








Original Paper

The Cytotoxic Effect of *Red Beetroot* Aqueous Extract on Esophageal Cancer Cell Line KYSE30

Shirin Elah Dadi (M.Sc)¹ , Roya Lari (Ph.D)^{*2}  , Masoud Fereidoni (Ph.D)³  

¹ M.Sc in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. ² Associate Professor of Cellular & Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. ³ Professor of Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Background and Objective: Esophageal cancer is one of the most prevalent cancers worldwide, and due to the placement of Iran in the Asian belt of esophageal cancer, the use of modern therapeutic approaches is necessary. Betanin is a natural compound extracted from the *red beetroot* of *Beta vulgaris* species whose antioxidant properties and role in removing free radicals have been proven. The present study was conducted to determine the cytotoxic effect of *red beetroot* aqueous extract on esophageal cancer cell line KYSE30.

Methods: In this descriptive-analytical study, esophageal cancer cell line KYSE30 was cultured and then underwent treatment with different concentrations of *red beetroot* aqueous extract (3, 30, 300, 1000, and 3000 µg/mL) in the three time intervals of 24, 48, and 72 hours. The anticancer effect of treated cells was evaluated by the tetrazolium (MTT) colorimetric assay and the effect of viability was evaluated by the trypan blue assay.

Results: The viability of esophageal cancer cell line at concentrations of 30, 300, 1000, and 3000 µg/mL of *red beetroot* aqueous extract within 24 hours was statistically significantly reduced compared to the control cells ($P < 0.05$). The viability of esophageal cancer cell line in concentrations of 1000 and 3000 µg/mL of *red beetroot* aqueous extract within 48 hours showed a statistically significant reduction compared to the control cells ($P < 0.05$). The viability of esophageal cancer cell line at concentrations of 3, 30, 300, 1000, and 3000 µg/mL of *red beetroot* aqueous extract within 72 hours showed a statistically significant reduction compared to the control cells ($P < 0.05$). The MTT assay results approved the trypan blue assay results. Also, the trypan blue assay indicated that the concentration of 3000 µg/mL significantly led to reduced viability of cells within 72 hours (64.14 ± 3.29) compared to 24 hours (77.22 ± 3.34) and 48 hours (66.93 ± 5.57) ($P < 0.05$).

Conclusion: *Red beetroot* aqueous extract has a cytotoxic effect on esophageal cancer cell line KYSE30.

Keywords: Esophageal Neoplasms, KYSE30 cells, Red Beet Extract, Betanin

*Corresponding Author: Roya Lari (Ph.D), E-mail: rlari@um.ac.ir



Received 21 February 2023

Final Revised 19 November 2023

Accepted 19 November 2023

Published Online 27 Feb 2024

Cite this article as: Elah Dadi Sh, Lari R, Fereidoni M. [The Cytotoxic Effect of Red Beetroot Aqueous Extract on Esophageal Cancer Cell Line KYSE30]. J Gorgan Univ Med Sci. 2024; 26(1): 95-103. [Article in Persian]

 10.21859/JGorganUnivMedSci.26.1.95





Extended Abstract

Introduction

Death by esophageal cancer is regarded as the sixth and the second leading cause in the world and Iran, respectively. The two principal subtypes of esophageal cancer include esophageal squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (AC). Based on epidemiological studies, regions of the world have been categorized as “the Asian Belt of Esophageal Cancer.” In the meantime, Iran, particularly its northeastern regions, is considered among the most prevalent areas of developing esophageal cancer. Modern medicine proposes various therapeutic approaches, such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, and hormone therapy, for the treatment of esophageal cancer, but its high mortality rate has been reported after applying various therapeutic approaches. Thus, the use of applying treatments with low complications is required. Therefore, taking preventive actions against cancer, such as appropriate dietary habits, has been strongly recommended. In herbal medicine, the identification and use of compounds extracted from plants seems to be an appropriate method for research studies in order to achieve cancer treatment. *Red beetroot* contains large amounts of red pigments (betacyanins) and yellow pigments (betaxanthins) and also a remarkable antioxidant capacity that leads to inhibiting nitrate, oxygen, and chlorine free radicals. Studies have demonstrated that betanin, as the main compound of sugar beet, is a therapeutic agent, which not only induces apoptosis, but also hinders angiogenesis and proliferation of skin, liver, lung, and esophagus cancer cells. *Red beetroot* extract, the red food coloring (E162) of which has been approved by the Food and Drug Administration (FDA), can prevent the incidence of some malignancies and be used as a preventive agent to cope with human cancers. Given that betanin is the main compound of sugar beet, has antioxidant and antitumor activities, and is a strong inhibitor of cancer cells, the current research was conducted to determine the cytotoxic effect of *red beetroot* aqueous extract on esophageal cancer cell line KYSE30.

Methods

In this descriptive-analytical study, esophageal cancer cell line KYSE30 purchased from Pasteur Institute in Tehran was cultured in the Biology Department, Ferdowsi University in Mashhad in 2018. *Red beetroot* extract was prepared using a 24-hour shaker and a 0.22 µm filter. In order to culture cancer cell line KYSE30, the RPMI 1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco-Germany) was used. Cell line KYSE30 was kept in an incubator equipped with CO₂ at a temperature of 37°C, and their growth status was assessed using an inverted microscope daily. After the cells reached a density of approximately 70-80%, they were passaged using trypsin-ethylenediaminetetraacetate (EDTA) (Sigma-Germany) at a ratio of 1:3. After the cells reached the desired cell density, the tetrazolium (MTT) colorimetric assay related to the cytotoxicity of the obtained extract was carried out on cancer cells KYSE30 and the results were evaluated. Cell viability was evaluated using the trypan blue staining assay.

Results

According to the MTT assay results, the viability of esophageal cancer cells under treatment with different concentrations of *red beetroot* extract indicated a reduction in all incubation times (24, 48, and 72 hours) compared to the control group. In a 24-hour time interval, the concentration of 30 µg/mL of *red beetroot* extract led to decreased growth of cancer cells KYSE30 (P<0.01). The concentration of 1000 µg/mL and higher had the highest toxicity on the cells so that it indicated a statistically significant reduction compared to the control group (P<0.001). In the 48-hour time interval, the concentration of 3000 µg/mL of *red beetroot* aqueous extract showed the highest toxicity on cells compared to the control group (P<0.01). Similarly, in

the 72-hour time interval, cytotoxicity was visible even at a concentration of 3 µg/mL, indicating a statistically significant reduction compared to the control group (P<0.001). Furthermore, the cytotoxicity in the concentrations of 300, 1000, and 3000 µg/mL was also statistically significantly reduced compared to the control group (P<0.001). The results obtained from trypan blue staining demonstrated that the percentage of viable cells in esophageal cancer cells under treatment with various concentrations of *red beetroot* aqueous extract reduced in all three incubation times of 24, 48, and 72 hours at a concentration above 1000 µg/mL compared to the control group. The viability of untreated esophageal cancer cells (the control group) was determined to be 92.79% in the 24-hour time interval. The viability of esophageal cancer cells after the effect of concentrations of 1000 and 3000 µg/mL of *red beetroot* aqueous extract for 24 hours showed a reduction of 79.23% and 77.22%, respectively, which was a statistically significant reduction compared to the control group (P<0.01). In all three time intervals of 24, 48, and 72 hours, a concentration higher than 1000 µg/mL of *red beetroot* aqueous extract showed the highest toxicity on cell line KYSE30, denoting a statistically significant difference with untreated cells (the control group) (P<0.05). The concentration of 3000 µg/mL of *red beetroot* aqueous extract significantly culminated in decreased viability of esophageal cancer cells so that on the third day, the cell viability significantly decreased compared to the first and second days (P<0.01). A direct relationship was found between the lethality rate and the increased concentration of *red beetroot* aqueous extract over time.

Conclusion

According to the current research results, as the concentration of *red beetroot* extract increased, the number of cancer cells KYSE30 decreased so that in all three time intervals of 24, 48, and 72 hours, a concentration higher than 1000 µg/mL showed a highest impact on the esophageal cancer cells compared to the control group cells. The obtained results demonstrate the time-dependent and concentration-dependent impacts of this substance, denoting the selective cytotoxicity of *red beetroot* aqueous extract on KYSE30 cells compared to the control (untreated) cells. The *red beetroot* extract has a comprehensive preventive activity and can lessen the growth of cancer cells, inhibit angiogenesis, and prevent inflammation and apoptosis induction in cancer lines, such as Raji cells (human lymphoid cancer cells), B16F10 cells (melanoma cancer cells), K562 cells (myeloid leukemia cells), HT-29 cells (colorectal cancer cell line), and MCF-7 cells (breast cancer cell line). Moreover, it has been found that treatment of the MCF-7 cell line with betanin extracted from *red beetroot* can culminate in increasing the cellular level of apoptosis-related proteins (p53, Bad, FAS, and TRAILR4) and alter the mitochondrial membrane potential. These changes created in the cell and the launching of internal and external apoptotic pathways can be attributed to the *red beetroot* extract.

Funding

This article was extracted from Shirin Elah Dadi's master's thesis in the Animal Physiology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Also, this article was extracted from proposal of Ferdowsi University of Mashhad (No. 44862).

Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgment

We would like to thank the financial support of the Vice-Chancellor for Research and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.

Red beetroot aqueous extract has a toxic effect on esophageal cancer cell line KYSE30 and can lead to reduced viability of these cells.



تحقیقی

اثر سمیت سلولی عصاره آبی چغندر قرمز (*Red Beetroot*) بر روی رده سلول سرطانی مری (KYSE30)

شیرین اله‌دادی^۱، دکتر رویا لاری^{۲*}، دکتر مسعود فریدونی^۳

^۱ کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. ^۲ دانشیار بیولوژی سلولی مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. ^۳ استاد فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان مری یکی از سرطان‌های رایج در جهان بوده و با توجه به قرارگیری کشور ایران در کمربند آسیایی سرطان مری استفاده از رویکردهای درمانی نوین ضروری است. بتانین یک ترکیب طبیعی بوده و از ریشه چغندر قرمز گونه *Beta Vulgaris* استخراج می‌شود و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و نقش آن در حذف رادیکال‌های آزاد به اثبات رسیده است. این مطالعه به منظور تعیین اثر سمیت سلولی عصاره آبی چغندر قرمز (*Red Beetroot*) بر روی رده سلول سرطانی مری (KYSE30) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی رده سلول سرطانی مری (KYSE30) کشت داده شدند. سپس تحت تیمار با غلظت‌های مختلفی از عصاره آبی چغندر قرمز (۳، ۳۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. اثر ضدسرطانی سلول‌های تیمار شده با آزمون MTT و اثر زنده‌مانی به روش تریپان بلو ارزیابی شدند.

یافته‌ها: بقای رده سلولی سرطان مری در غلظت‌های ۳۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندر قرمز طی ۲۴ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافتند ($P < 0/05$). بقای رده سلولی سرطان مری در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندر قرمز طی ۴۸ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافتند ($P < 0/05$). بقای رده سلولی سرطان مری در غلظت‌های ۳، ۳۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندر قرمز طی ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافتند ($P < 0/05$). نتایج حاصل از آزمون MTT نتایج تریپان بلو را تایید کرد. همچنین آزمون تریپان بلو نشان داد که غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بقای سلول‌ها در ۷۲ ساعت ($64/14 \pm 3/29$) نسبت به ۲۴ ساعت ($77/22 \pm 3/34$) و ۴۸ ساعت ($66/93 \pm 5/57$) گردید ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره آبی چغندر قرمز بر روی رده سلول سرطانی مری (KYSE30) دارای اثر سمیت سلولی است.

واژه‌های کلیدی: سرطان مری، رده سلولی KYSE30، چغندر قرمز، بتانین

* نویسنده مسؤول: دکتر رویا لاری، پست الکترونیکی: rlari@um.ac.ir

نشانی: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، تلفن ۰۵۱-۳۸۸۰۵۵۱۱

وصول ۱۴۰۱/۱۲/۲ اصلاح نهایی ۱۴۰۲/۸/۲۸ پذیرش ۱۴۰۲/۸/۲۸ انتشار ۱۴۰۲/۱۲/۸

مقدمه

سرطان‌های دستگاه گوارش، شمار قابل توجهی از مرگ و میر را در جهان به خود اختصاص داده است. به‌طوری که میزان ابتلا و مرگ و میر در آسیا بیشتر از سایر نواحی گزارش شده است.^۱ مرگ و میر به دلیل ابتلا به سرطان مری در جهان و ایران به ترتیب علت ششم و دوم محسوب می‌شود.^{۲،۳} دو زیرگروه اصلی سرطان مری شامل کارسینوم سلول سنگفرشی مری (SCC) و آدنوکارسینوم (AC) است.^{۴،۵} و بروز این دو زیرگروه در مناطق جغرافیایی متفاوت است. به طوری که SCC در شرق آسیا، شرق و جنوب آفریقا و جنوب

اروپا شیوع بیشتری دارد و AC در آمریکای شمالی و سایر بخش‌های اروپا شایع‌تر است.^۶ براساس مطالعات اپیدمیولوژیکی، مناطقی از جهان تحت عنوان «کمربند آسیایی سرطان مری» طبقه‌بندی شده‌اند و در این میان کشور ایران و به‌خصوص نواحی شمال شرقی آن جزو شایع‌ترین مناطق وقوع سرطان مری به‌شمار می‌روند.^{۷،۸} توپولوژی، مورفولوژیک و روند درمانی این بدخیمی در نواحی مختلف دنیا متفاوت است و به عواملی همچون عادات ناسالم غذایی، چاقی، عفونت، مصرف سیگار، تنباکو و الکل بستگی دارد.^۹ میزان ۵۰ درصد از میزان سرطان‌های دستگاه گوارش با تعدیل عوامل خطر

ابتلا، ارتباط نزدیکی دارد. به عنوان مثال، میزان شیوع بالای سرطان مری در شمال شرق ایران به عواملی همچون مصرف سیگار، نوشیدن مایعات داغ، چاقی، رفلاکس معده، سن و زمینه ژنتیکی افراد ارتباط دارد که با کم نمودن مصرف سیگار میزان بیماری کاهش می‌یابد.^{۱۰} متأسفانه، این سرطان در مراحل پیشرفته از بیماری بروز می‌کند و یکی از روش‌های رایج درمانی، جراحی است. روش درمانی جراحی بسیار تهاجمی بوده و با عوارض جانبی زیاد و مرگ و میر همراه است. علایمی همچون از دست دادن اشتها، سیری زودرس و رفلاکس شدید می‌تواند کیفیت زندگی بیماران را تحت تأثیر قرار دهد.^{۱۱}

پزشکی مدرن روش‌های درمانی مختلفی همچون جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و هورمون‌درمانی برای درمان سرطان مری را پیشنهاد می‌کند؛ اما میزان مرگ و میر بالای آن پس از اعمال روش‌های درمانی مختلف ذکر شده است. لذا استفاده از درمان‌هایی با عوارض جانبی کمتر احساس می‌شود. بنابراین، انجام اقدامات پیشگیری کننده از سرطان، مانند عادات غذایی مناسب، به شدت توصیه شده است.^{۱۲} طب گیاهی منشأ مؤثرترین داروهای کنونی درمان سرطان است و به نظر می‌رسد شناسایی و استفاده از ترکیبات استخراج شده از گیاهان روش مناسبی برای مطالعات تحقیقاتی برای دستیابی به درمان سرطان باشد. از مزایای استفاده از گیاهان می‌توان به سهولت تهیه آنها، هزینه کم و در بسیاری موارد ایمنی آنها و مهارگر قوی رشد سلول‌های سرطانی اشاره نمود.^{۱۳،۱۴}

مطالعات مختلفی، رابطه معکوس بین مصرف میوه‌ها و سبزیجات و خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن و بدخیمی‌ها را نشان داده‌اند.^{۱۵،۱۶} میوه‌ها و سبزیجات به عنوان منابعی غنی از ترکیبات زیستی فعال با ظرفیت ضد اکسیدانی بالا در زمینه پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند. ضد اکسیدان‌های بسیاری همچون آسکوربیک اسید، کارنوتینید، آنتی‌سیامین و بتالائین با ظرفیت بالقوه خود در جهت حذف رادیکال‌های آزاد و آسیب به سلول‌های سرطانی به عنوان گروه‌های درمانی در نظر گرفته می‌شوند.^{۱۶}

چغندر قرمز (*Red Beetroot*) حاوی مقادیر زیادی رنگدانه قرمز (بتاسیانین‌ها) و رنگدانه‌های زرد (بتاگزانتین‌ها) بوده و دارای ظرفیت ضد اکسیدانی برجسته است که موجب مهار نیترات، رادیکال‌های آزاد کلر و اکسیژن می‌گردد. ویژگی ذکر شده در بتاسیانین‌ها بیشتر از بتاگزانتین‌ها است.^{۱۷} بتانین یک ترکیب نیتروژنی محلول در آب بوده و حدود ۷۵-۹۵ درصد (۳۰۰-۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از رنگدانه‌های چغندر قند را شامل می‌شود. این ماده فتوشیمیایی فعال، اثرات زیستی مطلوب خود همچون ضد اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی و محافظت کننده کبدی را از طریق بخش آمین که اهداء کنندگان الکترون هستند؛ ایفا می‌کند. مطالعات برون‌تنی و

درون‌تنی نشان داده‌اند که بتانین به عنوان ترکیب اصلی چغندر قند به عنوان یک عامل درمانی نه تنها موجب القای آپوپتوز شده بلکه از رگزایی و تکثیر سلول‌های سرطانی پوست، کبد، ریه و مری جلوگیری می‌کند.^{۱۸،۱۹} در مطالعه‌ای نشان داده شد که تیمار رده سلولی K562 (رده سلولی لوسمی میلوئید انسانی) با استفاده از ۴۰ Mm بتانین موجب فعال‌سازی کاسپاز-۳ شده و مسیر مرگ سلولی آپوپتوز را فعال کرده و در نتیجه رشد سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند.^{۲۰} عصاره چغندر قرمز که رنگ خوراکی قرمز آن (E162) مورد تایید سازمان غذا و دارو قرار گرفته؛ می‌تواند از بروز برخی از بدخیمی‌ها جلوگیری کند و به عنوان ماده پیشگیری کننده برای مقابله با سرطان‌های انسانی به کار رود.^{۲۱} با توجه به اینکه ترکیب اصلی چغندر قند، بتانین است و دارای فعالیت‌هایی همچون ضد اکسیدانی، ضد توموری و مهارگر قوی سلول‌های سرطانی است؛ می‌تواند به عنوان عامل درمانی مهم در حوزه پزشکی مورد استفاده قرار گیرد. لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر سمیت سلولی عصاره آبی چغندر قرمز بر روی رده سلول سرطانی مری (KYSE30) انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تحلیلی رده سلول سرطانی مری (KYSE30) خریداری شده از انستیتو پاستور تهران در گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۷ کشت داده شدند.

آماده‌سازی عصاره گیاهی: چغندر قرمز گونه *Beta vulgaris* گیاهی از خانواده اسفنجیان است که مواد غذایی در ریشه غده‌ای آن ذخیره می‌شود. حدود یک کیلوگرم چغندر قرمز تهیه، آسیاب و در محیطی خشک به دور از نور آفتاب خشک شد. ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و به مدت ۲۴ ساعت شیکر با دور ۱۸۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد یکدست و عصاره‌گیری گردید. سپس به منظور عسلی نمودن، ترکیب به دست آمده به مدت ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی نسبی در زیر هود روشن قرار داده شد. به منظور ارزیابی میزان آب و عصاره خشک، چغندر قرمز که پس از ۷۲ ساعت به صورت عسلی درآمده بود؛ به شرح زیر رطوبت سنجی و محاسبه شد.

جرم فویل - [جرم فویل + جرم عصاره مرطوب] = جرم عصاره مرطوب عسلی

جرم فویل - [جرم فویل + جرم عصاره خشک] = جرم عصاره خشک شده

۱۰۰ × جرم عصاره مرطوب / جرم عصاره خشک = درصد ماده خشک

در انتها، عصاره‌های به دست آمده با استفاده از فیلتر $0.22 \mu\text{m}$ در شرایط استریل فیلتر شدند.

کشت سلولی: به منظور کشت رده سلولی سرطانی KYSE30 از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد (گیبو-آلمان) استفاده شد. رده سلولی KYSE30 در انکوباتور مجهز به CO_2 و در

دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و وضعیت رشد آنها به صورت روزانه با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم حدود ۸۰-۷۰ درصد با استفاده از تریسین-EDTA (سیگما-آلمان) به نسبت ۱:۳ پاساژ داده شدند.

ارزیابی سنجش سلولی با استفاده از روش MTT: به منظور ارزیابی اثرات ضدسرطانی عصاره آبی چغندر قرمز بر روی سلول‌های KYSE30، حدود ۷۰۰۰ سلول در هر خانه از ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شد. در هر آزمایش برای هر گروه ۱۰ نمونه در نظر گرفته شد و پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از عصاره شامل ۳، ۳۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار و میزان کشندگی آنها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان‌های موردنظر، ۲۰ μl از محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-) (diphenyl tetrazolium bromide) با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد، محلول هر چاهک خارج و برای حل نمودن بلورهای فورمازان، حدود ۱۵۰ μl DMSO به آنها افزوده شد. در انتها جذب چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Awareness، امریکا) در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

توانایی زیستی سلول‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

۱۰۰ × کل سلول‌ها / تعداد سلول‌های زنده = توانایی زیستی سلول‌ها

در نهایت مقادیر به دست آمده از نظر آماری با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. تحلیل‌های آماری با استفاده از آزمون One-way ANOVA انجام شد. به منظور مقایسه میانگین متغیرهای پژوهش بین دو گروه از آزمون pairwise t-test استفاده گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با توجه به نتایج آزمون MTT زنده‌مانی سلول‌های سرطانی مری تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره چغندر قرمز در همه زمان‌های انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد (شکل ۲).

در بازه زمانی ۲۴ ساعت، غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره چغندر قرمز موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی KYSE30 گردید ($P < 0/01$). غلظت ۱۰۰۰ μg/ml به بالا بیشترین سمیت را بر روی سلول‌ها داشت؛ به طوری که نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری نشان داد ($P < 0/001$) (جدول یک).

در بازه زمانی ۴۸ ساعت، غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندر قرمز بیشترین سمیت را بر روی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0/01$) (جدول یک).

همچنین در بازه زمانی ۷۲ ساعت، سمیت سلولی حتی در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر قابل مشاهده بود که در مقایسه با گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری نشان داد ($P < 0/001$). علاوه بر این، سمیت سلولی در غلظت‌های ۳۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافت ($P < 0/001$).

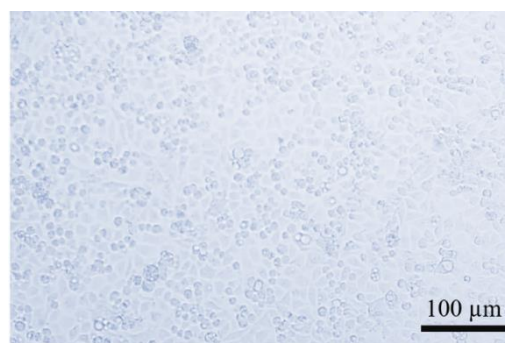
نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو نشان داد که درصد سلول‌های زنده در سلول‌های سرطانی مری تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره آبی چغندر قرمز در هر سه زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت بالای ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به

دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و وضعیت رشد آنها به صورت روزانه با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم حدود ۸۰-۷۰ درصد با استفاده از تریسین-EDTA (سیگما-آلمان) به نسبت ۱:۳ پاساژ داده شدند.

ارزیابی سنجش سلولی با استفاده از روش MTT: به منظور ارزیابی اثرات ضدسرطانی عصاره آبی چغندر قرمز بر روی سلول‌های KYSE30، حدود ۷۰۰۰ سلول در هر خانه از ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شد. در هر آزمایش برای هر گروه ۱۰ نمونه در نظر گرفته شد و پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از عصاره شامل ۳، ۳۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار و میزان کشندگی آنها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان‌های موردنظر، ۲۰ μl از محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-) (diphenyl tetrazolium bromide) با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد، محلول هر چاهک خارج و برای حل نمودن بلورهای فورمازان، حدود ۱۵۰ μl DMSO به آنها افزوده شد. در انتها جذب چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Awareness، امریکا) در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

۱۰۰ × جذب نوری در سلول‌های کنترل / جذب نوری در سلول‌های تیمار شده = درصد زنده‌مانی سلول‌ها

داده‌ها توسط نرم‌افزار گراف پدپریسم ۶ محاسبه شد. هر آزمایش برای سه بار تکرار شد و نتایج یکی از آزمایشات (N=10) به عنوان نمونه ارایه شد.^{۲۲} پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم سلولی موردنظر (شکل یک)، آزمون MTT مربوط به سمیت سلولی عصاره حاصل بر روی سلول‌های سرطانی KYSE30 انجام و نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱: نمایش رده سلولی KYSE30

ارزیابی زنده‌مانی سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو: به منظور سنجش زنده‌مانی سلول‌های KYSE30 پس از تیمار با غلظت‌های مختلفی از عصاره چغندر قرمز (۳، ۳۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ μg/ml)

جدول ۱: ارزیابی میزان بقای رده سلولی سرطان مری KYSE30 در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از جذب نوری در روش MTT

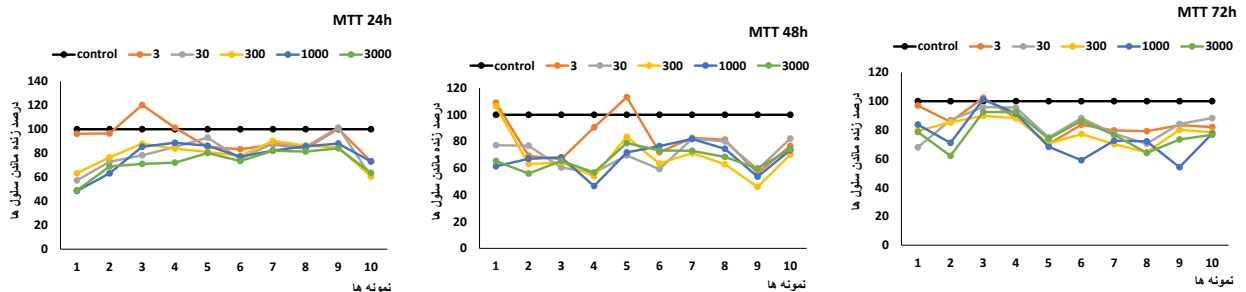
زمان	کنترل (n=5)	۳ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)
۲۴ ساعت	۰/۸۰±۰/۱	۰/۷۳±۰/۱۴	۰/۶۲±۰/۰۳	۰/۶۲±۰/۰۵	۰/۶±۰/۰۵	۰/۵۶±۰/۰۴
P-value	-	-	P<۰/۰۱	P<۰/۰۱	P<۰/۰۱	P<۰/۰۰۱
۴۸ ساعت	۰/۹۶±۰/۱	۰/۷۸±۰/۱۶	۰/۶۷±۰/۰۹	۰/۶۵±۰/۱۴	۰/۶۴±۰/۰۶	۰/۶۴±۰/۰۳
P-value	-	-	-	-	P<۰/۰۵	P<۰/۰۱
۷۲ ساعت	۰/۷۵±۰/۰۶	۰/۶۳±۰/۰۷	۰/۶۲±۰/۰۵	۰/۵۸±۰/۰۴	۰/۵۶±۰/۰۹	۰/۵۸±۰/۰۶
P-value	-	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱

آزمون مورد استفاده: One-way ANOVA، میانگین داده‌ها حاصل سه تکرار در یک آزمایش و مقادیر معنی‌دار در مقایسه گروه کنترل است.

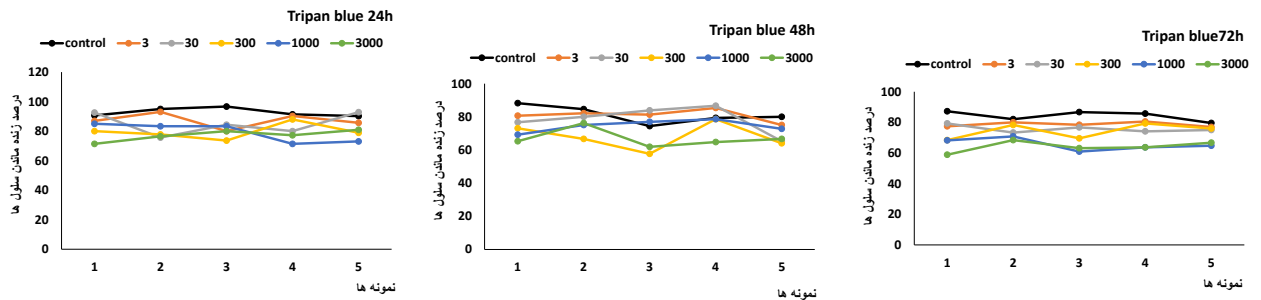
جدول ۲: درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری KYSE30 در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از شمارش سلولی به روش تریپان بلو

زمان	کنترل (n=5)	۳ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)	۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (n=5)
۲۴ ساعت	۹۲/۷۹±۲/۵	۸۷/۲۱±۴/۴۴	۸۵/۱±۶/۸۱	۷۹/۶۸±۴/۶۸	۷۹/۲۳±۵/۷۶	۷۷/۲۲±۳/۳۴
P-value	-	-	-	P<۰/۰۱	P<۰/۰۱	P<۰/۰۱
۴۸ ساعت	۸۱/۳±۴/۷۵	۸۰/۸۶±۳/۳۴	۷۸/۴۸±۷/۴۵	۶۸/۱۰±۷/۲۳	۷۶/۳۳±۵/۱۲	۶۶/۹۳±۵/۵۷
P-value	-	-	-	P<۰/۰۱۱	P<۰/۰۴۵	P<۰/۰۰۲۹
۷۲ ساعت	۸۴/۲۳±۲/۹۵	۷۸/۶۵±۱/۴۲	۷۵/۶۷±۲/۱۳	۷۴/۳۱±۴/۴۹	۶۵/۶۴±۳/۵	۶۴/۱۴±۳/۲۹
P-value	-	-	P<۰/۰۱	P<۰/۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۰۱

آزمون مورد استفاده: One-way ANOVA، میانگین داده‌ها حاصل سه تکرار در یک آزمایش و مقادیر معنی‌دار در مقایسه گروه کنترل است.



شکل ۲: نمودار نقطه‌ای درصد زنده ماندن سلول‌ها نسبت به گروه کنترل در غلظت‌های مختلف عصاره آبی چغندر قرمز بر روی رده سلولی سرطان مری (KYSE30) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT (n=10).



شکل ۳: نمودار نقطه‌ای درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره آبی چغندر قرمز بر روی رده سلولی سرطان مری (KYSE30) در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش تریپان بلو در ۳ بار تکرار (n=5).

در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، غلظت بالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین تاثیر را بر روی سلول‌های سرطانی مری در مقایسه با سلول‌های گروه شاهد نشان داد. نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده اثرات وابسته به زمان و غلظت این ماده بوده و حاکی از سمیت سلولی انتخابی عصاره آبی چغندرقرمز بر سلول‌های KYSE30 در مقایسه با سلول‌های کنترل (تیمار نشده) است.

عصاره چغندرقرمز فعالیت پیشگیری کننده جامعی داشته و می‌تواند موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی، مهار رگزایی، جلوگیری از التهاب و القای آپوپتوز در رده‌های سرطانی همچون سلول‌های Raji (سلول‌های سرطانی لنف انسانی)، B16F10 (سلول‌های سرطانی ملانوما)،^{۳۳} K562 (سلول‌های میلوئید لوسمی)،^{۳۴} HT-29 (رده سلولی سرطانی کولورکتال)^{۳۵-۳۶} و MCF-7 (رده سلولی سرطان پستان)^{۳۷} می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که تیمار رده سلولی MCF-7 با بتانین استخراج شده از چغندرقرمز می‌تواند موجب افزایش سطح سلولی پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز شده (FAS, Bad, p53 و TRAILR4) و پتانسیل غشای میتوکندری را تغییر دهد. این تغییرات ایجاد شده در سلول و راه‌اندازی مسیرهای آپوپتوزی داخلی و خارجی را می‌توان به عصاره چغندرقرمز نسبت داد.^{۳۷} علاوه بر این نتایج تحقیقات دیگری سمیت کمتر عصاره چغندرقرمز نسبت به داروی رایج شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین در برابر سلول‌های طبیعی نشان می‌دهد که حاکی از تمایز افتراقی آن است. در این زمینه مطالعات درون‌تنی نشان می‌دهد تزریق بتانین به موش‌های ماده حامل سرطان ریه از طریق آب آشامیدنی می‌تواند موجب مهار رشد تومور آنها شود. همچنین مهار رگزایی و افزایش بیان کاسپاز-۳ در نمونه‌های تیمار شده مشاهده گردید.^{۳۸} همچنین مطالعه Nowacki و همکاران نشان داد میزان $40 \mu\text{M}$ از عصاره چغندرقرمز، می‌تواند مسیر پیام‌رسانی مرتبط با STAT3 را در رده سلولی MCF-7 مهار کرده و در نتیجه موجب مهار تکثیر سلولی و بقای سلول‌ها شود. STAT3 یکی از عوامل مهم رونویسی بوده که در انواع مختلف سرطان‌ها فعال است و نقش مهمی در مهار آپوپتوز و القای مقاومت شیمیایی دارد. در این زمینه، مهار مسیر پیام‌رسانی STAT3 می‌تواند باعث سرکوب پیام‌های مرتبط با بقای سلولی شود و از طرف دیگر موجب راه‌اندازی مسیرهای مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود.^{۳۷} نتایج اولیه در پژوهش حاضر همسو با مطالعات بررسی شده نشان داد که پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بقای سلول‌های سرطانی کاهش یافت و بیشترین سمیت عصاره آبی چغندرقرمز در غلظت $3000 \mu\text{l}$ مشاهده گردید. تحقیقات قبلی نشان دادند که هم عصاره هیدروالکلی چغندر و هم بتانین به طور موثری از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده‌اند و سطح بیان ژن‌های پروآپوپتوز (BAD, Caspase-3, Caspase-8)،

گروه کنترل کاهش یافت (شکل ۳). بقای سلول‌های سرطانی مری تیمار نشده (گروه کنترل) در بازه زمانی ۲۴ ساعته $92/79$ درصد تعیین شد. بقای سلول‌های سرطانی مری پس از اثر غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندرقرمز ۲۴ ساعته به ترتیب با مقادیر $79/23$ درصد و $77/22$ درصد کاهش نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل آماری معنی‌داری داشت ($P < 0/01$) (جدول ۲).

درصد زنده‌مانی ۴۸ ساعته سلول‌های سرطانی مری گروه کنترل $81/3$ درصد تعیین شد. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی مری پس از اثر عصاره آبی چغندرقرمز ۴۸ ساعته در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۶۸ درصد ($P < 0/011$)، در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر $76/33$ درصد ($P < 0/045$) و در غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۶۷ درصد ($P < 0/0029$) تعیین شد که در مقایسه با گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲).

درصد زنده‌مانی ۷۲ ساعته سلول‌های سرطانی مری گروه کنترل $84/2$ درصد تعیین شد. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی مری پس از اثر عصاره آبی چغندرقرمز ۷۲ ساعته در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۷۷ درصد ($P < 0/01$)، در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۷۴ درصد ($P < 0/01$)، در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر $65/6$ درصد ($P < 0/001$) و در غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر $64/1$ درصد ($P < 0/0001$) تعیین شد که در مقایسه با گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲).

در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته غلظت بالای ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندرقرمز بیشترین سمیت را بر روی رده سلولی KYSE30 و اختلاف آماری معنی‌داری با سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل) نشان داد ($P < 0/05$). غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندرقرمز به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بقای سلول‌های سرطانی مری گردید. به‌طوری که در روز سوم بقای سلولی نسبت به روز اول و دوم به‌شدت کاهش یافت ($P < 0/01$). همچنین در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندرقرمز بقای سلول‌های سرطانی مری در روز سوم به‌طور معنی‌داری نسبت به روز اول کاهش یافت ($P < 0/01$). غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چغندرقرمز به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بقای سلول‌های سرطانی مری در ۷۲ ساعت ($P < 0/008$) نسبت به ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت گردید (جدول ۲). بین میزان کشندگی و افزایش غلظت عصاره آبی چغندرقرمز در طول زمان رابطه مستقیم وجود داشت.

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، با افزایش غلظت عصاره چغندرقرمز، تعداد سلول‌های سرطانی KYSE30 کاهش یافت. به‌طوری که

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی چغندر قرمز بر روی رده سلولی سرطان مری KYSE30 اثر سمیت دارد و می‌تواند موجب کاهش زنده‌مانی این سلول‌ها شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم شیرین الهادادی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد و نیز حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه فردوسی مشهد (کد ۴۴۸۶۲) بود. بخشی از هزینه‌های مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده است و بدین وسیله سپاس خود را اعلام می‌داریم. بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

References

- Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Jul;159(1):335-349.e15. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.068.
- Sadjadi A, Nourai M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Parkin DM. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005 Jul-Sep;6(3):359-63.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan;72(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21708.
- Samadi F, Babaei M, Yazdanbod A, Fallah M, Nourai M, Nasrollahzadeh D, et al. Survival rate of gastric and esophageal cancers in Ardabil province, North-West of Iran. *Arch Iran Med*. 2007 Jan;10(1):32-7.
- Steevens J, Botterweck AA, Dirx MJ, van den Brandt PA, Schouten LJ. Trends in incidence of oesophageal and stomach cancer subtypes in Europe. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jun;22(6):669-78. doi: 10.1097/MEG.0b013e32832ca091.
- Huang FL, Yu SJ. Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment. *Asian J Surg*. 2018 May;41(3):210-15. doi: 10.1016/j.asjsur.2016.10.005.
- Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett*. 2008 Aug;267(1):133-64. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.025.
- Liu CQ, Ma YL, Qin Q, Wang PH, Luo Y, Xu PF, Cui Y. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040. *Thorac Cancer*. 2023 Jan;14(1):3-11. doi: 10.1111/1759-7714.14745.
- Al Dulaimi D. Recent advances in oesophageal diseases. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2014;7(3):186-89.
- Darabi M, Asadi Lari M, Motevalian SA, Motlagh A, Arsang-Jang S, Karimi Jaber M. Trends in gastrointestinal cancer incidence in Iran, 2001-2010: a joinpoint analysis. *Epidemiol Health*. 2016 Dec;38:e2016056. doi: 10.4178/epih.e2016056.
- Elliott JA, Docherty NG, Eckhardt HG, Doyle SL, Guinan EM, Ravi N, et al. Weight Loss, Satiety, and the Postprandial Gut Hormone Response After Esophagectomy: A Prospective Study. *Ann Surg*. 2017 Jul;266(1):82-90. doi: 10.1097/SLA.0000000000001918.
- Piasna-Stupecka E, Leszczyńska T, Drozdowska M, Dziadek K, Domagała B, Domagała D, et al. Young Shoots of Red Beet

(Fas-R و Caspase-9) در رده‌های سلولی سرطان کولورکتال را افزایش دادند. در مقابل، ژن ضد آپوپتوز (Bcl-2) به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. لذا به‌نظر می‌رسد عصاره گیاه چغندر در مهار سلول‌های سرطانی موفق عمل نموده است. پیش‌بینی می‌شود که این ترکیب احتمالاً با اثر بر روی فاکتورهای رونویسی همچون STAT3 و مهار آن منجر به سرکوب پروتئین‌های آپوپتوزی همچون BCL2 و Survivin می‌گردد.^{۲۹،۲۸}

یافته‌های اولیه مطالعه حاضر می‌تواند راهگشای مطالعات دیگری برای یافتن عصاره‌های متفاوت چغندر و رده‌های سلولی سرطانی مختلف باشد و پتانسیل بتانین مستخرج از چغندر قرمز را به عنوان ترکیب طبیعی با فعالیت ضدسرطانی در مطالعات پیش‌کلینیکی آینده مطرح کند.

and the Root at Full Maturity Inhibit Proliferation and Induce Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr;24(8):6889. doi: 10.3390/ijms24086889.

- Shakir HK, Ahmed AA, Hassan AA, Al-Shammari AM, Mohammad MH, Almzaeni AK. Cytotoxicity of Ethanolic Extract of petroselinum sativum against Esophageal Cancer Cell Lines. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*. 2022;15(1):15-18.
- Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr*. 2003 Sep;78(3 Suppl):517S-520S. doi: 10.1093/ajcn/78.3.517S.
- Netzel M, Stintzing FC, Quaas D, Strab G, Carle R, Bitsch R, et al. Renal excretion of antioxidative constituents from red beet in humans. *Food Research International*. 2005;38(8-9):1051-58. doi: 10.1016/j.foodres.2005.03.016.
- Kazmierczak R, Hallmann E, Lipowski J, Dreła N, Kowalik A, Püssa T, et al. Beetroot (Beta vulgaris L.) and naturally fermented beetroot juices from organic and conventional production: metabolomics, antioxidant levels and anticancer activity. *J Sci Food Agric*. 2014 Oct;94(13):2618-29. doi: 10.1002/jsfa.6722.
- Azeredo HMC. Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009 Dec;44(12):2365-76. doi: 10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x.
- Zhang Q, Pan J, Wang Y, Lubet R, You M. Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate- and benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Mol Carcinog*. 2013 Sep;52(9):686-91. doi: 10.1002/mc.21907.
- Kapadia GJ, Azuine MA, Sridhar R, Okuda Y, Tsuruta A, Ichiishi E, et al. Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol Res*. 2003 Feb;47(2):141-48. doi: 10.1016/s1043-6618(02)00285-2.
- Sreekanth D, Arunasree MK, Roy KR, Chandramohan Reddy T, Reddy GV, Reddanna P. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of Opuntia ficus-indica induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*. 2007 Nov;14(11):739-46. doi: 10.1016/j.phymed.2007.03.017.
- Lechner JF, Wang LS, Rocha CM, Larue B, Henry C, McIntyre CM, et al. Drinking water with red beetroot food color

- antagonizes esophageal carcinogenesis in N-nitrosomethylbenzylamine-treated rats. *J Med Food*. 2010 Jun;13(3):733-39. doi: 10.1089/jmf.2008.0280.
22. Mishra T, Khullar M, Bhatia A. Anticancer Potential of Aqueous Ethanol Seed Extract of *Ziziphus mauritiana* against Cancer Cell Lines and Ehrlich Ascites Carcinoma. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:765029. doi: 10.1155/2011/765029.
23. Wu LC, Hsu HW, Chen YC, Chiu CC, Lin YI, Ho JA. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*. 2006;95(2):319-27. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.002.
24. Esatbeyoglu T, Wagner AE, Motafakkerzad R, Nakajima Y, Matsugo S, Rimbach G. Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food Chem Toxicol*. 2014 Nov;73:119-26. doi: 10.1016/j.fct.2014.08.007.
25. Saber A, Abedimanesh N, Somi M-H, Khosroushahi AY. Anticancer effects of beetroot hydro-alcoholic extract and betanin on human colorectal cancer cell lines. *Research Square*. 2020; pp: 1-19. doi: 10.21203/rs.3.rs-90862/v1. [Preprint]
26. Alfawal AE, Elgammal OE, El-Shanshoury MR. Anticancer Activity of Beetroot (*Beta vulgaris L.*) Extracts (Human Colon Carcinoma Cell Line). *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*. 2022 Jun;17(1):253-62. doi: 10.21608/ajar.2022.266507.
27. Nowacki L, Vigneron P, Rotellini L, Cazzola H, Merlier F, Prost E, et al. Betanin-Enriched Red Beetroot (*Beta vulgaris L.*) Extract Induces Apoptosis and Autophagic Cell Death in MCF-7 Cells. *Phytother Res*. 2015 Dec;29(12):1964-73. doi: 10.1002/ptr.5491.
28. Cheng Y, Li Y, Nian Y, Liu D, Dai F, Zhang J. STAT3 is involved in miR-124-mediated suppressive effects on esophageal cancer cells. *BMC Cancer*. 2015 Apr;15:306. doi: 10.1186/s12885-015-1303-0.
29. Saber A, Abedimanesh N, Somi MH, Khosroushahi AY, Moradi S. Anticancer properties of red beetroot hydro-alcoholic extract and its main constituent; betanin on colorectal cancer cell lines. *BMC Complement Med Ther*. 2023 Jul;23(1):246. doi: 10.1186/s12906-023-04077-7.