

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL DE CARDIOLOGIE**

ANDRICA FLORINA - MARIA



TEZĂ DE DOCTORAT

**EVALUAREA EFECTULUI MULTI – TARGET
AL *SPIRULINEI PLATENSIS* IN VITRO ȘI IN VIVO**

Conducător Științific

PROF. UNIV. DR. DRĂGAN SIMONA RUXANDA

**Timișoara
2016**

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VI
Lista abrevierilor	VIII
Indexul Figurilor	IX
Indexul Tabelelor	XI
Mulțumiri.....	XII
INTRODUCERE	XIII

PARTEA GENERALĂ

1. Stresul oxidativ	1
2. Efectul multi – target al spirulinei	13

PARTEA SPECIFICĂ

3. Caracterizarea spirulinei	36
4. Determinarea activității antimicrobiene a spirulinei	49
5. Determinarea <i>in vitro</i> a potențialului antiproliferativ al spirulinei prin evaluarea viabilității celulare cu reactivul alamar blue.....	53
6. Determinarea <i>in vitro</i> a potențialului anticanceros al spirulinei prin proprietatea de a inhiba migrarea celulelor de melanom uman (A375)	58
7. Determinarea <i>in vivo</i> a toxicității spirulinei	64
8. Determinarea <i>in vivo</i> a activității antioxidante a spirulinei folosind modelul animal experimental de diabet zaharat indus cu aloxan	71
9. Determinarea <i>in vivo</i> a capacității antiinflamatoare a spirulinei folosind modelul animal experimental de inflamație acută indusă chimic	101

CONCLUZII.....	109
----------------	-----

BIBLIOGRAFIE.....	113
-------------------	-----

ANEXE.....	I
------------	---

Cuvinte cheie: spirulină, diabet zaharat, melanom, inflamație, activitate antioxidantă, efect antiproliferativ

INTRODUCERE

Suplimentele alimentare derivate din plante ce conțin combinații cu mecanisme de acțiune cunoscute, eficacitate și siguranță dovedită pentru fiecare component, reprezintă generația următoare de fito-farmaceutice. În cadrul acestei teze de doctorat am ales să studiez ca și produs fito-farmaceutic cu profil de siguranță dovedit de studiile de toxicitate acută și cronică, spirulina, o algă albastră-verde care aparține familiei *Oscillatoriaceae*, încrengătura *Cyanobacteria*. Am ales această algă datorită semnalării în literatură a efectului său antioxidant, fiind cunoscut faptul ca printre factorii declanșatori ai diabetului zaharat de tip 2 și în bolile maligne, stresul oxidativ ocupă un rol principal. Stresul oxidativ conduce la apariția speciilor de radicali liberi, care afectează negativ procesele celulare. Modularea tratamentului protector cu antioxidante poate modifica semnificativ rezistența la stresul oxidativ și acumularea radicalilor liberi la animalele de laborator. Numeroase studii au evidențiat îmbunătățirea funcției celulelor beta-pancreatice și a secreției de insulină în urma administrării unor compuși cu acțiune antioxidantă.

Spirulina se află printre cele mai utilizate suplimente nutritive, datorită conținutului ei bogat în proteine (60–70%), aminoacizi esențiali, minerale necesare organismului (fier, nichel, calciu, potasiu, crom, sodiu, zinc, magneziu, mangan, cupru, seleniu), vitamine, pigmenți carotenoizi și acizi grași esențiali, manifestând numeroase efecte farmacologice, printre care se numără cele antioxidante, anticancerigene, antiinflamatoare, antimicrobiene, imunostimulente. Astfel, spirulina este utilizată în numeroase domenii precum medicină, farmacie, cosmetică, agricultură, ca hrană pentru animale, ca nutraceutic și în industria chimică.

Motivația principală a studiului a fost dată de incidența crescută a cazurilor de diabet și a ratei crescute de mortalitate cauzate de melanomul malign, atât în populația României, cât și în țări cu economii avansate. Consecințele tulburărilor asociate diabetului și a melanomului malign sunt severe și determină costuri foarte ridicate pentru sistemele de sănătate. Scopul studiului a constat în evaluarea efectului multi-target al spirulinei, în vederea acoperirii tuturor aspectelor patogenice ale acestor boli degenerative: stres oxidativ, inflamație, infecție, control al glicemiei, potențial antiproliferativ.

Noutatea și complexitatea studiului este dată de abordarea multidisciplinară privitoare la testarea spirulinei (*Spirulina platensis*) atât *in vitro* pe celule de melanom uman și murinic, cât și *in vivo* pe model experimental de

diabet indus cu aloxan și de inflamație locală indusă chimic cu tetradecanoil-forbol (TPA).

Importanța acestei teme a constat în evaluarea efectelor spirulinei în controlul și tratarea diabetului, al melanomului malign și al proceselor inflamatorii cutanate, rezultatele obținute în cadrul cercetării având potențialul de a fi transpuse în aplicații ce îmbunătățesc direct starea de sănătate, prin intervenții inovative pentru bolile degenerative, cu eficacitate maximă și mai puține efecte secundare.

Studiul 1. Caracterizarea spirulinei

Spirulina sub formă de pulbere, testată în acest studiu a provenit de la un producător autorizat, Favisan Lugoj, România, siguranța acestui produs fiind certificată prin buletin de analiză.

Obiective: Obiectivul acestui studiu a constat în evaluarea activității antioxidante a extractelor etanolice, metanolice și apoase de spirulină de diferite concentrații (0,05 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) utilizându-se o metodă spectrofotometrică, pe bază de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). DPPH este un radical liber de culoare violet-închis, care în prezența unui antioxidant se reduce la un compus de culoare galben pal, spectrofotometrabil la o lungime de undă de 517 nm.

Materiale și metode: Deoarece activitatea antioxidantă a extractelor de spirulină a fost maximă la concentrația de 1 mg/mL, la aceeași concentrație au fost dozați polifenolii totali, din extractele apoase, hidroalcoolice (apa:etanol=1:1), alcoolice (etanolic și metanolic) și acide (soluție apoasă de acid oxalic 20%) de spirulină, prin metoda Folin – Ciocâlțeu. Metoda Folin – Ciocâlțeu are la bază reacția de oxidare cu ajutorul unui molibdowolfram. Din această reacție a rezultat ionul (Mo^{4+}) (albastru), a cărui absorbanță a fost determinată spectrofotometric la o lungime de undă de 750 nm.

Rezultate și discuții: Activitatea antioxidantă a soluțiilor etanolice de spirulină de concentrație (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1mg/mL) nu a fost semnificativ mai scăzută decât cele ale soluției etalon de acid ascorbic ($p > 0,05$, $p = 0,21$, $p = 0,12$, $p = 0,21$), ceea ce a demonstrat că cele 3 soluții etanolice de spirulină au avut o activitate antioxidantă comparabilă cu cea a acidului ascorbic. De asemenea, cele 4 soluții metanolice de spirulină de concentrații diferite (0,05 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1mg/mL) au prezentat o activitate antioxidantă mai scăzută decât cea a acidului ascorbic, dar cu toate acestea, diferențele nu au fost semnificative ($p > 0,05$, $p = 0,16$, $p = 0,16$, $p = 0,14$, $p = 0,18$). Doar cele patru extracte apoase de spirulină de concentrații diferite (0,05 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1mg/mL) au prezentat o activitate antioxidantă mai crescută față de cea a soluției etalon de

acid ascorbic, aceste valori nefiind semnificativ mai mari decât cele ale soluției de acid ascorbic ($p > 0,05$, $p = 0,16$, $p = 0,16$, $p = 0,14$, $p = 0,18$).

Conform metodei Folin-Ciocalteu, extractul apos de spirulină a prezentat cea mai mare concentrație de polifenoli (582 mg/100g probă), fiind urmat de extractul etanolic (167 mg/100g probă). Extractul metanolic (101 mg/100g probă) și cel hidroalcoolic (100 mg/100g probă) au avut un conținut apropiat de polifenoli, în timp ce extractul acid a prezentat cea mai mică concentrație de polifenoli totali (45 mg/100g probă)

Concluzii: Conform acestui studiu, extractul apos de spirulină a demonstrat efectul antioxidant cel mai puternic și cea mai mare concentrație de polifenoli totali, motiv pentru care a fost testată în continuare în cadrul studiilor *in vitro* pe celule de melanom uman și murinic și *in vivo* pe model de șoarece cu diabet indus cu aloxan și a modelului de inflamație cutanată locală indusă chimic.

Studiul 2: Determinarea activității antimicrobiene a spirulinei

Obiective: Având în vedere că studiile anterioare au demonstrat că substanțele active cu acțiune antimicrobiană din spirulină nu sunt solubile în apă, fiind mult mai solubile în solvenți organici, în special, în metanol, am determinat activitatea antimicrobiană a extractului metanolic de spirulină (0,5 mg/ml, 1 mg/ml) prin metoda de difuziune în agar.

Materiale și metode: Soluțiile metanolice de spirulină au fost testate pentru activitatea lor antimicrobiană împotriva bacililor gram-negativi (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*), a bacililor gram-pozitivi (*Bacillus cereus*), a cocilor gram-pozitivi (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) și a fungilor (*Candida albicans*), folosind metoda de difuziune în agar. Ca și soluții standard s-au folosit: gentamicina pentru bacterii și fluconazolul pentru *Candida albicans*.

Rezultate și discuții: Soluția metanolică de spirulină cu o concentrație mai crescută (1 mg/mL) a avut un efect inhibitor asupra *E. coli* și *Enterococcus faecalis*. Cu toate acestea, zonele de inhibiție ale celor două suspensii bacteriene au fost mai mici decât cele ale soluțiilor standard, care au fost cuprinse între 16 – 19 mm.

Concluzii: Efectul inhibitor al extractului metanolic de spirulină (1 mg/mL) asupra *E. coli* și *Enterococcus faecalis* a fost cu 1 până la 3 unități mai redus decât cel al gentamicinei.

Studiul 3. Determinarea *in vitro* a potențialului antiproliferativ al spirulinei prin evaluarea viabilității celulare cu reactivul alamar blue

Obiective: Obiectivul testului cu alamar blue a constat în evaluarea citotoxicității relative și a efectului antiproliferativ al extractelor de spirulină de concentrații diferite (0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) pe linii celulare de melanom uman A375, respectiv de melanom murinic B164A5.

Materiale și metode : Soluția de spirulină s-a realizat prin dizolvarea spirulinei în dimetilsulfoxid (DMSO) după care a fost diluată cu mediu celular (DMEM) în raport de 1:1000, pentru ca DMSO să nu aibă nici un efect negativ asupra proliferării celulare. Aceasta este o metodă colorimetrică care se bazează pe transformarea alamarului blue din forma oxidată de culoare albastră, de către celulele metabolic active în forma redusă de culoare roșie.

Rezultate și discuții: Soluțiile de spirulină de diferite concentrații (0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) au inhibat proliferarea celulelor de melanom uman A375 și de melanom murinic B164A5, dependent de concentrație. Celulele de melanom murinic s-au dovedit a fi mai sensibile la stimularea cu soluțiile pe bază de spirulină.

Concluzii: Acest studiu a demonstrat că cele 3 soluții de spirulină de concentrații diferite (0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) au inhibat proliferarea celulelor de melanom uman A375 și murinic B164A5 dependent de concentrație.

Studiul 4. Determinarea *in vitro* a potențialului anticanceros al spirulinei prin proprietatea de a inhiba migrarea celulelor de melanom uman (A375)

Obiective: Scopul acestui studiu a constat în evaluarea *in vitro* a efectului antiproliferativ și antimigrator al extractelor apoase de spirulină de diferite concentrații (0,05 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL și 1 mg/mL) asupra celulelor de melanom uman A 375 utilizând metoda scratch assay.

Materiale și metode: La o confluență de 90-100% a liniei celulare de melanom uman A375, s-au realizat linii sub forma unor zgârieturi în zone bine determinate la nivelul stratului de celule cu ajutorul unei pipete sterile de (10 μ l). S-a observat atât efectul antiproliferativ, cât și efectul antimigrator al soluțiilor testate la nivelul zonei unde au fost îndepărtate celulele, la un interval de 3 ore și de 12 ore de la stimulare.

Rezultate și discuții : Migrarea unui număr semnificativ de celule în zona marcată s-a observat în cazul celulelor stimulate cu soluții de spirulină de concentrații mai scăzute (0,05 mg/mL, 0,2mg/mL, 0,5 mg/mL). De asemenea, s-

a putut observa și o creștere a numărului de celule în cazul stimulării acestora cu soluții de spirulină de concentrații reduse (0,05 mg/mL, 0,2mg/mL).

Concluzii: Soluția apoasă de spirulină a inhibat capacitatea de migrare a celulelor de melanom uman A375 în funcție de concentrație.

Studiul 5 : Determinarea in vivo a toxicității spirulinei

Obiective: Deoarece extractul de spirulină este folosit de secole fără să fi cauzat efecte adverse grave, am folosit testul limită pentru a evalua toxicitatea orală și cutanată acută a extractului etanolic de spirulină. S-a utilizat extractul etanolic de spirulina, pentru o evaporare mai rapidă a solventului la nivelul pielii.

Materiale și metode: Studiile de toxicitate acută orală și cutanată au fost realizate conform ghidurilor OECD- 425 și OECD-434.

Conform OECD-425, am început studiul de toxicitate orală acută folosind un singur șoarece, care a fost înfometat peste noapte, primind în dimineața următoare pe cale orală o doză test de spirulina 2000 mg/kg corp/24h. Animalul a supraviețuit. În continuare, am administrat aceeași doză de spirulină la alte patru femele de șoarece, care, de asemenea, au supraviețuit. Studiul s-a continuat cu administrarea unei doze de 5000 mg/kg corp/24 h inițial la un șoarece, apoi la alți 3 șoareci (femele). Conform OECD-434 cu privire la toxicitatea cutanată acută, au fost selectați 18 șoareci, care au fost divizați în 4 grupuri: 5 femele tratate cu soluție alcoolică diluată de spirulină (5000mg/kg corp), 5 masculi tratați cu soluție alcoolică diluată de spirulină (5000mg/kg corp), 4 șoareci (2 femele, 2 masculi) tratați cu soluție de alcool etilic diluată (solvent) (grup 3), 4 șoareci (2 femele, 2 masculi) netratați. Spirulina a fost dizolvată într-o soluție diluată de etanol (70 %) și apoi a fost aplicată uniform pe 10 % din suprafața totală a corpului (pe spatele șoarecilor). Nivelul de melanină și de eritem a fost decelat cu ajutorul mexametruului MX 18, iar nivelul de hidratare al pielii a fost determinat prin intermediul unui corneometru CM825 MX18. Toate animalele au fost ținute sub observație timp de 14 zile, după care au fost sacrificate.

Rezultate și discuții : Toți șoarecii care au primit spirulina în doze 2000 mg/kg corp/24 h și 5000 mg/kg corp/24 h au supraviețuit și nu au manifestat nici o modificare de comportament, cum ar fi convulsii sau disfuncții locomotorii. Valorile eritemului cutanat au fost mai crescute în primele 48 de ore de la administrarea locală a soluției de spirulină, atât la femele ($p = 0,035$), cât și la masculi ($p = 0,052$), dar, cu toate acestea, diferențe semnificative au fost înregistrate doar în cazul femelelor care prezintă o sensibilitate mai crescută la nivelul pielii. Nu au fost înregistrate modificări semnificative în ceea ce privește nivelul de hidratare al pielii și valorile concentrației de melanină

înainte și după aplicarea soluției alcoolice de spirulină la femelele ($p > 0.05$) și la masculii ($p > 0.05$) de șoarece.

Concluzii : Soluția alcoolică concentrată de spirulină (5000 mg/kg corp/24 h) a manifestat o toxicitate orală și cutanată redusă, deoarece majoritatea parametrilor cutanați determinați nu au suferit schimbări semnificative în urma administrării locale de spirulină. Doar în cazul femelelor tratate cu spirulină s-a observat un eritem semnificativ crescut față de celelalte grupuri de animale.

Studiul 6. Determinarea *in vivo* a activității antioxidante a spirulinei folosind modelul animal experimental de diabet zaharat indus cu aloxan

Obiective: Obiectivul acestui studiu *in vivo* a constatat în evaluarea efectului antioxidant, hipoglicemiant și hipolipemiant al extractului apos de spirulină la șoarecii cu diabet indus cu aloxan pe o perioadă de 28 de zile.

Materiale și metode: Inducerea diabetului la șoarecii masculi SKH1 s-a realizat prin injectarea intraperitoneală a unei doze de 150 mg/kg corp aloxan, sub formă dizolvată în soluție de NaCl 0,9%. Volumul de soluție de aloxan administrată/șoarece a fost de 0,2 mL. În studiu au fost incluși doar șoarecii care au prezentat un nivel al glicemiei mai mare de 200 mg/dl la o săptămână după injectarea aloxanului. În acest studiu experimental au fost utilizați 30 de șoareci SKH1 care au fost împărțiți, în mod egal, în 3 grupuri ($n=10$ șoareci/grup): șoareci control sănătoși, șoareci control diabetici, șoareci diabetici tratați cu spirulină. Extractul apos de spirulină (100 mg/kg corp spirulină) a fost administrat zilnic șoarecilor prin amestecare cu mâncarea standard (pelete). Pe toată durata studiului a fost verificată săptămânal greutatea și glicemia animalelor. De asemenea, s-a calculat săptămânal cantitatea medie de pelete, respectiv volumul mediu de apă consumat zilnic/șoarece pentru fiecare lot al studiului. După 28 de zile, animalele au fost sacrificate (sub anestezie). Hemoglobina glicozilată (HBA1C) și parametrii profilului lipidic (colesterol total, HDL, LDL, trigliceride) au fost determinați pe analizor de biochimie, insulinemia și catalaza au fost determinate prin tehnica ELISA, iar glutatión peroxidază și superoxid dismutază prin metode colorimetrice.

Rezultate și discuții: Efectul hipoglicemiant al spirulinei s-a evidențiat începând cu cea de a 2-a săptămână a studiului, când a fost observată o scădere semnificativă a valorilor glicemiei lotului de șoareci diabetici tratați cu spirulină, față de cei diabetici netratați ($p = 0,024$). La finalizarea studiului, valorile hemoglobinei glicozilate a șoarecilor diabetici tratați cu spirulină au fost semnificativ mai mici decât cele ale șoarecilor diabetici netratați ($p=0,045$). Nu

s-au observat diferențe semnificative în ceea ce privește secreția de insulină între șoarecii diabetici netratați și cei tratați cu spirulină, ceea ce a dovedit că spirulina nu a crescut semnificativ secreția de insulină la nivel pancreatic. Tratamentul cu spirulină a crescut semnificativ valoarea activității enzimelor antioxidante superoxid dismutază ($p=0,028$) și glutatation peroxidază ($p<0,05$), dar nu a avut un efect semnificativ asupra creșterii activității catalazei între cele două loturi de șoareci diabetici ($p=0,686$). Nu a fost observată o scădere semnificativă a valorilor colesterolului total ($p=0,736$), a LDL-ului ($p=0,830$), a trigliceridelor ($p=0,724$), respectiv o creștere a HDL-ului ($p=0,830$) în urma administrării spirulinei la șoarecii diabetici spre deosebire de cei netratați. S-a observat o creștere a cantității de mâncare și a volumului de apă consumat de șoarecii diabetici față de cei sănătoși. De asemenea, administrarea spirulinei a redus cantitatea de pelete, respectiv de apă consumată la șoarecii diabetici tratați cu spirulină față de cei diabetici netratați.

Concluzii: Tratamentul cu spirulină (100 mg/kg corp/zi) a scăzut semnificativ glicemia și hemoglobina glicozilată la șoarecii diabetici care au urmat acest tratament față de cei control diabetici. Efectul hipoglicemiant al spirulinei nu s-a datorat creșterii insulinemiei la șoarecii diabetici. Spirulina a avut un efect antioxidant semnificativ prin creșterea activității enzimelor antioxidante, în special a superoxid dismutazei și a glutatation peroxidazei, dar nu a avut un efect semnificativ asupra îmbunătățirii valorilor parametrilor lipidici la șoarecii diabetici.

Studiul 7. Determinarea in vivo a capacității antiinflamatoare a spirulinei folosind modelul animal experimental de inflamație acută indusă chimic

Obiective: Principalul obiectiv al acestui studiu a constat în evaluarea efectului antiinflamator al extractului apos de spirulină pe un model animal de inflamație acută indusă la nivelul urechii prin aplicare locală de 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA).

Materiale și metode : În acest studiu experimental au fost utilizați 35 de șoareci care au fost împărțiți, în mod egal, în 7 grupuri ($n=5$ șoareci/grup): șoareci sănătoși – netratați, șoareci tratați cu acetonă, șoareci tratați cu soluție de TPA dizolvată în acetonă – $2\mu\text{g}/20\mu\text{L}$, șoareci tratați cu indometacin $1,25\text{ mg}/25\text{mg}$ (control), șoareci la care s-a aplicat solventul soluției de spirulină – apă bidistilată – $20\mu\text{L}$, șoareci tratați cu soluție apoasă de spirulină $0,2\text{ mg}/\text{mL}$ și șoareci tratați cu soluție apoasă spirulină $1\text{ mg}/\text{mL}$. Procesul de inducere al inflamației la nivelul urechilor de șoarece s-a realizat prin aplicarea locală la nivelul urechii externe a $20\mu\text{L}$ de TPA dizolvat, în prealabil, în acetonă ($0,1\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Fiecărui șoarece care a făcut parte din grupurile 3, 4, 5, 6 și 7 i s-a

aplicat la nivelul ambelor urechi 20 μ L de TPA dizolvat în acetonă, de 7 ori pe parcursul celor 2 săptămâni de studiu. După o oră de la administrarea soluției de TPA, șoarecilor din grupul 4 li s-a administrat indometacin sub formă de cremă pe aceeași suprafață supusă tratamentului. Șoarecilor din grupul 5 li s-a administrat 20 μ L apă bidistilată, iar șoarecilor din grupurile 6 și 7 li s-a administrat 20 μ L de soluție aposă de spirulină de concentrație 0,2 mg/mL, respectiv 1 mg/mL. Parametrul TEWL sau TEWA care cuantifică gradul de pierdere transdermică de apă a fost măsurat cu ajutorul unui tewametr. După 14 zile, de la prima administrare de TPA, șoarecii au fost sacrificați, iar urechile au fost decupate, cântărite și supuse analizelor histologice.

Rezultate și discuții : În cazul șoarecilor tratați cu indometacin, respectiv cu soluții apoase de spirulină de concentrații diferite s-a observat o diminuare a procesului inflamator, prin scăderea greutatei urechilor. De asemenea, valorile DELTA TEWL au indicat o scădere semnificativă a procesului inflamator la șoarecii tratați cu o concentrație crescută de spirulină 1 mg/mL, spre deosebire de cei tratați cu soluția de spirulină de concentrație 0,2 mg/mL. Examenul histopatologic a arătat un proces inflamator moderat în cazul urechilor tratate cu soluție de spirulină de concentrație 1 mg/mL și un proces inflamator sever în cazul celor tratate cu soluția de spirulina de 0.2 mg/mL.

Concluzii: În cadrul acestui studiu s-a demonstrat că efectul antiinflamator al spirulinei este dependent de concentrație, reprezentând o alternativă terapeutică în tratarea afecțiunilor inflamatorii cutanate.

Concluzii finale:

1. Extractul apos de spirulină a prezentat activitatea antioxidantă maximă și concentrația cea mai mare de polifenoli totali.
2. Extractul metanolic de spirulină a inhibat bacteriile *E. coli* și *Enterococcus faecalis*, dar nu a avut efect asupra *Candida albicans*.
3. Spirulina a inhibat proliferarea celulelor de melanom uman A375 și murinice B164A5 dependent de concentrație.
4. Studiile de toxicitate acută orală și cutanată efectuate pe șoareci sănătoși, folosind doze limită de spirulină (5000 mg/ kg corp/ 24 h) au evidențiat siguranța și tolerabilitatea crescută a spirulinei.
5. În studiile *in vivo*, tratamentul cu spirulină a scăzut glicemia, hemoglobina glicozilată la șoareci diabetici, a crescut activitatea enzimelor antioxidante, dar nu a avut efect asupra insulinemiei și a profilului lipidic. Spirulina a demonstrat un efect anti-inflamator dependent de doză pe urechea de șoarece cu inflamație indusă chimic.