

Különböző nem-ionizáló sugárzások vizsgálata az emberi bőrön *in vitro*

Doktori értekezés

Szilágyi Zsófia

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Elméleti és Transzlációs Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Thuróczy György, Ph.D, osztályvezető

Hivatalos bírálók:

Dr. Persa Eszter, Ph.D, tudományos főmunkatárs
Dr. Mártonfalvi Zsolt, Ph.D, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, M.D, D.Sc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Cervenák László, Ph.D, tudományos tanácsadó
Dr. Kovács Mihály, Ph.D, egyetemi tanár

Budapest
2025

1. BEVEZETÉS

Életünk során különböző természetes és mesterséges sugárzásoknak vagyunk kitéve. A 0–3 PHz frekvenciatartományban lévő elektromágneses spektrumot nem-ionizáló sugárzásoknak nevezzük. Az elmúlt évtizedek gyors technológiai fejlődésének eredményeként az emberek az élet minden területén egyre nagyobb mértékben vannak kitéve az elektromágneses térnek (EMF). A megnövekedett mindennapi használat és a mesterséges források magas jelenléte miatt a WHO kiemelten kezeli az extrém alacsony elektromágneses terek és a rádiófrekvenciás (RF) sugárzás hatásainak kutatását. A Nemzetközi Rákutató Ügynökség (IARC) a mobiltelefon használattal összefüggésbe hozható agydaganat egy rosszindulatú típusának, a glioma megnövekedett kockázata miatt 2B vagyis „lehetséges rákkeltő” kategóriába sorolta az RF sugárzásokat. Az ultraibolya (UV) sugárzás karcinogén hatása régóta bizonyított, ami miatt az IARC a legmagasabb, 1-es, azaz rákkeltő kategóriába sorolja. A Nemzetközi Nem-ionizáló Sugárvédelmi Bizottság (ICNIRP) iránymutatásokat, az Európai bizottság pedig ajánlásokat fogalmazott meg az EMF expozíciós határértékeire vonatkozóan a lakosság nem-ionizáló sugárzások lehetséges káros hatásaival szembeni védelme érdekében.

RF sugárzás a 100 kHz – 300 GHz közötti tartományban lévő EMF sugárzás. Az ember környezetében megtalálható RF források közül a legismertebbek: a rádió- és tv adók, mobiltelefon bázisállomások, valamint a feltörekvő vezeték nélküli technológiák (pl. Wi-Fi, autóradarok). A vezeték nélküli technológiák új generációi (3G, 4G, 5G, Wi-Fi) magasabb frekvencián működnek, mint a korábbi, 2G néven ismert, 900 MHz-en működő mobiltelefon rendszer. Általánosságban elmondható, hogy a frekvencia növekedésével a sugárzás hullámhossza és az emberi testbe történő behatolási mélysége csökken. Tehát a magasabb frekvenciájú RF expozíció nem hatol mélyebb rétegekbe, főként a bőrben és a szaruhártyában nyelődik el. RF sugárzás által okozott hőhatás akkor lép fel, ha az RF expozíció az emberi szervezetben több, mint 1°C-os hőmérséklet emelkedést eredményez (2-8 W/kg felett). Az RF expozíciót korlátozó nemzetközi biztonsági

előírások és ajánlások ezen a jól ismert hőhatáson alapszanak. Nem termikus hatásról akkor beszélhetünk, ha az RF sugárzás intenzitása olyan alacsony, hogy nem emeli jelentősen a sejtek, szövetek vagy a szervezet hőmérsékletét, valamint a termoreguláció sem érintett (0,5 W/kg). Számos tanulmány egyet ért abban, hogy az RF expozíció önmagában nem káros vagy genotoxikus a nemzetközileg elfogadott expozíciós határértékek alatt.

Középfrekvenciás mágneses tér (IF MF) a 300 Hz és 100 kHz közötti frekvenciatartományú EMF. Számos IF MF-t használó eszközzel találkozunk akár a háztartásban, boltokban, reptereken, ugyanis az inverteres hűtők, mosógépek vagy klímák, az indukciós főzőlapok, a boltok lopásgátló kapui, ellenőrző kapui mind IF MF-fel működnek. Valamint a vezeték nélküli töltés és az elektromos és hibrid autók is használják ezt a frekvencia tartományt. Mindezen széleskörű felhasználás ellenére, az IF MF bőrre gyakorolt hatását vizsgáló kutatások száma igen csekély.

Az UV sugárzás fő természeti forrása a napsugárzás. A Földre érkező sugárzás jelentős részét kiszűri az ózon réteg, csak az UV-A (315–400 nm) tartomány 95%-a, valamint elenyésző mennyiségű UV-B (280–315 nm) sugárzás éri el a földfelszínt. Viszont ezekre vonatkozóan epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az UV sugárzás jelentős szerepet játszik a bőrrák minden főbb típusának előfordulásában. A standard eritéma dózis (SED) a bőrre gyakorolt dózis mennyiségét fejezi ki, ahol 1 SED 100 J/m² effektív sugárzási expozíciónak felel meg. Az UV sugárzás bizonyítottan DNS károsodást okoz. UV sugárzásra specifikusak DNS-t károsító képződések a ciklobutan-pirimidin dimerek és pirimidin-pirimidon 6-4 fototermékek, továbbá a UV sugárzás közvetett DNS károsodást is okozhat az oxidatív stressz révén, reaktív oxigéngyökök (ROS) generálásával. A szervezet reakciója az UV sugárzásra a gyulladás, génmutáció és fotoimmunszuppresszió, amelyek összefüggésben állnak a bőröregedéssel és fotokarcinogenezissel.

A különböző kombinált expozíciók lehetséges következményei mindig is a tudományos kutatások középpontjában álltak. Az elmúlt

néhány évtizedben számos kutatás folyt e téren az ionizáló sugárzás, UV sugárzás, egyéb fizikai ágensek és EMF expozíció, különös tekintettel az RF expozíció területén. Ezekben a vizsgálatokban számos lehetséges kimenetet feltételeztek, amelyek szerint az RF más fizikai ágenssel kombinált expozíciója fokozhatja vagy mérsékelheti az ismert fizikai ágens toxikus hatását. A kombinált expozíciók közül érdemes kiemelni az adaptív válasz jelenségét, amely során a sejtek egy előzetesen alacsony és nem toxikus dózisú genotoxikus ágens („adaptive dose”, AD) expozíciójának hatására ellenállóbbá, rezisztensebbé válnak későbbi azonos vagy más genotoxikus ágens nagyobb, toxikus dózisának („challenge dose”, CD) expozíciója által kiváltott károsodásával szemben. Az adaptív válasz jelensége nem csak az ionizáló sugárzások, de az RF, IF MF és az UV sugárzás hatására is bizonyított.

Kétségtelen, hogy a vezeték nélküli kommunikációs technológia hatékonyra és kényelmessé tette az emberek mindennapjait, ugyanakkor az emberiség folyamatos EMF expozíciónak való kitettsége kérdéseket vet fel az EMF lehetséges biológiai és egészségügyi hatásaival kapcsolatban.

2. CÉLKITŰZÉS

Jelen disszertáció célja volt megvizsgálni, hogy a nem-ionizáló sugárzások önmagukban, illetve más sugárzásokkal kombinálva okozhatnak-e nem termikus hatásokat az emberi bőrben. A kutatást két részre osztottuk a könnyebb érthetőség érdekében.

2.1 Az egymást követő rádiófrekvenciás és UV besugárzás gyulladást okozó hatásvizsgálata 3D bőrmodellen

Szerettük volna megvizsgálni az RF és UV sugárzásnak különböző kombinációban milyen hatása van az emberi bőr élőképességére, gyulladására és a bőröregedésre. Kétféle különböző RF expozícióra összpontosítottunk: az 1950 MHz 3G vezeték nélküli mobil technológia (UMTS) és a 2422 MHz Wi-Fi frekvenciájára. Első hipotézisként azt

feltételeztük, hogy az UV sugárzás a szövetek élőképességre és gyulladásban résztvevő folyamataira gyakorolt káros hatásait egy későbbi RF expozíció fokozhatja. Második hipotézisünk pedig az volt, hogy egy előzetes RF expozíció védő hatást vált ki az *adaptív válasz* révén egy későbbi UV sugárzás okozta károsodásokkal szemben. Első célkitűzésünk volt, hogy megvizsgáljuk az egymást követő UV sugárzás és RF expozíció hatását 3D bőrmmodell életképességére és gyulladás folyamataira. A második célunk az RF expozíció által kiváltott lehetséges adaptív válasz kimutatása volt 3D bőrmmodellben.

2.2 *IF MF és ionizáló sugárzás egymást követő expozíciójának genotoxikus hatásvizsgálata humán dermális fibroblaszt sejtekben*

Célunk volt, hogy megvizsgáljuk az IF MF expozíció önmagában és ionizáló sugárzással kombinálva milyen hatással van a humán bőr genotoxicitására. A tudományos irodalom alapján, első hipotézisünk volt, hogy az IF MF expozíció önmagában nincs hatással a humán dermális fibroblaszt sejtekre. Második hipotézisként azt feltételeztük, hogy az IF MF az adaptív válasz jelenségén keresztül képes védő hatást kifejteni a fibroblaszt sejtekben, ezzel csökkentve az ionizáló sugárzás genotoxikus hatását. Első célunk volt, hogy megvizsgáljuk a 22 kHz vagy 250 kHz IF MF okoz-e genotoxikus hatást a humán dermális fibroblaszt sejtekben. Második célunk volt, hogy megvizsgáljuk képes-e az IF MF preventív hatást biztosítani az ionizáló sugárzás káros hatásával szemben.

3. MÓDSZEREK

3.1 *RF (UMTS vagy Wi-Fi) és UV sugárzásnak kitett bőrmmodell*

Kísérleteink elvégzéséhez a MatTek EpidermFT, teljes vastagságú 3D bőrmmodelljét használtuk, melyeket 35 mm-es Petri csészében, 37°C-on 5%-os CO₂ mellett tartottuk. Két szövetet kezeltünk párhuzamos mintaként az egyes kezeléseknél.

RF besugárzáshoz két különböző besugárzó rendszert alkalmaztunk az UMTS és a Wi-Fi besugárzáshoz.

Az UMTS sugárzáshoz tápvonal típusú besugárzókat használtunk – egyet a tényleges 1950 MHz besugárzáshoz, egyet az ál (sham) besugárzáshoz – melyeket CO₂ inkubátorba tettük. Az UMTS szintézerhez egy RF teljesítményerősítőt csatlakoztattunk, amely garantálta a szükséges, beállított RF teljesítményt 4 W/kg SAR szintig a mintákban.

A Wi-Fi besugárzáshoz egy előzetesen leírt WPC rendszert használtunk, amely 2422 MHz frekvencián működött. A WPC rendszert CO₂ inkubátorba helyeztük, hogy biztosítsuk az *in vitro* kísérletekhez szükséges környezeti feltételeket. Az inkubátor elektronikus műszerei által gerjesztett EMF terek befolyásolhatják a teljesítménysűrűséget, ezért a WPC-t egy RF abszorbens anyaggal ellátott dobozba helyeztük, hogy elkerüljük az RF visszaverődéseket.

Mindkét RF besugárzóban monitoroztuk a hőmérsékletet és szövetek hőmérséklet emelkedését +/- 1°C között tartottuk. Az ál besugárzást kapott minták ugyanazon környezeti feltételek mellett voltak tartva, mint az RF besugárzott minták, csak tényleges RF expozíció nélkül.

UV besugárzással szimuláltuk az emberi bőr természetes napsugárzásának való kitettségét, melyhez a Hönle SOL 500 napszimulátort használtuk. Ennek spektruma közel azonos a nap spektrumával, a H2 filter csak a 290 nm-nél nagyobb hullámhosszú tartományt (UVB, UVA, látható fény) engedi át. A szövetek 2 SED besugárzást 30 perc alatt, 4 SED besugárzást pedig 60 perc alatt kaptak.

Az első hipotézisünk vizsgálatához a szöveteket 2 SED UV dózis után 24 órán keresztül ki-be kapcsolt, 4 W/kg SAR dózisú RF expozíciónak tettük ki, melyet *Additív hatás protokoll*nak neveztünk. A vizsgált minták a következők kezeléseket kapták: ál besugárzás (SH), 24 órás RF besugárzás (RF), 2 SED UV és RF besugárzás (UVRF), valamint 2 SED UV besugárzás (UV).

A második hipotézisünk vizsgálatához az *Adaptív válasz protokollt* használtuk, mely során a szöveteket 24 órás 1,5 W/kg SAR értékű folytonos RF expozíciónak, majd 4 órával később 4 SED UV besugárzásnak tettünk ki. A vizsgált minták a következők kezeléseket kapták: ál besugárzás (SH), RF és 4 SED UV besugárzás (RFUV), 4 SED UV besugárzás (UV).

Az *Additív hatás protokollal* egy valós élethelyzet szerettünk volna szimulálni. Ezért választottunk egy magasabb, 4 W/kg dózisú ki-be kapcsolt RF sugárzást, hiszen a valós életben sem egyfolytában telefonálunk vagy internetezünk. Az *Adaptív válasz protokoll* esetében alacsonyabb 1,5 W/kg teljesítményű RF dózist választottunk, melyet széles körben alkalmaznak bizonyos orvosi terápiák során, amelynek szimulálására törekedtünk. Mivel az RF expozíció időzítése AD-ként fontos az adaptív válasz kiváltásához, az AD és CD közötti inkubációs időt (4 óra) korábban leírt publikációk alapján választottuk ki.

Három független kísérletet végeztünk mindkét frekvencia (1950 MHz UMTS és 2422 MHz Wi-Fi) két protokolljának (*Additív hatás* és *Adaptív válasz*) minden vizsgálati végpontján.

A besugárzások után a szövetek élőképességének vizsgálatához MTT tesztet végeztünk, ami a metabolikusan aktív sejtek mennyiségét mutatja ki. A gyulladásban és bőröregedésben szereplő interleukinok (IL-1 α , IL-6, IL-8) és enzim (MMP-1) mennyiségét ELISA kit-tel mértük.

3.2 IF MF-nek és ionizáló sugárzásnak kitett humán dermális fibroblaszt sejtek

Humán dermális fibroblaszt sejteket DMEM-ben tenyésztettük 37°C-on, 5%-os CO₂ mellett, melyeket egy nappal a besugárzási protokoll előtt 35 mm-es Petri csészébe tettünk át.

Az IF besugárzó rendszer egy IF generátorból, egy erősítőből és egy szolenoid tekercsből állt, melyet CO₂ inkubátorba helyeztünk. A tekercs 22 kHz vagy 250 kHz frekvencián rezonancia üzemmódban működött 100 μ T fluxussűrűséggel. A Petri csészéket egy műanyag

tartó segítségével helyeztük a tekercs középebe, itt a fibroblaszt sejtek 24 órás IF MF besugárzást kaptak.

Az ionizáló besugárzáshoz az X-RAD 225 röntgen forrást használtuk, amely egy teljesen automata rendszer. A röntgen forrás 0,5 Gy/perc vagy 1 Gy/perc alatt adta le a kívánt dózist.

A besugárzási protokoll során vizsgált minták a következő kezeléseket kapták: ál besugárzás, mint negatív kontrol (SH+SH), IF MF és ál besugárzás (IF MF+SH), IF MF + ionizáló besugárzás (AR), ionizáló besugárzás a CD dózis szerint (IR), ionizáló besugárzás, mint pozitív kontrol (PC).

A besugárzási protokoll két frekvenciáján (22 kHz és 250 kHz) három-három független kísérletet végeztük el, melyek mindegyikét három különböző genotoxikológiai módszerrel értékeltük ki. Az alkaline comet assay a DNS egyszáltörések (SSB) mérésére alkalmas módszer. FPG enzimvel való kiegészítése során az oxidatív stressz, a 8-oxoguanine szint mérésére is alkalmas, melyek többletként jelennek meg az SSB-k mellett. A cytokinesis-block micronucleus assay-el a DNS abberációkat, fragmenseket lehet kimutatni, amelyek a citokinézis gátlása miatt mikronukleuszok formájában jelennek meg a kétmagvú sejtekben. A γ H2AX assay a DNS kétszáltörések (DSB) helyének kimutatására alkalmas módszer, melyek fluoreszcens festékkel való megjelölése esetén „fókuszokként” jelennek meg a sejtmagban.

Két Petri csészét kezeltünk párhuzamos mintaként az egyes kezeléseknél minden egyes végpontban. Az ál besugárzást kapott minták ugyanazon környezeti feltételek mellett voltak kezelve, mint az IF MF besugárzott minták, csak tényleges IF MF expozíció nélkül. Hogy lehetőségünk legyen az önálló IF MF lehetséges genotoxikus hatását is megvizsgálni az FPG-modified alkaline comet assay módszert két további kezeléssel egészítettük ki; ez esetben a sejteket 24 órás IF MF (IF MF) expozíciónak vagy ál (SH) besugárzásnak tettünk ki, majd azonnal vizsgáltuk őket.

4. EREDMÉNYEK

4.1 RF (UMTS vagy Wi-Fi) és UV sugárzásnak kitett bőrmodell

A 3D bőrszövetek vizsgálata során azt eredményt kaptuk, hogy azon szövetek élőképessége, amelyek UV besugárzást – önmagukban vagy RF-fel kombinálva – kaptak szignifikánsan csökkent. A RF expozíció sem az 1950 MHz UMTS, sem a 2422 MHz Wi-Fi frekvencián nem okozott szignifikáns eltérést a szövetek élőképességében a kontroll szövetekhez képest.

Az UMTS expozíció, *Additív hatás* protokoll vizsgálatának esetében az IL-1 α , IL-6, IL-8 koncentrációja nem tért el szignifikáns a releváns kezelések között, de az MMP-1 koncentrációja szignifikánsan csökkent a kombinált kezelést kapott (UVRF) mintákban a csak UV sugárzást kapott mintákhoz képest.

UMTS expozíció, *Adaptív válasz* protokoll vizsgálatokor az IL-1 α és IL-8 koncentrációja szignifikánsan csökkent azokban a mintákban, amelyek kombinált sugárzást (1950 MHz RF expozíciót majd UV sugárzást) kaptak, azokhoz a mintákhoz képest, amelyek csak UV besugárzást kaptak.

Az *Additív hatás* és *Adaptív válasz* Wi-Fi expozíció vizsgálatának estében nem találtunk szignifikáns eltérést a releváns kezelések között.

4.2 IF MF-nek és ionizáló sugárzásnak kitett humán dermális fibroblaszt sejtek

Az FPG-modified alkaline comet assay módszerrel szignifikáns eltérést nem tudtunk kimutatni a releváns kezelések között. A módszert kiegészítő két további kezelés tekintetében az SH expozícióhoz képest a 24 órás 250 kHz-es IF MF expozíció szignifikánsan megnövekedett oxidatív stressz szintet eredményezett, míg a 22 kHz IF MF expozíció nem.

A 22 kHz frekvenciájú IF MF besugárzás hatására szignifikánsan kevesebb mikronukleuszos binukleált fibroblaszt sejtet mutattunk ki a

kontroll (SH+SH) csoporthoz képest. Az IF kombinált (AR) és az ionizáló besugárzott kezelés (IR) között nem volt különbség. 250 kHz frekvencián sem az IF MF, sem a kombinált (AR) kezelés hatására nem tudtunk eltérést kimutatni.

DNS DSB tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést egyik frekvencián sem az IF MF önálló vagy ionizáló sugárzással kombinált kezelés hatására.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen disszertáció célja volt, hogy megvizsgáljuk a különböző nem-ionizáló sugárzások önmagukban és más sugárzásokkal kombinálva hatással lehetnek-e az emberi bőrre.

Eredményként azt találtuk, hogy az UV sugárzást követő 4 W/kg 1950 MHz UMTS expozíció szignifikánsan csökkentette az bőröregedésben szerepet játszó MMP-1 enzim koncentrációját a 3D bőrmódelben. Továbbá kimutattuk az adaptív válasz jelenségét, abban az esetben, amikor az előzetes 1950 MHz UMTS expozíció szignifikánsan csökkentette a későbbi UV besugárzás által generált IL-1 α és IL-8 koncentrációját 3D bőrmódelben. Wi-Fi besugárzás hatására nem tudtunk kimutatni additív hatást, sem adaptív választ. Feltételezzük, hogy az UMTS és Wi-Fi expozíció hatása közötti különbség a RF modulációjának különbségéből adódhat. Tanulmányunk úttörőnek számít az EMF kutatások terén, hiszen elsőként publikáltunk 3D bőrszöveten végzett UV és RF kombinált sugárzás hatásáról.

Valamint megvizsgáltuk az IF MF humán dermális fibroblasztokra gyakorolt genotoxikus hatását, melyek alapján azt az eredményt kaptuk, hogy a 22 kHz-es expozíció csökkentette a mikronukleuszos sejtek számát, ezzel szemben a 24 órás 250 kHz IF MF expozíció fokozott oxidatív stressz szintet eredményezett. Az IF MF által ionizáló sugárzásra kiváltott adaptív válasz jelenségét nem tudtuk kimutatni a fibroblaszt sejtekben. Az ellentmondásos eredmények miatt az eredményeket kellő mértékkel értelmezzük, tisztázásukhoz további

vizsgálatok szükségesek. Az IF kutatások limitált száma miatt azonban kutatásunk nagymértékben hozzájárult az IF MF lehetséges hatásainak feltérképezéséhez.

Összességében a dolgozat nem ad bizonyítékot az EMF expozíció jelentős biológiai és egészségügyi hatására, különösen az UMTS (3G), a Wi-Fi és az IF MF bőrre gyakorolt expozíciója esetén. Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy az EMF sugárzások nem okoznak közvetlen DNS károsodást, viszont celluláris és molekuláris szinten változásokat indukálhatnak a bőrsejtekben.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertáció alapját képező saját közlemények:

Szilágyi Zs, Németh Zs, Bakos J, Necz P P, Sáfár A, Kubinyi Gy, Selmaoui B, Thuróczy Gy. Evaluation of Inflammation by Cytokine Production Following Combined Exposure to Ultraviolet and Radiofrequency Radiation of Mobile Phones on 3D Reconstructed Human Skin *In Vitro*. Int. J. Environ. Res. Public Health 2020; 17:4401. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124401>.

Szilágyi Zs, Németh Zs, Bakos J, Kubinyi Gy, Necz P P, Szabó E, Thuróczy Gy, Pinto R, Selmaoui B. Assessment of Inflammation in 3D Reconstructed Human Skin Exposed to Ultraviolet and Wi-Fi Radiation. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24:2853. <https://doi.org/10.3390/ijms24032853>.

Szilágyi Zs, Pintér B, Szabó E, Kubinyi Gy, Le Drean Y, Thuróczy Gy. Investigation of genotoxicity induced by intermediate frequency magnetic field combined with ionising radiation: *In vitro* study on human fibroblast cells. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2024; 899:503817. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2024.503817>.

Disszertációtól független közlemények:

Németh Zs, Laczkovich-Szaladják E, Brech A, **Szilágyi Zs**, Kubinyi Gy, Thuróczy Gy. Intermediate frequency magnetic field at 250.8 kHz does not induce DNA damage or “Adaptive Response” *in vitro*. Genetics&Applications 2019; 3:1. <https://doi.org/10.31383/ga.vol3iss1pp42-50>.

Vecsei Zs, **Szilágyi Zs**, Thuróczy Gy. Radiofrequency personal exposimetry during outdoor entertainment of young adults: a case study. Radiation Protection Dosimetry 2023; 199:8–9. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncad087>.