VALUTAZIONE DELLA FORMAZIONE DEI RADICALI DELL'OSSIGENO IN COLTURE CELLULARI ESPOSTE A 900 MHz

O. Zeni[1], G. d'Ambrosio[2], R. Massa[2], R. Di Pietro[1], M.R. Scarfì[1]

[1]ICEmB presso CNR- IREA, Via Diocleziano, 328 – 80124 Napoli,
zeni.o@irea.cnr.it

[2]ICEmB presso Dipartimento di Ingegneria Elettronica e delle Telecomunicazioni,

Università di Napoli Federico II, Via Claudio, 21 – 80125 Napoli,
guglielmo.dambrosio@unina.it

Abstract

The induction of oxidative stress has been evaluated in a murine cell line (L929) exposed in vitro to 900 MHz continuous wave. Two different SAR values ,0.3 and 1 W/kg, have been applied for 10 min and 30 min exposure duration. Results indicate absence of effects on the Reactive Oxygen Species (ROS) formation as revealed soon after RF exposure and following several times until 1 hour from field application.

INTRODUZIONE

I radicali liberi sono molecole molto reattive che posseggono un elettrone spaiato e sono prodotti continuamente nelle cellule come intermedi del metabolismo. Le più importanti reazioni dei radicali liberi nelle cellule aerobiche coinvolgono l'ossigeno molecolare e i suoi derivati radicalici, le cosiddette specie reattive dell'ossigeno (ROS), tra cui l'anione superossido, il radicale ossidrilico e il perossido d'idrogeno. Questi ultimi, se presenti in basse concentrazioni, sono utili o indispensabili a svariate funzioni metaboliche cellulari; al contrario una eccessiva produzione o una inadeguata rimozione dei ROS determinano una condizione che prende il nome di stress ossidativo che causa mal funzionamento metabolico e danni a macromolecole biologiche [1]. E' noto che l'eccesso di ossidanti ha un ruolo importante nei processi di iniziazione, promozione e progressione del cancro [2] per cui, nell'ambito della valutazione degli effetti biologici dovuti a esposizioni a campi elettromagnetici, l'induzione di stress ossidativo riveste un ruolo chiave tra i meccanismi coinvolti nei processi di cancerogenesi non genotossica [3, 4].
In questo lavoro viene studiata la formazione di ROS in colture cellulari murine (L929) esposte ad un campo elettromagnetico ad una delle frequenze tipicamente utilizzate per la telefonia cellulare (900 MHz). Per questo scopo, in seguito a esposizioni della durata di 10 e 30 minuti, a due livelli di tasso di assorbimento specifico (SAR, 0.3 e 1 W/kg) i ROS sono stati misurati sia subito dopo l'esposizione sia ad intervalli di tempo fino ad un massimo di 1 ora.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari di fibrosarcoma murino (L929) sono state coltivate a 37° C in atmosfera controllata di CO_2 al 5% in terreno DMEM addizionato con il 10% di Siero Fetale Bovino inattivato al calore, 1% di L-Glutamina e 0.5% di Penicillina-Streptomicina. 2.5 x 10^6 cellule sono state seminate in 15 ml di terreno completo 24 ore prima dell'esperimento in fiasche Falcon da 250 ml.
Per la misura della formazione dei ROS è stato applicato il metodo proposto da Le Bell et al. [5] che sfrutta la trasformazione di Diclorofluoresceina Diacetato (DCF-DA) in Diclorofluoresceina (DCF) in presenza di ROS. La fluorescenza della DCF è stata misurata mediante un fluorimetro (Perkin-Elmer; LS50) a una lunghezza d'onda di eccitazione di 495 nm e una di emissione di 525 nm e il contenuto di ROS è stato normalizzato per la concentrazione delle proteine totali (valutata con un kit Bio-rad e usando la Albumina Bovina Serica come standard).
Le esposizioni sono state condotte in guida d'onda a 900 MHz in onda continua (CW) per 10 e 30 minuti a due differenti valori di SAR: 0.3 e 1 W/kg. Per ogni condizione sperimentale sono stati allestiti due campioni, uno da esporre, l'altro da utilizzare come controllo (pseudo esposizione). A tal fine sono state utilizzate due guide d'onda, termostatate mediante circolazione esterna di acqua (temperatura interna di 37°C); una guida è stata alimentata dal segnale a radiofrequenza, mentre l'altra è stata utilizzata per la pseudo-esposizione. La guida portacampione era alimentata da un segnale a 900 MHz amplificato e le potenze incidente, riflessa e trasmessa venivano continuamente misurate durante l'esposizione.

L'effetto del campo elettromagnetico è stato valutato saggiando la formazione dei ROS dopo l'esposizione di 10 e 30 minuti. Inoltre, è stata anche valutata la cinetica della formazione di ROS: per esposizioni di 10 minuti i ROS sono stati anche dosati dopo 20, 40 e 60 minuti dall'inizio del trattamento, mentre nel caso delle esposizioni della durata di 30 minuti il dosaggio è stato eseguito anche dopo 45 e 60 minuti dal suo inizio.
La concentrazione di ROS nei campioni esposti è stata confrontata con quella rilevata nei rispettivi controlli (pseudo-esposti) valutando il rapporto in termini percentuali. Per ogni condizione sperimentale viene riportata la media ± lo scarto tipo su almeno tre esperimenti indipendenti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In figura 1 vengono riportati i risultati ottenuti in seguito a 10 minuti di esposizione ai due valori di SAR applicati. Per tutti i tempi saggiati non si riscontrano differenze statisticamente significative tra i campioni esposti rispetto agli pseudo-esposti, anche se, nel caso dei campioni esposti al SAR di 1 W/Kg, si evidenzia un lieve incremento nella formazione di ROS quando la misura viene effettuata subito dopo i 10 minuti di esposizione (40 ± 23 %). Tale differenza comunque non risulta statisticamente significativa (P=0.09).

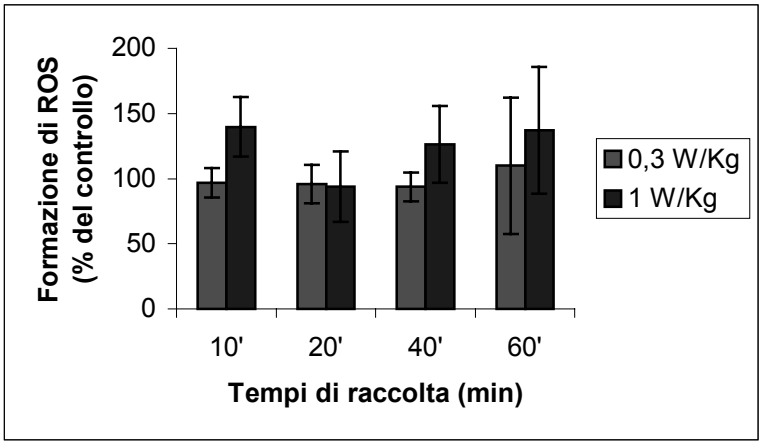

Figura 1- Concentrazione di ROS in colture di L929 dopo 10 minuti di esposizione a 900 MHz in onda continua e a vari tempi di raccolta.

I risultati ottenuti in seguito a 30 minuti di esposizione vengono riportati in figura 2 per valori di SAR di 0.3 e 1 W/kg. Anche in questo caso le differenze tra i campioni esposti e i rispettivi pseudo-esposti non mostrano differenze statisticamente significative ($P>0.05$ in tutti i casi). Bisogna però notare che anche in questo caso si riscontra un incremento nella formazione di ROS di circa il 30 % quando la misura viene fatta subito dopo l'esposizione, per entrambi i SAR esaminati.

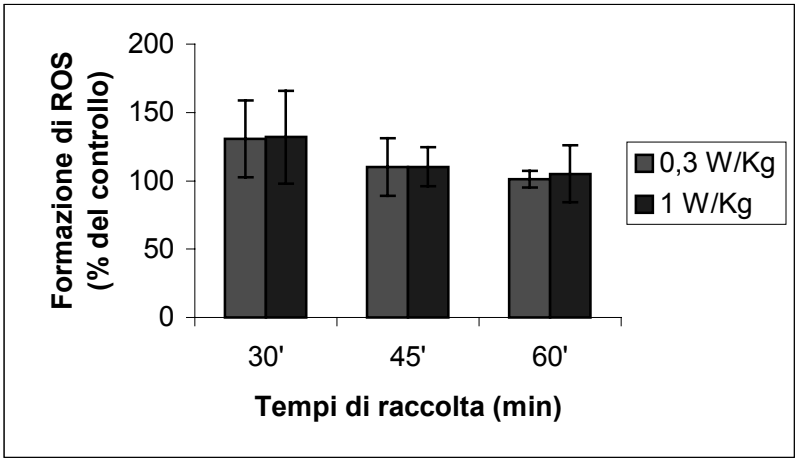

Figura 2- Concentrazione di ROS in colture di L929 dopo 30 minuti di esposizione a 900 MHz in onda continua e a vari tempi di raccolta.

In conclusione, i risultati ottenuti, sebbene preliminari, non evidenziano alterazione statisticamente significative nella concentrazione di ROS nei campioni esposti rispetto ai controlli, suggerendo che nelle condizioni sperimentali adottate l'esposizione a 900 MHz in onda continua non induce stress ossidativo. Sono comunque in corso ulteriori esperimenti sia per verificare la validità statistica dei risultati ottenuti subito dopo le esposizioni in onda continua, sia per valutare l'effetto della modulazione del segnale GSM nelle stesse condizioni sperimentali.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto Europeo "Combined Effects of Electromagnetic Fields with Environmental Carcinogens" (CEMFEC), Quinto Programma Quadro.

BIBLIOGRAFIA

[1] L.L. De Zwart, JHN Meerman, JNM Commaudeur, NPE Vermeulen (1999) Free Radical Biolo. & Med., 26 (1-2), 202-226.
[2]Laval J, Jurado J., Saparbaev M, Sidorkina O. (1998) Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. Mutation Res., 402, 93-102
[3] J Juutilainen, S Land (1997) Mutat Res., 387(3), 165-71.
[4] YM Moustafa, RM Moustafa, A Belacy, SH Abou-El-Ela, FM Ali (2001) J of Pharmaceutical and biomedical analysis, 26, 605-608.
[5] CP Le Bell, FA Sied, M Mc Kee, SC Bondy (1990) Tox. Applied Pharmacol., 104, 17- 24.