

بررسی اثر میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روند اسپرmatوژنز و پروتئین‌های سرم خون موش نژاد Balb/c

کاظم پریور^۱، Ph.D.، محمد نبیونی^{۲*}، نعمت‌الله گلستانیان^۳، الهه امینی^۴ M.Sc.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه تربیت معلم، تهران

۲- گروه فیزیک، دانشگاه تربیت معلم، تهران

۳- فارغ‌التحصیل مقطع کارشناسی ارشد سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه تربیت معلم، تهران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: nabiuni@tmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۲۲

چکیده

هدف: هدف این پژوهش تغییرات ایجاد شده توسط میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روند اسپرmatوژنز، میزان پروتئین‌های سرم خون و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز موش Balb/c است.

مواد و روش‌ها: موش‌های نر بالغ نژاد Balb/c در گروه‌های کنترل، شم و تجربی دسته بندی شدند. در گروه تجربی موش‌ها درون محفظه قرار گرفته و در معرض میدان الکترومغناطیسی با شدت ۱۲۰ گوس، فرکانس ۱۰۰ هرتز با شکل موج سینوسی یکسو شده به مدت ۱۴ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، موش‌ها وزن و کشته شدند. تعداد سلول‌های زاینده در بیضه توسط آزمون هیستوتکنیک، سنجش سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط اتوانالیزور و اندازه‌گیری پروتئین‌های شاخص سرم خون توسط آزمون الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین وزن موش‌ها و بیضه‌ها در بین گروه‌ها مشاهده نشد. سلول‌های اسپرmatوگونی و اسپرmatوسیت ثانویه در گروه تجربی نسبت به دو گروه دیگر افزایش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) نشان دادند. سنجش درصد پروتئین‌های سرم خون نشان داد که در بین پنج پروتئین شاخص خون، درصد آلفا ۱ گلوبولین در گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل و شم کاهش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) نشان داد، با این وجود ارزیابی فعالیت آلکالین فسفاتاز تفاوت معنی‌داری را نداشت.

نتیجه‌گیری: در معرض قرار دادن موش‌های بالغ با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین (۱۲۰ گوس، فرکانس ۱۰۰ هرتز)، موجب تغییراتی در اسپرmatوژنز از جمله افزایش تعداد اسپرmatوسیت‌های ثانویه، ایجاد حالت سن سیتیوم در سلول‌های اسپرmatوژنیک، تخریب بافت بینابینی بیضه شد که می‌تواند منجر به کاهش باروری در موش‌ها شود.

واژگان کلیدی: میدان‌های الکترومغناطیسی، اسپرmatوژنز، سنجش پروتئین‌های سرم خون

مقدمه

میدان های الکترومغناطیسی ترکیبی از میدان های الکتریکی و مغناطیسی بوده و تمام جنبه های حیات را تحت پوشش قرار می دهند. اثر میدان های الکترومغناطیسی بر روی سلامتی وابسته به فرکانس و شدت میدان است. میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس های مایکروویو و رادیویی ابزار خوبی جهت شناخت زمینه های بیولوژیکی، مولکولی، رشد و نمو طبیعی، پاسخ های ایمنی، فرایند ارتباط بین سلول ها و ... را فراهم نموده اند (۱ و ۲).

میدان های الکترومغناطیسی اثر گرمایی و غیر گرمایی ایجاد کرده که در هر دو صورت می توانند بر روی سطوح سلولی و مولکولی اثرات مخربی داشته باشد. مطالعه بر روی افرادی که در معرض میدان های الکترو مغناطیسی با فرکانس بالا بوده اند نشان داد که در این افراد میزان خودکشی ۴۰ درصد بالاتر از دیگران است (۳).

بررسی ها نشان داده است که میدان های الکترو مغناطیسی با فرکانس پایین نیز که در درمان بیماری های انسانی از جمله ترمیم شکستگی استخوان مورد استفاده قرار گرفته، در شدت ۳-۵ میکرو آمپر بر میلی متر مربع موجب تحریک استخوان سازی و در شدت های بالاتر موجب تخریب استخوان می گردند (۴ و ۵).

این میدان ها با اثر بر روی گلیکوپروتئین های غشایی، بر روی فرایندهای داخل سلول مثل فعالیت آنزیم های درون سلول، اسکلت سلولی و هسته سلول تاثیر گذارند (۶). با توجه به کاربردی که این میدان ها در درمان برخی بیماری ها پیدا کرده اند، این احتمال وجود دارد که این میدان ها باعث ایجاد اثرات مخرب جبران ناپذیری گردند. بنابراین تحقیقات بسیاری در زمینه تاثیرات بیولوژیکی این میدان ها در حال انجام است. میدان های الکترومغناطیسی به عنوان یک فاکتور استرس زا می توانند موجب تغییر در سطوح هورمونی و ایمنی شده و ساختار و عملکرد دستگاه های بدن از جمله دستگاه تولید مثل را تحت تاثیر قرار دهند. اسپرماتوزن فرایندی است که در طی آن رویدادهای متوالی موجب تبدیل سلول های اسپرماتوگونی به اسپرماتوزوا می شود. از آنجایی که تعیین فعالیت آنزیمی در سرم خون یا عصاره بافتی شاخص مهمی در تشخیص بالینی بوده و تغییرات وابسته به جنس از خود نشان می دهند و از آنجا که آسیب های مورفولوژیکی بافت تغییرات غشایی به وجود آورده و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با تغییر نسبت کلسترول به

فسفولیپید دچار تغییر می شود، از این رو درصد فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بیضه موجب نشان دادن آسیب های احتمالی ناشی از تاثیر سوء میدان های الکترومغناطیسی است. به علاوه تحقیقات بر روی پروتئین های سرم خون نشان داده که کاهش در مقدار آلومین موجب بیماری کبدی، سوء تغذیه و پیری می شود و درصد آلفا ۱ گلوبولین، آلفا ۲ گلوبولین، بتا گلوبولین و گاما گلوبولین در بیماری های عفونی تغییر می کند (۷).

در قرن گذشته گرایش زیادی مبنی بر استفاده از میدان های الکترومغناطیسی ایجاد شده و از طرفی اثرات این میدان ها برای طولانی مدت بر روی سیستم تولید مثلی نگرانی عمده ای را به وجود آورده است. پژوهش ها نشان داده است که میدان های الکترومغناطیسی می توانند اثرات متضادی بر روی سلول ها و بافت بیضه داشته باشند. با این وجود اثرات میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین تحت بررسی است. هدف از این پژوهش تعیین اثر بیولوژیک میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین (۱۲۰ گوس، فرکانس ۱۰۰ هرتز) بر روی اسپرماتوزن، میزان پروتئین های سرم خون و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز است.

مواد و روش ها

حیوانات: برای انجام این آزمایش موش سفید آزمایشگاهی نژاد Balb/c از موسسه پاستور تهران خریداری و تحت شرایط طبیعی ۱۲ ساعت تاریکی/۱۲ ساعت روشنایی، دمای ۲۱±۲، رطوبت بین ۴۰-۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در این تحقیق سعی شد هر گونه عاملی که موجب استرس بر روی حیوان می شود، حذف شده و نمونه های کنترل، شم و تجربی در شرایط یکسان و درون یک قفس نگهداری شوند.

در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

مشخصات دستگاه تولید کننده میدان الکترومغناطیسی با

فرکانس پایین: برای تولید میدانی با شدت ۱۲۰ گوس، فرکانس ۱۰۰ هرتز و شکل موج کاملا یکسو شده از یک منبع تغذیه (حاوی ترانسفورماتور با قابلیت تولید جریان های با ولتاژ ۲۲۰، ۲۱۰، ۱۸۰، ۱۴۰، ۱۱۰، ۶۰)، ولت متر (۲۲۰ ولت)، آمپر متر (۵-۱۰ آمپر)، پل دیود، کلید قطع و وصل، چراغ سیگنال، کلید انتخاب، فیوز، رادیاتور، جعبه فلزی (با ابعاد ۲۵×۲۵×۳۵

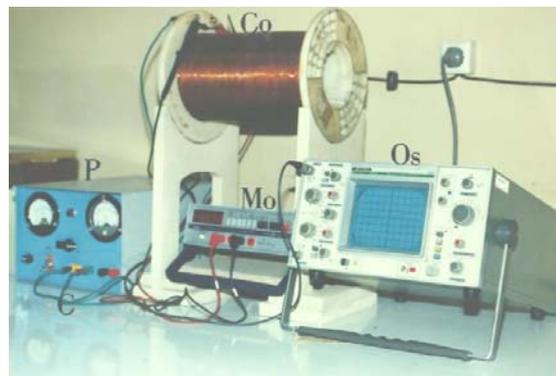
گروه شم گروهی بود که در آن موش ها درون محفظه قرار گرفته اما هیچ گونه جریانی بر آنها اعمال نشد. گروه کنترل نیز گروهی بودند که در شرایط کاملا طبیعی (نه درون محفظه و نه تحت تاثیر میدان) قرار گرفتند. موش های گروه تجربی به مدت ۱۴ ساعت (هر روز ۷ ساعت، ۲ روز متوالی) تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین (شدت ۱۲۰ گوس، فرکانس ۱۰۰ هرتز) قرار گرفتند. پس از انجام تیمار، موش ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط طبیعی قرار گرفته و سپس وزن شده و با کلروفرم کشته شدند.

تهیه مقاطع میکروسکوپی و مطالعه آنها: پس از خارج نمودن بیضه ها و شستشو با سرم فیزیولوژیک سرد، بیضه ها توزین، مراحل هیستوتکنیک با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین انجام و مقاطع میکروسکوپی تهیه شدند. در مطالعه مقاطع میکروسکوپی، مورفولوژی لوله های منی ساز، سلول های لیدیک، سرتولی و بافت بیضه توسط میکروسکوپ نوری به دقت مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور شمارش سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتید و اسپرماتوزوای بیضه از هر یک از گروه ها برش گیری شده و به طور تصادفی از هر مقطع ۳ لام و در هر لام ۶ لوله منی ساز انتخاب شده و زیر میکروسکوپ نوری به صورت چشمی سلول ها مورد شمارش قرار گرفتند.

اندازه گیری سطح پروتئین های شاخص سرم خون موش:

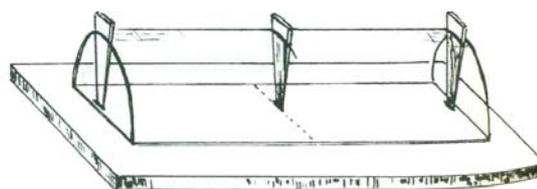
پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، توسط سرنگ های ۱ میلی لیتری از بطن چپ حیوان خون گیری انجام و سرم خونی توسط سانتریفیوژ با دور ۳۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه جدا شد. در مرحله بعد توسط پیت پاستور مقدار ۳ میلی لیتر از سرم، درون جا نمونه ای اپلیکاتور ریخته شد و بر روی پلیت هایی که داخل بافر ورنال قرار داشتند نمونه گذاری صورت گرفت. سپس استات پلیت های حاوی سرم به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۱۸۰ ولت در محل پلیت ها قرار گرفته تا باندهای الکتروفورزی تفکیک شده و توسط روش Helena رنگ آمیزی شوند. پس از رنگ آمیزی، استات پلیت های حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه داخل اون با حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته تا شفاف شوند. در نهایت توسط دانسیتومتر مدل Helena در طول موج ۵۲۵ نانومتر، درصد پروتئین های شاخص سرم (۵ پروتئین اصلی سرم یعنی آلبومین، آلفا ۱ گلوبولین، آلفا ۲ گلوبولین، بتا گلوبولین و گاما گلوبولین) اندازه گیری شدند.

سانتی متر، سیم، فیش اتصال، ترمینال پلاستیکی، دستگاه مولد جریان، سیم پیچ (کوئل)، مولتی متر (ولت متر و آمپر متر برای نشان دادن جهت جریان)، اسیلوسکوپ (به منظور نشان دادن شکل موج) و سیستم نگهدارنده چوبی (جهت نگهداری کوئل) استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱: شمایی از دستگاه تولید کننده میدان الکترومغناطیسی. P دستگاه مولد جریان. Co سیم پیچ (کوئل). Mo مولتی متر. Os اسیلوسکوپ. C سیم رابط.

گروه های آزمایشی: از آنجایی که بایستی آزمایش ها بر روی موش بالغ نر انجام می شد، موش های تکثیر شده پس از گذراندن دوره شیرخوارگی (۲۵ روز بعد از تولد) از سایر موش ها جدا و در اتاق پرورش حیوانات نگهداری شدند. پس از طی این دوره، موش های بالغ در ۳ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در هر گروه ۶ تایی (۲ گروه تجربی، ۲ گروه شم و ۲ گروه کنترل یا شاهد) حضور داشتند. در گروه تجربی، موش ها درون محفظه ای داخل بوبین قرار گرفتند تا به راحتی حرکت کرده و راستای بدن حیوان در راستای میدان قرار گیرد. جنس محفظه از پلاستیک خشک بود و ضمن ایجاد شکل دهی، با قرار گرفتن در وسط میدان تاثیری روی خطوط میدان نداشت. در ضمن محفظه قابلیت جابجایی داشته و در وسط میدان که شکل میدان یکنواخت بود قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲: محفظه پلاستیکی جهت مهار حیوان در داخل میدان مغناطیسی.

مورد بررسی قرار گرفت. از هر گروه تعداد سه لام و در هر لام شش لوله اسپرم ساز به صورت تصادفی انتخاب شدند. نتایج حاصل از شمارش نشان داد که افزایش معنی داری ($p \leq 0.05$) در تعداد سلول های اسپرماتوگونی در گروه تجربی نسبت به دو گروه دیگر مشاهده شد، اما تفاوت معنی داری بین سلول های اسپرماتوسیت اولیه در هر سه گروه وجود نداشت. به علاوه شمارش تعداد سلول های اسپرماتوسیت ثانویه در گروه تجربی نسبت به دو گروه دیگر افزایش معنی داری ($p \leq 0.05$) نشان داد، اما تفاوت معنی داری در شمارش تعداد سلول های اسپرماتید و اسپرمی مشاهده نشد (جدول ۱).

b. تغییرات کلی بافت بیضه موش های در معرض میدان الکترومغناطیسی

مقایسه مورفولوژیکی مقاطع میکروسکوپی نشان داد که در گروه کنترل، بافت بیضه و لوله های منی ساز درون آن نظم و ترتیب خاصی داشتند، این در حالی است که در نمونه های تجربی بهم ریختگی در نظم لوله های منی ساز اسپرماتوزن مشاهده شد. در نمونه کنترل تجمع نسبی اسپرم ها در بخش میانی لوله منی ساز دیده شد، در صورتی که در نمونه های تجربی فضای لومن تخلیه شده و در عوض تجمعی از اسپرم ها در فضای لومن اپیدیدیم مشاهده شد. از طرفی مقایسه بافت بینابینی و سلول های لیدیدگ در هر سه گروه نشان داد که نظم و ترتیب موجود در نمونه های گروه کنترل، در نمونه های تجربی دیده نشده و در بسیاری از موارد بافت چربی جایگزین بافت هم بند شده بود. هم چنین بافت چربی موجود بر روی بیضه در نمونه های کنترل دارای ساختمان منظمی بود، در حالی که در نمونه های تجربی پارگی بافت و تجمع هسته مشاهده شد. در بافت بیضه نمونه های کنترل، به علت نظم و ترتیب موجود، بیشترین تعداد سلول های اسپرماتوزن، اسپرماتوگونی ها بودند، در حالی که در نمونه تجربی که در آنها فرایند تقسیم سلولی تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی تسریع شده بود، تعداد سلول های اسپرماتوسیت ثانویه بیشتری در درون لوله های منی ساز مشاهده شد. به علاوه در گروه تجربی این میدان ها بر روی تمایز سلولی اثر گذاشته و اسپرماتوسیت های ثانویه در کنار یکدیگر درون یک سن سیتیوم قرار گرفتند (شکل ۳).

سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز بیضه: بعد از کشتن موش ها و خون گیری جهت انجام آزمایش های الکتروفورز، بیضه ها خارج، با سرم فیزیولوژیک شستشو و درون لوله های آزمایشی که حاوی ۴۰ برابر وزن بیضه، سرم فیزیولوژیک سرد بودند قرار گرفتند. سپس توسط دستگاه هموژنایزر اتوماتیک با دور ۲۵۰۰ rpm و ۲ دقیقه درجه سانتی گراد بافت بیضه هموژنیزه شد. در مرحله بعد عصاره به دست آمده با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا رسوب بافتی به طور کامل از عصاره جدا شده و محلول شفافی جهت سنجش آنزیمی به دست آید. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت Technicon و روش Technicon-RA با دستگاه اتو آنالیزور استفاده شد. در نهایت فعالیت آنزیم با روش کالری متری در طول موج ۴۰۵ نانومتر انجام شد.

بررسی های آماری: در این تحقیق جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار InStat استفاده و نمودارها بر روی فضای EXCEL رسم شدند. هر آزمایش سه بار تکرار شد و $p \leq 0.05$ سطح معنی دار بودن نتایج تلقی گردید.

نتایج

وزن بیضه ها

پس از انجام آزمایش موش های هر سه گروه (کنترل، شم و تجربی) قبل از کشته شدن وزن شدند. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اختلاف معنی داری بین وزن موش ها در بین این سه گروه، وجود نداشت که نشان دهنده سن و شرایط نگهداری یکسان موش ها بود. میانگین وزن موش های گروه شم $24/78 \pm 3/13$ ، گروه تجربی $23/21 \pm 4/6$ بود که نسبت به گروه کنترل $23/37 \pm 6/11$ تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین میانگین وزن بیضه های موش های گروه شم $0/09 \pm 0/03$ ، گروه تجربی $0/08 \pm 0/01$ بود که در مقایسه با گروه کنترل $0/08 \pm 0/03$ اختلاف معنی داری نشان ندادند.

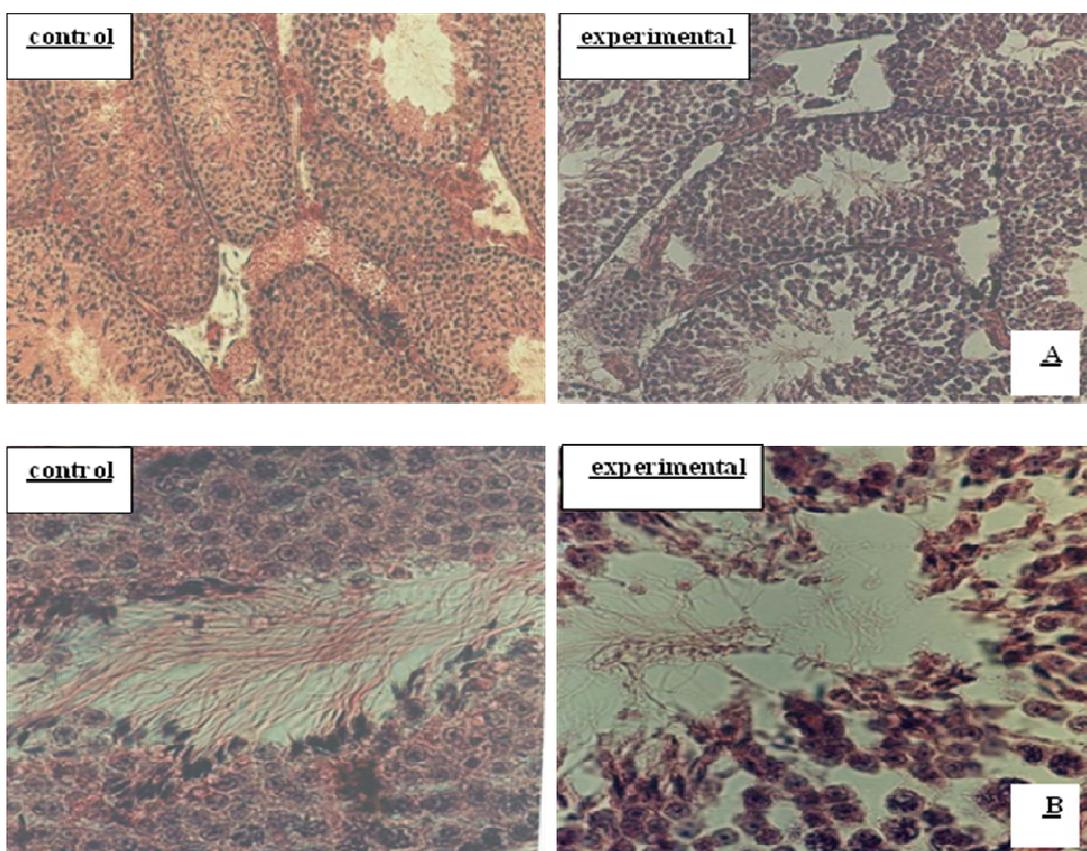
بررسی تغییرات هیستولوژیک بافت بیضه

a. مطالعه مقاطع میکروسکوپی به منظور شمارش تعداد سلول های جنسی در لوله های منی ساز

برای این منظور از هر سه گروه مقاطع میکروسکوپی با ضخامت ۷ میکرون تهیه و پس از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ نوری

جدول ۱: نتایج تحلیل آماری انواع تعداد سلول های زاینده در موش های گروه کنترل، شم و تجربی $Mean \pm SE$ در مقایسه با گروه کنترل و شم $P < 0.05$ *

مشاهدات	تعداد اسپرما توگونی	تعداد اسپرما توسیت اولیه	تعداد اسپرما توسیت ثانویه	تعداد اسپرما تید	تعداد اسپرما توژوا
کنترل	۵۷/۳۳±۱۰/۱۵	۵۲/۴۴±۱۰/۶۳	۸۷±۳۳/۵۵	۵۵/۶۴±۱۳/۵۹	۶۶/۲۲±۱۲/۶۵
شم	۶۱/۳۹±۲۵/۶۸	۷۷/۷۲±۲۵/۵۷	۶۱/۶۷±۳۵/۶۶	۶۶/۱۱±۱۵/۶	۹۹/۷۲±۳۷/۲۵
تجربی	۷۲/۸۳±۲۵/۳*	۶۲/۸۸±۱۵/۲۴	۲۱۰±۵۴/۲۷*	۵۳/۳۳±۱۴/۲۶	۸۲/۶۶±۳۳/۵۵



شکل ۳: (A) فتومیکروگراف از بافت بیضه موش در گروه کنترل و تجربی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین. در گروه کنترل (control) نظم و ترتیب لوله های منی ساز و بافت بینابینی بیضه و در گروه تجربی (experimental) تخلیه نسبی لوله های منی ساز و بهم ریختگی بافت بینابینی و بی نظمی در نحوه قرار گیری لوله ها نشان داده شده است (بزرگنمایی $200 \times$). (B) در گروه کنترل، تمرکز اسپرمها در میان لوله نشان داده شده است در حالی که فتومیکروگراف گروه تجربی نشان دهنده تخریب بافتی، بهم ریختگی نظم سلول های اسپرما توژن و تخلیه بخش میانی لوله ها از اسپرم است. (بزرگنمایی $400 \times$).

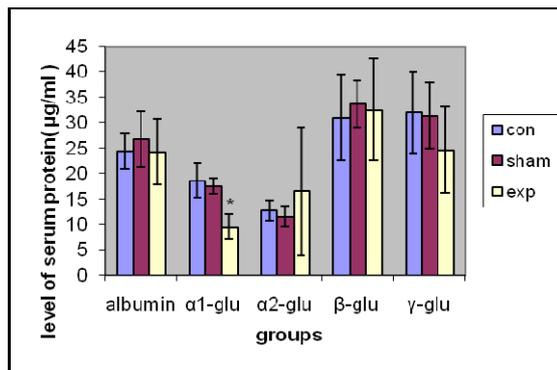
بررسی تغییرات درصد پروتئین های شاخص سرم خون

برای این منظور پس از خون گیری، انجام الکتروفورز و به دست آوردن باندهای پروتئینی، این باندها توسط دستگاه دانسیتومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و درصد پنج پروتئین اصلی سرم

بررسی شدند. اندازه گیری درصد پروتئین های موجود در سرم خون نشان داد که از بین آنها، میزان آلفا ۱ گلوبولین در گروه تجربی نسبت به گروه های کنترل و شم کاهش معنی دار ($p \leq 0.05$) نشان داد (شکل ۴).

می‌شود. گزارشات متناقضی مبنی بر اثرات میدان‌های الکترومغناطیسی بر روی سیستم‌های بیولوژیکی موجود زنده موجود است. Pool (۸) و Goodman (۹) گزارش کردند که اثرات القایی میدان‌های الکترومغناطیسی موجب افزایش فعالیت رونویسی RNA، افزایش سنتز پروتئین و تسریع در فرایندهای رشد و نمو می‌گردد. مطالعات Liboff (۱۰) نشان دهنده تاثیرات با میدان‌های ۵۶۰ میکرو تسلا بر روی سنتز DNA است که ارتباط زیادی با شدت میدان دارد. به طور کلی میدان‌های الکترومغناطیسی در بسیاری از موارد موجب القای کاهش cAMP می‌گردند و از آنجایی که cAMP می‌تواند به عنوان یک مهار کننده تکثیر سلولی باشد، می‌توان گفت که تاثیر این میدان‌ها در افزایش و تسریع تکثیر سلولی از طریق کاهش در میزان cAMP می‌باشند (۱۰). با این وجود Delgado (۱۱) و Zusman (۱۲) نشان دادند که اثرات القایی این میدان‌ها موجب کاهش سرعت فعالیت‌های درون سلولی و نهایتاً کاهش سرعت در فرایندهای رشد و نمو می‌گردد. بهار آرا و همکاران (۱۳) امواج الکترومغناطیسی با فرکانس پایین ۵۰ هرتز را بر روی اریتروسیت‌های مغز استخوان موش نر کوچک آزمایشگاهی اثر داده و نشان دادند که این امواج موجب القای آسیب کروموزومی و افزایش در میزان میکرونوکلئوس در اریتروسیت‌های مغز استخوان موش نژاد balb/c می‌شوند (۱۳).

Varma و همکاران (۱۴) امواج رادیویی را بر روی بافت بیضه اثر داده و در خصوص اثرات زیستی آن گزارش نمودند که این امواج موجب بی‌نظمی‌های مورفولوژیکی در لوله‌های منی ساز و سلول‌های سرتولی می‌شود. از این رو امواج رادیویی می‌توانند قادر به القاء تغییرات در بافت بیضه شوند. Kowalczyk و همکاران (۱۵) اثرات میدان‌های الکترومغناطیسی بر روی اسپرماتوژن موش را بررسی نموده و نشان دادند که امواج ۱/۷ و ۲/۴۵ گیگا هرتز توانست روی اپی تلیوم منی ساز، شمارش و مورفولوژی اسپرم و اسپرماتوسیت‌های اولیه در موش تاثیر گذار باشد. یافته‌های ما در این آزمایش نیز نشان داد که میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس ۱۰۰ هرتز موجب تغییراتی در لوله منی ساز از جمله تخلیه فضای لومن لوله‌ها و تخریب بافت چربی و افزایش معنی‌دار اسپرماتوسیت‌های ثانویه گردید. Saunders و همکاران (۱۶) اثر امواج میکروویوی ۲/۴۵ گیگاهرتزی را بر روی روند اسپرماتوژن موش بررسی کرده و دریافتند که در بین

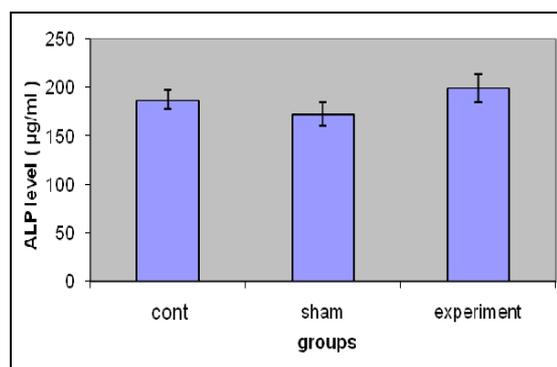


شکل ۴: نمودار میزان تغییرات پروتئین‌های شاخص سرم در موش‌های تجربی، شاهد و کنترل. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود از بین پروتئین‌های سرم خون (محور افقی) میزان آلفا ۱ گلوبولین تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی در گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل و شم کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) یافته است. ($Mean \pm S.E. *P < 0.05$)

نتایج بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی آلکالین فسفاتاز در

بافت بیضه

تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده نشان داد که در سطح $p \leq 0.05$ اختلاف معنی داری در میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز بین گروه‌های کنترل ($180 \pm 3/500$)، شم ($165 \pm 3/000$) و تجربی ($214 \pm 4/500$) وجود نداشت. البته نتایج به دست آمده افزایش در میزان فعالیت این آنزیم در گروه تجربی که در معرض میدان الکترومغناطیسی بودند را در سطح پایین تر از $p \leq 0.05$ نشان داد که معنی دار نبود (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار تغییرات میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در عصاره بافت بیضه موش نر بالغ (نمونه‌های تجربی، شاهد و کنترل).

بحث

میدان‌های الکترومغناطیسی قادر به تاثیر بر روی اندام‌ها، بافت‌های سنتز کننده پروتئین‌های سرم در خون، تغییر در مقدار این پروتئین‌ها و تغییر در سطح هورمونی هستند که اینها از تغییرات در غشاء سلول و فعالیت‌های درون سلولی ناشی

که این میدان ها روی تحرک اسپرم تاثیر داشته و منجر به تغییرات ساختاری در سلول های زاینده مردان می شود.

رجائی و همکاران (۲۱) موش های نر نژاد Balb/c را (روزی ۳ ساعت به مدت ۶ روز در هفته تا ۲ ماه) در معرض میدان های الکترومغناطیسی ۵۰ هرتز، و با شدت ۰/۵ تسلا قرار داده و پس از طی این دوره تاثیر این میدان ها را بر روی اپیدیدیم و دفران بررسی کرده و نشان دادند که این میدان ها باعث کاهش در ضخامت اپیدیدیم و دفران، کاهش ارتفاع سلول های اپی تلیال و کاهش در وزن بیضه نسبت به موش های گروه کنترل شد. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که در گروه تجربی که تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۱۰۰ هرتز قرار گرفتند، در مقایسه با دو گروه شم و کنترل تغییری در وزن بیضه ها مشاهده نشد، هر چند تغییرات در تعداد سلول های اسپرماتوسیت های ثانویه و تعداد سلول های تمایز یافته در فضای لومن ها و آرایش جداره به مرکز آنها نشان دهنده اثرات غیر قابل انکار این میدان ها با فرکانس ها و شدت های مختلف می باشد. هم چنین محمدی روشن ده و همکارانش (۲۲) موش های نر نژاد Balb/c را (به مدت ۸ هفته روزی ۴ ساعت) تحت تاثیر میدان های الکترومغناطیسی ۳ میلی تسلا قرار داده و تغییرات بافتی را در بیضه های این موش ها از جمله افزایش در تعداد اسپرماتوسیت ها، سلول های لیدیک و ضخامت غشاء پایه گزارش کردند (که با داده های به دست آمده در تحقیق حاضر یعنی افزایش در تعداد اسپرماتوسیت ها و اختلال در میزان سلول های لیدیک مطابقت دارد).

Kesari (۲۳) اثر امواج مایکروویو با فرکانس ۵۰ هرتز (۴۵ روز، روزی ۲ ساعت) را بر روی سیستم تولید مثلی رت های نر نژاد ویستار را آزمایش کرده و کاهش معنی داری در میزان آنزیم های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون پر اکسیداز، افزایش در کاتالاز، کاهش در فعالیت هیستون کیناز و افزایش آپوپتوز مشاهده کردند که شاید شاخصی در نا باروری رت های جنس نر باشد. Tenorio و همکاران (۲۴) رت های نر را در مراحل مختلف بلوغ از روز ۱۳ بارداری تا ۲۱ نوزادی روزی ۳ ساعت تحت تاثیر امواج الکترومغناطیسی با فرکانس پایین ۶۰ هرتز، ۱ مگاهرتز قرار داده و دریافتند که امواج الکترومغناطیسی با فرکانس پایین می تواند در اسپرماتوژنز رت ها اختلال ایجاد کرده و موجب کاهش باروری یا نا باروری شود.

سلول های زاینده، اسپرماتوسیت ها حساس ترین سلول ها نسبت به امواج رادیویی هستند که با داده های به دست آمده از این آزمایش مبنی بر افزایش معنی دار تعداد اسپرماتوسیت های ثانویه تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین مطابقت دارد.

McGivern (۱۷) نشان داد که میدان های الکترومغناطیسی موجب افزایش وزن اپیدیدیم، کیسه منی و غده پروستاتی، تاخیر در تمایز بافت بینابینی بیضه و تعداد طناب های تناسلی در موش های نری می شود که مادران آنها در طی روزهای ۲۰-۱۵ حاملگی (دوره بحرانی در تمایز سلول جنسی) در معرض میدان الکترومغناطیسی با شدت ۸ گوس و فرکانس ۱۵ هرتز قرار گرفته اند. داده های تحقیق حاضر نیز نشان داد که در موش های نری که تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین قرار گرفتند، تجمع اسپرم ها در فضای لومن اپیدیدیم و به هم ریختگی بافت بینابینی و سلول های لیدیک مشاهده می شود.

Ozguner و همکاران (۱۸) اثرات بیولوژیک میدان های الکترومغناطیسی ۹۰۰ مگاهرتز را بر روی بیضه های رت بررسی نمودند و گزارش کردند که با اینکه ضخامت لوله های منی ساز و ارتفاع اپی تلیوم زاینده در این موش ها کاهش یافته بود، وزن بیضه ها و بافت بینابینی بیضه نسبت به گروه کنترل تغییر چشمگیری را نشان نداد. همچنین آنها مشاهده کردند که میزان تستوسترون در موش های تحت تاثیر میدان کاهش معنی داری یافته بود در حالی که میزان هورمون لوتئینی (LH) و هورمون محرک فولیکول (FSH) تغییر قابل ملاحظه ای نسبت به کنترل نشان نداد. داده های به دست آمده در این تحقیق نیز نشان داد که موش های گروه تجربی (تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی) هیچ گونه تغییر معنی دار در وزن بیضه ها در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند که می تواند به دلیل سن و شرایط نگهداری یکسان موش ها باشد.

Chung و همکاران (۱۹) رت های باردار را از روز ۶ تا ۲۱ بارداری در معرض میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس ۶۰ مگاهرتز قرار داده و بافت بیضه و مورفولوژی اسپرم را در نرهای نسل F1 بررسی کرده و گزارش کردند که هیچ گونه تغییر قابل ردیابی در اسپرماتوژنز و باروری نرهای نسل F1 مشاهده نشد. Eroglu و همکاران (۲۰) تعدادی مرد بالغ را تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی ۹۰۰ مگاهرتز تلفن همراه قرار داده و دریافتند

ساروخانی و همکاران (۲۵) اثرات امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۹۵۰ هرتز (امواج تلفن همراه) ۳ وات و ۶ وات، را بر روی عملکرد اندام‌های جنسی و غدد فوق کلیه خرگوش نر بررسی کرده و نشان دادند که در گروه تجربی ۳ وات غلظت FSH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت، در صورتی که در گروه تجربی ۶ وات در مقایسه با گروه کنترل غلظت تستوسترون کاهش یافته در حالی که غلظت FSH افزایش یافت. با این وجود تفاوتی در غلظت کورتیزول در هیچ یک از گروه‌های تجربی نسبت به کنترل مشاهده نشد. این محققین پیشنهاد کردند که اختلال در غلظت تستوسترون و FSH در گروه‌های تحت تاثیر امواج الکترومغناطیسی احتمالاً روی عملکرد تولید مثلی تاثیر گذاشته در صورتی که عدم تغییر در غلظت کورتیزول نشان دهنده این است که امواج الکترومغناطیسی ساطع شده از تلفن همراه تاثیری روی عملکرد غدد فوق کلیه خرگوش نر ندارد.

در تحقیق حاضر نتایج به دست آمده نشان داد که اولاً میدان الکترومغناطیسی قادر به ایجاد تغییر در فرایند اسپرماتوزن می‌باشد چرا که میدان‌های مذکور قادرند بافت بینابینی بیضه را تحت تاثیر قرار داده و نظم و قرار گیری سلول‌های لیدینگ را به هم بزنند و از طرف دیگر موجب تسریع تخلیه اسپرم‌ها از داخل فضای میانی لوله‌های منی ساز گردند. یافته‌هایی مثل افزایش تعداد اسپرماتوسیت‌های ثانویه و کاهش نسبی سلول‌های اسپرماتید نشان دهنده این بود که میدان‌های الکترومغناطیسی به عنوان عامل القا کننده موجب تغییر در اسپرماتوزن می‌گردند. از طرف دیگر از آنجایی که اساس آسیب‌های مورفولوژیک و بافتی را بایستی در تغییرات غشایی جستجو کرد و آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای سلولی داشته و فعالیتش با تغییر نسبت کلسترول به فسفولیپیدهای غشاء سلول دچار تغییر می‌شود، آسیب غشاء سلول موجب رهاسازی بیش از حد این آنزیم به مایعات بین سلولی و سرم می‌گردد. آنزیم آلکالین فسفاتاز از طریق کنترل سطح نوکلئوتیدی AMP در تنظیم موضعی جریان خون دخالت داشته و در سطح سلولی نیز با دخالت در نقل و انتقال کلسیم از غشاء سلولی و عملکرد آن به عنوان Ca-Mg-ATPase و تداخل عمل با آنزیم‌های غشایی سلول فعالیت دارد. از این رو اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به عنوان شاخصی در خصوص تغییرات بافت بیضه مورد استفاده

قرار گرفت. دلیل اندازه‌گیری پروتئین‌های شاخص سرم نیز این است که هر یک از این پروتئین‌ها به دلیلی از اهمیت خاصی برخوردارند. مقدار آلبومین در طول زندگی ثابت است و در سن پیری شروع به کاهش می‌نماید. در اکثر بیماری‌های کبدی کاهش چشمگیری در میزان آلبومین مشاهده می‌شود که احتمالاً در پاسخ به استرس می‌باشد. سطح آلفا ۱ گلوبولین، آلفا ۲ گلوبولین، بتا گلوبولین و گاما گلوبولین نیز در اکثر بیماری‌ها تغییر می‌یابند. یافته‌های این تحقیق نشان داد که میدان‌های الکترومغناطیسی بر مقدار درصد پروتئین‌های شاخص سرم موثر بوده و در اکثر موارد به عنوان عامل استرس زا مطرح می‌باشند، به طوری که این میدان‌ها اگرچه تغییری در میزان آلبومین سرم ایجاد نمی‌کنند ولی با کاهش میزان آلفا ۱ گلوبولین تاثیرات خود را بروز می‌دهند. در نتیجه میدان‌های الکترومغناطیسی قادرند از طریق تاثیر بر روی اندام‌ها و بافت‌های مختلف سنتز کننده پروتئین‌های سرم خون مقدار این پروتئین‌ها را تغییر داده که موجب تغییر در سطح هورمونی می‌شود. تغییر در سطح هورمونی نیز ناشی از تغییرات در غشاء سلول و فعالیت درون سلولی است که می‌تواند از جمله عوامل تاثیر گذار در ساختمان و عملکرد بافت بیضه باشند. تغییراتی نظیر افزایش تعداد اسپرماتوسیت‌های ثانویه، ایجاد حالت سن سیتیوم در این سلول‌ها، تخریب بافت بینابینی و بافت چربی از جمله این تغییرات هستند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که پس از در معرض قرار گرفتن موش‌ها در برابر میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین (شدت ۱۲۰ گوس، فرکانس ۱۰۰ هرتز) درصد پروتئین‌های شاخص سرم و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز دچار تغییر شده و آسیب به وجود آمده موجب افزایش در میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز گشته که نشان دهنده تغییرات در بافت بیضه است، اما این افزایش در سطح $p \leq 0.05$ معنی‌دار نبود. نتایج به دست آمده در مورد تغییرات پروتئین‌های شاخص سرم خون نیز نشان داد که میدان الکترومغناطیسی ایجاد شده بر روی درصد پروتئین‌های شاخص سرم موثر بوده و به عنوان فاکتور استرس‌زا موجب کاهش معنی‌داری در درصد آلفا ۱ گلوبولین می‌گردد. هم چنین این میدان‌ها موجب افزایش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) در تعداد اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های ثانویه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در دانشگاه تربیت معلم تهران انجام شد، لذا از ریاست محترم دانشکده علوم و مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران جهت همکاری های لازم نهایت تشکر را داریم.

منابع

- 15- Kowalczuk CI, Saunders RD, Stapleton HR. Sperm count and sperm abnormality in male mice after exposure to 2.45 GHz microwave radiation. *Mutat Res* 1983;122:155-156.
- 16- Saunders RD, Kowalczuk CI. Effects of 2.45 GHz microwave radiation and heat on mouse spermatogenic epithelium. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1981;40:623-32.
- 17- Mc GIVERN R, Sokol RZ, Adey WR. Prenatal exposure to a lower-frequency electromagnetic fields demasculinizes adult scent marking behavior and increases accessory sex organ weights in rats. *Teratology* 1990;41:1-4
- 18- Ozguner M, Koyu A, Cesur G, Ural M, Ozguner F. Biological and morphological effects on thw reproductive organs of rats after exposure to electromagnetic field. *Soudi Medical* 2005;26(3):405-410.
- 19- Chng MK, Lee SJ, Kim YB, et al. Evaluation of spermatogenesis and fertility in F1 male rats after in utero and neonatal exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Asian Journal Androl* 2005;7:189-194.
- 20- Erogul O, Oztas E, Yildirim I, Kir Tayfun, Aydur E, Komesli G, et al. Effects of Electromagnetic Radiation from a cellular Phone on human sperm motility: An In Vitro Study. *Arcive of Medical Research* 2006;37:840-843.
- 21- Rajaei F, Farokhi M, Ghasemi N, Pahlevan AA. Effects of extremely low-frequency magnetic field on mouse epididymis and deferens ducts. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2009;7(2):85-89.
- 22- Mohammadi Roushandeh A, Halabian R, Mozafari P, Soleimani Rad J, Sadeghzadeh Oskouei B. et al. Down Regulation of Lipocalin 2 Expression in Mouse Testis after Exposure to Electromagnetic Field. *Iranian Journal Medical Science* 2009;34(4):265-270.
- 23- Kesari KK, Behari J, Microwave exposure affecting reproductive system in male rats. *Application Biochemistry Biotechnology* 2010;162(2):416-428.
- 24- Tenorio BM, Jimenez GC, Moris RN, Piexoto CA, Nogueira RA, Junior VA, Evaluation of testicular degeneration induced by low-frequency electromagnetic fields. *Journal of Applied Toxicology* 2011.
- 25- Sarookhani MR, Asiabanha Rezaei M, Safari A, Zaroushani V, Ziaeiha M. The influence of 950 MHz magnetic field (mobile phone radiation) on sex organ and adrenal functions of male rabbits. *African Journal of Biochemistry Research* 2011;5(2):65-68.
1. Frohlich H. Coherent electric vibrations in biological systems and the cancer problem. *IEEE. Trans. Microwave theory Tech.* 1978;26:613-617.
2. Grundler WF. Resonant growth rate response of yeast cell irradiated by weak microwaves. *Phys Lett.* 1977;463-466.
3. Perry ES. Environmental power frequency magnetic fields and suicide. *IEE Conf London.* 1982.
4. Basset L. Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *Bone and joint surgery.* 1981;63(4):511-521.
5. Brighton CT. Treatment of nonunion with constant direct current. *Trans Biol Repair growth soc.* 1981;1-16.
6. Adey W.R. Tissue interaction with non-ionizing electromagnetic fields. *Physiological Review.* 1981; 61(2):453-513.
7. Guldberg RB. A Review of cancer induction by extremely low frequency electromagnetic fields: is there possible mechanism? *MED HYPOTHESIS.* 1991;35(3):265-275.
8. Pool R. Electromagnetic fields: The Biological evidence. 1990; 249:1378-1381.
9. Goodman R. Pulsing Electromagnetic fields induce cellular Transcription. 1983; 220:1283-1285.
- 10- Liboff RL. A biomagnetic hypothesis, *biophysic journal.* 1984;844-846.
- 11- Delgado. J. Embryological changes induced by weak extremely low frequency electromagnetic fields. *J Anatomy* 1982;134:533-551.
- 12- Zusman .I. Effect of pulsing electromagnetic fields on the prenatal and postnatal development in mice and rat. *Invivo and invitro studies.* *Teratology* 1990;42:157-170.
- 13- Bahar Ara, J, Parivar, K, Oryan Sh, Ashrag A. The effects of long-term exposure with simulating cell phone waves on gonads of female balb/C mouse, *Medical journal of Reproduction & Infertility* 2004; 5(3): 217-226.
- 14-Varma MM, Traboulay EA Jr. Biological effects of microwave radiation on the testes of Swiss mice. *Experientia* 1975;31: 301-2.

Effect of low frequency electromagnetic fields on the spermatogenesis and blood serum protein of Balb/c mice

Parivar K, Ph.D.¹, Nabiuni M, Ph.D.^{1*}, Golestanian N, Ph.D.², Amini E, M.Sc.³

1- Department of Biology, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

2- Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran.

3- MSc, Developmental Biology, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: nabiuni@tmu.ac.ir

Received: 12 Jun. 2011

Accepted: 23 Aug. 2011

Abstract

Aim: Electro magnetic fields (EMFs) on spermatogenesis, blood serum protein level and alkaline phosphatase of mice have been investigated.

Material and methods: Male adult Balb/c were arranged in 3 groups (control, sham-exposed, experimental-n=6-). In experimental group, mice received EMFs(120 gauss and frequency of 100 Hz) twice every time 7 hours in two consecutive days. After 48h, the animals were weighed and dissected. The number of germ cells in testes with histotechnic assay, assessment of alkaline phosphatase with auto analyzer and measurement of blood serum protein with electrophoresis assay were investigated.

Results: No significant difference observed in mice weight and testes weight. The number of spermatogonia and secondary spermatocyte showed significant increase ($p \leq 0.05$) in experimental group rather control, sham-exposed. Assessment of serum proteins indicated between 5 essential proteins in blood, percentage of alpha-globulins showed significant reduction ($p \leq 0.05$) in experimental group. Evaluation of alkaline phosphatase didn't show significant difference.

Conclusion: Exposing Balb/c mice to EMFs with low frequency (120 gauss and frequency of 100 Hz) has led to changes in testis tissue such as increasing secondary spermatocyte, syncytium state in spermatogenic cells, destruction interstitial tissue. These changes can cause reduction of fertility.

Keywords: Electro Magnetic Fields (EMFs), Spermatogenesis, Measuring protein levels