

بررسی تأثیرات میدان الکترومغناطیسی پالسی با فرکانس بسیار پایین بر روی خصوصیات بیوشیمیایی سلول‌های سرطانی پروستات، رده DU-145

بهناز خاوری: کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران. be_khavari@ut.ac.ir

* **شهین احمدیان:** استاد، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (*نویسنده مسئول). ahmadian@ibb.ut.ac.ir

یعقوب پاژنگ: استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ypazhang@yahoo.com

بهرام بلوری: دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران. bolouri.b@iuims.ac.ir

مهشید شفیق زاده: کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران. shafizadeh@ibb.ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: در دهه‌های اخیر تحقیقات زیادی درباره احتمال تأثیرات زیستی میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین صورت گرفته است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر تابش ۲۴ تا ۷۲ ساعته میدان الکترومغناطیسی پالسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی‌تسلا بر میزان تکثیر و برخی وقایع بیوشیمیایی درون سلولی، در سلول‌های سرطانی پروستات، رده DU-145 و همچنین بررسی تأثیر تیمار هم‌زمان سلول‌های DU-145 با میدان مزبور و داروی ضدسرطانی بربرین می‌باشد.

روش کار: سلول‌های کنترل و تیمار در پلیت‌های مجزا کشت داده شده و از روش‌های سنجش MTT، طیف‌سنجی فلورسانس، وسترن بلات و آزمون کامت به ترتیب برای بررسی میزان تکثیر سلولی، غلظت گونه‌های فعال اکسیژن، مقدار پروتئین سورواپوین و وقوع آسیب در مولکول DNA استفاده گردید.

یافته‌ها: قرارگیری پیوسته سلول‌ها در معرض میدان مذکور، سبب افزایشی معنی‌دار در میزان رشد و تکثیر سلول‌ها می‌گردد که همراه با افزایش قابل توجه غلظت داخل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. تابش میدان الکترومغناطیسی تأثیری بر میزان بیان پروتئین سورواپوین که نقش مهمی در رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی ایفا می‌نماید، ندارد. میدان، دارای خاصیت آسیب‌رسانی به DNA بوده و میزان وقوع مجموعه آسیب‌های تکرار شونده و دورشته‌ای را افزایش می‌دهد. به‌علاوه، قرارگیری در معرض میدان مورد مطالعه، تأثیری بر فعالیت سایتوتوکسیک داروی بربرین در این سلول‌ها ندارد. **نتیجه‌گیری:** میدان الکترومغناطیسی مزبور می‌تواند به‌عنوان توسعه‌دهنده تومور در سلول‌های DU-145 عمل نماید و این اثر را احتمالاً با واسطه القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌ها و آسیب رساندن به مولکول DNA اعمال می‌کند.

کلیدواژه‌ها: میدان الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین، سرطان پروستات، استرس اکسیداتیو، سورواپوین، بربرین

مقدمه

عمومی در رابطه با خطرات احتمالی قرارگیری در معرض این میدان‌ها به وجود آمد. از آن زمان مطالعات بسیار گسترده‌ای به منظور بررسی رابطه میان قرار گرفتن در معرض این میدان‌ها و خطر ابتلا به بیماری سرطان انجام شده که یافته‌های بسیار متنوع و گاه متناقضی را به دنبال داشته است (۲). هرچند نتایج برخی مطالعات اپیدمیولوژیک (۳ و ۴) و آزمایشگاهی (۵-۷) حاکی از افزایش احتمال وقوع و یا پیشرفت سرطان به دنبال تابش ELF-EMF می‌باشد، سایر تحقیقات چنین ارتباطی را تأیید نکرده‌اند (۸ و ۹). در مقابل، گروهی از مطالعات نیز نشان داده‌اند که این میدان‌ها نه تنها فاقد فعالیت سرطان‌زایی

میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین (Extremely Low Frequency, ELF-EMF) شاخه‌ای از میدان‌های الکترومغناطیسی هستند که فرکانس آن‌ها کمتر از ۳۰۰ هرتز بوده و عمدتاً به‌طور مصنوعی، توسط تجهیزات تولید، انتقال و توزیع الکتریسیته و دستگاه‌های الکتریکی مورد استفاده در منازل و محیط‌های کار، تولید می‌شوند.

از سال ۱۹۷۹ که Leeper و Wertheimer نتایج تحقیقات خود را مبنی بر افزایش وقوع لوکمی در کودکانی که منازلشان در نزدیکی خطوط انتقال نیرو قرار دارد گزارش نمودند (۱)، یک نگرانی

آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (GIBCO) و 100 واحد بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (GIBCO) و با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع، کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه با فشار دی‌اکسید کربن ۵٪ نگهداری شدند. برای انجام کلیه آزمایش‌ها، پس از تعیین درصد سلول‌های زنده با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو، از سلول‌هایی با حداقل ۹۵ درصد قدرت حیات (Viability) استفاده شد.

سیستم تابش میدان الکترومغناطیسی: این سیستم شامل پیچه هلمولتز با روکش آلومینیومی و سه پایه پلکسی گلاسو استیمولاتور می‌باشد. هر سیم‌پیچ دارای ۵۰۰ دور سیم مسی به قطر ۰/۷ میلی‌متر است. قطر سیم‌پیچ‌ها در قسمت خارجی حلقه، ۷۷ سانتی‌متر، قطر داخلی، ۷۴ سانتی‌متر و فاصله بین دو سیم‌پیچ، ۳۵ سانتی‌متر می‌باشد. از آنجاکه به دلیل پایین بودن ولتاژ، میزان گرم شدن سیم‌پیچ‌ها در طول مدت آزمایش بسیار کم بود، هیچ سیستم خنک‌کننده‌ای برای پیچه در نظر گرفته نشد. تغییرات دمایی پیچه به وسیله دماسنج دیجیتال اندازه‌گیری و مشاهده شد که عملکرد سیستم تابشی اثری بر دمای محیط داخل پیچه ندارد. نمونه درست در مرکز پیچه و بر روی گرانیگاهی با پایه غیرفلزی قرار گرفت تا اختلالی در خطوط میدان ایجاد نشود. به‌منظور تولید میدان مورد نظر، یک مدار نوسان‌ساز و مبدل ولتاژ طراحی شد که با تنظیم سیستم، میدانی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی‌تسلا تولید شد.

تیمار سلول‌ها با داروی بربرین (Berberine): سلول‌ها در پلیتهای ۹۶ خانه‌ای، به تعداد ۶۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک، کشت داده شده و بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در انکوباتور ۳۷ درجه، با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار از بربرین تیمار شدند. با توجه به اینکه حلال دارو، یعنی DMSO، سمی می‌باشد این تیمار به گونه‌ای صورت گرفت که غلظت نهایی DMSO در محیط کشت از ۰/۱٪ تجاوز نکند.

بررسی تکثیر سلولی: به‌منظور بررسی میزان

هستند، بلکه می‌توانند رشد تومور را از طریق مهار فرآیند تکثیر سلولی و یا تحریک وقوع آپوپتوز کاهش دهند (۱۰ و ۱۱).

نحوه برهم‌کنش این شاخه از میدان‌های الکترومغناطیسی با سیستم‌های زنده نیز به‌طور گسترده‌ای بررسی شده است. از جمله مهم‌ترین مشاهدات صورت گرفته می‌توان به تغییر نفوذپذیری غشاء سلول به مولکول‌های کوچک، نظیر یون کلسیم (۱۲)، ایجاد انواع آسیب‌ها در مولکول DNA و اختلالات کروموزومی (۵ و ۱۳)، تغییر در وضعیت ردوکس سلولی و ایجاد استرس اکسیداتیو (۵ و ۱۴) و نیز تغییر در میزان بیان و یا فعالیت برخی پروتئین‌های دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی، نظیر فاکتور رونویسی NF- κ B (۵)، پروتئین سرکوبگر تومور P53 (۱۱) و Bcl-2 (۱۴) و پروتئین شوک حرارتی HSP-70 (۱۵) اشاره نمود.

در مطالعه حاضر، سلول‌های سرطان پروستات انسان، رده DU-145، به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیسی پالسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی‌تسلا قرار گرفتند و تغییرات رشد و تکثیر و غلظت داخل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن در آن‌ها بررسی شد. مقدار پروتئین سورواپوین، به‌عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه در بیماری سرطان که به رشد و متاستاز توده سلولی سرطانی کمک می‌کند (۱۶) و نیز میزان وقوع آسیب‌های تکرشته‌ای و دو رشته‌ای در مولکول DNA، در سلول‌های قرار گرفته تحت تابش میدان با سلول‌های کنترل مقایسه گردید. در انتها نیز تأثیر تابش پیوسته میدان بر خاصیت سایتوتوکسیک داروی بربرین که فعالیت ضدتوموری آن در بسیاری از رده‌های سلولی سرطانی به اثبات رسیده است (۱۷)، در سلول‌های DU-145 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

کشت سلول: سلول‌های سرطان پروستات انسان، رده DU-145، در محیط کشت RPMI (GIBCO) 1640 با ۱۰٪ از سرم جنین گاوی (GIBCO)، 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر

کنترل و تیمار شده با میدان به ویال های جداگانه انتقال یافته و به آن‌ها، DCFH-DA با غلظت نهایی ۲۰ میکرومولار اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، شدت نشر فلورسانس نمونه ها در طول موج تحریکی ۴۹۵ نانومتر و نشری ۵۲۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تغییرات بیان پروتئین سوروایوین: برای بررسی تغییرات بیان سوروایوین، در سطح تولید پروتئین، از روش وسترن بلات استفاده شد (۲۰). ابتدا محتویات پروتئینی سلول‌ها با استفاده از بافر لیز سلولی (حاوی تریس اسیدی 50 میلی مولار، کلرید سدیم 150 میلی مولار، EDTA 1 میلی مولار، EGTA 1 میلی مولار، فلوئورید سدیم 50 میلی مولار، سدیم دئوکسی کولات ۰/۵٪، وزنی/حجمی، SDS ۰/۱٪، وزنی/حجمی، گلیسرول ۱۰٪، حجمی/حجمی و تریتون X-100 ۱٪، حجمی/حجمی) استخراج و غلظت پروتئین‌ها با روش برادفورد تعیین گردید. سپس مقادیر برابر از پروتئین‌های مربوط به نمونه‌های کنترل و تیمار شده با میدان، با استفاده از SDS-PAGE ۱۲٪، تفکیک شده و بندهای پروتئینی حاصله به روی کاغذ نیتروسولوز انتقال یافتند. بعد از بلوکه شدن با شیر خشک بدون چربی (skim milk) ۱۰ درصد، کاغذ نیتروسولوز ابتدا با مخلوط آنتی بادی های اکتین (Sigma) و سوروایوین (Sigma) و سپس با آنتی بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (Sigma) تیمار شد. مجاورسازی ده دقیقه ای کاغذ با سوبسترای آلکالین فسفاتاز منجر به ظهور باندهای مربوط به پروتئین‌های اکتین و سوروایوین گردید. برای مقایسه شدت باندهای پروتئینی از نرم افزار ImageJ استفاده شد؛ بدین صورت که پس از تقسیم شدت هر یک از باندهای سوروایوین بر شدت باند اکتین متناظر آن (نرمالیزه کردن)، پارامتر دانسیته نسبی از طریق تقسیم اعداد حاصله بر عدد مربوط به نمونه کنترل محاسبه گردید.

بررسی آسیب دیدگی مولکول DNA: به منظور بررسی تأثیر تابش میدان الکترومغناطیسی بر میزان وقوع آسیب‌های تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای در مولکول DNA از

تغییرات در رشد و تکثیر سلول‌ها، از روش سنجش MTT (Microculture Tetrazolium assay) استفاده شد (۱۸). سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، به تعداد ۶۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک، کشت داده شده و بعد از ۲۴ ساعت، در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار داده شدند. پلیت‌های کنترل نیز در انکوباتور ۳۷ درجه با میدان خاموش قرار گرفتند. پس از پایان تابش میدان، استوک رنگ MTT از طریق حل کردن ۵ میلی گرم پودر MTT (Sigma) در یک میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات (Phosphate Buffer Solution-PBS) آماده شده و سپس محیط موجود در چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید حاوی ۰/۱٪ از استوک MTT جایگزین گردید. پس از ۴ ساعت قرارگیری پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه، محیط رویی چاهک‌ها تخلیه شده و رسوب حاصله در ۱۰۰ میکرولیتر حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) (Sigma) حل شد. نهایتاً شدت جذب پلیت‌های قرار گرفته در معرض میدان در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA READER (Exert96, Asys Hitch Ec Austria) اندازه‌گیری و با نمونه‌های کنترل مقایسه شد.

سنجش گونه‌های فعال اکسیژن: غلظت داخل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن، در سلول‌های کنترل و تیمار شده با میدان، با استفاده از ترکیب DCFH-DA، dichlorodihydro-fluorescein diacetate (Sigma) مقایسه شد (۱۹). این ماده پس از ورود به سلول، به ترکیب غیر فلورسسانت DCFH-dichlorodihydro-fluorescein (fluorescein) داستیله شده و سپس توسط گونه‌های فعال اکسیژن داخل سلول، به سرعت به ترکیب فلورسسانتی به نام DCFdichlorfluorescein) اکسید می‌شود. بنابراین شدت فلورسانس مشاهده شده را می‌توان به‌عنوان معیاری جهت مقایسه غلظت داخل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن در نظر گرفت. بدین منظور، سلول‌ها در پلیت‌های شش‌خانه‌ای کشت داده شده و پس از پایان تابش میدان، تریپسینه و جمع آوری شدند. سپس تعداد برابری از سلول‌های

بودن تفاوت های مشاهده شده میان سلول های کنترل و تیمار، از آزمون Student t-test استفاده شد. در این روش، کمیتی به نام P-value محاسبه می شود که هرچه مقدار آن کمتر باشد تفاوت مشاهده شده معنی دارتر خواهد بود. P-value کمتر از مقادیر ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ به ترتیب با یک (*)، دو (***) و سه (***) ستاره نشان داده شده است.

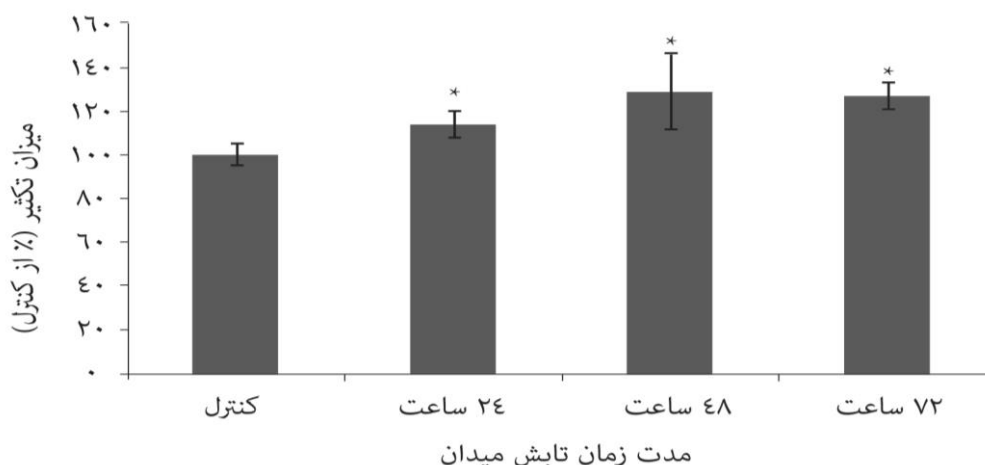
یافته ها

تأثیر میدان الکترومغناطیس بر تکثیر سلولی: سلول های DU-145 به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیسی پالسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی تسلا قرار گرفتند و میزان تکثیر آنها با استفاده از روش MTT با سلول هایی که تحت تابش میدان قرار نگرفته بودند مقایسه شد. همان طور که شکل ۱ نشان می دهد تابش ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته میدان، به ترتیب موجب ۱۴، ۲۹ و ۲۷ درصد افزایش در میزان تکثیر سلول های DU-145 می گردد.

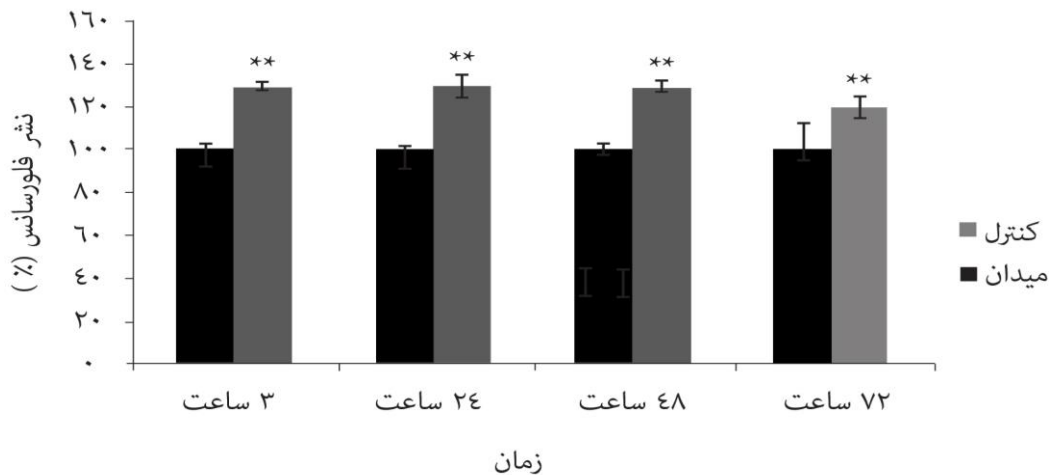
تأثیر میدان الکترومغناطیس بر غلظت گونه های فعال اکسیژن: غلظت داخل سلولی گونه های فعال اکسیژن در سلول هایی که تحت تابش ۳ تا ۷۲ ساعته میدان قرار گرفته بودند، با استفاده از ترکیب DCFH-DA، با سلول های

روش قلیایی الکتروفورز سلول های تکی روی ژل (آزمون کامت) استفاده شد (۲۱). ابتدا سلول ها در لایه نازکی از آگارز بر روی لام به دام افتاده و به کمک بافر حاوی کلرید سدیم ۲/۵ مولار، EDTA ۱۰۰ میلی مولار، تریس اسیدی ۱۰ میلی مولار و تراپتئون X-100 یک درصد حجمی/حجمی (PH=10)، شکسته شدند. سپس مولکول های DNA توسط بافر دناتوره کننده، حاوی هیدروکسید سدیم ۳۰۰ میلی مولار و EDTA یک میلی مولار (pH=13)، به فرم تکرشته ای در آمده و به مدت ۳۰ دقیقه تحت الکتروفورز با ولتاژ ۱۳ ولت (یک ولت به ازای هر سانتی متر طول تانک) قرار گرفتند. پس از خنثی سازی با محلول تریس اسیدی ۰/۴ مولار (pH=7.5)، لام ها با اتیدیوم برمایید (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) رنگ آمیزی شده و عکس برداری از آنها با میکروسکوپ فلورسانس انجام شد. تجزیه و تحلیل عکس ها به کمک نرم افزار Cometscore V.1.5 صورت گرفت و از میان پارامترهای متعدد اندازه گیری شده توسط نرم افزار، پارامتر "درصد DNA در دنباله" برای گزارش نتایج انتخاب گردید.

تمام نتایج به دست آمده در این مطالعه معادل میانگین \pm انحراف از معیار بوده و حاصل سه تکرار مستقل هستند. جهت بررسی میزان معنی دار

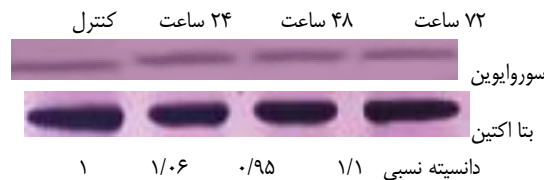


شکل ۱- قرارگیری پیوسته سلول های رده DU-145 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیسی با فرکانس 50 Hz و شدت 0.6 mT. به ترتیب موجب ۱۴، ۲۹ و ۲۷ درصد افزایش رشد در مقایسه با سلول های کنترل می گردد. نتایج به دست آمده معادل میانگین \pm انحراف از معیار بوده و حاصل سه تکرار مستقل هستند. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001



شکل ۲- تأثیر تیمار با میدان بر غلظت داخل سلولی گونه های فعال اکسیژن. نتایج به دست آمده معادل میانگین \pm انحراف از معیار بوده و حاصل سه تکرار

تکرار مستقل هستند. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$



شکل ۳- تأثیر قرارگیری ۷۲-۲۴ ساعته سلول های DU-145 در معرض میدان بر بیان پروتئین سورویوین در این سلول ها. پروتئین بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی، جهت اثبات برابر بودن میزان نمونه وارد شده به هر یک از چاهک های ژل الکتروفورز، مورد استفاده قرار گرفت. همان طور که در ظاهر، تغییری در میزان بیان سورویوین مشاهده نمی شود، تحلیل باند ها با استفاده از نرم افزار ImageJ نیز نشان داد که قرارگیری در معرض میدان، تأثیری بر مقدار این پروتئین ندارد.

تأثیر میدان الکترومغناطیس بر آسیب DNA: با استفاده از روش قلیایی آزمون کامت، میزان وقوع مجموعه آسیب های تک رشته ای و دو رشته ای DNA در سلول های قرار گرفته در معرض میدان با سلول های کنترل مقایسه شد. همان طور که شکل ۴ نشان می دهد تابش پیوسته میدان ۵۰ هرتز و ۰/۶ میلی تسلا، در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت موجب افزایش معنی دار مقدار DNA موجود در بخش دنباله کامت می گردد ($P < 0.01$ در Student's t-test) که بیانگر افزایش وقوع آسیب ها در مولکول DNA می باشد.

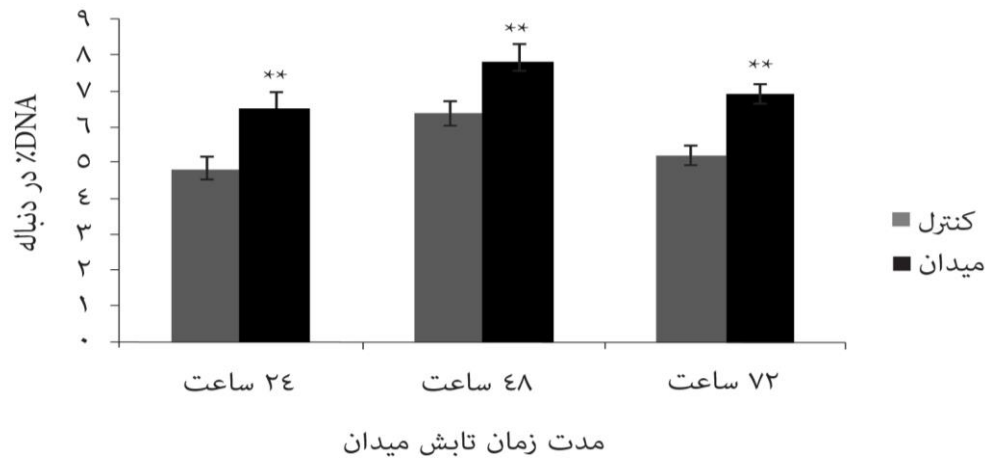
تأثیر میدان الکترومغناطیس بر فعالیت سایتوتوکسیک داروی بربرین در سلول های DU-145: ابتدا تأثیر غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار بربرین بر تکثیر سلول های DU-145 در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به کمک روش سنجش MTT، بررسی شد. نتایج نشان داد که

کنترل مقایسه شد. شکل ۲ نشان می دهد که قرارگیری پیوسته سلول های DU-145 در معرض میدان ۵۰ Hz، 0.6 mT سبب افزایش ۳۰ درصدی (در زمان های ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و ۲۷ درصدی (در زمان ۷۲ ساعت) شدت نشر فلورسانس در طول موج ۵۲۲ نانومتر، نسبت به سلول های کنترل می گردد ($P < 0.01$ در Student's t-test) که بیانگر افزایش غلظت داخل سلولی گونه های فعال اکسیژن می باشد.

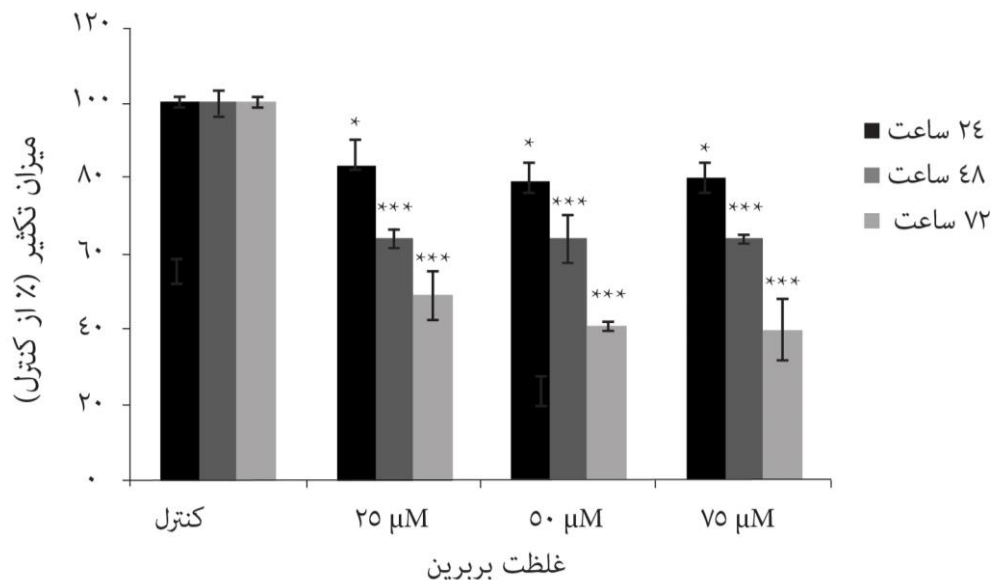
تأثیر میدان الکترومغناطیس بر میزان بیان پروتئین سورویوین: مقایسه مقدار پروتئین سورویوین در سلول های تیمار شده با میدان و سلول های کنترل به کمک روش وسترن بلات صورت گرفت. شکل ۳ نشان می دهد که ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرارگیری در معرض میدان الکترومغناطیسی، اثر معنی داری بر میزان بیان سورویوین در سطح تولید پروتئین ندارد.

میدان الکترومغناطیسی پالسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی تسلا مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۶ نشان می دهد چنین تیماری در زمان های ۲۴ (A) و ۷۲ (C) ساعت تأثیر معنی داری بر تکثیر سلول ها ندارد؛ اما در زمان ۴۸ ساعت (B)، موجب افزایش نسبتاً قابل توجه شدت تکثیر سلول ها در مقایسه با حالتی می گردد که آن ها را تنها با غلظت های مختلف دارو تیمار کرده باشیم.

تیمار ۲۴-۷۲ ساعته سلول های DU-145 با غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار بربرین، سبب کاهش ۲۰-۱۷ درصدی (پس از ۲۴ ساعت)، ۳۶ درصدی (پس از ۴۸ ساعت) و ۶۰-۵۱ درصدی (پس از ۷۲ ساعت) شدت تکثیر سلول ها در مقایسه با سلول های کنترل می گردد (شکل ۵). در $P < 0.001$ در Student's t-test) اثر تیمار هم زمان سلول ها، به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت، با غلظت های مذکور بربرین و



شکل ۴- تأثیر میدان الکترومغناطیس بر آسیب DNA. نتایج به دست آمده معادل میانگین \pm انحراف از معیار بوده و حاصل سه تکرار مستقل هستند. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

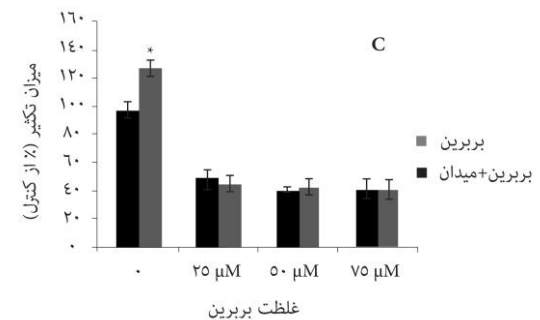
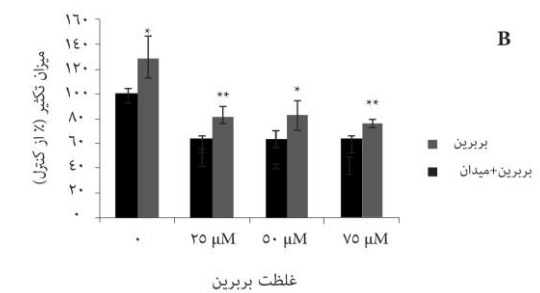
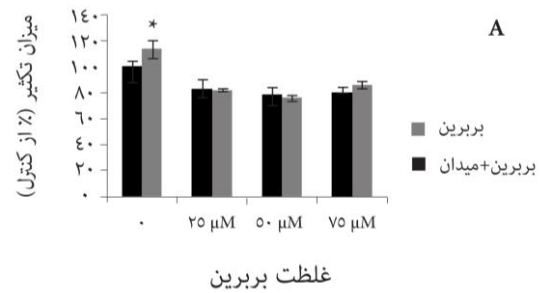


شکل ۵: تأثیر تیمار با داروی بربرین بر قدرت تکثیر سلول های DU-145. نتایج به دست آمده معادل میانگین \pm انحراف از معیار بوده و حاصل سه تکرار مستقل هستند. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(۵)، Wei و همکاران (۶) و Manni و همکاران (۷) مؤید دخالت میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین در توسعه تومورهای سرطانی می‌باشد. نکته بسیار جالب توجه، تفاوت فاحش نتیجه این بخش از مطالعه با نتیجه یک تحقیق مشابه است که طی آن، سلول‌های DU-145 به مدت ۲۴-۹۶ ساعت در معرض میدان مغناطیسی سینوسی با فرکانس ۶۰ هرتز و شدت های ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی تسلا قرار گرفتند. این تیمار موجب کاهش قابل توجه تعداد سلول‌ها، به صورت وابسته به دوز (شدت میدان) و زمان، گردید (۲۲). مقایسه این دو مطالعه به خوبی نشان می‌دهد که چگونه تفاوت‌های هرچند اندک در مؤلفه‌های تابشی میدان می‌تواند نتایج کاملاً متفاوتی را به دنبال داشته باشد.

القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌ها از طریق افزایش دادن غلظت گونه‌های فعال اکسیژن و یا کاهش غلظت و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، یکی از پذیرفته شده ترین مکانیسم‌های پیشنهادی در مورد نحوه برهم‌کنش میدان با سیستم‌های زنده است (۲۳). لذا در ادامه کار، غلظت داخل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های کنترل، با سلول‌هایی که به مدت ۳، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض میدان قرار گرفته بودند، مقایسه شد. همچون تعدادی از تحقیقات انجام شده (۲۲، ۵) و (۲۴)، در این مطالعه نیز یک افزایش قابل توجه، حدود ۳۰ درصدی، در شدت فلورسانس سلول‌هایی که تحت تابش پیوسته میدان قرار گرفته بودند مشاهده شد که بیانگر بالاتر بودن غلظت گونه‌های فعال اکسیژن در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل می‌باشد.

اثر بر فعالیت و یا شدت بیان برخی از پروتئین‌های دخیل در فرآیندهای تکثیر، تمایز و مرگ سلولی، یکی دیگر از مکانیسم‌هایی است که طی تحقیقات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. هر چند به نظر می‌رسد در هیچ یک از مطالعات انجام شده، بررسی جامعی در مورد جزئیات تغییرات رخ داده در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی صورت نگرفته و تنها به سنجش پراکنده میزان فعالیت و یا بیان چند پروتئین کلیدی در



شکل ۶ - مقایسه قدرت بقا سلول‌های DU-145 تیمار شده با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار بربرین و سلول‌هایی که ضمن تیمار با دارو، در معرض میدان ۵۰ هرتز و ۰/۶ میلی تسلا نیز بوده‌اند، در زمان‌های ۲۴ (A)، ۴۸ (B) و ۷۲ (C) ساعت. ستون مشکی در غلظت صفر بربرین، نماینده سلول‌های کنترل و ستون خاکستری، نشان دهنده سلول‌هایی است که تنها تحت تابش ELF-EMF قرار گرفته‌اند. نتایج به دست آمده معادل میانگین \pm انحراف از معیار بوده و حاصل سه تکرار مستقل هستند. * $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعات حاضر نشان داد که قرارگیری پیوسته سلول‌های DU-145 به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیسی ی پالسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی تسلا، سبب یک افزایش معنی دار، ۱۴-۲۹ درصدی، در میزان رشد و تکثیر سلول‌ها می‌گردد. این مشاهده، همانند نتایج حاصل از تحقیقات Wolf و همکاران

یکی از پرکاربردترین پارامترهای مورد استفاده برای گزارش نتایج حاصل از آزمون کامت می باشد، حاکی از افزایش میزان آسیب‌های تک رشته ای و دو رشته ای در DNA به دنبال تابش میدان بود. به بیان دیگر، نتایج این بخش از مطالعه نشان می دهد که میدان الکترومغناطیسی پالسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی تسلا، در صورت تابش پیوسته و طولانی مدت می‌تواند به‌عنوان یک عامل ژنوتوکسیک عمل نماید. این مشاهده، در کنار یافته های حاصل از تحقیقات Wolf (۵) و Lai (۲۷ و ۲۸)، ادعای Winker و همکارانش (۱۳) را مبنی بر اینکه تنها تابش های منقطع، و نه پیوسته، میدان الکترومغناطیسی قادر است به مولکول DNA آسیب برساند، رد می کند. نکته مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد آن است که انرژی میدان‌های الکترو مغناطیسی با فرکانس بسیار پایین، به اندازه ای نیست که بتواند مستقیماً موجب شکستن پیوندهای بین اتمی گردد و لذا تنها برهم‌کنش های غیر مستقیم میان DNA و میدان، معقول و پذیرفتنی است (۲۹). نتایج برخی مطالعات پیشنهاد می‌کند که احتمالاً میدان به واسطه القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌ها سبب بروز آسیب در مولکول DNA می‌گردد (۵،۲۸ و ۳۰).

در آخرین بخش کار، تأثیر قرارگیری پیوسته سلول‌های DU-145 تحت تابش ۲۴ تا ۷۲ ساعته میدان ۵۰ هرتز و ۰/۶ میلی تسلا، بر خاصیت سایتوتوکسیک داروی بربرین در این سلول‌ها بررسی شد. ابتدا سلول‌ها تنها با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار دارو تیمار شدند. نتایج نشان داد که کلیه غلظت‌های به کار رفته، خصوصاً پس از ۷۲ ساعت، قادر به مهار مناسب رشد سلول‌های سرطانی می باشند. لذا در ادامه کاربا توجه به اینکه هر سه غلظت دارو، رشد و تکثیر سلول‌های DU-145 را به‌طور قابل ملاحظه ای مهار کردند، اثر تیمار هم زمان سلول‌ها با غلظت‌های مذکور و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۶ میلی تسلا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از تضعیف نسبی فعالیت سایتوتوکسیک داروی بربرین، به دنبال ۴۸

مسیرهای پیام‌رسانی اکتفا شده است. مطالعات نشان داده‌اند بیان پروتئین سورویوین، که نقش مهم آن در رشد و توسعه تومورهای سرطانی اثبات شده است، تحت تأثیر انواعی از فاکتورهای رونویسی حساس به شرایط اکسیداتیو سلول، مانند NF- κ B، P53 و STAT3، قرار دارد (۲۵). لذا، با توجه به افزایش مشاهده شده در میزان تکثیر و نیز غلظت گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های DU-145 پس از تابش پیوسته میدان الکترومغناطیسی و نیز با توجه به اینکه بررسی مقالات مشابه نشان می دهد تاکنون تغییرات بیان و فعالیت سورویوین مورد مطالعه قرار نگرفته است، مقدار این پروتئین در نمونه‌های استخراج شده از سلول‌های کنترل، با سلول‌های قرار گرفته در معرض میدان مقایسه شد. بر خلاف انتظار، نتایج حاصل از ایمونوبلاتینگ نشان داد که میزان بیان سورویوین در هیچ یک از زمان‌های مورد مطالعه، تفاوتی با مقدار آن در سلول‌های کنترل ندارد. به عبارت دیگر، افزایش مشاهده شده در رشد سلول‌های قرار گرفته در معرض میدان، ارتباطی با تغییر بیان پروتئین سورویوین ندارد. با توجه به پیچیدگی مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی می‌توان احتمال داد که فعالیت فاکتورهای رونویسی و سایر عوامل تنظیم کننده بیان سورویوین به‌گونه‌ای تغییر کرده که در مجموع تأثیری بر مقدار تولید این پروتئین نداشته است.

با توجه به اینکه بسیاری از عوامل سرطان زا، جهش‌زا نیز می باشند، پتانسیل ELF-EMF برای آسیب زدن به مولکول DNA به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. همچون بررسی های به عمل آمده در مورد احتمال سرطان‌زا بودن میدان، نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده درباره خاصیت ژنوتوکسیسیتهی آن نیز کاملاً متفاوت می‌باشد (۲۶). در مطالعه حاضر، با استفاده از روش قلیایی آزمون کامت، میزان وقوع مجموعه آسیب‌های تکرشته‌ای و دو رشته‌ای در مولکول DNA سلول‌های DU-145 که به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار گرفته بودند، با سلول‌های کنترل مقایسه شد. اندازه گیری پارامتر "درصد DNA در دنباله"، که

اثرات میدان صورت گیرد و ثانیاً مکانیسم های برهم کنش این میدان ها با سیستم های زنده و نقش هریک از خصوصیات فیزیکی و تابشی میدان در ایجاد تأثیرات مشاهده شده، به طور جزئی تر و منسجم تر بررسی شود.

منابع

1. Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 1979;109:273-84.
2. Repacholi M. Concern that "EMF" magnetic fields from power lines cause cancer. *Sci Total Environ* 2012;426:454-8.
3. Feychting M, Forssén U, Floderus B. Occupational and residential magnetic field exposure and leukemia and central nervous system tumors. *Epidemiology* 1997;8:384-9.
4. Li CY, Thériault G, Lin RS. Residential exposure to 60-Hertz magnetic fields and adult cancers in Taiwan. *Epidemiology* 1997;8:25-30.
5. Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M, et al. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2005;1743:120-9.
6. Wei M, Guizzetti M, Yost M, Costa LG. Exposure to 60-Hz magnetic fields and proliferation of human astrocytoma cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;162:166-76.
7. Manni V, Lisi A, Pozzi D, Rieti S, Serafino A, Giuliani L, et al. Effects of extremely low frequency (50 Hz) magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes. *Bioelectromagnetics* 2002;23:298-305.
8. Schreiber GH, Swaen GM, Meijers JM, Slangen JJ, Sturmans F. Cancer mortality and residence near electricity transmission equipment: a retrospective cohort study. *Int J Epidemiol* 1993;22:9-15.
9. Yoshizawa H, Tsuchiya T, Mizoe H, Ozeki H, Kanao S, Yomori H, et al. No effect of extremely low-frequency magnetic field observed on cell growth or initial response of cell proliferation in human cancer cell lines. *Bioelectromagnetics* 2002;23:355-68.
10. Tofani S, Barone D, Cintorino M, de Santi MM, Ferrara A, Orlassino R, et al. Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. *Bioelectromagnetics* 2001;22(6):419-28.
11. Tofani S, Cintorino M, Barone D, Berardelli M, De Santi MM, Ferrara A, et al. Increased mouse survival, tumor growth inhibition and decreased immunoreactive p53 after exposure to magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2002;23(3):230-8.

ساعت تابش پیوسته میدان مذکور بود؛ در حالی که در زمان های ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت تفاوتی میان شدت عمل دارو در سلول های عادی و سلول های قرار گرفته در معرض میدان مشاهده نشد. بنابراین، با توجه به اینکه فعالیت بهینه دارو در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شده، و از سوی دیگر، تابش ۷۲ ساعته میدان، تأثیری بر شدت تکثیر سلول های تیمار شده با بربرین نداشته است، می توان چنین نتیجه گیری کرد که قرارگیری سلول های DU-145 در معرض میدان مورد مطالعه، در مجموع، تأثیری بر خاصیت سایتوتوکسیک داروی بربرین در این سلول ها ندارد.

همان طور که از مجموع مقالات بررسی شده در قسمت های مقدمه و بحث این مقاله، و همچنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مقایسه آن با تحقیقات مشابه، مشخص است، داده های موجود در زمینه اثرات سرطانزایی و یا ضد سرطانی ELF-EMF با فرکانس های ۵۰ و ۶۰ هرتز، و حتی ساز و کارهای ایجادکننده چنین اثراتی، بسیار متنوع و متناقض می باشد؛ به طوری که مقایسه نتایج مطالعات مختلف و دست یابی به یک جمع بندی مشخص را بسیار مشکل، و تا حدودی غیر ممکن، ساخته است.

مهم ترین دلایلی که می توان برای این تفاوت های فاحش در نظر گرفت عبارتند از: استفاده از رده های سلولی مختلف، شامل انسانی و حیوانی و سرطانی و غیرسرطانی که الفاء اثرات پنجره ای را به دنبال دارد، تنوع بالای الگوهای تابشی به کار رفته از لحاظ فرکانس، شدت و مدت زمان تابش میدان، تابش منقطع و یا پیوسته و همچنین پالسی و یا سینوسی بودن میدان، و جهت گیری میدان های الکتریکی و مغناطیسی. در مجموع به نظر می رسد برای دست یابی به نتایج دقیق تر، به گونه ای که امکان جمع بندی تحقیقات و اظهار نظر قطعی در مورد نقش ELF-EMF در فرآیندهای آغاز، توسعه و یا مهار بیماری سرطان فراهم شود، لازم است اولاً یک استاندارد سازی در مورد مؤلفه های فیزیکی و تابشی میدان الکترومغناطیسی و همچنین ملاک های ارزیابی

Pazhang Y, Shafieezadeh M. Effects of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields on morphological and biochemical properties of human breast carcinoma cells (T47D). *Electromagn Biol Med* 2012;31(4):425-35.

25. Zhang M, Yang J, Li F. Transcriptional and posttranscriptional controls of survivin in cancer cells: Essential interfaces for developing novel approaches for cancer treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(3):391-402.

26. Vijayalaxmi, Obe G. Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation: a review and future research recommendations. *Bioelectromagnetics* 2005;26:412-30.

27. Lai H, Singh NP. Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 1997;18:156-65.

28. Lai, H., and Singh, NP. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect* 2004;112: 687-94.

29. Simkó M. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects. *Curr Med Chem* 2007;14:1141-52.

30. Lai H, Singh NP. Melatonin and N-tert-butyl-alpha-phenylnitron block 60-Hz magnetic field-induced DNA single and double strand breaks in rat brain cells. *J Pineal Res* 1997;22: 152-62.

12. Liburdy RP, Callahan DE, Harland J, Dunham E, Sloma TR, Yaswen P. Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction. *FEBS Lett* 1993;334:301-8.

13. Winker R, Ivancsits S, Pilger A, Adlkofer F, Rudiger HW. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res* 2005;585:43-9.

14. Falone S, Grossi MR, Cinque B, D'Angelo B, Tettamanti E, Cimini A, et al. Fifty hertz extremely low-frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2093-106.

15. Mannerling AC, Simkó M, Mild KH, Mattsson MO. Effects of 50-Hz magnetic field exposure on superoxide radical anion formation and HSP70 induction in human K562 cells. *Radiat Environ Biophys* 2010;49(4):731-41.

16. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: A promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 2007; 249:49-60.

17. Tang J, feng Y, Taso S, Wang N, Curtain R, Wang Y. Berberine and Coptidis rhizoma as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations. *J Ethnopharmacol* 2009; 126:5-17.

18. Malehmir M, Haghpanah V, Larijani B, Ahmadian S, Alimoghaddam K, Heshmat R, et al. Multifaceted suppression of aggressive behavior of thyroid carcinoma by all-trans retinoic acid induced re-differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 348:260-9.

19. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5:227-31.

20. Sambrook, J. and Russell, DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. A8.40-A8.51.

21. Villarini M, Moretti M, Scassellati-Sforzolini G, Boccioli B, Pasquini R. Effects of co-exposure to extremely low frequency (50 Hz) magnetic fields and xenobiotics determined in vitro by the alkaline comet assay. *Sci Total Environ* 2006;361:208-19.

22. Koh EK, Ryu BK, Jeong DY, Bang IS, Nam MH, Chae KS. A 60-Hz sinusoidal magnetic field induces apoptosis of prostate cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Radiat Biol* 2008; 84:945-55.

23. Lacy-Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields. *FASEB J* 1998;12:395-420.

24. Sadeghipour R, Ahmadian S, Bolouri B,

The effects of extremely low frequency pulsed electromagnetic field on biochemical properties of the prostate cancer cell line, DU-145

Behnaz Khavari, Msc, Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran. be_khavari@ut.ac.ir

***Shahin Ahmadian**, PhD, Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran (*Corresponding author). ahmadian@ibb.ut.ac.ir

Yaghub Pazhang, PhD, Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia university, Urmia, Iran. ypazhang@yahoo.com

Bahram Bolouri, PhD, Associate Professor of Biophysical Medicine, Department of Physical Medicine, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. bolouri.b@iums.ac.ir

Mahshid Shafizadeh, Msc, Department of Biochemistry, Institute of biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran. shafizadeh@ibb.ut.ac.ir

Abstract

Background: In the recent decades, there has been an increasing effort to study possible biological effects of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs). In this study, the effects of 50 Hz, 0.6 mT pulsed electromagnetic field on proliferation and biochemical properties, in a prostate cancer cell line, DU-145, and the simultaneous treatment of these cells with electromagnetic field and anticancer drug, berberine, were explored

Methods: Control and treated cells were seeded in separate plate dishes and cell proliferation, concentration of reactive oxygen species (ROS), survivin expression and DNA damage were studied by MTT assay, Fluorescence spectrometry, Western blotting and Comet assay, respectively.

Results: Our results showed a significant increment in cell proliferation and intracellular concentration of ROS after 24-72 hours of continuous exposure to the field. The treatment did not affect the expression level of the cancer biomarker, survivin, but acted as a genotoxic agent and increased DNA single and double strand damages. The results also showed that continuous exposure to the applied field does not have any effect on the cytotoxic activity of berberine in DU-145 cells.

Conclusion: On the whole, it seems that the studied electromagnetic field acts as a tumor promoter in this cell line, possibly through induction of oxidative stress and DNA damage.

Keywords: Extremely low frequency electromagnetic fields, Prostate cancer, Oxidative stress, Survivin, Berberine