

Effetti biologici dell'esposizione a campi elettromagnetici di 900 MHz vengono ridotti dalla presenza dell'apparato RayGuard. Studio sperimentale su cellule CCRF-CEM in coltura.

CNR-Bologna

Introduzione

Si fa sempre più evidente che le radiazioni elettromagnetiche (NIR) sono in grado di produrre effetti sui sistemi biologici. Esiste un'ampia serie di dati che documentano la capacità delle radiazioni non ionizzanti (NIR) di influenzare gli organismi viventi (Adey 1990) e i meccanismi biochimici e molecolari di cellule sia *in vitro* che *in vivo* con effetti non dipendenti da fenomeni termici. (Barnes 1996, Astumian *et al.* 1995, Litovitz *et al.* 1993). Studi recenti hanno dimostrato che le NIR influenzano il metabolismo e la proliferazione cellulare inducendo effetti potenzialmente dannosi in tutti i compartimenti cellulari, dalla membrana citoplasmatica in cui risulta modificata la distribuzione delle proteine (Bersani *et al.* 1997) al citoplasma ed al nucleo in cui le NIR attivano una serie di eventi a cascata che coinvolgono enzimi intracellulari (*signalling*) (Hill 1998) e molecole di regolazione della crescita cellulare. Allo scopo di verificare gli effetti biologici prodotti dalle NIR in sistemi cellulari, abbiamo analizzato i cambiamenti che possono avvenire nei linfociti esposti a radiofrequenze e microonde (RF/MW) utilizzando linee cellulari leucemiche T umane (CCRF-CEM) che rappresentano il sistema più vicino e simile rispetto a linfociti primari umani i quali potrebbero presentare una variabilità dovuta, ad esempio, alle caratteristiche intrinseche dei donatori. Su queste cellule abbiamo studiato la variazione di proliferazione cellulare e l'andamento del ciclo cellulare mediante FACS-analysis in presenza e non dell'apparato protettore **RayGuard** durante l'esposizione a campi elettromagnetici di 900 MHz per valutare se il sistema di protezione cellulare RayGuard può annullare o ridurre gli effetti delle NIR sulle cellule in coltura documentate in altre pubblicazioni

Materiali e metodi

COLTURE CELLULARI

Linee cellulari leucemiche T umane CCRF-CEM, sono state coltivate in terreno di coltura RPMI 1640 con aggiunta di FCS 10%. Le cellule sono state coltivate in fiasche di coltura di 8 cm di diametro alla densità di 1×10^6 cellule per capsula ed esposte a campi elettromagnetici a 900 MHz per 2, 4, 24, 48 ore in presenza ed in assenza di RayGuard. La stessa quantità di cellule è stata usata come controllo nello stesso incubatore al di fuori della cella TEM. Quale ulteriore sistema di controllo le cellule non esposte a campi sono state incubate in un incubatore diverso da quello che conteneva la cella TEM.

SISTEMA DI ESPOSIZIONE CELLULARE A 900 MHz

Le cellule sono state irradiate da un campo elettromagnetico prodotto dal generatore di segnale sinusoidale tra 800 e 1000 MHz con 5 dBm di potenza di uscita che generava un campo elettrico, calcolato, all'interno della cella TEM di 4,89 V/m.

Il campo elettromagnetico è stato prodotto per mezzo di un generatore di segnale, a larga banda e inviato ad una cella TEM (Transverse Electro Magnetic) nella gamma di frequenze da 800 a 1000 MHz terminante con un carico opportunamente adattato per frequenze da 850 a 950 MHz con impedenza caratteristica di 75Ω . La cella TEM, (Fig. 1), è una linea di trasmissione di tre piani con le pareti laterali chiuse, per non permettere irradiazione di energia verso l'esterno e quindi assicurarsi l'isolamento elettromagnetico nell'ambiente circostante. Progettata per frequenze maggiori di 800 MHz e impedenza caratteristica di 75Ω produce un campo elettromagnetico stabile all'interno (0-2dBm). Per l'esposizione delle cellule a campo in presenza del RayGuard quest'ultimo è stato inserito all'interno della cella TEM. È stata effettuata una mappatura del

campo all'interno della cella allo scopo di verificare se esistevano perturbazioni del campo che potessero influenzare le esposizioni delle cellule nelle fiasche di coltura.

ESPOSIZIONE SHAM

Al fine di effettuare un controllo delle influenze delle apparecchiature sulle cellule in coltura ma senza somministrare il campo, cellule leucemiche (CCRF-CEM) sono state coltivate per 2, 4, 24 e 48 ore all'interno della cella TEM ed al di fuori senza somministrare radiazione elettromagnetica a generatore spento con e senza RayGuard. Al termine dell'esposizione sham si è proceduto, come con i campioni esposti ai test di proliferazione ed alla FACS analisi.

TEST DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

100 μ l/pozzetto di sospensione cellulare (5000 cellule) esposte e non, in presenza e in assenza del RayGuard, sono state aliquotate in una piastra ELISA 96 pozzetti. Per ciascun punto di esposizione sono stati preparati 12 pozzetti di lettura per ottenere valori statisticamente validi. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 μ g di MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide), a cui si è fatta seguire una incubazione di 4 ore a 37°C. L' MTT viene scisso in maniera NADP/NADPH dipendente, da cellule metabolicamente attive, in sali di formazano che, insolubili in soluzione acquosa, formano precipitati violetti. In seguito sono stati aggiunti 100 microlitri di buffer di solubilizzazione (0.01M HCl, 10% SDS) e sono stati re-incubati a 37°C overnight. I cristalli di formazano vengono, così, solubilizzati e quantificati spettrofotometricamente (550nm-690nm) mediante lettore di piastre ELISA. L'intensità di colorazione è direttamente correlata alla quantità di cellule metabolicamente attive presenti nel pozzetto al momento dell'aggiunta di MTT. L'indice di proliferazione è stato calcolato facendo il rapporto tra la misura diretta del campione preso in esame ed uno di riferimento. La deviazione standard è stata calcolata secondo le regole classiche della propagazione dell'errore.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA A FLUSSO (FACS)

Allo scopo di determinare il quantitativo di DNA le cellule sono state coltivate per 2, 4, 24 e 48 ore, in assenza o in presenza di campo elettromagnetico e RayGuard, sono state fissate in alcool etilico 70% a 4°C per 30 min. I nuclei sono stati colorati con 25 μ g/ml di ioduro di propidio e incubati con 1mg/ml di RNasi per 1 ora a 37 °C. Il contenuto nucleare di DNA è stato determinato mediante citofluorimetro a flusso .

Risultati

TEST DI PROLIFERAZIONE

Un uguale numero di cellule (1.000.000/ml di terreno di coltura) è stato usato per la coltivazione nelle condizioni sperimentali citate in materiali e metodi. Esaminando i risultati del test di proliferazione, che rivela il numero di cellule presenti al termine dell'esperimento, si evidenzia che, nelle cellule esposte, si ha una diminuzione statisticamente significativa ($p < 0.01$) del numero totale di cellule per esposizioni di 48 ore. Nessuna significativa differenza tra cellule esposte e non esposte è stata osservata per esposizioni a tempi più brevi (2, 4, 24 ore) (Fig. 2). Le cellule coltivate all'interno della cella TEM nelle stesse condizioni di coltura, ma senza la somministrazione del campo (sham) non mostrano alcuna differenza con il gruppo di cellule di controllo (Fig. 3), suggerendo che la cella TEM, da sola, non causa alcuna alterazione della proliferazione cellulare in assenza di campo elettromagnetico. Gli stessi risultati si ottengono nelle stesse condizioni sham ma in presenza di RayGuard all'interno della cella TEM.

Il test di proliferazione su cellule coltivate all'interno della cella TEM ed esposte al campo elettromagnetico, a 900 MHz in **presenza del RayGuard**, non mostra alcuna significativa differenza di proliferazione rispetto al controllo, anche dopo 48 ore di esposizione (Fig.4). Pertanto il RayGuard annulla l'effetto dell'esposizione a campo elettromagnetico sulla proliferazione cellulare.

CITOMETRIA A FLUSSO (FACS Analysis)

Allo scopo di verificare se tuttavia fossero presenti modificazioni delle fasi del ciclo cellulare, non riconducibili alla sola quantità di cellule, è stata effettuata la determinazione del contenuto di DNA cellulare e quindi della percentuale del numero delle cellule impegnate nelle varie fasi del ciclo cellulare mediante citometria a flusso.

L'analisi dei campioni esposti ha evidenziato un aumento significativo ($p < 0.01$) (18.07% nelle cellule esposte a campi elettromagnetici e 3.89% nei controlli) del numero di cellule in apoptosi a partire dalle due ore di esposizione, tale aumento si evidenzia anche a 24 (7.98% nelle cellule esposte a campi elettromagnetici e 4.03% nei controlli) e 48 ore (3.38% nelle cellule esposte a campi elettromagnetici e 1.37% nei controlli) di esposizione ($p < 0.05$).

Inoltre i campi elettromagnetici inducono un aumento significativo del numero di cellule in fase di duplicazione (39.63% nelle cellule esposte e 22.6% nei controlli) ed una riduzione significativa delle cellule bloccate (resting) (26.68% nelle cellule esposte e 40.06% nei controlli) ($p < 0.01$) dopo 48 ore di esposizione.

Per quanto riguarda gli effetti dei campi elettromagnetici in **presenza di RayGuard**, la FACS-analysis ha rivelato valori analoghi a quelli ottenuti nei controlli, sia per le cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare sia per quanto riguarda la percentuale di cellule in apoptosi. Pertanto la presenza del RayGuard nella cella di esposizione determina l'annullamento degli effetti che le emissioni elettromagnetiche causano nelle cellule ciclanti. (Tab.1 e Fig. 5)

Discussione

I meccanismi molecolari di controllo del ciclo cellulare sono stati oggetto, nel corso degli ultimi anni, di numerose ricerche anche grazie al crescere di informazioni sul ruolo da essi svolto nella genesi del cancro, una malattia che coinvolge cambiamenti dinamici del genoma.

Potenziati effetti cancerogeni delle NIR, sia a bassa che ad alta frequenza sono stati ipotizzati sulla base degli effetti dimostrati in vari tipi di tumore (Byus et al, 1987; O' Brien et al 1994, 1998; Liburdy et al, 1993; Cain et al, 1993) tra cui la leucemia linfatica cronica dei bambini (Uckun et al, 1995; Feychting e Ahlbom 1993). Tali dati dimostrano che le NIR possono avere effetto genotossico. È stato dimostrato che le microonde sono in grado di indurre tagli (break) alla doppia elica del DNA e che rotture su singolo filamento del DNA sono spesso associate all'insorgenza di tumori (Tice 1978; Ames 1989), all'apoptosi (Walker et al. 1991; Prigent et al. 1993) e all'invecchiamento (Hart e Setlow 1974). Effetti mutageni di bassi livelli di microonde (2.45 GHz calcolato come SAR 1.8 W/Kg) sulla sequenza di DNA nel cervello e nel testicolo di ratto sono stati dimostrati da Sarkar et al. 1993. Lai e Singh 1995 hanno dimostrato che le microonde e campi non modulati (CW) causano rotture al DNA nel tessuto cerebrale e che queste rotture si verificano dopo 4 ore a seguito di una seconda esposizione in maniera dose-dipendente come anche riportato da Adey 1997.

Evidenze cliniche suggeriscono che un difetto dei meccanismi di riparazione del danno al DNA è un processo fondamentale e necessario per la carcinogenesi. Inoltre Garaj-Vrhovac et al. 1990 hanno dimostrato che lavoratori esposti a microonde con potenze di 10-50 μ W/cm² mostrano il 27.9% di formazione di micronuclei a seguito di attivazione del processo apoptotico e il 31,5 % di

aberrazioni cromosomiche rispetto a soggetti di controllo che mostrano, invece, una incidenza nella formazione di micronuclei dell'1.8% ed aberrazioni cromosomiche del 1.5%.

Al fine di verificare se il Ray Guard possa ridurre o eliminare gli effetti dannosi prodotti dalle NIR sono state esposte cellule tumorali a campi elettromagnetici a 900 MHz in presenza dello strumento. Cellule tumorali esposte a NIR diminuiscono progressivamente di numero rispetto alle colture di controllo. Questa diminuzione del numero di cellule in coltura e' correlata ad una alterata proliferazione cellulare che deriva da una anormale duplicazione del corredo genetico (DNA) cui non fa seguito la divisione cellulare prevalentemente nei tempi di esposizione piu' lunghi (48 ore). Questo fatto porta alla comparsa di cellule tumorigeniche che, se non eliminate attraverso il processo di morte cellulare programmata (apoptosi), potrebbero dare origine a cloni di cellule tumorali altamente aggressive. Infatti le cellule esposte a NIR nei tempi brevi mostrano un considerevole aumento delle cellule apoptotiche prevalentemente a 2 e 24 ore di esposizione. Questo dato suggerisce che le cellule rispondono immediatamente al segnale di danno indotto dai campi elettromagnetici attivando il processo apoptotico. Dal momento che l'esposizione si protrae per tempi lunghi, le cellule sopravvissute che hanno evitato il processo apoptotico proseguono nella duplicazione genomica, dando origine alla selezione di cloni altamente aggressivi che hanno accumulato danni al DNA.

Le colture cellulari esposte a campi elettromagnetici in presenza del RayGuard, mostrano una proliferazione cellulare e una percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare comparabile a quella delle cellule di controllo non esposte a campi elettromagnetici. La presenza del RayGuard durante l'esposizione a NIR sembra neutralizzare gli effetti dannosi a livello genomico indotto dai campi elettromagnetici a 900 MHz. Ulteriori studi sui meccanismi biologici e molecolari sottesi a questo fenomeno dovranno essere condotti al fine di chiarire piu' approfonditamente questi risultati preliminari.

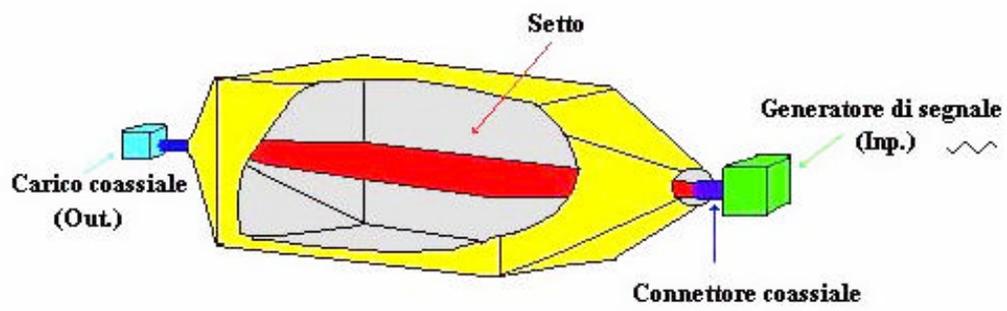


Fig. 1 – Schema costruttivo della cella TEM

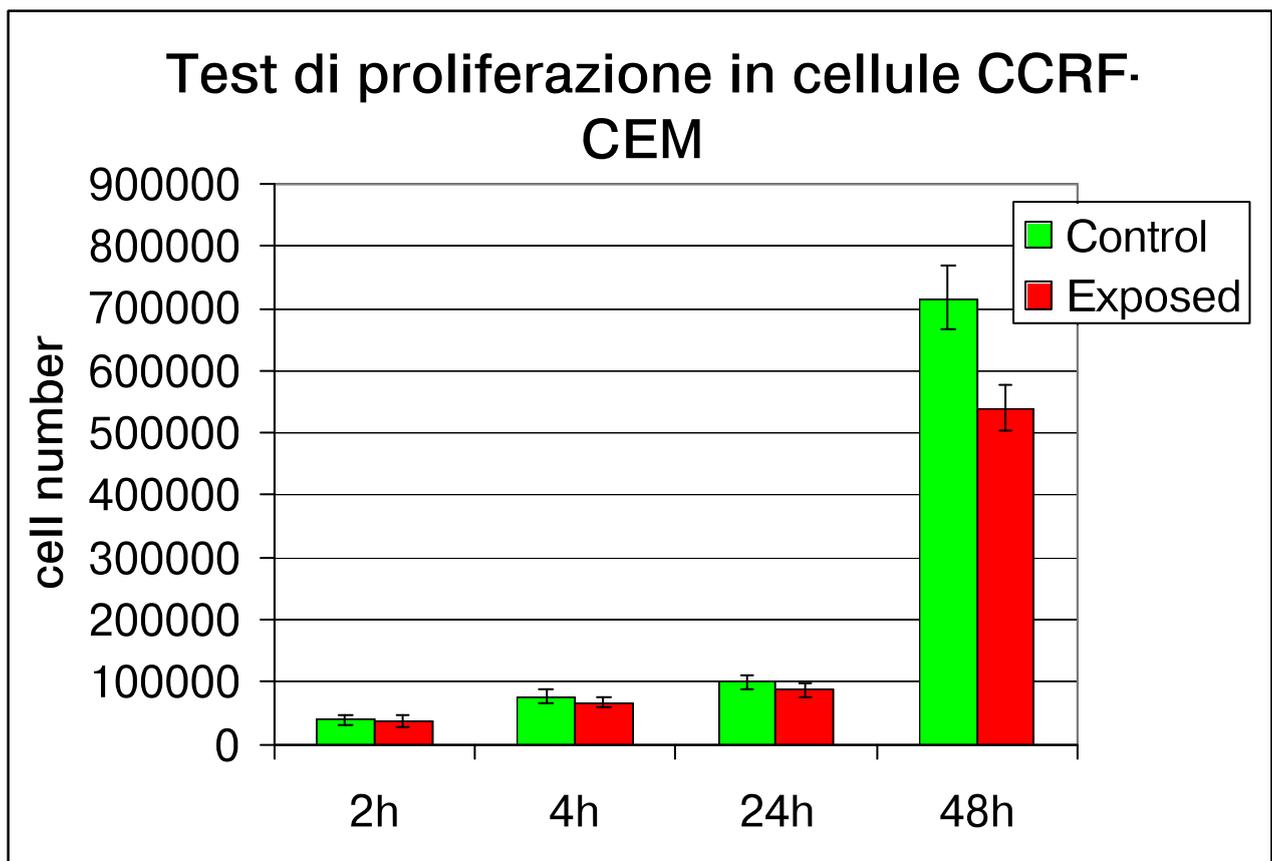


Fig 2- Istogramma della proliferazione cellulare delle cellule CCRF-CEM leucemiche in coltura. Risulta evidente la diminuzione statisticamente significativa del numero di cellule dopo 48 ore di esposizione a campo elettromagnetico di 900 MHz ($p < 0,05$).

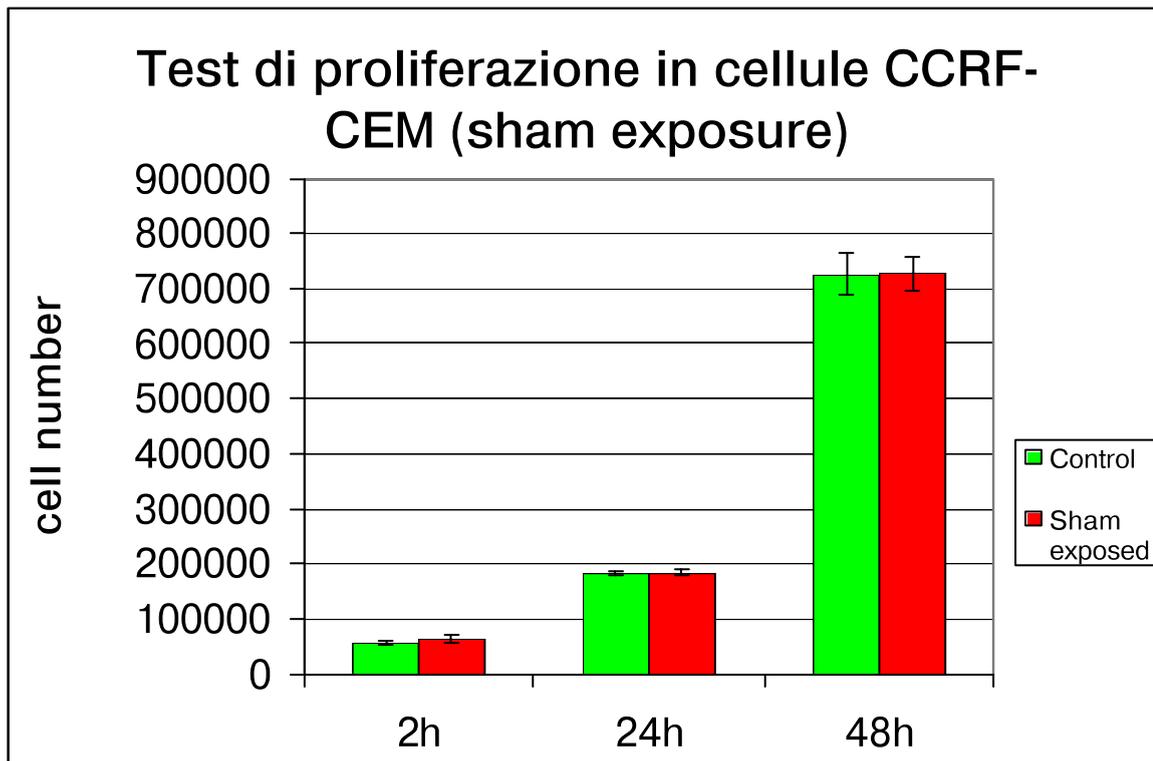


Fig.3- Istogramma della proliferazione cellulare in colture di cellule CCRF-CEM T-leucemiche. Esposizione sham: le cellule coltivate nelle condizioni sperimentali ma senza emissione di campo elettromagnetico non mostrano nessuna differenza significativa al test di proliferazione.

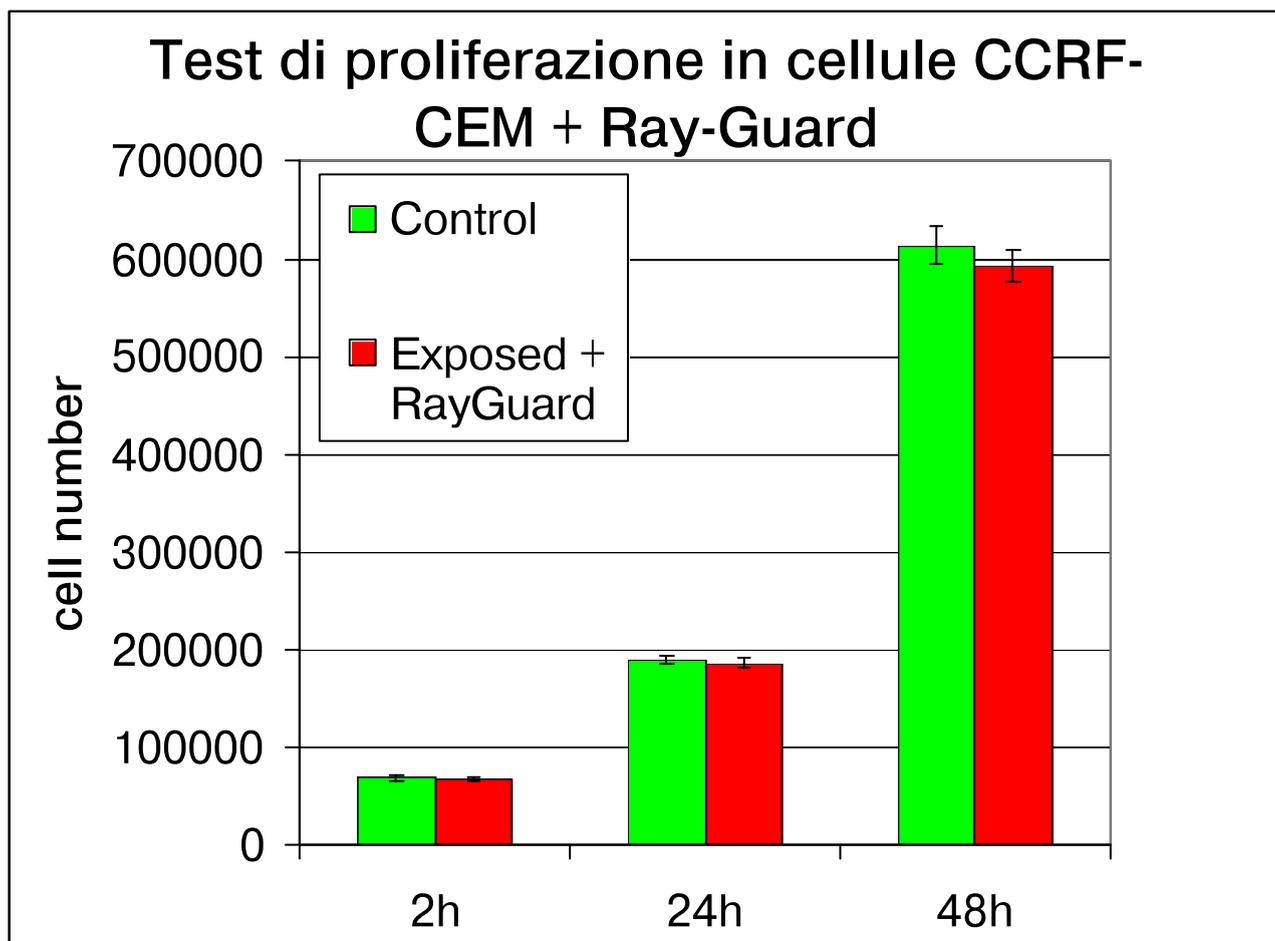


Fig 4 - Istogramma della proliferazione cellulare di cellule CCRF-CEM T-leucemiche in coltura. In presenza del Ray Guard le cellule esposte a campo elettromagnetico di 900 MHz non mostrano differenza significativa di proliferazione cellulare a 48 ore.

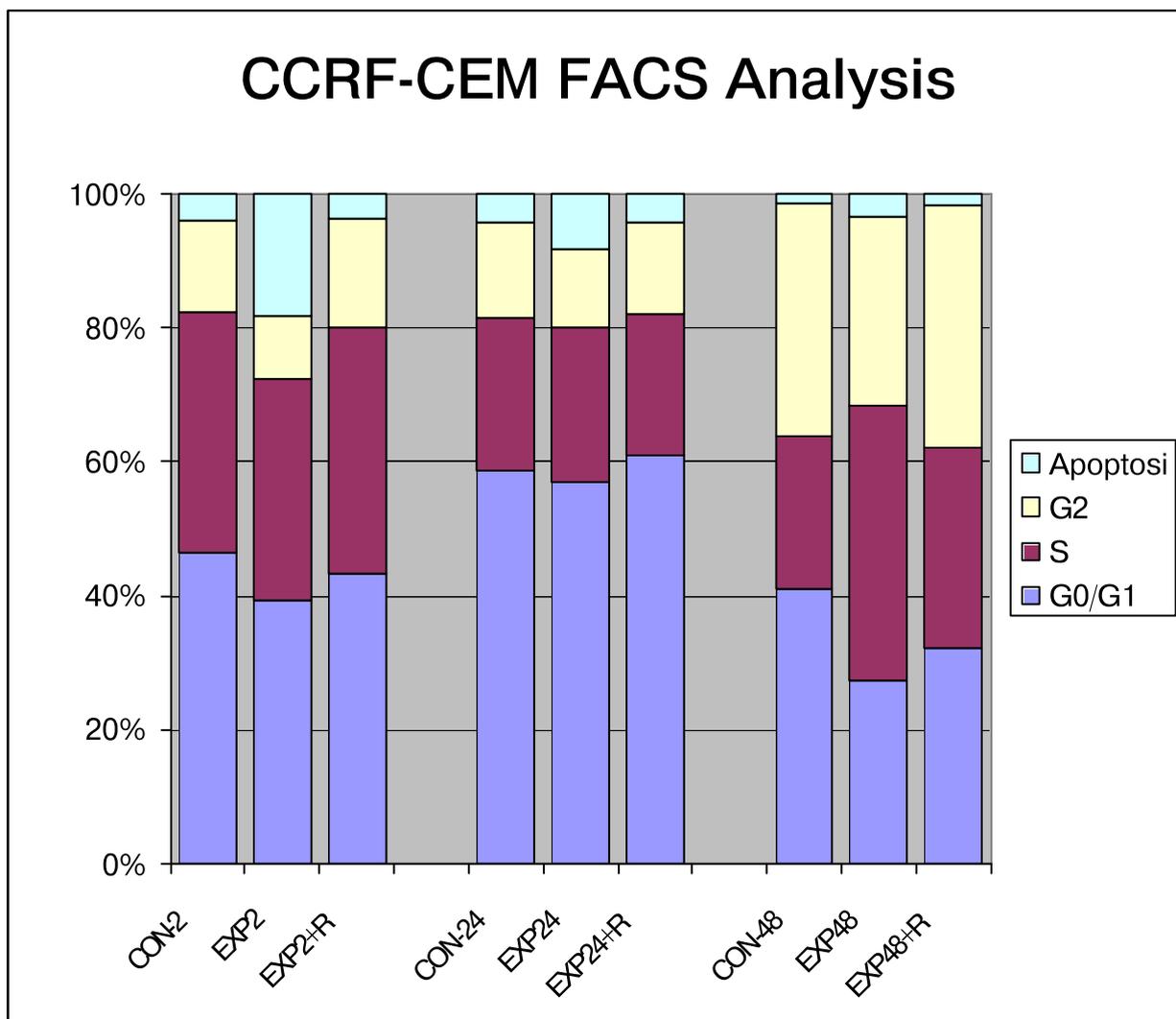


Fig. 5 - GRAFICO DEI RISULTATI DELLA FACS ANALYSIS

Cellule leucemiche CEM esposte a campo elettromagnetico .le porzioni delle colonne del grafico rappresentano la percentuale delle fasi del ciclo cellulare G0/G1, S, G2/M e Apoptosi.

| 2 HOURS EXPOSURE | G0/G1 | S | G2/M | APOPTOSIS |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| CONTROL | 45.75 | 35.55 | 13.42 | 3.89 |
| EXPOSED NIR | 38.5 | 32.38 | 9.13 | 18.07 |
| EXPOSED+RAYGUARD | 42.43 | 36.2 | 15.83 | 3.75 |
| | | | | |

| 24 HOURS EXPOSURE | G0/G1 | S | G2/M | APOPTOSIS |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| CONTROL | 56.31 | 21.95 | 13.79 | 4.03 |
| EXPOSED NIR | 54.82 | 22.15 | 11.09 | 7.98 |
| EXPOSED+RAYGUARD | 58.31 | 20.15 | 12.98 | 4.22 |
| | | | | |

| 48 HOURS EXPOSURE | G0/G1 | S | G2/M | APOPTOSIS |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| CONTROL | 40.05 | 22.60 | 33.97 | 1.37 |
| EXPOSED NIR | 26.68 | 39.83 | 27.62 | 3.38 |
| EXPOSED+RAYGUARD | 31.74 | 29.35 | 35.39 | 1.7 |
| | | | | |

Tab. 1 – FACS analysis di cellule CCFR-CEM esposte a campo elettromagnetico 900 MHz in assenza e presenza di **RAYGUARD**. I valori rappresentano le percentuali di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. In rosso le percentuali statisticamente significative del numero di cellule in cui il ciclo cellulare e' alterato dalla esposizione a campi elettromagnetici. I valori ottenuti dalle cellule di controllo e dalle cellule esposte a campo elettromagnetico in presenza di RayGuard non sono statisticamente differenti (valori in colore blu).

REFERENCES

- Adey W.R. [1990] "Electromagnetic Fields and the Essence of Living Systems," in J.B.Andersen (ed.), *Modern Radio Science*, Oxford University Press, pp. 1-36.
- Adey W.R. [1997] "Bioeffects of Mobile Communication Fields; Possible Mechanisms for Cumulative Dose," in N. Kuster, Q. Balzano and J.C. Lin (eds.), *Mobile Communication Safety*, New York, Chapman Hall, pp. 103-140.
- Ames B.N. [1989] "Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer," *Free Radical Res. Commun.* 7, pp. 121-128.
- Astumian R.D., Weaver J.C., and Adair R.K. [1995] "Rectification and signal averaging of weak electric fields by biological cells," *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 92, pp. 3 740-3 743.
- Barnes F. S. [1996] "The Effects of ELF on Chemical Reaction Rates in Biological Systems," in S. Ueno (ed.), *Biological Effects of Magnetic and Electromagnetic Fields*, New York, Plenum Press, pp. 37-44.
- Bersani F, Marinelli F, Ognibene A, Matteucci A. Cecchi S. Santi S. Squarzoni S, Maraldi N.M.[1997] Intramembrane protein distribution in cell cultures is affected by 50 Hz pulsed magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 18 463-469.
- Byus C.V., Pieper S.E., and Adey W.R. [1987] "The effects of low-energy 60Hz_ environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme omithine decarboxylase," *Carcinogenesis*, 8, pp. 1385-1389.
- Cain C.D., Thomas D.L., and Adey W.R. [1993] "60-Hz magnetic field acts as copromoter in focus formation of C3H10T cells," *Carcinogenesis*, 14, pp. 955-960.
- Feychting M., and Ahlbom A. [1993]"Magnetic fields and cancer in people residing near Swedish high voltage power lines," Karolinska Institute, Stockholm, *IMM-Report 6/92*, 67.
- Garaj-Vhrovac V., Fucic A., and Horvat D. [1990] "Comparison of chromosome aberrations and micronuclei induction in human lymphocytes after occupational exposure to vinyl chloride and microwave radiation," *Periodicum Biologorum*, 92, pp. 411-416.
- Hart R.W., and Setlow R.B. [1974] "Correlation between deoxyribonucleic acid excision repair and life span in a number of mammalian species," *Proc. Nat. Acad Sci, USA*, 71, pp. 2169-2173.
- Hill S.M. [1998] "Receptor crosstalk: communication through cell signaling pathways,"
- Lai H., and Singh N.P. [1995] "Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells," *Bioelectromagnetics.* 16, pp. 207-210.
- Liburdy R.P, Callahan DE Harland J Dunhan E Sloma TR Yaswen P. [1993] Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal trasduction cascade. Effects on calcium influx and C-Myc mRNA induction. *FEBS lett* 334, 301-308.
- Litovitz TA, Montrose CJ, Goodman R. and Elson EC. [1990] Amplitud windows and transiently augmented transcription from exposure to electromagnetic fields. *Bioelectromagnetic* 11 (4) 297-312.
- O'Brien T.G., Simsiman R.C. and Boutwell R.K. [1994] "Induction of the polyamine biosynthetic enzymes in mouse epidermis with neoplastic transformation," *Cancer Res.* 54, pp. 2313-2316.
- Prigent P., Blanpied C., Alten J., and Hirsch F. [1993] "A safe and rapid method for analyzing apoptosis-induced fragmentation of DNA extracted from tissues or cultured cells," *J. Immunol. Methods*, 160, pp. 139-140.
- Sarkar S , Ali S , and Behari J [1994] Effect of low power microwave on the mouse genome; a direct DNA analysis. *Mutation Res.* 330, 141-147.
- Tice R.R. [1 978] "Aging and DNA Repair Capability," in E.L. Schneider (ed.) *The Genetics of aging*, New York, Plenum Press, pp. 53-89.

Uckun F.M. Kurosaki T., Jin J., Jun X., Morgan A., Takata M., Bolen J., and Luben R. [1995]
"Exposure of B-lineage lymphoid cells to low energy electromagnetic fields stimulates Lyn kinase activity," *J Biol Chem.*, 270, pp. 27666-27670.

Walker P.R., Snút C. , Youdale T., Leblane J., Whitfield J.F., and Sikorska M. [1991]
"Topoisomerase II reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes, *Cancer Res.*, 51, pp. 1078-1085.