Selective Toxicity of n-Hexane Extract of Black Soldier Fly Larvae on Mitochondria Isolated from Hepatocytes in an Animal Model of Hepatocellular Carcinoma

Tahereh Zarei Taher [1,2], Yalda Arast[3]

1. Student Research Committee, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
2. Ph.D. Candidate, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3428-0835
3. Research Center of Environmental Pollutants, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran., (Corresponding Author), Tel: 09129176907, Email: arast.92@gmail.com.ORCID ID: 0000-0001-5147-0158

ABSTRACT

Background and Aim: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant liver tumor, ranking as the fifth most prevalent cancer and the third leading cause of cancer-related mortality worldwide. Drug resistance and adverse side effects underscore the need for novel therapeutic strategies derived from natural sources with selective toxicity. Mitochondria, owing to their pivotal roles in apoptosis and cellular metabolism, represent a promising target in cancer therapy. The black soldier fly (Hermetia illucens) larval extract, rich in bioactive compounds such as fatty acids, exhibits potential anticancer properties. This study aimed to investigate the cytotoxic effects of black soldier fly larval extract on mitochondria isolated from hepatocytes of an animal model of hepatocellular carcinoma.

Materials and Methods: In this experimental study, an HCC animal model was established by subcutaneously injecting hepatic cancer cells into BALB/c mice. Liver mitochondria were isolated from both tumor-bearing and control animals. The IC50 of the larval extract was determined using the MTT assay. Mitochondria were then treated with hexane larval extract at concentrations of 1600, 3200, and 6400 µg/mL. Key mitochondrial parameters, including reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial membrane potential (MMP), mitochondrial swelling, cytochrome c release, and apoptosis, were assessed.

Results: The results demonstrated that various concentrations of the black soldier fly larval extract significantly induced ROS generation, mitochondrial swelling, MMP depolarization, cytochrome c release, and mitochondrial apoptosis in mitochondria isolated from HCC hepatocytes in a time- and dose-dependent manner. In contrast, no significant alterations in these parameters were observed in mitochondria from control (non-tumor) hepatocytes.

Conclusion: These findings suggest that bioactive compounds in black soldier fly larvae extract exert selective cytotoxic effects on HCC cells by disrupting mitochondrial function and triggering apoptosis, highlighting their potential as a natural anticancer agent. Nevertheless, further investigations, including molecular characterization, in vivo validation studies, and clinical trials, are required to confirm its therapeutic efficacy and safety.

Keywords: Apoptosis, Black Soldier Fly Larva, Hepatocellular Carcinoma, Mitochondria, Oxidative Stress, Reactive Oxygen Species

Received: Nov 11, 2025 **Accepted:** Feb 14, 2026

How to cite the article: Zarei Taher T, Arast Y. Selective Toxicity of n-Hexane Extract of Black Soldier Fly Larvae on Mitochondria Isolated from Hepatocytes in an Animal Model of Hepatocellular Carcinoma. SJKU 2026;30(6):16-29.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

سمیت انتخابی عصارهٔ اِن هگزانی لارو مگس سرباز سیاه بر روی میتوکندری‌های جداشده از هپاتوسیت‌های کبد مدل حیوانی هپاتوسلولار کارسینوما

طاهره زارعی طاهر[۱،۲]، یلدا ارست[۳]

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

۲.دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بافت و علوم کاربردی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

کد ارکید:۰۸۳۵-۳۴۲۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. مرکز تحقیقات آلاینده های محیطی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.، (نویسنده مسئول)،پست الکترونیک: arast.92@gmail.com, شماره تماس: ۰۹۱۲۹۱۷۶۹۰۷، کد ارکید: ۰۱۵۸-۵۱۴۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) شایع‌ترین تومور بدخیم اولیهٔ کبد است که به‌عنوان پنجمین سرطان شایع و سومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان شناخته می‌شود. مقاومت دارویی و عوارض جانبی نیاز به توسعهٔ درمان‌های جدید با منشأ طبیعی و سمیت انتخابی را برجسته کرده است. میتوکندری‌ها، به‌دلیل نقش کلیدی در آپوپتوز و متابولیسم سلولی، هدف مهمی در درمان سرطان هستند. عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه به‌دلیل داشتن ترکیبات زیست‌فعال ارزشمند، مانند اسیدهای چرب، قابلیت ضدسرطانی دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر سمیت عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه بر میتوکندری‌های ایزوله‌شده از هپاتوسیت‌های مدل حیوانی هپاتوسلولار کارسینوما انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ آزمایشگاهی، مدل حیوانی HCC با تزریق زیرجلدی سلول‌های سرطانی کبد در موش سوری ایجاد شد. میتوکندری‌ها از بافت کبد استخراج و ایزوله شدند. میزان IC50 عصارهٔ لارو با آزمون MTT ارزیابی شد. پس از تیمار با غلظت‌های ۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، عصارهٔ اِن هگزانی لارو، میزان تولید ROS، پتانسیل غشای میتوکندری، تورم میتوکندریایی، آزادسازی سیتوکروم سی و آپوپتوز بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تیمار با غلظت‌های مختلف عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه، به‌صورت وابسته به زمان و غلظت، باعث افزایش معنی‌دار تولید گونه‌های فعال اکسیژن، تورم میتوکندری، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری، آزادسازی سیتوکروم c و القای آپوپتوز، فقط در میتوکندری‌های جداشده از سلول‌های HCC شد. در پارامترهای ذکرشده در میتوکندری سلول‌های کبدی کنترل، هیچ تغییر قابل‌توجهی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه می‌توانند با آثار سیتوتوکسیک انتخابی و اختلال در عملکرد میتوکندری‌های سلول‌های HCC و همچنین القای آپوپتوز، به‌عنوان ترکیب ضدسرطانی بالقوه مورد توجه قرار گیرند. بااین‌حال، به مطالعات بیشتری، ازجمله آزمایش‌های شناسایی مولکولی، آزمایش‌های تأییدی درون‌تنی و آزمایش‌های بالینی نیاز است.

کلمات کلیدی: لارو مگس سرباز سیاه، گونه‌های فعال اکسیژن، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز، میتوکندری، هپاتوسلولار کارسینوما

وصول مقاله:۱۴۰۴/۰۸/۲۰ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۴/۱۰/۱۶پذیرش:۱۴۰۴/۱۱/۲۵

مقدمه

سرطان کبد همچنان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌آید. هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) شایع‌ترین نوع سرطان کبد است (۱). از مهم‌ترین عوامل ایجاد هپاتوسلولار کارسینوما قرارگرفتن در معرض مواد شیمیایی سرطان‌زا، شامل مواد شیمیایی سمی صنعتی و آلاینده‌ها و آلودگی محیط زیست، عفونت‌های ویروسی و هپاتیت، بیماری کبد چرب غیرالکلی و افزودنی‌های غذایی است (۲، ۳). شیوع روبه‌رشد این بیماری در کنار عوارض جانبی قابل‌توجه و مقاومت دارویی، که اغلب با درمان‌های مرسوم همچون شیمی درمانی همراه است، نیاز فزاینده‌ای به شناسایی عوامل درمانی جدید با مکانیسم عمل انتخابی و پروفایل سمیت مطلوب ایجاد کرده است (۴). در این زمینه، هدف‌گیری اختصاصی میتوکندری به‌عنوان مرکز کنترل آپوپتوز و هومئوستاز انرژی سلول، راهبرد امیدوارکننده‌ای در اکتشاف داروهای ضدسرطان محسوب می‌شود (۵). اختلال در یکپارچگی و عملکرد میتوکندری می‌تواند آبشاری از رویدادهای پیش‌آپوپتوزی، ازجمله افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندری، تورم و آزادسازی فاکتورهای پیش‌آپوپتوزی مانند سیتوکروم c را به راه اندازد (۶).

در دهه‌های اخیر، ترکیبات طبیعی مشتق‌شده از منابع زیستی متنوع به‌دلیل تنوع ساختاری، سمیت نسبی کمتر و سازگاری زیستی بهتر، کانون توجه تحقیقات ضدسرطانی بوده‌اند (۲). در میان این منابع، حشرات به‌عنوان ذخایر غنی از متابولیت‌های ثانویه با خواص زیست‌فعال نویدبخش، بررسی شده‌اند. لارو مگس سرباز سیاه نوعی حشرهٔ دوستدار محیط زیست است که می‌تواند از زباله‌های آلی تغذیه کند و با تبدیل این ترکیبات به مواد مغذی ارزشمند، به یاری پاکسازی محیط زیست بیاید. لارو مگس سرباز سیاه (Hermetia illucens) به‌ویژه به‌دلیل محتوای قابل‌توجه از لیپیدها (شامل اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع مانند لوریک، پالمیتیک و لینولئیک اسید)، پروتئین‌های باکیفیت و پلی‌ساکاریدهایی مانند کیتین و کیتوسان شناخته شده است (۷). مطالعات مقدماتی نشان داده‌اند که عصاره‌های مختلف این لارو، همانند عصارهٔ برخی حشرات دیگر مانند سوسک زرد (Tenebrio molitor) و همچنین مگس سرباز سیاه (Hermetia illucens) می‌توانند رشد برخی رده‌های سلولی سرطانی را مهار و آپوپتوز را القا کنند (۷، ۸). این آثار به فعال‌سازی کاسپازها، توقف چرخهٔ سلولی و افزایش استرس اکسیداتیو نسبت داده شده‌اند. بااین‌حال، شکاف دانشی مهمی در این زمینه وجود دارد؛ مکانیسم عمل دقیق این عصاره‌ها در سطح مولکولی، به‌ویژه تأثیر مستقیم و اولیهٔ ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها در عملکرد میتوکندری‌های ایزوله‌شده از سلول‌های سرطانی، به‌طور نظام‌مند بررسی نشده است. مشخص نیست که آیا آثار سیتوتوکسیک گزارش‌شده ناشی از یک اختلال اولیه در میتوکندری است یا پیامدی ثانویه از آسیب دیگر اجزای سلولی.

برای بررسی دقیق‌تر این رابطه، در مطالعهٔ حاضر از عصارهٔ nهگزانی لارو مگس سرباز سیاه استفاده شد. انتخاب حلال nهگزان با هدف استخراج انتخابی ترکیبات لیپوفیل (به‌ویژه اسیدهای چرب) صورت گرفت که به‌دلیل ماهیت هیدروفوبیک، پتانسیل نفوذ به غشای دولایهٔ لیپیدی میتوکندری و ایجاد اختلال مستقیم در یکپارچگی و عملکرد آن را دارند (۹). این رویکرد، ارزیابی بی‌واسطه و مستقیم اثر عصاره را در میتوکندری‌های ایزوله، مستقل از تأثیرات احتمالی در سایر سیگنال‌های سلولی یا اندامک‌ها، ممکن می‌کند.

بر پایهٔ دانش موجود و شکاف‌های شناسایی‌شده، این مطالعهٔ آزمایشگاهی با هدف بررسی اثر سمیت انتخابی عصارهٔ n هگزانی لارو مگس سرباز سیاه در شاخص‌های کلیدی عملکرد میتوکندری‌های ایزوله‌شده از هپاتوسیت‌های

موش‌های مدل HCC، شامل تولیدROS ، پتانسیل غشای میتوکندری، تورم و آزادسازی سیتوکروم c و القای آپوپتوز انجام شد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند درک مکانیستی عمیق‌تری از نحوهٔ تعامل ترکیبات زیست‌فعال این عصاره با میتوکندری سلول‌های سرطانی فراهم کند و در جهت توسعهٔ درمان‌های نوین مبتنی‌بر ترکیبات طبیعی گامی مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

ترکیبات شیمیایی و معرف‌ها

۲،۷-دی‌کلروفلورسین دی‌استات (DCHF-DA) و رودامین ۱۲۳ (Rh 123) از شرکت شیمیایی سیگما-آلدریچ خریده شدند. علاوه‌بر این، کیت سنجش آزادسازی سیتوکروم c از شرکت R&D Systems, Inc. (مینیاپولیس، مینه‌سوتا، ایالات متحده آمریکا) خریده شد. تمام حلال‌های استخراج دارای درجهٔ تجزیه‌ای بودند و از مرک آلمان خریده شدند. ۲-متیل‌اکسولان، که با نام ۲-متیل تتراهیدروفوران نیز شناخته می‌شود، از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شد. استانداردها، شامل مخلوط Supelco 37 FAME، DL-α- پالمیتین، گلیسریل ۱،۳-دی‌پالمیتات، گلیسریل تری‌پالمیتات، اسید پالمیتیک و مخلوط فسفولیپید، از شرکت سیگما-آلدریچ خریده شد.

آماده‌سازی عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه

عصارهٔ لاروهای مگس سرباز سیاه از محصولات فناورانهٔ دانشگاه علوم پزشکی قم تهیه شد. لاروها با آب مقطر استریل حداقل سه بار شسته شدند. سپس در آون با دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. پس از خشک‌شدن کامل، لاروها تاحد پودر نرم با آسیاب برقی خرد شدند. وزن دقیق پودر اندازه‌گیری و ثبت شد. مقدار ۲۵ گرم پودر لارو مگس سرباز سیاه در انگشتانهٔ سلولزی قرار داده شد و به‌مدت شش ساعت با ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال‌های اِن‌هگزان و ۲-MeO تحت استخراج کامل سوکسله قرار گرفت. برای دستیابی به حذف کامل چربی، رفلاکس هر دو ساعت به‌طور موقت متوقف و نمونهٔ داخل انگشتانه به‌طور کامل مخلوط شد تا نفوذ تسهیل شود و تجمع در ماتریس کاهش یابد. حلال‌ها پس از شش تا هفت ساعت جمع‌آوری شدند تا چرخه‌های استخراج تقریباً مشابهی ایجاد شود و سپس تحت فشار کاهش‌یافته تبخیر شدند. استخراج‌ها در سه بار تکرار انجام شد (۱۰).

مطالعات حیوانی

در این مطالعهٔ آزمایشگاهی، مدل حیوانی هپاتوسلولار کارسینوما از مرکز مطالعات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی قم تهیه شد. به‌منظور تهیهٔ این مدل سرطانی (HCC)، از تعداد بیست سر موش سوری نر بالغ نژاد BALB/c محدودهٔ سنی شش تا هشت هفته و میانگین وزنی ۲۰ تا ۲۵ گرم استفاده شده است. القای تومور در حیوانات به روش تزریق زیرجلدی سلول‌های سرطانی کبد (سلول‌های هپاتومای موشی Hepa1-6 ردهٔ سلولی شمارهٔ C15)، استفاده شد که مجموعهٔ سلول‌های استاندارد انستیتو پاستور ایران آن را تأیید کرده است. تمام آزمایش‌ها طبق استانداردها و پروتکل‌های اخلاقی مصوب کمیتهٔ آزمایش روی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی قم انجام شد.

جداسازی میتوکندری از سلول‌های کبدی

سلول‌های هپاتوسلولار کارسینوما موش به روش پرفیوژن کبدی کلاژناز دومرحله‌ای جداسازی شدند. یکپارچگی و زنده‌مانی سلولی با استفاده از آزمون تریپان بلو ارزیابی شد (۱۱). در ادامه، میتوکندری‌ها از سلول‌های کبد سرطانی استخراج شدند. بدین منظور، ابتدا سلول‌ها به‌مدت سه دقیقه در دور ۳۰۰ g سانتریفوژ شدند. سپس supernatant جداسازی و ذخیره شد و رسوب سلولی به‌مدت ده دقیقه هموژنیزه و متعاقباً به‌مدت پنج دقیقه در دور ۷۶۰ g سانتریفوژ شد. رسوب میتوکندری‌ها در بافر تریس (Tris)

برای ارزیابی تولید ROS، پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) و تورم (شامل ۰/۰۵ مولار تریس ـ هیدروکلراید، ۰/۲۵ مولار ساکارز، ۲۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم،۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم و ۱ میلی‌مولار فسفات دی‌سدیم) با pH=۷/۴ و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۲). یکپارچگی غشای خارجی و عملکردی‌بودن سیستم انتقالی میتوکندری با استفاده از آزمون مهار تورم القاشده با کلسیم بررسی شد. میتوکندری‌ها در بافر تورم (۲۰۰ mM ساکارز، ۱۰ mM HEPES ، ۵ mM سوکسینات، ۱ mM فسفات، ۲ µM روتنون، ۱۰ µM EGT، (pH=۷/۲) و در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد با (۱۰۰ µM) Ca^{2+} تیمار شدند. تورم به‌صورت کاهش جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر پایش شد. در آزمون موازی، میتوکندری‌ها با (۱ µM) CsA پیش‌تیمار شدند. حفظ ثبات جذب نوری (عدم تورم) در حضور CsA نشان‌دهندهٔ یکپارچگی غشای خارجی و وجود مکانیسم مهارپذیر منفذ گذرا (mPTP) بود (۱۳).

آزمون MTT

سمیت عصاره بر میتوکندری‌های ایزوله با استفاده از روشی مبتنی‌بر آزمون MTT، که به‌طور ویژه برای ارزیابی فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (SDH) در میتوکندری‌های ایزوله به کار می‌رود، اندازه‌گیری شد. اساس این روش، احیای نمک تترازولیوم زرد MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] به کریستال‌های فرمازان بنفش و نامحلول است که با الکترون‌های منتقل‌شده از کمپلکس II (سوکسینات دهیدروژناز) زنجیرهٔ تنفسی میتوکندری انجام می‌پذیرد. ازآنجاکه فعالیت SDH شاخص مستقیمی از یکپارچگی غشای داخلی میتوکندری و کارایی فسفریلاسیون اکسیداتیو است، کاهش در میزان احیای MTT بازتابی از اختلال در عملکرد میتوکندری و سمیت عصاره محسوب می‌شود. این روش تطبیق‌یافته به‌طور گسترده‌ای در مطالعات میتوکندری‌محور برای غربالگری سمیت میتوکندریایی ترکیبات مختلف استفاده شده است (۱۳).

سوسپانسیون میتوکندری (غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر در بافر تنفسی) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای با غلظت‌های مختلف عصاره (۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از محلول (MTT ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS استریل) به هر چاهک اضافه و پلیت مجدداً به‌مدت پانزده دقیقه در همان شرایط انکوبه شد. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر DMSO خالص به هر چاهک متوقف شد. پس از هم‌زدن ملایم به‌مدت پنج دقیقه، جذب در طول موج ۵۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاریدر خوانده شد (۱۴).

تعیین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

سوسپانسیون میتوکندری (۰/۵ میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر) در بافر تنفسی با غلظت‌های نهایی ۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه انکوبه شد. پس از هر بازهٔ زمانی، DCFH-DA با غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ده دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. شدت فلورسانس بلافاصله در طول‌موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و نشر ۵۲۵ نانومتر با اسپکتروفلورومتر اندازه‌گیری شد (۱۵).

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)

سوسپانسیون میتوکندری (غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر در بافر تنفسی) در لوله‌های اپندورف با غلظت‌های نهایی عصاره (۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در بن‌ماری انکوبه شد. ابتدا، میتوکندری و عصاره مخلوط و

سپس به دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از دورهٔ انکوباسیون، رودامین ۱۲۳ (Rh123) با غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار به هر لوله اضافه و نمونه‌ها به‌مدت ده دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بلافاصله پس از این مرحله، محتوای هر لوله به کووت فلورسانس منتقل و شدت فلورسانس در طول موج تحریک ۵۰۷ نانومتر و نشر ۵۲۹ نانومتر با استفاده از اسپکتروفلورومتر (Shimadzu RF5000U) اندازه‌گیری شد. کاهش شدت فلورسانس نسبی (نسبت به گروه کنترل) به‌عنوان افت پتانسیل غشای میتوکندری گزارش شد (۱۵).

تعیین تورم میتوکندری

سوسپانسیون میتوکندری (۰/۵ میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر) در بافر تورم (ترکیب: ۲۰۰ میلی‌مولار ساکارز، ۱۰ میلی‌مولار HEPES ، ۵ میلی‌مولار سوکسینات، ۱ میلی‌مولار فسفات، ۲ میکرومولار روتنون، ۱۰ میکرومولار EGTA، pH=۷/۲) با غلظت‌های نهایی عصاره (۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مخلوط و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر در زمان‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه بلافاصله پس از افزودن عصاره و با استفاده از دستگاه الایزاریدر خوانده شد (۱۵).

آزادسازی سیتوکروم c

آزادسازی سیتوکروم c با استفاده از کیت سنجش کمی سیتوکروم C موش صحرایی/ موش سوری (شرکت R&D Systems, Inc.، مینیاپولیس، مینه‌سوتا، ایالات متحدهٔ آمریکا) تعیین شد (۱۶).

ارزیابی آپوپتوز

این آزمون برای بررسی ارتباط بین اختلال میتوکندریایی مشاهده‌شده و فعال‌سازی آپوپتوز در سطح سلول کامل انجام شد. باوجود شواهد قوی از آسیب مستقیم عصاره به میتوکندری‌های ایزوله، آپوپتوز نوعی فرایند سلولی هماهنگ است که به یکپارچگی چندین مسیر نیاز دارد. اثبات وقوع آپوپتوز در سلول کامل نشان می‌دهد که آسیب میتوکندریایی از آستانهٔ لازم برای راه‌اندازی مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول فراتر رفته است و اهمیت زیستی دارد. سلول‌های Hepa1-6 با غلظت IC_{50} عصاره (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت دوازده ساعت در شرایط استاندارد کشت (۳۷°C، ۵٪ CO_2) تیمار شدند. سلول‌ها جمع‌آوری و با کیت Annexin V-FITC/PI رنگ‌آمیزی شدند (۱۵ دقیقه، تاریکی، دمای اتاق). جمعیت‌های سلولی با فلوسایتومتر (BD FACSCalibur) آنالیز و درصد سلول‌های آپوپتوتیک ($Annexin\ V^+$) محاسبه شد (۱۰).

محاسبات آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل (n=3) انجام شد. حیوانات و نمونه‌های میتوکندریایی به‌صورت تصادفی به گروه‌های کنترل و تیمار اختصاص داده شدند و ارزیابی نتایج آزمایش‌های فلورسانس، الایزا و فلوسایتومتری به‌صورت کور (Blinded) توسط ارزیابان مستقل انجام شد. گروه‌های کنترل سالم و کنترل بیمار در این مطالعه گروه‌هایی هستند که با عصاره تیمار نشده‌اند.

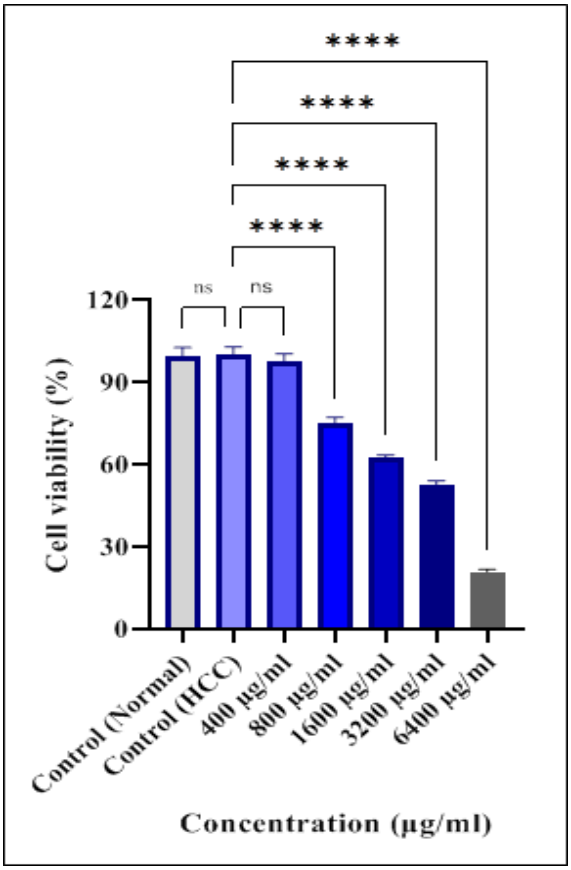
پیش از انجام آنالیزهای مقایسه‌ای، پیش‌فرض نرمال‌بودن توزیع داده‌ها در هر گروه با استفاده از آزمون شاپیرو ـ ویلک (Shapiro-Wilk test) بررسی شد ($p>۰/۰۵$). همچنین، برابری واریانس‌ها بین گروه‌های مقایسه‌شده با آزمون لوین (Levene's test) تأیید شد. پس از احراز این پیش‌شرط‌ها، برای مقایسهٔ میانگین بین سه گروه یا بیشتر از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به‌دنبال آن، آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. برای مقایسهٔ میانگین بین دو گروه مستقل از آزمون t مستقل استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. سطح معنی‌داری آماری $p>۰/۰۵$ در نظر گرفته شد و تمامی تحلیل‌ها با

نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۸.۴.۳) انجام شدند.

یافته‌ها

نتایج آزمون MTT

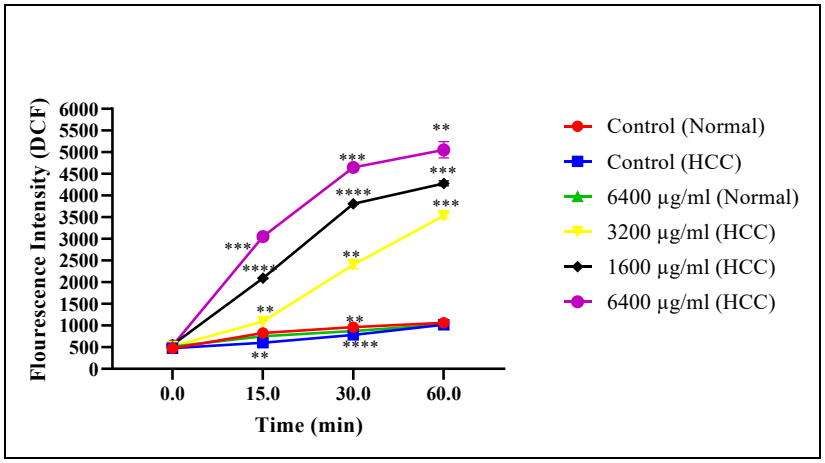
سمیت عصارهٔ **n** هگزانی لارو مگس سرباز سیاه بر میتوکندری‌های ایزوله‌شده از هپاتوسیت‌های موش‌های مبتلا به HCC با استفاده از آزمون MTT در غلظت‌های ۴۰۰ تا ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ارزیابی شد. نتایج نشان داد عصاره به‌صورت وابسته به غلظت باعث کاهش معنی‌دار فعالیت سوکسینات دهیدروژناز (SDH) می‌شود. برای محاسبهٔ IC_{50}، داده‌های درصد مهار حاصل از سه تکرار مستقل با استفاده از مدل رگرسیون غیرخطی در نرم‌افزار GraphPad Prism v.9 آنالیز شد. غلظت مهار ۵۰ درصد (IC_{50}) عصارهٔ ۳۲۰۰±۱۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با بازهٔ اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد. بر این اساس، غلظت‌های ۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (به‌ترتیب نصف، برابر و دو برابر IC_{50}) برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. شکل ۱ اثر سمی عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه را در غلظت‌های مختلف (۱۶۰۰و ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ بر µl/ml در میتوکندری به‌صورت میزان مهار آنزیم سوکسینات دهیدروژناز نشان می‌دهد.



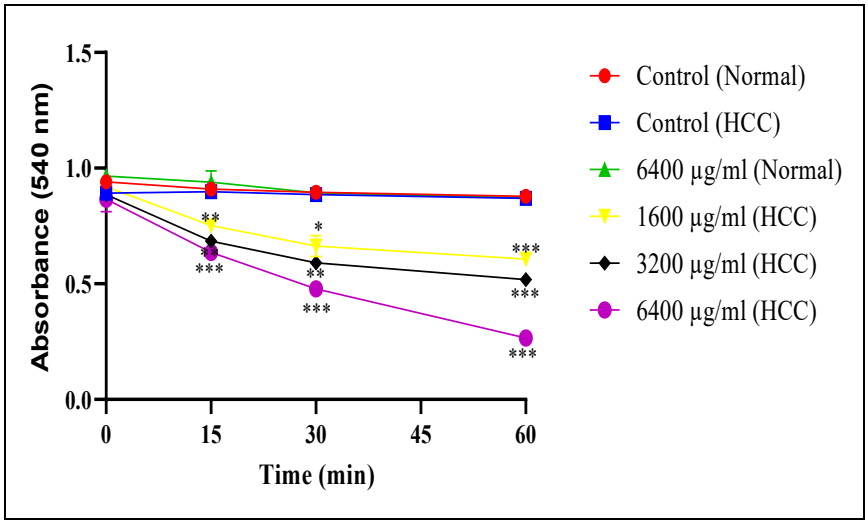
شکل ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌ها تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه. میتوکندری‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره (۴۰۰ تا ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند و فعالیت آنزیم SDH (شاخص سلامت میتوکندری) با استفاده از آزمون MTT اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت نسبی نسبت به گروه کنترل محاسبه شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از سه آزمایش مستقل (n=۳) ارائه شده‌اند. ستاره‌ها نشان‌دهندهٔ سطح معنی‌داری آماری در مقایسه با گروه کنترل هستند (****p<۰/۰۰۰۱؛ *p<۰/۰۵).

نتایج آزمون ROS میتوکندریایی

همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، غلظت‌های اعمال‌شدهٔ عصاره (۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون، به‌ترتیب باعث افزایش ۶±۴۰، ۸±۶۵ و ۱۰±۹۰ درصد در تولید ROS در مقایسه با گروه کنترل شدند (p<۰/۰۰۰۱). در گروه سالم، افزایش معنی‌داری در میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن مشاهده نشد (شکل ۲). افزایش شدت فلورسنت (DCF) نشان‌دهندهٔ تولید ROS در میتوکندری است.



شکل ۲. اثر عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در میتوکندری‌های ایزوله از هپاتوسیت‌های HCC. میتوکندری‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از عصاره به‌مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند و تولید ROS با استفاده از پروب DCFH-DA اندازه‌گیری شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (n=۳) ارائه شده‌اند. تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA دوطرفه انجام شد. ستاره‌ها نشان‌دهندهٔ سطح معنی‌داری آماری در مقایسه با گروه کنترل در هر زمان هستند (****p<۰/۰۰۰۱؛ ***p<۰/۰۰۱؛ **p<۰/۰۱؛ *p<۰/۰۵).



شکل ۳. ارزیابی تورم میتوکندری‌های ایزوله در پاسخ به عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه. میتوکندری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه انکوبه شدند و تورم از طریق کاهش جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر پایش شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (n=۳) ارائه شده‌اند. تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA دوطرفه انجام شد. علامت **** نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۰۰۱ است.

نتایج آزمون تورم میتوکندریایی

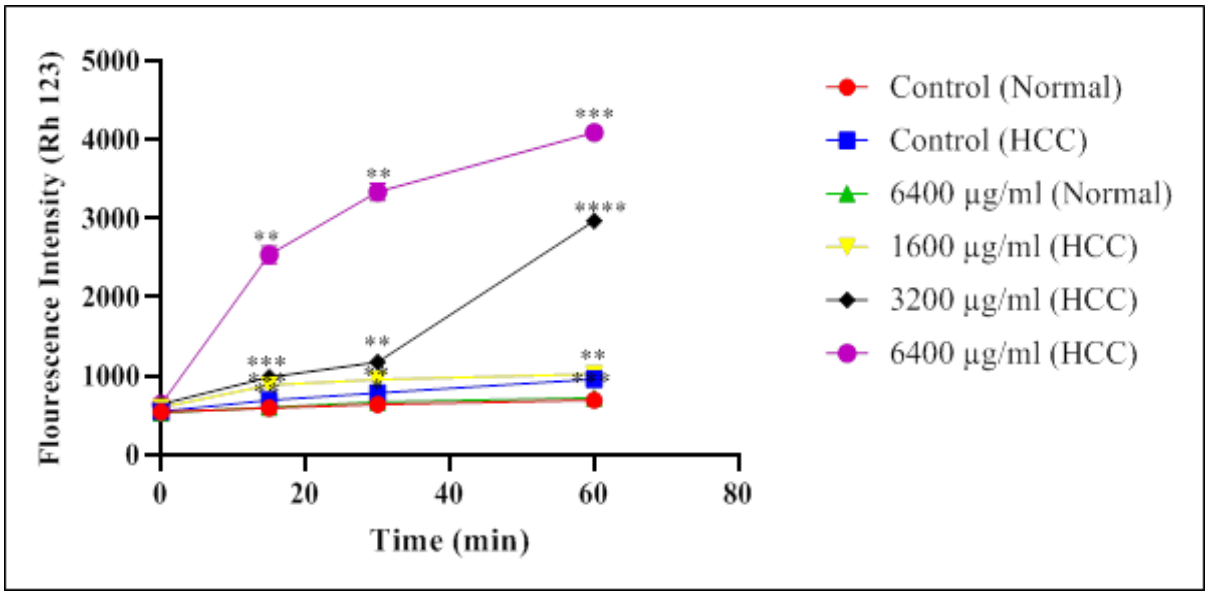
تورم میتوکندری به‌عنوان شاخصی از نفوذپذیری منفذ گذرای میتوکندری (MPT) اندازه‌گیری شد. افزودن عصاره در غلظت‌های ۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون به‌ترتیب باعث کاهش جذب نوری (در ۵۴۰ نانومتر) به میزان ۴±۲۵، ۶±۴۵ و ۸±۶۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل شد که نشان‌دهندهٔ افزایش معنی‌دار تورم میتوکندریایی است ($p<۰/۰۰۰۱$). در گروه سالم تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج آزمون پتانسیل غشای میتوکندریایی (MMP)

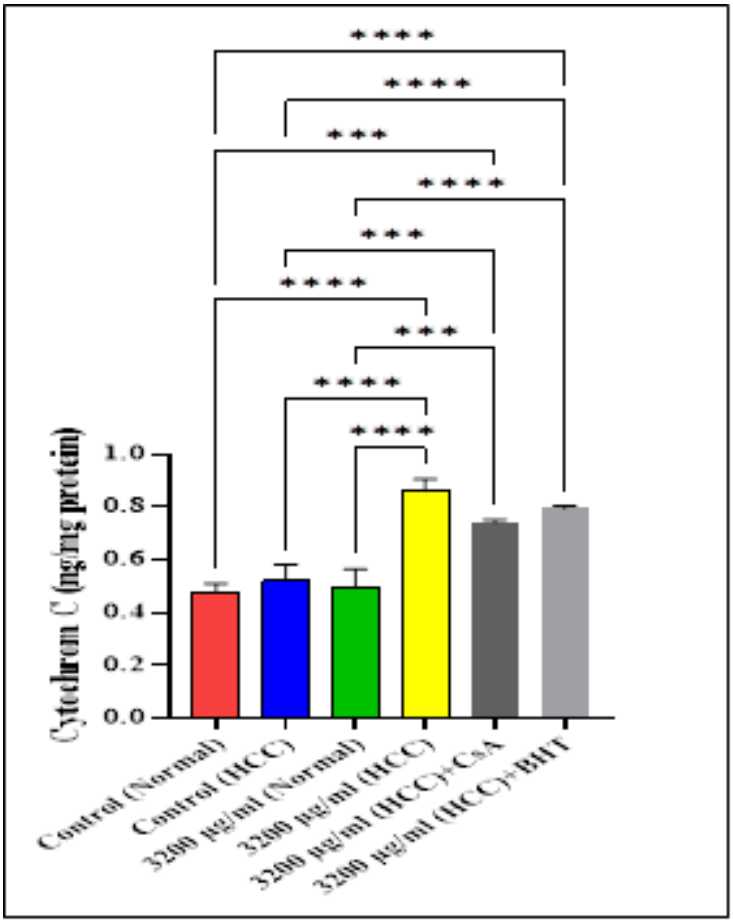
در این مطالعه، پتانسیل غشای میتوکندریایی با استفاده از Rh 123 اندازه‌گیری شد. عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه در غلظت‌های ۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب باعث کاهش ۵±۳۰، ۷±۵۵ و ۹±۸۰ درصد در پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) پس از ۶۰ دقیقه شد ($p<۰/۰۰۰۱$) (شکل ۴).

نتایج آزمون سیتوکروم سی

افزودن غلظت IC_{50} عصاره (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث افزایش ۱۲±۷۰ درصد در آزادسازی سیتوکروم c در مقایسه با گروه کنترل شد ($p<۰/۰۰۰۱$)؛ درحالی‌که پیش‌تیمار این عصاره‌ها با میتوکندری‌های سرطانی تیمارشده با سیکلوسپورین (CsA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به‌طور قابل‌توجهی آزادسازی سیتوکروم c را کاهش داد (شکل ۵).



شکل ۴. اثر عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه در پتانسیل غشای میتوکندری (MMP). میتوکندری‌ها با غلظت‌های مشخص‌شدهٔ عصاره به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند و MMP با استفاده از پروب رودامین ۱۲۳ اندازه‌گیری شد. کاهش فلورسانس نشان‌دهندهٔ افت پتانسیل غشای میتوکندری است. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (n=۳) ارائه شده‌اند. تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA دوطرفه انجام شد. علامت **** نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح $p<۰/۰۰۰۱$ است.

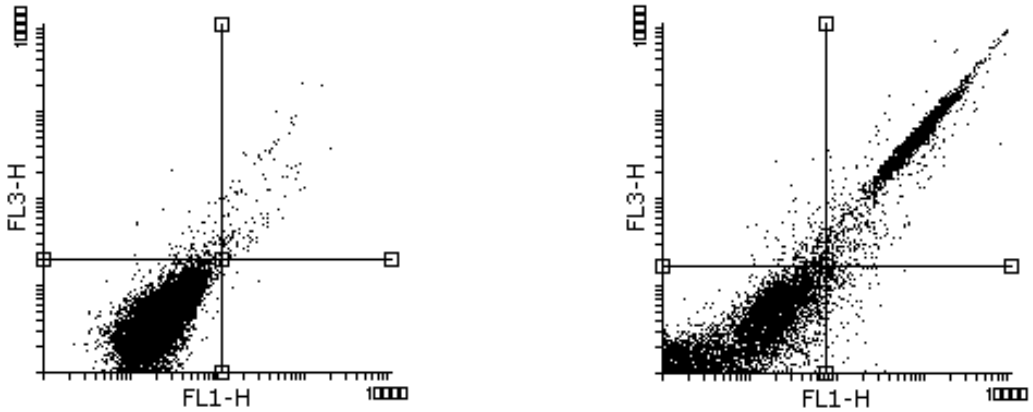


شکل ۵. اثر عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه بر آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری‌های ایزوله از هپاتوسیت‌های HCC. میتوکندری‌ها با غلظت IC_{50} عصاره (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. میزان سیتوکروم c آزادشده به روش الایزا اندازه‌گیری شد. همچنین، اثر مهارکنندگی پیش‌تیمار با سیکلوسپورین A (CsA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) نشان داده شده است. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (n=۳) ارائه شده‌اند. تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه انجام شد. علامت **** نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۰۰۱ است.

نتایج سنجش آپوپتوز

به‌منظور تعیینِ پیامد زیستیِ نهاییِ اختلالات عملکردی مشاهده‌شده در میتوکندری‌های ایزوله، القای آپوپتوز در سلول‌های کامل هپاتومای موشی (Hepa1-6) ارزیابی شد. براساس نتایج بخش‌های پیشین، که نشان‌دهندهٔ القای استرس اکسیداتیو، فروپاشی پتانسیل غشا، تورم و آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری‌های HCC با عصاره بود، این فرضیه مطرح شد که این رویدادهای میتوکندریایی می‌توانند به فعال‌سازی مسیر آپوپتوز وابسته به میتوکندری (ذاتی) در سطح سلول کامل منجر شوند. برای آزمون این فرضیه، سلول‌ها به‌مدت ۱۲ ساعت با غلظت IC_{50} عصاره (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. گروه کنترل منفی شامل سلول‌های تیمارنشده و گروه کنترل حلال شامل سلول‌های تیمارشده با DMSO 0.1% بود.

نتایج حاصل از فلوسایتومتری با رنگ‌آمیزی Annexin V/PI نشان داد تیمار با غلظت IC_{50} عصاره (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۱۲ ساعت باعث القای آپوپتوز در ۶±۴۵ درصد از سلول‌های Hepa1-6 شد، درحالی‌که در گروه کنترل این مقدار کمتر از ۵ درصد بود (شکل ۶).



	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	97.83
Right Bottom	0.08
Left Top	0.91
Right Top	1.18

	% of Vis
All events	100.00
Left Bottom	59.67
Right Bottom	1.39
Left Top	1.80
Right Top	37.14

شکل ۶. القای آپوپتوز در سلول‌های Hepa1-6 (HCC) تحت‌تأثیر عصارهٔ لارو مگس سرباز سیاه. سلول‌ها با غلظت IC_{50} عصاره (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت دوازده ساعت تیمار شدند و آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/PI و آنالیز فلوسایتومتری ارزیابی شد. (A) نمونه‌های کنترل (غیرتیمارشده)؛ (B) نمونه‌های تیمارشده با عصاره. مناطق چهارگانه (Q1–Q4) نشان‌دهندهٔ جمعیت‌های سلولی نکروتیک، آپوپتوتیک دیررس، آپوپتوتیک زودرس و زنده هستند.

این یافته، که عصاره در یک غلظت واحد (IC_{50}) هم‌زمان هم موجب اختلال در پارامترهای کلیدی میتوکندریایی و هم القای آپوپتوز در سلول کامل می‌شود، می‌تواند از ارتباط بین هدف‌گیری میتوکندری و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده توسط عصاره حمایت کند.

بحث

سرطان کبد بیماری ویرانگری است که سلامت افراد بی‌شماری را در سراسر جهان به خطر می‌اندازد. با توجه به آثار جانبی و بسیار شدیدی که داروهای متداول در درمان این سرطان دارند، شناسایی داروهایی با منشأ طبیعی می‌تواند در کنترل و پیشرفت آن نقش مهمی داشته باشد (۱۰).

نتایج مطلوب مطالعاتی که دربارهٔ تأثیر ترکیبات طبیعی در کنترل و درمان سرطان انجام شده است، روزنه‌های امیدبخشی را در مدیریت این بیماری کشنده ایجاد کرده است. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که عصارهٔ n هگزانی لارو مگس سرباز سیاه با مختل‌کردن عملکرد میتوکندری، مسیر آپوپتوز وابسته به میتوکندری را در سلول‌های هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) فعال می‌کند.

براساس یافته‌های این مطالعه و با توجه به ماهیت لیپوفیلی، عصارهٔ n هگزانی لارو مگس سرباز سیاه سرشار از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع است (۹). مکانیسم عمل احتمالی از طریق اختلال مستقیم در یکپارچگی غشای داخلی میتوکندری (IMM) آغاز می‌شود. ترکیبات لیپوفیل عصاره با نفوذ به غشای دولایهٔ لیپیدی میتوکندری، باعث افزایش نفوذپذیری غشا، اختلال در زنجیرهٔ انتقال الکترون و نشت پروتون می‌شوند که نتیجهٔ آن کاهش پتانسیل غشای میتوکندری است. این افت پتانسیل غشای میتوکندری به بازشدن منفذ گذرای میتوکندریایی (mPTP)، تورم ماتریکس و آزادسازی فاکتورهای پیش‌آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c به سیتوزول منجر می‌شود (۱۵). آزادسازی سیتوکروم c با تشکیل آپوپتوزوم و فعال‌سازی کاسپازهای اجرایی، در نهایت مرگ

برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول از طریق مسیر ذاتی آپوپتوز را القا می‌کند (۱۷). بنابراین، این عصاره با هدف‌گیری اولیه و مستقیم ساختار و عملکرد میتوکندری، آبشار میتوکندریایی آپوپتوز را در سلول‌های HCC فعال می‌کند.

افزایش قابل توجه و وابسته به غلظت در تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به احتمال زیاد به‌عنوان رویداد آغازگر، با ایجاد آسیب اکسیداتیو به اجزای غشای داخلی میتوکندری، به افت شدید پتانسیل غشای میتوکندری منجر شد. این اختلال در یکپارچگی غشا، محرک کلیدی برای بازشدن منافذ گذرای میتوکندری (mPTP) است که در این پژوهش با شواهد مستقیم مبنی‌بر تورم میتوکندریایی و آزادسازی قوی سیتوکروم c تأیید شد. این مجموعه از رویدادهای میتوکندریایی، الگوی شناخته‌شدهٔ استرس پیش‌آپوپتوتیک را بازتاب می‌دهد و به‌طور منطقی توضیح می‌دهد که تیمار با همان غلظت مؤثر (IC_{50})، به القای معنی‌دار آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار با عصاره منجر می‌شود. همچنین، ماهیت انتخابی آثار، که منحصراً در میتوکندری سلول‌های سرطانی مشاهده شد و در نمونه‌های سالم تکرار نشد، پروفایل ایمنی نسبی این عصاره را نیز برجسته می‌کند. از منظر مقایسه‌ای، مقدار IC_{50} محاسبه‌شده برای این عصاره (۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نظر رتبه‌ای با محدودهٔ غلظت‌های مؤثر گزارش‌شده برای عصارهٔ سایر حشرات با خواص ضدسرطانی مشابه، مانند عصارهٔ سوسک زرد و همچنین لارو مگس سرباز سیاه در مطالعات قبلی قابل مقایسه است (۱۸، ۱۹). بااین‌حال، وجه تمایز و نوآوری اصلی مطالعهٔ حاضر در عمق تحلیل مکانیستی آن نهفته است. درحالی‌که بسیاری از پژوهش‌های پیشین اثربخشی نهایی چنین عصاره‌هایی را در سطح سلول کامل (مانند مهار رشد یا القای آپوپتوز) گزارش کرده‌اند (۲۰)، این تحقیق با تمرکز بر میتوکندری‌های ایزوله، شواهد کمی و مستقیمی از اختلال اولیه در پارامترهای کلیدی عملکردی این اندامک حیاتی ارائه می‌دهد. این رویکرد می‌تواند شکاف دانشی موجود بین مشاهدهٔ اثر نهایی و درک مکانیسم اولیهٔ عمل را پر کند.

نوآوری این کار هنگام مقایسه با مطالعهٔ قبلی در مدل ملانوما آشکارتر می‌شود. نتایج آن مطالعه نشان داد که این عصاره بر میتوکندری‌های سلول‌های سرطانی پوست سمیت انتخابی اعمال می‌کند (۱۰). موفقیت مطالعهٔ حاضر در تکرار این یافتهٔ کلیدی بر هدف‌گیری میتوکندری در یک مدل سرطان کاملاً متفاوت (HCC) بر دو نکتهٔ مهم دلالت دارد: نخست، به نظر می‌رسد که مکانیسم میتوکندری‌محور در سمیت این عصاره، یک ویژگی عمومی و وابسته به بافت خاص نباشد، بلکه احتمالاً از ترکیبات زیست‌فعال پایدار در عصاره ناشی می‌شود. دوم، این تکرارپذیری بین مدل‌های مختلف تومورال، پایهٔ علمی قوی‌تر و پتانسیل درمانی گسترده‌تری برای این عصاره، به‌عنوان کاندیدای ضدسرطان با مکانیسم عمل متمایز، ایجاد می‌کند.

نتیجه‌گیری

باوجود یافته‌های ارزشمندی که این پژوهش ارائه می‌دهد، محدودیت‌هایی نیز وجود دارد که باید در تفسیر نتایج و طراحی مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرند. اگرچه تمرکز بر میتوکندری‌های ایزوله برای استنباط رابطهٔ مکانیستی ضروری است، پیچیدگی تعاملات درون‌سلولی و مسیرهای جبرانی موجود در یک سلول زنده را در نظر نمی‌گیرد. همچنین، عصارهٔ مورد استفاده ترکیب پیچیده‌ای است و شناسایی دقیق مادهٔ مؤثر فعال (یا ترکیبات مؤثر) برای بهینه‌سازی و استانداردسازی ضروری است. گام‌های بعدی منطقی باید شامل خالص‌سازی و شناسایی این ترکیبات با تکنیک‌های کروماتوگرافی و طیف‌سنجی جرمی، ارزیابی کارایی و سمیت درون‌تنی در مدل حیوانی پیش‌بالینی HCC و بررسی پتانسیل هم‌افزایی آن با رژیم‌های درمانی مرسوم باشد.

تشکر و قدردانی

بخشی از نتایج این مقاله ماحاصل پایان‌نامۀ دکتری حرفه‌ای مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قم با کد اخلاق IR.MUQ.AEC.1404.003 است و حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی قم در پیشبرد این طرح شایسته تقدیر است. نویسندگان این مقاله تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1. Hwang SY, Danpanichkul P, Agopian V, Mehta N, Parikh ND, Abou-Alfa GK, et al. Hepatocellular carcinoma: updates on epidemiology, surveillance, diagnosis and treatment. Clinical and Molecular Hepatology. 2024;31(Suppl):S228.
2. Razi NS, Seydi E, Nazemi M, Arast Y, Pourahmad J. Selective toxicity of Persian gulf sea squirt (Phallusia nigra) extract on isolated mitochondria obtained from liver hepatocytes of hepatocellular carcinoma induced rat. Hepatitis Monthly. 2017;17(2):1.
3. Kanwal F, Kramer JR, Mapakshi S, Natarajan Y, Chayanupatkul M, Richardson PA, et al. Risk of hepatocellular cancer in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Gastroenterology. 2018;155(6):1828-37. e2.
4. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: Globocan sources and methods. International Journal of Cancer. 2019;144(8):1941-53.
5. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2021;73:4-13.
6. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2019;16(10):589-604.
7. Chuang SC, Lee YCA, Hashibe M, Dai M, Zheng T, Boffetta P. Interaction between cigarette smoking and hepatitis B and C virus infection on the risk of liver cancer: a meta-analysis. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2010;19(5):1261-8.
8. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of Natural Products. 2020;83(3):770-803.
9. Caligiani A, Marseglia A, Leni G, Baldassarre S, Maistrello L, Dossena A, Sforza S. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. Food Research International. 2018;105:812-20.
10. Arast Y, Sabbaghi M, Kamranfar F, Heidari F, Fazli Nejad SM, Hosseinabadi T, Pourahmad J. Selective cytotoxicity of standardised n-hexane extract of black soldier flies' larvae on cancerous skin cells mitochondria isolated from rat model of melanoma. Cutaneous and Ocular Toxicology. 2024;43(4):264-71.
11.Georgescu N, Lupu AR. Tumoral and normal cells treatment with high-voltage pulsed cold atmospheric plasma jets. IEEE Transactions on Plasma Science. 2010;38(8):1949-55.
12. Halestrap A, McStay G, Clarke S. The permeability transition pore complex: another view. Biochimie. 2002;48(2-3):153-166.
13. Abdolahi A, Vahabzadeh Z, Izadpanah E, Moloudi MR. Vaspin attenuates steatosis-induced fibrosis via GRP78 receptor by targeting AMPK signaling pathway. Journal of Physiology and Biochemistry. 2022;78(1):185-197.
14. Talari M, Seydi E, Salimi A, Mohsenifar Z, Kamalinejad M, Pourahmad J. Dracocephalum: novel anticancer plant acting on liver cancer cell mitochondria. BioMed Research International. 2014;2014(1):892170.

15. Salimi A, Roudkenar MH, Sadeghi L, Mohseni A, Seydi E, Pirahmadi N, Pourahmad J. Ellagic acid, a polyphenolic compound, selectively induces ROS-mediated apoptosis in cancerous B-lymphocytes of CLL patients by directly targeting mitochondria. Redox Biology. 2015;6:461-71.
16. Vervoort H, Fenical W, Epifanio RDA. Tamandarins A and B: New cytotoxic depsipeptides from a Brazilian ascidian of the family Didemnidae. The Journal of Organic Chemistry. 2000;65(3):782-92.
17. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. Cancer Discovery. 2022;12(1):31-46.
18. Wu RA, Ding Q, Lu H, Tan H, Sun N, Wang K, et al. Caspase 3-mediated cytotoxicity of mealworm larvae (Tenebrio molitor) oil extract against human hepatocellular carcinoma and colorectal adenocarcinoma. Journal of Ethnopharmacology. 2020;250:112438.
19. Rajasekhar N, Ramesh N, Prashantha CN. Identification and in-silico prediction of hermetiaillucens larval protein that inhibits the progression of cervical cancer. International Journal of Engineering and Advanced Technology. 2020;9(3):3418-25.
20. Budi HS, Anitasari S, Ulfa N, Setiabudi M, Ramasamy R, Wu CZ, Shen YK. Palmitic acid of Musa Paradisiaca induces apoptosis through caspase-3 in human oral squamous cell carcinoma. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2022; 26(19):7099-7114.