








Research Article

## Assessment of the Anti-Cancer Properties of Harmine and Low-Frequency Electromagnetic Field (50 Hz) on Ovarian Cancer Cells (A2780)

Malihe Keykhaour<sup>1</sup> , Javad Baharara<sup>2,\*</sup> , Hamed Hatami<sup>3</sup> , Maryam Lotfi<sup>2</sup> ,  
Sajad Farrokhyar<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology and Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch Islamic Azad University, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Department of Hematology, Samen- Al- Aimah Hospital, North Khorasan Social Security Organization, Bojnurd, Iran

\* **Corresponding author:** Javad Baharara, Department of Biology and Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch Islamic Azad University, Mashhad, Iran. Email: [baharara@yahoo.com](mailto:baharara@yahoo.com)

DOI: [10.61186/jams.27.3.137](https://doi.org/10.61186/jams.27.3.137)

### How to Cite this Article:

Keykhaour M, Baharara J, Hatami H, Lotfi M, Farrokhyar S. Assessment of the Anti-Cancer Properties of Harmine and Low-Frequency Electromagnetic Field(50 Hz) on Ovarian Cancer Cells (A2780). *J Arak Uni Med Sci.* 2024;27(3): 137-45. DOI: [10.61186/jams.27.3.137](https://doi.org/10.61186/jams.27.3.137)

Received: 06.04.2024

Accepted: 15.07.2024

### Keywords:

A2780 cell line;

Harmine;

Electromagnetic field

© 2024 Arak University of Medical Sciences

### Abstract

**Introduction:** Harmine is an alkaloid from the carboline family, belonging to the harmal plant, which has extensive applications in traditional medicine, with numerous studies highlighting its anti-cancer effects. Since biological processes are influenced by electromagnetic fields, the current study examined the anti-cancer effects of harmine and low-frequency electromagnetic fields on the expression of COX2, VEGF, and MMP-2 genes in the A2780 cell line.

**Methods:** In this experimental-laboratory study, ovarian cancer cell lines were randomly divided into four groups: control, harmine at concentrations of 6, 12, 24, 48, 96, and 192 micromolar, low-frequency electromagnetic field with an intensity of 50 Gauss, and harmine at a concentration of 48 micromolar with a low-frequency electromagnetic field of 50 Gauss intensity. Their toxicity was assessed using the MTT assay, nuclear morphological changes by DAPI staining, apoptotic effects of these compounds by measuring nitric oxide (NO), and gene expression changes by Real-Time PCR. Quantitative data were analyzed the ANOVA statistical test at a  $P < 0.05$  level.

**Results:** Quantitative data comparison of this research indicated that harmine and a low-frequency electromagnetic field with an intensity of 50 Gauss caused a concentration-dependent reduction in the viability of ovarian cancer cells. Additionally, in the nitric oxide test, a significant decrease was found in the control group compared to the groups treated with a concentration of 48 micromolar and synergized with a 50 Gauss electromagnetic field ( $p < 0.05$ ). The expression of the aforementioned genes in treated cells showed a significant decrease. Treating ovarian cancer cells with harmine and its combined application led to significant nuclear morphological changes, including chromatin condensation, formation of apoptotic bodies, and wrinkling of the cell membrane.

**Conclusions:** The combined application of harmine and a low-frequency electromagnetic field induced apoptosis in A2780 cancer cells and resulted in the downregulation of COX2, VEGF-A, and MMP-2 gene expression. Consequently, the combined use of harmine with a low-frequency electromagnetic field, due to its effective cytotoxicity in inhibiting proliferation and inducing apoptosis, could be a suitable candidate for clinical studies.

## ارزیابی خواص ضد سرطانی هارمین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم (۵۰ هرتز) بر سلول‌های سرطان رده‌ی تخمدان (A2780)

ملیحه کیخاپور<sup>۱</sup>، جواد بهارآرا<sup>۲\*</sup>، حامد حاتمی<sup>۳</sup>، مریم لطفی<sup>۲</sup>، سجاد فرخ یار<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، ایران

<sup>۳</sup> گروه هماتولوژی بیمارستان ثامن الائمه، سازمان تامین اجتماعی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

\* نویسنده مسئول: جواد بهارآرا، گروه زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، ایران.

ایمیل: baharara@yahoo.com

DOI: 10.61186/jams.27.3.137

<b>چکیده</b>	تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۱۸
<b>مقدمه:</b> هارمین، یک آلکالوئید از دسته کربولین از خانواده اسپند و گیاهی است که در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد. مطالعات متعددی بر اثرات ضد سرطانی آن تأکید می‌کند. از آنجایی که فرایندهای بیولوژیکی تحت تأثیر میدان‌های الکترومغناطیسی می‌باشند، در مطالعه حاضر اثرات ضد سرطانی هارمین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم بر بیان ژن‌های COX2، VEGF A و MMP-2 در رده سلولی A2780 بررسی شد.	تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۵
<b>روش کار:</b> در این پژوهش تجربی- آزمایشگاهی، رده سلولی سرطان تخمدان در ۴ گروه شاهد، هارمین با غلظت‌های (۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۹۲ میکرومولار)، میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گوس و هارمین با غلظت ۴۸ میکرومولار و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گوس به صورت تصادفی تقسیم شدند. سمیت آن‌ها با آزمون MTT، تغییرات ریخت‌شناسی هسته با رنگ‌آمیزی DAPI، اثرات آپوپتوزیس این ترکیبات با اندازه‌گیری نیتریک اکساید (NO) و تغییرات بیان ژن‌ها نیز به روش Real Time PCR بررسی گردید. داده‌های کمی با استفاده از آزمون آماری ANOVA در سطح $P < 0/05$ تجزیه و تحلیل شدند.	واژگان کلیدی: رده سلولی A2780، هارمین، میدان الکترومغناطیسی
<b>یافته‌ها:</b> مقایسه داده‌های کمی این پژوهش نشان داد که هارمین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گوس به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش زیست‌پذیری در سلول‌های سرطان تخمدان شد و همچنین در تست نیتریک اکساید گروه شاهد با گروه‌های تیمار با غلظت ۴۸ میکرومولار و هم‌افزایی با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ گوس کاهش معنی‌دار یافته است ( $P < 0/05$ )، بیان ژن‌های فوق در سلول‌های تحت تیمار کاهش معنی‌دار نشان داد و تیمار سلول‌های سرطان تخمدان با هارمین و کاربرد توأم آن باعث تغییرات ریخت‌شناسی هسته از جمله تراکم کروماتین، تشکیل اجسام آپوپتوزی و چروکیدگی غشای سلول شد.	تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.
<b>نتیجه‌گیری:</b> کاربرد توأم هارمین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم، باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی A2780 و سبب کاهش بیان ژن‌های COX2 و VEGF A و MMP-2 شد. در نتیجه کاربرد توأم هارمین با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم به دلیل داشتن سمیت سلولی مؤثر در مهار تکثیر و القا آپوپتوز می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت مطالعات کلینیکی باشد.	

ارجاع: کیخاپور ملیحه، بهارآرا جواد، حاتمی حامد، لطفی مریم، فرخ یار سجاد. ارزیابی خواص ضد سرطانی هارمین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم (۵۰ هرتز) بر سلول‌های سرطان رده‌ی تخمدان (A2780). مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک ۱۴۰۳؛ ۲۷ (۳): ۱۳۷-۱۴۵.

### مقدمه

خاص تشخیص داده نمی‌شود و باعث بروز عوارض و مرگ و میر نسبتاً بالایی می‌شود. علائمی از جمله درد لگن و درد زیر شکم، خونریزی واژینال در دوران قاعدگی، خونریزی نامنظم بعد از یائسگی، نفخ و تغییر در عادات ادراری یا روده‌ای به صورت موزیانه به عنوان تومورزایی پیشرفت می‌کنند (۱). در برخی موارد، سلول‌های سرطانی اولیه به بافت مجاور حمله کرده و به اندام‌های دور گسترش می‌یابند. این یک بیماری ناهمگن است که با

سرطان تخمدان، در رتبه هفتم شایع‌ترین تومورهای بدخیم در میان بیماری‌های زنان قرار دارد که سلامت باروری زنان را به طور جدی تهدید می‌کند. این بیماری با پاتوزنز پنهان، تشخیص اشتباه، میزان عود بالا و پیش‌بینی ضعیف مشخص می‌شود و در کلینیک، شیمی‌درمانی را در اولویت درمان قرار می‌دهند (۱). این بیماری تا مرحله پیشرفته به طور

سیتوکین‌های پیش التهابی را تنظیم کند. علاوه بر این، می‌تواند فعالیت TNF- $\alpha$  را سرکوب کند. نتایج یک مطالعه توسط Geng و همکاران نشان داد که هارمین، رشد سلول‌های سرطانی را از طریق فعال‌سازی هماهنگ آپوپتوز و مهار اتوفژی مهار می‌کند. بیش از نیمی از موارد سرطان اغلب دارای جهش در ژن P53 هستند و آلکالوئید هارمین موجود در گیاه اسپند، به عنوان یک مولکول فعال‌کننده سیگنالینگ p53 در داخل سلول‌های سرطانی، سبب جلوگیری از رشد تومور، مهار رگ‌زایی و القاء آپوپتوز می‌شود و با توقف تقسیم سلولی از رشد و پیشرفت سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۹، ۱۰).

چیت‌بندی و همکاران در سال ۲۰۲۱ با بررسی اثر الکوئیدهای هارمین بر القای آپاپتوزیس در رده سلولی سرطان کولون انسانی و تغییرات بیان ژن‌های آپاپتوتیک p53-Bax bcl2 استفاده کردند و نتایج بررسی‌ها نشان داد که هارمین به دلیل داشتن سمیت مؤثر در مهار تکثیر و القای آپاپتوز، می‌تواند در درمان سلول‌های سرطان کولون مورد استفاده قرار گیرد (۹).

بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که میدان الکترومغناطیسی، از طریق تغییر در عملکرد یا فرایندهای عملکردی سلول‌ها، باعث تکثیر و تمایز سلولی، اختلال در سیکل سلولی، القای مرگ برنامه‌ریزی شده، اختلال در تعادل درون سلولی، رونویسی DNA، بیان ژن و تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۱۱). همچنین امواج الکترومغناطیسی در فرکانس‌های مختلف می‌تواند برای درمان سرطان کاربرد داشته باشد زیرا سلول‌های سرطانی مقدار زیادی آهن دارند و بیشتر به میدان الکترومغناطیسی حساس هستند و بطور کلی پذیرفته شده است که میدان‌های ۶۰/۵۰ هرتز نمی‌تواند مقدار کافی انرژی را به سلول‌های منتقل کند و قادر به شکستن تک رشته و یا دو رشته DNA سلول‌های در معرض تشعشعات نمی‌باشد تا بتواند مستقیماً به DNA آسیب برساند و اثرات ژنوتوکسیک ایجاد کند، همچنین بیان تغییر یافته پروتئین‌های تنظیمی درگیر در مسیرهای انتقال سیگنال که مسیر آپاپتوز را کنترل می‌کند نیز می‌تواند بر حساسیت دارویی تأثیر بگذارند (۱۲، ۱۳). از آنجایی که در دنیای مدرن، امواج الکترومغناطیسی به بخش جدایی‌ناپذیر از زندگی روزمره تبدیل شده است در این پژوهش، اثر توأم میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم به همراه عصاره هارمین بر سرطان تخمدان رده سلولی A2780 بررسی شد.

### روش کار

در این مطالعه، ۴ گروه مورد بررسی قرار گرفتند از جمله: شاهد، هارمین با غلظت‌های (۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۹۲ میکرومولار)، میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گوس و هارمین با غلظت ۴۸ میکرومولار و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گوس تیمار شدند. سلول‌های سرطانی A2780 از انستیتو پاستور تهیه شد و در محیط RPMI1640 با ۱۰ درصد FBS همراه با آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور حاوی 5% CO<sub>2</sub> در فلاسک T25 کشت داده شدند. بعد از طی سه پاساژ به منظور خالص‌سازی، از سلول‌ها برای انجام مراحل بعد استفاده شد.

نحوه تولید میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم: به منظور

جهش‌های ارثی در ژن‌های حساسیت، مانند ژن سرکوب‌کننده تومور p53، انکوژن‌های ERBB2 و PIK3CA و غیره مرتبط است. تقریباً ۱۰ درصد از سرطان تخمدان در زنان حامل جهش‌های BRCA1 یا BRCA2 رخ می‌دهد (۱). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که عامل اساسی گسترش و تهاجم نامحدود تومور COX-2 (cyclooxygenase-2)، VEGF (Vascular endothelial growth factor) و MMP2 است.

COX-2 آنزیمی است که می‌تواند اسید آراشیدونیک را به پروستاگلاندین‌ها (PGs) تبدیل کند و شواهدی وجود دارد که بیان بیش از حد COX-2 باعث افزایش تکثیر و تهاجم سلول‌های تومور می‌شود (۲). از طرفی سیگنال‌دهی پاراکرین بین تومور و سلول‌های اپی‌تلیال و استرومای اطراف برای حفظ ریز محیط تومور، پیشرفت تومور و سرطان تخمدان حیاتی است (۳). سیگنال‌دهی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) واسطه کلیدی رگ‌زایی و شناسایی نقش آن و سایر سیگنال‌دهی‌ها است (۳). مسیرهای مربوط به تنظیم رگ‌زایی تومور در برابر سرطان تخمدان ارزشمند است و فرض شده که مسیر سیگنال (JAK) برای تومورزایی مبدل و فعال‌کننده مسیر رونویسی (STAT) هستند در واقع، پروتئین‌های STAT به عنوان گروهی از فاکتورهای رونویسی سیتوپلاسمی نهفته که در واکنش به سیگنالینگ سیتوکین فعال می‌شوند، مشخص شدند (۳، ۴). بیان نابجای ژن‌های STAT باعث اختلال در بیان و افزایش بیان ژن VEGF شده و به نوبه خود منجر به فعال شدن VEGFR-2 در سلول‌های اندوتلیال می‌شود و در نتیجه باعث تکثیر غیر قابل کنترل سلول و ایجاد سرطان می‌گردد، علاوه بر این، VEGFR-2، که عمدتاً در سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود، به عنوان یکی از اهداف رونویسی مستقیم STAT3 شناخته می‌شود (۴، ۵). درمان‌های معمول این بیماری روش‌های شیمی‌درمانی، رادیودرمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و غیره می‌باشد، اما به دلیل عوارض جانبی ناشی از این راهکارها، استفاده از شیوه‌های درمانی جایگزین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱، ۶).

یکی از این راهکارهای جایگزین استفاده از آلکالوئیدها می‌باشد (۶). آلکالوئیدها از جمله مواد شیمیایی طبیعی موجود در غذاهای کاربردی و مواد مغذی هستند و برای پیشگیری و یا مدیریت استرس اکسیداتیو و بیماری‌های ناشی از التهاب پیشنهاد شده‌اند (۶).

امروزه طیف گسترده‌ای از گیاهان که سرشار از آلکالوئیدها هستند کشف شده‌اند که فعالیت بیولوژیکی از خود نشان می‌دهند (۷). آلکالوئیدها، دارای فعالیت ضد رگ‌زایی هستند و از طریق چندین اثر عمل می‌کنند (۸). مکانیسم‌های مهار رگ‌زایی آلکالوئیدهای زیادی وجود دارد، تقریباً همه آلکالوئیدها یک فعالیت ضد تکثیر و سمیت در برابر رده‌های سلولی سرطانی نشان می‌دهند که از چندین منشاء بافت‌شناسی مختلف (مری، معده، روده بزرگ، کبد، ریه، پستان، استخوان و مغز) مشتق شده‌اند و این فعالیت به فعال شدن سلول‌های سرطانی و بیان ژن‌های آپاپتوز نیز بستگی دارد (۶). هارمین نیز حاوی آلکالوئید است و عموماً در دانه‌ها و ریشه اسپند یافت می‌شود.

هارمین، می‌تواند آپاپتوز را القا کند و فاکتورهای رونویسی و

هارمین تیمار شدند.

برای بررسی غلظت نیتریک اکساید در سلول‌ها از تست گریس استفاده شد (۱۵). در این روش واکنشگر گریس برای سنجش غلظت نیتریک اکساید به مایع رویی سلول‌ها در گروه‌های شاهد و تیماری مختلف اضافه گردید و تمامی مراحل طبق پروتکل موجود در داخل کیت خریداری شده انجام شد و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع فوقانی با ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس حاوی ۲ درصد سولفانیل آمید در اسید سولفوریک ۵ درصد و ۰/۱ درصد ۱-نفتیل اتیلن دی‌آمین مخلوط گردید. سپس جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. هرچه میزان نیتریک اکساید در نمونه بیشتر باشد، میزان جذب در آن طول موج بیشتر خواهد بود.

#### بررسی تغییرات ریخت‌شناسی هسته در سلول‌های تیماری با

رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI به منظور ارزیابی ریخت‌شناسی هسته‌ها از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. این تست جهت تأیید تأثیر سمیت سلول و ضد تکثیر هارمین مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور بعد از تیمار، سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با متانول فیکس و سپس توسط DAPI رنگ‌آمیزی شدند. در انتها نمونه توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد (۱۶).

#### بررسی بیان ژن‌های VEGF A و COX2 و MMP2 در این

مطالعه میزان بیان ژن‌های VEGF A و COX2 و MMP2 بر سلول‌های A2780 تحت تیمار با هارمین و هم‌افزایی این ماده با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گاوس با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها، در ابتدا RNA سلول‌های تیمار شده توسط هارمین و شاهد با استفاده از کیت استخراج RNA (کیت پارس توس) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. پس از بررسی کمی RNA جهت ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ساخت cDNA از کیت پارس توس بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد (۱۷). در این پژوهش از ژن‌ها VEGF A و COX2 و MMP2 به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. توالی پرایمرهای ژن‌های یاد شده در جدول ۱ آمده است.

داده‌های کمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) و با روش‌های آماری ANOVA و در سطح معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) تجزیه و تحلیل شدند و در موارد لزوم از تست دانت و جهت رسم نمودارها از اکسل استفاده شد.

**ملاحظات اخلاقی:** محققین به تمامی اصول پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های توصیه شده توسط معاهده هلسینکی در مورد رعایت اخلاق در پژوهش پای‌بند بودند. کلیه ضوابط اخلاق در پژوهش لحاظ شده است.

تولید میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم (LF-EMF) از سیستم مولد میدان الکترومغناطیسی در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی (طراحی شده توسط بهارآرا و همکاران) جهت انجام آزمایشات استفاده شد. این سیستم می‌تواند میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم (۵۰ هرتز) و دامنه شدت بین ۱ تا ۶۰ میلی‌تسلا (۱۰ تا ۶۰۰ گاوس) فراهم کند. به طور خلاصه، سیستم الکترومغناطیسی شامل شیر برقی، منبع تغذیه با محدوده ولتاژ ۰ تا ۳۰۰ ولت، خازن، آمپر متر و سیستم انکوباسیون است. شدت مغناطیسی با تغییر ولتاژ الکتریکی مطابق با معادله  $4\pi \mu_0 \ln$ ، Tesla، شدت میدان الکترومغناطیسی بر حسب B تنظیم شد (محاسبه با  $I, B = \mu nI$  شدت جریان). برای اطمینان از سیستم (LF-EMF) صحت شدت میدان الکترومغناطیسی، از یک تسلا متر برای کنترل و کالیبراسیون استفاده شد. در طول آزمایش، دما  $37 \pm 0/3$  درجه‌ی سانتی‌گراد باقی ماند (۱۴).

#### تعیین سمیت سلولی Cell viability by MTT assay بررسی

اثر سمیت هارمین با استفاده از روش MTT تعیین گردید. به منظور بررسی تأثیر هارمین بر میزان تکثیر و بقای سلولی، تعداد  $5 \times 10^5$  سلول در میلی‌لیتر در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور تیمار شدند. سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف (۶-۱۲-۲۴-۴۸-۹۶-۱۹۲ میکرومولار) هارمین و فاقد هارمین (گروه شاهد) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. همچنین برای بررسی اثرات میدان الکترو مغناطیسی سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و سپس به مدت ۴ ساعت در میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس قرار گرفتند. برای تیمار در گروه هم‌افزایی از غلظت (۴۸ میکرومولار) کمتر از IC50 بصورت هم‌زمان با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم استفاده گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر، رنگ MTT به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از پایان سه ساعت زمان انکوباسیون، جهت سنجش نوری به هر یک از چاهک‌ها دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه گردید. بلورهای فورمازان تولید شده درون هر چاهک با پیپتاژ به طور کامل بصورت محلول درآمدند. چگالی نوری محلول درون هر چاهک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۵۰ نانومتر سنجیده شد (۹).

$100 * (A_{treatment} / A_{control}) =$  درصد زیست‌پذیری سلول‌ها

#### بررسی توان زیستی سلول‌ها با انجام تست نیتریک اکساید: در

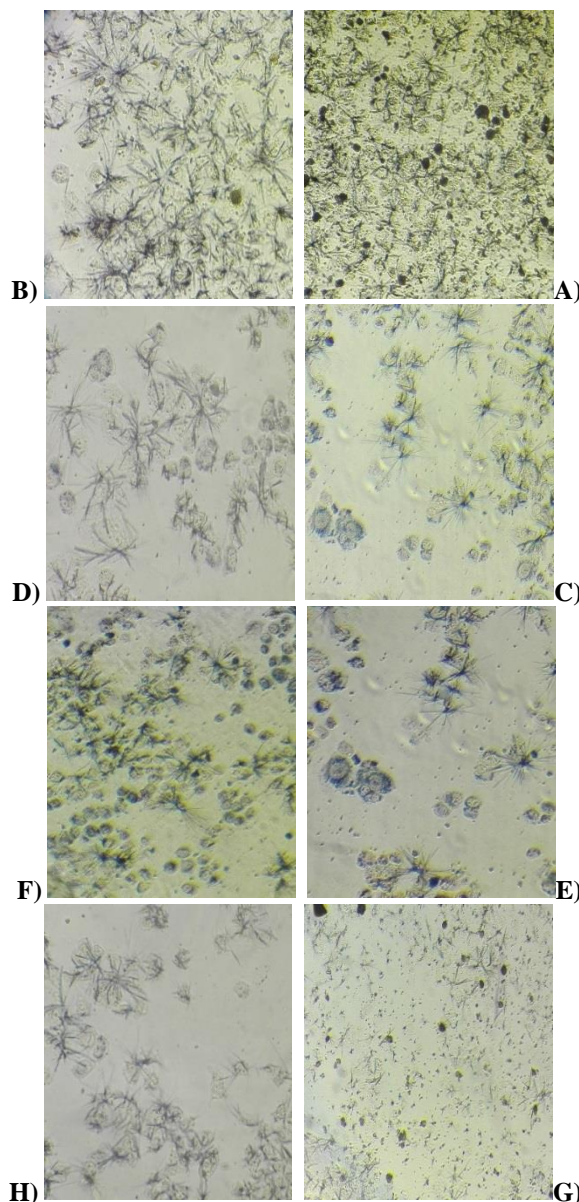
این مرحله پس از کشت سلول‌های A2780 در داخل پلیت ۹۶ خانه پلیت را به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار دادیم بعد سلول‌ها به گروه‌های شاهد، تیمار و هم‌افزایی تقسیم شدند و سپس سلول‌ها توسط غلظت (۴۸ میکرومولار) و هم‌افزایی (۴۸ میکرومولار) از محلول ۱ میلی‌مولار

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد بررسی

Gene	Forward $\Delta \rightarrow 3'$	Reverse $\Delta \rightarrow 3'$
COX2	ACC AGA GCA GGC AGA TGA AAT ACC-A	CAG GAT ACA GCT CCA CAG CAT CG
MMP2	CAT CGC TCA GAT CCG TGG TGA GA	TCC TCC TGT GGG GCC TCG TAT
VEGF A	AAG ATC CGC AGA CGT GTA AAT GTT CC	CGG CTT GTC ACA TCT GCA AGT ACG
GAPDH	GAACATCATCCCTGCATCCA	GTTCA CCAGTGAGCTTCCC

## یافته‌ها

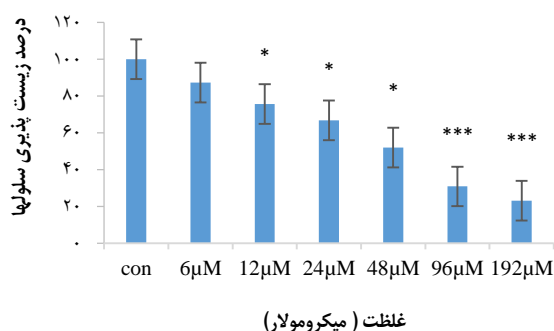
ریخت شناسی سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف هارمین و کاربرد توام این دو عامل در شکل ۱ نشان می‌دهد که بخش زیادی از سلول‌های سرطانی تخمدان تیمار شده با هارمین از ظرف کشت جدا شده‌اند و سلول‌های چسبیده باقی مانده با از دست دادن چسبندگی، انقباض و گرد شدن که تغییرات ریخت‌شناسی مرتبط با آپوپتوز است نمایان می‌شود.



شکل ۱. تصویر ریخت‌شناسی سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف هارمین با بزرگ‌نمایی ۴۰X. A- سلول‌ها بدون دریافت هارمین. B- تیمار سلول‌ها با غلظت ۶ میکرومولار هارمین. C- تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۲ میکرومولار هارمین. D- تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۴ میکرومولار هارمین. E- تیمار سلول‌ها با غلظت ۴۸ میکرومولار هارمین. F- تیمار سلول‌ها با غلظت ۹۶ میکرومولار هارمین. G- تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۹۲ میکرومولار هارمین. H- کاربرد توأم هارمین (۴۸ میکرومولار) و میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس.

## اثرات غلظت‌های مختلف هارمین بر زیست‌پذیری سلول‌های

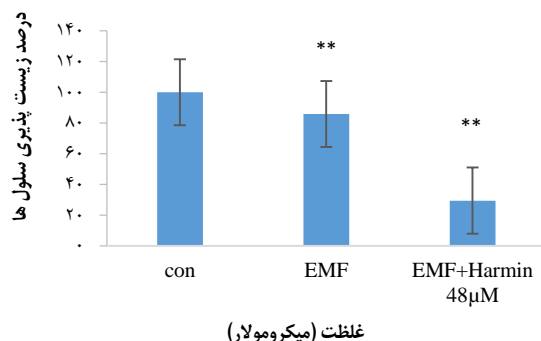
A2780: به منظور تعیین زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی A2780 از آزمون سمیت سلولی با استفاده از MTT استفاده شد. با توجه به نمودار ۱، هارمین باعث کاهش معنی‌دار زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 تحت تیمار با همه گروه‌ها به‌جز گروه‌های تجربی ۱ (۶ μM) نسبت به گروه شاهد شد ( $P < 0/05$ ). همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت میانگین، درصد بقاء کاهش یافته است. در نمودار ۲، نشان می‌دهد که کاربرد توأم هارمین (۴۸ میکرومولار) با میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس بیشترین کاهش را نسبت به گروه شاهد داشته است.



نمودار ۱. میانگین درصد بقاء  
\* در سطح  $P < 0/05$  معنی‌دار است؛ \*\*\* در سطح  $P < 0/001$  معنی‌دار است

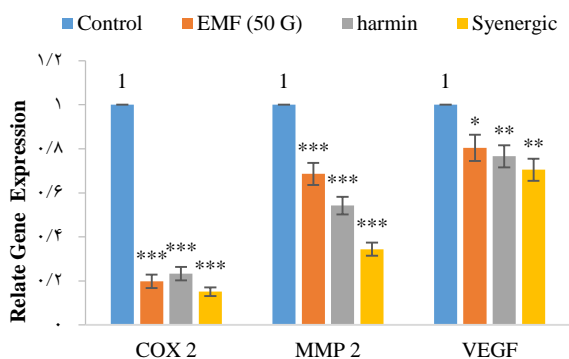
## بررسی نتایج ارزیابی نیتریک اکساید (NO): به منظور بررسی

اثرات آپوپتوزیس هارمین و میدان الکترومغناطیسی از روش نیتریک اکساید (NO) استفاده شد. با توجه به نمودار ۳، نشان می‌دهد که مقایسه میانگین غلظت نیتریک اکساید در گروه تیمار با غلظت ۴۸ میکرومولار هارمین نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌دار داشته است ( $P < 0/01$ ) و همچنین در سلول‌های تحت تیمار هارمین با غلظت (۴۸ میکرومولار) و میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس نیز کاهش معنی‌دار دارد ( $P < 0/001$ ).



نمودار ۲. مقایسه اثر میدان الکترومغناطیسی (۵۰ گاوس) و کاربرد توأم هارمین (۴۸ میکرومولار) با میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس بر درصد زیست‌پذیری سلول‌ها  
\*\* در سطح  $P < 0/01$  معنی‌دار است.

الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس کاهش یافته است ( $P < 0.001$ ). همچنین کاربرد توأم میدان الکترو مغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس و هارمین با غلظت (۴۸ میکرومولار) باعث کاهش بیشتری در سطح بیان این ژن شده است.

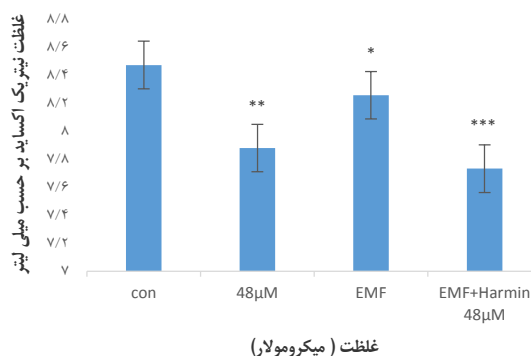


نمودار ۴. مقایسه مقدار بیان ژن‌های COX2, VEGF A, MMP2 تحت تیمار با هارمین و میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس و کاربرد توأم میدان الکترو مغناطیسی و هارمین در سلول‌های A2780

#### بحث

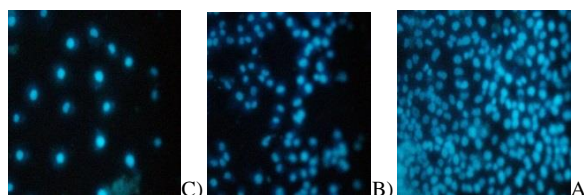
سرطان، یک بیماری کشنده و علت اصلی مرگ نه تنها در کشورهای توسعه نیافته، بلکه در کشورهای توسعه یافته است (۹، ۱۸) که عمدتاً به دلیل توانایی تهاجمی و متاستاتیکی آن است که ممکن است با تغییر مکانیکی در سلول‌های سرطانی فردی و همچنین تغییرات در ریزمحیط سرطان مرتبط باشد. مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی برای تنظیم مکانوتیپ‌های سلولی نسبتاً مبهم هستند، اگرچه پذیرفته شده است که فرایندهای بیولوژیکی پیچیده، مانند مسیرهای مرتبط با چسبندگی سلولی، بازسازی اسکلت سلولی و اسکلت هسته‌ای درگیر هستند. در طی سال‌های اخیر، شواهد در حال ظهور نشان داده‌اند که تغییرات مکانیکی سلولی، مانند تغییرات در سفتی سلولی و تغییر شکل‌پذیری، رویدادهای فنوتیپی رایج در توسعه و پیشرفت سرطان هستند و دانشمندان با تلاش‌های فراوان در زمینه سرطان توانسته‌اند برخی از بیماری‌های بدخیم را به مرحله درمان برسانند (۹، ۱۸). با این حال روش‌های رایج درمان سرطان، سبب دستیابی به پیشرفت‌هایی در این زمینه شده است همچنین، استراتژی‌های درمان‌های اخیر، نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه محصولات طبیعی داشته که سبب تولید داروهای مؤثری در درمان سرطان گردیده است (۹).

این تحقیق با هدف بررسی اثر آلكالوئید هارمین و میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس بر القای اپوپتوزیس و اثرات ضد سرطانی آن بر رده سلولی سرطان تخمدان A2780 انجام شد. نتایج نشان داد که هارمین، منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 نسبت به گروه شاهد شده است و هم‌افزایی میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس و هارمین باعث کاهش مؤثرتر میانگین زیست‌پذیری سلول‌ها در مقایسه با کاربرد هر یک از عوامل میدان الکترومغناطیسی و هارمین به تنهایی شد. بعلاوه هارمین به‌صورت توأم با



نمودار ۳. مقایسه میانگین غلظت نیتریک آکساید در گروه‌های تجربی با گروه شاهد. در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار است؛ \*؛ در سطح  $P < 0.01$  معنی‌دار است؛ \*\*؛ در سطح  $P < 0.001$  معنی‌دار است.

**نتایج بررسی DAPI** برای بررسی اثرات هارمین و کاربرد توأم آن با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم بر روی هسته سلول‌ها، از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. تغییرات ریخت‌شناسی حاصل از آپوپتوز همچون فشردگی و چروکیدگی هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک با این رنگ‌آمیزی قابل تشخیص می‌باشد. در شکل ۲ مشاهده می‌شود که تیمار هارمین و کاربرد توأم آن با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم بویژه در غلظت ۴۸ میکرومولار باعث قطعه‌قطعه شدن هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک نسبت به گروه شاهد شد.



شکل ۲. تصویر سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف هارمین با بزرگ‌نمایی  $40\times$ . A- سلول‌ها بدون دریافت هارمین B- تیمار سلول با میدان الکترومغناطیسی. C- تیمار سلول‌ها با غلظت ۶۰ (IC = ۵۰) میکرومولار هارمین و میدان الکترومغناطیسی

**نتایج بررسی بیان ژن‌های COX2, MMP2, VEGF A تحت هارمین با روش آنالیز Real Time PCR** نتایج آزمایشات در نمودار ۴ نشان داد که سطح بیان ژن VEGF A نسبت به نمونه شاهد در سلول‌های تحت تیمار هارمین با غلظت (۴۸ میکرومولار) و میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). همچنین کاربرد توأم این دو عامل باعث کاهش بیشتری در سطح بیان این ژن شده است. نتایج سطح بیان ژن MMP2 نسبت به نمونه کنترل در سلول‌های تحت تیمار هارمین با غلظت (۴۸ میکرومولار) و میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس کاهش یافته است ( $P < 0.001$ ). همچنین کاربرد توأم میدان الکترو مغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس و هارمین با غلظت (۴۸ میکرومولار) باعث کاهش بیشتری در سطح بیان این ژن شده است و نتایج سطح بیان ژن COX2 نسبت به نمونه کنترل در سلول‌های تحت تیمار هارمین با غلظت (۴۸ میکرومولار) و میدان

شده است زیرا اجزای غشای پایه مانند کلاژن نوع I را تخریب کرده و همچنین، MMP-14 سرطان را به طور کلی پیش‌بینی می‌کند (۲۱، ۲۳). MMP-14 یک دایمر در سطح سلول و یک کمپلکس با MMP-2 و TIMP-2 (مهارکننده بافت متالوپروتئیناز ۲) تشکیل می‌دهد تا MMP-2 را فعال کند (۲۲). بیان MMP-14 بسته به نوع سرطان متفاوت است و در تومورهای مزانشیمی، ملانوم‌ها و تومورهای مغزی زیاد است و همچنین در تومورهای کبدی و در کارسینوم‌ها از جمله سرطان سینه یافت می‌شود (۲۳). به طور کلی بیان متالوپروتئینازهای ماتریکس ۲، ۹ و ۱۴ (MMP-2، MMP-9، MMP-14) و مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئیناز ۱ و ۲ (TIMP-1، TIMP-2) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF-A) در تهاجم تومور و متاستاز از طریق تخریب ماتریکس خارج سلولی نقش دارد (۲۳).

به طور خاص، MMPها نقش مهمی را در سرطان بازی می‌کند زیرا پروتئین های Ras می‌تواند RECK را کاهش دهند که ممکن است منجر به افزایش ترشح MMP9 شود و در نتیجه رگ‌زایی ناشی از VEGF-A را مهار کند (۲۴، ۲۵). رگ‌زایی در سرطان، از جمله سرطان‌های زنان، برای رشد تومورهای اولیه و متاستاز ثانویه مورد نیاز است و توسعه درمان‌های ضد رگ‌زایی در سرطان‌های زنان و بهبود اثر بخشی آن تمرکز اصلی تحقیقات بنیادی و بالینی بوده است (۲۵). از طرفی پروستاگلاندین‌ها که باعث التهاب و درد می‌شوند تنها از طریق COX2 تولید می‌شوند، هدف داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی، با تولید پروستاگلاندین‌ها واسطه اتساع عروق و تجمع پلاکتی است و مهار بیان COX-2 و iNOS توسط هارمین در داخل بدن می‌تواند از طریق تعدیل STAT1، JNK، NF-κB در برابر التهاب عفونی موثر باشد (۲۶). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد توام میدان‌های الکترومغناطیسی و هارمین باعث کاهش بیشتر بیان این ژن‌ها در مقایسه با کاربرد هریک به تنهایی می‌شود. نیتریک اکسید یک مولکول پیام رسان ناپایدار است که توسط سه ایزوفورم مختلف تولید می‌شود و در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیک بدن نقش دارد (۲۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقدار نیتریک اکساید تحت تیمار با میدان الکترومغناطیسی (۵۰ گاوس) و هارمین کاهش می‌یابد ولی کاربرد توام این دو عامل اثرات کاهشی شدیدتری نسبت به کاربرد هریک به تنهایی بر غلظت نیتریک اکساید دارد که این نتایج با مطالعات قبلی همسو بود.

استفاده از ترکیبات طبیعی با توجه به داشتن عوارض جانبی کمتر نسبت به روش‌های رایج درمان سرطان می‌تواند مسیر امیدوارکننده‌ای برای درمان سرطان محسوب گردد. هارمین با توجه به کم‌هزینه و در دسترس بودن آن می‌تواند به عنوان یک نامزد داروی ضد سرطان بیشتر مورد توجه و مطالعه قرار گیرد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کاربرد توام هارمین و میدان الکترومغناطیسی و سطح بیان ژن COX2 (بیومارکر ویژه التهاب‌زا)؛ سطح بیان ژن MMP2 (بیومارکر ویژه متاستازیک) و سطح بیان ژن VEGF A (بیومارکر ویژه آنژیوژنیک) که از اهداف مهم در درمان انواع سرطان‌ها می‌باشند را نسبت به گروه شاهد به طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد. در نهایت نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند پیشنهاداتی را در جهت استفاده از ترکیبات طبیعی همراه با

میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس، کاهش معنی‌داری در بیان ژن‌های MMP2، VEGF a و COX2 را باعث شد. استفاده از عصاره‌های گیاهی متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از گیاهان به عنوان آنتی‌اکسیدان در صنایع پزشکی، دارویی و صنایع غذایی کاربرد وسیعی پیدا نموده است؛ با توجه به عدم پذیرش افزودنی‌های شیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از سوی مصرف‌کنندگان به دلیل اثرات نامطلوب این ترکیبات بر سلامت انسان و از آن‌جا که برای هارمین اثرات درمانی متعدد از جمله ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد شده است از آنجایی که تاکنون نیز مطالعه‌ای در زمینه اثر هم‌افزایی هارمین و میدان الکترومغناطیسی بر خواص ضد سرطانی هارمین و میدان الکترومغناطیسی روی سرطان تخمدان رده سلولی A2780 این موضوع ما را بر آن داشت که به بررسی اثر احتمالی بیولوژیکی این مواد و ارزیابی فعالیت ضد سرطانی آنها بپردازیم.

برای مطالعه اثرات ضد سرطانی هارمین بر رده سلولی A2780، میدان‌های الکترومغناطیسی و کاربرد توأم این دو عامل از رده سلولی سرطان تخمدان A2780 مقاوم به سیس پلاتین استفاده شد. در گام اول اثرات سمیت هارمین بر رده سلولی مذکور بررسی گردید. برای بررسی سمیت از آزمون MTT استفاده شد. این آزمون بر پایه احیای نمک‌های تترازولیوم به وسیله فعالیت‌های متابولیکی سلول زنده (توسط آنزیم دهیدروژناز) استوار است که در نتیجه‌ی فرایند احیا، بلورهای بنفش‌رنگ فورمازون تشکیل می‌شود. سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و به وسیله‌ی روش‌های اسپکتروفوتومتری مقدارسنجی می‌شود. مقدار بلور فورمازون ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده باشد. نتایج آزمون MTT نشان داد که هارمین سبب کاهش تعداد و کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی تخمدان رده A2780 به صورت وابسته به غلظت می‌شود. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس باعث کاهش معنادار در زیست‌پذیری سلول‌های رده A2780 می‌شود. اثرات ضد تکثیر می‌تواند میدان‌های الکترومغناطیسی در مطالعات قبلی نیز بررسی شده است. در تحقیق حاضر مشاهده شد که کاربرد توأم میدان الکترومغناطیسی با شدت ۵۰ گاوس و هارمین با غلظت (۴۸ میکرومولار) باعث کاهش بیشتری در رشد سلول‌های سرطانی رده A2780 نسبت به زمانی که از این دو عامل به صورت تنهایی استفاده شد می‌شود.

افزایش برخی شاخص‌های آنژیوژنیک مانند VEGF نه تنها تشکیل عروق خونی جدید بلکه عروق لنفاوی درون تومور را نیز افزایش می‌دهد (۱۹). MMPها نقش مهمی نه تنها در فرایندهای فیزیولوژیکی طبیعی، بلکه در فرایندهای پاتولوژیک مانند التهاب و سرطان نقش دارند، بیش از ۲۰ نوع MMP وجود دارد که توسط بدن تولید می‌شود که عملکردهای بیولوژیکی متعددی را انجام می‌دهد که برای فرایندهای تخریب، مهاجرت سلولی، اپوپتوز ضروری هستند (۲۱-۲۳). اکثر MMPها به صورت پروپروتئین‌های غیرفعال ترشح می‌شوند که در صورت جدا شدن توسط پروتئینازهای خارج سلولی فعال می‌شوند (۲۱).

در سال ۱۹۹۴، MMP-14 اولین MMP متصل به غشا بود که توصیف شد و نقش آن در تهاجم و متاستاز در مدل‌های حیوانی نشان داده

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با شماره پایان‌نامه ۱۱۱۳۰۵۱۷۹۵۲۰۰۲ به تأیید مدیر پژوهشی دانشکده علوم پایه مشهد رسیده است. بدین‌وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی دانشگاه آزاد اسلامی تشکر می‌شود.

### سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان به یک اندازه در نگارش مقاله سهیم بوده‌اند.

### تضاد منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

میدان الکترومغناطیس به عنوان یک روش مکمل کنترل رشد سلول‌های سرطانی ارائه کند.

### نتیجه‌گیری

استفاده از ترکیبات طبیعی با توجه به داشتن عوارض جانبی کمتر نسبت به روش‌های رایج درمان سرطان، می‌تواند مسیر امیدوارکننده‌ای برای درمان سرطان محسوب گردد. یافته‌های این بررسی بیانگر آن بود که کاربرد توأم هارمین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم در رده سلولی A2780، دارای اثرات ضد تکثیر و ضد آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی رده A2780 می‌باشد. لذا مطالعات بالینی بر روی مدل‌های حیوانی جهت تأیید این موضوع امری ضروری است.

### References

- Mirzaie A, Diba H, Khosravi-Nejad F, Javanmardi H. Synergistic cytotoxicity of bevacizumab and silver nanoparticles on ovarian cancer cell line (A2780) and analysis of Bcl-2 and caspase 3 apoptotic genes expression [in Persian]. *Cell and Tissue Journal*. 2021;12(2):72-8. doi: 10.52547/JCT.12.2.72
- Guo H, Xue W, Zhao Q, Zhao H, Hu Z, Zhang X, Duan GJJoCS. Correlation and significance of COX-2, Ki67, VEGF and other immune indexes with the growth of malignant pulmonary nodules. *J Cardiothorac Surg*. 2022;17(1):290. pmid: 36384712 doi: 10.1186/s13019-022-02039-7
- Masoumi-Dehghi S, Babashah S, Sadeghizadeh M. microRNA-141-3p-containing small extracellular vesicles derived from epithelial ovarian cancer cells promote endothelial cell angiogenesis through activating the JAK/STAT3 and NF-κB signaling pathways. *J Cell Commun Signal*. 2020;14(2):233-44.
- Chen S-M, Jahejo AR, Nabi F, Ahmed S, Zhao J-f, Yu J, et al. Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway-related genes STAT3, SOCS3 and their role in thiram induced tibial dyschondroplasia chickens. *Res Vet Sci*. 2021;136:25-31.
- Sanaei Jahromi M, Kavousi F. Evaluation of the effect of valproic acid on JAK/STAT pathway, SOCS1, SOCS3, Bcl-xL, c-Myc, and Mcl-1 gene expression, cell growth inhibition and apoptosis induction in human colon cancer HT29 cell line [in Persian]. *Armaghan-e Danesh*. 2021;26(3):324-37. doi: 10.52547/armaghanj.26.3.324
- Alasvand M, Assadollahi V, Ambra R, Hedayati E, Kooti W, Peluso IJom, longevity c. Antiangiogenic effect of alkaloids. *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 2019:9475908. pmid: 31178979 doi: 10.1155/2019/9475908
- Adamski Z, Blythe LL, Milella L, Bufo SA. Biological activities of alkaloids: from toxicology to pharmacology. *Toxins (Basel)*. 2020;12(4):210. pmid: 32224853 doi: 10.3390/toxins12040210
- Wink M. Annual plant reviews, biochemistry of plant secondary metabolism. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2011.p.99-1177.
- Geng X, Ren Y, Wang F, Tian D, Yao X, Zhang Y. Harmine inhibit cancer cell growth through coordinated activation of apoptosis and inhibition of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;498(1):99-104. pmid: 29501493 doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.205
- Chitbandi R, Baharara J, Tehranipour M. Apoptosis induction of harmine on human colon cancer cell line HT29 and alteration in apoptotic genes expression P53, Bax and Bcl-2 [in Persian]. *Journal of Animal Biology* 2022;14(4):51-63.
- Roshankhah S, Arji Rodsari B, Jalili C, Salahshoor MR. The role of harmine in up-regulating p53 gene expression and inducing apoptosis in MCF-7 cell line [in Persian]. *Middle East Journal of Cancer*. 2020;11(1):34-41. doi: 10.30476/mejc.2019.78703.0
- Moshtaghi S, Parivar K, Baharara J, Hayati N, Kerachian MA. Synergic application effects of bromelain and low-frequency electromagnetic field on the aortic ring on angiogenesis [in Persian]. *Journal of Plasma and Biomarkers*. 2019;12(1):13-24.
- Barati M, Darvishi B, Javidi MA, Mohammadian A, Shariatpanahi SP, Eisavand MR, et al. Cellular stress response to extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF): An explanation for controversial effects of ELF-EMF on apoptosis. *Cell Prolif*. 2021;54(12):e13154. pmid: 34741480 doi: 10.1111/cpr.13154
- Baharara J, Zahedifar Z. The effect of low-frequency electromagnetic fields on some biological activities of animals [in Persian]. *J Arak Univ Med Sci*. 2012;15(7):80-93.
- Baharara J, Hadad F, Ashraf A, Khanderoo E. The effect of extremely low frequency electromagnetic field [50Hz] on induction of chromosomal damages on bone marrow erythrocytes of male Balb/C mouse [in Persian]. *J Arak Univ Med Sci* 2008;11(2):19-26.
- Maftoon M, Ahmadi R. The cytotoxic effect of progesterone on viability and Nitric oxide gene expression in fibroblastoma cells (L929) [in Persian]. *Res Cell and Tissue*. 2021;2(2):28-34.
- Khezri S, Baharara J, Amini E. Evaluation of the effect of menthol on apoptosis induction and Bax and Bcl2 gene expression in the CT-26 colon cancer cell line[in Persian]. *Cell and Tissue Journal*. 2021;12(1):20-8. doi: 10.52547/JCT.12.1.20
- Salek F, Baharara J, Nejad Shahrokhbadi K, Amini E. Comparison of the effect of exosomes derived from Sertoli cells with vitamin C on damage induced by electromagnetic field (50 Hz) in spermatogonial stem cells [in Persian]. *Journal of Plasma and Biomarkers*. 2021; 1:173:112-22.
- Thawabteh A, Juma S, Bader M, Karaman D, Scrano L, Bufo SA, et al. The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. *Toxins (Basel)*. 2019;11(11):656.
- Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. *Front Oncol*. 2019;9:1370. pmid: 31921634 doi: 10.3389/fonc.2019.01370
- Ribatti D, Solimando AG, Pezzella F. The anti-VEGF (R) drug discovery legacy: improving attrition rates by breaking the vicious cycle of angiogenesis in cancer. *Cancers (Basel)*.



- 2021;13(14):3433. **pmid:** 34298648 **doi:** 10.3390/cancers13143433
22. Caroline Vos M, van der Wurff AA, van Kuppevelt TH, Massuger LFAG. The role of MMP-14 in ovarian cancer: a systematic review. *J Ovarian Res.* 2021;14(1):101. **pmid:** 34344453 **doi:** 10.1186/s13048-021-00852-7
23. Carey P, Low E, Harper E, Stack MS. Metalloproteinases in ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3403. **pmid:** 33810259 **doi:** 10.3390/ijms22073403
24. Azevedo Martins JM, Rabelo-Santos SH, do Amaral Westin MC, Zeferino LC. Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis. *BMC Cancer.* 2020;20(1):660. **pmid:** 32669083 **doi:** 10.1186/s12885-020-07150-3
25. Miller F, Singh GJOEoCCotB. Cancer and Angiogenesis. *NCL.* 2016:39-54.
26. Yetkin-Arik B, Kastelein AW, Klaassen I, Jansen CH, Latul YP, Vittori M, et al. Angiogenesis in gynecological cancers and the options for anti-angiogenesis therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021;1875(1):188446. **pmid:** 33058997 **doi:** 10.1016/j.bbcan.2020.188446
27. Jin S-J, Song Y, Park HS, Park KW, Lee S, Kang HJL. Harmine Inhibits Multiple TLR-Induced Inflammatory Expression through Modulation of NF- $\kappa$ B p65, JNK, and STAT1. *Life (Basel).* 2022;12(12):2022. **pmid:** 36556387 **doi:** 10.3390/life12122022
28. Hooshyar M, Abedian-Kenari S, Mohammadpour A, Mirmajidi H, Jafari-Sabet M, Ataee R. Evaluation of NOS2 Polymorphism in Gastric Adenocarcinoma Patients in Mazandaran Province [in Persian]. *jssu.* 2021;29(6):3843-53. **doi:** 10.18502/ssu.v29i6.6994