155/2021/6692628] [PMID: 33815659]
34. Kashyap GC, Sarala R, Manjunath U. Impact of *Spirulina Chikki* Supplementation on Nutritional Status of Children: An Intervention Study in Tumkur District of Karnataka, India. *Front Pediatr*. 2022;10:860789. [DOI: 10.3389/fped.2022.860789] [PMID: 35498815]