

**SINISEN VALON JA HYVIN PIENITAAJUISEN MAGNEET-  
TIKENTÄN VÄLITÖN JA VIIVÄSTYNYT GENOTOKSISUUS**

Mikko Herrala  
Pro Gradu -tutkielma  
Ympäristötiede  
Itä-Suomen yliopisto, ympäristötieteen laitos  
Toukokuu 2012



ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Ympäristötiede

Mikko Herrala: Sinisen valon ja hyvin pienitaajuisen magneettikentän välitön ja viivästynyt genotoksisuus

Pro Gradu -tutkielma 56 sivua, 1 liite (2 sivua)

Tutkielman ohjaajat: Tutkijatohtori Anne Höytö, FT

Yliopistonlehtori Jonne Naarala, FT, dosentti

Toukokuu 2012

---

avainsanat: sininen valo, hyvin pienitaajuinen magneettikenttä, ihmisen neuroblastoomasolu, genotoksisuus, genomin epävakaisuus

## TIIVISTELMÄ

Sinisen valon ja hyvin pienitaajuisen magneettikentän välitön ja viivästynyt genotoksisuus - tutkielmassa selvitettiin sinisen valon ja hyvin pienitaajuisen magneettikentän biologisia vaikutuksia ihmisen SH-SY5Y neuroblastoomasoluissa. Tutkimuksessa aktivoitiin solujen kryptokromiproteiineja sinisellä valolla ja altistettiin soluja samalla hyvin pienitaajuiselle magneettikentälle sekä menadionille. Tutkimuksessa selvitettiin altisteiden vaikutuksia solujen elävyyteen (propidiumjodidi/digitoniinikäsittely), happiradikaalituotantoon (fluorometrinen superoksidianionimääritys), solujen proliferaatioon (Alamar Blue -menetelmä), mikrotumien määrään ja suhteelliseen solumäärään. Määritykset tehtiin välittömästi altistuksen jälkeen sekä 8 ja 15 vuorokauden kuluttua altistuksen päättymisestä.

Tutkimuksessa havaittiin sinisellä valolla, hyvin pienitaajuisella magneettikentällä ja menadionilla välittömiä ja viivästyneitä biologisia vaikutuksia. Hyvin pienitaajuisen magneettikentän ja menadionin havaittiin lisäävän superoksidianionituotantoa välittömästi altistuksen jälkeen ja sinisen valon puolestaan vähentävän superoksidianionien määrää. Sinisen valon ja menadionin yhteisaltistus lisäsi mikrotumien määrää välittömästi altistuksen jälkeen määritetynä. Sinisen valon ja menadionin havaittiin hidastavan solujen proliferaatiota. Tutkimuksessa havaittiin sinisellä valolla ja menadionilla viivästyneitä vaikutuksia solujen superoksidianionituotantoon sekä mikrotumien määrään. Lisäksi kaikilla altisteilla havaittiin vaikutuksia suhteelliseen solumäärään kaikissa aikapisteissä.

Havaitut välittömät vaikutukset olivat pääosin samankaltaisia kuin aiemmissakin tutkimuksissa, mutta viivästyneistä vaikutuksista ei ole saatavilla aiempaa tutkimustietoa. Viivästyneiden vaikutusten havaitseminen viittaisi pitkittyneeseen genotoksisuuteen. Mikrotumien havaitseminen sinisen valon ja menadionin osalta yksinään vasta monta solusukupolvea myöhemmin sellaisissa soluissa, jotka eivät itse ole altistuneet, viittaa siihen, että sininen valo ja menadioni voisivat aiheuttaa genomin epävakaisuutta. Tutkimuksessa ei kuitenkaan saatu selville mekanisme, josta havaitut vaikutukset johtuvat vaan lisää tutkimusta aiheesta tarvitaan.



## **ESIPUHE**

Tein pro gradu -tutkielmani Itä-Suomen yliopiston ympäristötieteen laitoksella ympäristösolubiologian tutkimusryhmässä. Tutkielman laboratoriotyöt tein syksyn 2011 aikana ja kirjallisen osion kevään 2012 aikana. Pro graduni on osa “Genomic instability induced by genotoxic and non-genotoxic exposures” -projektia, joka on rahoitettu Itä-Suomen yliopiston strategisella rahoituksella.

Haluan kiittää ohjaajiani Anne Höytöä ja Jonne Naaralaa mielenkiintoisen tutkimusaiheen tarjoamisesta ja aivan loistavasta ohjauksesta. Haluan kiittää myös tutkielman tarkastajana toiminutta Jukka Luukkosta. Lisäksi haluan kiittää koko tutkimusryhmää innostavasta ja rennosta työilmapiiristä sekä erityisesti laboratoriomestari Hanne Säppiä korvaamattomasta avusta laboratoriotyöskentelyssä.

Tahdon kiittää lämpimästi vanhempiani kaikesta saamastani tuesta opintojeni aikana.



# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1. JOHDANTO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. KIRJALLISUUSKATSAUS</b> .....	<b>10</b>
2.1 HYVIN PIENITAAJUISET MAGNEETTIKENTÄT JA SININEN VALO .....	10
2.1.1 Hyvin pienitaajuiset magneettikentät .....	10
2.1.2 Sininen valo .....	12
2.2 GENOTOKSISUUS .....	13
2.2.1 Hyvin pienitaajuisen magneettikenttien genotoksisuus .....	14
2.2.2 Sinisen valon genotoksisuus .....	15
2.3 HYVIN PIENITAAJUUSTEN MAGNEETTIKENTTIEN JA SINISEN VALON VAIKUTUSMEKANISMIT .....	15
2.3.1 Hyvin pienitaajuisen magneettikenttien vaikutusmekanismi .....	16
2.3.2 Sinisen valon vaikutusmekanismi .....	17
<b>3. TYÖN TAVOITTEET</b> .....	<b>19</b>
<b>4. AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>20</b>
4.1 KOEASETELMA .....	20
4.2 SOLULINJA JA SOLUVILJELY .....	23
4.2.1 Solujen ylläpito ja esikasvatus .....	23
4.2.2 Kuoppalevyjen ja maljojen valmistelu altistuksiin ja määrittäisiin .....	24
4.3 ESIKOKEET .....	25
4.4 MÄÄRITYSMENETELMÄT .....	27
4.4.1 Superoksidianionituotannon määrittäminen .....	27
4.4.2 Solujen elävyys .....	28
4.4.3 Mikrotuma-analyysit .....	29
4.4.4 Proliferaatio .....	33
4.5 TILASTOLLISET MENETELMÄT .....	33
<b>5. TULOKSET</b> .....	<b>34</b>
5.1 VÄLITTÖMÄT VAIKUTUKSET .....	34
5.2 VIIVÄSTYNEET VAIKUTUKSET .....	38
<b>6. TULOSTEN TARKASTELU</b> .....	<b>46</b>
6.1 VIRHELÄHTEET .....	49
<b>7. YHTEENVETO</b> .....	<b>51</b>
<b>LÄHDELUETTELO</b> .....	<b>52</b>
<b>LIITE 1. KEMIKAALIT JA LIUOKSET</b> .....	





## 1. JOHDANTO

Yhteiskunnan sähköistymisen jälkeen erilaisten sähkölaitteiden määrä elinympäristössämme on lisääntynyt nopeasti ja jatkaa edelleen kasvuaan. Kaikista sähkölaitteista ja sähkönsiirrosta aiheutuu magneettikenttiä, joten altistumme päivittäin lukuisille erilaisille ja eri tehoisille magneettikentille. Tutkimuksissa on havaittu, että hyvin pienitaajuisilla magneettikentillä on biologisia vaikutuksia ja epidemiologisissa tutkimuksissa on havaittu hyvin pienitaajuisien magneettikenttien lisäävän lasten riskiä sairastua leukemiaan. Hyvin pienitaajuiset magneettikentät onkin luokiteltu mahdollisesti syöpää aiheuttaviksi. Jotta hyvin pienitaajuisista magneettikentistä aiheutuvaa riskiä pystytään arvioimaan, tarvitaan tutkimustietoa niiden vaikutuksista ja vaikutusmekanismeista.

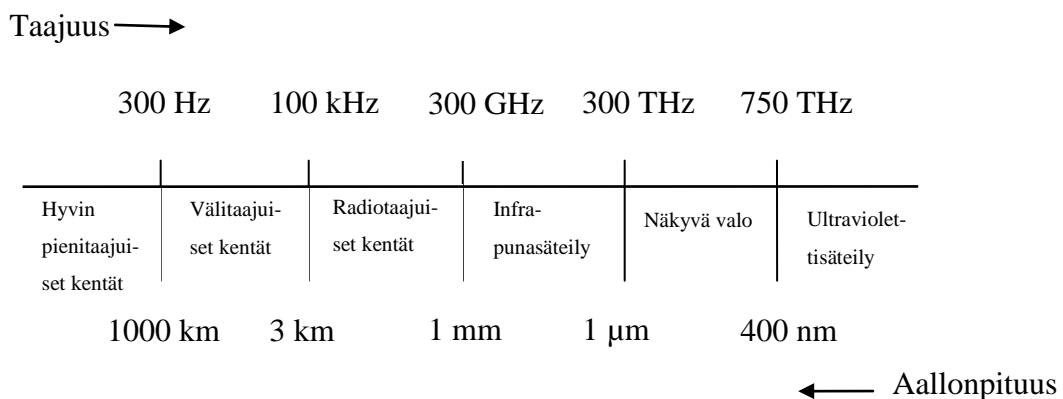
Hyvin pienitaajuisien magneettikenttien vaikutusmekanismi on toistaiseksi tuntematon, mutta erilaisia teorioita on esitetty. Tiedeyhteisö pitää tällä hetkellä todennäköisimpänä niin sanottua radikaaliparimekanismia. Teoriassa ajatellaan magneettikenttien vaikuttavan soluissa olevien happiradikaalien elektronien spineihin. Erityisesti vaikutusten uskotaan välittyvän kryptokromiproteiinien kautta. Samaisten kryptokromien kautta aistitaan myös valoa ja nimenomaan sinisen valon aallonpituudella olevaa valoa. Kryptokromien uskotaan olevan väline, jonka avulla esimerkiksi muuttolinnut aistivat maan magneettikentän, jonka mukaan ne suunnistavat. Ihmiset eivät magneettikenttiä havaitse, mutta myös ihmisen soluissa tiedetään olevan kryptokromiproteiineja.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää hyvin pienitaajuisien magneettikenttien ja sinisen valon vaikutuksia ihmisen neuroblastomasoluihin ja sitä kautta saada lisää tietoa magneettikenttien vaikutusmekanismista. Tutkimuksessa selvitetään sinisen valon ja hyvin pienitaajuisen magneettikentän yhdessä ja erikseen aiheuttamia biologisia vaikutuksia välittömästi altistuksen jälkeen, sekä viivästyneitä vaikutuksia 8 ja 15 vuorokauden kuluttua altistuksen päättymisestä.

## 2. KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 HYVIN PIENITAAJUISET MAGNEETTIKENTÄT JA SININEN VALO

Magneettikentät ovat osa ionisoimatonta säteilyä, joka tarkoittaa sitä, että fotonin energia on niin pieni, ettei se riitä aikaansaamaan merkittävää ionisaatiota eli elektronin irtoamista atomeista. Erilaisia magneettikenttiä muodostuu kaikista sähkölaitteista ja sähkönsiirrosta. Magneettikentät voidaan luokitella taajuuden ja aallonpituuden mukaan hyvin pienitaajuisiin, välitaajuisiin ja radiotaajuisiin kenttiin. Kuvasta 1. nähdään magneettikenttien jakautuminen taajuuden ja aallonpituuden perusteella. Sininen valo sijoittuu sähkömagneettisessa spektrissä näkyvän valon alueelle. Magneettikenttien magneettivuon tiheys ilmaistaan Tesloina (T) ja niiden voimakkuus vaihtelee suuresti riippuen lähteestä ja etäisyydestä.



Kuva 1. Sähkömagneettinen spektri.

#### 2.1.1 Hyvin pienitaajuiset magneettikentät

Hyvin pienitaajuiset magneettikentät ovat taajuudeltaan alle 300 Hz ja niiden voimakkuus eli magneettivuon tiheys vaihtelee lähteestä riippuen. Hyvin pienitaajuisen kentän muutosnopeus on riittävän suuri indusoimaan paikallaan olevaan ihmiseen sähkökenttiä ja -virtoja. Riittävän voimakkaina induktiosähkökenttä ja -virrat voivat aiheuttaa sähköärsytystä hermo- ja lihassoluissa (Jokela 2006). Hyvin pienitaajuiset magneettikentät on luokiteltu mahdollisesti karsi-

nogeenisiksi eli syöpää aiheuttaviksi (IARC 2002). Suomessa hyvin pienitaajuisille magneettikentille on annettu väestön raja-arvoksi 50 Hz taajuiselle kentälle 100  $\mu\text{T}$  (STM 2002)

Hyvin pienitaajuisia kenttiä syntyy sähkön tuotannon, jakelun ja käytön yhteydessä. Teollisuuden käytössä voi olla hyvinkin suuria kentän voimakkuuksia aiheuttavia laitteita, kuten induktiokuumentimia, joiden läheisyydessä työntekijä voi altistua yli 1 mT kentälle. Sen sijaan kodin sähkölaitteet aiheuttavat vain heikkoja 1-100  $\mu\text{T}$  kenttiä, joille altistuminen on paikallista ja lyhytkestoista. Kotitalouksissa suurempia, yli 100  $\mu\text{T}$  kentän voimakkuuksia voi aiheutua kiinteistömuuntamoista. Suurjännitteisten voimalinjojen alapuolella magneettikentän voimakkuus on tavallisesti noin 3-10  $\mu\text{T}$ . Kentän voimakkuus heikkenee kuitenkin etäisyyden kasvaessa siten, että 60 metrin etäisyydellä voimajohdoista magneettikenttä on vaimentunut jo alle 1  $\mu\text{T}$  tasolle (Jokela 2006). Vaikka nämä kentän voimakkuudet ovat hyvin pieniä ja alle raja-arvojen, havaitsivat Wertheimer ja Leeper jo vuonna 1979 julkaistussa epidemiologisessa tutkimuksessaan, että voimalinjojen lähellä asuvilla lapsilla oli kohonnut riski sairastua leukemiaan. Nämä havainnot on myöhemmin vahvistettu useissa tutkimuksissa, kuten käy ilmi Ahlbomin ym. (2000) artikkelista, jossa he analysoivat aiheesta tehtyjä tutkimuksia.

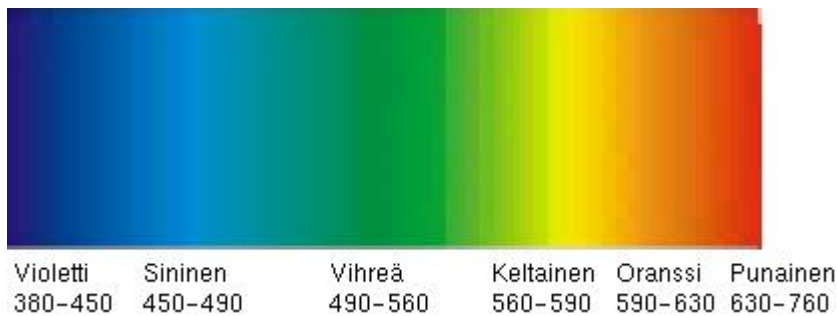
Lukuisissa tutkimuksissa on raportoitu magneettikentän yhteisvaikutuksista jonkin muun altisteen kanssa. Juutilainen ym. (2006b) totesivat meta-analyysissään, että valtaosa tutkimuksista, joissa on selvitetty hyvin pienitaajuisen magneettikentän ja jonkin muun altisteen yhteisvaikutuksia, on tuloksiltaan positiivisia. Myös Luukkonen (2011) toteaa väitöskirjassaan, että magneettikentät vaikuttavat biologisiin prosesseihin, jotka ovat yhteydessä syöpään. Luukkosen (2011) mukaan valtaosa positiivisista tutkimustuloksista on saatu yli 100  $\mu\text{T}$  kentän voimakkuuksilla, joten ne eivät selitä epidemiologisten tutkimusten tuloksia, jotka on havaittu alle 1  $\mu\text{T}$  kentillä.

Hyvin pienitaajuisien magneettikenttien on todettu lisäävän solujen DNA-vaurioita sekä vaikuttavan DNA-vaurioiden korjauskykyyn ja -tarkkuuteen yhdessä happiradikaalituotantoa lisäävän menadioni-altistuksen kanssa (Markkanen ym. 2008, Luukkonen ym. 2011). Yhteisvaikutuksia on havaittu myös yhdessä bentso(a)pyreenin ja bleomysiinin kanssa (Cho ja Chung 2003, Cho ym. 2007). Cho ym. (2007) mukaan pelkällä bleomysiinillä havaittiin myös viivästyneitä vaikutuksia, mutta yhdessä magneettikentän kanssa viivästyneitä vaikutuksia ei nähty. Lisäksi valon ja hyvin pienitaajuisen magneettikentän yhteisvaikutuksesta on saatu viitteitä. Juutilainen ja Kumlin (2006) havaitsivat valon ja magneettikentän vaikuttavan mela-

toniin tuotantoon ihmisillä ja Choi ym. (2003) raportoivat 60 Hz ja 1,5 mT magneettikentän vaikuttavan hiirten päivärytmiin yhdessä valon kanssa. Olssonin ym. (2001) mukaan hyvin pienitaajuinen magneettikenttä voi stimuloida tai inhiboida solujen kasvua riippuen solujen tilasta. Lisäksi hyvin pienitaajuisilla magneettikentillä on eläinkokeissa havaittu vaikutuksia kivun tuntemiseen ja sietämiseen (Del Seppia ym. 2007).

### 2.1.2 Sininen valo

Sininen valo on osa näkyvää valoa, jonka tärkein lähde on aurinko ja erilaiset valaisimet. Näkyvän valon spektri on esitetty kuvassa 2. Kuvasta nähdään, että sinisen valon aallonpituus on 450–490 nm. Valo on fotonien aaltoliikettä, jonka intensiteetti kasvaa aallonpituuden lyhentyessä, joten sinisen valon intensiteetti on suurempi kuin esimerkiksi punaisen valon.



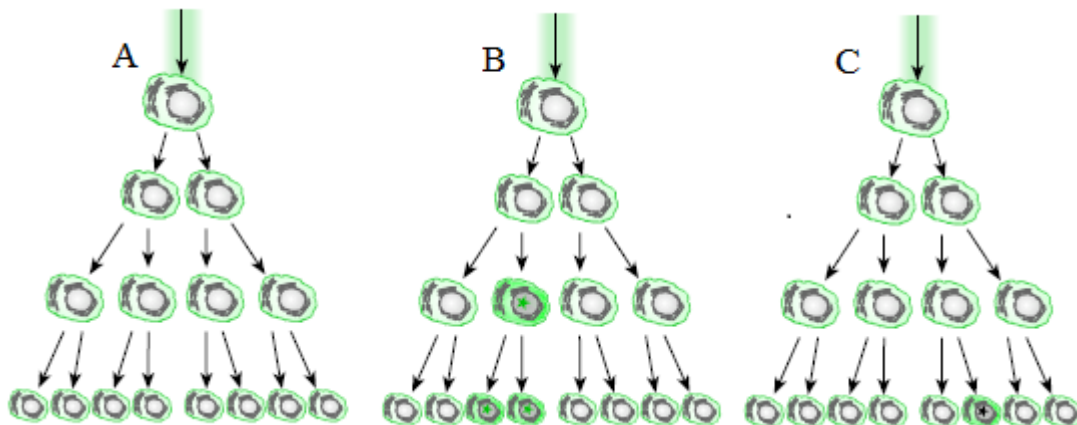
Kuva 2. Näkyvän valon spektri ja aallonpituudet (nm). (Ilmatieteenlaitos / <http://www.geo.fmi.fi/oppimateriaali/envisat/valonsade/spektri.html>)

Tutkimuksissa sinisellä valolla on havaittu monenlaisia vaikutuksia. King ym. (2004) mukaan altistuminen näkyvälle valolle ja erityisesti sinisen valon aallonpituuksille on suurin syy ikääntymisen myötä seuraavassa näkökyvyn heikentymisessä. Lewis tutkimusryhmineen (2004) on todennut sinisen valon lisäävän oksidatiivista stressiä ja hidastavan solujen kasvua. Lisäksi Brunelle tutkimusryhmineen (2007) totesi sinisen valon vaikuttavan panssarisiimaelioiden solusyklin säätelyyn. Ohara ym. (2002 ja 2003) puolestaan ovat todenneet sinisen valon inhiboivan melanoomasolujen kasvua ja ihokasvainten ilmentymistä hiirillä. Myös Wataha ym. (2008) raportoivat sinisen valon solujen proliferaatiota estävästä vaikutuksesta. Lisäksi on raportoitu sinisen valon nopeuttavan haavojen paranemista eläinkokeissa (Adamskaya ym. 2011) ja vähentävän sieni-infektioiden määrää mandariineissa (Alferez ym. 2012). Bennett

ym. (2009) puolestaan havaitsivat sinisen valon olevan yhteydessä äitien synnytyksen jälkeiseen masennukseen. Vaikutus johtui siitä, että altistuminen siniselle valolle vähentää melatoniinin tuotantoa. Valon vaikutuksesta melatoniinin tuotantoon ovat raportoineet myös Juutilainen ja Kumlin (2006).

## 2.2 GENOTOKSISUUS

Genotoksisuudella tarkoitetaan jonkin tekijän haitallisia vaikutuksia solun DNA:han. Tyypillisesti genotoksisuutta aiheuttavia yhdisteitä ovat erilaiset kemikaalit sekä ionisoiva säteily (Sancar ym. 2004). Genotoksiset vaikutukset voivat kohdistua suoraan DNA:han mutaatioina tai muina DNA-vaurioina. Kuitenkin esimerkiksi solujen kohonnut happiradikaalien määrä voi vaikuttaa solun toimintaan ja solusykliin, mikä saattaa ilmetä genotoksisina vaikutuksina (Sancar ym. 2004). Genotoksisuutta voidaan määrittää heti altistuksen jälkeen ja mikäli vaikutukset näkyvät myös altistuneiden solujen jälkeläissoluissa voidaan puhua pitkittyneestä genotoksisuudesta. Tilannetta, jossa altistuneissa soluissa ei havaita vaikutuksia, mutta niiden altistumattomissa jälkeläissoluissa havaitaan genotoksisia vaikutuksia, kutsutaan genomien epävakaisuudeksi (Mustonen ym. 2002). Kaavakuva genomien epävakaisuudesta nähdään kuvassa 3.



Kuva 3. Kaavakuva genomien epävakaisuudesta. Suurin osa altistuneista soluista säilyttää normaalin ilmiänsänsä (A). Esimerkkejä altistuksen aikaansaamasta genomien epävakaisuudesta (B ja C): altistunut solu ja sen lähimmät jälkeläiset ovat vaurioitumattomia, mutta vaikutuksia nähdään alun perin altistuneiden solujen jälkeläisissä. (Muokattu Mustonen ym. 2002)

Genomin epävakaisuus voi ilmetä esimerkiksi mutaatioina, mikrotumina tai lisääntyneenä solukuolemana vielä useiden solunjakautumisten jälkeen. Genomin epävakaisuus voi pahimmillaan johtaa syöpään, mutta genomin epävakaisuuden aiheuttavaa mekanismia ei kuitenkaan vielä tunneta (Kastan ja Bartek 2004).

### 2.2.1 Hyvin pienitaajuisten magneettikenttien genotoksisuus

Hyvin pienitaajuisten magneettikenttien genotoksisuutta on tutkittu melko paljon ja suurin osa kokeellisesta tutkimustiedosta tukee sitä johtopäätöstä, että hyvin pientaajuisilla magneettikentillä yksinään ei ole suoria genotoksisia vaikutuksia pienillä tai keskisuurilla kentänvoimakkuuksilla (Juutilainen ym. 2006a). Useissa tutkimuksissa, jotka on tehty 50 Hz magneettikentällä ja erilaisilla kentän voimakkuuksilla ei ole havaittu mitään genotoksisia vaikutuksia (Abramsson-Zetterberg ym. 2001, Burdak-Rothkamm ym. 2009, Stronati ym. 2004). Abramsson-Zetterberg ym. (2001) tutkivat hyvin pienitaajuisen kentän genotoksisuutta määrittämällä mikrotumia hiirten punasoluista, Burdak-Rothkamm tutkimusryhmineen (2009) puolestaan tutkivat ihmisen ihon fibroblastisoluihin tapahtuvia DNA-vaurioita ja Stronati ym. (2004) määrittivät ihmisten verinäytteistä sisarkromatidivaihdoksia, mikrotumia, kromosomipoikkeamia ja DNA-vaurioita Comet Assay –menetelmällä. Myöskään Verschaeve tutkimusryhmineen (2011) ei havainnut 50 Hz ja 100 tai 500 mT magneettikentän aiheuttavan mitään genotoksisia vaikutuksia yksin tai yhdessä tunnettujen mutageenien kanssa. Verschaeve ym. (2011) tutkivat genotoksisuutta *Salmonella typhimurium* bakteereilla VITOTOX -menetelmällä.

Kuitenkin joissakin yksittäisissä tutkimuksissa on havaittu hyvin pientaajuisilla magneettikentillä genotoksisia vaikutuksia. Dominici tutkimusryhmineen (2011) havaitsi, että työssään voimakkailla hyvin pientaajuisille magneettikentille altistuvilla hitsaajilla oli imusoluissa enemmän mikrotumia kuin kontrolliryhmällä. Samassa tutkimuksessa määritettiin myös sisarkromatidivaihdoksia, joita hitsaajilla oli vähemmän kuin kontrolleilla. Tulokset ovat siis hieman ristiriidassa keskenään ja tutkimuksessa otanta olikin melko pieni. Hyvin pienitaajuisten magneettikenttien vaikutuksista mikrotumien määrään ovat raportoineet myös Udroui (2006) ja Fatigoni (2005) tutkimusryhmineen. Udroui ym. (2006) havaitsivat 50 Hz ja 650  $\mu$ T magneettikentän lisäävän mikrotumien määrää vastasyntyneillä hiirillä, mutta aikuisilla hiirillä vaikutusta ei havaittu. Fatigoni ym. (2005) totesivat 50 Hz ja 1 mT magneettikentän olevan

genotoksinen *Tradescantia*-mikrotumamenetelmällä. Vijayalaxmi ja Prihoda (2009) analysoivat 87 julkaisua vuosilta 1990–2007 ja havaitsivat, että monissa tutkimuksissa oli raportoitu magneettikenttien genotoksisuudesta yhteisaltistuksessa jonkin tunnetun genotoksisen altisteen kanssa. Kuitenkin heidän mukaansa havaitut vaikutukset olivat pääosin hyvin pieniä ja myös julkaisuharha saattaisi selittää havaittuja vaikutuksia. Hyvin pienitaajuisten magneettikenttien viivästyneistä vaikutuksista ja mahdollisesta genomien epävakaisuudesta ei ole saatavilla tutkimustietoa.

### 2.2.2 Sinisen valon genotoksisuus

Sinisen valon genotoksisuutta on tutkittu melko vähän, mutta aiheesta löytyy kuitenkin joitakin yksittäisiä tutkimuksia, joiden perusteella sinisellä valolla voisi olla genotoksisia vaikutuksia. Sideris ym. havaitsivat jo vuonna 1981 kiinanhamstereiden V-79 soluilla tutkimuksessaan sinisen valon lisäävän yksijuosteisen DNA:n katkoksia, sisarkromatidivaihdoksia ja solujen kuolleisuutta. Vastaavasti Christensen ym. (1990) havaitsivat ihmisen glioblastoomasoluilla tehdyssä tutkimuksessaan sinisen valon aiheuttavan yksijuosteisen DNA:n katkoksia ja lisäksi bilirubiinin läsnäollessa muodostui pitkäikäisiä toksisia fotokemiallisia yhdisteitä. Roehlecke tutkimusryhmineen (2009) havaitsivat sinisen valon aiheuttavan lukuisia vaikutuksia verkkokalvon epiteelin pigmenttisoluissa. Roehlecke ym. (2009) mukaan sininen valo vähensi solujen metabolista aktiivisuutta ja mitokondrionaalista membraanipotentialia, mutta lisäsi solunsisäistä happiradikaalituotantoa ja monenlaisten stressiproteiinien muodostumista. Seko ym. (2001) puolestaan totesivat tutkimuksessaan sinisen valon lisäävän apoptoottista solukuolemaa rottien verkkokalvon epiteelin pigmenttisoluissa.

## 2.3 HYVIN PIENITAAJUISTEN MAGNEETTIKENTTIEN JA SINISEN VALON VAIKUTUSMEKANISMIT

Sinisen valon ja hyvin pienitaajuisten magneettikenttien vaikutuksia on tutkittu erilaisilla kasveilla ja eläimillä. Ahmad tutkimusryhmineen (2007) totesi kokeissaan magneettikenttäaltistuksen heikentävän liturohon (*Arabidopsis thaliana*) juurien kasvua yhdessä sinisen valon kanssa. Myös Solov'yov ym. (2007) totesivat magneettikentän vaikuttavan kasveihin. Harris

kumppaneineen (2009) puolestaan totesi, ettei magneettikentällä ole vaikutusta kasvien kasvuun.

Sammakon poikasten (Diego-Rasilla ym. 2010) ja sisiliskojen (Nishimura ym. 2010) on todettu aistivan magneettikenttiä ja molemmissa tutkimuksissa todetaan, että magneettikentän aistiminen on riippuvainen valosta tai näköhavainnosta. Quaglino tutkimusryhmineen (2004) raportoi hyvin pienitaajuisten magneettikentän vaikutuksista rottien kateenkorvan soluihin yhdessä jatkuvan valoaltistuksen kanssa. Myös muuttolinnut suunnistavat magneettikenttien mukaan (Lohmann ym. 2010) ja Heyersin ym. (2007) mukaan linnut tarvitsevat myös visuaalisen havainnon aistiakseen magneettikentän. Stapput tutkimusryhmineen (2010) vahvisti tämän havainnon kokeessaan, jossa he havaitsivat, että punarinnat menettivät suuntavaistonsa, jos niiden oikea silmä peitettiin, vasemman silmän peittäminen ei vaikuttanut suunnistuskyyneen. Paitsi eläimillä ja kasveilla, niin myös ihmisillä on havaittu magneettikentällä ja valolla yhteisvaikutuksia, sillä Praton ym. (2001) mukaan magneettikenttä vaikuttaa ihmisen tasapainoaistiin riippuen valoisuudesta.

### **2.3.1 Hyvin pienitaajuisten magneettikenttien vaikutusmekanismi**

Hyvin pienitaajuisten magneettikenttien vaikutusmekanismista solutasolta eliötasolle asti on esitetty erilaisia teorioita, mutta varmaa tutkimustietoa mekanismista ei ole. Hyvin pienitaajuisten kenttien kohdalla on merkitsevää se, kuinka suuria voimia kentät aiheuttavat varattuihin hiukkasiin (Lang ja Jokela 2006). Yleisesti vahvimpana teoriana pidetään niin sanottua radikaalipari-mekanismia, jonka teoriapohja tunnetaan hyvin. Radikaalipari-mekanismi tarkoittaa, että magneettikenttä vaikuttaa happiradikaaleilla olevien parittomien elektronien spiniin ja niiden suuntaukseen (Brocklehurst ja McLauchlan 1996).

Radikaaliparimekanismin vaikutukset tapahtuvat todennäköisesti kryptokromiproteiineissa. Chavesin ym. (2011) mukaan kryptokromit toimivat sinisen valon reseptoreina ja magnetoreseptoreina kasveissa eläimissä ja ihmisissä vaikuttaen esimerkiksi vuorokausirytmiiin. San-car ym. (2010) totevat myös, että kryptokromi on yksi vuorokausirytmien säätelytekijä ja lisäksi vuorokausirytmii on herkkä säätelylle ja siihen voivat vaikuttaa erilaiset genotoksiset altisteet. Ihmisen ei ole todettu pystyvän aistimaan magneettikenttiä mutta myös ihmisellä on kryptokromeja (Liedvogel ja Mouritsen 2010). Kuitenkin Foley tutkimusryhmineen (2011)



osoitti, että ihmisen transgeeninen kryptokromi toimii magnetoreseptorina kärpäsellä. Biskupin ym. (2009) mukaan kryptokromeissa tapahtuu radikaaliparireaktioita ja Maeda ym. (2012) toteavat kryptokromin olevan ideaalinen magnetoreseptori. Lisäksi Rodgers ja Hore (2008) sanovat, että magnetoreseptio linnuilla perustuu radikaaliparimekanismiin. Hyvin pienitajuisten magneettikenttien onkin tutkimuksissa havaittu lisäävän solujen happiradikaalituotantoa. Luukkosen (2011) väitöskirjasta käy ilmi, että seitsemässä eri tutkimuksessa joissa oli selvitetty hyvin pienitajuisten magneettikentän vaikutuksia solujen happiradikaalituotantoon, viidessä havaittiin magneettikentän lisäävän solunsisäistä happiradikaalituotantoa ja kahdessa vaikutusta ei havaittu. Esimerkiksi Mannerling tutkimusryhmineen (2010) havaitsi 50 Hz ja 25, 50 tai 100  $\mu\text{T}$  magneettikenttäaltistuksen lisäävän superoksidianionituotantoa ihmisen leukemiasoluilla tehdyssä tutkimuksessa.

Magneettikenttien vaikutusmekanismeista on esitetty myös toisenlaisia teorioita, joista tunnetuimpia ovat resonanssivaikutukset ja koherentit värähtelyt, joka tunnetaan myös Fröhlichin teoriana. Lisäksi on esitetty myös muita vähemmän analysoituja teorioita, kuten magnetiitti-teoria ja Zeemannin-Starkin -kvanttimalli, joka on eräs ligandi-reseptorimalli. Kuitenkaan mitään näistä teorioista ei ole onnistuttu vahvistamaan paikkansapitäväksi. (Lang ja Jokela 2006)

### **2.3.2 Sinisen valon vaikutusmekanismi**

Sinisestä valosta aiheutuvat vaikutukset ovat ilmeisesti kytköksissä kryptokromeihin, jotka toimivat eliöiden soluissa valoreseptoreina sinisen valon aallonpituudella (Cashmore ym. 1999). Brunelle tutkimusryhmineen (2007) totesi, että sinisen valon vaikutus panssarisiimaeliöihin tapahtui nimenomaan kryptokromien välityksellä. Myös Yoshii ym. (2009) totesivat, että kärpästen (*Drosophila*) vuorokausirytmii on herkkä magneettikentälle ja herkkyyteen vaikuttavat kryptokromit, joiden toimintaa säätelee valo. Sinisen valon vaikutuksista solujen happiradikaalituotantoon on raportoitu useissa tutkimuksissa. King tutkimusryhmineen (2004) totesi, että sininen valo voi lisätä happiradikaalien määrää ja sitä kautta solukuolemaa mitokondrioissa sijaitsevan elektronien siirtoketjun kautta verkkokalvon epiteelin pigmenteissä. Myös Lewis tutkimusryhmineen (2004) on todennut sinisen valon lisäävän oksidatiivista stressiä ihmisen epidermaalisilla sarveissoluilla tehdyssä tutkimuksessa. Omata tutkimusryhmineen (2006) havaitsi sinisen valon vaikuttavan solujen sisäiseen ja ulkoiseen happiradikaalituotantoon.

lien määrään. Omata ym. (2006) tutkimuksessa havaittiin, että happiradikaalien määrässä ja muodostumispaikassa oli eroja riippuen käytetystä solulinjasta ja kasvatusmediumista, mutta syytä havaittuihin eroihin ja sinisen valon vaikutusmekanismia ei saatu selville. Myös Roehlecke ym. (2009) havaitsivat sinisen valon lisäävän solunsisäistä happiradikaalituotantoa. Tutkimustiedon perusteella vaikuttaa siltä, että sinisen valon vaikutusmekanismi on kytköksissä kryptokromeihin ja mahdollisesti radikaaliparimekanismiin.

### **3. TYÖN TAVOITTEET**

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää hyvin pienitaajuisen magneettikentän aiheuttamia välittömiä ja viivästyneitä biologisia vaikutuksia ihmisen neuroblastoomasoluissa. Tutkimuksessa aktivoitiin solujen kryptokromiproteiineja sinisellä valolla ja altistettiin soluja samalla hyvin pienitaajuiselle magneettikentälle sekä menadionille. Tavoitteena oli selvittää vaikuttavatko altisteet yhdessä tai erikseen solujen happiradikaalituotantoon ja solujen proliferaatioon, sekä aiheuttavatko altisteet DNA-vaurioita ja aiheutuuko altistuksesta genomin epävakaisuutta. Tutkimuksessa tarkasteltiin välittömiä vaikutuksia heti altistuksen jälkeen sekä viivästyneitä vaikutuksia 8 ja 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta.

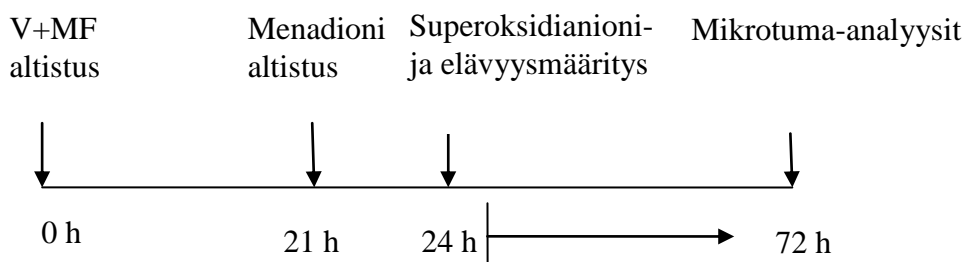
## 4. AINEISTO JA MENETELMÄT

### 4.1 KOEASETELMA

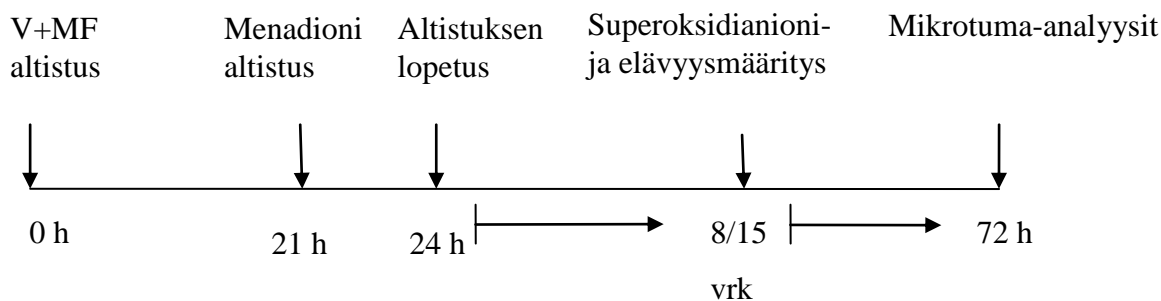
Tutkimuksessa ihmisen neuroblastoomasoluja (solulinja SH-SY5Y) altistettiin 48-kuoppalevyillä (Costar, Yhdysvallat) tai muovisilla maljoilla (halkaisija 60 mm, Nunc, Tanska) soluviljelyinkubaattorissa siniselle valolle 24 tuntia. Samanaikaisesti sinisen valon kanssa soluja altistettiin myös 50 Hz magneettikentälle, joka oli voimakkuudeltaan 100  $\mu$ T. Lisäksi altistena käytettiin menadionia (10 ja 20  $\mu$ M) siten, että valo- ja magneettikenttäältistuksen viimeiseksi 3 tunniksi kuoppalevyille lisättiin menadioni. Menadionin lisäys tapahtui steriileissä olosuhteissa pimeässä laminaarivirtauskaapissa. Tämän vuoksi valo- ja magneettikenttäältistukseen tuli lyhyt katkos, mutta solujen steriilin jatkokasvatuksen varmistamiseksi menadionin lisäämistä ei voitu suorittaa inkubaattorissa. Valon tasaisen jakautumisen varmistamiseksi kuoppalevyistä käytettiin vain kolmen ensimmäisen rivin (A-C) kuoppia. Tutkimuksessa käytetyt näytekoodit on esitetty taulukossa 1. Kuvissa 4 ja 5 nähdään aikajanana kokeiden aikataulu.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt näytekoodit sekä niiden selitykset.

<b>Nimi</b>	<b>Näyte</b>
<b>K</b>	Kontrolli
<b>10MQ</b>	10 $\mu$ M menadioni
<b>20MQ</b>	20 $\mu$ M menadioni
<b>V</b>	Sininen valo
<b>V+10MQ</b>	Sininen valo + 10 $\mu$ M menadioni
<b>V+20MQ</b>	Sininen valo + 20 $\mu$ M menadioni
<b>MF</b>	50 Hz magneettikenttä 100 $\mu$ T
<b>MF+10MQ</b>	50 Hz magneettikenttä 100 $\mu$ T + 10 $\mu$ M menadioni
<b>MF+20MQ</b>	50 Hz magneettikenttä 100 $\mu$ T + 20 $\mu$ M menadioni
<b>V+MF</b>	Sininen valo + 50 Hz magneettikenttä 100 $\mu$ T
<b>V+MF+10MQ</b>	Sininen valo + 50 Hz magneettikenttä 100 $\mu$ T + 10 $\mu$ M menadioni
<b>V+MF+20MQ</b>	Sininen valo + 50 Hz magneettikenttä 100 $\mu$ T + 20 $\mu$ M menadioni



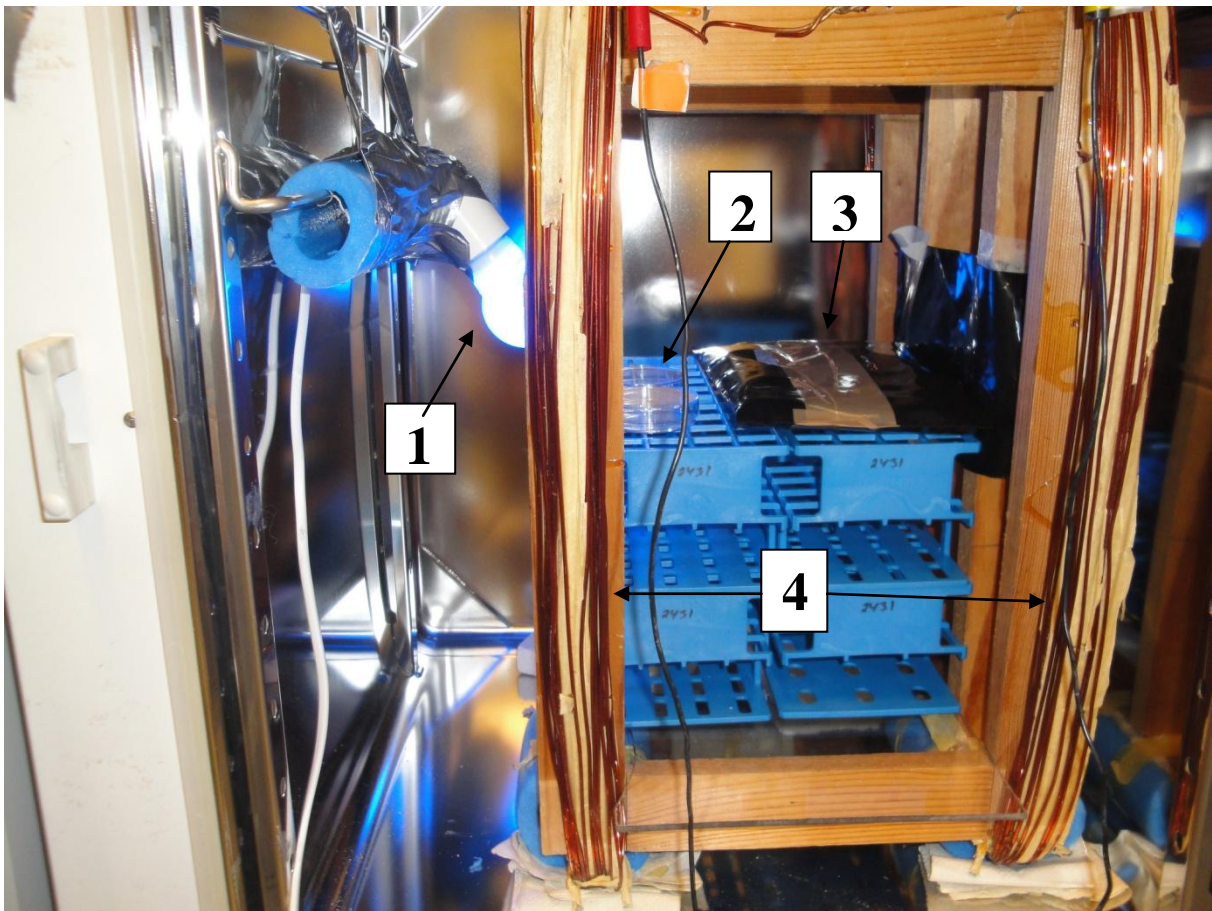
Kuva 4. Välittömien vaikutusten määrittäminen.



Kuva 5. Viivästyneiden vaikutusten määrittäminen.

Solujen altistaminen tapahtui soluviljelyinkubaattorissa (Heraeus HERAcell, Saksa), johon oli liitetty magneettikenttäaltistuslaitteisto ja sininen led-lamppu (Led QRL-E27Bulb-B 1,2W/220V AC, Oshino Lamps, Saksa). Soluviljelyinkubaattorin lämpötila oli +37 °C ja suhteellinen hiilidioksidipitoisuus noin 5 %. Magneettikenttäaltistuslaitteisto koostui signaaligeneraattorista (Wavetek Arbitrary Waveform Generator model 75, Yhdysvallat), vahvistimesta (Peavey M-3000 Power Amplifier, Peavey Electronics Corp., Yhdysvallat) ja inkubaattorin sisälle asetetuista kahdesta kuparikelasta. Kelat olivat 340 \* 460 mm kokoisia ja ne oli asetettu 220 mm etäisyydelle toisistaan Helmholtz-tyyppisesti, jolloin niiden sisään muodostui lähes tasainen magneettikenttä. Lisäksi inkubaattorin sisälle oli asennettu vinosti toiselle seinustalle sininen led-lamppu noin 4,5–6,5 cm etäisyydelle altistettavien kuoppalevyjen/maljojen yläpuolelle. Etäisyyden vaihtelu johtuu siitä, että lampun kiinnittämisessä ja kiinnipysymisessä oli ongelmia tutkimusten aikana ja välillä lampun asento oli hiukan vaihtunut 24 tunnin altistuksen aikana. Kuvassa 5 on esitetty altistusjärjestely soluviljelyinkubaattorissa. Altistettavat solut asetettiin maljoilla/kuoppalevyillä telineen päälle kelojen väliin korkeuden suhteen mahdollisimman keskelle ja sivuttaissuunnassa telineen reunoille, jotta etäi-

syys lamppuun olisi mahdollisimman lyhyt. Vastaavasti pelkälle magneettikentälle altistettavat maljat/kuoppalevyt asetettiin telineen vastakkaiselle reunalle samaan kohtaan, jotta magneettikenttä olisi samankaltainen. Kontrolleja sekä siniselle valolle altistettavia kuoppalevyjä/maljoja pidettiin vastaavanlaisessa soluviljelyinkubaattorissa, jossa ei ollut magneettikenttäaltistuskelaa, mutta johon oli kiinnitetty sininen led-lamppu. Kuten kuvasta 6 nähdään, kontrolli- ja pelkälle magneettikentälle altistetut kuoppalevyt/maljat peitettiin mustalla valokuvamuovipussilla, jotta ne eivät altistu valolle. Muovipussia ei kuitenkaan suljettu tiiviisti, jotta ilma pääsi kiertämään soluille.



Kuva 6. Altistusjärjestely soluviljelyinkubaattorissa. 1 on sininen led-lamppu, 2 valolle ja magneettikentälle altistettavat maljat, 3 valokuvamuovipussin sisällä olevat pelkälle magneettikentälle altistettavat maljat, 4 kelat, joiden väliin magneettikenttä muodostuu.

Tutkimuksissa mitattiin välittömiä vaikutuksia heti altistuksen päätyttyä mittaamalla solujen superoksidianionituotantoa fluorometrillä dihydroksietidium (DHE) -menetelmällä, solujen elävyyttä propidiumjodidi (PI)- ja digitoniinikäsittelyllä, sekä DNA-vaurioita määrittämällä mikrotomia ja suhteellista solumäärää virtaussytometrillä (Becton Dickinson FACSCalibur, Yhdysvallat) 72 tuntia altistuksen päättymisestä. Lisäksi määritettiin solujen proliferaatiota

Alamar Blue -menetelmällä. Viivästyneitä vaikutuksia selvitettiin mittaamalla solujen superoksidianionituotantoa ja elävyyttä, sekä genomien epävakaisuutta määrittämällä mikrotumia ja suhteellista solumäärää virtaussytometrialla 8 ja 15 vuorokauden kuluttua altistuksen päättymisestä.

## 4.2 SOLULINJA JA SOLUVILJELY

### 4.2.1 Solujen ylläpito ja esikasvatus

Tutkimuksessa käytettiin altistettavina soluina ihmisen neuroblastoomasoluja (SH-SY5Y). Kyseistä solulinjaa käytettiin, koska se oli tutkimusryhmän aiemmissa tutkimuksissa todettu hyvin soveltuvaksi aiotun kaltaisiin tutkimuksiin. Soluja säilytettiin nestetyössä kasvatusliuosta sisältävissä ampulleissa, joihin oli lisätty jääkiteiden muodostumisen estämiseksi 10 % dimetyylisulfoksidia (DMSO). Kaikki kemikaalit ja tutkimuksessa käytettyjen liuosten valmistusohjeet on esitetty liitteessä 1.

Soluja kasvatettiin Dulbecco's Modified Eagle Mediumissa (DMEM), joka sisälsi glukoosia 4,5 g/l. Mediumiin lisättiin 10 % inaktivoitua FBS:a, 50 U/ml penisilliiniä ja 50 µg/ml streptomysiiniä. Soluja kasvatettiin steriileissä olosuhteissa muovisissa soluviljelypulloissa (75 cm<sup>2</sup>, Nunc, Tanska), joita pidettiin soluviljelyinkubaattorissa (Heraeus HERACell, Saksa). Soluviljelyinkubaattorin lämpötila oli +37 °C, suhteellinen hiilidioksidipitoisuus 5 % ja suhteellinen ilmankosteus noin 90 %. Solujen siirrostus tapahtui steriileissä olosuhteissa laminaarivirtauskaapissa (Kojair Tech Oy, KR-125B, Suomi). Laminaarikaapissa työskennellessä ja muutoinkin työskentelyn aikana käytettiin kumisia suojakäsineitä. Ennen työskentelyn aloittamista laminaarikaappi puhdistettiin 1,5 % Erifenolilla (Erisan erifenol combi, Orion-yhtymä Oyj NOIRO, Suomi) ja 70 % etyylialkoholilla (EtOH, Altia Corporation, Suomi). Ennen työskentelyä tarvittavat liuokset lämmitettiin +37 °C:een vesihauteessa (Grant Instruments Y22, Englanti).

Siirrostettaessa soluja kasvatuspulloista poistettiin kasvatusmedium pasteur-pipetillä ja pulloon pipetoitiin 5 ml irrotusliuosta. Irrotusliuoksen sisältämä EDTA (Etyleenidiamiinitetraetikkahappo) kelatoi Ca<sup>2+</sup> ja Mg<sup>2+</sup> -ioneja, joita tarvitaan solujen kiinnittymiseen. Solususpens-

sio pipetoitiin 15 tai 50 ml:n muoviputkeen ja sentrifugoitiin (Heraeus Instruments Biofuge primo/Kendro Laboratory products, Saksa) 8 minuutin ajan, 363 x g, minkä jälkeen poistettiin supernatantti. Solupelletti suspensoitiin 1 millilitraan kasvatusliuosta.

Solujen laskentaa varten solususpensiosta laimennettiin solunäyte 1:100 pipetoimalla 1,5 ml:n eppendorf-putkeen 10 µl solususpensiota ja 990 µl PBS-puskuria. Laimennosta pipetoitiin 10 µl peitinlasin (Thermo Scientific, Saksa) alle solulaskentalevyille (Neubauer, Marienfeld, Saksa) ja laskettiin faasikontrastimikroskoopilla (Olympus CK40, Japani) katsoen solumäärät laskentakammista. Solumäärien perusteella laskettiin ja tehtiin halutun solumäärän sisältävät solususpensiot laimentamalla alkuperäistä solususpensiota kasvatusmediumilla siten, että pullossa yhteistilavuudeksi tuli noin 20 ml. Soluja siirrostettiin tarvittaessa, noin 2 kertaa viikossa.

#### **4.2.2 Kuoppalevyjen ja maljojen valmistelu altistuksiin ja määrittäisiin**

Välittömiä vaikutuksia mitattaessa solujen altistus tapahtui 48-kuoppalevyillä. Solujen esikasvatus, irrotus ja solulaskenta tehtiin kohdassa 4.2.1 kuvatulla tavalla. Kuoppalevyille pipetoitiin  $0,1 \cdot 10^6$  solua/kuoppa siten, että yhteistilavuus oli 500 µl (solususpensio + medium). Kuitenkin solujen proliferaatiomäärittystä varten pipetoitiin vain  $0,017 \cdot 10^6$  solua/kuoppa siten, että yhteistilavuus oli 500 µl (solususpensio + medium). Viivästyneitä vaikutuksia mitattaessa solujen altistus tapahtui maljoilla. Solujen esikasvatus, irrotus ja solulaskenta tehtiin kohdassa 4.2.1 kuvatulla tavalla. Maljoille pipetoitiin  $0,25 \cdot 10^6$  solua/malja siten, että yhteistilavuus oli 5 ml (solususpensio + medium).

Kuuden vuorokauden kuluttua altistuksesta solut siirrostettiin maljoilta kuoppalevyille 8 vuorokauden määrittäiksi varten ja uusille maljoille 15 vuorokauden määrittäiksi varten. Kaikki altistuksen jälkeen tehdyt toimenpiteet pyrittiin tekemään mahdollisimman pimeissä olosuhteissa, jotta solut eivät enää altistuisi valolle. Maljoilta poistettiin kasvatusmedium pasteuripipetillä ja maljoille pipetoitiin 2 ml irrotusliuosta. Solususpensio pipetoitiin 15 ml muoviputkeen ja sentrifugoitiin 8 minuutin ajan, 363 x g, jonka jälkeen poistettiin supernatantti. Solupelletti suspensoitiin 1 millilitraan kasvatusliuosta.



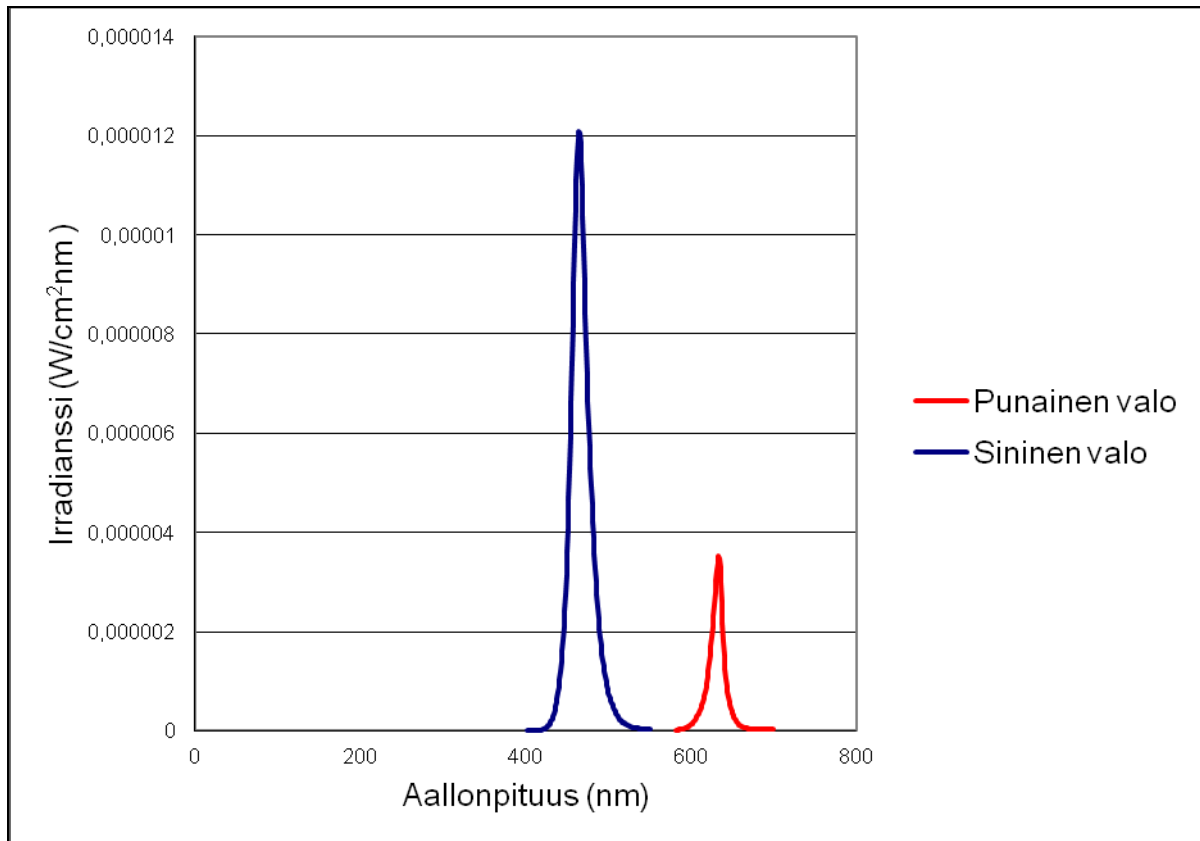
Solujen laskentaa varten solususpensiosta laimennettiin solunäyte 1:10 pipetoimalla eppendorf-putkeen 10 µl solususpensiota ja 90 µl PBS-puskuria. Laimennosta pipetoitiin laskentalevyille 10 µl ja laskettiin mikroskopoiden solumäärät laskentakammioista. Solulaskennan 8 ja 15 vuorokauden siirrostuksissa suoritti laboratoriomestari Hanne Säppi. Solumäärien perusteella laskettiin halutut solususpensiot. 48-kuoppalevyille pipetoitiin soluja  $0,1 \cdot 10^6$  solua/kuoppa siten, että yhteistilavuus oli 500 µl (solususpensio + medium) ja maljoille  $0,25 \cdot 10^6$  solua/malja siten, että yhteistilavuus oli 5 ml (solususpensio + medium). Viikon kuluessa siirrostettiin solut 15 vuorokauden maljoilta 48-kuoppalevyille edellä kuvatulla tavalla määrityksiä varten.

### 4.3 ESIKOKKEET

Esikokeissa altistettiin ihmisen neuroblastomasoluja (solulinja SH-SY5Y) 48-kuoppalevyillä siniselle tai punaiselle valolle soluviljelyinkubaattorissa 24 tunnin ajan. Soluviljelyinkubaattoriin oli kiinnitetty sininen (Led QRL-E27Bulb-B 1,2W/220V AC, Oshino Lamps, Saksa) tai punainen (Led QRL-E27Bulb-R 1,2W/220V AC, Oshino Lamps, Saksa) led-lamppu 4,5 cm etäisyydelle suoraan kuoppalevyn yläpuolelle. Lisäksi soluja altistettiin eri annoksilla menadionille siten, että menadionit lisättiin kuoppalevyille valoaltistuksen viimeisen 3 tunnin ajaksi. Menadionit pipetoitiin kuoppalevyille soluviljelyinkubaattorin sisällä, jotta valoaltistukseen ei tulisi taukoa. Käytetyt menadionikonsentraatiot olivat 1, 10, 15, 20, 25 ja 50 µM. Kontrollikuoppalevy oli kääritty folioon, jotta se ei altistuisi valolle. Rinnakkaisia näytteitä oli kolme jokaisessa toistossa. Välittömästi altistuksen jälkeen solujen superoksidianionituotantoa mitattiin fluorometrillä (PERKIN ELMER HTS 7000 PLUS Bio Assay Reader, Perkin Elmer, Yhdysvallat) DHE-menetelmällä (kts. 4.4.1). Esikokeet tehtiin, jotta löydettäisiin varsinaisiin tutkimuksiin sopivat menadionipitoisuudet ja nähtäisiin ovatko käytettävät lamput riittävän tehokkaita.

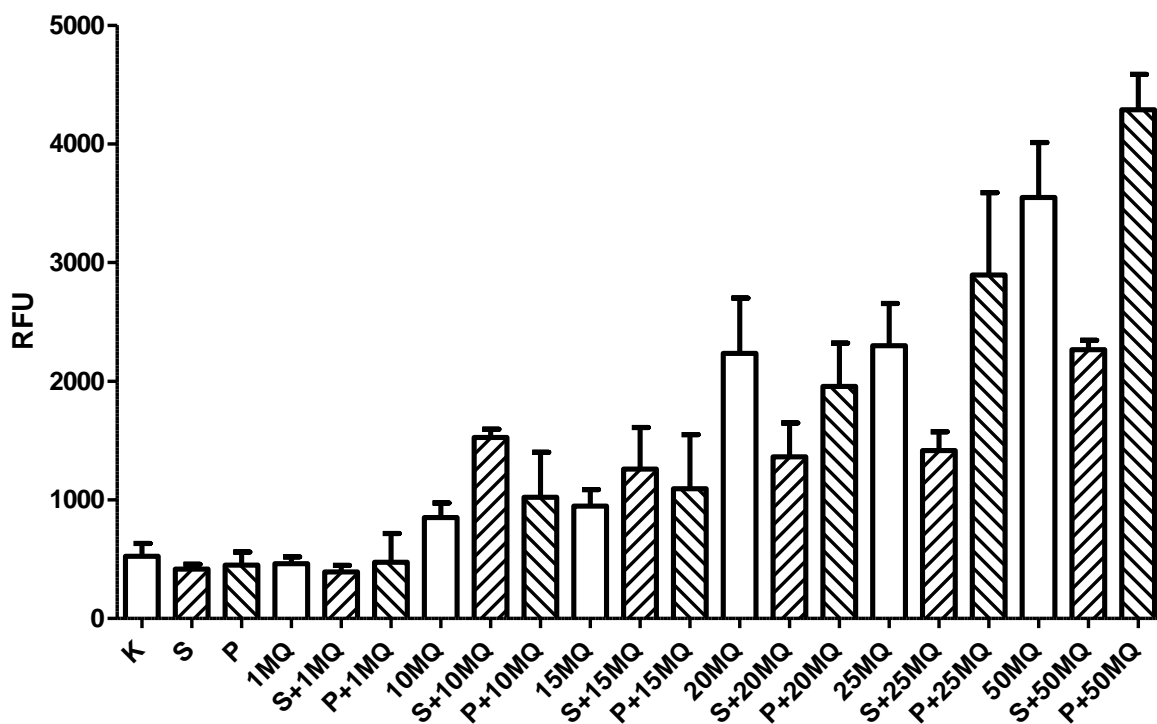
Esikokeiden yhteydessä mitattiin tutkimuksessa käytettävien lamppujen aallonpituudet ja irradianssit. Mittaukset tehtiin spektroradiometrillä (OL 756 Portable High-Accuracy UV-Visible Spectroradiometer, Optronic Laboratories Inc, Yhdysvallat). Sinisen ja punaisen lampun aallonpituudet, irradianssi ja fotosynteettisesti saatavilla oleva säteily (PAR) mitattiin suoraan 5 cm päästä lampusta siten, että välissä oli 48-kuoppalevyn muovinen kansi, koska myös soluja altistettaessa maljojen/kuoppalevyjen päällä on kansi. Kaikki mittaukset suoritettiin.

tiin pimeässä huoneessa ilman taustavaloa. Sinisen lampun aallonpituus oli 430–500 nm, irradianssi  $3,276649 \cdot 10^{-4} \text{ W/cm}^2\text{nm}$  ja PAR  $1,280854 \cdot 10^1 \mu\text{M/sm}^2$ . Punaisen lampun aallonpituus oli 600–660 nm, irradianssi  $7,174458 \cdot 10^{-5} \text{ W/cm}^2\text{nm}$  ja PAR  $3,698598 \mu\text{M/sm}^2$ . Kuvasta 7 nähdään sinisen ja punaisen lampun mitatut irradianssit ja aallonpituudet.



Kuva 7. Sinisen ja punaisen led-lampun irradianssi ja aallonpituus.

Kuvassa 8 on esitetty solujen superoksidianionituotanto suhteellisina fluoresenssiyksikköinä (RFU) välittömästi altistuksen jälkeen mitattuna DHE-menetelmällä. Kuvasta nähdään, että sininen valo lisää superoksidianionien määrää yhdessä menadionin kanssa annoksilla 10 ja 15  $\mu\text{M}$ , kun taas suuremmilla annoksilla vaikutus on päinvastainen. Punainen valo taas näyttäisi lisäävän superoksidianionien määrää yhdessä menadionin kanssa lukuunottamatta 20  $\mu\text{M}$  annosta, jolla superoksidianionituotanto laskee hieman. Esikokeissa toistoja oli valoaltistusten osalta vain kaksi, joten tulokset ovat suuntaa antavia.



Kuva 8. Superoksidianionituotanto mitattuna välittömästi 24 h sinisen (S) tai punaisen (P) valoaltistuksen jälkeen. Viimeisen 3 tunnin ajan solut altistettiin myös menadionille (MQ) eri annoksilla (1, 10, 15, 20, 25 ja 50  $\mu\text{M}$ ). Kontrolli (K) pidettiin folioon käärittynä, joten se ei ole altistunut valolle. Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty suhteellisina fluoresenssiyksikköinä (RFU),  $n = 2 - 4$ .

Esikokeen perusteella varsinaisiin kokeisiin valittiin käytettäväksi menadionipitoisuuksiksi 10 ja 20  $\mu\text{M}$ , koska yhdessä 10  $\mu\text{M}$  pitoisuuden kanssa sininen valo lisäsi superoksidianionituotantoa ja 20  $\mu\text{M}$  annoksella vaikutus oli päinvastainen. Myös punaiseen valoon verrattuna vaikutus oli 20  $\mu\text{M}$  pitoisuudella erilainen. Suuremmilla menadionipitoisuuksilla solujen elävyys heikentyi ja viivästyneiden vaikutusten mittaaminen osoittautui mahdottomaksi jo 20  $\mu\text{M}$  annoksellakin.

## 4.4 MÄÄRITYSMENETELMÄT

### 4.4.1 Superoksidianionituotannon määrittäminen

Superoksidianioni  $\text{O}_2^{\bullet-}$  on reaktiivinen happiradikaali, jota syntyy solun sisäisessä happiradikaalituotannossa. Solujen superoksidianionituotantoa mitattiin DHE (dihydroksietidium) -menetelmällä. Soluissa tuotetut superoksidianionit hapettavat DHE:ta, mikä voidaan havaita

mittaamalla fluoresenssiä fluorometrillä. DHE-määrityksiä varten solut altistettiin 48-kuoppalevyillä tai viivästyneitä vaikutuksia mitattaessa solut oli siirrostettu maljoilta kuoppalevyille kaksi vuorokautta ennen mittausta. Superoksidianionituotantoa määritettäessä kuoppalevyillä oli kolme rinnakkaista näytettä.

Altistuksen loputtua tai viivästyneitä vaikutuksia mitattaessa 8 tai 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta, kuopista imettiin altisteet tai kasvatusliuokset pois ja tilalle pipetoitiin 250 µl 10 µM DHE-HBSS:a. Myös kolmeen tyhjään kuoppaan pipetoitiin DHE-HBSS:a, jolloin niistä saatiin blankit. Tämän jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin pimeässä +37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen mitattiin fluoresenssi fluorometrillä (PERKIN ELMER HTS 7000 PLUS Bio Assay Reader, Perkin Elmer, Yhdysvallat) eksitaatioaallonpituuden ollessa 485 nm, emissioaallonpituuden 595 nm ja valomonistinputken herkkyuden 120.

#### **4.4.2 Solujen elävyys**

Solujen elävyyttä määritettiin propidiumjodidi (PI)- ja digitoniinikäsittelyillä. Elävyydsmäärityksessä PI sitoutuu solujen DNA:han ja fluoresoi, jolloin voidaan mitata fluorometrillä fluoresenssi. PI pääsee kuitenkin vain sellaisiin soluihin, joiden solukalvo on vaurioitunut nekroosin eli toksisen solukuoleman seurauksena. Käsittelyn toisessa vaiheessa lisättävä digitoniini hajottaa solukalvon, jolloin PI pääsee tunkeutumaan kaikkiin soluihin ja sen avulla saadaan lopuksi määritettyä näytteen maksimifluoresenssi. Määrityksiä varten solut altistettiin 48-kuoppalevyillä tai viivästyneitä vaikutuksia mitattaessa solut oli siirrostettu maljoilta kuoppalevyille kaksi vuorokautta ennen mittausta. Välittömien vaikutusten elävyydsmääritys tehtiin DHE-määrityksen jälkeen samoilta kuoppalevyiltä mutta eri kuopista. Solujen elävyyttä määritettäessä kuoppalevyillä oli kolme rinnakkaista näytettä.

Altistuksen loputtua tai viivästyneitä vaikutuksia mitattaessa 8 tai 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta, kuopista imettiin altisteet tai kasvatusliuokset pois ja pipetoitiin tilalle 250 µl HBSS-puskuria. Kuoppiin lisättiin 10 µl 1,25 mM propidiumjodidia, jolloin PI-pitoisuus kuopissa oli 50 µM. HBSS-puskuria ja PI:tä pipetoitiin myös kolmeen tyhjään kuoppaan, jolloin saatiin blank 1. Kuoppalevyä sekoitettiin lyhyesti käsin ja inkuboitiin 20 minuuttia huoneenlämmössä foliolla peitettynä. Inkuboinnin jälkeen mitattiin fluoresenssi eksitaatioaallonpituuden ollessa 540 nm, emissioaallonpituuden 612 nm ja valomonistinputken herkkyuden 110.

PI-mittauksen jälkeen kuoppiin lisättiin 10 µl 4 mM digitoniinia, jolloin pitoisuus kuopissa oli 160 µM. Myös blank 1 -kuoppiin lisättiin digitoniini, jolloin niistä saatiin blank 2. Digitoniinin lisäyksen jälkeen soluja inkuboitiin 20 minuuttia huoneenlämmössä foliolla peitettynä, voimakkaassa ravistelussa (kuoppalevyravistelijä, Labsystems Wellmix, Saksa). Inkuboinnin jälkeen mitattiin fluoresenssi eksitaatioaallonpituuden ollessa 540 nm, emissioaallonpituuden 612 nm ja valomonistinputken herkkyyden 110.

Fluoresenssiarvot suhteutettiin solujen määrään perustuen propidiumjodidin antamaan maksimifluoresenssiin digitoniinin läsnä ollessa.

ELÄVYYSPROSENTTI(%) LASKETTIIN KAAVALLA:

$$100 - [(F - \text{blank1}) / (F_{\text{MAX}} - \text{blank2})] * 100$$

F: Fluoresenssiarvo propidiumjodidin lisäyksen jälkeen

blank1: Tausta soluttomista kuopista, propidiumjodidin lisäyksen jälkeen

blank2: Tausta soluttomista kuopista, digitoniinin lisäyksen jälkeen

F<sub>MAX</sub>: Maksimifluoresenssi digitoniinikäsittelyn jälkeen

#### 4.4.3 Mikrotuma-analyysit

Mikrotumat ovat DNA-kappaleita, jotka ovat peräisin joko katkenneista kromosomeista tai yksittäisistä kromosomeista, jotka ovat solunjakautumisessa jääneet tytärsolujen tumien ulkopuolelle. Mikrotumien muodostuminen on siis merkki DNA-vauriosta. Mikrotumia ja suhteellista solumäärää määritettiin virtaussytometrialla. Menetelmä on todettu sopivaksi mikrotumien ja suhteellisen solumäärän analysointiin (Bryce ym. 2007). Virtaussytometrin toiminta perustuu yksittäisten solujen virtaukseen valonlähteen ohi. Analysoitavat solut saatetaan yksisolususpensioksi ja imetään näyteputkesta kapeaksi virtaukseksi, joka johdetaan virtauskyvetiin. Kyvetissä solut fokusoidaan hydrodynaamisesti vaipanesteen avulla kulkemaan yksitelien lasersäteiden ohi. Kohdatessaan laserin, soluun kiinnittynyt fluoresoiva yhdiste virittyy tietyllä aallonpituudella ja emittoi korkeammalla aallonpituusvälillä. Solujen analysointiin ja

lajiteluun käytetään sekä fluoresenssia että valosirontaa, joiden avulla saadaan tietoa solun koosta ja rakenteesta, jolloin mikrotumat pystytään havaitsemaan näytteestä.

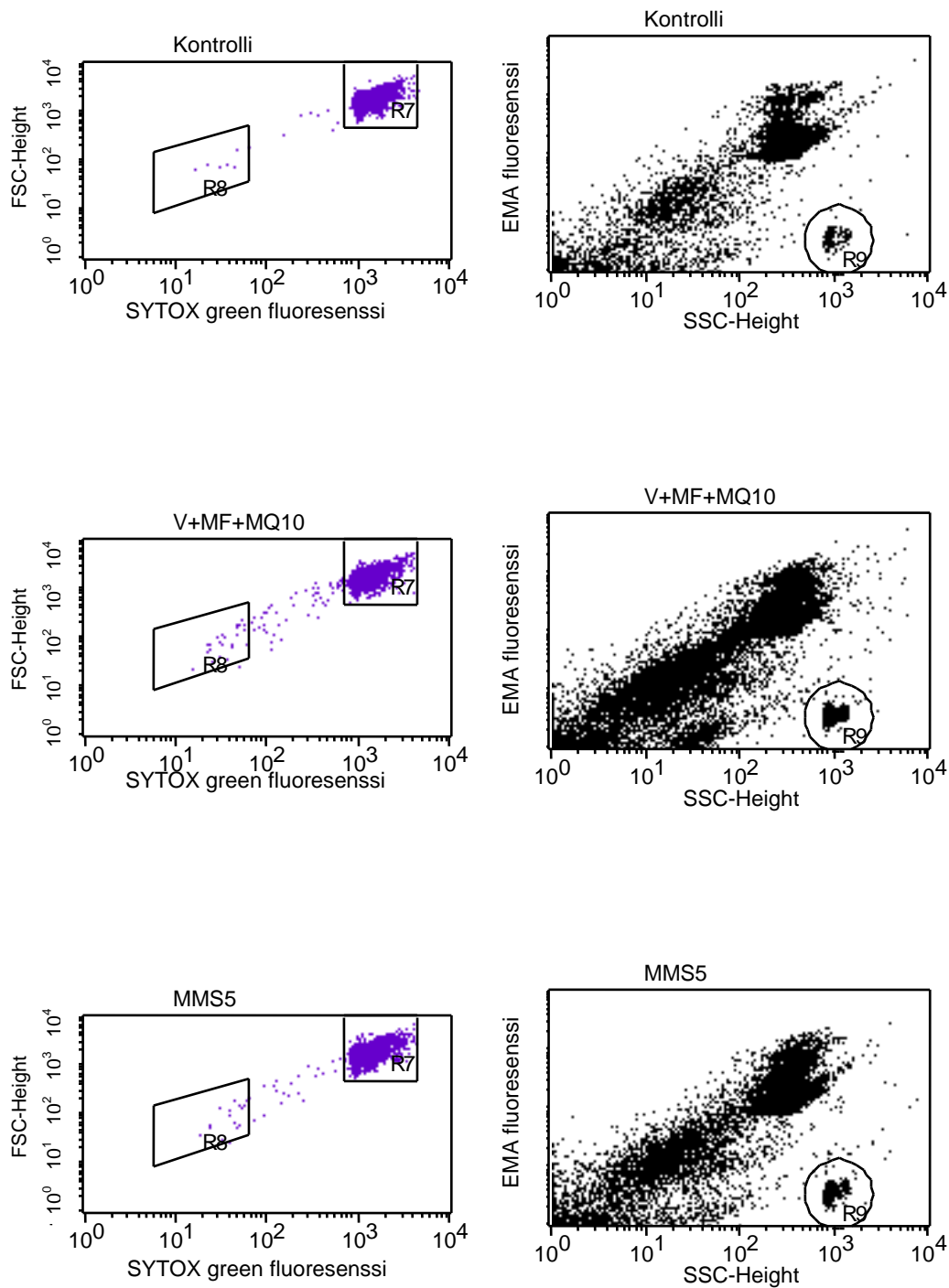
Virtausytometrillä tehtävää määrittystä varten solut värjättiin kahdesti. Ensimmäisessä värjäyksessä käytettävä EMA (etidium monoatsidi) värjää valoaktiivoinnin aikana kuolleiden ja kuolevien solujen tumat, joiden solukalvo on vaurioitunut. Terveiden solujen tumia EMA ei värjää. Tämän jälkeen solut pestään ja lyysispuskurit hajottavat solujen membraanit siten, että kaikki kromatiini purkautuu ja SYTOX green värjää kromatiinin. Tällöin kuolleiden solujen tumat ovat värjäytyneet kahdesti ja terveet tumat vain kerran. Analyysissä määritettiin 20 000 tapahtumaa jokaisesta näytteestä siten, että EMA ja SYTOX green fluoresointi mitattiin eksitaatio aallonpituudella 488 nm, EMA emissio 670 nm filterillä ja SYTOX green emissio 530 nm filterillä.

Suhteellisen solumäärän määrittämiseksi näytteisiin lisättiin fluoresoivia helmiä (Peak Flow, Green Flow cytometry reference beads, 6 µm; Invitrogen Corporation, Yhdysvallat) ennen määrittystä. Virtausytometrillä laskettiin näytteen sisältämät fluoresoivat helmet ja niiden määrää verrattiin näytteen terveiden tumien määrään. Tätä suhdetta verrattiin kontrollien vastaavaan suhteeseen ja siten saatiin selville suhteellinen solumäärä. Mitä enemmän terveitä tumia oli suhteessa helmien määrään, sitä suurempi oli suhteellinen solumäärä.

Mikrotumat ja suhteellinen elävyys määritettiin 72 tuntia altistuksen päättymisestä, jotta solut ehtivät jakautua ja mikrotumat muodostua. Myös 8 ja 15 vuorokauden mittauksissa määritykset tehtiin vasta 8 tai 15 vrk + 72 tunnin kuluttua, jolloin mittaus kuvasi tilannetta 8 tai 15 vuorokauden kohdalla. Määritykset tehtiin 48-kuoppalevyiltä ja määrityksissä analysoitiin kaksi rinnakkaista näytettä. Kuopista imettiin mediumit pois ja kuoppalevyjä inkuboitiin jäiden päällä 20 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen kuoppiin pipetoitiin 150 µl kylmää (+4°C) EMA-liuosta ja kuoppalevyjä valoaktivoitiin 30 minuuttia jäiden päällä. Valoaktivointi suoritettiin hehkulampun (Philips 60 W/ 240 V) alla siten, että solujen etäisyys lampusta oli 15 cm. Valoaktiivoinnin jälkeen kuopista imettiin EMA-liuos pois ja solut pestiin kertaalleen kylmällä (+4 °C) 500 µl PBS-FBS -liuoksella. Kuoppiin lisättiin 250 µl kylmää (+4 °C) Lyysis 1 -puskuria, minkä jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin 1 tunti +37 °C:ssa valolta suojattuna. Inkuboinnin jälkeen kuoppiin lisättiin 250 µl huoneenlämpöistä (+20 °C) Lyysis 2 -puskuria, minkä jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä (+20 °C) valolta suojattuna. Lyysis 2 sisälsi myös fluoresoivat helmet, joita tarvittiin suhteellisen elävyyden määrittä-

miseen. Inkuboinnin jälkeen näytteet pipetoitiin kuoppalevyiltä muoviputkiin ja näytteet analysoitiin virtaussytometrillä (Becton Dickinson FACSCalibur, Yhdysvallat) heti tai seuraavana päivänä. Seuraavana päivänä analysoitavia näytteitä säilytettiin pimeässä +4 °C:ssa mittaukseen asti.

Mikrotumien ja suhteellisen solumäärän analysointiin käytettiin Cell Quest Pro -ohjelman versiota 4.0.2 (BD Biosciences, Yhdysvallat). Kuvasta 9 nähdään kuvia analysointiohjelman tuloksista. Kuvista nähdään, että kontrollissa on vähemmän mikrotumia (R8) kuin altistetuissa soluissa. Myös fluoresoivia helmiä (R9) näkyy kontrollissa suhteessa vähemmän näytteen kokonaistumamäärään, joten kontrollin suhteellinen solumäärä on suurempi kuin altistetuissa näytteissä. Mikrotumia ja suhteellista solumäärää määritettäessä käytettiin positiivisena kontrollina 5 µg/ml metyyylimetaanisulfonaattia (MMS), koska sen tiedetään aiheuttavan mikrotumia. MMS altistus kesti 24 tuntia, jonka aikana malja pidettiin samassa soluviljelyinkubaattorissa kuin kontrollimalja ja pelkälle siniselle valolle altistetut maljat. MMS-malja pidettiin folioon käärittynä, jotta se ei altistunut valolle.



Kuva 9. Mikrotuma- ja suhteellinen solumääräanalyysien kuvia. Ylimmissä kuvissa on kontrolli, keskimmaisissa kuvissa valolle, magneettikentälle ja 10  $\mu$ M menadionille altistettut (V+MF+10MQ) ja alimmaisissa kuvissa positiivisena kontrollina toimineelle 5  $\mu$ g/ml metyyli-metaanisulfaatille (MMS5) altistettut solut. Kuvissa R7 alueen sisällä näkyvät normaalit tumat ja R8 alueen sisällä mikrotumat. R9 ympyrän sisällä ovat suhteellisen solumäärän laskemiseen käytetyt fluoresoivat helmet.



#### 4.4.4 Proliferaatio

Proliferaatiolla tarkoitetaan solujen jakautumista eli käytännössä solujen lukumäärän lisääntymistä. Solujen proliferaatiota määritettiin Alamar Blue –menetelmällä. Alamar Blue on kaupallinen reagenssi, jonka väri ja fluoresenssi muuttuvat, kun aine pelkistyy solujen proliferaation seurauksena.

Proliferaatiomääritykset tehtiin 48-kuoppalevyiltä välittömästi altistuksen päätyttyä. Altisteet imettiin pois kuopista ja kuoppiin lisättiin 50 µl Alamar Blueta ja 450 µl mediumia. Samat määrät pipetoitiin myös kahteen tyhjään kuoppaan, jolloin saatiin blankit. Kuoppalevy oli jaettu kahteen osaan, joista toisiin kuoppiin pipetoitiin tässä vaiheessa pelkästään 450 µl mediumia. Myös kahteen tyhjään kuoppaan pipetoitiin vain medium. Välittömästi Alamar Bluen lisäämisen jälkeen mitattiin fluoresenssi ekstitaatioaallonpituudella 540 nm, emissioaallonpituudella 595 nm ja valomonistinputkenherkkyyden ollessa 60. Fluoresenssi mitattiin myös aikapisteissä 4, 24, 48, 72 tuntia altistuksen loppumisesta. Koska Alamar Blue on toksinen soluille, oli solujen elävyys heikentynyt ja jotta solujen proliferaatiota pystyttäisiin seuraamaan pidempään, lisättiin kolmen vuorokauden kuluttua altistuksesta 50 µl Alamar Blueta kuoppiin, joihin oli aiemmin pipetoitu vain mediumia. Tämän jälkeen fuoresenssi mitattiin uusista kuopista ja jatkossa myös aikapisteissä 76, 96, 120 ja 144 tuntia altistuksen loppumisesta. Proliferaatiomäärityksessä käytettiin kahta rinnakkaista näytettä.

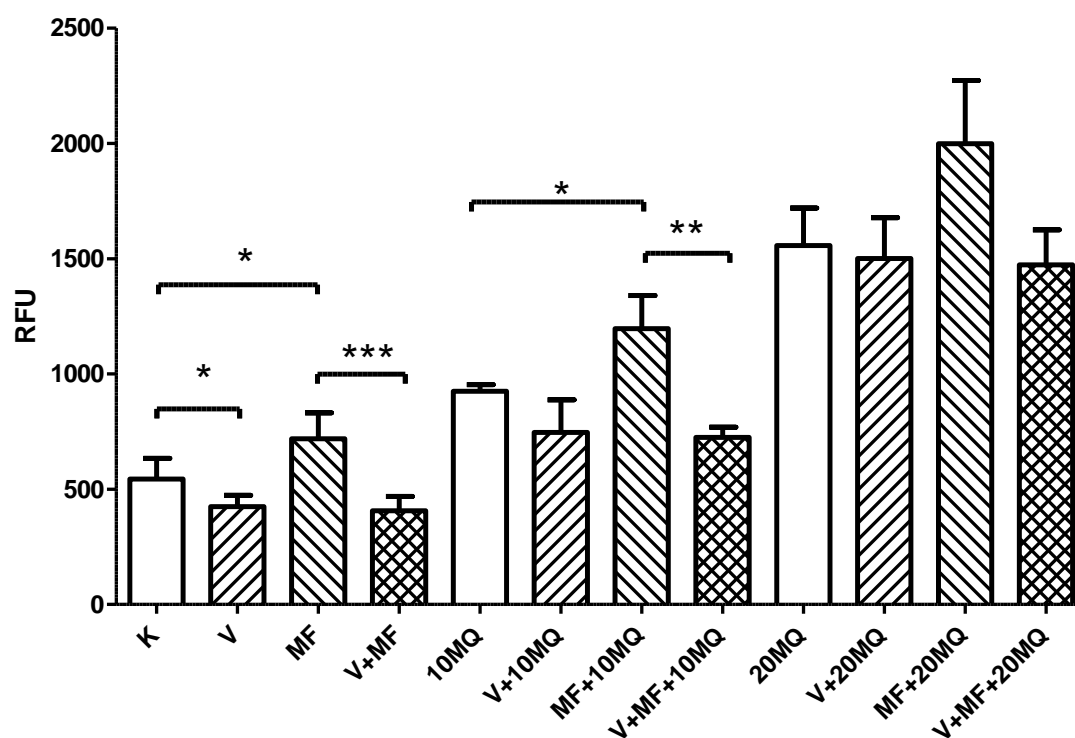
#### 4.5 TILASTOLLISET MENETELMÄT

Tulosten tilastollisen merkitsevyyden laskemiseen käytettiin lineaarista sekamalli-analyysiä, joka on laajennettu versio perinteisestä yksisuuntaisesta varianssianalyysistä (oneway ANOVA). Sekamalli-analyysissä on mahdollista käsitellä yhtäaikaisesti useita eri muuttujia ja toisistaan riippumattomia toistokertoja. Tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics ohjelman versiolla 19 ja tilastollisesti merkitseviksi katsottiin tulokset, joiden p-arvo oli  $< 0,05$ . Analyysissä yhdistettiin kunkin kokeen kaikki toistot ja aineisto jaettiin menadionipitoisuuden mukaan, minkä jälkeen ajettiin tilastolliset analyysit eri muuttujille. Lisäksi aineisto jaettiin myös magneettikenttäaltistuksen mukaan, jotta menadionin tilastolliset vaikutukset saatiin selville.

## 5. TULOKSET

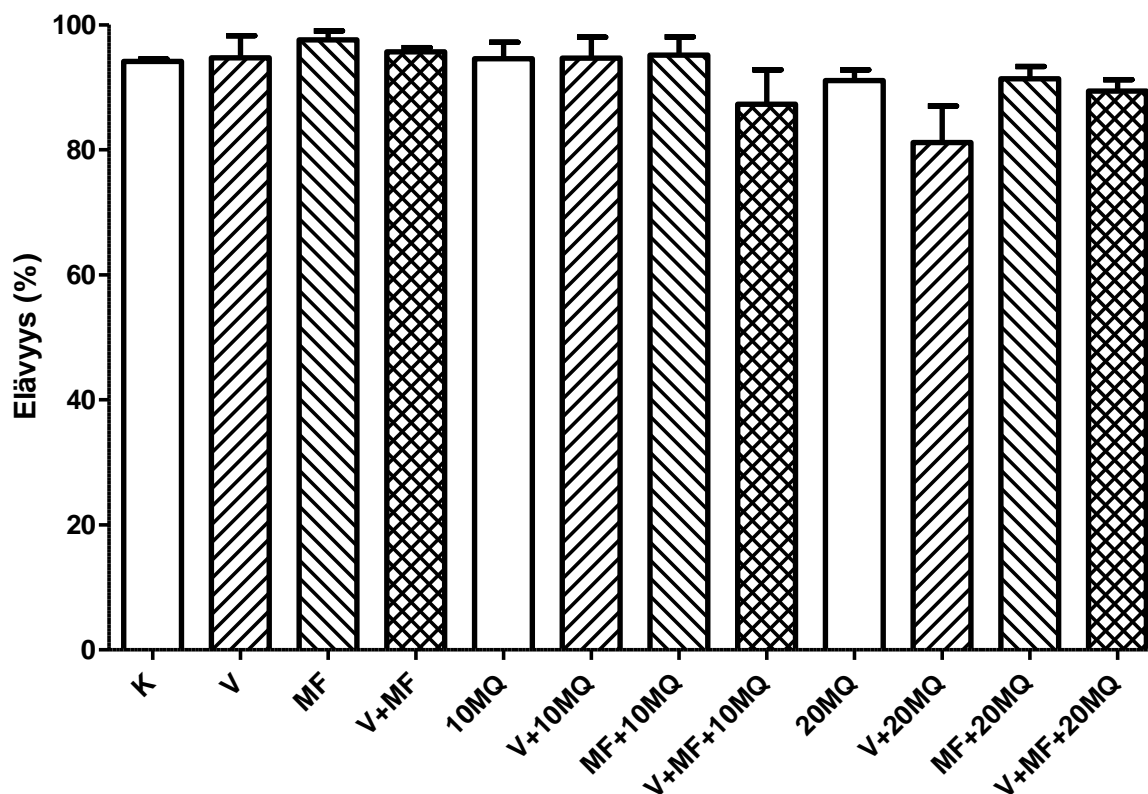
### 5.1 VÄLITTÖMÄT VAIKUTUKSET

Kuvassa 10. on esitetty solujen superoksidianionituotanto mitattuna välittömästi altistuksen jälkeen. Kuvasta nähdään, että menadioni lisää solujen superoksidianionituotantoa tilastollisesti merkitsevästi ja annos-vasteisesti (K vs. 10MQ  $p = 0,047$  ja 10MQ vs. 20MQ  $p = 0,020$ ). Magneettikenttäaltistus lisäsi tilastollisesti merkitsevästi superoksidianionituotantoa suhteessa kontrolliin ilman menadionialtistusta ( $p = 0,012$ ) sekä 10  $\mu\text{M}$  menadionin läsnä ollessa ( $p = 0,032$ ). Sininen valo vähensi hieman superoksidianionituotantoa verrattuna kontrolliin ( $p = 0,049$ ). Sininen valo inhiboi tilastollisesti merkitsevästi magneettikenttäaltistuksen aiheuttamaa superoksidianionituotantoa sekä ilman menadionialtistusta ( $p = 0,001$ ), että 10  $\mu\text{M}$  menadionin kanssa ( $p = 0,003$ ). Myös 20  $\mu\text{M}$  menadionin kanssa vaikutus on lähes tilastollisesti merkitsevä ( $p = 0,056$ ).



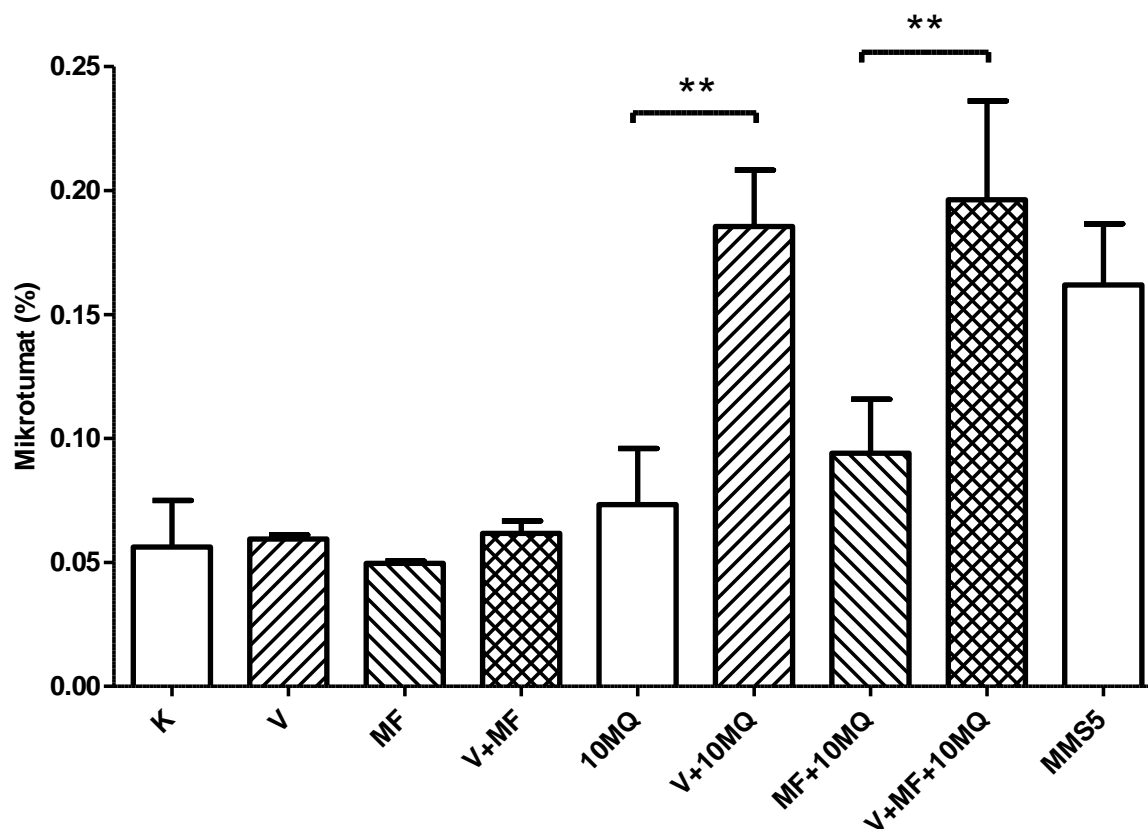
Kuva 10. Superoksidianionituotanto välittömästi altistuksen jälkeen. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä) ja 10/20 MQ (10 tai 20  $\mu\text{M}$  menadioni). Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty suhteellisina fluoresenssiyksikköinä (RFU),  $n = 3$ . (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Kuvassa 11. nähdään solujen elävyys välittömästi altistuksen jälkeen. Solujen elävyydessä ei ole tilastollisesti merkitseviä eroja ja solujen elävyydet ovat yli 80 % suuremmallakin menadionipitoisuudella. Käytettävän solulinjan solujen elävyys on tavallisesti noin 80–90 % kontrollinäytteissä.



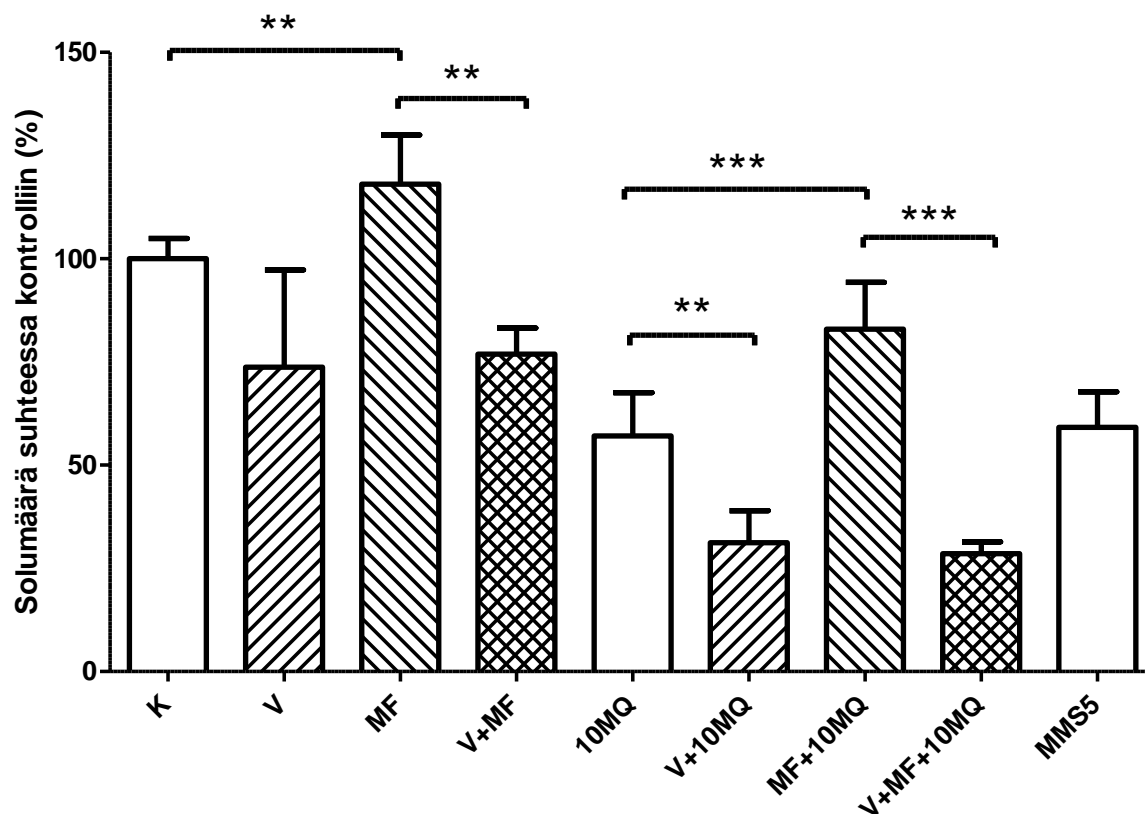
Kuva 11. Solujen elävyys välittömästi altistuksen jälkeen. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä) ja 10/20 MQ (10 tai 20  $\mu\text{M}$  menadioni). Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty prosentteina,  $n = 3$ .

Kuvassa 12. on mikrotumien määrä mitattuna 72 tuntia altistuksen jälkeen. Kuvasta nähdään, että sininen valo lisäsi tilastollisesti merkitsevästi mikrotumien määrää yhdessä menadionin kanssa ( $p = 0,002$ ). Mikrotumien määrä lisääntyy noin kaksinkertaiseksi sinisen valon vaikutuksesta myös yhdessä magneettikentän ja 10  $\mu\text{M}$  menadionin kanssa ( $p = 0,003$ ) verrattuna pelkkään magneettikenttä- ja menadionaltistukseen. Kuvasta havaitaan myös positiivisen kontrollin (MMS5) toimineen, koska se on lisännyt mikrotumien määrää yli kaksinkertaiseksi kontrolliin verrattuna.



Kuva 12. Mikrotumien määrä prosentteina 72 tuntia altistuksen jälkeen. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä), 10MQ (10  $\mu$ M menadioni) ja MMS5 (5  $\mu$ g/ml metyyylimetaanisulfonaatti). Esitetty keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM), n = 3. (\*\* p < 0,01)

Kuvassa 13. on esitetty suhteellinen solumäärä määritettynä 72 tuntia altistuksen päättymisestä. Kuvasta nähdään menadionin laskevan suhteellista solumäärää tilastollisesti merkitsevästi ( $p < 0,001$ ). Magneettikenttä lisää tilastollisesti merkitsevästi suhteellista solumäärää noin 30 % verrattuna kontrolliin ilman menadionia ( $p = 0,009$ ), sekä menadionin kanssa ( $p < 0,001$ ). Sininen valo yhdessä magneettikentän kanssa laskee suhteellista solumäärää tilastollisesti merkitsevästi verrattuna pelkkään magneettikenttäaltistukseen ( $p = 0,002$ ). Myös pelkän valon vaikutus verrattuna kontrolliin on lähes tilastollisesti merkitsevä ( $p = 0,056$ ). Sininen valo laskee suhteellista solumäärää tilastollisesti merkitsevästi menadionin läsnä ollessa sekä ilman magneettikenttää ( $p = 0,003$ ), että magneettikentän kanssa ( $p < 0,001$ ). Kuvasta havaitaan myös positiivisen kontrollin (MMS5) toimineen, sillä se on laskenut suhteellista solumäärää verrattuna kontrolliin.

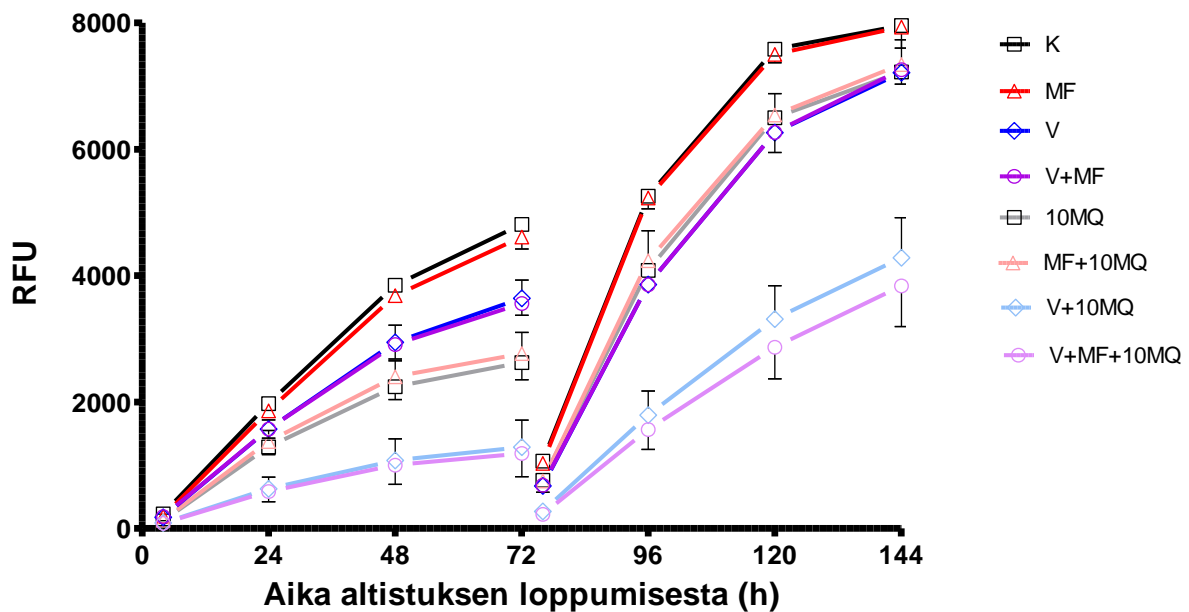


Kuva 13. Suhteellinen solumäärä prosentteina 72 tuntia altistuksen jälkeen. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä), 10MQ (10  $\mu$ M menadioni) ja MMS5 (5  $\mu$ g/ml metyyliimetaanisulfonaatti). Esitetty keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM),  $n = 3$ . (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Kuvassa 14. on solujen proliferaatio altistuksen jälkeen määritettynä Alamar Blue -menetelmällä. Fluoresenssi mitattiin aikapisteissä 4, 24, 48 ja 72 tuntia altistuksen loppumisesta. Kuvasta nähdään sinisen valon proliferaatiota tilastollisesti merkitsevästi hidastava vaikutus verrattuna kontrolliin ilman menadionia ( $p < 0,001$ ) ja menadionin kanssa ( $p = 0,002$ ). Sininen valo hidastaa tilastollisesti merkitsevästi proliferaatioita myös yhdessä magneettikentän kanssa ( $p = 0,001$ ) ja yhdessä menadionin ja magneettikentän kanssa ( $p < 0,001$ ).

Alamar Blueta lisättiin uusiin kuoppiin 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Tämän jälkeen fluoresenssi mitattiin uusista kuopista aikapisteissä 76, 96, 120 ja 144 tuntia altistuksen loppumisesta. Kuvasta nähdään sinisen valon proliferaatiota tilastollisesti merkitsevästi hidastava vaikutus verrattuna kontrolliin ilman menadionia ( $p < 0,001$ ) ja menadionin kanssa ( $p < 0,001$ ). Sininen valo hidastaa tilastollisesti merkitsevästi proliferaatioita myös yhdessä magneettikentän kanssa ( $p < 0,001$ ) ja yhdessä menadionin ja magneettikentän kanssa ( $p < 0,001$ ).

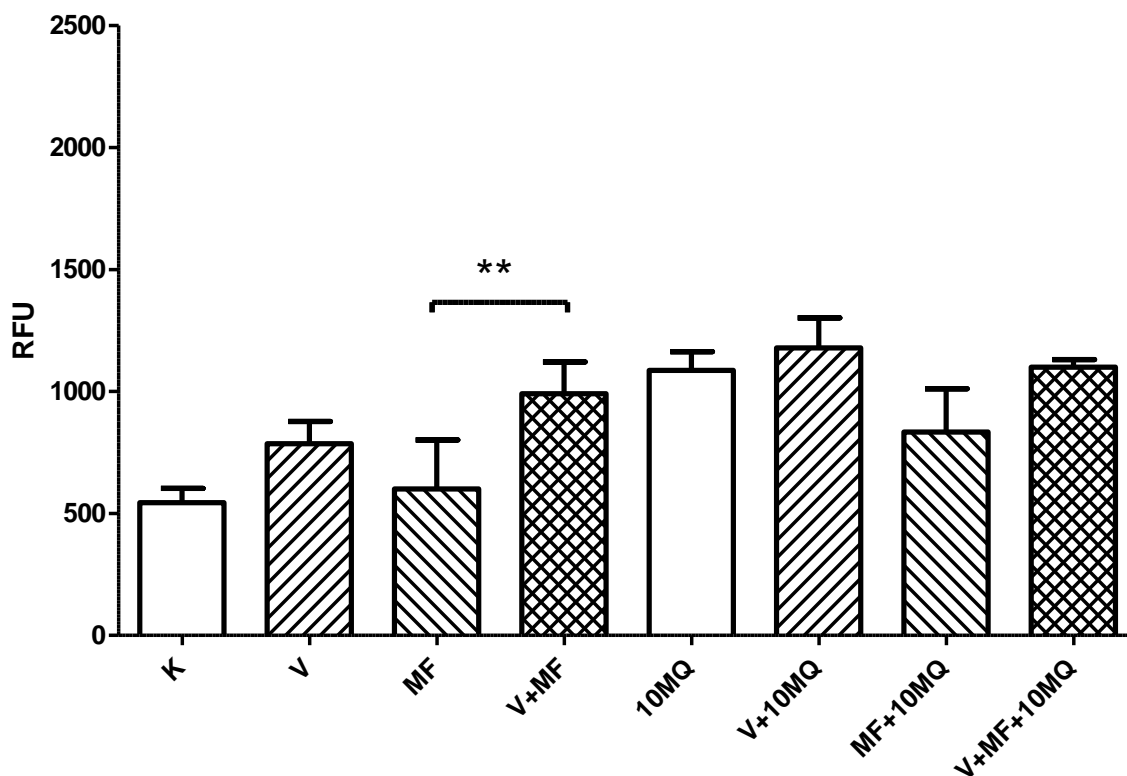
Menadioni hidastaa proliferaatiota tilastollisesti merkitsevästi ( $p < 0,001$ ) ja vaikutus on suurimmillaan sinisen valon läsnä ollessa. Määritykset tehtiin myös  $20 \mu\text{M}$  menadionilla, mutta solujen elävyys osoittautui liian alhaiseksi, jotta määrittäminen olisi ollut luotettava. Mikroskooppilla soluja tarkasteltaessa oli solujen elävyys heikentynyt valolle altistuneissa kuopissa, mikä osittain selittää eroa tuloksissa.



Kuva 14. Solujen proliferaatio altistuksen jälkeen mitattuna eri aikapisteissä. 72 tunnin jälkeen Alamar Blueta lisättiin uusiin kuoppiin, minkä jälkeen määritykset on tehty uusista kuopista. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä) ja 10MQ (10  $\mu\text{M}$  menadioni). Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty suhteellisina fluoresenssiyksikköinä (RFU),  $n = 2$ .

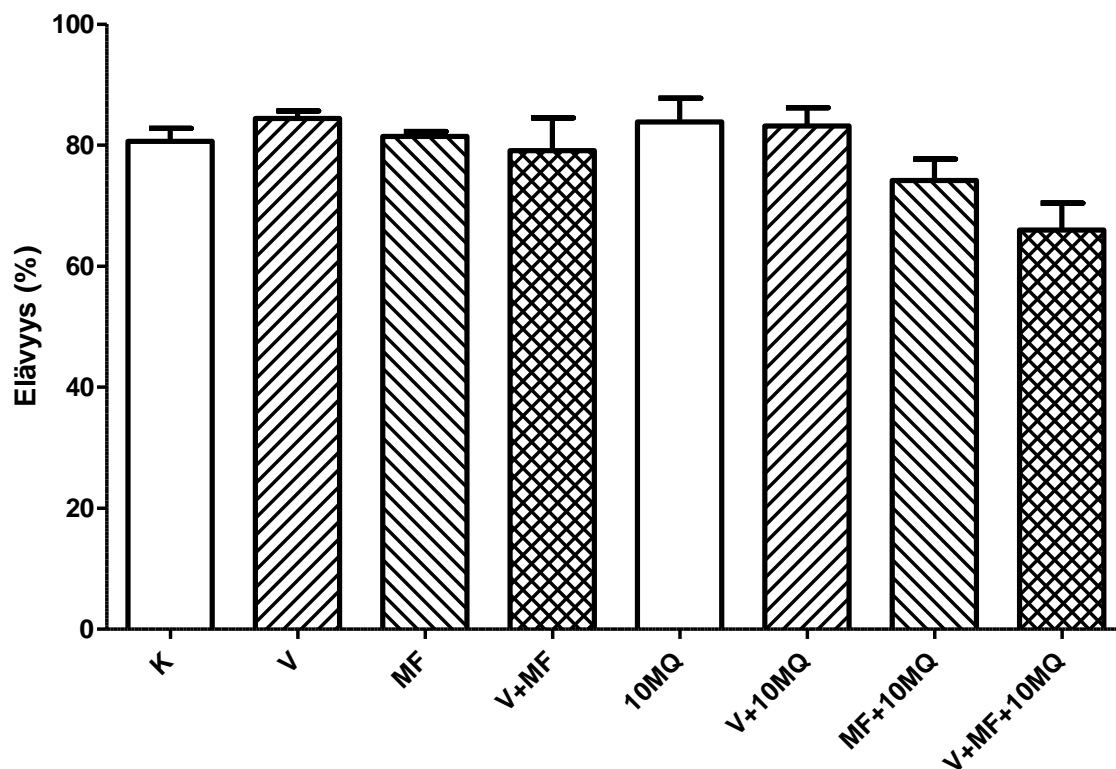
## 5.2 VIIVÄSTYNEET VAIKUTUKSET

Kuvassa 15. on esitetty solujen superoksidianionituotanto mitattuna 8 vuorokautta altistuksen päättymisen jälkeen. Kuvasta nähdään, että menadioni lisää tilastollisesti merkitsevästi solujen superoksidianionituotantoa noin kaksinkertaiseksi kontrolliin nähden ( $p = 0,010$ ). Sininen valo lisää superoksidianionien määrää lähes tilastollisesti merkitsevästi suhteessa kontrolliin ( $p = 0,057$ ) ja tilastollisesti merkitsevästi yhdessä magneettikentän kanssa verrattuna pelkkään magneettikenttäaltistukseen ( $p = 0,006$ ).



Kuva 14. Superoksidianionituotanto 8 vuorokauden kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä) ja 10MQ (10  $\mu$ M menadioni). Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty suhteellisina fluoresenssiyksikköinä (RFU), n = 3 - 4. (\*\* p < 0,01)

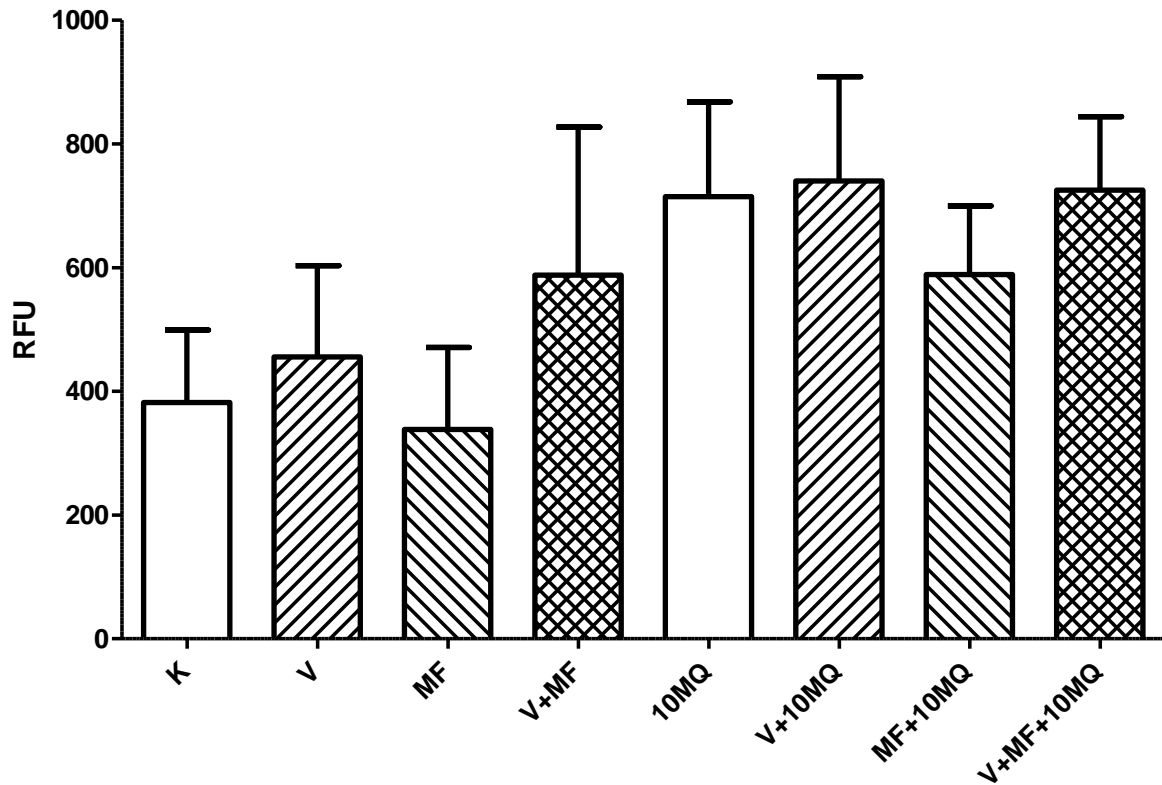
Solujen elävyys 8 vuorokautta altistuksen päättymisen jälkeen nähdään kuvasta 16. Solujen elävyydet ovat laskeneet noin 80 % tasolle kauttaaltaan. Ainoastaan menadionille ja magneettikentälle, sekä menadionille, magneettikentälle ja siniselle valolle altistuneiden solujen elävyys on hieman alhaisempi, mutta solujen elävyydessä ei ole tilastollisesti merkitseviä eroja.



Kuva 16. Solujen elävyys 8 vuorokauden kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä) ja 10MQ (10  $\mu$ M menadioni). Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty prosentteina, n = 3 - 4.

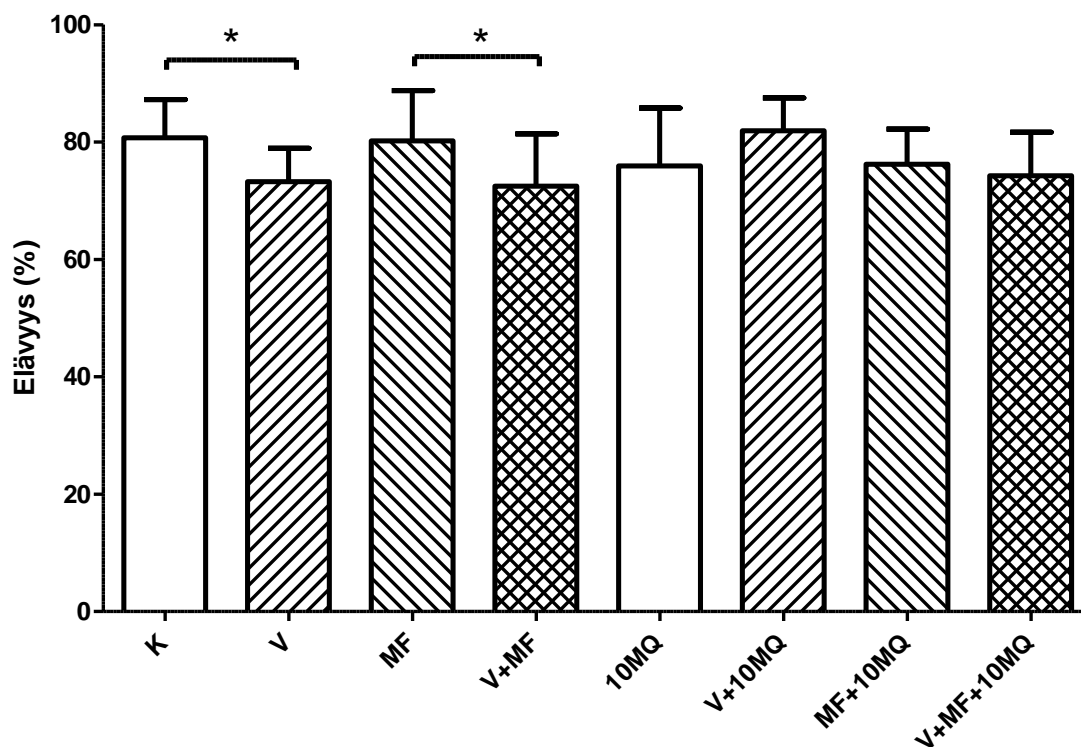
Kuvassa 17. on esitetty solujen superoksidianionituotanto mitattuna 15 vuorokautta altistuksen päättymisen jälkeen. Kuvasta nähdään, että menadioni lisää edelleen tilastollisesti merkitsevästi solujen superoksidianionituotantoa ( $p < 0,001$ ). Sininen valo lisää superoksidianionien määrää lähes tilastollisesti merkitsevästi yhdessä magneettikentän kanssa verrattuna pelkkään magneettikenttäaltistukseen ( $p = 0,066$ ). Kauttaaltaan superoksidianionien määrä on kuitenkin selvästi alhaisempi kuin välittömästi altistuksen jälkeen tai 8 vuorokauden kuluttua altistuksesta.





Kuva 17. Superoksidianionituotanto 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä) ja 10MQ (10  $\mu$ M menadioni). Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty suhteellisina fluoresenssiyksikköinä (RFU),  $n = 3$ .

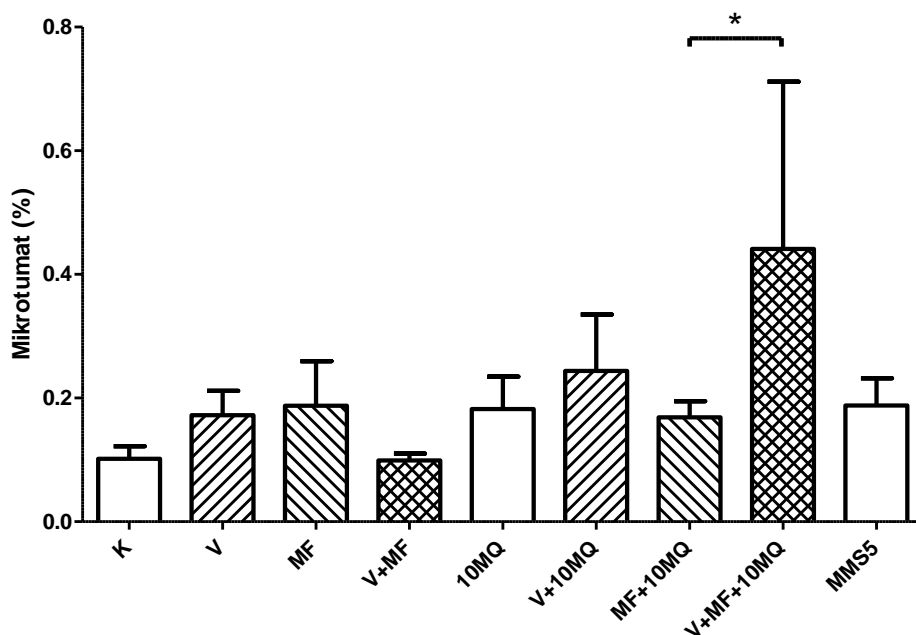
Solujen elävyys 15 vuorokautta altistuksen päättymisen jälkeen on esitetty kuvassa 18. Sininen valo laskee tilastollisesti merkitsevästi solujen elävyyttä suhteessa kontrolliin ( $p = 0,034$ ) ja yhdessä magneettikentän kanssa verrattuna pelkkään magneettikenttäaltistukseen ( $p = 0,030$ ). Solujen elävyydessä ei kuitenkaan ole suuria eroja, vaan elävyys on edelleen noin 80 %.



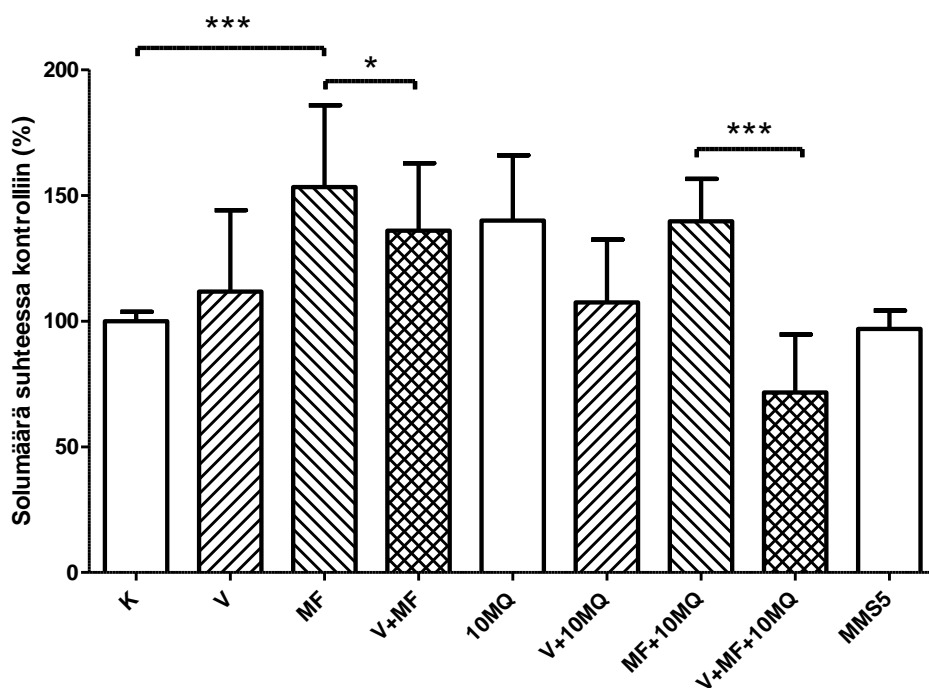
Kuva 18. Solujen elävyys 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä) ja 10MQ (10  $\mu$ M menadioni). Lasketut keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM) on esitetty prosentteina,  $n = 3$ . (\*  $p < 0,05$ )

Kuvassa 19. on esitetty mikrotumien määrä mitattuna 8 vuorokauden ja 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Menadioni lisää tilastollisesti merkitsevästi mikrotumien määrää ( $p = 0,020$ ) Kuvasta nähdään, että sininen valo lisää mikrotumien määrää yli kaksinkertaiseksi yhdessä menadionin ja magneettikentän kanssa verrattuna pelkkään menadioni- ja magneettikenttälaitukseen ( $p = 0,035$ ). Sinisen valon ja magneettikentän yhteisvaikutuksesta mikrotumien määrä on tilastollisesti lähes merkitsevästi pienempi kuin pelkän sinisen valon mikrotumat ( $p = 0,059$ ).

Suhteellinen solumäärä 8 vuorokauden ja 72 tunnin kuluttua altistuksesta nähdään kuvassa 20. Kuvasta havaitaan magneettikentän lisäävän suhteellista solumäärää noin 50 % kontrolliin nähden ( $p < 0,001$ ). Sininen valo yhdessä magneettikentän kanssa laskee suhteellista solumäärää tilastollisesti merkitsevästi verrattuna pelkkään magneettikenttälaitukseen ( $p = 0,017$ ). Sinisen valon suhteellista solumäärää laskeva vaikutus havaitaan myös yhdessä magneettikentän ja menadionin kanssa ( $p < 0,001$ ).

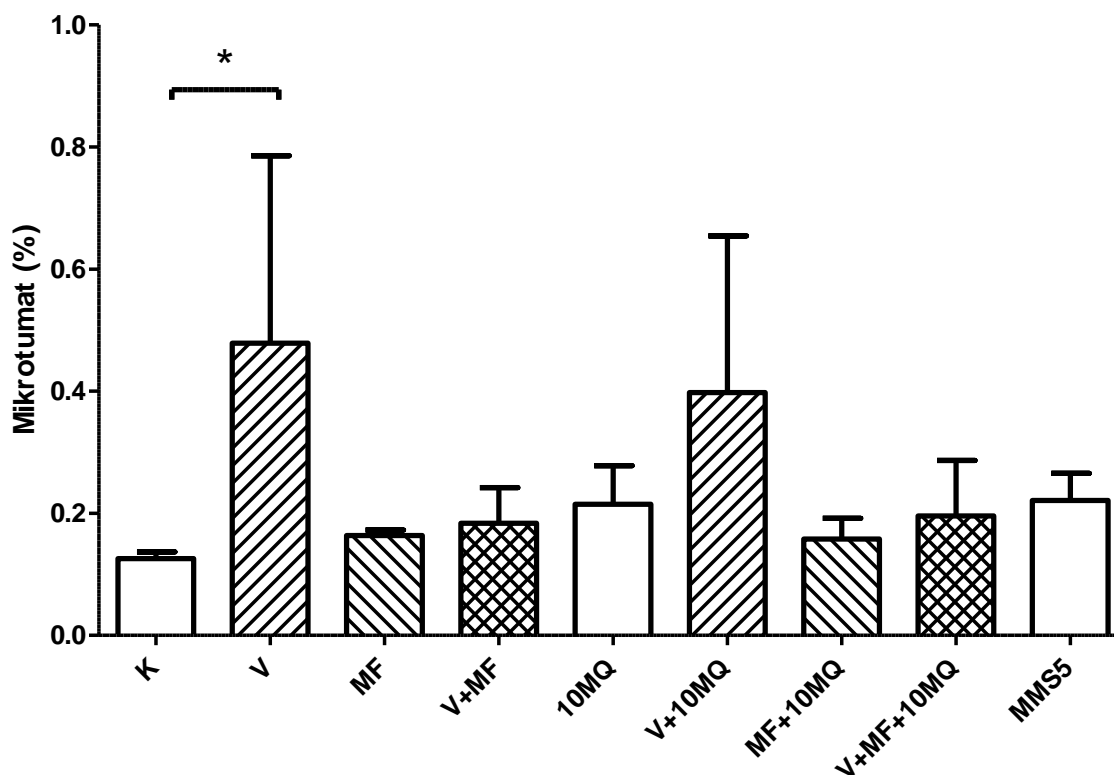


Kuva 19. Mikrotumien määrä prosentteina 8 vuorokauden + 72 tunnin kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä), 10MQ (10  $\mu$ M menadioni) ja MMS5 (5  $\mu$ g/ml metyylimetaanisulfonaatti). Esitetty keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM), n = 4-5. (\* p < 0,05)



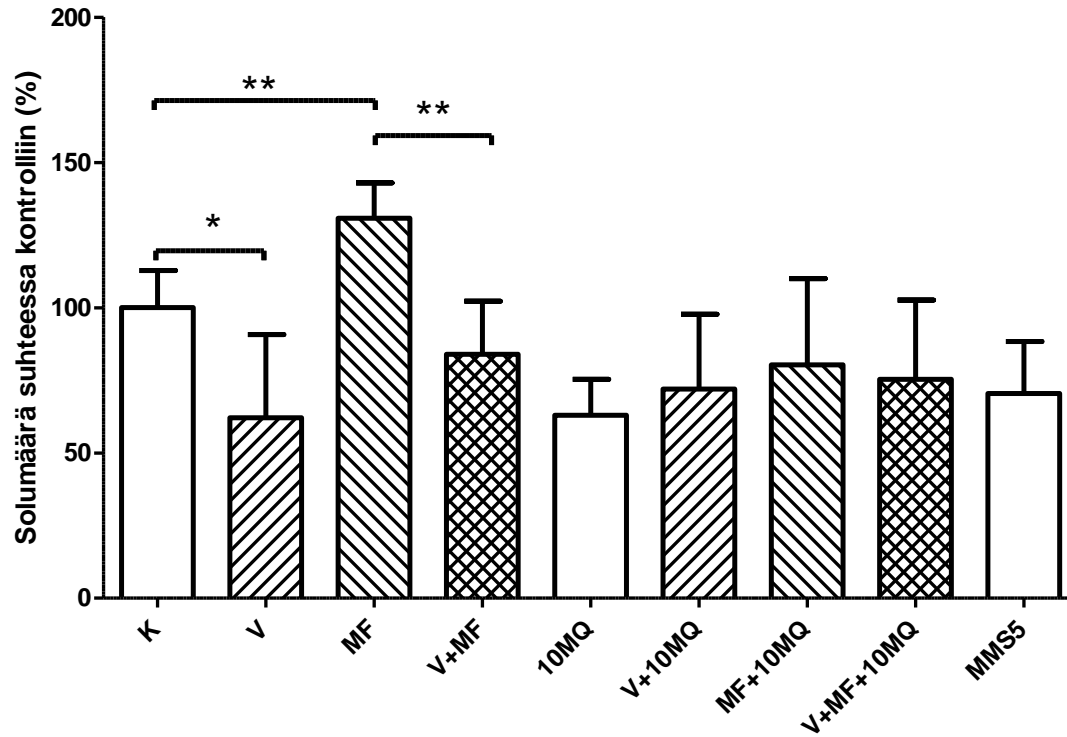
Kuva 20. Suhteellinen solunäärä prosentteina 8 vuorokauden + 72 tunnin kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä), 10MQ (10  $\mu$ M menadioni) ja MMS5 (5  $\mu$ g/ml metyylimetaanisulfonaatti). Esitetty keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM), n = 4 - 5. (\* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001)

Kuvassa 21. on mikrotumien määrä mitattuna 15 vuorokauden ja 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Kuvasta nähdään, että sininen valo lisää tilastollisesti merkitsevästi mikrotumien määrää verrattuna kontrolliin ( $p = 0,027$ ). Sinisen valon ja magneettikentän yhteisvaikutuksesta mikrotumien määrä on lähes tilastollisesti merkitsevästi pienempi kuin pelkän sinisen valon mikrotumien ( $p = 0,052$ )



Kuva 21. Mikrotumien määrä prosentteina 15 vuorokauden + 72 tunnin kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä), 10MQ (10  $\mu$ M menadioni) ja MMS5 (5  $\mu$ g/ml metyylimetaanisulfonaatti). Esitetty keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM),  $n = 3$ . (\*  $p < 0,05$ )

Kuvassa 22. nähdään suhteellinen solumäärä 15 vuorokauden ja 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Menadioni laskee suhteellista solumäärää tilastollisesti merkitsevästi ( $p = 0,004$ ). Kuvasta nähdään sinisen valon laskevan solujen elävyyttä verrattuna kontrolliin ( $p = 0,023$ ). Sinisen valon elävyyttä laskeva vaikutus havaitaan myös yhdessä magneettikentän kanssa verrattuna pelkkään magneettikenttäaltistukseen ( $p = 0,008$ ). Pelkkä magneettikenttäaltistus lisäsi tilastollisesti merkitsevästi solumäärää verrattuna kontrolliin ( $p = 0,005$ ).



Kuva 22. Suhteellinen solumäärä prosentteina 15 vuorokauden + 72 tunnin kuluttua altistuksesta. K (kontrolli), V (sininen valo), MF (magneettikenttä), 10MQ (10  $\mu$ M menadioni) ja MMS5 (5  $\mu$ g/ml metyylimetaanisulfonaatti). Esitetty keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe (SEM), n = 3. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)

## 6. TULOSTEN TARKASTELU

Tutkimuksessa havaittiin sinisellä valolla, hyvin pienitaajuisella magneettikentällä ja menadionilla välittömiä ja viivästyneitä biologisia vaikutuksia. Hyvin pienitaajuisen magneettikentän ja menadionin havaittiin lisäävän superoksidianionituotantoa välittömästi altistuksen jälkeen ja sinisen valon puolestaan vähentävän superoksidianionien määrää. Sinisen valon ja menadionin yhteisaltistus lisäsi mikrotumien määrää välittömästi altistuksen jälkeen määritetynä. Sinisen valon ja menadionin havaittiin hidastavan solujen proliferaatiota. Tutkimuksessa havaittiin sinisellä valolla ja menadionilla viivästyneitä vaikutuksia solujen superoksidianionituotantoon sekä mikrotumien määrään. Lisäksi kaikilla altisteilla havaittiin vaikutuksia suhteelliseen solumäärään kaikissa aikapisteissä. Solujen elävyydessä ei tutkimuksessa havaittu merkittäviä muutoksia ja solujen elävyys oli melko hyvä koko tutkimuksen ajan.

Välittömissä vaikutuksissa havaittu magneettikentän superoksidianionituotantoa lisäävä vaikutus etenkin yhdessä menadionin kanssa on samankaltainen kuin aiemmissakin tutkimuksissa (Luukkonen 2011, Mannerling ym. 2010). Mannerlingin ym. (2010) tutkimuksessa altistusaika magneettikentälle oli vain 1 tunti, kun tässä tutkimuksessa altistuksen kesto oli 24 tuntia. Kuitenkin tulokset ovat hyvin samankaltaisia, joten ehkä vaikutuksia superoksidianionituotantoon olisi havaittavissa jo lyhemmilläkin altistuksilla. Myös pelkkä menadioni lisäsi ennakoidusti solujen superoksidianionituotantoa. Sininen valo laski hieman superoksidianionituotantoa, minkä lisäksi se inhiboi magneettikentän aikaansaamaa superoksidianionituotantoa. Tämä tulos on toisensuuntainen kuin aiemmat tutkimustulokset (Lewis ym. 2004, King ym. 2004, Omata ym. 2006, Roehlecke ym. 2009) ja myös esikokeissa sinisen valon vaikutus oli toisensuuntainen. Aiemmissa tutkimuksissa altistusajat siniselle valolle ovat olleet huomattavasti lyhyempiä kuin tässä tutkimuksessa, Lewis ym. (2004) 10 s tai 2 min, Omata ym. (2006) 10–240 s, sekä King ym. (2004) 1 min. Toisaalta Roehlecke ym. (2009) käyttivät tutkimuksessaan 3, 24 ja 72 tunnin altistusta siniselle valolle ja havaitsivat superoksidianionituotantoa lisäävän vaikutuksen ainoastaan 24 tunnin altistuksella. Roehlecke ym. (2009) käyttivät tutkimuksessaan  $1 \text{ mW/cm}^2$  ja  $0.3 \text{ mW/cm}^2$  irradiansseja, joista jälkimmäinen on hyvin lähellä tässä tutkimuksessa käytetyn sinisen lampun irradianssia. Menadionin havaittiin lisäävän solujen superoksidianionituotantoa tilastollisesti merkitsevästi vielä 8 ja 15 vuorokautta altistuksen jälkeenkin. Myös sinisen valon havaittiin lisäävän superoksidianionituotantoa vielä 8 ja 15 vuorokauden kuluttua.

Sinisen valon havaittiin vähentävän superoksidianionien määrää välittömästi altistuksen jälkeen, mutta myöhemmissä aikapisteissä sininen valo lisäsi superoksidianionituotantoa. Syytä tähän muutokseen ei tiedetä ja tulos onkin hieman ristiriidassa aiempien tutkimusten kanssa. Tämä tutkimus oli hyvin samankaltainen kuin Roehlecken ym. (2009) tutkimus, mutta tulokset ovat silti päinvastaiset superoksidianionituotannon osalta. Asiaa on kuitenkin tutkittu melko vähän ja esimerkiksi käytetyllä solulinjalla, valon lähteen etäisyydellä, tehokkuudella ja altistusajalla saattaa olla suuriakin vaikutuksia tuloksiin. Tutkimuksessa käytetty DHE-menetelmä mittasi sytosolisen superoksidianionituotannon määrää ja todennäköisesti superoksidianionituotanto tapahtuu pääosin mitokondrioissa. Roehlecke ym. (2009) ja King ym. (2004) ovatkin raportoineet sinisen valon vaikutuksista solunsisäiseen happiradikaalituotantoon ja mitokondrioihin. Lisää tietoa asiasta voisi saada tekemällä määrityksen menetelmällä, joka mittaa mitokondrionaalista superoksidianionituotantoa, mutta tämän tutkimuksen puitteissa siihen ei ollut mahdollisuutta.

Sinisen valon ja menadionin havaittiin hidastavan tilastollisesti merkitsevästi solujen proliferaatiota, mutta magneettikentällä ei havaittu proliferatiivisia vaikutuksia. Sinisen valon osalta tehdyt havainnot ovat samankaltaisia kuin Ohara ym. (2002) tulokset. Ohara ym. (2002) havaitsivat 20 min ja  $5.7 \text{ mW/cm}^2$  altistuksen siniselle valolle inhiboivan melanoomasolujen kasvua. Proliferaatiomäärityksen tuloksiin hieman epävarmuutta aiheuttaa käytetty menetelmä, sillä tutkimuksessa Alamar Blue osoittautui toksiseksi käytetylle solulinjalle. Altisteiden todellinen vaikutus ei välttämättä ole yhtä suuri kuin tuloksista vaikuttaisi, sillä mikroskoopilla tarkasteltuna osa soluista oli kuollut määrityksen aikana. Sinisellä valolla saattaakin olla solujen elävyyttä heikentävä vaikutus ja Seko ym. (2001) ovat todenneet sinisen valon lisäävän apoptoottista solukuolemaa 24 h ja  $2.7 \text{ mW/cm}^2$  altistuksella. Myös Sideris ym. (1981) havaitsivat sinisen valon lisäävän solujen kuolleisuutta.

Kolme vuorokautta altistuksen jälkeen määritettynä sininen valo yhdessä menadionin kanssa lisäsi tilastollisesti merkitsevästi mikrotumien määrää. Magneettikenttä ja menadioni eivät nostaneet mikrotumien määrää tilastollisesti merkitsevästi, mikä oli odotettua Luukkosen ym. (2011) tutkimuksen perusteella, jossa vaikutuksia oli havaittu vasta suuremmilla menadionipitoisuuksilla. Luukkonen ym. (2011) havaitsivat menadionin lisäävän mikrotumien määrää vasta  $20 \mu\text{M}$  annoksella, jolloin suhteellinen solumääräkin oli jo alle 30 %. Suhteellisessa solumäärässä havaittiin paljon muutoksia 3 vuorokauden kuluttua altistuksesta määritettynä.

Menadioni laski tilastollisesti merkitsevästi suhteellista solumäärää ja magneettikenttä vastavasti nosti sitä. Tulokset ovat samansuuntaisia kuin Luukkosella ym. (2011), joiden tutkimuksessa menadioni laski tilastollisesti merkitsevästi suhteellista solumäärää, sekä 50 Hz ja 100  $\mu$ T magneettikenttä nosti hieman suhteellista solumäärää verrattuna kontrolliin, vaikka tulokset eivät olleetkaan tilastollisesti merkitseviä. Sininen valo inhiboi tilastollisesti merkittävästi magneettikentän aiheuttamaa suhteellisen solumäärän nousua ja laski suhteellista solumäärää yhdessä menadionin kanssa. Kolmen vuorokauden kuluttua altistuksesta mikrotumien määrässä ja suhteellisessa solumäärässä havaitut muutokset heijastavat välittömästi altistuksen jälkeen nähtyjä eroja solujen superoksidianionituotannossa.

Sininen valo lisäsi mikrotumien määrää yhdessä menadionin kanssa 8 vuorokauden kuluttua altistuksesta ja yksinään vielä 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta. Menadioninkin havaittiin lisäävän mikrotumia tilastollisesti merkitsevästi 8 vuorokauden kuluttua altistuksesta ja vielä 15 vuorokauden kuluttuakin, mutta tällöin ero ei enää ollut tilastollisesti merkitsevä. Suhteellisessa solumäärässä havaittiin muutoksia kaikilla altisteilla eri aikapisteissä. Sinisen valon aiheuttamat mikrotumat 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta viittaisivat genomin epävakaisuuteen, sillä samaa vaikutusta ei havaittu välittömästi altistuksen jälkeen. Menadionin sekä valon ja menadionin yhteisaltistuksella havaitut mikrotumat ja superoksidianionituotannon lisäys vielä 8 ja 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta viittaavat pitkittyneeseen genotoksisuuteen.

Viivästyneiden vaikutusten havaitseminen tutkimuksessa viittaa siihen, että altistuminen siniselle valolle ja menadionille voisi aiheuttaa genomin epävakaisuutta. Hyvin pienitaajuisella magneettikentällä ei havaittu viivästyneitä vaikutuksia yksinään mutta yhdessä menadionin ja sinisen valon kanssa kylläkin. Tulokset näyttäisivätkin vahvistavan magneettikentän tunnettua roolia yhteisaltistuksissa (Juutilainen ym. 2006b). Mekanismia, josta tutkimuksessa havaitut vaikutukset johtuvat, ei saatu selville. Kuitenkin jokin signaali välittyy altistuneista soluista tytärsoluille, jotka eivät itse ole altistuneet, vielä 15 vuorokaudenkin kuluttua altistuksesta. Koska tutkimuksessa havaittiin sinisellä valollakin vaikutuksia, saattavat vaikutukset perustua kryptokromivälitteiseen radikaaliparimekanismiin.

Aiempaa tutkimustietoa viivästyneistä vaikutuksista ei ole saatavilla, joten lisää tutkimusta aiheesta tarvitaan tämän tutkimuksen tulosten varmentamiseksi ja altisteiden vaikutusmekanismien selvittämiseksi. Jatkossa tulisi käyttää spesifisempiä menetelmiä ja mitata altisteiden



vaikutuksia esimerkiksi suoraan kryptokromeista. Myös erilaisia altistusaikoja ja tasoja kannattaisi kokeilla, sillä tässä tutkimuksessa käytettiin vain 24 tunnin altistusta ja yhdenlaista sinisen valon lähdettä. Tutkimuksia voisi tehdä myös muilla solulinjoilla ja erilaisia yhteisalvistuksia kannattaisi testata, sillä magneettikentän vaikutukset näyttäisivät tulevan esiin yhdessä jonkin toisen altisteen kanssa. Solujen proliferaatiota tulisi määrittää jollakin muulla menetelmällä, koska Alamar Blue osoittautui toksiseksi käytetyllä solulinjalla. Sinisen valon vaikutuksia apoptoosiin kannattaisi myös selvittää.

## 6.1 VIRHELÄHTEET

Altistusjärjestelmässä oli tutkimuksen aikana ongelmia, kun sinisen lampun kiinnitys oli heikohko ja lampun asento pääsi välillä vaihtumaan, mikä vaikutti lampun etäisyyteen altistettavista soluista. Tällä saattaa olla merkitystä tuloksiin, sillä valon irradianssi pienenee etäisyyden kasvaessa. Valo- ja magneettikenttäaltistukseen tuli myös hetkellinen tauko, kun menadionin lisäys tapahtui laminaarikaapissa. Tälläkin saattaa olla vaikutusta tuloksiin, vaikka katkos oli hyvin lyhyt verrattuna koko altistusaikaan ja menadionin lisäys pyrittiin tekemään pimeässä. Kaikki maljat/kuoppalevyt käsiteltiin samalla tavalla, joten tulokset ovat kuitenkin aina keskenään vertailukelpoisia.

Osassa kokeista jouduttiin vastoinkäymisten takia tyytymään vähempään määrään rinnakkaisia näytteitä kuin oli tarkoitus. Etenkin mikrotuma-analyyseissä oli ongelmia ja joissakin toistoissa oli vain yksi rinnakkainen/näyte. Tällä saattaa olla vaikutusta tulosten luotettavuuteen ja tuloksissa hajonta onkin paikoitellen melko suurta mikrotuma-analyysien kohdalla. Sinisen valon proliferaatiota hidastava vaikutus ei välttämättä ole niin suuri kuin tuloksista voisi päätellä, vaan osa tuloksesta johtunee siitä, että solujen elävyys oli heikentynyt Alamar Bluen toksisuudesta johtuen.

Yksi mahdollinen virhelähde on tutkimuksen tekijän kokemattomuus laboratoriotyöskentelystä ja käytetyistä menetelmistä. Soluviljely on tarkkaa työtä ja käytetyt kemikaali ja liuosmäärät välillä hyvin pieniä, joten pienikin virhe työskentelyssä voi näkyä tuloksissa. Kokonaisuudessaan tutkimukset sujuivat kuitenkin hyvin ja tuloksia voidaan pitää melko luotettavina. Tuloksien luotettavuutta lisää se, että koko tutkimuksen ajan solujen elävyys pysyi hyvänä. Mahdollisten virheiden määrää pystyisi vähentämään lisäämällä toistojen määrää, mutta sii-

hen ei tässä tutkimuksessa ollut mahdollisuutta, johtuen rajallisista resursseista ja viivästyneiden vaikutusten määrittämiseen kuluvasta pitkähköstä ajasta.

## 7. YHTEENVETO

Tutkimuksessa havaittiin sinisellä valolla, hyvin pienitaajuisella magneettikentällä ja menadionilla välittömiä ja viivästyneitä biologisia vaikutuksia ihmisen neuroblastoomasoluissa. Välittömät vaikutukset ovat samansuuntaisia kuin aiemmin raportoiduissa tutkimuksissa lukuun ottamatta sinisen valon superoksidianionituotantoa laskevaa vaikutusta, joka on päinvastainen havainto kuin aiemmissa tutkimuksissa. Viivästyneet vaikutukset ovat uutta tutkimustietoa ja biologisten vaikutusten havaitseminen siniselle valolle ja menadionille altistetuissa soluissa vielä 8 ja 15 vuorokauden kuluttua altistuksesta viittaisi pitkittyneeseen genotoksiinisuuteen. Pelkällä sinisellä valolla tai menadionilla tehdyt havainnot viivästyneistä vaikutuksista tarkoittavat sitä, että jokin signaali soluissa välittyy uusille tytärsoluille, koska vaikutukset havaittiin vasta monta solusukupolvea myöhemmin sellaisissa soluissa, jotka eivät itse olleet altistuneet. Tämä taas viittaa siihen, että sininen valo ja menadioni voisivat aiheuttaa genomien epävakaisuutta. Tämän tutkimuksen perusteella ei voida sanoa mistä tämä vaikutus johtuu, vaan lisää tutkimusta aiheesta tarvitaan. Mahdollinen vaikutusmekanismi saattaa olla kryptokromeissa tapahtuvat radikaaliparireaktiot, johon sinisellä valolla havaitut biologiset vaikutukset viittaisivat.

## LÄHDELUETTELO

- Abramsson-Zetterberg L ja Grawé J 2001 “Extended exposure of adult and fetal mice to 50 Hz magnetic field does not increase the incidence of micronuclei in erythrocytes” *Bioelectromagnetics* 22: 351-357
- Adamskaya N., Dungal P., Mittermayr R., Hartinger J., Feichtinger G., Wassermann K., Redl H. ja van Griensven M. 2011 “Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats” *Injury, International Journal of the Care of the Injured* 42: 917–921
- Ahlbom A., Day N., Feychting M., Roman E., Skinner J., Dockerty J., Linet M., McBride M., Michaelis J., Olsen J-H., Tynes T. ja Verkasalo P-K. 2000 “A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia” *British Journal of Cancer* 83: 692–698
- Ahmad M., Galland P., Ritz T., Wiltschko R. ja Wiltschko W. 2007 “Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*” *Planta* 225: 615-624
- Alferez F., Liao H-L. ja Burns J. K. 2012 “Blue light alters infection by *Penicillium digitatum* in tangerines” *Postharvest Biology and Technology* 63: 11–15
- Bennett S., Alpert M., Kubulins V. ja Hansler R. L. 2009 “Use of modified spectacles and light bulbs to block blue light at night may prevent postpartum depression” *Medical Hypotheses* 73: 251–253
- Biskup T., Schleicher E. Okafuji A., Link G., Hitomi K., Getzoff E. D. ja Weber S. 2009 “Direct observation of a photoinduced radical pair in a cryptochrome blue-light photoreceptor” *Angewandte Chemie International Edition* 48: 404–407
- Brocklehurst B. ja McLauchlan K. A. 1996 “Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems” *International Journal of Radiation Biology* 69: 3-24
- Brunelle S. A., Hazard E. S., Sotka E. E. ja Van Dolah F. M. 2007 “Characterization of a dinoflagellate cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle” *Journal of Phycology* 43: 509–518
- Bryce S. M., Bemis J. C., Avlasevich S. L. ja Dertinger S. D. 2007 “*In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity” *Mutation Research* 630: 78–91
- Burdak-Rothkamm S., Rothkamm K., Folkard M., Patel G., Hone P., Lloyd D., Ainsbury L. ja Prise K. M. 2009 “DNA and chromosomal damage in response to intermittent extremely low-frequency magnetic fields” *Mutation Research* 672: 82–89
- Cashmore A. R., Jarillo J. A., Wu Y-J. ja Liu D. 1999 “Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals” *Science* 284: 760-765
- Chaves I., Pokorny R., Byrdin M., Hoang N., Ritz T., Brettel K., Essen L-O., van der Horst G. T. J., Batschauer A. ja Ahmad M. 2011 “The cryptochromes: Blue light photoreceptors in plants and animals” *Annual Review of Plant Physiology* 62: 335–64

Christensen T., Reitan J. B., Kinn G. 1990 "Single-strand breaks in the DNA of human cells exposed to visible light from phototherapy lamps in the presence and absence of bilirubin" *Journal of Photochemistry and Photobiology B (2-4)*: 337-346

Cho Y. H. ja Chung H. W. 2003 "The effect of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) on the frequency of micronuclei and sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by benzo(a)pyrene" *Toxicology Letters* 143: 37-44

Cho Y. H., Jeon H. K. ja Chung H. W. 2007 "Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on delayed chromosomal instability induced by bleomycin in normal human fibroblast cells" *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70: 1252–1258

Choi Y. M., Jeong J. H., Kim J. S., Lee B-C., Je H. D. ja Sohn H. D. 2003 "Extremely low frequency magnetic field exposure modulates the diurnal rhythm of the pain threshold in mice" *Bioelectromagnetics* 24: 206-210

Del Seppia C., Ghione S., Luschi P., Ossenkopp K-P., Choleris E. ja Kavaliers M. 2007 "Review: Pain perception and electromagnetic fields" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31: 619–642

Diego-Rasilla F. J., Luengo M. R. ja Phillips J. B. 2010 "Light-dependent magnetic compass in Iberian green frog tadpoles" *Naturwissenschaften* 97: 1077–1088

Dominici L., Villarini M., Fatigoni., Monarca S. ja Moretti M. 2011 "Genotoxic hazard evaluation in welders occupationally exposed to extremely low-frequency magnetic fields (ELF-MF)" *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215: 68– 75

Fatigoni C., Dominici L., Moretti M., Villarini M. ja Monarca S. 2005 "Genotoxic Effects of extremely low frequency (ELF) magnetic fields (MF) evaluated by the *Tradescantia*-micronucleus assay" *Environmental Toxicology* 20: 585–591

Foley L. E., Gegear R. J. ja Reppert S. M. 2011 "Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity" *Nature Communications* 2:356 doi: 10.1038/ncomms1364

Harris S-R., Henbest K. B., Maeda K., Pannell J. R., Timmel C. R., Hore P. J. ja Okamoto H. 2009 "Effect of magnetic fields on cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*" *Journal of the Royal Society Interface* 6: 1193 –1205

Heyers D, Manns M, Luksch H, Güntürkün O, Mouritsen H 2007 "A visual pathway links brain structures active during magnetic Compass orientation in migratory birds" *PLoS ONE* 2(9): e937. doi:10.1371/journal.pone.0000937

IARC (International Agency for Research on Cancer) 2002 "Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields" 80: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon

Jokela K. 2006 Säteily- ja ydinturvallisuus -kirjasarja, osa 6 Sähkömagneettiset kentät, luku 1 Ionisoimaton säteily ja sähkömagneettiset kentät. Säteilyturvakeskus: Hämeenlinna

Juutilainen J ja Kumlin T 2006 "Occupational magnetic field exposure and melatonin: Interaction with light-at-night" *Bioelectromagnetics* 27: 423-426

Juutilainen J., Naarala J., Verkasalo P., Kumlin T., Huuskonen H. ja Kuustonen J. 2006a Säteily- ja ydinturvallisuus -kirjasarja, osa 6 Sähkömagneettiset kentät, luku 5 Hyvin pienitajuisten kenttien vaikutuksia. Säteilyturvakeskus: Hämeenlinna

Juutilainen J., Kumlin T. ja Naarala J. 2006b "Do extremely low frequency magnetic fields enhance the effects of environmental carcinogens? A meta-analysis of experimental studies" *International Journal of Radiation Biology* 82: 1-12

Kastan M. B. ja Bartek J. 2004 "Cell-cycle checkpoints and cancer" *Nature* 432: 316-323

King A., Gottlieb E., Brooks D. G., Murphy M. P. ja Dunaief J. L. 2004 "Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells" *Photochemistry and Photobiology* 79: 470-475

Lang S. ja Jokela K. 2006 Säteily- ja ydinturvallisuus -kirjasarja, osa 6 Sähkömagneettiset kentät, luku 4 Biofysikaaliset vaikutukset. Säteilyturvakeskus: Hämeenlinna

Lewis J. B., Wataha J. C., Messer R. L. W., Caughman G. B., Yamamoto T. ja Hsu S. D. 2004 "Blue light differentially alters cellular redox properties" *Journal of Biomedical Materials Research* 72B: 223-229

Liedvogel M. ja Mouritsen H. 2010 "Cryptochromes - a potential magnetoreceptor: what do we know and what do we want to know?" *Journal of the Royal Society Interface* 7: 147-162

Lohmann K. J. 2010 "Magnetic-field perception" *Nature* 464: 1140-1142

Luukkonen J. 2011 Dissertations in forestry and natural sciences: Insights into cancer-related effects of electromagnetic fields. Itä-Suomen yliopisto, ympäristötieteen laitos: Kuopio

Luukkonen J., Liimatainen A., Höytö A., Juutilainen J. ja Naarala J. 2011 "Pre-Exposure to 50 Hz Magnetic Fields Modifies Menadione-Induced Genotoxic Effects in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells" *PLoS ONE* 6(3): e18021. doi: 10.1371/journal.pone.0018021

Maeda K., Robinson A. J., Henbest K. B., Hogben H. J., Biskup T., Ahmad M., Schleicher E., Weber S., Timmel C. R. ja Hore P. J. 2012 "Magnetically sensitive light-induced reactions in cryptochrome are consistent with its proposed role as a magnetoreceptor" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 4774-4779

Mannerling A-C., Simkó M., Mild K. H. ja Mattsson M-O. 2010 "Effects of 50-Hz magnetic field exposure on superoxide radical anion formation and HSP70 induction in human K562 cells" *Radiation and Environmental Biophysics* 49: 731-741

Markkanen A., Juutilainen J. ja Naarala J. 2008 "Pre-exposure to 50 Hz magnetic fields modifies menadione-induced DNA damage response in murine L929 cells" *International Journal of Radiation Biology* 84: 742-751

Mustonen R., Salomaa S. ja Kiuru A. 2002 Säteily- ja ydinturvallisuus -kirjasarja, osa 4 Säteilyn terveysvaikutukset, luku 5 Säteily ja syövän synty. Säteilyturvakeskus: Hämeenlinna

Nishimura T., Okano H., Tada H., Nishimura E., Sugimoto K., Mohri K. ja Fukushima M. 2010 "Lizards respond to an extremely low-frequency electromagnetic field" *The Journal of Experimental Biology* 213: 1985-1990

Ohara M., Kawashima Y., Katoh O. ja Watanabe H. 2002 "Blue light inhibits the growth of B16 melanoma cells" *Japanese Journal of Cancer Research* 93: 551-558

Ohara M., Kawashima Y., Kitajima S., Mitsuoka C. ja Watanabe H. 2003 "Blue light inhibits the growth of skin tumors in the v-Ha-ras transgenic mouse" *Cancer Science* 94: 205-209

Olsson G., Belyaev I. Y., Helleday T. ja Harms-Ringdahl M. 2001 "ELF magnetic field affects proliferation of SPD8/V79 Chinese hamster cells but does not interact with intrachromosomal recombination" *Mutation Research* 493: 55-66

Omata Y., Lewis J. B., Rotenberg S., Lockwood P. E., Messer R. L. W., Noda M., Hsu S. D., Sano H. ja Wataha J. C. 2006 "Intra- and extracellular reactive oxygen species generated by blue light" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 77: 470-477

Prato F. S., Thomas A. W. ja Cook C. M. 2001 "Human standing balance is affected by exposure to pulsed ELF magnetic fields: light intensity-dependent effects" *NeuroReport* 12: 1501-1505

Quaglino D., Capri M., Zecca L., Franceschi C. ja Ronchetti I. P. 2004 "The effect on rat thymocytes of the simultaneous *In Vivo* exposure to 50-Hz electric and magnetic field and to continuous light" *TheScientificWorldJOURNAL* 4(S2): 91-99

Rodgers C. T. ja Hore P. J. 2008 "Chemical magnetoreception in birds: The radical pair mechanism" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 353-360

Roehlecke C., Schaller A., Knels L. ja Funk R. H. W. 2009 "The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells" *Molecular Vision* 15: 1929-1938

Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Keziban Ü-K. ja Linn S. 2004 "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints" *The Annual Review of Biochemistry* 73: 39-85

Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Kang T-H., Reardon J. T., Lee J. H. ja Ozturk N. 2010 "Circadian clock control of the cellular response to DNA damage" *FEBS Letters* 584(12): 2618-2625. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.017.

Seko Y., Pang J., Tokoro T., Ichinose S. ja Mochizuki M. 2001 "Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cells of the rat" *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 239: 47-52

Sideris E. G., Papageorgiou G. C., Charalampous S. C. ja Vitsa E. M. 1981 "A spectrum response study on single strand DNA breaks, sister chromatid exchanges, and lethality induced by phototherapy lights" *Pediatric Research* 15: 1019-1023

Solov'yov I. A., Chandler D. E. ja Schulten K. 2007 "Magnetic field effects in *Arabidopsis thaliana* cryptochrome-1" Biophysical Journal 92: 2711–2726

Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetus (294/2002) ionisoimattoman säteilyn väestölle aiheuttaman altistumisen rajoittamisesta [Online] <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2002/20020294> (luettu 24.5.2012)

Stapput K., Güntürkün O., Hoffmann K-P., Wiltschko R. ja Wiltschko W. 2010 "Magnetoreception of directional information in birds requires nondegraded vision" Current Biology 20: 1259–1262

Stronati L., Testa A., Villani P., Marino C., Lovisolo G.A., Conti D., Russo F., Fresegna A. M. ja Cordelli E. 2004 "Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration, micronucleus, and sister chromatid exchange analyses" Bioelectromagnetics 25: 41-48

Udroiu I., Cristaldi M., Ieradi L. A., Bedini A., Giuliani L. ja Tanzarella C. 2006 "Clastogenicity and aneuploidy in newborn and adult mice exposed to 50 Hz magnetic fields" International Journal of Radiation Biology 82: 561 – 567

Verschaeve L., Anthonissen R., Grudniewska M., Wudarski J., Gevaert L. ja Maes A. 2011 "Genotoxicity investigation of ELF-magnetic fields in *Salmonella typhimurium* with the sensitive SOS-based VITOTOX test" Bioelectromagnetics 32: 580-584

Vijayalaxmi ja Prihoda T. J. 2009 "Genetic damage in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electro-magnetic fields: A meta-analysis of data from 87 publications (1990–2007)" International Journal of Radiation Biology 85: 196–213

Wataha J. C., Lewis J. B., Lockwood P. E., Noda M. ja Messer L. R. 2008 "Response of THP-1 monocytes to blue light from dental curing lights" Journal of Oral Rehabilitation 35: 105–110

Wertheimer N. ja Leeper E. 1979 "Electrical wiring configurations and childhood cancer" American Journal of Epidemiology 109: 273-284

Yoshii T., Ahmad M. ja Helfrich-Förster C. 2009 "Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila*'s circadian clock" PLoS Biology 7(4): e1000086. doi:10.1371/journal.pbio.1000086



## LIITE 1. KEMIKAALIT JA LIUOKSET

### Kemikaalit

Alamar Blue (Biosource International Inc., Yhdysvallat)  
 DHE = Dihydroksietidium (Biochemika/ Sigma-Aldrich, Yhdysvallat/Saksa)  
 Digitoniini (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat/Saksa)  
 DMEM = Dulbeccos´ s Modified Eagle Medium (Gibco, Invitrogen Corporation, Yhdysvallat)  
 DMSO = Dimetyylisulfoksidi (Sigma Chemicals, Iso-Britannia/Yhdysvallat/Saksa)  
 EDTA = Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (Merck KGaA, Saksa)  
 EMA = Etidium monoatsidi (Invitrogen Corporation/ Molecular Probes, Yhdysvallat)  
 Fluoresoivat helmet = Peak Flow, Green Flow cytometry reference beads, 6µm (Invitrogen Corporation, Yhdysvallat)  
 EtOH = Etyylialkoholi (Altia Corporation, Suomi)  
 Eriphenol Erisan erifenol combi (Orion-yhtymä Oyj NOIRO, Suomi)  
 FBS = Fetal Bovine Serum = fetaali vasikan seerumi (Gibco, Invitrogen Corporation, Iso-Britannia)  
 Igepal (Sigma Chemical, Yhdysvallat/Saksa)  
 KCl (Merck KGaA, Saksa)  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Saksa)  
 Menadioni (Sigma Chemical, Yhdysvallat / Sigma-Aldrich, Belgia)  
 MMS = metyylimetaanisulfonaatti (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat/Saksa)  
 NaCl (Fischer Scientific, Iso-Britannia)  
 NaHCO<sub>3</sub> (Riedel-de Haën, Saksa)  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Saksa)  
 Natriumsitraatti (Riedel-de Haën, Saksa)  
 Penisilliinistreptomysiiniiliuos = 5000 U/ml penisilliiniä ja 5000µg/ml streptomysiiniä (Gibco, Invitrogen Corporation, Kanada)  
 PI = Propidiumjodidi (Molecular Probes, Yhdysvallat / Molecular Probes Europe, Alankomaat)  
 RNase A = Ribonukleasi A (Sigma Chemical, Yhdysvallat)  
 Sitruunahappo = trikarboksyylihappo (Riedel-de Haën, Saksa)  
 Sukroosi (MP Biomedicals, Yhdysvallat/ Saksa)  
 Sytox Green (Invitrogen Corporation/Molecular Probes, Yhdysvallat)  
 Tris-HCl = Trizma Hydrochloride (Sigma Chemical, Yhdysvallat/Saksa)

### Liuokset

DHE-kantaliuos 10mM DMSO:ssa: Liuotetaan 25 mg DHE:tä 7,926 ml:n DMSO:ta. Jaetaan 100 µL eriin eppendorf-putkiin ja lisätään suojakaasu N<sub>2</sub>. Säilytys -20 °C.

DHE-HBSS: 10 µl 10 mM DHE-kantaliuosta + 10 ml HBSS

Digitoniini-kantaliuos 4mM MilliQ-vedessä: Tehdään ensin 40 mM kantaliuos. Digitoniinia liuotetaan 49,17 mg/ml +95 °C MilliQ-veteen 15 minuutin ajan lämpöblokkissa. 40 mM kantaliuos laimennetaan eppendorf-putkiin 1:10 suhteessa MilliQ-vedellä. Säilytys +4 °C.

EMA-kantaliuos 850 µg/ml: 5 mg EMA + 5,882 ml EtOH

EMA-liuos: 8 ml PBS+FBS –puskuri + 80 µl EMA-kantaliuos

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution (5,4 mM KCl, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 3,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,9 mM NaHCO<sub>3</sub>) pH 7,0-7,4:

900 ml:aan MilliQ-vettä liuotetaan 0,4 g KCl, 0,06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,0 g NaCl, 0,35 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,048 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g D-Glukoosi. Liuoksen pH tarkistetaan ja lisätään MilliQ-vettä loppu-tilavuuteen 1000 ml asti. Valmis liuos steriilisuodatetaan membraanisuodattimella (Millipore 0,22 µm) steriiliin säiliöpulloon.

Irritusliuos (0,02 % EDTA PBS:ssä): 180 ml PBS, 0,04 g EDTA. Liuos steriloidaan autoklaavissa.

Kasvatusliuos: 500 ml DMEM with 4,5 g/l glucose, 50 ml 10 % inaktivoitu FBS, penisilliinistreptomysiiniliuosta 5 ml. Penisilliinistreptomysiiniliuos ja inaktivoitu FBS (molempien säilytys -20 °C) lisätään juuri ennen käyttöä valmiiksi jaotelluista eristä.

Lyysis 1 -kantaliuos: 0,584 mg NaCl/ml + 1mg Natriumsitraatti/ml + 0,3 µl Igepal/ml + 0,5 mg RNase A/ml + 0,4 µM SYTOX green

Tee tislattuun veteen 100 ml kantaliuosta, joka sisältää NaCl, natriumsitraatti ja Igepal, muut lisätään juuri ennen käyttöä.

Lyysis 1 -käyttöliuos: 15 ml lyysis 1 kantaliuos + 60 µl SYTOX green kantaliuos + 750 µl RNase A (10 mg/ml in TE).

Lyysis 2 -kantaliuos: 85,6 mg sukroosi/ml + 15 mg sitruunahappo/ml + 0,4 µM SYTOX green

Tee tislattuun veteen 100 ml kantaliuosta, joka sisältää sukroosia ja sitruunahappoa, SYTOX green lisätään juuri ennen käyttöä.

Lyysis 2 -käyttöliuos: 15 ml lyysis 2 kantaliuos + 60 µl SYTOX green kantaliuos + 1 tippa fluoresoivia helmiä (6 µm fluorescent beads)

Menadioni-kantaliuos 100mM MilliQ-vedessä: Liuotetaan 0,1381 g menadionia 5 ml:aan MilliQ-vettä. Jaetaan eppendorf-putkiin ja parafilmi putkien ympärille. Säilytys -20 °C.

PBS = Phosphate-Buffered Saline w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 1000 ml, pH 7,4: KCl 0,20 g/l (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 g/l (1,5 mM), NaCl 8,00 g/l (137 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/l (8,1 mM)

PBS-FBS: 1 ml FBS + 49 ml PBS

Sytox Green kantaliuos: 1470 µl DMSO + 30 µl SYTOX Green