

## Effect of Extremely Low-frequency Electromagnetic Field on Apoptosis Induction and Expression of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and ERBB2 in BT-474 Cells

Shayeghan M<sup>1,2</sup>, Mehdizadeh R<sup>2</sup>, Forouzesh F<sup>2</sup>, Sanati H<sup>3</sup>, Ghadirian R<sup>1</sup>, Javidi MA<sup>1\*\*</sup>, Madjid Ansari A<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Integrative Oncology Department, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) Department, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran

Receive: 6/1/2022  
Accepted: 10/5/2022

\* Corresponding Author:  
majidansari@acecr.ac.ir  
\*\* Co-correspond:  
javidi@acecr.ac.ir

Ethics Approval:  
IR.IAU.PS.REC.1397.146

### Abstract

**Introduction:** Breast cancer is the most common cancer and the first cause of cancer-related death in women worldwide. Although admirable achievements have been made in finding new therapeutic interventions, introducing efficient approaches with the least side effect is still undoubtedly demanded. Exposure to extremely-low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) with specific parameters of frequency, intensity, and duration seems to show promising results in cancer treatments. In this study we investigated the possible anti-cancer role of ELF-EMF in BT-474 breast cancer cells.

**Methods:** The BT474 breast cancer cell lines and normal MCF10A cells were exposed to sinusoidal ELF-EMF (100mT, 1Hz) for 2h/d for 5 days. The survival and apoptosis rates of these cells were measured using trypan blue and flow cytometry, respectively. Also, to measure the mRNA expression level of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and ERBB2 (HER2) genes, we used real-time PCR.

**Results:** ELF-EMF induced apoptosis in about 69% of BT474 ( $p < 0.05$ ) but not in the MCF10A cells. Also, the gene expression analysis revealed a decrease in ERBB2 and PR expression and an increase in ER expression levels in the experimental group compared with the control group in BT-474 cells.

**Conclusion:** Exposure to an ELF-EMF of 100 mT, 1 Hz, for 5 days, 2 h/d, can induce significant apoptosis in BT474 cells. Furthermore, it can affect important genes related to breast cancer (decreasing ERBB2 and PR and increasing ER expression), which may be beneficial as possible adjuvant therapy.

**Keywords:** Breast Cancer, Electromagnetic Fields, Apoptosis, Adjuvant Therapy

## Introduction

Breast cancer is the most common cancer and the first cause of cancer-related death in women worldwide. Despite admirable achievements in finding new therapeutic interventions, introducing efficient approaches with the least side effect is still undoubtedly demanded. Exposure to extremely-low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) of specific frequency, intensity for specific duration has shown promising results in cancer treatments (1). ELF-EMF, unlike ionizing radiation, is not strong enough to damage DNA, but can affect cellular mechanisms such as proliferation, differentiation, and cell death (2). In this study we investigated the possible anti-cancer role of ELF-EMF in BT-474 breast cancer cells.

## Materials and Methods

The BT474 breast cancer cells and normal MCF10A cells were exposed to ELF-EMF (100 mT, 1 Hz) for 2h/d for 5 days. The survival and apoptosis rates were measured using trypan blue and flow cytometry, respectively. Also, the mRNA expression levels of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and ERBB2 (HER2) genes, were measured with the real-time PCR method.

## Results

ELF-EMF induced apoptosis in about 69% of BT474 cells ( $p < 0.05$ ) but not in the MCF10A cells (Figure 1). Also, the real-time PCR revealed a decrease in ERBB2 and PR expression levels and an increase in ER expression level in the treatment group compared with the control group in BT-474 cells (Figure 2).

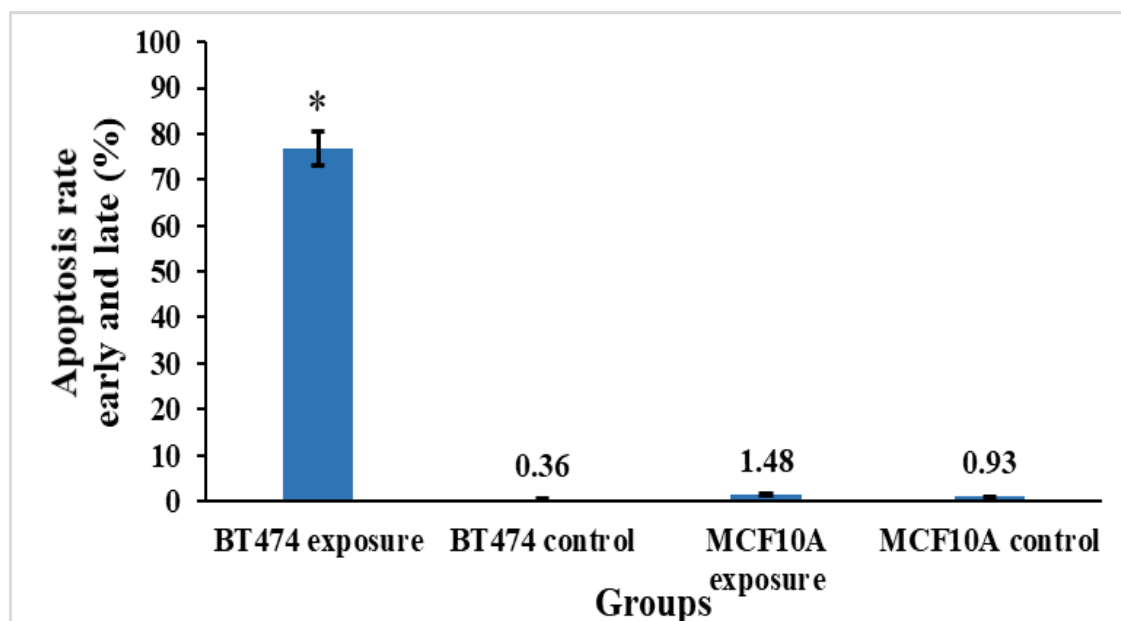
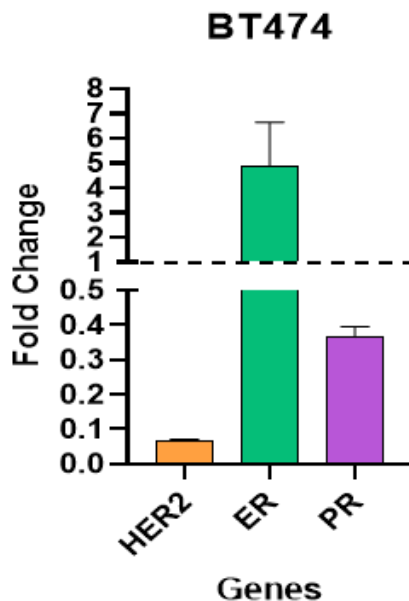


Figure 1: Rate Of Apoptosis Based On Flow Cytometry Data. About 69% Of BT474 Cells Underwent Apoptosis ( $P < 0.05$ ). The Rate Of Apoptosis In The MCF10A Cell Line Was Not Significantly Different From Its Control Group.

Figure 2: Results of Gene Expression Analysis. ERBB2 (HER2) and Progesterone Receptor (PR) Expression Decreased (0.066 And 0.366 Times, Respectively) and Estrogen Receptor (ER) Expression Increased (4.617 Times) in the Treatment Group In Comparison With the Control Group.



**Figure 2: Results of Gene Expression Analysis. ERBB2 (HER2) and Progesterone Receptor (PR) Expression Decreased (0.066 And 0.366 Times, Respectively) and Estrogen Receptor (ER) Expression Increased (4.617 Times) in the Treatment Group In Comparison With the Control Group.**

### Discussion

Recently, electromagnetic fields have been recognized as a new cancer treatment method. Although ELF-EMF can affect important cellular processes, apoptosis and proliferation, more studies are needed to understand the exact mechanism of this effect (3).

Several studies have been carried out on the effects of exposure to electromagnetic fields on apoptosis, but the results were contradictory (4-6).

As shown in other studies, any changes in the parameters of the electromagnetic field directly affect the biological processes such as apoptosis and proliferation. The effect of the electromagnetic field on cancer depends on various factors such as the cell type, the EMF type (pulsed vs sinusoidal), and the EMF intensity, and frequency (7, 8).

In the present study, ELF-EMF induced 69% apoptosis in the BT474 breast cancer cell line in comparison with normal cells, which can confirm the specificity of this method.

### Conclusion

In the present study, apoptosis was significantly increased only in breast cancer cells. So it can be concluded that the electromagnetic field does not affect normal cells with healthy genetic function. Because of the exclusive cytotoxicity of ELF-EMF on breast cancer cells, it is possible that this method can be used as a complement to common cancer treatment methods. Also, in future studies, it may be possible to increase the effectiveness of specific and targeted methods by using this method along with the conventional therapies.

## References

1. Barati M, Javidi MA, Darvishi B, Shariatpanahi SP, Moosavi ZSM, Ghadirian R, et al. Necroptosis triggered by ROS accumulation and Ca<sup>2+</sup> overload, partly explains the inflammatory responses and anti-cancer effects associated with 1Hz, 100 mT ELF-MF in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021;169:84-98.
2. Shayeghan M, Forouzes F, Madjid Ansari A, Javidi MA. DNMT1 and miRNAs: possible epigenetics footprints in electromagnetic fields utilization in oncology. *Medical Oncology*. 2021; 38(10):1-12.
3. Francisco A-C, Mar S-AMd, Irene C, Sandra R-A, Josefa L, Elisa R-M, et al. Could radiotherapy effectiveness be enhanced by electromagnetic field treatment? *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(7): 14974-95.
4. Ehnert S, Fentz A-K, Schreiner A, Birk J, Wilbrand B, Ziegler P, et al. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of •O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
5. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Residential magnetic fields and the risk of breast cancer. *American journal of epidemiology*. 2002; 155(5):446-54.
6. Kivrak EG, Yurt KK, Kaplan AA, Alkan I, Altun G. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *Journal of microscopy and ultrastructure*. 2017;5(4):167-76.
7. Crocetti S, Beyer C, Schade G, Egli M, Fröhlich J, Franco-Obregón A. Low intensity and frequency pulsed electromagnetic fields selectively impair breast cancer cell viability. *PLoS one*. 2013;8(9):e72944.
8. Bellossi A, Desplaces A. Effect of a 9 mT pulsed magnetic field on C3H/BI female mice with mammary carcinoma. A comparison between the 12 Hz and the 460 Hz frequencies. In *Vivo* (Athens, Greece). 1991;5(1):39-40.

## بررسی اثر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین بر القای آپتوز و سطح بیان بیومارکرهای ER، PR و HER2 در رده سلولی BT474 سرطان پستان انسانی

محدثه شایقان<sup>۱</sup>، رومینا مهدی‌زاده<sup>۲</sup>، فلورا فروزش<sup>۳</sup>، حسن صنعتی<sup>۳</sup>، ریحانه قدیریان<sup>۱</sup>، محمدمین جاویدی<sup>۱\*</sup>، علیرضا مجید انصاری<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه پژوهشی طب فراگیر در سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده سرطان معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه توسعه فناوری‌های پیشرفته در سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده سرطان معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

### چکیده

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

\* نویسنده مسئول:

majidansari@acecr.ac.ir

\*\* نویسنده مسئول مشترک:

javadi@acecr.ac.ir

**مقدمه:** سرطان پستان شایع‌ترین سرطان و اولین علت مرگ ناشی از سرطان در بانوان جهان به‌شمار می‌رود. علیرغم دستیابی به مداخلات درمانی جدید، معرفی رویکردهای کارآمدی که کمترین عوارض جانبی را داشته باشند همواره مورد نیاز بوده است. از طرفی به‌نظر می‌رسد که میدان الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین (ELF-EMF) در زمان/فرکانس/شدت مناسب، نتایج امیدوارکننده‌ای در درمان سرطان نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی نقش احتمالی ELF-EMF در رده سلولی BT474 سرطان پستان انسانی است.

**روش بررسی:** رده‌های سلولی سرطان پستان BT474 و نرمال MCF10A در معرض ELF-EMF سینوسی (1Hz, 100mT) به مدت ۲ ساعت/روز برای ۵ روز قرار گرفتند. میزان بقا و آپتوز این سلول‌ها به ترتیب توسط تریپان بلو و فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. همچنین برای اندازه‌گیری سطح بیان mRNA ژن‌های ER، PR و HER2، real-time PCR انجام گردید.

**یافته‌ها:** داده‌ها بیانگر آن هستند که ELF-EMF منجر به القای حدود ۶۹٪ آپتوز در سلول‌های BT474 ( $p < 0.05$ ) و نه در MCF10A شده است. همچنین، نتایج حاصل از real-time PCR نشان‌دهنده کاهش میزان بیان HER2 و PR و افزایش بیان ER در گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل در سلول‌های BT-474 است.

**نتیجه‌گیری:** ELF-EMF (1Hz, 100mT, 2h/day) به مدت ۵ روز می‌تواند آپتوز قابل توجهی را در سلول‌های BT474 القا کند. علاوه بر این، می‌تواند بر ژن‌های مهم مرتبط با سرطان پستان (کاهش HER2 و PR و افزایش ER) تأثیرگذار باشد، که ممکن است در درمان‌های کمکی احتمالی مفید واقع گردد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، میدان الکترومغناطیسی، آپتوز، درمان‌های کمکی

## مقدمه

سرطان پستان که مهم‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان، میان خانم‌ها است و از دو طریق رگ‌های خونی و لنف‌ها می‌تواند به سایر قسمت‌های بدن متاستاز دهد (۱).

الکتریکی شدن زندگی بشری و افزایش استفاده از نیروی الکتریسیته باعث افزایش تماس جمعیت‌ها با میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس فوق‌العاده کم شده است. میدان‌های الکترومغناطیسی به‌طور نامحدودی در سرتاسر محیط گسترده‌اند. این میدان‌ها به وسیله طیف امواج الکترومغناطیس منتشر شده از خورشید به طور طبیعی تولید می‌شوند (۲). میدان‌های الکترومغناطیسی تولید شده در صنعت به سه دسته تقسیم می‌شوند: Extremely low frequency (ELF) fields که به وسیله دستگاه‌های الکتریکی تولید می‌شوند و فرکانسی تا حدود  $300\text{ Hz}$  دارند. Intermediate frequency (IF) fields این میدان‌ها فرکانسی از  $300\text{ Hz}$  تا  $10\text{ MHz}$  دارند و منابع تولیدکننده آن‌ها مانیتور کامپیوتر، سیستم‌های امنیتی و سایر سیستم‌ها است. Radiofrequency fields (RF) فرکانسی در حدود  $10\text{ MHz}$  تا  $300\text{ GHz}$  را تولید می‌کند مانند تلویزیون، رادیو و موبایل (۲، ۳). این میدان‌های ساخت بشر اساساً از میدان‌های الکترومغناطیسی که به طور طبیعی اطراف ما هستند قدرت خیلی بیشتری دارند و اثرات محسوسی بر روی سیستم‌های بیولوژیک برجای می‌گذارند (۴). میدان‌های الکترومغناطیسی اندازه‌گیری شده با فرکانس  $50$  هرتز از خطوط انتقال جریان برق به طور کلی دامنه‌ای در حدود  $1\text{ KVM}^{-1}$  و  $10\text{--}1\text{ }\mu\text{T}$  دارد که می‌تواند به  $11\text{ KVM}^{-1}$  و  $100\text{ }\mu\text{T}$  برسد (۵). این نکته که میدان‌های الکترومغناطیسی دارای اثرات بیولوژیک هستند کاملاً مورد قبول است و در کلینیک‌ها از اثرات القایی میدان‌های الکترومغناطیسی برای بازآرایی اعصاب و ترمیم استخوان استفاده می‌شود که برای این تیمارها از شدت‌های بالاتر میدان‌های الکترومغناطیسی نسبت به آنچه که در محیط‌های مسکونی و تجاری با آن سرو کار داریم، استفاده می‌کنند (میدان‌هایی با شدت بالاتر از  $1$  تا  $100$  میلی تسلا) (۶). در چند مطالعه اپیدمیولوژیک ارتباط افزایش ریسک ابتلا به لوکمی در کودکان توسط میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار کم گزارش شده است (۷). این مشاهدات با مطالعه اثرات القایی

میدان‌های الکترومغناطیسی بر سیستم‌های بیولوژیک مخصوصاً ترکیباتی که تکثیر سلولی را تنظیم می‌کنند، تقویت شد. قرار گرفتن در معرض میدان الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین (ELF-EMF) ممکن است منجر به تغییرات مختلفی در سلول شود. به عنوان نمونه مطالعه‌ای توسط Anna Koziarowska و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام پذیرفت که در آن به تاثیر ELF-EMF بر زنده ماندن سلول‌ها پرداختند. در این مطالعه سلول‌های سرطانی U87-MG و B143 و سلول‌های نرمال BJ و HEK در معرض مقادیر مختلفی از فرکانس (۲-۲۰-۳۰-۵۰-۶۰ Hz) و زمان (۰-۱-۲-۳ ساعت) قرار گرفتند. پس از آن، تست MTT برای سنجش زنده مانی سلول‌ها انجام شد و مشخص شد که این میدان بر زنده مانی سلول‌های سرطانی و نرمال تأثیر متفاوتی داشته است. این مطالعه اولیه نشان داد که میدان الکترو مغناطیسی (EMF) ممکن است به عنوان یک ابزار بالقوه در زنده ماندن سلول‌ها عمل کند (۸). مطالعات نشان داده‌اند که میدان الکترومغناطیسی منجر به استرس اکسیداتیو و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در بدن می‌شود (۹). همچنین مطالعه براتی و همکاران در سال ۲۰۲۱ در ارتباط با بررسی اثر ELF-EMF بر سطح رادیکال‌های آزاد و یون کلسیم در رده‌های سلولی سرطان پستان در موش‌های BALB/c برای اولین بار نشان داده است که القای نکروز پتوز در رده سلولی سرطان پستان MC4-L2 پس از قرار گرفتن در معرض ELF-EMF با فرکانس  $1\text{ Hz}$  و شدت  $100\text{ mT}$  و ۲ ساعت در روز به مدت ۵ روز، رخ می‌دهد (۱۰).

در نظر گرفتن سلول زنده به عنوان یک سیستم الکتریکی و جسم باردار، چهار چوبی برای درک مکانیزم اثر انرژی‌های الکتریکی و الکترومغناطیسی در اعمال فیزیولوژیک سلول فراهم می‌آورد. مکانیزم‌های متعدد پیشنهاد شده است که بر اساس آن اختلاف پتانسیل بافتی نقش پیامبرهای اولیه را ایفا می‌کند. جریان الکتریکی القا شده توسط میدان الکترومغناطیسی ممکن است کانال‌هایی یونی نظیر کلسیم را فعال کند که پیامبر ثانویه مهمی است و می‌تواند پروتئین کیناز یا آبشارهای آنزیمی به خصوص را در سلول فعال کند. فعالیت مداوم کانال‌های یونی غشاء در فرکانس خاصی انجام می‌شود و در صورت تداخل با سیگنال‌های میدان الکترومغناطیسی پدیده

می‌نماید. با توجه به اهمیت اثر میدان‌های مغناطیسی بر فرآیندهای زیستی و به خصوص اثر میدان‌های مغناطیسی با فرکانس‌های پایین و در ادامه مطالعات پیشین به جهت رسیدن به نتایج جدید آزموده و جمع‌بندی و ابهام‌زدایی از مطالعات متعدد گذشته، ما برآن شدیم طی مطالعه‌ای به بررسی مقایسه‌ای اثرات میدان‌های مغناطیسی متناوب با فرکانس خیلی پایین بر روی تغییرات بیان بیومارکرهای سطحی، آپتوز و پرولیفیریشن در رده سلولی انسانی سرطان پستان بپردازیم. بررسی تغییرات سیگنالی از لحاظ بیان مارکرهای سطحی شناخته شده در سرطان پستان نیز می‌تواند پیشنهاد دهنده مکانیسم‌های احتمالی اثر و محل اثرگذاری درون سلولی باشد.

### مواد و روش‌ها

شناسه اخلاق مربوط به پژوهش حاضر، IR.IAU.PS.REC.1397.146 است که در تاریخ ۱۳۹۷/۶/۵ در کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی مصوب گردید. طی این تحقیق مداخله‌ای-آزمایشگاهی برای ایجاد میدان مغناطیسی از دستگاه مولد میدان ELF که توسط شرکت پرتوسازان قائم طراحی و ساخته شده است استفاده می‌شود. این دستگاه به عنوان یک دستگاه منحصر به فرد در سطح کشور، توانایی تولید میدانی با فرکانس ۰ تا ۶۰ هرتز و شدت ۰ تا ۱۰۰ میلی تسلا را با بهره‌گیری از مینیمم آمپر ورودی دارد. با استفاده از گوس متر میدان متناوب خروجی دستگاه بررسی و در نقاط مختلف محاسبه و میدان متوسط بررسی و کالیبره می‌شود. رده‌های سلولی BT474 به عنوان رده سلولی سرطانی و رده سلولی نرمال MCF10A از انستیتو پاستور ایران خریداری و به محل آزمایشگاه انتقال یافته و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. این سلول‌ها در محیط کشت رشد کامل (RPMI 1640) دارای سرم گاوی جنینی FBS ۱۰٪، آنتی‌بیوتیک‌های (پنی‌سیلین/استرپتومایسین) ۱٪ نگهداری شده‌اند. سلول‌ها در محیط کشت کامل تحت اتمسفر ۹۵٪ هوا و دی‌اکسیدکربن ۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد یافتند. سلول‌های BT474 و MCF10A جهت تیمار توسط ELF-EMF به طور تصادفی به گروه‌های شاهد و دریافت کننده تابش‌های میدان الکترومغناطیسی تقسیم شدند. متعاقباً برای گروه‌های شاهد و تحت تیمار تعداد ده هزار سلول در

رزونانس اتفاق می‌افتد. در نتیجه، نوسانات زمینه‌ای غشاء، به نوسانات قوی و منظم تبدیل می‌شود که می‌تواند رفتار سلول را تغییر دهد (۱۱). همچنین میدان‌های الکترومغناطیسی باعث جابجایی الکترون‌ها در DNA می‌شوند و این خود باعث بارگیری موقتی گروه‌های کوچک از جفت بازها می‌گردد. در جایگاه باردار شده نیروی تفکیک بر پیوند هیدروژنی غلبه می‌کند و دو رشته از هم جدا می‌شوند و امکان رونویسی فراهم می‌شود. به علاوه پاسخ به استرس که با سنتز پروتئین‌های استرس (hsp70) شناخته می‌شود، قادر است به وسیله افزایش دما و یا محرک دیگری مثل میدان‌های الکترومغناطیسی القا شود. اما محرک‌های متفاوت روی جایگاه‌های متفاوت از پروموتور اثر می‌گذارد. پروموتور hsp70 و همچنین ژن حساس به میدان (نظیر c-myc)، چندین کپی از یک سکانس نوکلئوتیدی ویژه دارند که به میدان‌های الکترومغناطیسی پاسخ می‌دهد (۱۲).

در حالی که در آپتوز حاشیه‌نشینی و متراکم شدن کروماتین رخ می‌دهد، هسته قطعه قطعه شده و نهایتاً متلاشی می‌شود. سلول نیز چروک می‌گردد. در جریان آپتوز، سلول‌ها ریز پرزها و اتصالات سلولی خود را از دست می‌دهند. در این هنگام شبکه آندوپلاسمی با غشاء پلاسمایی ترکیب شده و غشاء شروع به تاول زدن می‌کند. در پایان وزیکول‌های به نام اجسام آپتوزی با غشایی نسبتاً متفاوت ظاهر می‌گردد. چنین وزیکول‌هایی به علت تغییرات ایجاد شده در ساختار غشا و به هم خوردن توزیع فسفاتیدیل سرین، توسط سلول‌های مجاور تشخیص داده می‌شوند و از طریق دگرخواری حذف می‌شوند. پدیده آپتوز به عنوان مرگی که تحت کنترل ژنتیکی مستقیم است، با تغییر در بیان ژن‌ها همراه است که از جمله تغییراتی در بیان Bax و Bcl2 را نام برد. در واقع می‌توان پدیده آپتوز را نوعی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های در حال مرگ در نظر گرفت که در برابر نکروز قرار دارد (۱۳).

در مجموع اطلاعات فوق نشان‌دهنده امکان دسترسی احتمالی به استراتژی‌های جدید پیشگیرانه و درمانی در زمینه سرطان پستان است و به‌علاوه با توجه به شرایط اقتصادی و گرانی روز افزون هزینه‌های درمان و واردات دارو، یافتن روش‌های مکمل با قابلیت‌های بومی و امکان ارائه در سطح گسترده و وسیع برای چندین نفر ضروری

روی ژل آگارز بررسی گردید. سپس به منظور حذف DNA ژنومی مقدار ۳/۶ میکروگرم از RNA استخراج شده توسط ۱۸ واحد DNase فاقد RNase (از شرکت Fermentas) و ۲۰ واحد مهارکننده RNase و ۲/۴ میکرولیتر از MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۲۵ میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شد. سپس برای غیرفعال کردن DNase، واکنش ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتیگراد گرما گذاری شد. در مرحله بعد ۱ میکروگرم از این RNA با استفاده از کیت precision™ reverse transcription (شرکت PrimerDesign) به cDNA تبدیل شد.

#### طراحی پرایمر

طراحی پرایمر برای تکثیر ژنهای Progesteron receptor، HER2، Esterogen receptor توسط نرم افزار gene runner انجام گرفت (جدول ۱) و جهت ارزیابی بیان این ژن ها real-time PCR با استفاده از روش SYBR GREEN و آنالیز اطلاعات به وسیله مقایسه Threshold Cycle انجام شد. Real Time PCR به وسیله دستگاه Applied Biosystem 7500 و آنالیز اولیه داده ها توسط نرم افزار 7500 software system ver.2.0 انجام شد. در نهایت جهت محاسبه بیان ژن ها از فرمول  $Fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده گردید.

#### آنالیز آماری

در نهایت جهت بررسی های آماری ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف توزیع طبیعی داده ها مورد بررسی قرار گرفت و پس از حصول از طبیعی بودن توزیع داده ها آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و t-test با استفاده از نرم افزار SPSS20 مورد استفاده قرار گرفت. اختلاف بین گروه ها در سطح  $p < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

هر چاهک از پلیت های ۲۴ خانه کشت داده شد که گروه های شاهد تحت تاثیر هیچ گونه تیماری قرار نگرفتند بر مبنای مطالعات پیشین محققین (۲۲) پلیت های تحت تیمار به مدت ۵ روز و روزی دو ساعت تحت تابش میدان الکترومغناطیسی با فرکانس 1Hz و شدت 100mT قرار گرفتند.

#### میزان زنده مانی سلول ها

برای به دست آوردن توانایی بقای رده های سلولی مورد مطالعه از رنگ آمیزی سلول ها به وسیله رنگ اسیدی تریپان بلو استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلوی ۱٪ به ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول اضافه شده و چند بار مخلوط شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول سلول و تریپان بلو به آرامی از بالا و پایین لامل به سطح لام نتوبار انتقال داده شدند و در زیر میکروسکوپ تعداد سلول های زنده موجود در ۴ خانه ۱۶ تایی در سطح لام و همچنین درصد میزان بقا از طریق فرمول های زیر به دست آمدند:

عکس ضریب رقت × مقدار محیط کشت × ۱۰۰۰۰ × میانگین تعداد سلول های شمارش شده در چهار خانه = تعداد سلول های زنده  
(تعداد کل سلول ها / تعداد سلول های زنده) × ۱۰۰ = درصد میزان بقا

سپس با استفاده از فلوسایتومتری، نوع مرگ سلولی در رده های سلولی مورد مطالعه توسط کیت Annexin V/PI (BD Pharmingen™) دقیقاً بر اساس اطلاعات کیت انجام پذیرفت.

#### استخراج RNA و سنتز cDNA

تعداد یک میلیون سلول در یک میلی لیتر Rnplus (شرکت سیناژن، ایران) همگن شد و RNA از سلول بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کمیت و کیفیت آن ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر و الکتروفورز بر

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام واکنش real-time PCR

Gene Name	Sequence (5' to 3')	Amplicon Length (bp)
Estrogen Receptor	F:AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC	234
	R:CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT	
Progesterone Receptor	F:GAGAGCTCATCAAGGCAATTGG	227
	R:CACCATCCCTGCCAATATCTTG	
Human Epidermal Growth Factor2	F: AGCCTTGCCCCATCAACTG	113
	R: AATGCCAACCACCGCAGA	

## یافته‌ها

### میزان زنده مانی سلول‌ها با روش Trypan blue

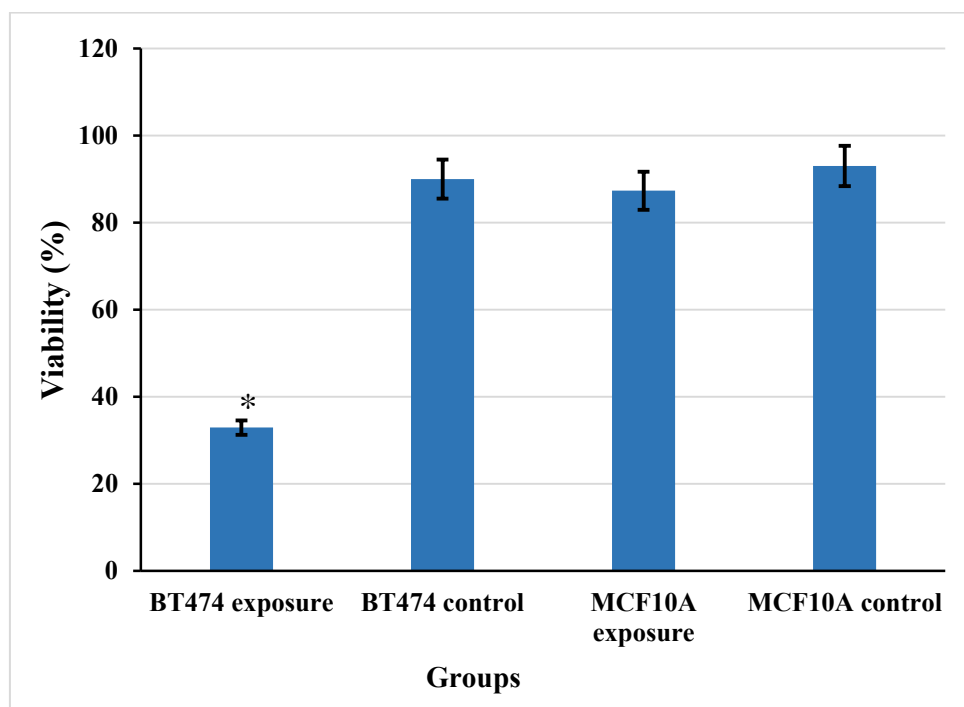
جهت بررسی حساسیت سلول‌های سرطانی و نرمال، در این مطالعه رده سلولی BT474 به عنوان سلول سرطانی پستان و MCF10A به عنوان رده سلولی نرمال در معرض ELF-EMF قرار داده شدند. میزان زنده مانی سلول‌ها در رده‌های سلولی انتخاب شده در گروه‌های شاهد و تیمار شده، با روش Trypan Blue اندازه‌گیری شد (شکل ۱). درصد زنده مانی رده BT474 در گروه آزمون برابر ۳۲/۹۴ و در گروه شاهد برابر ۹۰ و رده MCF10A در گروه آزمون برابر ۸۷/۳۳ و در گروه شاهد برابر ۹۳ است. این میزان در گروه تیمار رده سلولی BT474 در مقایسه با گروه کنترل آن به صورت معناداری کاهش یافت ( $p < 0.05$ )؛ در حالی که این تفاوت در گروه تیمار و کنترل رده سلولی MCF10A مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

### تاثیر ELF-EMF بر میزان آپوپتوز

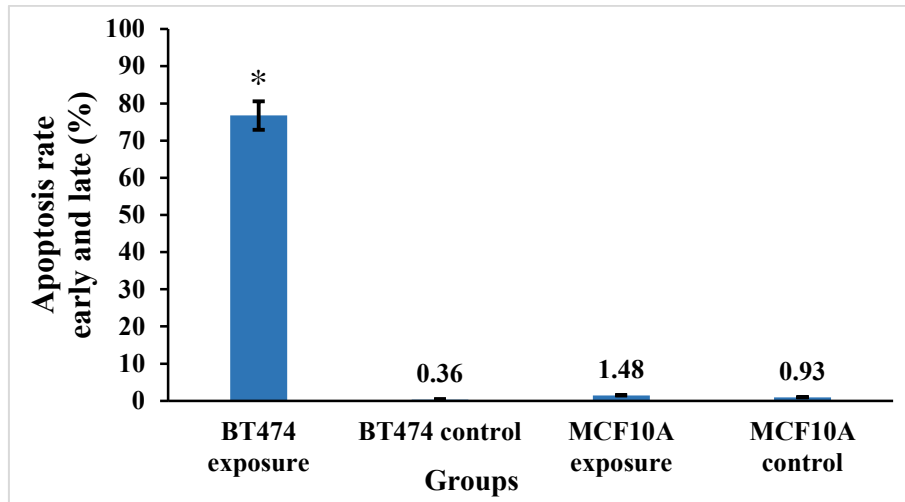
میزان آپوپتوز به وسیله روش فلوسیتومتری در رده‌های سلولی BT474 و MCF10A در دو گروه شاهد و تحت تیمار با ELF-EMF (۱۰۰ میلی تسلا، ۱ هرتز) در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. با توجه به این شکل، نزدیک به ۹۹٪ سلول‌ها در گروه‌های شاهد زنده مانده‌اند. همچنین به صورت میانگین حدود ۶۹٪ از سلول‌های BT474 دچار آپوپتوز (early + late) شده‌اند که نسبت به گروه کنترل خود دارای اختلاف معناداری است ( $p < 0.05$ ). از طرفی این مقدار در رده سلولی MCF10A با گروه کنترل خود اختلاف معناداری نداشت ( $p > 0.05$ ).

### نتیجه بیان ژن‌ها

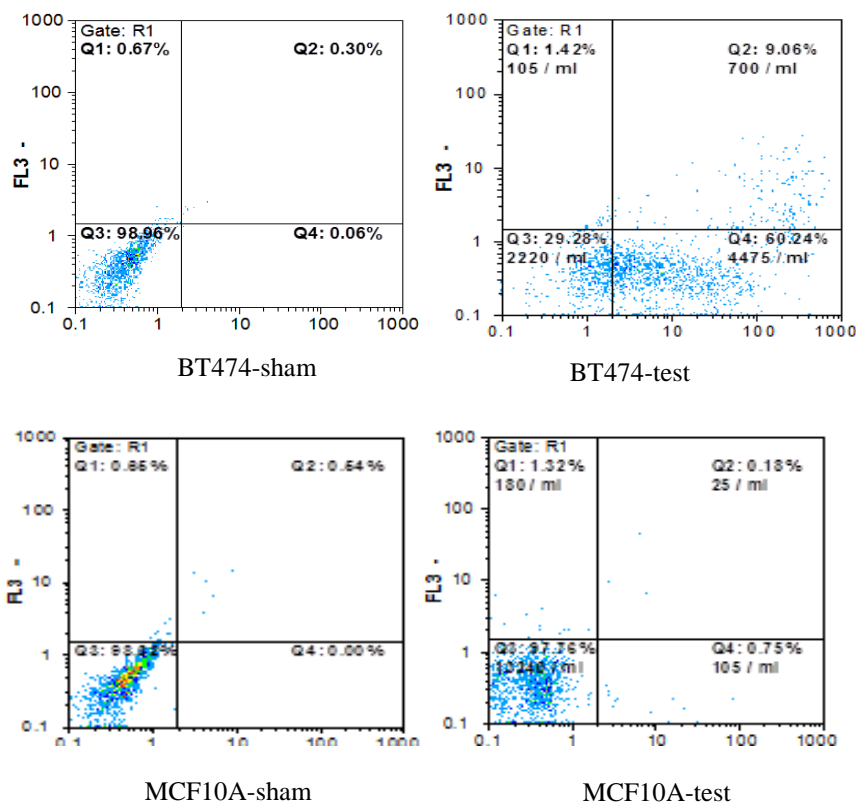
در مقایسه با گروه شاهد کاهش قابل توجهی در میزان بیان HER2 در گروه آزمون وجود دارد.  $(H1) = 0.066$  همچنین ER (گیرنده استروژن) در مقایسه با گروه کنترل با ضریب میانگین دارای افزایش بوده است. PR (پروژسترون) در گروه نمونه نسبت به گروه کنترل با ضریب میانگین ۰/۳۶۶ کاهش بیان داشته است (شکل ۴).



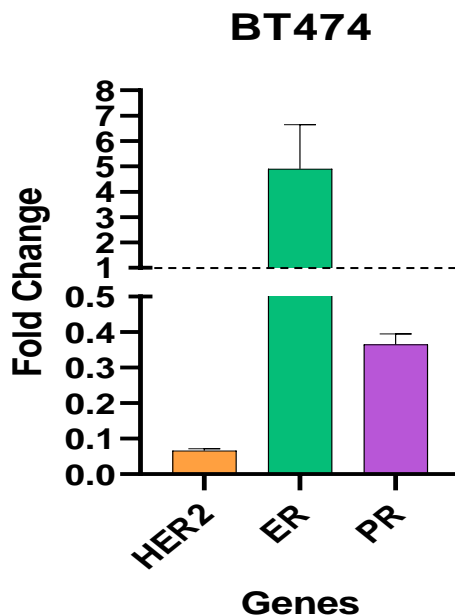
شکل ۱: درصد بقاء سلول‌های سرطانی BT474 و رده سلولی نرمال MCF10A در گروه‌های شاهد و تحت تیمار با ELF-EMF توسط رنگ آمیزی Trypan blue -درصد بقاء رده سلولی BT474 در گروه آزمون برابر ۳۲/۹۴ و در گروه شاهد برابر ۹۰ ( $p < 0.05$ ) و رده سلولی MCF10A در گروه آزمون برابر ۸۷/۳۳ و در گروه شاهد برابر ۹۳ است ( $p > 0.05$ ).



شکل ۲: میزان آپوتوز بر اساس داده‌های فلوسایتومتری در سلول‌های تیمار شده با ELF-EMF - داده‌ها بیانگر آن هستند که حدود ۶۹٪ از سلول‌های رده BT474 دچار آپوتوز شده‌اند ( $p < 0.05$ ). همچنین میزان القای آپوتوز در رده سلولی MCF10A با گروه کنترل خود اختلاف معناداری نداشت ( $p > 0.05$ ).



شکل ۳: داده‌های فلوسایتومتری رده‌های سلولی BT474 و MCF10A در گروه‌های شاهد و تحت تیمار با ELF-EMF (1Hz, 100mT): جمعیت سلول‌های با نکروز نهایی (AnnexinV - /PI +): جمعیت سلول‌های با آپوتوز تاخیری نهایی و نکروز اولیه (AnnexinV + /PI +): جمعیت سلول‌های زنده (AnnexinV - /PI -): جمعیت سلول‌های با آپوتوز اولیه (AnnexinV + /PI -)



شکل ۴: نتیجه حاصل از بیان ژن‌ها توسط *real-time PCR* - کاهش میزان بیان HER2 در گروه آزمون (۰/۰۶۶)، همچنین افزایش بیان ER در مقایسه با گروه کنترل (۴/۶۱۷)، کاهش بیان PR در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل (۰/۳۶۶)

## بحث

بر اساس مطالعات انجام شده سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. اخیراً میدان‌های الکترومغناطیسی به عنوان یک متد جدید جهت درمان سرطان شناخته می‌شوند. اگرچه ELF-EMF می‌تواند بر پروسه‌های مهم سلولی از قبیل آپوپتوز تاثیر بگذارد، اما به مطالعات بیشتری جهت شناخت مکانیسم دقیق این تاثیرگذاری نیاز است (۱۶). در مطالعه حاضر، رده‌های سلولی سرطان پستان BT474 و نرمال MCF10A در معرض ELF-EMF سینوسی (۱۰۰ mT، ۱ Hz) به مدت ۲ ساعت/روز برای ۵ روز قرار گرفتند که ELF-EMF منجر به القای حدود ۶۹٪ آپوپتوز در سلول‌های BT474 ( $p < 0.05$ ) در شرایط *in vitro* شده است. مطالعه براتی و همکاران در سال ۲۰۲۱ در ارتباط با بررسی اثر ELF-EMF بر سطح رادیکال‌های آزاد و یون کلسیم در رده‌های سلولی سرطان پستان در موش‌های BALB/c برای اولین بار نشان داده است که القای نکروپتوز در رده سلولی سرطان پستان MC4-L2 پس از قرار گرفتن در معرض ELF-EMF با فرکانس ۱ Hz و شدت ۱۰۰ mT و ۲ ساعت در روز به مدت ۵ روز، رخ می‌دهد (۱۰). همچنین، نتایج حاصل از *real-time PCR* نشان‌دهنده

کاهش میزان بیان HER2 و PR و افزایش بیان ER در گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل است. در مطالعه انجام شده توسط Gallagher و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ارتباط استروژن رسپتور بتا و تاثیر آن بر چرخه سلولی و آپوپتوز در سرطان پستان نشان می‌دهد که القای بیان ER $\beta$  باعث افزایش عملکرد تاموکسیفن شده و مهار رشد سلول‌های سرطانی را در پی دارد. همچنین ترکیب بیان ER همراه با تاموکسیفن باعث مهار چرخه سلولی و ماندن سلول در فاز G1 می‌شود که در واقع بیان ER باعث افزایش مرگ سلولی ناشی از مصرف تاموکسیفن و افزایش بیان ژن‌های پیش-آپوپتوزی می‌شود (۱۷). در مطالعه انجام شده توسط Aejaz Sayeed و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ارتباط با استروژن رسپتور آلفا و آپوپتوز، نتایج حاکی از آن هستند که ER $\alpha$  در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان با p53 متصل به پروموتور Survivin تعامل کرده و باعث مهار سرکوب رونویسی تحمیل شده توسط p53 در این ژن می‌شود (۱۸). در عین حال، بیان Survivin باعث افزایش بیان بیش از حد Her2 شده که منجر به ممانعت فعالیت کاسپازها می‌شود (۱۹). نقش اولیه Her2 سرکوب آپوپتوز است و برای این منظور از مسیر PI3K استفاده می‌کند. از طرفی بیان Her2 با افزایش پروتئین‌های ضدآپوپتوزی Bcl2 مرتبط است،

آن‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد، از طرف دیگر فرکانس ۴۶۰ هرتز نیز باعث افزایش طول عمر در مراحل انتهایی سرطان می‌شود (۲۳). همچنین در مطالعه دیگر که توسط Robison در سال ۲۰۰۲ انجام شد، Sinusoidal EMF (۰/۱۵ میلی تسلا و ۶۰ هرتز) باعث کاهش سرعت ترمیم DNA در رده‌های سلولی HL60 و HL60-R شد، در صورتی که اثری بر روی سرعت ترمیم DNA در رده سلولی Raji، گرفته شده از مرد ۱۱ ساله سیاه پوست مبتلا به لنفوم بورکیت، نداشت (۲۴).

طبق مطالعات انجام شده، یکی از نتایج حاصل از مواجهه با میدان‌های الکترومغناطیسی افزایش کلسیم بین سلولی است (۲۰)، که می‌تواند القا کننده مسیر آپوتوز از طریق چندین مسیر باشد، که مهمترین آنها از طریق کالمودولین انجام می‌گیرد. همچنین احتمال می‌رود، علت عدم اثرگذاری این مواجهه بر روی رده سلولی نرمال پستان به علت توانمندی این سلول‌ها در جلوگیری از این افزایش کلسیم بین سلولی باشد در حالی که احتمالاً در رده‌های سلولی سرطان پستان دیگر این توانایی دیده نمی‌شود. در راستای تایید این فرضیه مشاهده شده است Panaxydol، که از مشتقات گیاه جینسینگ است و باعث بالا رفتن کلسیم بین سلولی می‌شود به صورت اختصاصی سبب افزایش میزان آپوتوز در سلول سرطانی MCF7 می‌شود، در حالی که بر روی رده سلولی نرمال چنین اثری ندارد (۲۰).

### نتیجه‌گیری

حال با توجه به اینکه در مطالعه حاضر آپوتوز در سلول‌های توموری سرطان پستان به صورت معناداری افزایش یافته و این تفاوت در بین گروه کنترل و تیمار سلول‌های سالم دیده نمی‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که میدان الکترومغناطیسی به‌کار گرفته شده بر روی سلول‌های با عملکرد و محتوای ژنتیکی سالم اثری ندارد. در نهایت با توجه به اثر سمیت سلولی اختصاصی ELF-EMF بر روی رده‌های سلولی سرطان پستان، امکان دارد که این روش به صورت مکمل در کنار روش‌های رایج درمان سرطان به کار گرفته شود. همچنین در مطالعات بعدی انتظار می‌رود با بررسی میزان بیان بیومارکرهای سطحی رده سلولی BT474 بتوان با استفاده

همچنین Her2 از طریق AKT آپوتوز ناشی از p53 را از طریق تنظیم MDM2 سرکوب می‌کند (۱۹).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که Sinusoidal ELF-EMF (۱۰۰ میلی تسلا و ۱ هرتز) می‌تواند با القای آپوتوز در رده سلولی BT474 باعث کاهش بقای این رده سلولی در مقایسه با گروه کنترل آن شود، و با مشاهده نشدن این اثر بر روی رده سلولی MCF10A، به عنوان رده سلولی نرمال بافت پستان، می‌توان عملکرد اختصاصی این روش را تایید نمود.

همان‌طور که در مطالعات مختلف نشان داده شده است، اثرگذاری میدان الکترومغناطیسی در سرطان به عوامل مختلفی مانند: نوع میدان الکترومغناطیسی اعم از پالسی و سینوسی، شدت، فرکانس و رده سلولی مورد بررسی بستگی دارد. حال تغییر این پارامترها باعث تغییر نوع اثر بیولوژیک میدان الکترومغناطیسی مانند تغییر در آپوتوز و تکثیر می‌شود (۲۰، ۲۱). در همین راستا در مطالعه‌ای که Crocetti و همکاران در سال ۲۰۱۳ نتایج آن را منتشر کردند، نشان داده شد که رده سلولی MCF7 به عنوان رده سلولی سرطان پستان که از لحاظ بیومارکرهای سطحی متفاوت از رده سلولی BT474 است به میدان الکترومغناطیسی پالسی با شدت ۳ میلی تسلا با فرکانس ۲۰ هرتز و برای مدت ۶۰ دقیقه در روز بسیار حساس است. همچنین این میدان الکترومغناطیسی با همین ویژگی‌ها بر روی رده سلولی MCF10A سمیتی نداشته است (۲۲). لذا می‌توان پیشنهاد داد که هر دو شکل میدان اعم از پالسی یا سینوسی می‌تواند سمیت سلولی اختصاصی داشته باشد و البته این سمیت با مختصات متفاوتی از نظر شدت و فرکانس میدان می‌تواند نتایج مشابهی ایجاد نماید که البته با مختصات دیگری در هر دو نوع پالسی و سینوسی حاصل نمی‌شود. لذا انجام مطالعات آتی بر روی مختصات دیگری از هر دو نوع میدان می‌تواند به بررسی و یافتن ارتباط احتمالی بین مختصات میدان و میزان اثرات آپوتوتیک منجر شود.

از سوی دیگر در مطالعه Bellossi و همکارانش، موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان را در معرض میدان الکترومغناطیسی با شدت ۹ میلی تسلا و فرکانس ۱۲ و ۴۶۰ هرتز قرار داده و گزارش نمودند در مراحل ابتدایی بیماری زمانی که موش‌های مبتلا در مواجهه با میدان با فرکانس ۱۲ هرتز قرار می‌گیرند طول مدت زنده ماندن

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

از این روش در کنار درمان‌های رایج اثرگذاری روش‌های اختصاصی و هدفمند را افزایش داد.

## References

1. Barati M, Javidi MA, Darvishi B, Shariatpanahi SP, Moosavi ZSM, Ghadirian R, et al. Necroptosis triggered by ROS accumulation and Ca<sup>2+</sup> overload, partly explains the inflammatory responses and anti-cancer effects associated with 1Hz, 100 mT ELF-MF in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021; 169:84-98.
2. Shayeghan M, Forouzes F, Madjid Ansari A, Javidi MA. DNMT1 and miRNAs: possible epigenetics footprints in electromagnetic fields utilization in oncology. *Medical Oncology*. 2021; 38(10):1-12.
3. Francisco A-C, Mar S-AMd, Irene C, Sandra R-A, Josefa L, Elisa R-M, et al. Could radiotherapy effectiveness be enhanced by electromagnetic field treatment? *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(7): 14974-95.
4. Ehnert S, Fentz A-K, Schreiner A, Birk J, Wilbrand B, Ziegler P, et al. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Scientific reports*. 2017 ;7(1):1-11.
5. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Residential magnetic fields and the risk of breast cancer. *American journal of epidemiology*. 2002; 155(5):446-54.
6. Kivrak EG, Yurt KK, Kaplan AA, Alkan I, Altun G. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *Journal of microscopy and ultrastructure*. 2017; 5(4):167-76.
7. Crocetti S, Beyer C, Schade G, Egli M, Fröhlich J, Franco-Obregón A. Low intensity and frequency pulsed electromagnetic fields selectively impair breast cancer cell viability. *PloS one*. 2013; 8(9):e72944.
8. Bellossi A, Desplaces A. Effect of a 9 mT pulsed magnetic field on C3H/Bi female mice with mammary carcinoma. A comparison between the 12 Hz and the 460 Hz frequencies. In *Vivo* (Athens, Greece). 1991; 5(1): 39-40.
9. Koboldt D, Fulton R, McLellan M, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael J, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
10. Chen Q, Lang L, Wu W, Xu G, Zhang X, Li T, et al. A meta-analysis on the relationship between exposure to ELF-EMFs and the risk of female breast cancer. *PLoS One*. 2013; 8(7):e69272.
11. Chiamarello E, Bonato M, Fiocchi S, Tognola G, Parazzini M, Ravazzani P, et al. Radio frequency electromagnetic fields exposure assessment in indoor environments: a review. *International journal of environmental research and public health*. 2019;16(6):955.
12. Lacy-hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields 1. *The FASEB Journal*. 1998; 12(6):395-420.
13. Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, Hou X, Jin F, Podratz KC, et al. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2006; 5(11):2767-76.
14. Bai W-F, Xu W-C, Feng Y, Huang H, Li X-P, Deng C-Y, et al. Fifty-Hertz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stromal cells to differentiate into functional neurons. *Cytotherapy*. 2013; 15(8):961-70.
15. Kheifets L, Renew D, Sias G, Swanson J. Extremely low frequency electric fields and cancer: assessing the evidence. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*. 2010; 31(2):89-101.

16. Koziorowska A, Romerowicz-Misielak M, Sołek P, Koziorowski M. Extremely low frequency variable electromagnetic fields affect cancer and noncancerous cells in vitro differently: Preliminary study. *Electromagnetic biology and medicine*. 2018; 37(1):35-42.
17. Tkalec M, Malarić K, Pevalek-Kozlina B. Exposure to radiofrequency radiation induces oxidative stress in duckweed *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment*. 2007; 388(1-3): 78-89.
18. Leman ES, Siskin BF, Zimmer S, Anderson KW. Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*. 2001; 22(3):178-84.
19. Adey W, Fields NE. Bibliography from BioInitiative Report. *Applied Scientific Research*.1:63.
20. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*. 2013; 23(12):620-33.
21. Odin L, Tornblom N. Studies on the chemical composition of glomeruli isolated from human kidneys with Kimmelstiel-Wilson lesions. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*. 1959; 64:313-21.
22. Kiseleva E, Drummond SP, Goldberg MW, Rutherford SA, Allen TD, Wilson KL. Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *Journal of cell science*. 2004;117(12):2481-90.
23. Hodges-Gallagher L, Valentine CD, Bader SE, Kushner PJ. Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*. 2008; 109(2):241-50.
24. Sayeed A, Konduri SD, Liu W, Bansal S, Li F, Das GM. Estrogen receptor  $\alpha$  inhibits p53-mediated transcriptional repression: implications for the regulation of apoptosis. *Cancer research*. 2007; 67(16):7746-55.
25. Carpenter RL, Lo H-W. Regulation of apoptosis by HER2 in breast cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*. 2013; 2013(Suppl 7).
26. Robison JG, Pendleton AR, Monson KO, Murray BK, O'Neill KL. Decreased DNA repair rates and protection from heat induced apoptosis mediated by electromagnetic field exposure. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*. 2002; 23(2):106-12.
27. Haddad JB, Obolensky AG, Shinnick P. The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2007;13(5):485-90.
28. Kim JY, Yu S-J, Oh HJ, Lee JY, Kim Y, Sohn J. Panaxydol induces apoptosis through an increased intracellular calcium level, activation of JNK and p38 MAPK and NADPH oxidase-dependent generation of reactive oxygen species. *Apoptosis*. 2011; 16(4): 347-58.