

A decorative graphic element consisting of a blue, circular, dotted pattern resembling a fingerprint or a stylized globe, located in the upper right corner of the blue text area.

# **ATHEM-2**

## **Untersuchung athermischer Wirkungen elektromagnetischer Felder im Mobilfunkbereich**



**AUVA Report-Nr. 70**  
2016

**Forschungsbericht**

## **ATHEM-2**

# **Untersuchung athermischer Wirkungen elektromagnetischer Felder im Mobilfunkbereich**

Ein Projekt der AUVA (Allgemeine Unfallversicherungsanstalt) gemeinsam mit  
MUW: Medizinische Universität Wien  
SL: Seibersdorf Laboratories GmbH

**Projektleitung:**

Allgemeine Unfallversicherungsanstalt  
Dipl.-Ing. Dr. Hamid Molla-Djafari  
Adalbert-Stifter-Straße 65  
A-1200 Wien

**Projekt-Auftraggeber:**

Allgemeine Unfallversicherungsanstalt  
Ansprechpartner: Dr. Klaus Schiessl  
Abteilung für Unfallverhütung und  
Berufskrankheitenbekämpfung  
Adalbert-Stifter-Straße 65  
A-1200 Wien

**Projektkoordination:**

Ao. Univ.Prof. Dr. Wilhelm Mosgöller  
SCIgenia Forschungssupport GmbH &  
Medizinische Universität Wien  
A-1090 Wien,  
Telefon: +43 664 28 48 324  
wilhelm.mosgoeller@meduniwien.ac.at

Telefon: +43 5 93 93-21753  
Fax: +43 5 93 93-20710  
mail: klaus.schiessl@auva.at  
Internet: www.auva.at

**Verfasser, Redaktion und Ansprechpartner**

<b>AUVA (Allgemeine Unfallversicherungsanstalt)</b>	
Dipl.-Ing. Dr. Hamid Molla-Djafari Allgemeine Unfallversicherungsanstalt Adalbert-Stifter-Straße 65 1200 Wien mail: <a href="mailto:molla-djafari@emf-emes.at">molla-djafari@emf-emes.at</a>	Ansprechpartner: Dr. Klaus Schiessl Allgemeine Unfallversicherungsanstalt Abteilung für Unfallverhütung und Berufskrankheiten-bekämpfung Adalbert-Stifter-Straße 65 1200 Wien mail: <a href="mailto:klaus.schiessl@auva.at">klaus.schiessl@auva.at</a>
<b>Seibersdorf Labor GmbH</b>	
Dipl.-Ing. Gernot Schmid Fachbereich Elektromagnetische Verträglichkeit Seibersdorf Labor GmbH 2444 Seibersdorf mail: <a href="mailto:gernot.schmid@seibersdorf-laboratories.at">gernot.schmid@seibersdorf-laboratories.at</a>	
<b>Medizinische Universität Wien</b>	
Ao. Univ.Prof. Dr. Michael Kundi Med. Univ. Wien, Institut für Umwelthygiene AG für Arbeits- und Sozialhygiene Kinderspitalgasse 15, 1095 Wien mail: <a href="mailto:michael.kundi@meduniwien.ac.at">michael.kundi@meduniwien.ac.at</a>	A.o. Univ.Prof. Dr. Siegfried Knasmüller Med. Univ. Wien, Klinik für Innere Medizin I Institut f. Krebsforschung Borschkegasse 8a, 1090 Wien mail: <a href="mailto:siegfried.knasmueller@meduniwien.ac.at">siegfried.knasmueller@meduniwien.ac.at</a>
Ao. Univ.Prof. Dr. Wilhelm Mosgöller Med. Univ. Wien, Klinik für Innere Medizin I Institut f. Krebsforschung Borschkegasse 8a, 1090 Wien mail: <a href="mailto:wilhelm.mosgoeller@meduniwien.ac.at">wilhelm.mosgoeller@meduniwien.ac.at</a>	

**Projektbeteiligungen-Rollen**

**Auftraggeber, Finanzierung:** Allgemeine Unfallversicherungsanstalt (AUVA), Wien

**Projektleitung:** Allgemeine Unfallversicherungsanstalt (AUVA), Wien

**Projektkoordination:** SCIgenia Forschungssupport GmbH, 1090 Wien

**Anlagenentwicklung zur Human Exposition:** Seibersdorf Labor GmbH, Fachbereich Elektromagnetische Verträglichkeit, Seibersdorf

**Humane kognitive Gehirnfunktion unter EMF Exposition:** Medizinische Universität Wien, ZPH, Institut für Umwelthygiene, Wien

**Gen-Toxikologie:** Medizinische Universität Wien, Klinik für Innere Medizin I, Institut f. Krebsforschung, Wien



## KURZZUSAMMENFASSUNG

Das ATHEM-2 Projekt zur „Untersuchung athermischer Wirkungen elektromagnetischer Felder im Mobilfunkbereich“ ist eine Fortsetzung des ATHEM-1 Forschungsprojektes (2002-2008).

Mobiltelefone versenden und empfangen hochfrequente elektromagnetische Felder (HF-EMF). Wer ein Mobiltelefon nutzt, ist diesen Feldern ausgesetzt (exponiert). Beim ATHEM-2 Projekt ging es neben der Untersuchung von kognitiven Wirkungen darum, ob und wie die HF-EMF Exposition Zellen des menschlichen Körpers verändert. Ein Projekt-Schwerpunkt lag auf Labor-Untersuchungen zu zellulären Mechanismen möglicher gentoxischer Wirkungen. Zur Qualitätssicherung wurden die geplanten Untersuchungen im Vorfeld von externen Experten begutachtet. Alle Experimente wurden „doppelblind“ durchgeführt. Weder die freiwilligen Probanden noch die am Experiment beteiligten Wissenschaftler wussten während der Exposition und Probenaufbereitung über die Expositionsbedingungen Bescheid.

Für die Human-Experimente an freiwilligen Probanden wurde die Wangenschleimhaut an fünf aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils zwei Stunden exponiert. Die nicht exponierte gegenüberliegende Wangenseite diente als Kontrolle. Während dieser Exposition wurden Wirkungen auf die kognitive Hirnleistung untersucht. Die Exposition verkürzte die Reaktionszeit, während sich die Fehlerrate erhöhte. Bei komplexeren Abläufen wie Gedächtnistests steigt unter Exposition sowohl Reaktionszeit als auch Fehlerrate. Zwei bzw. drei Wochen nach der HF-EMF Exposition wurden Mundschleimhaut-Zellen entnommen und analysiert. Dabei fanden sich geringe gentoxische und zytotoxische Effekte und Hinweise auf eine Kumulation der Expositions-Wirkungen.

Die in vitro Labortests zur Gentoxizität bestätigten die Existenz empfindlicher und strahlungs-unempfindlicher Zellen. Auch die Existenz einer Latenzzeit (Beginn der Exposition bis zum Auftreten von Wirkungen) wurde bestätigt. Als zellulärer Mechanismus – also wie es bei sensiblen Zellen zu DNA-Veränderungen kommen kann - wurde festgestellt, dass HF-EMF Exposition die DNA oxidieren und somit brüchig machen kann. Bei Zellen unter zusätzlichem Stress erhöhte die HF-EMF Exposition die DNA-Bruchrate. Wir beobachteten Zellen, die unter HF-EMF Exposition spezifische zelluläre Reparaturmechanismen aktivieren. Dieser Befund bestätigt einerseits, dass DNA-Schäden aufgetreten sind, und stützt andererseits die Annahme, dass diese repariert werden können. Solcherart entstandene Veränderungen an der DNA sind nach ca. zwei Stunden verschwunden.

Keine der gefundenen Wirkungen lassen den Schluss auf direkte gesundheitsschädliche Wirkungen zu. Allerdings begründen sie ein potentielles Risiko für exponierte Personen. Die Beachtung einfacher Vorsorgemaßnahmen zur Herabsetzung der Exposition kann dieses Risiko minimieren. Zu konkreten Vorsorgemaßnahmen zählen unter anderem das Handy nicht am Körper sondern in der Tasche zu tragen, und beim Telefonieren Freisprechanlage oder Headset zu verwenden.



## INHALTSVERZEICHNIS

Kurzzusammenfassung	7
1 Motivation der AUVA	13
1.1 Hintergrund	13
1.2 Grenzwerte	13
1.3 Thermische und athermische Wirkungen	14
1.4 Gesellschaftliche Aspekte der Immissionsreduktion	14
1.5 Ziele der ATHEM-Projektforschung	15
1.6 Projekt-Ziele im Detail	16
2 Wissenschaftliche Fragestellungen	17
2.1 Was darf man sich von der Wissenschaft in ATHEM-2 erwarten?	17
2.2 Untersuchungs-Themen beim ATHEM-2 Projekt	17
3 Expositionsanlage für doppelt blinde Human-Exposition	21
3.1 Problemstellung	22
3.2 Anforderungen an das Expositionssystem	23
3.3 Gesamtkonzeption	24
3.4 Dosimetrie und Unsicherheitsabschätzung	29
3.5 Expositionsdatenanalyse und Entblindung	37
4 Kognitive Auswirkungen	39
4.1 Kognitive Auswirkungen - Problemstellung	40
4.2 Material und Methoden	49
4.3 Ergebnisse	58
4.4 Zusammenfassung: Kognitive Tests	74
5 Humane Mundhöhlzellen	77
5.1 Hintergrund	78
5.2 Material und Methoden	82
5.3 Ergebnisse	87
5.4 Zusammenfassung und Diskussion	97
6 Genetische Toxikologie	99
6.1 Hintergrund	100
6.2 Verwendete Methoden	101
6.3 Ergebnisse	114
6.4 Zusammenfassung: <i>in vitro</i> Gentoxikologie	164
7 Projekt-Zusammenfassung des Koordinators	165
7.1 Expositionsanlage für doppelt verblindete Human-Exposition	165
7.2 Kognitive Effekte	166

7.3	Humanexperimente zur Gen- und Zytotoxizität	166
7.4	DNA Läsionen und Mechanismen	167
7.5	Zusammenfassung und Ausblick	171
8	Schlussfolgerungen zu Präventivmaßnahmen	173
8.1	Schutz- und Präventionsmaßnahmen in elektromagnetischen Feldern	173
8.2	Allgemeine Schutzmaßnahmen in elektromagnetischen Feldern	173
8.3	Vorsorgemaßnahmen bei der Benützung von Handys	175
9	Zitierte Literatur	177





# 1 MOTIVATION DER AUVA

Dipl.-Ing. Dr. Hamid Molla-Djafari

## 1.1 HINTERGRUND

Um die Aufgabe „Arbeitnehmerschutz“ aktiv und objektiv wahrnehmen zu können, bedarf es eines wissenschaftlichen Zugangs. Darum hat die AUVA viele Studien im Bereich elektromagnetischer Felder (EMF) durchgeführt. In einer wissenschaftlichen Studie der AUVA an Leichenköpfen wurde bereits vor Jahren überprüft, ob die im Kopf gemessenen Immissionen unterhalb oder oberhalb der Grenzwerte liegen.

Durch die weite Verbreitung von Mobilfunkanwendungen seit Mitte der 90er Jahre hat die Exposition der Arbeitnehmer und der Bevölkerung gegenüber hochfrequenten elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks kontinuierlich zugenommen. Nach Angaben der International Telecommunication Union der Vereinten Nationen gibt es gegenwärtig mehr als 7 Milliarden Mobiltelefonnutzer weltweit (ITU, UN Teilorganisation d. Internat. Telekom. Union 2015). Diese Entwicklung zog eine neue Art der Exposition für breite Bevölkerungsschichten nach sich. Angesichts der offenen Fragen zu gesundheitlich nachteiligen Auswirkungen der von Mobiltelefonen ausgesandten Mikrowellen und niederfrequenten Magnetfelder besteht ein klares Forschungsdefizit. Die Untersuchung möglicher Gesundheitsrisiken wird somit zur öffentlichen Aufgabe.

Nach Einführung der Mobiltelefonie hat sich die Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) nicht nur unter der berufstätigen sondern auch Allgemeinbevölkerung stark erhöht. Es ergeben sich Fragen zur Anwendungssicherheit. International haben privatrechtlich organisierte Versicherungsgesellschaften von den Rückversicherungs-Gesellschaften die Empfehlung erhalten, mögliche Gesundheitsrisiken, die mit der Exposition zu EMF im Zusammenhang stehen aus Personenbezogenen Versicherungen auszunehmen.

Die Möglichkeit, ein Risiko *a priori* auszuschließen, gibt es nicht. Alternativ läßt sich ein mögliches Risiko durch gezielte Forschung erfassen und kalkulieren. Vor diesem Hintergrund beauftragte die AUVA bereits 2002 das ATHEM-1 Projekt, um mögliche Wirkungen der Exposition zu elektromagnetischen Feldern auf biologische Strukturen objektiv zu untersuchen. Wie bei ATHEM-1 beobachtet und mittlerweile international bestätigt, entstehen durch die Exposition Veränderungen an bestimmten – nicht allen – menschlichen Zellen. Um ein Krebsrisiko ausschließen zu können, wäre es wesentlich, jene Expositions-Bedingungen zu kennen, bei welchen keine Risiko-Indikatoren am Menschen auftreten.

## 1.2 GRENZWERTE

Natürlich stützt man sich bei der Festlegung von Immissions-Grenzwerten und Vorsorgemaßnahmen auf wissenschaftliche Daten. Es ist hinreichend gesichert: Vor gesundheitlich bedenklicher Erwärmung bei Anwendungen des Mobilfunks schützen die

Immissions-Grenzwerte in den aktuellen Verordnungen und Normen. Der Mobilfunk nutzt EMF mit so geringen Expositionen, dass eine kritische Erwärmung des exponierten Gewebes nicht zu erwarten ist. Aber er brachte eine neue Expositionsart mit sich, denn nie zuvor hielten sich breite Bevölkerungsschichten einen Mikrowellen-Sender an den Kopf und waren dem so genannten Nahfeld von hochfrequenten EMF ausgesetzt.

Für die Risiko-Abschätzung bezüglich Effekte der Exposition zu diesen Feldern existieren teilweise recht widersprüchliche Schlussfolgerungen. Es sind unterschiedliche Sichtweisen und Interessenslagen mit den daraus resultierenden Konflikten, die für die Wissenschaft eine Herausforderung bedeuten. Bisher Erforschtes und konventionelles Wissen reicht kaum aus, um belastbare Aussagen zu treffen. Vor diesem Hintergrund zielte das Forschungsprojekt ATHEM-2 Projekt wie schon das Vorgängerprojekt darauf ab, brisante Fragen zu möglichen Wechsel-Wirkungen von Mobilfunkfeldern mit der Biologie zu untersuchen.

### **1.3 THERMISCHE UND ATHERMISCHE WIRKUNGEN**

Bereits vor Jahrzehnten haben Wissenschaftler so genannte athermische - also „nicht wärme-bedingte“ - Wirkungen der Exposition zu hochfrequenten elektromagnetischen Feldern beschrieben. Sollten athermische Wirkungen mit Relevanz für die Gesundheit existieren, ist ein Schutzkonzept, das auf thermischen Effekten beruht, nicht ausreichend.

Während Validität und Einhaltung so genannter thermischer Grenzwerte im Wesentlichen gewährleistet sind, kamen seit etwa 1995 biologische Effekte, die als gesundheitlich unerwünscht gelten, in Diskussion. Beispielsweise hat 2012 ein italienisches höchstrichterliches Urteil den Anspruch eines Managers auf eine staatliche Invalidenrente anerkannt, mit der Begründung, dass Dienstgespräche mit dem Mobiltelefon den Tumor verursachten; das Gericht hat den kausalen Zusammenhang zum Mobilfunk-Telefonieren im Ausmaß von täglich fünf bis sechs Stunden hergestellt und die gegenständliche Erkrankung erstmals als Berufskrankheit anerkannt. Weiters war in einer epidemiologischen Studie in der kleinen Gruppe der extremen Vieltelefonierer das Gehirntumor-Risiko nach 10 Jahren leicht erhöht.

### **1.4 GESELLSCHAFTLICHE ASPEKTE DER IMMISSIONSREDUKTION**

Die öffentliche Diskussion über mögliche gesundheitliche Schädwirkungen durch niederfrequente elektromagnetische Felder wurde durch die Einstufung von starken niederfrequenten Magnet-Feldern als „2B“ - „possible carcinogen“ durch die IARC (International Agency for Research on Cancer) <sup>[1]</sup> verstärkt. Seit Mai 2013 liegt auch zu hochfrequenten elektromagnetischen Feldern eine 2B-Einstufung („möglicherweise krebserregend“) vor.<sup>[2]</sup>

Grenzwerte zur Expositionsbegrenzung sind in hohem Maße eine politische Entscheidung. Die Wissenschaft liefert lediglich eine Entscheidungsbasis. Es ist allerdings schwierig, auf Basis unterschiedlich interpretierter wissenschaftlicher Daten den benötigten politischen Konsens zu finden. In der Praxis der Grenzwertfindung

erfordert der gesellschaftliche Konsens eine kritische Menge von stimmigen wissenschaftlichen Daten.

Ein Ergebnis von experimentellen Untersuchungen kann auch sein, Effekte aufzuzeigen, die nicht grundsätzlich immer schädlich sind (z.B. Einflüsse auf kognitive Fähigkeiten), sondern erst in Verbindung mit weiteren Umständen relevant werden.

Weil wir kaum noch bereit sind, ohne HF-EMF-emittierende Geräte auszukommen, erfordert es gegebenenfalls pragmatische Lösungen, um mögliche Gesundheitsfolgen hintanzuhalten. Einerseits gilt es, dem legitimen Sicherheitsbedürfnis der Bevölkerung gerecht zu werden, andererseits sollte man einer zunehmend beliebten neuen Technologie keine unnötigen Erschwernisse in den Weg legen. Folglich gebietet der Präventionsgedanke, die unabhängige Forschung mit hohen Qualitätsansprüchen voranzutreiben.

## **1.5 ZIELE DER ATHEM-PROJEKTFORSCHUNG**

Die Erforschung HF-EMF-induzierter athermischer (wärmeunabhängiger) biologischer Wirkungen erfolgt in einem interdisziplinären Umfeld. Wissenschaftler aus Technik und Biologie müssen zusammenwirken, und sie müssen erst eine gemeinsame Sprache finden, um offene Fragen gemeinsam zu lösen. Die Komplexität biologischer Systeme und Abläufe erschwert die Erforschung und Erklärung subtiler expositionsbedingter biologischer Wirkungen.

Die strukturierte Forschung im Rahmen des ATHEM-1 Projektes konnte Widersprüche in der internationalen wissenschaftlichen Literatur auflösen. Es fanden sich natürliche Erklärungen, warum international viele *in vitro* Experimente mit unterschiedlichen und scheinbar widersprüchlichen Ausgängen vorlagen. Beim ATHEM-1 Projekt exponierte man verschiedenste Zellen *in vitro* mit HF-EMF unter vergleichbaren Bedingungen. Es fanden sich unempfindliche und empfindliche Zellen, die erst nach einer gewissen Latenzzeit (d.h. Zeit zwischen Beginn der Exposition und Auftreten der Expositionswirkung) reagierten. Die Ergebnisse dieses Projektes flossen direkt in Vorsorge-Maßnahmen zur Risikoprävention ein. Der zu diesem Projekt erstellte AUVA-Lehrfilm zum umsichtigen Umgang mit Handys zwecks Risikoreduktion hat einen international hohen Bekanntheitsgrad erlangt.

Das ATHEM-2 Projekt verfolgt das Ziel, Wissenslücken zu schließen:

Dazu wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

1. Schaffung und Anwendung von objektiven und reproduzierbaren Expositionsbedingungen für doppelt verblindete Human-Untersuchungen
2. Doppelt blinde Untersuchung der HF-EMF-Einflüsse auf das Gehirn (kognitive Leistungen)
3. Doppelt blinde Human-Experimente zu möglichen Zyto-und Gentoxischen Wirkungen
4. Doppelt blinde *in vitro* Experimente zu Wirkungen auf die zelluläre DNA und
5. Untersuchung der zellulären Mechanismen der DNA-Schädigung.

## 1.6 PROJEKT-ZIELE IM DETAIL

Das Ziel von ATHEM-2 war es, folgende für den Schutz von Arbeitnehmern und Allgemeinbevölkerung relevanten Fragestellungen zu untersuchen und zu beantworten:

1. **Zeitschwelle:** Bestimmung der Expositionsdauer, bis sich ein Effekt zeigt.
2. **Abklingzeit:** Bestimmung der Regenerationszeit nach Expositionsende
3. **Dosis-Schwelle:** Bestimmung des sogenannten SAR-Schwellenwerts bei Langzeit-Exposition
4. **Jugendliche als Risikogruppe:** Feststellung, ob aktive Zellen (typisch für Jugendliche) sensibler auf die Strahlung reagieren als inaktive Zellen.
5. **Kombinierte Risiken:** Klärung, ob bestehende Zell- oder DNA-Schäden durch EMF-Exposition verstärkt werden.
6. **Feststellung der Relevanz** positiver *in vitro* Befunde für den Menschen.
7. Wirkung auf den **Menschen**, sowohl kognitiv wie zellbiologisch.

Auf Basis dieser systematischen Forschung wurden einfache Präventionsmaßnahmen entwickelt, die sicheren Umgang mit Mobilfunk bzw. Risikominimierung begründen.

## 2 WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNGEN

Ao. Univ.Prof. Dr. Wilhelm Mosgöller

### 2.1 WAS DARF MAN SICH VON DER WISSENSCHAFT IN ATHEM-2 ERWARTEN?

Ein zentrales Ziel des ATHEM-2 Projekts ist es bei komplexen Fragestellungen belastbare Ergebnisse zu erhalten. Um objektive Aussagen treffen zu können, wurde die Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) des Mobilfunks randomisiert, doppelt blind durchgeführt und rigoros überwacht. Dem verständlichen Wunsch nach schnellen Ergebnissen stehen Qualitätsansprüche und die Notwendigkeit, keine vorschnellen Schlüsse zu ziehen, gegenüber.

Zur speziellen Frage eines möglichen Krebsrisikos ist die Epidemiologie die federführende Wissenschaft. Die Epidemiologie alleine ist allerdings ohne grundlagenwissenschaftliche Untersuchungen nahezu wertlos. Somit kommt den Untersuchungen an Zellen wie sie in beiden ATHEM-Projekten realisiert wurden besonderer Stellenwert zu.

### 2.2 UNTERSUCHUNGSTHEMEN BEIM ATHEM-2 PROJEKT

Die Untersuchungen konzentrieren sich auf HF-EMF des Mobilfunks, im speziellen auf UMTS Signale welche in der mobilen Kommunikation heute weitverbreitet sind. Der von UMTS genutzte Frequenzbereich reicht von 1,92 bis 2,17 GHz. Geltende Grenzwerte schützen vor Erwärmung des Gewebes welche sich durch HF-EMF dieser Frequenzen unmittelbar ergeben würde.

Bei allen Untersuchungen wurde der SAR-Wert dokumentiert. Der SAR-Wert (**S**pezifische **A**bsorptions**R**ate) beschreibt jenen Teil der HF-Strahlung der im Gewebe absorbiert wird und eine Erwärmung verursacht. Damit die Gewebeerwärmung nicht zu hoch wird, gibt es Grenzwerte, die das Expositions-niveau (und damit die Gewebeerwärmung) beschränken. In diesem Projekt wurden alle Expositionen mit Intensitäten durchgeführt, die eine bedenkliche Erwärmung ausschließen. Darum bezeichnet man die gefundenen Effekte als athermische oder „nicht thermische“ Effekte.

#### 2.2.1 Einflüsse auf Gehirnphysiologie, kognitive Fähigkeiten

Nachdem beim ersten ATHEM-Projekt unter Exposition mit HF-EMF Verringerungen von Reaktionszeiten auf Kosten einer erhöhten Fehlerrate gefunden wurden, ergab sich beim vorliegenden Nachfolge-Projekt die Gelegenheit diese Ergebnisse zu überprüfen.

#### 2.2.2 Human Experimente zu DNA-Schäden

Diese Fragestellung berührt die Übertragbarkeit von *in vitro* Ergebnissen auf den Menschen. Es sollte untersucht werden, ob gegebenenfalls festgestellte, HF-EMF expositionsbedingte DNA-Schäden *in vitro* (also unter Laborbedingungen) vorkommen oder auch im menschlichen Körper („*in vivo*“) beobachtet werden können.

Dazu wurden unter rigoros kontrollierten Bedingungen erstmalig freiwillige erwachsene Teilnehmer doppelt blind so exponiert, dass die Mundschleimhautzellen auf der Wangeninnenseite einer definierten Exposition ausgesetzt sind. Anschließend wurden, ähnlich wie bei einer kriminaltechnologischen Untersuchung, mit einer kleinen Bürste Zellen von der Wangeninnenseite entnommen um diese auf allfällige expositionsbedingte Änderungen hin zu untersuchen.

Da die Intensität der Strahlung exponentiell mit der Entfernung abnimmt und aufgrund von dazwischenliegenden, absorbierenden Zungengewebe, konnte die gegenüberliegende (nicht direkt bestrahlte Wange) als Kontrolle genutzt werden. Nach der verblindeten Exposition einer Wangenseite wurden daher an beiden Wangen Zellproben abgenommen und ausgewertet. Ziel war es manifestierte Beeinträchtigungen in der exponierten Mundschleimhaut festzustellen.

In Kombination mit zwei unterschiedlichen Expositions-Intensitäten und Auswahl entweder der linken oder rechten Wange, erlaubt dieser Ansatz Rückschlüsse auf mögliche Dosis-Wirkungseffekte zu ziehen.

### **2.2.3 *In vitro* Untersuchungen zur Wirkungen auf die DNA**

Bereits lange vor Beginn des ATHEM-2 Projektes gab es konkrete Hinweise auf athermische Wirkungen auf die DNA. Diese begründen bei der Exposition zu HF-EMF Maßnahmen zur Risikoreduktion.

HF-EMF expositionsbedingte DNA-Brüche wurden erstmals bei Labortieren beschrieben.<sup>[3, 4]</sup> Bei Zellkulturen (*in vitro*) erzeugte eine minutenweise unterbrochene Exposition stärkere Einwirkungen als kontinuierliche Bestrahlung.<sup>[5, 6]</sup> Eine expositionsbedingte Vermehrung von DNA-Brüchen wird allgemein als Risikoindikator gewertet. In Italien haben erste Gerichts-Urteile das Risiko anerkannt.<sup>1</sup>

Im Rahmen des vorangegangenen ATHEM-1 Projektes wurden Zellen mit zwei sich ergänzenden Methoden untersucht, um 1) DNA-Brüche und 2) Proteinveränderungen in den gleichen Zellen festzustellen. Die DNA-Brüche in den sensiblen Zellen wurden durch Protein-Befunde in den gleichen Zellen plausibel bestätigt.<sup>[7]</sup> Mittlerweile sind die HF-EMF expositionsbedingten DNA-Schäden international mehrfach reproduziert.<sup>[8-10]</sup> Allerdings war zu Projektbeginn der zelluläre Mechanismus, der in sensiblen Zellen die DNA verändert noch Gegenstand kontrovers geführter wissenschaftlicher Diskussionen.

Beim ATHEM-1 Projekt wurde festgestellt, dass die intermittierende Exposition mehr biologische Wirkung hat, als die Exposition mit kontinuierlichen Feldern. Darum wurden die Zellexperimente im ATHEM-2 Projekt durchgehend mit intermittierender Exposition (5 Min. „an“, 10 Min „aus“) durchgeführt.

Bei intermittierender Exposition (z.B. im Zyklus 5 min „an“, 10 min „aus“, also wenn das Feld effektiv nur ein Drittel der Expositionsdauer „an“ ist) wurden in Vergleich zu kontinuierlicher Exposition über die gleiche Dauer die DNA-Bruchrate erhöht vorgefunden. Dies ist ein klarer Beleg dafür, dass die HF-EMF expositionsbedingten DNA-

---

<sup>1</sup> In Italien hat 2012 das Oberste Gericht in Rom den Zusammenhang zwischen Handystrahlung und einer Tumorerkrankung eines Managers bestätigt.

Beeinträchtigungen nicht allein mit der Menge an elektromagnetisch indizierter Wärme-Energie korrelieren, also Wärme-unabhängig (=athermisch) entstehen.

Mit HF-EMF Exposition assoziierte zelluläre Veränderungen wie DNA-Brüche wurden aber nicht nur *in vitro*, sondern auch an lebenden Tieren wiederholt beobachtet.<sup>[4, 11, 12]</sup>

Die Ergebnisse der DNA Forschung sind oberflächlich betrachtet sehr widersprüchlich. Angebliche Widersprüche können allerdings als scheinbar aufgelöst werden, wenn man berücksichtigt, das zumeist die Ergebnisse kurzer Expositionsdauern (< 2 Stunden) publiziert wurden.<sup>[13-16]</sup> Diese negativen Befunde stehen aber nicht im Widerspruch zu jenen Untersuchungen, die nach längerer Expositionsdauer Effekte fanden.<sup>[8, 10]</sup> Um das Wissen um diesem Sachverhalt zu vertiefen wurden in diesem Projekt Zellen unterschiedlich lange exponiert.

Die folgenden Beobachtungen erklären weitere Widersprüche in der Literatur als scheinbar, da athermische Effekte der HF-EMF Exposition weitere Abhängigkeiten zeigen dürften:

**Zelltyp-Abhängigkeit:** Der am häufigsten untersuchte Zelltyp sind so genannte Lymphozyten.<sup>[15, 17-25]</sup> Lymphozyten wurden verschiedentlich als resistent gegenüber HF-EMF beschrieben. Die Resistenz eines Zelltyps hebt jedoch nicht die Empfindlichkeit eines anderen auf, wenn es bei diesem anderen Zelltyp expositionsbedingte DNA-Brüche gibt. Beispielsweise lagen bei Projektbeginn Ergebnisse zu folgenden sensiblen Zelltypen vor: Fibroblasten, Neuronen, Trophoblasten, CHL-Zellen, lymphoblastoide Zellen.<sup>[5, 6, 8, 10, 13, 26, 27]</sup>

Im Rahmen des ATHEM-2 Projekts wurde eine Reihe von weiteren Zell-Linien untersucht, um sensible und unsensible Zellen sowie zelluläre Mechanismen zu finden.

**Latenzzeit:** Im Gegensatz zu radioaktiver Bestrahlung findet man bei HF-EMF nach kurzer Expositionszeit keine Effekte. Dies spricht für dafür, dass möglicherweise unterschiedliche zelluläre Mechanismen im Spiel sind, die die beobachteten DNA-Brüche und DNA-Läsionen (also DNA-Schäden) erzeugen. Bei sensiblen Zellen wurde die Zeitdauer vom Beginn der Exposition bis zum Auftreten der positiven Befunde je nach Forschergruppe, Testmodell und Zelltyp unterschiedlich beschrieben. Die Latenzzeit betrug zwanzig Minuten,<sup>[9]</sup> 4 Stunden,<sup>[7]</sup> oder 16 Stunden.<sup>[8]</sup>

Wie später noch genauer ausgeführt bestätigten sich nun beim ATHEM-2 Projekt die in der neueren Literatur beschriebene Befunde, dass bei empfindlichen Zellen oxidativem Stress und Oxidierung von DNA eine Schlüsselrolle zukommt. Dies würde beispielsweise erklären, dass metabolisch aktive Zellen - wie sie bei Kindern und Jugendlichen gehäuft vorkommen – sowie andere Zellen, welche bereits mehr freie oxidative Radikale angesammelt, haben vulnerabler sein könnten als ruhende Zellen.

**Erholungszeit.** Nach Ende der Exposition benötigen sensible Zellen eine bestimmte Erholungs-Zeit bis expositionsbedingte Effekte verschwinden. Im ATHEM-1 Projekt wurden sowohl bei DNA-Brüchen wie bei den Proteinveränderungen 2 Stunden Erholungszeit beobachtet, bis der Normal-Zustand erreicht wird.<sup>[7]</sup> Franzellitti *et al.* (2010)<sup>[8]</sup> kam zu ähnlichen Ergebnissen. Im ATHEM-2 Projekt waren systematische Untersuchungen geplant, um festzustellen, ob kürzere Erholungszeiten ausreichen.



### **3 EXPOSITIONSANLAGE FÜR DOPPELT BLINDE HUMAN-EXPOSITION**

Titel und Ziel des Teilprojektes :

**Entwicklung einer Expositionseinrichtung für  
Provokationsstudien zur Untersuchung möglicher  
Auswirkungen hochfrequenter elektromagnetischer  
Felder von UMTS-Mobiltelefonen auf die  
Mundschleimhaut**

Teilprojektleiter:

Dipl.-Ing. Gernot Schmid  
Seibersdorf Labor GmbH, Seibersdorf  
Fachbereich Elektromagnetische Verträglichkeit

Mitarbeiter:

Stefan Cecil,  
Richard Überbacher  
Beide:  
Seibersdorf Labor GmbH  
Geschäftsfeld EMC & Optics

### 3.1 PROBLEMSTELLUNG

Um die Übertragbarkeit von zellulären *in vitro* Ergebnissen auf den Menschen zu überprüfen wurden im Projekt ATHEM-2, neben *in vitro* Versuchen mit mehreren unterschiedlichen Zelllinien, auch Experimente mit freiwilligen Probanden vorgesehen. Für die *in vitro* Experimente wurde die Expositionsanlage sXc 1950 (IT'IS Foundation, Zürich, Schweiz) verwendet, die im Rahmen des Vorgängerprojektes ATHEM-1 angekauft worden war.

Die in ATHEM-2 geplanten Experimente mit freiwilligen Probanden sahen die gezielte Bestrahlung von Epithelzellen der Wangenschleimhaut vor, wobei für die Bestrahlung, aus Gründen der Vergleichbarkeit, exakt die gleiche Signalstruktur verwendet werden sollte wie im Fall der *in vitro* Experimente. In gewissen Zeitabständen nach der Bestrahlung wurden von den Probanden mittels Abstrich Zellen der Wangenschleimhaut gewonnen und hinsichtlich der betrachteten Endpunkte zur Gentoxizität ausgewertet.

Zur Befeldung im Bereich des Kopfes kamen im Rahmen bisheriger Provokationsstudien die unterschiedlichsten Konzepte zum Einsatz. Dabei ist neben biologischen/medizinischen Gesichtspunkten vor allem auch die Konzeption und die detaillierte dosimetrische Analyse des Expositionssystems wesentlicher Bestandteil eines qualitativ hochwertigen Studiendesigns. Möglichst exakt definierte und für alle Probanden möglichst identische Expositionsbedingungen (im Sinne der Strahlungsabsorption im Gewebe) stellen daher ein wichtiges Qualitätskriterium für derartige Expositionseinrichtungen dar.

Speziell im Fall von Nahfeld-Expositionen, also wenn die Strahlungsquelle sehr nahe dem menschlichen Körper (Kopf) betrieben wird, führen bereits kleine Variationen in der relativen Lage zwischen Kopf und Antenne zu großen Schwankungen in der resultierenden Strahlungsabsorption im Gewebe. Eine schlecht definierte Position der Antenne zum Kopf, führt daher in der Praxis unweigerlich zu großen intra- und interindividuellen Schwankungen der Exposition im Probandenkollektiv.

Die Expositionseinrichtungen haben in der Praxis gewisse, aus dem biologischen/medizinischen Versuchsdesign ableitbare Randbedingungen zu erfüllen. Es ist immer ein Kompromiss zwischen optimierten Expositionsbedingungen und einer im Sinne der biologischen/medizinischen Versuchsdurchführung geforderten Praktikabilität der zu finden. Darum ging der Entwicklung der Expositionsanlage für dieses Projekt eine grundlegende Diskussion zwischen Technikern und Biowissenschaftlern voraus. Als gemeinsamer Nenner wurde die Expositionseinrichtung für die Mundschleimhaut optimiert. Das erlaubt genaue Dosimetrie einerseits und einfache (unblutige) Probenname andererseits.

### 3.2 ANFORDERUNGEN AN DAS EXPOSITIONSSYSTEM

Die Wahl der Mundschleimhaut als Zielgewebe hat mehrere methodische Vorteile:

- der relativ kurze Erneuerungszyklus der Mundschleimhaut (ca. 2-3 Wochen) ermöglicht die Analyse von Effekten in unterschiedlichen Zellreifestadien
- die exponierten Zellen sind leicht (nicht-invasiv) zu gewinnen
- es können parallele Untersuchungen mit *in vitro* Exposition erfolgen

Für die Durchführung der hier zur Diskussion stehenden Untersuchung bezüglich möglicher Einflüsse hochfrequenter elektromagnetischer Felder von UMTS Mobiltelefonen auf die Zellen der Mundschleimhaut wurden in Zusammenarbeit mit der medizinischen Versuchsleitung folgende Anforderungen an das Expositionssystem definiert:

- minimale (Bewegungs-) Einschränkung der Probanden
- Exposition doppelt verblindet schaltbar, alternativ auf der linken oder rechten Kopfseite
- 2 unterschiedliche Expositionsstufen (niedrig / hoch)
- hohe Expositionsstufe nahe dem SAR-Teilkörpergrenzwert für die Allgemeinbevölkerung, aber nicht darüber
- Minimierung der Expositionsunsicherheit (intra- und interindividuelle Variationen)
- hohe Leistungseffizienz und damit geringe Verstärkerkosten
- doppelt verblindete Applikation der Befeldung über bedienungsfreundliche Steuersoftware
- lückenlose Überwachung und Aufzeichnung der expositionsrelevanten Systemparameter während der Experimente zur Qualitätssicherung bzw. Sicherheit der Probanden im Fehlerfall

### 3.3 GESAMTKONZEPTION

#### 3.3.1 Überblick

Abbildung 3.1 zeigt eine vereinfachte Darstellung des System-Konzeptes. Die Probanden befinden sich während der Exposition in einer, an den 4 Seitenwänden mit HF-Absorbern ausgekleideten Expositions kabine (nicht dargestellt) und bearbeiten dort die vom Testleiter vorgegebenen Aufgaben. Das HF-Signal zur Exposition der Probanden wird entsprechend der vorzugebenden Befeldungsbedingung generiert, verstärkt und über computergesteuerte Schalter mittels Kabel der Antenne auf der rechten oder linken Seite des vom Probanden getragenen Headsets zugeführt (durch Expositionssoftware auf Notebook doppelblind gesteuert). Alle für die Exposition der Probanden relevanten Daten (Vorwärts- und Rückwärtsleistung) werden in 10-Sekunden-Intervallen erfasst und mit einem Zeitstempel versehen auf dem Steuerrechner (Notebook) in verschlüsselter Form gespeichert.

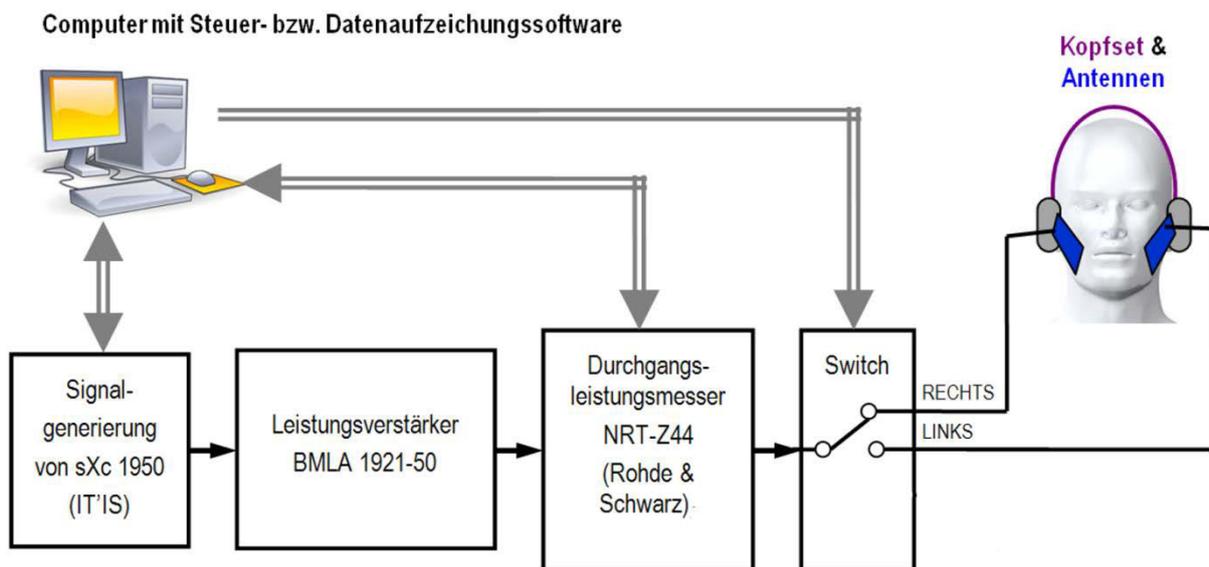


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Expositionssystems

#### 3.3.2 Signalgenerierung und Verstärkung

Die Generierung des HF-Signals erfolgt durch eine UMTS-Signalgenerierungseinheit, ursprünglich entwickelt von der IT'IS Foundation (Zürich, Schweiz) für die Exposition von Zellen im Rahmen von *in vitro* Studien. Grundsätzlich ist die Vielfalt der in der Praxis auftretenden möglichen Sendesignalformen durch die speziellen Signalisierungsformen und die Sendeleistungsregelung moderner Mobilfunksysteme unendlich groß, sodass im Rahmen von Experimenten immer nur eine Auswahl von typischen Signalformen zu wählen ist. Im vorliegenden Fall wurden (im Rahmen der technischen Spezifikationen UMTS liegende) Signale verwendet, die möglichst ausgeprägte niederfrequente Schwankungen der Sendeleistung beinhalten.

UMTS besitzt in der gegenwärtig verbreiteten Ausprägung kein Zeitvielfach-Zugriffsverfahren. UMTS Handys strahlen, im Gegensatz zu GSM Handys, keine HF-Pakete ab, sondern ein breitbandiges, speziell codiertes Signal. Dennoch ist in der Praxis davon auszugehen, dass die von UMTS Handys abgestrahlte Sendeleistung

starke zeitliche Schwankungen aufweisen kann. Grund dafür ist die bei UMTS notwendige und daher implementierte extrem effiziente Sendeleistungsregelung, die 1500-mal pro Sekunde die Sendeleistung an die gerade herrschenden Empfangsbedingungen anpasst. Da die resultierenden Schwankungen der Sendeleistung daher maßgeblich durch die Empfangsbedingungen bestimmt sind, ist es, anders als bei GSM, bei UMTS praktisch nicht möglich „typische“ Signalisierungsverläufe vorherzusagen. Da niederfrequente Anteile in der Signaleinhüllenden als möglicherweise biologisch relevant angesehen werden müssen, wurde für die UMTS-Experimente eine synthetische Signalform verwendet, die - unter Einhaltung der UMTS-Spezifikationen - zu maximalen niederfrequenten Anteilen in der Signaleinhüllenden führt.

Abbildung 3.2 zeigt den Zeitverlauf der Einhüllenden des verwendeten UMTS-Expositionssignals (Mittenfrequenz 1950 MHz, Bandbreite 5 MHz). Die Einhüllende dieses Signals enthält signifikante niederfrequente Frequenzkomponenten bis in den Bereich von 1500 Hz. Dieses Signalform wurde bereits in einer Vielzahl (internationalen) *in vitro* Studien eingesetzt und wurde auch im Rahmen des ATHEM-2 Projekts für die parallel zu den Human Experimenten laufenden *in vitro* Versuche verwendet wodurch vergleichende Bewertungen der Ergebnisdaten möglich waren. Nähere technische Details der verwendeten Signalform können <sup>[28]</sup> entnommen werden.

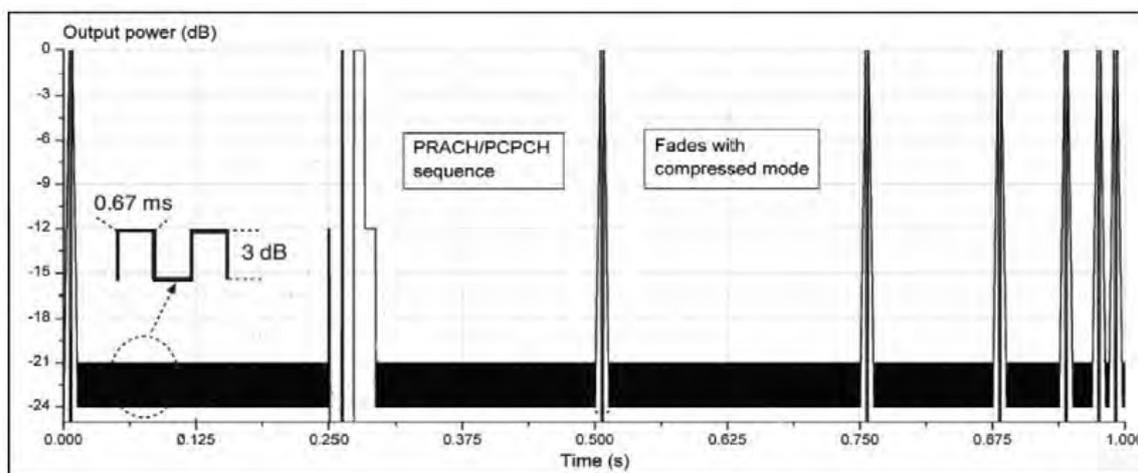


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Expositionssignals

Zur Signalverstärkung wird ein 50 W Linear-Leistungsverstärker BLMA 1921-50 der Fa. Bonn verwendet. Alle Komponenten zur Signalgenerierung, Signalverstärkung, sowie zur Leistungsmessung wurden kompakt in einem versperrbaren 19 Zoll Rack untergebracht (Abbildung 3.3). Die Frontscheibe des 19 Zoll Racks wurde, zur Sicherstellung der Verblindung für den Zeitraum der Experimente an der Innenseite mit einem nicht-transparentem Sichtschutz ausgestattet (in Abbildung 3.3 nicht dargestellt).



Abbildung 3.3: Aufbau der Signalgenerierungs- und Verstärkungseinheit, untergebracht in einem 19 Zoll Rack (Hintergrund) und Laptop Computer mit Steuer- und Aufzeichnungssoftware (Vordergrund), installiert am Institut für Umwelthygiene, Kinderspitalgasse, 1090 Wien.

Grundsätzlich waren gemäß dem Studiendesign vier unterschiedliche Expositionsbedingungen (Versuchsbedingungen) vorgesehen:

- hohe Exposition auf der rechten Kopfseite (HR)
- hohe Exposition auf der linken Kopfseite (HL)
- niedrige Exposition auf der rechten Kopfseite (NR)
- niedrige Exposition auf der linken Kopfseite (NL)

Als nicht-exponierte Kontrolle dienten jeweils die Wangenschleimhautzellen der nicht exponierten Kopfseite (Kontralateralseite).

Die Auslegung des Expositionssystems erfolgte unter der Zielvorgabe im für einen typischen Wangenschleimhautabstrich zugänglichen Bereich in der hohen Expositionsstufe eine mittlere SAR in der Wangenschleimhaut von ca. 1,6 W/kg zu erreichen. Die Exposition in der niedrigen Expositionsstufe sollte gegenüber der hohen Expositionsstufe ausreichend abgesenkt sein, sodass unter Berücksichtigung der Systemunsicherheiten eine statistisch eindeutige Abgrenzung zwischen hoher und niedriger Exposition möglich ist.

### 3.3.3 Headset und Antennen

Um die Relativposition zwischen Antenne und Kopf möglichst konstant zu halten und somit die intra- und interindividuellen Variationen der Exposition im Probandenkollektiv zu minimieren, wurden die Antennen mittels eines speziell entwickelten Headsets am Probandenkopf fixiert. Der Proband trägt dieses Headset wie einen Stereo Kopfhörer. (Abbildung 3.4). Die Anspeisung der Antennen erfolgt über dünne Koaxialkabel von oben (HF-Kabel an der Decke bis oberhalb des Probanden geführt). Die Antennen selbst sind über eine Justiervorrichtung aus Kunststoff am Headset montiert um deren Relativposition zum Kopf optimal an die Probanden anpassen zu können.



Abbildung 3.4: Proband mit angelegtem Headset

Bei den Antennen selbst handelt es sich um Patchantennen (Backplane  $95 \times 55 \text{ mm}^2$ , Patch  $70 \times 36,5 \text{ mm}^2$ ), angepasst auf eine Betriebsfrequenz von 1950 MHz, angeordnet in einem Gehäuse aus Rohacell<sup>®</sup> (extrem leicht und HF-transparent, bei gleichzeitig hoher mechanischer Stabilität). Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 zeigen Details der Antennen. Am Antennengehäuse sind Distanzbolzen vorgesehen, welche die Solldistanz zur Wangenaußenseite sicherstellen. Im Zuge der individuellen Justierung war die Antenne so einzustellen, dass alle 3 Distanzbolzen sanften Kontakt zur Wangenaußenseite hatten. Auf diese Weise wird eine Solldistanz zwischen Patch und Hautoberfläche von 15 mm hergestellt.

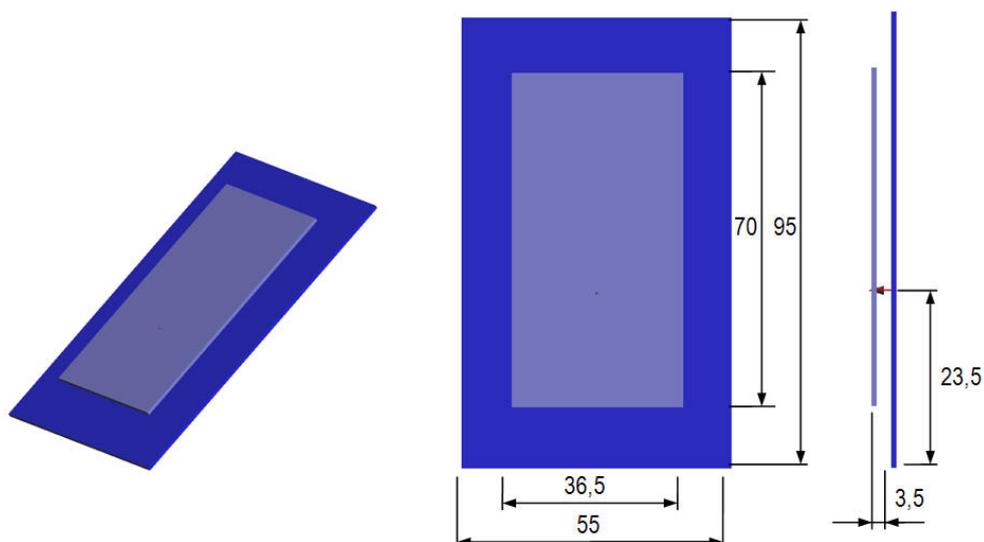


Abbildung 3.5: Skizze der entwickelten Patchantennen

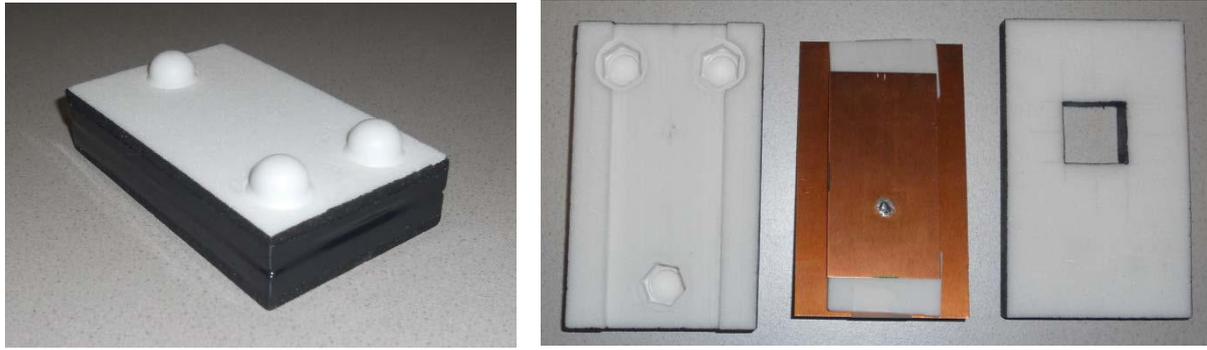


Abbildung 3.6: Fotos der entwickelten Patchantennen.

Linkes Bild: Antenne im Antennengehäuse aus Rohacell®; rechtes Bild: geöffnetes Antennengehäuse (links: Innenansicht der Gehäuse-Vorderseite, Mitte: Antenne mit Distanzhaltern für Patch aus Rohacell®, rechts: Innenansicht der Gehäuse-Rückseite mit Aussparung für Antennenstecker.

Wesentlich während der Antennenentwicklung war auch die Beachtung bzw. Vermeidung/Minimierung möglicher Erwärmungseffekte an der Antenne, die von den Probanden wahrgenommen werden könnten (Gefahr der Entblindung). Messungen der Erwärmung an der Antennenoberfläche ergaben bei einer Antenneneingangsleistung von 1 W weniger als 1,5°C. Bei den im Zuge der Experimente verwendeten Antenneneingangsleistungen ( $\leq 90$  mW, siehe Abschnitt 3.4.4) kann eine wahrnehmbare Erwärmung durch die Antenne ausgeschlossen werden.

### 3.3.4 Ablaufsteuerung und Datenaufzeichnung

Die Ablaufsteuerung durch die Steuer- und Datenaufzeichnungssoftware (programmiert in LabView, Version 8.0) erfolgt doppelblind und pseudozufällig über ein einfach verständliches und gegenüber Bedienungsfehlern resistentes User Interface. Der Testleiter muss lediglich den betreffenden Probanden anhand seiner eindeutigen ID auswählen und nach ordnungsgemäßem Anlegen des Headsets die Sitzung am Computer starten. Die Steuersoftware startet danach automatisch und pseudozufällig die richtige Exposition (LINKS/RECHTS, HIGH/LOW) für die im Studiendesign vordefinierte Expositionsdauer. Während der gesamten Sitzung erfolgt die kontinuierliche Überwachung und Aufzeichnung der für die Exposition relevanten Parameter (Vorwärts- und Rückwärtsleistungsmessung). Alle expositionsrelevanten Daten werden am Steuerrechner in verschlüsselter Form gespeichert und regelmäßig gesichert. Vorgesehen wird auch die vorzeitige und/oder zwischenzeitliche Unterbrechung der Exposition. Die Funktion der Expositionsanlage wird kontinuierlich überwacht und im Falle von Systemfehlern (Antennendefekt, Kabelbruch, etc.) erfolgt die Auslösung eines Alarms und die Unterbrechung der aktuellen Sitzung. Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 zeigen exemplarisch zwei Screenshots der Steuer- und Datenaufzeichnungssoftware.

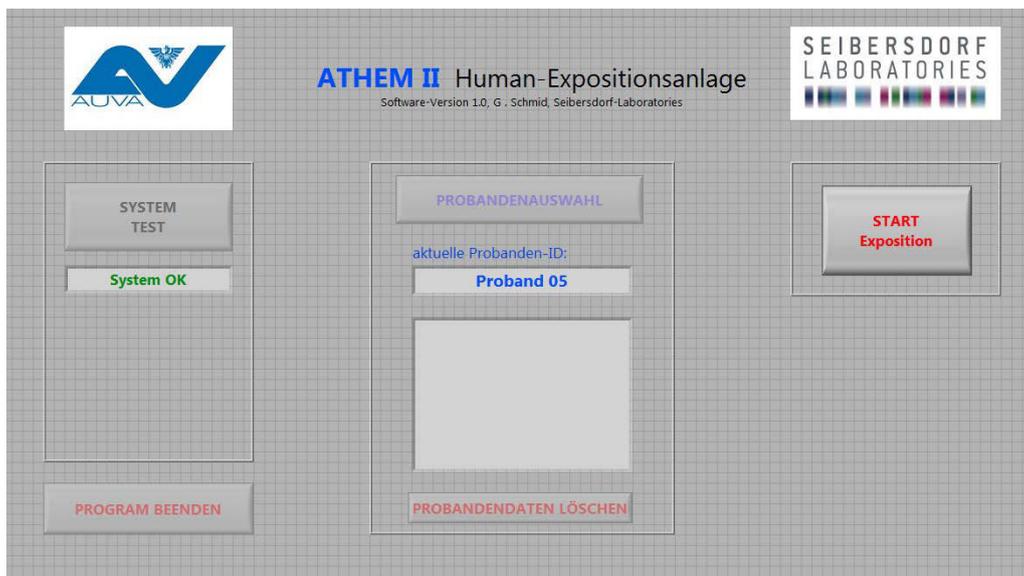


Abbildung 3.7: User Interface der Steuer- und Aufzeichnungssoftware. Bild nach erfolgreichem automatischen Systemtest und Anlegen/Aufrufen eines Probanden, bereit zum Starten der Exposition.

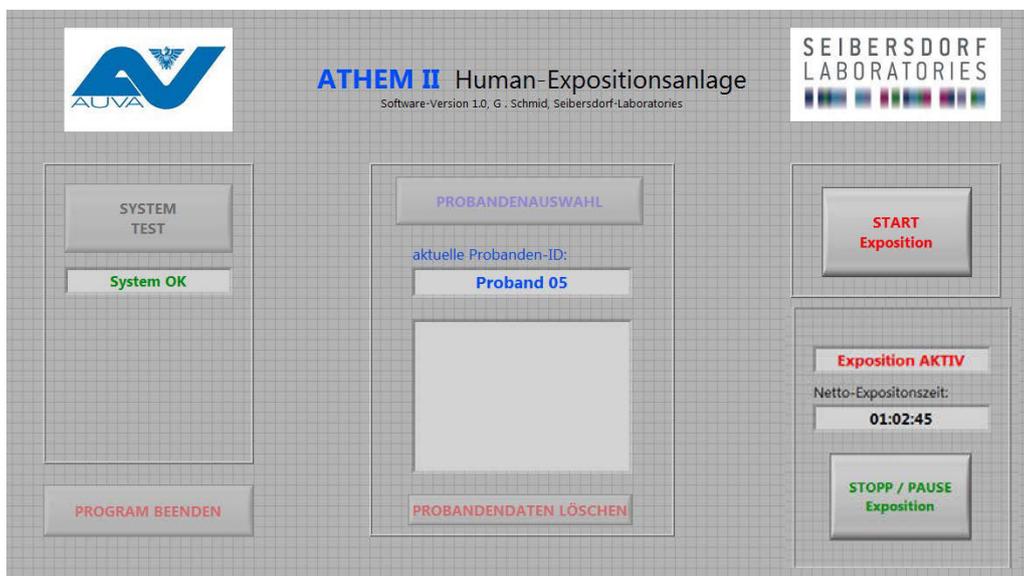


Abbildung 3.8: User Interface der Steuer- und Aufzeichnungssoftware Bild während der Exposition.

### 3.4 DOSIMETRIE UND UNSICHERHEITSABSCHÄTZUNG

Eine sorgfältige dosimetrische Evaluierung bzw. Entwicklungsbegleitung beim Design von Expositionseinrichtungen ist die essentielle Grundlage für eine zuverlässige und sichere Durchführung von Provokationsstudien. Die wesentlichen Schritte sind dabei:

**Auswahl eines Antennenkonzepts:** Bereits an dieser Stelle kann es notwendig sein einfache numerische Berechnungen bzw. experimentelle Messungen an Antennen-Prototypen durchzuführen, um bereits im Vorfeld abzuklären, ob das angestrebte Antennenkonzept die Erwartungen (hinsichtlich Effizienz, und Abstrahlcharakteristik) erfüllen kann.

**Erstellen eines numerischen Antennenmodells:** Da die Absorptionsverteilung im Kopf bzw. im Körper auf experimentellem Weg nicht bestimmt werden kann, sind

dosimetrische Berechnungen auf Basis von aufwändigen Computersimulationen und unter Verwendung detaillierter numerischer und anatomisch korrekter Kopfmodelle unerlässlich für die Dosisfindung im Vorfeld der Studie. Neben der Verfügbarkeit der genannten Kopfmodelle ist selbstverständlich auch ein numerisches Modell der Antenne, mit möglichst exakt gleichen Eigenschaften wie die realen Antennen essentiell. Die Entwicklung eines solchen numerischen Antennenmodells stellt oftmals eine der größten Herausforderungen dar. Jedenfalls muss das entwickelte numerische Antennenmodell auf Basis von Computersimulationen und experimentellen Messungen entsprechend evaluiert werden, um seine Entsprechung sicherzustellen.

**Dosisfindung:** Ist ein, die realen Antennen korrekt wiedergebendes numerisches Antennenmodelle gefunden, besteht der nächste Schritt in der Dosisfindung. Auf Basis von Computersimulationen unter Verwendung heterogener, anatomisch korrekter numerischer Kopfmodelle muss ermittelt werden, wie viel HF-Leistung der Antenne zugeführt werden muss, um die gewünschte SAR in den Zielgeweben zu erreichen. Kabelverluste und Antennenanpassung (und eventuelles De-Tuning der Antennen in Kopfnähe) sind dabei zu berücksichtigen. Die Verwendung stark vereinfachter Kopfmodelle (wie z.B. des für die Zulassungsprüfung von Mobiltelefonen standardisierten SAM-Phantoms) für die Dosisfindung ist im Allgemeinen kein sinnvoller Ansatz, da damit natürlich die detaillierte HF-Absorption in den einzelnen Gewebeschichten nicht erfasst werden kann. Weiters ist das SAM-Kopfmodell (und seine dielektrischen Eigenschaften) bewusst als konservatives Modell z.B. für die Zulassung vor der Markteinführung ausgelegt, d.h. die tatsächliche Absorption im menschlichen Kopf wird damit (auch bei Mittelung über alle unterschiedlichen Gewebe) im Allgemeinen überschätzt.

**Unsicherheitsanalyse:** Schließlich ist für die entwickelte Expositionseinrichtung eine Unsicherheitsanalyse hinsichtlich möglicher intra- und interindividueller Variationen der Exposition durchzuführen. Dies ist unerlässlich, um die statistische Auswertung der Studienergebnisse auf eine sichere Basis zu stellen, da die Variationen der Exposition in der Praxis, je nach Konzept und technischer Ausführung der Expositionseinrichtung beträchtlich sein können. Die wesentlichsten Eingangsgrößen für die Unsicherheitsanalyse sind:

- Variationen (wenn auch nur klein) der relativen Position zwischen Antenne und Kopf
- Unterschiedliche Kopfgrößen und Kopfformen der Probanden
- Unterschiedliche dielektrischen Eigenschaften der Gewebe zwischen den Probanden
- Stabilität der Signalquelle und des HF-Verstärkers (zumeist vernachlässigbar gegenüber den anderen Einflussgrößen)

Nach Literaturrecherchen betreffend die Gewebesichtung im Wangenbereich erfolgte zunächst auf numerischem Weg die Optimierung der Antennengeometrie auf Basis von numerischen Berechnungen mit einfachen planaren Gewebesichtmodellen. Die optimierte Antennengeometrie wurde als Prototyp realisiert und das entsprechende numerische Antennenmodell validiert. Zur Dosisfindung und zur Abschätzung der zu erwartenden dosimetrischen Unsicherheiten bzw. der inter-individuellen

Schwankungsbreiten der relevanten dosimetrischen Größen, wurden zunächst numerische Berechnungen mit planaren Gewebeschichtmodellen durchgeführt, welche die anatomische Situation im Wangenbereich annähern. Die Gewebeschichtdicken und die dielektrischen Gewebeparameter wurden innerhalb anatomisch bzw. physiologisch sinnvoller Grenzen, unabhängig voneinander variiert (dielektrische Gewebeparameter elektrische Leitfähigkeit  $\sigma$  und relative Permittivität  $\epsilon_r$ , jeweils  $\pm 20\%$  ausgehend von Nominalwerten nach Gabriel<sup>[29]</sup>). Schließlich erfolgten numerische Simulationen mit anatomischen Kopfmodellen, um die Übertragbarkeit der dosimetrischen Befunde aus den Berechnungen mit den planaren Gewebeschichtmodellen abzusichern. Alle numerischen Berechnungen erfolgten mit der Simulationsplattform SEMCAD X (Version 14.4, Schmid & Partner Engineering AG, Zürich, Schweiz).

### 3.4.1 Validierung der Antenne

Die aus den oben genannten Berechnungen hervorgehende optimierte Antennengeometrie (Abbildung 3.5) wurde in Form eines Prototyps realisiert und auf Basis eines Vergleichs von SAR-Messungen und entsprechenden numerischen Berechnungen bei Positionierung vor einem homogenen flachen Phantom ( $\sigma=1,4$  S/m  $\epsilon_r=38$ ) validiert (Abbildung 3.9). Als Abstände zum flachen Phantom wurden 10 mm, 15 mm und 20 mm betrachtet.

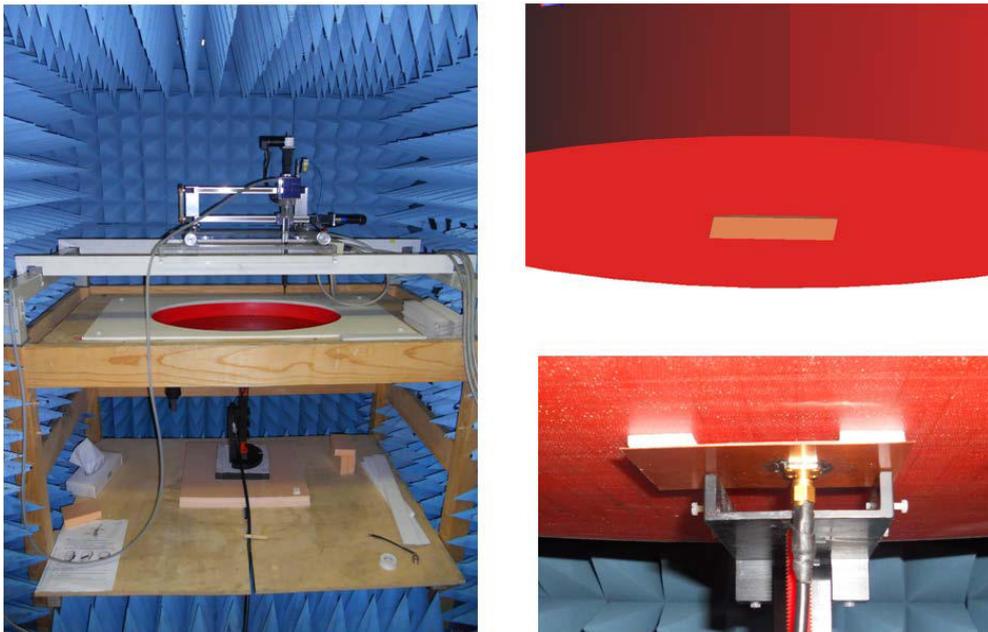


Abbildung 3.9: Anordnung zur Antennennvalidierung,  
links und rechts unten: Messanordnung, rechts oben: Computermodell

Es konnte hinreichende Übereinstimmung zwischen Messung und Berechnung erreicht werden. Die maximalen Abweichungen bezüglich der lokalen SAR-Verteilung lagen bei weniger als  $\pm 30\%$ , jene bezüglich der maximalen über 10g gemittelten SAR (maxSAR10g) bei weniger als  $\pm 9\%$ .

Weiters ergibt sich aus den Messungen und Berechnungen im homogenen Flachphantom, eine Leistungseffizienz bezüglich der maxSAR10g von ca. 22 W/kg pro Watt Antenneneingangsleistung.

### 3.4.2 Numerische Berechnungen mit planaren Gewebemodellen

Um den SAR Werte zu berechnen wurden mit dem validierten Antennenmodell dosimetrische Berechnungen mit einem planaren Gewebeschichtmodell durchgeführt. Abbildung 3.10 zeigt das verwendete Gewebeschichtmodell mit Berücksichtigung von Haut, Fett, Muskel, Mundschleimhaut und ein dahinter, in der Mundhöhle und direkt an die Mucosa (Schleimhaut) anliegendes „Gewebe“. Die Gewebeschichtdicken und die dielektrischen Gewebeparameter wurden innerhalb anatomisch bzw. physiologisch sinnvoller Grenzen, unabhängig voneinander variiert (dielektrische Gewebeparameter elektrische Leitfähigkeit  $\sigma$  und relative Permittivität  $\epsilon_r$ , jeweils  $\pm 20\%$  ausgehend von Nominalwerten nach Gabriel<sup>[29]</sup>). Tabelle 3.1 gibt die betrachteten Variationsbreiten der Gewebeschichtdicken an. Als in der Mundhöhle liegendes Gewebe wurden unabhängig voneinander Luft, Zahn, und Zunge angenommen und die daraus resultierenden Variationsbreiten der dosimetrischen Zielgröße (SAR in der Mundschleimhaut) bestimmt. Die Distanz der Antennenoberfläche zum Gewebeschichtmodell betrug  $15 \pm 3$  mm).

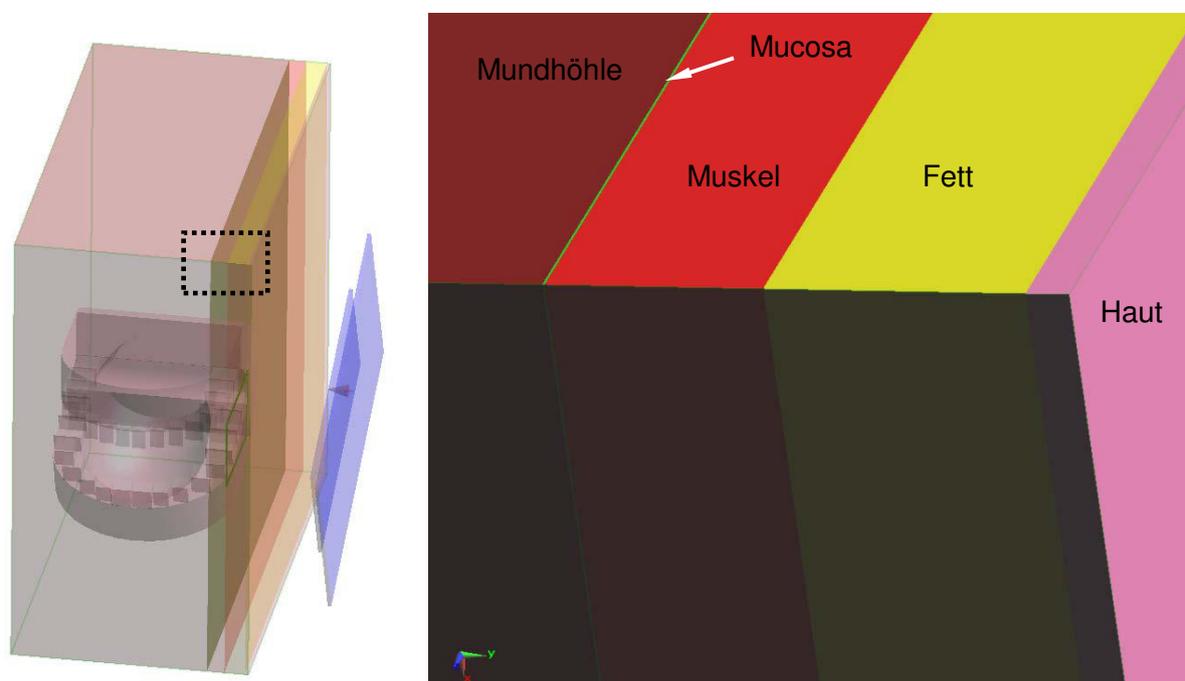


Abbildung 3.10: Planares Gewebeschichtmodell

Gewebeschicht	Nominaldicke	Dickenbereich
Haut	1,5 mm	1 mm ... 2 mm
Fett	6 mm	3 mm ... 9 mm
Muskel	5 mm	2 mm ... 8 mm
Mundschleimhaut	50 $\mu$ m	20 $\mu$ m ... 50 $\mu$ m

Tabelle 3.1: Betrachteter Bereich der Gewebeschichtdicken (Distanz Antenne-Haut 15 mm)

Aus den insgesamt 36 Einzelsimulationsläufen ergab sich eine mittlere über den interessierenden Bereich (grünes Rechteck in Abbildung 3.11) in der Mundschleimhaut gemittelte SAR von  $18,5$  W/kg ( $\pm 55\%$ ) pro Watt Antenneneingangsleistung.

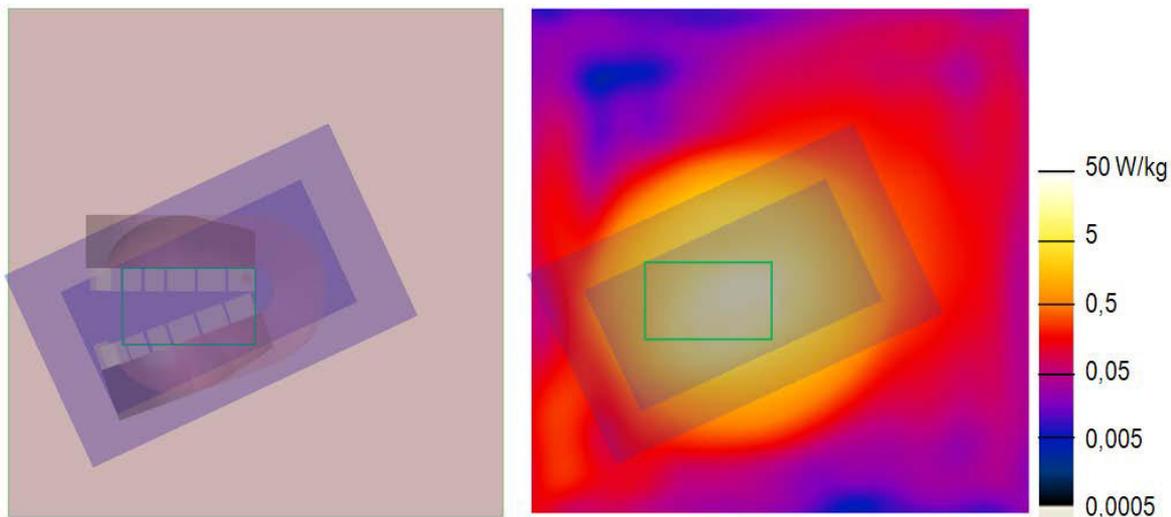


Abbildung 3.11: SAR-Verteilung in der Mundschleimhaut des planaren Gewebemodells in Nominalsituation  $d= 15$  mm, bei einer Antenneneingangsleistung von 1 W.

### 3.4.3 Numerische Berechnungen mit anatomischen Kopfmodellen

Zur Abschätzung der individuell bei den Probanden zu erwartenden SAR-Variabilität wurden Berechnungen mit drei Kopfmodellen vorgenommen. Weiters wurden die dielektrischen Gewebeparameter ( $\pm 20\%$  ausgehend von Nominalwerten nach <sup>[29]</sup> variiert und unterschiedliche Antennenpositionen relativ zum Kopf angenommen. Konkret wurden Verschiebungen nach unten, oben, vorne und hinten um jeweils bis zu 10 mm aus der Nominalposition, sowie eine Variation der Distanz der Antennenoberfläche (zur Hautoberfläche) von  $\pm 3$  mm angenommen. Zusätzlich wurde der Einfluss von metallischen Zahnfüllungen untersucht.

Die Berechnungen erfolgten mit drei unterschiedlichen anatomischen Kopfmodellen, die ein relativ breites Spektrum der im Wangenbereich zu erwartenden anatomischen Variabilität abdecken (Abbildung 3.12). Da gegenwärtig verfügbare anatomische Kopfmodelle aufgrund beschränkter räumlicher Auflösung keine individuelle Unterscheidung der Mundschleimhaut ermöglichen, wurde auf der jeweils betrachteten Kopfseite, an der Innenseite der Mundhöhle manuell eine ca. 35  $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschicht als Mundschleimhaut modelliert.

Aus den insgesamt 35 Simulationen ergab sich eine mittlere über den interessierenden Bereich in der Mundschleimhaut gemittelte SAR von 12,8 W/kg ( $\pm 49,7\%$ ) pro Watt Antenneneingangsleistung. Für die maxSAR10g ergaben sich aus den Simulationen mit den anatomischen Kopfmodellen unter den betrachteten Bedingungen 19,0 W/kg ( $\pm 27,6\%$ ) pro Watt Antenneneingangsleistung.

Eine Analyse der Homogenität der SAR-Verteilung im Zielareal zeigte, dass bei nominaler Antennenposition mehr als ca. 76% des Schleimhautgewebes oberhalb von 50% des SAR-Maximalwertes und 93% des Schleimhautgewebes oberhalb von 32% des SAR-Maximalwertes liegen.

Schließlich zeigte sich, dass metallische Zahnfüllungen, die direkten Kontakt zur Schleimhaut haben im Berührungsbereich zu lokalen SAR-Überhöhungen führen und damit die Homogenität der Exposition beeinflussen können. Bei der Probandenrekrui-

tierung sollte daher auf derartige Konstellationen geachtet bzw. diese möglichst vermieden werden.

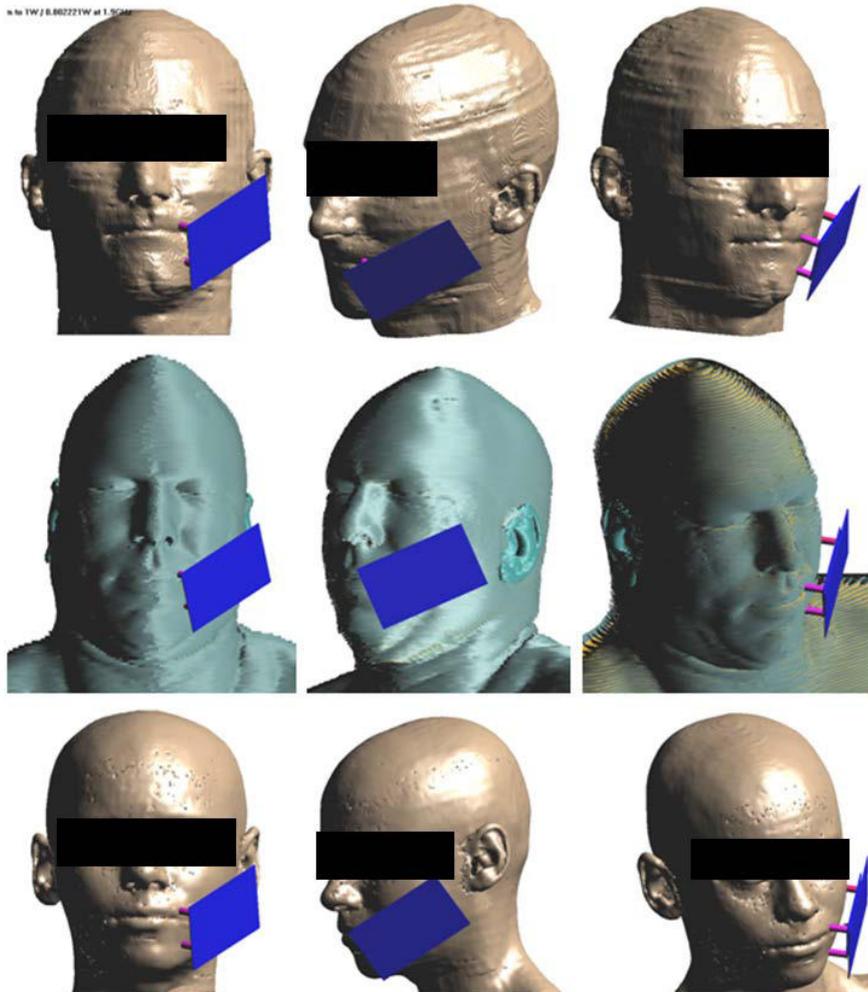


Abbildung 3.12: Anatomische Kopfmodelle mit Antenne in Normalposition

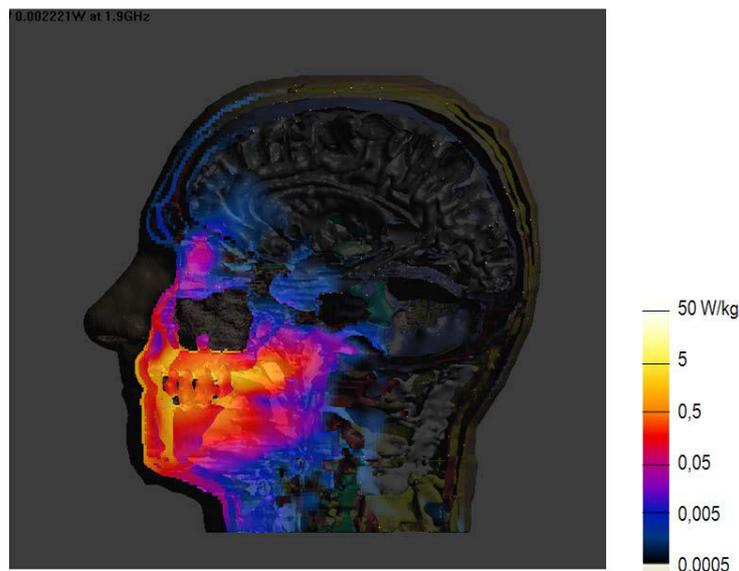


Abbildung 3.13: SAR-Verteilung in einer Vertikalebene durch einen Teil der (gewölbten) Mundschleimhaut des anatomischen Kopfmodells „Duke“ (34 jähriger Erwachsener) in Nominalsituation  $d= 15$  mm, bei einer Antenneneingangsleistung von 1 W.

### 3.4.4 Festlegung der Expositionsstufen und Antenneneingangsleistungen

Einerseits soll eine möglichst hohe Exposition im Zielareal der Mundschleimhaut erfolgen, jedoch darf aus ethischen Gründen die maxSAR<sub>10g</sub> im Kopf der Probanden den gegenwärtig von der ICNIRP festgelegten Basiswert von 2 W/kg nicht überschreiten. Aus den Messungen und Berechnungen am homogenen Flachphantom, die definitionsgemäß als konservatives Maß der tatsächlichen Exposition angesehen werden können, sowie aus den Berechnungen mit den anatomischen Kopfmodellen ergibt sich übereinstimmend eine maximale maxSAR<sub>10g</sub> von ca. 22 W/kg pro Watt Antenneneingangsleistung. Für die hohe Expositionsstufe wird daher eine effektive Antenneneingangsleistung von 90 mW festgelegt. Bei dieser Antenneneingangsleistung wird auf Basis der oben angeführten Ergebnisse eine mittlere SAR im Zielareal der Mundschleimhaut von 1,15 W/kg ( $\pm 49,7\%$ , aus Berechnungen mit anatomischen Kopfmodellen) bzw. 1,67 W/kg ( $\pm 55\%$ , aus Berechnungen mit planarem Gewebeschichtmodell) erreicht. Fasst man in konservativer Weise die Ergebnisse aus beiden Untersuchungen (anatomische Modelle und Gewebeschichtmodell) zusammen ergeben sich ein Variabilitätsbereich für die mittlere SAR in der Mundschleimhaut von 0,58 -2,59 W/kg.

Berücksichtigt man weiter die Inhomogenität (93% oberhalb von 32% des Maximalwertes), ist davon auszugehen, dass in der hohen Expositionsstufe in 93% des Mundschleimhautgewebes im Zielareal die SAR größer als 0,19 W/kg ist. Es wird daher vorgeschlagen die niedrige Expositionsstufe um einen Faktor 15 geringer als die hohe Expositionsstufe zu wählen. Damit kann für ca. 95% des Mundschleimhautgewebes eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Expositionsstufen sichergestellt werden.

Als mittlere Antenneneingangsleistungen in der hohen und niedrigen Expositionsstufe ergeben sich damit:

$$P_{\text{ant,HIGH}}: 90 \text{ mW} \Rightarrow \text{SAR}_{\text{Mucosa\_avg, HIGH}}=1,59 \text{ W/kg} (\pm 63\%)$$

$$P_{\text{ant,LOW}}: 6 \text{ mW} \Rightarrow \text{SAR}_{\text{Mucosa\_avg, HIGH}}=0,11 \text{ W/kg} (\pm 63\%)$$

### 3.4.5 Exposition der Kontrollseite (Scheinexposition)

Als nicht-exponierte Kontrollen im Zuge der statistischen Auswertung dienten die von der kontralateralen Wange geernteten Wangenschleimhautzellen, also Schleimhautzellen von der der jeweils aktiven Antenne gegenüber liegenden Wange. Aus diesem Grund wurde auch die in diesem Bereich ankommende Restexposition quantitativ, auf Basis numerischer Berechnungen ermittelt. Berücksichtigt wurden dabei einerseits unterschiedliche Ausbreitungsbedingungen im Mund und andererseits parasitäre (sekundäre) HF-Einkopplungen in die Antenne auf der jeweils nicht-exponierten Seite (Antenne ist, wenn nicht aktiv, immer mit 50 Ohm abgeschlossen). Bezüglich der Ausbreitungsverhältnisse im Mund wurde neben dem „Normalfall“, mit einem kleinen Luftspalt (1-5 mm) zwischen Gaumen und Zunge, ein Extremfall ohne Zunge angenommen. Dies wurde im Simulationsmodell dadurch berücksichtigt, dass die dielektrischen Gewebeeigenschaften des gesamten Zungengewebes gleich jenen für

Luft gesetzt wurden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Es zeigte sich dabei, dass im Extremfall („ohne Zunge“) die Exposition auf der gegenüberliegenden Seite gegenüber dem Normalfall erwartungsgemäß (um bis zu einem Faktor 3) größer ist, aber dennoch deutlich unterhalb des Expositions-niveaus auf Antennenseite liegt und statistisch vernachlässigt werden kann, selbst wenn man zusätzlich noch die Gesamt-Expositionsunsicherheit von  $\pm 63\%$  hinzunimmt.

SAR-Verhältnis ipsilateral/kontralateral			
		maximale SAR	mittlere SAR
„normale Zunge“, kleiner Luftspalt zwischen Zunge und Gaumen		24,6 dB (Faktor 288)	23,9 dB (Faktor 245)
„ohne Zunge“ (Zunge als Luft modelliert)		20,3 dB (Faktor 107)	19,2 dB (Faktor 83)
SAR-Variation ipsilateral/kontralateral im Extremfall „ohne Zunge“			
		maximale SAR	mittlere SAR
Hohe Expositionsstufe	Ipsilateral	6,90 W/kg	1,73 W/kg
	Kontralateral	0,083 W/kg	0,016 W/kg
Niedrige Expositonsstufe	Ipsilateral	0,45 W/kg	0,12 W/kg
	Kontralateral	0,0054 W/kg	0,0011 W/kg

Tabelle 3.2: Berechnungsergebnisse bezüglich ungewollter Exposition der kontralateralen (gegenüberliegenden) Seite,

### 3.5 EXPOSITIONSDATENANALYSE UND ENTBLINDUNG

Die während der Sitzungen aller Probanden aufgezeichneten Expositionsdaten (Abschnitt 4.2.4) wurden im Detail analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass alle Expositionsparameter innerhalb des erwarteten Unsicherheitsbereiches lagen und die Befeldungsbedingungen als valide angesehen werden können.

Am 09.12.2014 erfolgte die Teilentblindung und am 29.12.2014 schließlich die Vollentblindung der Expositionsdaten.

Nr	Probanden-name	Expositions-bedingung	Nr	Probanden-name	Expositions-bedingung
1	Al.	HOCH RECHTS	22	Mü.	HOCH RECHTS
2	Am.	NIEDRIG LINKS	23	Op.	NIEDRIG RECHTS
3	Ba. A-K	HOCH LINKS	24	Pr.	NIEDRIG LINKS
4	Ba.	NIEDRIG LINKS	25	Ra.*)	HOCH LINKS
5	Be.	HOCH RECHTS	26	Rei.	HOCH LINKS
6	Br.	HOCH LINKS	27	Scha.	NIEDRIG LINKS
7	Fr.	NIEDRIG LINKS	28	Schi.	HOCH LINKS
8	Fu.	HOCH LINKS	29	Schn.	HOCH LINKS
9	Gr.	HOCH RECHTS	30	Schr.	NIEDRIG RECHTS
10	Gu.	NIEDRIG RECHTS	31	Schw.	NIEDRIG RECHTS
11	Hal.	HOCH LINKS	32	Se.	NIEDRIG RECHTS
12	Har.	HOCH RECHTS	33	Stei.	NIEDRIG RECHTS
13	He.	HOCH RECHTS	34	Step.	HOCH LINKS
14	Ho.	NIEDRIG RECHTS	35	Str.	NIEDRIG LINKS
15	Hö.	NIEDRIG LINKS	36	Stu.	HOCH RECHTS
16	Ir.	HOCH RECHTS	37	Sy.	HOCH RECHTS
17	Ka.	NIEDRIG RECHTS	38	Un.	NIEDRIG RECHTS
18	Ku.	HOCH RECHTS	39	Wa.	NIEDRIG RECHTS
19	Me.	NIEDRIG RECHTS	40	We.	NIEDRIG LINKS
20	Mos.	HOCH LINKS	41	Za.	NIEDRIG LINKS
21	Mosh.	HOCH LINKS	42	Zi.	HOCH RECHTS



## 4 KOGNITIVE AUSWIRKUNGEN

Titel des Teilprojektes:

### **Experimentelle Untersuchungen zu kognitiven Auswirkungen von UMTS Mobilfunksignalen**

Teilprojektleiter:

Ao.Univ.Prof.Dr. Michael Kundi

Mitarbeiter:

Brigitte Piegler, MTA

Assoz.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Hans-Peter Hutter

Reportredaktion:

Ao.Univ.Prof. Dr. Michael Kundi (Teilprojektleiter, Med. Univ. Wien)

Dipl. Ing. Dr. Hamid Molla-Djafari (Gesamtprojektleiter, AUVA)

Ao.Univ.Prof. Dr. Wilhelm Mosgöller (Gesamtprojektkoordinator, Med. Univ. Wien)

## 4.1 KOGNITVE AUSWIRKUNGEN - PROBLEMSTELLUNG

Auswirkungen von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) des Mobilfunks auf kognitive Leistungen sind in zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen geprüft worden. Diese Untersuchungen geben kein einheitliches Bild. In Tabelle 4.1 sind alle diese Untersuchungen im Überblick angeführt. Von den 43 veröffentlichten Studien zeigten 22 signifikante Effekte der Exposition, wobei die Mehrheit (14) eine Verbesserung der Leistung unter Exposition im Sinne einer Verkürzung der Reaktionszeit oder Erhöhung der Anzahl absolvierter Aufgaben anzeigen. In einigen Untersuchungen zeigt sich die Verkürzung der Reaktionszeit mit einem Trend zu schlechterer Qualität der Leistung verbunden (sogenannter Speed-Accuracy Trade-Off).

In den meisten Untersuchungen waren die Expositionen kurzfristig und nur einmalig getestet worden. Daher erhebt sich die Frage, inwieweit die kognitiven Effekte von der Expositionsdauer abhängen oder sich bei wiederholter Exposition abschwächen oder verstärken. Weiters wurde im Allgemeinen nicht zwischen linker und rechter Kopfseite der Exposition unterschieden und gewöhnlich nur eine Kopfseite exponiert. Es ergeben sich daher aus der bisherigen Forschung drei wesentliche Fragestellungen:

- Wie verändern sich kognitive Effekte im Verlauf einer längeren Exposition?
- Gibt es eine Abschwächung oder Zunahme der Effekte über mehrere Tage?
- Spielt die Kopfseite, an der exponiert wird, eine Rolle?

Um diese Fragen beantworten zu können wurde ein randomisiertes Gruppendesign mit Doppelverblindung (d.h. weder die Untersuchungspersonen noch der Versuchsleiter sind über die Expositionsparameter informiert) gewählt.

Tabelle 4.1. Übersicht über Studien zu kognitiven Effekten von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks  
 SRT...Simple Reaction Task (einfacher Reaktionstest); CRT...Choice Reaction Task (Wahlreaktionstest); CW...Continuous Wave (unmoduliertes Signal); MHz...Megahertz (Millionen Schwingungen pro Sekunde); PW...Pulsed Wave (Pulsmodulation); RT...Reactiontime (Reaktionszeit); Exp...Exposition; sign...signifikant, EHS...Elektro-Hypersensible, ELF-MF...niederfrequente Magnetfelder, Sham...Scheinexposition (engl.)

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Preece et al. 1999</b> <sup>[30]</sup>	Cross-Over	36 Erwachsene	915 MHz CW und 217 Hz gepulst ~1 W jeweils 30 min während Tests linke Kopfseite	Kognitive Testbatterie	signifikant kürzere RT bei CRT
<b>Koivisto et al. 2000</b> <sup>[31, 32]</sup>	Cross-Over keine Pause Doppelblind	48 Erwachsene Rechtshänder (24m/24w) 18-34 Jahre	GSM 902 MHz 0,65 W/kg 30 min während Test linke Kopfseite	n-back Aufgabe	signifikant kürzere RT bei 3-back
<b>Jech et al. 2001</b> <sup>[33]</sup>	Cross-Over Aufeinanderfolgende Tage Doppelblind	22 Narkolepsie Patienten (9m/13w) 48±12 Jahre	GSM900 0,06 W/kg 45 min Teststart nach 5 min rechte Kopfseite	Aufmerksamkeitstest (odd.ball Paradigma)	signifikant kürzere RT
<b>Edelstyn &amp; Oldershaw 2002</b> <sup>[34]</sup>	Parallelgruppen Einfachblind	38 Studenten, Rechtshänder	Handelsübliches GSM900 Handy 30 min linke Kopfseite (1,19 W/kg??) während Tests	Gedächtnisspanne vorwärts/rückwärts (Ziffern, räumliche Anordnung), serielle Subtraktion, Wortflüssigkeit	5 von 8 Subtests signifikant Effekt der Exposition Verbesserung der Gedächtniskapazität und Schnelligkeit
<b>Lass et al. 2002</b> <sup>[35]</sup>	Unabhängige Gruppen (Exp/Sham)	100 Erwachsene (63m/37w)	450 MHz, 7 Hz AM 1,58 W/m <sup>2</sup> 10-20 min	3 Gedächtnis- und Aufmerksamkeitstests	signifikant höhere Varianz in exp. Gruppe bei 2 Tests, signifikant weniger Fehler bei 1 Test
<b>Lee et al. 2003</b> <sup>[36]</sup>	Parallelisierte Gruppen (Exp/Sham) Einfachblind	78 Studenten (25m/53w) 20±1 Jahre	GSM1800 60 min	Verbindungsaufgabe Daueraufmerksamkeit	signifikant stärkere Reduktion der RT bei Exp.

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Smythe &amp; Costall 2003</b> <sup>[37]</sup>	3 unabhängige Gruppen (no/Exp/Sham)	62 Erwachsene (33m/29w) 18-53 Jahre	GSM1800, 0,79 W/kg, linke Kopfseite 15 min während Lernphase	Kurz- und Langzeitgedächtnis	Bei Männern signifikant weniger Fehler bei Exposition, bei Frauen kein Unterschied
<b>Haarala et al. 2003, 2004</b> <sup>[38, 39]</sup>	Cross-Over 1 Tag Pause Doppelblind	64 Erwachsene (32m/32w) 20-42 Jahre	GSM 902 MHz 0,99 W/kg 65 min während Test linke Kopfseite	SRT, 2CRT, 10CRT, Vigilanztest, Subtraktionstest, Verifikationstest, Stroop-Test, n-back Test	kein Einfluss auf RT und Fehler
<b>Curcio et al. 2004</b> <sup>[40]</sup>	Cross-Over mit Baseline Doppelblind >2 Tage Pause	20 Erwachsene Rechtshänder (10m/10w) 22-31 Jahre	GSM 902,4 MHz linke Kopfseite (Helm), 0,5 W/kg 45 min vor/ 45 min während Test	SRT, visuelle Suchaufgabe, CRT, serielle Subtraktion	signifikant kürzere RT bei SRT und CRT
<b>Hinrichs &amp; Heinze 2004</b> <sup>[41]</sup>	Cross-Over Pause min 24 h ? Doppelblind	12 Erwachsene (2m/10 w) 18-30 Jahre	GSM 1,87 GHz 0,61 W/kg 30 min linke Kopfseite während Lernen	Wiedererkennen	kein Effekt auf Leistung
<b>Hamblin et al. 2004</b> <sup>[42]</sup>	Cross-Over 1 Woche Abstand Einfachblind	12 Erwachsene (4m/8w) Rechtshänder 19-44 Jahre	GSM 894,6 MHz 0,87 W/kg rechte Kopfseite 1 h während Tests	Reaktionstest	signifikant längere RT bei Exp.

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Krause et al. 2004</b> <sup>[43]</sup>	Cross-Over keine Pause Doppelblind	24 Erwachsene Rechtshänder (12m/12w) 24,3±8,1 Jahre	GSM900 Mobiltelefon, 30 min linke Kopfseite (0,65 W/kg) während Tests	modifizierter Sternberg Gedächtnistest	signifikant mehr Fehler bei Exp.
<b>Maier et al. 2004</b> <sup>[44]</sup>	Cross-Over mit Baseline Doppelblind	11 Erwachsene 23-48 Jahre	GSM900 linke Kopfseite (4 cm) zwischen Baseline und Test (50 min)	Auditive Ordnungsschwelle	signifikant geringere Verbesserung bei Exposition
<b>Schmid et al. 2005</b> <sup>[45]</sup>	Multiples Cross-Over Randomisiert Doppelblind	58 Erwachsene (29m/29w) 20-40 Jahre	UMTS 1,97 GHz 0,37/0,037 W/kg linke Kopfseite	Flimmerverschmelzungsfrequenz Trackingtest, Aufmerksamkeits-test, Kontrastempfindlichkeit	kein Effekt der Exposition
<b>Besset et al. 2005</b> <sup>[46]</sup>	Parallel. Gruppen	55 Erwachsene (27m/28w) 18-40 Jahre	GSM900 0,54 W/kg 2h, 5d/w, 6 Wochen 3 d BL/28 d Exp v.Sham/14 d Post	22 neuropsych. Tests 1 BL, 2 Exp, 1 Post	signifikante Effekte auf RT Veränderung (von den Autoren nicht bemerkt!)
<b>Preece et al. 2005</b> <sup>[47]</sup>	Cross-Over 1 Tag Pause Doppelblind	18 Kinder (9m/9w) 10-12 Jahre	GSM900 Mobiltelefon linke Kopfseite 30-35 min, (0,44/0,044 W/kg) während Tests	16 kognitive Tests	signifikanter Effekt bei SRT nicht mehr signifikant nach Bonferroni Korrektur

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Vecchio et al. 2012</b> <sup>[48]</sup>	Cross-Over Abstand 1 Woche Doppelblind	11 Erwachsene Rechtshänder (8m/3w) 24-63 Jahre	GSM 902.4 MHz 0,25 W (0.5 W/kg) 45 min vor Test	CRT	signifikante Verbesserung der RT bei Exp. nicht bei Sham
<b>Curcio et al. 2012</b> <sup>[49]</sup>	Cross-Over Abstand 1 Woche Doppelblind	12 männl. Erwachse- ne Rechtshänder 19- 25 Jahre	GSM 902.4 MHz 0,25 W (0.5 W/kg) 45 min vor Test	CRT	signifikante Verbesserung der RT bei Exp., nicht bei Sham
<b>Haarala et al. 2005</b> <sup>[50]</sup>	Cross-Over 1 Tag Pause Doppelblind	32 Kinder (16m/16w) 10-14 Jahre	GSM 902 MHz Mobil- telefon linke Kopfseite 50 min,(0,99 W/kg) während Tests	SRT, 2CRT,10CRT, Vigilanztest, n-back	kein Einfluss auf RT und Feh- ler
<b>Keetley et al. 2006</b> <sup>[51]</sup>	Cross-Over mit Baseline 1 Woche Pause Doppelblind	120 Erwachsene (58m/62w) 18-70 Jah- re	GSM900 Mobiltelefon 30 min linke Kopfseite vor Tests	Audio-visueller Lern- test, Gedächtnisspan- ne, Ziffer-Symbol Er- setzung, Zahlen ver- binden, RT, CRT, In- spektionszeit	Signifikante Effekte bei 4 von 8 Tests  Verbesserung bei einem, Verschlechterung bei ande- ren Tests
<b>Russo et al. 2006</b> <sup>[52]</sup>	Cross-Over mit 1 Woche Pause Doppelblind	168 Erwachsene (69m/99w) 17-41 Jah- re	888 MHz CW oder GSM  linke oder rechte Kopfseite 35-40 min während Tests	SRT, 10CRT, VT, Sub- traktionstest	kein Effekt der Exp.

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Wilén et al. 2006</b> <sup>[53]</sup>	Cross-Over mit Baseline min. 1 Tag Pause (Doppel)blind	40 Erwachsene (32m/8w) 29-65 Jahre 20 mit Symptomen/ 20 Kontrollpersonen	GSM900 Handy-Signal 8,5 cm rechte Kopfseite, 0,8 W/kg 30 min zwischen Baseline und Test	Sternberg Gedächtnis-test Flimmerverschm.fr.	kein Effekt der Exp. kein Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen
<b>Regel et al. 2006</b> <sup>[54]</sup>	Cross-Over 1 Woche Pause Doppelblind	33 ‚Sensitive‘ (14m/19w) 84 ‚Nicht-Sensitive‘ (41m/43w) 20-60 Jahre	UMTS Basisstations-signal -nur Org.kanal von links hinten (~2m, 25°) 45 min SAR Kopf: 45/4500 µW/kg während Test	SRT, 2CRT, n-back, visuelle Aufmerksamkeit	2CRT signifikant bei Sensitiven 1-back Genauigkeit signifikant bei Nicht-Sensitiven Nicht mehr signifikant nach Adjustierung für multiple Endpunkte
<b>Eliyahu et al. 2006</b> <sup>[55]</sup>	Cross-Over Lateinisches Quadrat Einfachblind Testabstand?	36 männl. Erwachsene Rechtshänder 19-27 Jahre	GSM 890,2 MHz 0.25 W, 2 h linke/rechte Kopfseite während Tests (2 Durchgänge)	Raumlokationstest (FACE), Buchstabenlokationstest, Lateralitätstest, Lateral-Kompatibilitätstest	in 3 der 4 Tests reduzierte RT bei Exp. von links und linke Hand
<b>Hamblin et al. 2006</b> <sup>[56]</sup>	Cross-Over 1 Woche Abstand Doppelblind	120 Erwachsene (46m/74w) 108 Rechtshänder 18-69 Jahre	GSM 895 MHz 0,11 W/kg 30 min während Test rechts oder links	Optische und akustische Reaktionszeit	kein Effekt der Exp.
<b>Terao et al. 2006</b> <sup>[57]</sup>	Cross-Over 1 Woche Pause Doppelblind	16 Erwachsene (9m/7w) Rechtshänder 23-52 Jahre	800 MHz, Japanisches System 0,054 W/kg, 30 min rechte Kopfseite zwischen Prä- und Post-Test	CRT	RT nach Exp. Nicht signifikant kürzer

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Haarala et al. 2007</b> <sup>[58]</sup>	Cross-Over 1 Woche Pause Doppelblind	48 Männer, Rechts- händer 24±2 Jahre	902 MHz CW oder 217 Hz PW 0,25 W (0,738 W/kg) linke oder rechte Kopfseite 90 min während Test	SRT, 2CRT, 10CRT, Vigilanztest, Subtrakti- onstest, Verifikations- test, n-back Test	kein Effekt der Exp.
<b>Cinel et al. 2007</b> <sup>[59]</sup>	Cross-Over + Unab- hängige Gruppen (CW/GSM) und (Links/Rechts)	168 Erwachsene (54m/114w) 18-42 Jahre	888 MHz CW oder GSM 1.4 W/kg 40 min linke oder rechte Kopfseite	Auditive Ordnungs- schwelle	kein Effekt der Exp.
<b>Fritzer et al. 2007</b> <sup>[60]</sup>	Unabhängige Grup- pen Einfachblind	20 männliche Er- wachsene 22-37 Jah- re	GSM 900 MHz 1 W/kg 6 Nächte	Zahlenverbinden Aufmerksamkeitstest Gedächtnistests	kein Effekt der Exp.
<b>Regel et al. 2007</b> <sup>[61]</sup>	Cross-Over 1 Woche Abstand Doppelblind	15 männliche Er- wachsene Rechts- händer 20-26 Jahre	GSM 900 MHz 0.2 und 5 W/kg 30 min linke Kopfseite vor Schlaf	SRT, CRT, n-back Test	Dosisabh. RT Zunahme bei allen Tests, signifikant bei 1- back
<b>Curcio et al. 2008</b> <sup>[62]</sup>	Cross-Over 1 Woche Abstand Doppelblind	24 Erwachsene (12m/12w) Rechts- händer 19-36 Jahre	GSM 902.4 MHz 0,25 W (0.5 W/kg) 3 x 15 min innerh. 85 min rechte Kopfseite	SRT, Sequenztest	kein Effekt der Exp.
<b>Kleinlogel et al. 2008</b> <sup>[63]</sup>	Cross-Over 1 Woche Abstand Doppelblind	15 männliche Er- wachsene Rechts- händer 20-35 Jahre	GSM 900 MHz 1 W/kg UMTS 1950 MHz 0,1 und 1 W/kg 30 min linke Kopfseite	CRT	kein Effekt der Exp.
<b>Leung et al. 2011</b> <sup>[64]</sup>	Cross-Over Abstand min 4 Tage Doppelblind	41 Jugendliche (13-15 Jahre), 42 Erwachse- ne <40, 20 Ältere (55- 70 Jahre)	GSM 849.6 MHz 0,7 W/kg W-CDMA 1900 MHz 1,7 W/kg	Odd-ball Paradigma n- back Aufgabe	Geringere Genauigkeit bei 3G Exposition

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Riddervold et al. 2008</b> <sup>[65]</sup>	Cross-Over min 24 h Abstand Doppelblind	40 Jugendliche (17m/23w) und 40 Erwachsene (24m/16w) 31±4.5 Jahre	2140 MHz CW UMTS 2140 MHz UMTS-ähnlich 45 min, vertikale Polarisation, 2.8 m Distanz 6-13 mW/m <sup>2</sup>	SRT, CRT, Gedächtnistest, Trail-Making Test	kein Effekt der Exp.
<b>Luria et al. 2009</b> <sup>[66]</sup>	Unabhängige Gruppen (rechts/links/Sham) Einfachblind	48 männliche Erwachsene Rechts-händer	GSM 890,2 MHz 0.54-1.09 W/kg, 1 h linke/rechte Kopfseite während Tests	Raumlokationstest	signifikant längere RT rechte Hand bei Exp. von links (Hareuveny et al. fanden, dass Exp. nicht allein verantwortlich ist)
<b>Wiholm et al. 2009</b> <sup>[67]</sup>	Cross-Over Doppelblind	42 Erwachsene (21m/21w) 18-45 Jahre	GSM 884 MHz 1.4 W/kg, 2.5 h linke Kopfseite während Tests	Labyrinthaufgabe	sign. kürzere Strecke bei Exp.
<b>Riddervold et al. 2010</b> <sup>[68]</sup>	Cross-Over min 24 h Abstand Doppelblind	53 männliche Einsatzkräfte, Rechts-händer 25-49 Jahre	TETRA 450 MHz 2 W/kg 45 min linke Kopfseite	SRT, CRT, Gedächtnistest, Trail-Making Test	geringfügige RT Verlängerung
<b>Sauter et al. 2011</b> <sup>[69]</sup>	Cross-Over 2 Wochen Abstand Doppelblind	30 männliche Erwachsene Rechts-händer 18-30 Jahre	GSM 900 MHz WCDMA 1966 MHz 2 W/kg, 7 h 15 min während Tests	Aufmerksamkeit Vigilanztest n-back Test	sign. Zu- und Abnahme RT bei einzelnen Tests, nicht mehr sign. nach Bonferroni Korrektur
<b>Wallace et al. 2012</b> <sup>[70]</sup>	Cross-Over Abstand min 1 Woche Doppelblind und offen	48 EHS Erwachsene (19m/29w) 152 nicht-EHS Erwachsene (65m/67w)	TETRA 420 MHz 10 mW/m <sup>2</sup> (~0,3 mW/kg) 4,95 m Abstand 50 min während Test	Kurzzeitgedächtnis Aufmerksamkeitstest	kein Effekt der Exp.

Studie	Design	Probanden	Exposition	Endpunkt(e)	Ergebnis
<b>Schmid et al. 2012</b> <sup>[71]</sup>	Cross-Over Abstand 1 Woche Doppelblind	25 männliche Erwachsene Rechtshänder 20-26 Jahre	900 MHz PW 2 u 8 Hz 2 W/kg ELF-MF 0.176 $\mu$ T 30 min linke Kopfseite	SRT, CRT, n-back Test	sign. kürzere RT bei MF Exp.
<b>Loughran et al. 2013</b> <sup>[72]</sup>	Cross-Over Abstand 1 Woche Doppelblind	22 Jugendliche (12m/10w) Rechtshänder 11-13 Jahre	GSM 900 MHz 0,35 und 1,4 W/kg linke Kopfseite, während Tests	SRT, CRT, n-back Test	kein Effekt der Exp.
<b>Sauter et al. 2015</b> <sup>[73]</sup>	Cross-Over 2 Wochen Abstand Doppelblind	30 männliche Erwachsene Rechtshänder 20-30 Jahre	TETRA 385 MHz 1,5 W/kg und 6 W/kg 2 h 45 min linke Kopfseite während Tests	Aufmerksamkeitstests Gedächtnistests	Verbesserung Leistung beim Gedächtnistest in 5 von 35 Indikatoren
<b>Malek et al. 2015</b> <sup>[74]</sup>	Cross-Over Einfachblind	100 EHS Personen 100 nicht-EHS Personen	GSM 945 MHz 280 W/m <sup>2</sup> , GSM 1840 MHz 250 W/m <sup>2</sup> , UMTS 380 W/m <sup>2</sup> (2 m Abstand)	CRT, Aufmerksamkeits-test Vigilanztest	Trend zu längerer RT und besserer Signaldetektion beim Vigilanztest

## 4.2 MATERIAL UND METHODEN

### 4.2.1 Versuchsdesign

Das Versuchsdesign basiert auf einem 2x2-Gruppen, doppelblindem Untersuchungsdesign. Die Personen wurden per Zufall den Versuchsbedingungen zugeordnet. Jede Person erhielt täglich zur selben Tageszeit über 5 Tage die zugeordnete Exposition über ca. 1 h 50 min.

Tabelle 4.2: Versuchsschema mit den vier Untersuchungsgruppen, die sich hinsichtlich der Intensität der Befeldung und der Kopfseite, an der die Exposition einwirkte, unterschieden

Exponierte Kopfseite Intensität	Links	Rechts
SAR 0,1 W/kg	A	B
SAR 1,6 W/kg	C	D

Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die hier angegebenen Expositionswerte (SAR, in W/kg) sich nicht auf die Exposition des Gehirns beziehen, sondern auf die Wangenschleimhaut, die das eigentliche Zielgewebe für die Untersuchungen der Mundhöhlenzellen (Abschnitt 0) war. Die relativ höchste Exposition des Gehirns wurde im Schläfenlappen ermittelt und ist um einen Faktor von über 200 niedriger. Die SAR Angaben in diesem Berichtsabschnitt bezeichnen somit lediglich die Expositionsgruppe und nicht die Expositionsintensität für das Gehirn.

Die Personen wurden in einem mit Absorbermaterial ausgestatteten Versuchsraum exponiert, wobei die Antennen am Kopf so fixiert wurden, dass sie ohne Beeinträchtigung der Bewegung längere Zeit weitgehend belastungsfrei getragen werden können. Es befanden sich Antennen an beiden Kopfseiten, sodass weder dem Versuchsleiter noch der Versuchsperson erkennbar war, auf welcher Seite die Exposition stattfand.

### 4.2.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Personen im Alter von 20 bis 60 Jahren beiderlei Geschlechts, die Nichtraucher ohne akute oder chronische Krankheiten waren (was mehrstündigen Versuchsanwesenheit unmöglich gemacht hätte), die möglichst nicht oder weniger als eine Stunde pro Tag mobil telefonieren wurden in die Studie aufgenommen, sofern sie nach Information über den Studienablauf schriftlich der Teilnahme zustimmten.

In Hinblick auf die zweite Fragestellung (Mundhöhlen Zell Analyse, vgl. Abschnitt 0) wurden die Teilnehmer informiert, dass sie während zwei Wochen vor dem Experiment bis drei Wochen danach ein Tagebuch führen müssen. Falls sie ein Mobiltelefon verwenden, sollten sie nur mit Freisprecheinrichtung telefonieren. Falls sie keine solche zur Verfügung hatten, wurde eine zur Verfügung gestellt.

### 4.2.3 Untersuchungspersonen

Insgesamt wurden wie geplant 42 Personen rekrutiert. Eine Person schied nach dem ersten Versuchstag aus familiären Gründen aus und konnte aufgrund des engen Zeitplans nicht ersetzt werden.

Von den Teilnehmern waren 21 Männer und 20 Frauen. Das Alter betrug  $29 \pm 10$  Jahre (22 bis 56 Jahre). 7 waren Links- und 34 Rechtshänder. Die Mehrheit (30 Personen) hatten eine AHS abgeschlossen und 9 eine akademische Ausbildung, 2 Personen hatten eine Fachschule absolviert.

20 Personen wurden der niedrigen Exposition (SAR 0,1 W/kg) per Zufall zugeordnet, wobei 9 an der linken und 11 an der rechten Kopfseite exponiert wurden, und 21 Personen der hohen Expositionsgruppe (1,6 W/kg), 10 an der linken und 11 an der rechten Kopfseite exponiert wurden.

### 4.2.4 Versuchsablauf

Exposition und Testablauf zur Prüfung kognitiver Auswirkungen erfolgte während einer Woche täglich nach dem gleichen Schema (Tabelle 4.3). Die Vorgabe der Aufgaben während des Versuchs erfolgte automatisiert mittels Computer. Die Pausen wurden mit einer Diashow, die ebenfalls durch den Computer gesteuert wurde, gefüllt.

Bei der Ankunft der Untersuchungsperson im Labor wurde ein kurzes Interview zur Tagesverfassung durchgeführt und danach wurden die Antennen angebracht. Nach einer Akklimatisation von 10 Minuten erfolgte eine Skalierung des Eigenzustands und eine erste Serie von kognitiven Test und Reaktionszeitmessungen. Die Tests wurden zur Erholung mehrmals durch Diashows unterbrochen. Zum Ende der etwa 2-stündigen Exposition wurde nochmals eine Eigenzustandsskalierung vorgenommen.

Nach Ende der Exposition und Abnahme der Antennen erfolgte noch eine kurze Befragung zu besonderen Wahrnehmungen. Die gesamte Dauer des Versuchs war etwa  $2 \frac{1}{2}$  Stunden pro Tag. Dasselbe Schema wurde an jedem Tag von Montag bis Freitag beibehalten, wobei aber die Diashows täglich variierten. Am letzten Tag wurde die weitere Vorgangsweise mit der Abnahme der Mundhöhlenzellen erneut erklärt und die Termine wenn notwendig angepasst.

Tabelle 4.3: Schema des Ablaufs einer Expositionssitzung

<b>Test/Präsentation/Schritt</b>	<b>Dauer (Minuten)</b>
<b>Applikation Antennen</b>	2
<b>Akklimatisation</b>	10
<b>Nitsch Fragebogen</b>	5
<b>Simple Reaction Test (SRT)</b>	3
<b>Gedächtnistest Vorgabe</b>	2
<b>Choice Reaction Test (CRT)</b>	2
<b>Gedächtnistest 1.Prüfung</b>	3
<b>Pause Diashow</b>	10
<b>Gedächtnistest 2.Prüfung</b>	3
<b>Wahrnehmungsreaktionstest</b>	2
<b>O2-Test</b>	5
<b>Pause Diashow</b>	10
<b>Gedächtnistest 3.Prüfung</b>	3
<b>Vigilanztest</b>	10
<b>Pause Diashow</b>	10
<b>Simple Reaction Test (SRT)</b>	3
<b>Choice Reaction Test (CRT)</b>	3
<b>Pause Diashow</b>	10
<b>Vigilanztest</b>	10
<b>Pause Diashow</b>	10
<b>Nitsch Fragebogen</b>	5

### 4.2.5 Kognitive und Reaktionstests

In jeder der fünf Expositionssitzungen von 2 Stunden Dauer wurde ein Programm vorgegeben, das aus einer Reihe von kognitiven und Reaktionstests bestand. Die Abfolge ist Tabelle 4.3 zu entnehmen. Die angegebenen Zeiten sind Durchschnittszeiten.

- Einfacher Reaktionstest (SRT – Simple Reaction Test)

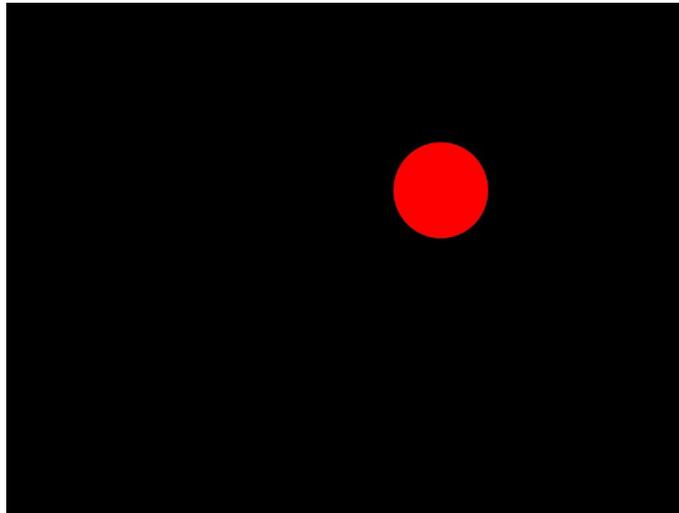


Abbildung 4.1: Beispiel einer Einfachwahltest-(SRT)-Aufgabe

Bei diesem Test muss möglichst rasch auf das Erscheinen eines farbigen Kreises reagiert werden. Dabei sind Form und Farbe egal. Ausgewertet wurde die durchschnittliche Reaktionszeit (unter Weglassen der ersten drei Aufgaben) von 140 einzelnen Reaktionen.

- Wahlreaktionstest (CRT – Choice Reaction Test)

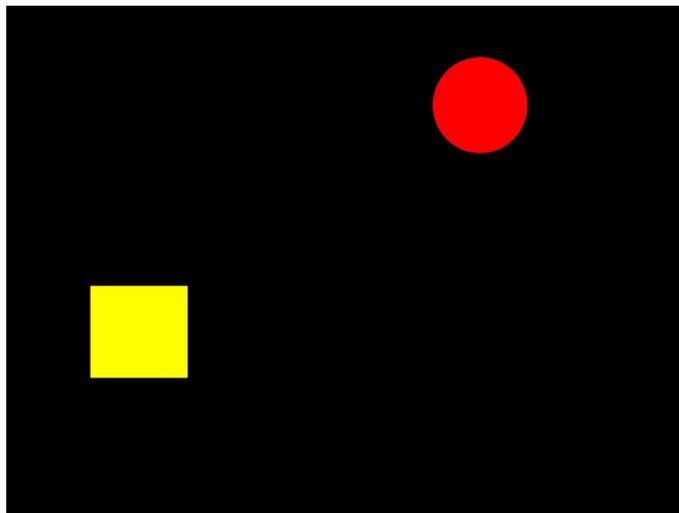


Abbildung 4.2: Beispiel einer Wahlreaktionstest-(CRT)-Aufgabe

Bei diesem Test muss mit der Taste „Y“ reagiert werden, wenn zwei an zufälligen Orten erscheinende Kreise oder Quadrate, welche die gleiche oder unterschiedliche Farben haben können, in mindestens einem Merkmal (Form oder Farbe) übereinstimmen und mit der Taste „N“, wenn das nicht der Fall ist. Ausgewertet wurden die Anzahl richtiger und falscher Reaktionen sowie die durchschnittliche Reaktionszeit über 140 Aufgaben.

- O2-Test

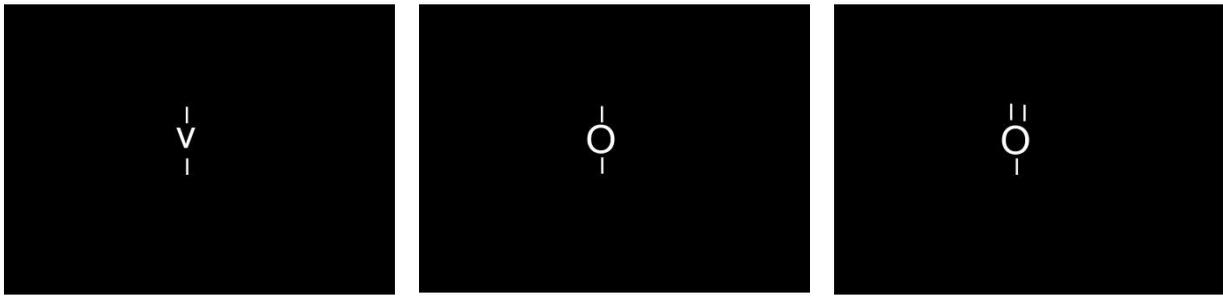


Abbildung 4.3: Beispiel dreier Items des O2-Test.

Bei diesem Test lautet die Aufgabe, mit der Taste „Y“ zu reagieren, wenn ein ‚O‘ mit zwei Strichen (z.B. das mittlere Bild) auftritt, während auf andere Zeichen oder ‚O‘ mit weniger oder mehr als zwei Strichen mit der Taste „N“ reagiert werden muss. Bei diesem Test werden die Anzahl richtig erkannter O2 und richtig erkannter nicht-O2 Bilder sowie die falschen Alarme und übersehenen Signale ausgewertet und die durchschnittliche Reaktionszeit ermittelt. Insgesamt hat der Test 120 Aufgaben.

- Wahrnehmungsreaktionstest

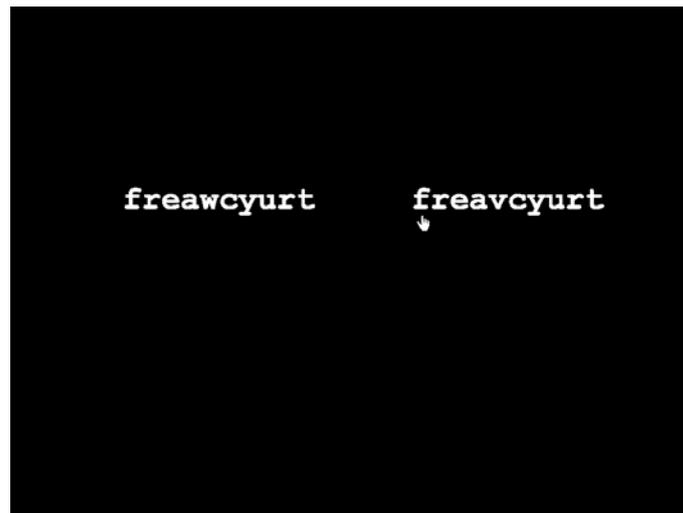


Abbildung 4.4 : Beispiel einer Wahrnehmungsreaktionstest-Aufgabe

Bei diesem Test geht es darum, die beiden Buchstabenserien zu vergleichen und den Cursor möglichst rasch unter das einzige abweichende Zeichen zu positionieren. Ausgewertet werden die Anzahl richtiger Reaktionen und die durchschnittliche Reaktionszeit.

- Vigilanztest

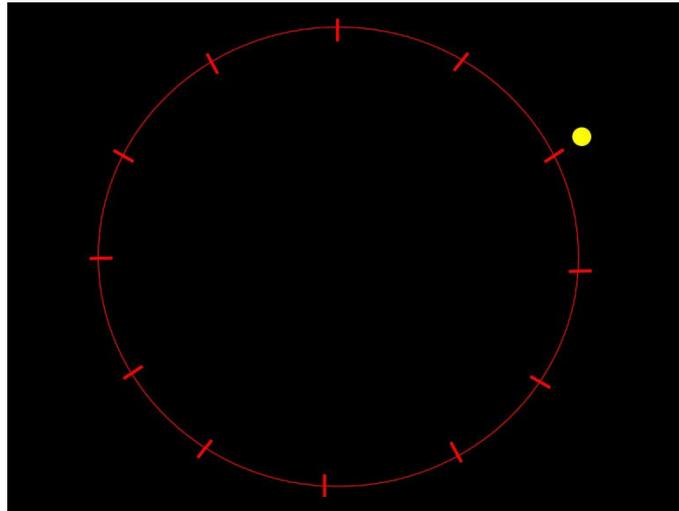


Abbildung 4.5: Vigilanztest. Der Lichtpunkt springt von Stunde zu Stunde im Kreis.

Bei diesem Test wird der Grad der Wachheit und Konzentration getestet. Dabei springt ein Lichtpunkt im kreisförmigen Zifferblatt im Sekundenabstand von Punkt zu Punkt. In zufälliger Abfolge wird ein Punkt übersprungen. Wenn dieses Ereignis auftritt, dann muss möglichst rasch reagiert werden. Ausgewertet wurden die Zahl der richtigen und falschen Reaktionen sowie die Zahl der übersehenen Sprünge. Auch die Reaktionszeit vom Ende des Sprunges wurde gemessen und die durchschnittliche Dauer bis zur Reaktion ermittelt.

- Gedächtnistest

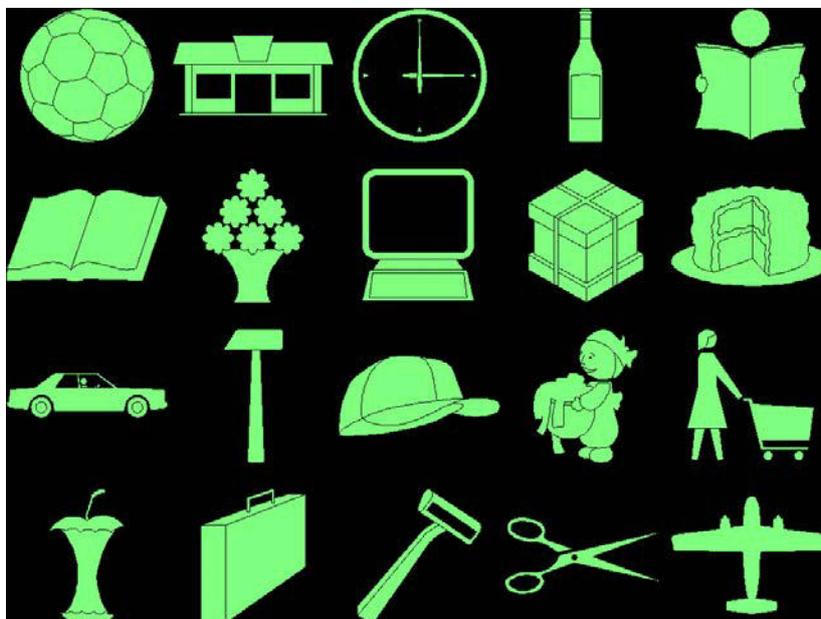


Abbildung 4.6: Beispiele einer Einprägungsphase des Gedächtnistests. 20 Objekte sollen in das Gedächtnis eingeprägt werden.

Zwanzig Bilder gleicher Art werden auf dem Bildschirm präsentiert und sollen während 30 Sekunden eingeprägt werden. Nach 3, 13 und 43 Minuten werden 10 dieser Bilder und 10 andere in zufälliger Reihenfolge nacheinander präsentiert und es muss entschieden werden, ob das Bild vorhanden war oder nicht. Hier wurde die Zahl der

richtig eingestuftes vorhanden und nicht vorhanden gewesenes Bild gezählt. Weiters wurden falsche Alarme und übersehene Bilder sowie die durchschnittliche Reaktionszeit erfasst.

#### **4.2.6 Eigenzustandsskalierung nach Nitsch**

Zusätzlich zu den kognitiven und Reaktionstest wurde mit dem Computer am Beginn und am Ende der Sitzung die Eigenzustandsskalierung nach Nitsch auf dem Bildschirm vorgegeben. Diese besteht aus 20 Eigenschaftswörtern, von denen die Versuchsperson jeweils angeben muss, in welchem Ausmaß sie seinen derzeitigen Zustand wiedergeben. Diese Antworten werden dann Faktoren zugeordnet (Anstrengungsbereitschaft, Spannungslage, Ermüdung, Schläfrigkeit) und in zwei Schritten in Stanine-Werten ausgegeben. Im ersten Schritt werden die Antworten anhand von Normwerten Flächen-transformiert. Danach wird die Summe über die jeweils einem Faktor zugeordneten Items ermittelt und anhand einer Tabelle in Stanine-Werte umgewandelt. Diese Stanine-Werte sind an der Normalverteilung orientiert und drücken eine bestimmte Fläche unter der Normalverteilung aus. Der Mittelwert der Stanine-Werte in der Normpopulation beträgt 5 bei einer Standardabweichung von 2.

#### 4.2.7 Statistische Auswertung der kognitiven Leistung während der Exposition

Die statistische Auswertung der kognitiven Leistung und der Reaktionszeiten erfolgte nach dem folgenden Schema:

**Reaktionszeiten:** die Reaktionszeiten wurden logarithmisch transformiert, weil die Verteilungen annähernd einer log-Normalverteilung folgen. Je nachdem, ob der Test nur einmal oder mehrmals während eines Versuchstags vorgegeben wurde, erfolgte die statistische Auswertung mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen mit normalverteilten Werten im Sinne einer 3- oder 4-fachen Varianzanalyse mit den Faktoren SAR (0,1 vs. 1,6 W/kg), Kopfseite der Exposition (links vs. rechts), Tag (Versuchstag 1 bis 5) und, wenn zutreffend, Versuchsabschnitt (erster vs. zweiter).

**Anzahl richtiger Reaktionen:** die Zahl der richtigen Reaktionen wurde mit verallgemeinerten Schätzgleichungen ausgewertet, wobei die Zahl der richtigen Reaktionen als binomialverteilt angenommen wurden. Die Faktoren waren dieselben wie für die Reaktionszeiten. Die Zahl der falschen Reaktionen oder übersehenen Signale wurden nicht statistisch analysiert, weil die Zahl der Aufgaben stets konstant war und diese Zahlen sich daher als Differenz aus den richtigen Reaktionen ergeben.

Bei der Anwendung der verallgemeinerten Schätzgleichungen werden die Unterschiede in den Messwerten auf die Untersuchungsfaktoren zurückgeführt. Dabei unterscheidet man Haupteffekte und Wechselwirkungseffekte. Im Einzelnen bedeuten signifikante Haupteffekte:

- SAR: Unterschiede unabhängig von der Kopfseite, dem Versuchsabschnitt und dem Versuchstag, aber abhängig vom SAR-Wert (Intensität der HF-EMF)
- Kopfseite: die Messwerte unterscheiden sich bei Exposition an der linken von der rechten Kopfseite unabhängig von der SAR, dem Versuchsabschnitt und dem Versuchstag
- Versuchstag: Es gibt Unterschiede zwischen den Versuchstagen unabhängig von der SAR, der Kopfseite der Exposition und dem Versuchsabschnitt
- Versuchsabschnitt: Es gibt Unterschiede zwischen dem ersten und zweiten Präsentationsabschnitt während der Exposition unabhängig von der SAR, der Kopfseite der Exposition und dem Versuchstag.

Daraus ergibt sich beispielsweise, dass ein signifikanter Haupteffekt für SAR und Kopfseite bedeutet, dass die Wirkung entweder schon sehr früh einsetzt oder dass die Messwerte einen sehr starken von diesen Faktoren abhängigen Trend aufweisen, der durch die geringen Unterschiede zu Beginn nicht ausgeglichen wird.

Die signifikanten Wechselwirkungen bedeuten im Einzelnen:

- SAR\*Kopfseite: Der Unterschied zwischen den Messergebnissen bei den beiden Intensitäten der Exposition hängen von der Kopfseite ab
- SAR\*Versuchstag: Der Trend über die Versuchstage ist bei den beiden Intensitäten der Exposition unterschiedlich

- SAR\*Versuchsabschnitt: Die Veränderung der Messwerte von der 1. zur 2. Stunde hängt von der Intensität der Exposition ab
- Kopfseite\*Versuchstag: Die Ergebnisse an den Versuchstagen sind unterschiedlich je nach dem auf welcher Kopfseite exponiert wurde
- Kopfseite\*Versuchsabschnitt: Die Veränderung der Messwerte von der 1. zur 2. Stunde hängt von der Kopfseite der Exposition ab
- Versuchstag\*Versuchsabschnitt: Die Ergebnisse an den Versuchstagen unterscheiden sich zwischen 1. und 2. Stunde
- SAR\*Kopfseite\*Versuchstag: Die Ergebnisse an den Versuchstagen sind unterschiedlich je nachdem auf welcher Kopfseite und mit welcher Intensität exponiert wurde
- SAR\*Kopfseite\*Versuchsabschnitt: Die Veränderung der Messwerte von der 1. zur 2. Stunde hängt von der Kopfseite und der Intensität der Exposition ab
- SAR\*Versuchstag\*Versuchsabschnitt: Die Ergebnisse an den Versuchstagen sind in der 1. und 2. Stunde und je nach Intensität der Exposition unterschiedlich
- Kopfseite\*Versuchstag\*Versuchsabschnitt: Der Trend über die Versuchstage ist in der 1. und 2. Präsentation (1.+2. Stunde) und je nach Kopfseite der Exposition unterschiedlich
- SAR\*Kopfseite\*Versuchstag\*Versuchsabschnitt: Der Trend über die Versuchstage ist in der 1. und 2. Stunde und je nach Kopfseite und Intensität der Exposition unterschiedlich.

Als signifikant mit einem Signifikanzniveau von 95 % werden im Folgenden Ergebnisse der statistischen Prüfung mit einem p-Wert von  $p < 0,05$  bezeichnet. p-Werte  $< 0,1$  zeigen eine Tendenz an.

## 4.3 ERGEBNISSE

### 4.3.1 Einfacher Reaktionstest

Dieser Test wurde zweimal durchgeführt (siehe Tabelle 4.3), einmal in der ersten und einmal in der zweiten Stunde. Da es keinen relevanten Unterschied zwischen der linken und rechten Kopfseite gab, wird in Abbildung 4.7 auf eine separate Darstellung verzichtet.

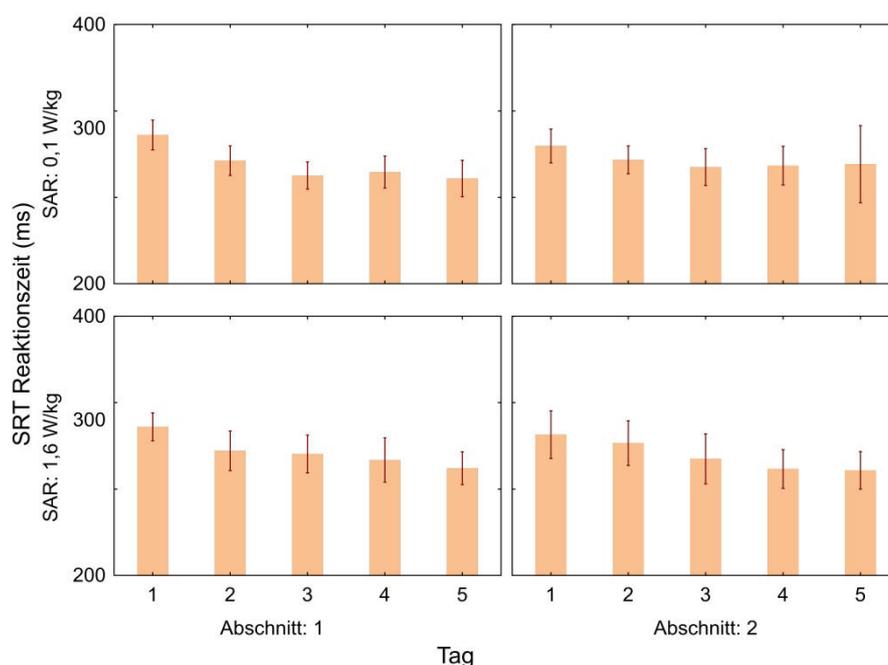


Abbildung 4.7: einfacher Reaktionstest (SRT-Test), Mittlere Reaktionszeiten (und 95% Konfidenzintervalle) an den einzelnen Versuchstagen und Versuchsabschnitten in den Versuchsgruppen mit SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg.

Die Ergebnisse der Reaktionszeit zeigen einen hoch-signifikanten Übungseffekt über die Versuchstage 1 bis 5, die Reaktionen wurden von Tag zu Tag schneller. Bei der Bedingung mit höherer SAR ist diese zunehmend schnellere Reaktion besonders in der 2. Stunde (Abschnitt 2) etwas deutlicher als bei 0,1 W/kg, dieser Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Analyse der Reaktionszeit mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen des einfachen Reaktionstests (SRT-Test)

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	0,00	1	0,969	n.s.
Kopfseite	0,26	1	0,608	n.s.
Tag (1-5)	47,25	4	<0,001	hoch signifikant
Abschnitt (1-2)	0,02	1	0,888	n.s.
SAR * Kopfseite	0,36	1	0,547	n.s.
SAR * Tag	2,83	4	0,587	n.s.
SAR * Abschnitt	1,71	1	0,191	n.s.
Kopfseite * Tag	1,12	4	0,891	n.s.

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
Kopfseite * Abschnitt	0,05	1	0,829	n.s.
Tag * Abschnitt	7,55	4	0,110	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	0,23	4	0,994	n.s.
SAR * Kopfseite * Abschnitt	0,45	1	0,502	n.s.
SAR * Tag * Abschnitt	6,66	4	0,155	n.s.
Kopfseite * Tag * Abschnitt	6,26	4	0,180	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag * Abschnitt	9,18	4	0,057	Tendenz

### 4.3.2 Wahlreaktionstest

Dieser Test wurde ebenfalls zweimal (in der ersten und zweiten Stunde bzw. Abschnitt des Testes) an jedem Testtag durchgeführt. Die folgende Abbildung 4.8 zeigt die Ergebnisse zu den Reaktionszeiten und Abbildung 4.9 den Anteil richtiger Reaktionen.

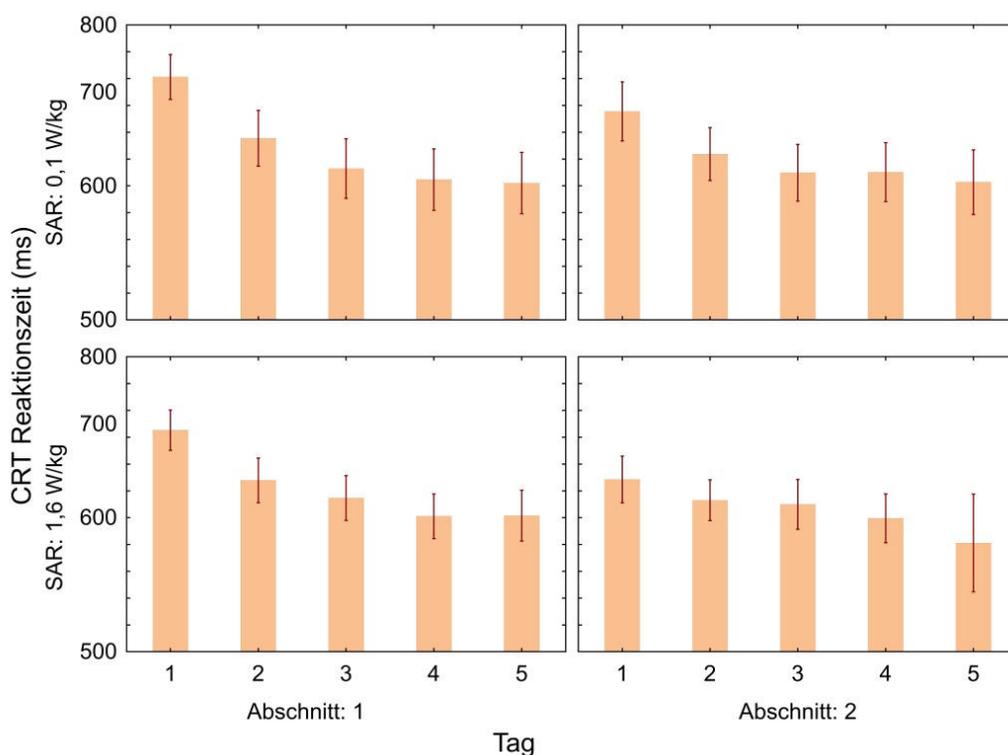


Abbildung 4.8: Wahlreaktionstests (CRT-Test), mittlere Reaktionszeiten (und 95% Konfidenzintervalle) an den einzelnen Versuchstagen und Versuchsabschnitten in den Versuchsgruppen mit SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Analyse der Reaktionszeit mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen des Wahlreaktionstest (CRT-Test)

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	0,98	1	0,323	n.s.
Kopfseite	0,25	1	0,616	n.s.
Tag (1-5)	48,49	4	<0,001	hoch signifikant
Abschnitt (1-2)	16,65	1	<0,001	hoch signifikant
SAR * Kopfseite	2,71	1	0,099	Tendenz
SAR * Tag	8,34	4	0,080	Tendenz
SAR * Abschnitt	4,26	1	0,039	signifikant
Kopfseite * Tag	5,18	4	0,270	n.s.
Kopfseite * Abschnitt	1,78	1	0,183	n.s.
Tag * Abschnitt	29,93	4	<0,001	hoch signifikant
SAR * Kopfseite * Tag	2,58	4	0,630	n.s.
SAR * Kopfseite * Abschnitt	0,84	1	0,358	n.s.
SAR * Tag * Abschnitt	2,80	4	0,593	n.s.
Kopfseite * Tag * Abschnitt	3,24	4	0,519	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag * Abschnitt	5,36	4	0,252	n.s.

Die Reaktionszeit wurde über die 5 Tage und innerhalb der einzelnen Tage über die Abschnitte (vor allem an den ersten Tagen) signifikant kürzer. Dieser Effekt war tendenziell wahrnehmbar hinsichtlich der Abnahme über die Tage ( $p=0,08$ ) und er war signifikant ( $p=0,039$ ) hinsichtlich der Präsentations-Abschnitte bei der höheren SAR-Gruppe.

Während die Reaktionszeit im Verlauf der Tage und Abschnitte bei der höheren Exposition kürzer wurden, nahm gleichzeitig der Anteil richtiger Reaktionen ab ( $p=0,009$ , Tabelle 4.6).

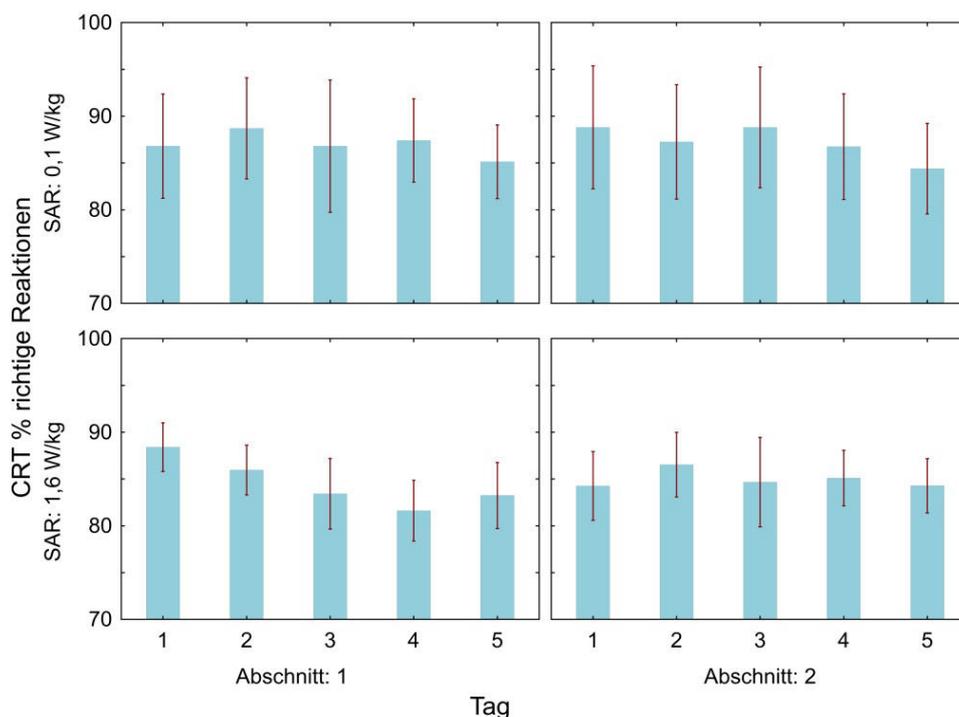


Abbildung 4.9: Wahlreaktionstests (CRT-Test), Anteil (%) richtiger Reaktionen (und 95% Konfidenzintervalle) an den einzelnen Versuchstagen und Versuchsabschnitten in den Versuchsgruppen (SAR-Gruppe: 0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Analyse der Anzahl richtiger Reaktionen im Wahlreaktionstest (CRT-Test) mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	1,24	1	0,265	n.s.
Kopfseite	1,31	1	0,253	n.s.
Tag (1-5)	7,86	4	0,097	Tendenz
Abschnitt (1-2)	0,51	1	0,474	n.s.
SAR * Kopfseite	0,05	1	0,818	n.s.
SAR * Tag	3,19	4	0,527	n.s.
SAR * Abschnitt	0,00	1	0,971	n.s.
Kopfseite * Tag	3,24	4	0,518	n.s.
Kopfseite * Abschnitt	2,94	1	0,086	Tendenz
Tag * Abschnitt	4,15	4	0,387	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	2,55	4	0,637	n.s.
SAR * Kopfseite * Abschnitt	1,07	1	0,301	n.s.
SAR * Tag * Abschnitt	13,57	4	0,009	Hoch signifikant
Kopfseite * Tag * Abschnitt	3,02	4	0,555	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag * Abschnitt	9,76	4	0,045	Signifikant

### 4.3.3 O2-Test

Dieser Test wurde nur einmal etwa in der Mitte der Expositionsphase vorgegeben. Die Abbildung 4.10 zeigt die durchschnittlichen Reaktionszeiten und Abbildung 4.11 die Anteile richtiger Reaktionen.

Auch bei diesem Test nahm die Reaktionszeit über die Tage signifikant ab. Tendenziell war die Reaktionszeit bei der Bedingung mit der höheren SAR kürzer ( $p=0,054$ ). Hinsichtlich des Anteils richtiger Reaktionen war der Trend über die Versuchstage zwischen den Bedingungen mit hoher und niedriger SAR hoch signifikant unterschiedlich ( $p<0,001$ ). Ebenso war ein signifikant unterschiedlicher Trend zwischen den Kopfseiten, die exponiert wurden, zu verzeichnen: bei Exposition der rechten Kopfseite nahm der Anteil richtiger Reaktionen von Tag zu Tag zu, während bei Exposition der linken Seite dieser Anstieg auf die ersten 3 Tage beschränkt war.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Analyse der Reaktionszeit mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen des O2-Tests

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	3,71	1	0,054	Tendenz
Kopfseite	0,01	1	0,917	n.s.
Tag (1-5)	15,92	4	0,003	hoch signifikant
SAR * Kopfseite	0,00	1	0,947	n.s.
SAR * Tag	1,91	4	0,752	n.s.
Kopfseite * Tag	4,68	4	0,322	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	1,95	4	0,745	n.s.

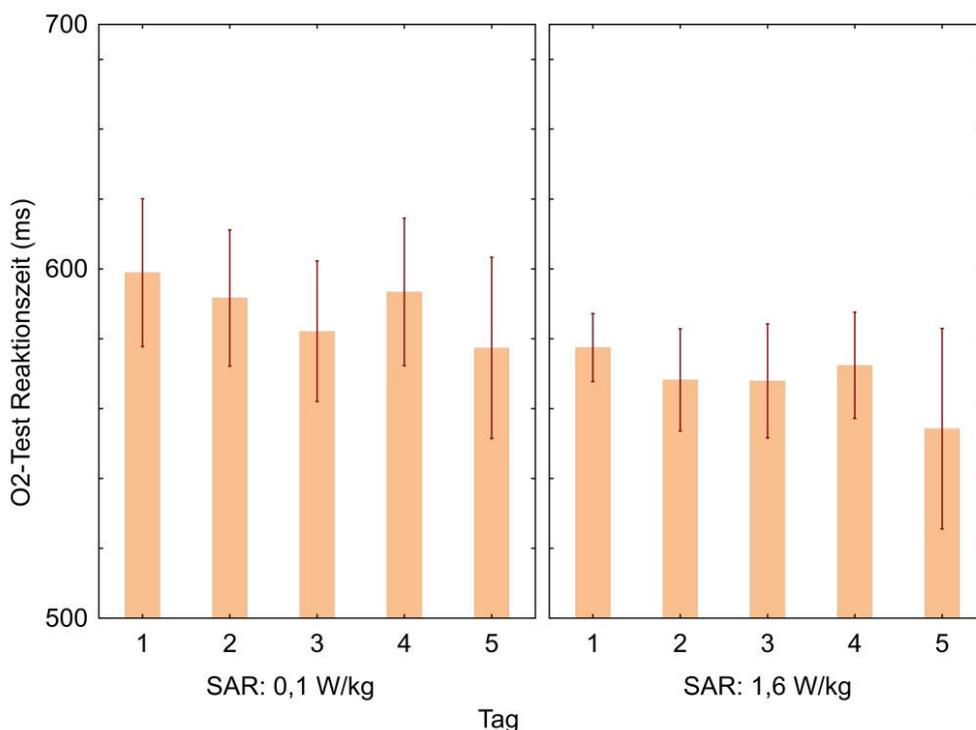


Abbildung 4.10: O2-Tests, mittlere Reaktionszeiten (und 95% Konfidenzintervalle) an den einzelnen Versuchstagen in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

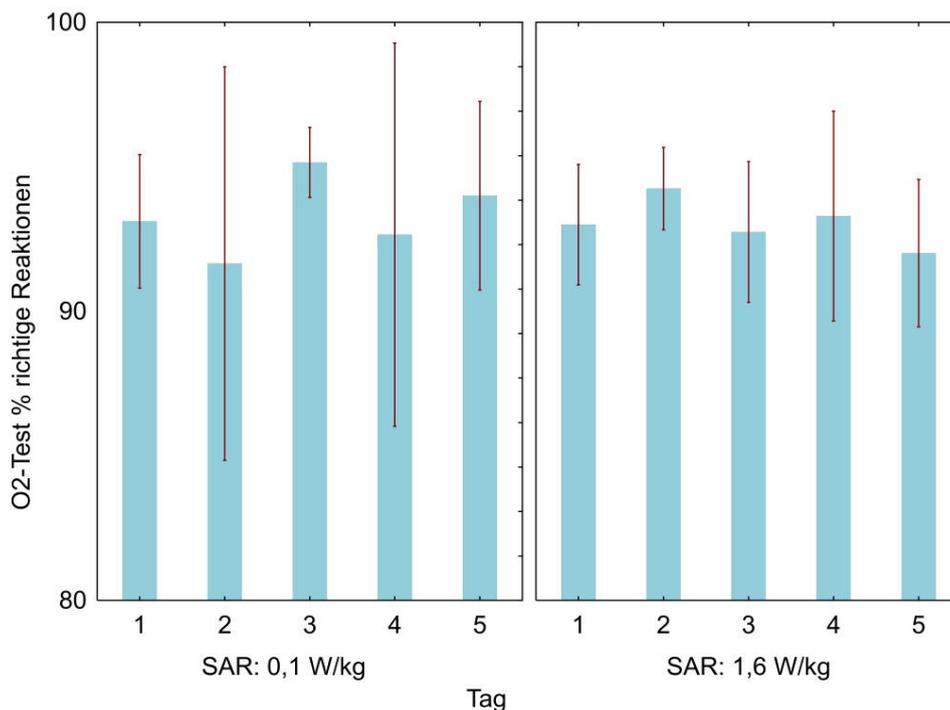


Abbildung 4.11: O2-Tests, Anteil (%) richtiger Reaktionen (und 95% Konfidenzintervalle) an den einzelnen Versuchstagen in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 und 1,6 W/kg).

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Analyse der Anzahl richtiger Reaktionen im O2-Test mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	0,14	1	0,706	n.s.
Kopfseite	0,00	1	0,973	n.s.
Tag (1-5)	12,27	4	0,015	signifikant
SAR * Kopfseite	1,12	1	0,289	n.s.
SAR * Tag	26,56	4	<0,001	hoch signifikant
Kopfseite * Tag	12,76	4	0,013	signifikant
SAR * Kopfseite * Tag	6,57	4	0,161	n.s.

### 4.3.4 Wahrnehmungsreaktionstest

Der Wahrnehmungsreaktionstest wurde ebenfalls nur einmal pro Tag etwa in der Mitte der Präsentationsphase vorgegeben. Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse zu den Reaktionszeiten und Tabelle 4.9 die inferenzstatistische Auswertung. In Abbildung 4.13 werden die Ergebnisse zum Anteil richtiger Reaktionen dargestellt und Tabelle 4.10 fasst die statistischen Prüfergebnisse zusammen.

Die Reaktionszeiten nahmen signifikant über die Tage ab, wobei dieser Effekt bei der Bedingung mit der höheren SAR signifikant stärker ausgeprägt war. Der Anteil richtiger Reaktionen (der über die Tage abnahm) war in der Gruppe mit höherer SAR signifikant niedriger.

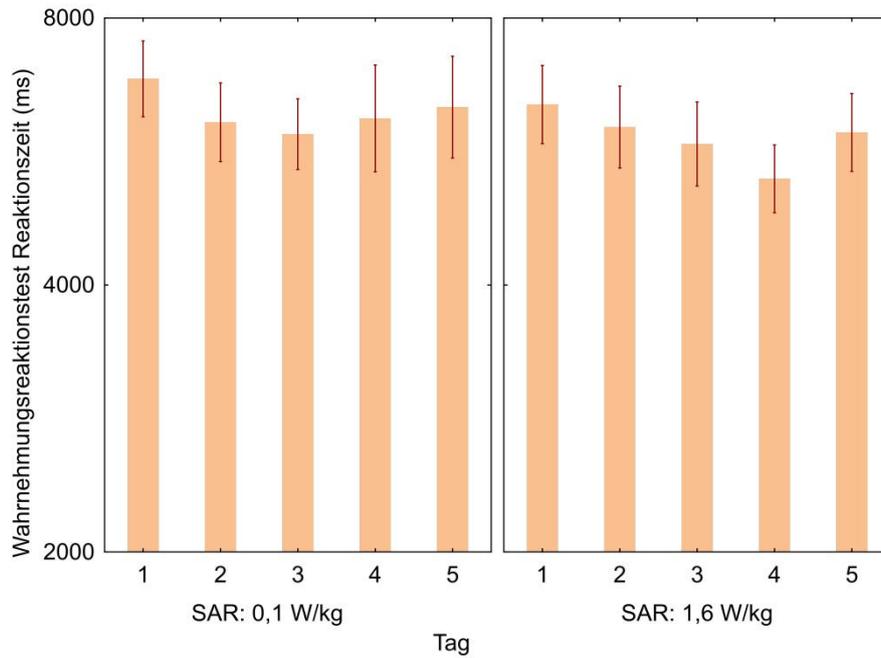


Abbildung 4.12: Wahrnehmungsreaktionstest, mittlere Reaktionszeiten (und 95% Konfidenzintervalle) an den einzelnen Versuchstagen in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Analyse der Reaktionszeit mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen des Wahrnehmungsreaktionstests

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	1,01	1	0,315	n.s.
Kopfseite	1,21	1	0,271	n.s.
Tag (1-5)	37,01	4	<0,001	hoch signifikant
SAR * Kopfseite	0,27	1	0,601	n.s.
SAR * Tag	7,80	4	0,099	Tendenz
Kopfseite * Tag	3,15	4	0,533	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	10,40	4	0,034	signifikant

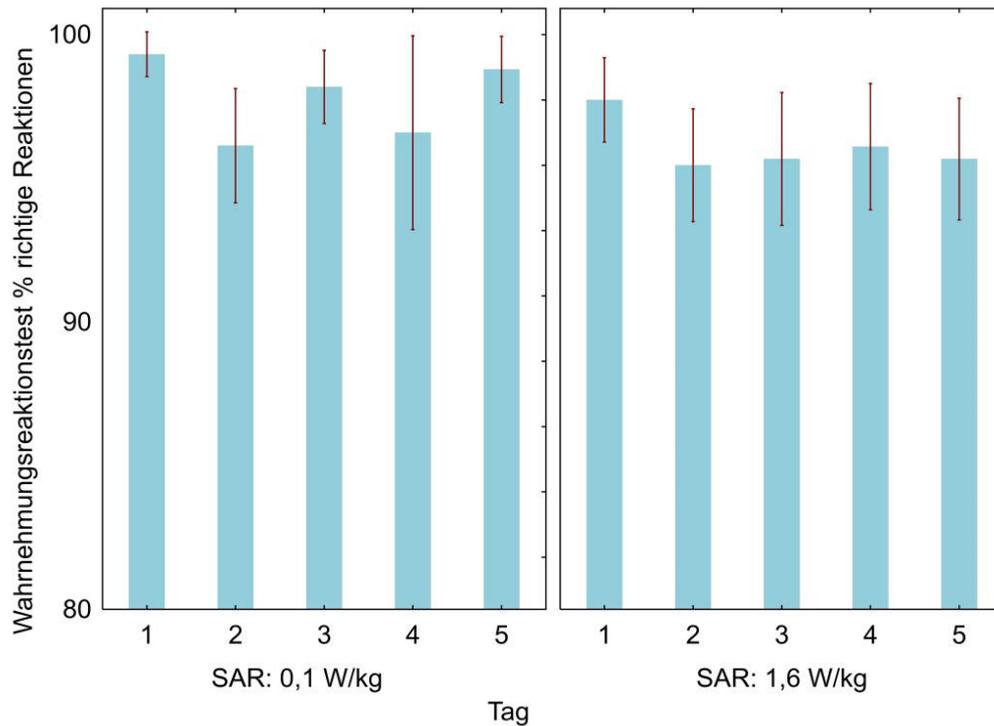


Abbildung 4.13: Wahrnehmungsreaktionstest, Anteil (%) richtiger Reaktionen und 95% Konfidenzintervalle an den einzelnen Versuchstagen in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Analyse der Anzahl richtiger Reaktionen im Wahrnehmungsreaktionstest mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	5,71	1	0,017	signifikant
Kopfseite	0,01	1	0,919	n.s.
Tag (1-5)	19,69	4	<0,001	hoch signifikant
SAR * Kopfseite	0,32	1	0,569	n.s.
SAR * Tag	4,06	4	0,398	n.s.
Kopfseite * Tag	2,64	4	0,619	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	4,91	4	0,296	n.s.

### 4.3.5 Vigilanztest

Der Vigilanztest wurde jeden Tag zweimal vorgegeben. Die Reaktionszeiten sind in **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.** und die Anteile richtiger Reaktionen in Abbildung 4.15 dargestellt.

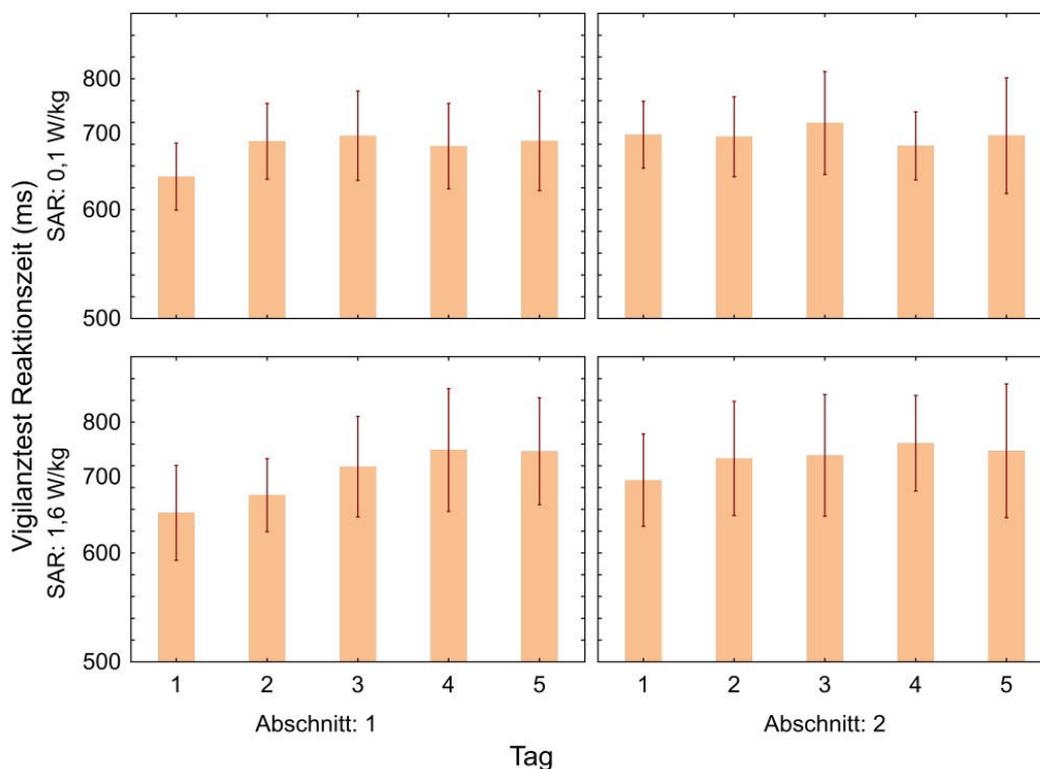


Abbildung 4.14: Vigilanztest, mittlere Reaktionszeiten und 95% Konfidenzintervalle an den einzelnen Versuchstagen und Versuchsabschnitten in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

Die Reaktionszeit nahm unabhängig von der SAR-Bedingung über die Tage und innerhalb der Tage (besonders während der ersten Tage) zu. Außerdem war ein Unterschied in der Zunahme innerhalb der Versuchstage zwischen den Kopfseiten, an denen exponiert wurde, aufgetreten. Dies geht darauf zurück, dass diese Zunahme bei Exposition der linken Kopfseite stärker ausgeprägt ist.

Die Zahl der richtigen Reaktionen nahm bei höheren SAR-Werten über die Versuchstage hoch signifikant stärker ab, wobei diese Abnahme insbesondere beim ersten Abschnitt auftrat. Unterschiede traten auch beim Trend unter Berücksichtigung der Kopfseite auf. Die Abnahme der Zahl der richtigen Reaktionen war dabei bei Exposition der linken Kopfseite besonders ausgeprägt (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.11: Ergebnisse der Analyse der Reaktionszeit mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen des Vigilanztests

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	0,52	1	0,470	n.s.
Kopfseite	2,26	1	0,133	n.s.
Tag (1-5)	8,49	4	0,075	Tendenz
Abschnitt (1-2)	9,72	1	0,002	hoch signifikant
SAR * Kopfseite	0,04	1	0,847	n.s.
SAR * Tag	3,30	4	0,509	n.s.
SAR * Abschnitt	0,14	1	0,710	n.s.
Kopfseite * Tag	4,98	4	0,289	n.s.
Kopfseite * Abschnitt	5,09	1	0,024	signifikant
Tag * Abschnitt	7,36	4	0,118	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	3,19	4	0,527	n.s.
SAR * Kopfseite * Abschnitt	0,36	1	0,549	n.s.
SAR * Tag * Abschnitt	3,10	4	0,541	n.s.
Kopfseite * Tag * Abschnitt	2,31	4	0,679	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag * Abschnitt	7,32	4	0,120	n.s.

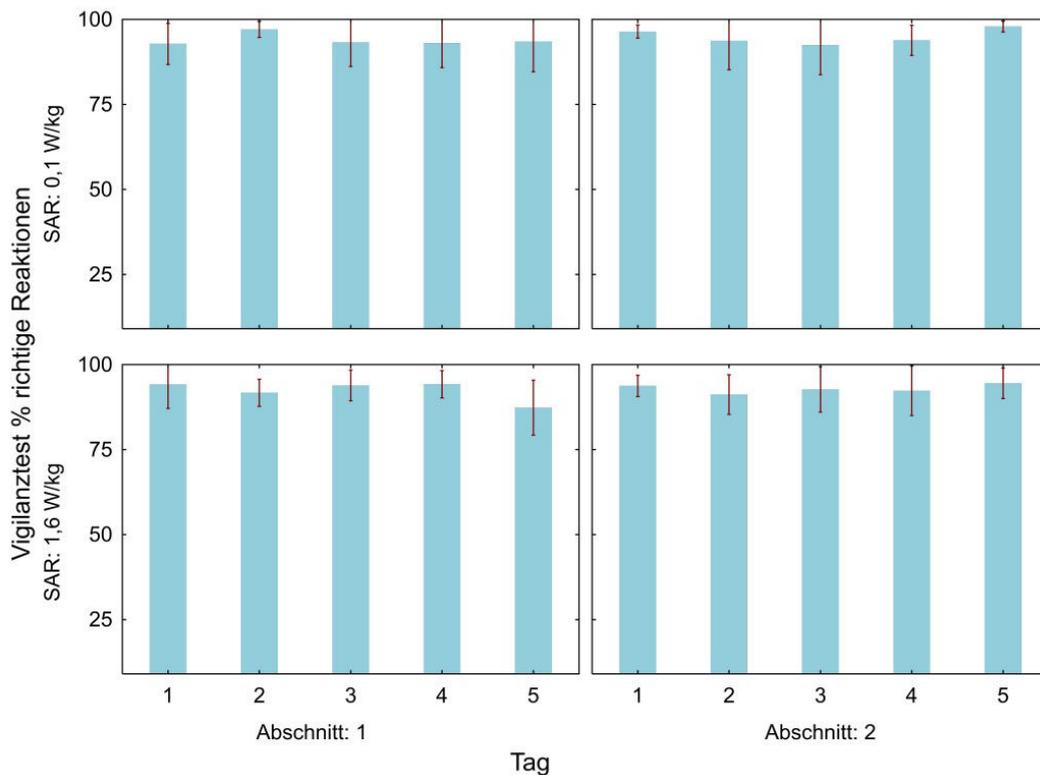


Abbildung 4.15: Vigilanztest, Anteil (%) richtiger Reaktionen und 95% Konfidenzintervalle an den einzelnen Versuchstagen und Abschnitten in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Analyse der Anzahl richtiger Reaktionen im Vigilanztest mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	0,63	1	0,427	n.s.
Kopfseite	0,27	1	0,605	n.s.
Tag (1-5)	3,12	4	0,538	n.s.
Abschnitt (1-2)	0,59	1	0,442	n.s.
SAR * Kopfseite	1,37	1	0,241	n.s.
SAR * Tag	21,05	4	<0,001	hoch signifikant
SAR * Abschnitt	0,11	1	0,743	n.s.
Kopfseite * Tag	13,97	4	0,007	hoch signifikant
Kopfseite * Abschnitt	2,71	1	0,100	Tendenz
Tag * Abschnitt	8,88	4	0,064	Tendenz
SAR * Kopfseite * Tag	8,11	4	0,088	Tendenz
SAR * Kopfseite * Abschnitt	4,50	1	0,034	signifikant
SAR * Tag * Abschnitt	14,41	4	0,006	hoch signifikant
Kopfseite * Tag * Abschnitt	11,86	4	0,018	signifikant
SAR * Kopfseite * Tag * Abschnitt	6,09	4	0,193	n.s.

#### 4.3.6 Gedächtnistest

Der Gedächtnistest wurde dreimal vorgegeben. Die erste Prüfung nach 3 Minuten diene lediglich als Aufwärmübung und wurde nicht ausgewertet. Die Ergebnisse zu den Reaktionszeiten sind in Abbildung 4.16 dargestellt, die Anteile richtiger Reaktionen in Abbildung 4.17.

Die Reaktionszeit war in der Gruppe mit der höheren SAR signifikant kürzer. Sie nahm von Tag 1 auf Tag 2 signifikant zu und war bis auf Tag 3 an allen Tagen bei der zweiten Testung höher.

Der Anteil richtiger Antworten war in der Gruppe mit der höheren SAR signifikant niedriger. Er nahm vom ersten auf den zweiten Tag signifikant ab und blieb dann auf diesem Niveau. An allen Tagen war die Zahl richtiger Reaktionen bei der zweiten Testung niedriger.

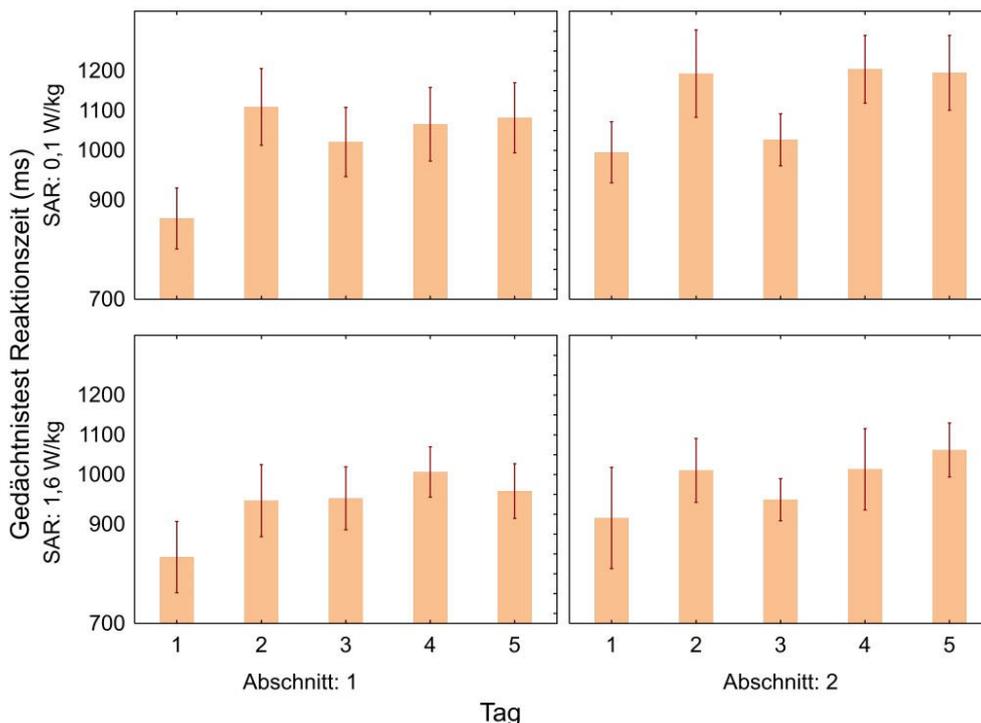


Abbildung 4.16: Gedächtnistest, mittlere Reaktionszeiten und 95% Konfidenzintervalle an den einzelnen Versuchstagen und Versuchsabschnitten in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

Tabelle 4.13: Ergebnisse der Analyse der Reaktionszeit mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen für den Gedächtnistest

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	11,01	1	<0,001	hoch signifikant
Kopfseite	1,40	1	0,237	n.s.
Tag (1-5)	61,13	4	<0,001	hoch signifikant
Abschnitt (1-2)	34,58	1	<0,001	hoch signifikant
SAR * Kopfseite	0,78	1	0,376	n.s.
SAR * Tag	5,86	4	0,210	n.s.
SAR * Abschnitt	2,42	1	0,120	n.s.
Kopfseite * Tag	6,55	4	0,162	n.s.
Kopfseite * Abschnitt	0,01	1	0,923	n.s.
Tag * Abschnitt	27,23	4	<0,001	hoch signifikant
SAR * Kopfseite * Tag	10,49	4	0,033	signifikant
SAR * Kopfseite * Abschnitt	1,19	1	0,275	n.s.
SAR * Tag * Abschnitt	5,22	4	0,266	n.s.
Kopfseite * Tag * Abschnitt	2,04	4	0,729	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag * Abschnitt	18,25	4	0,001	hoch signifikant

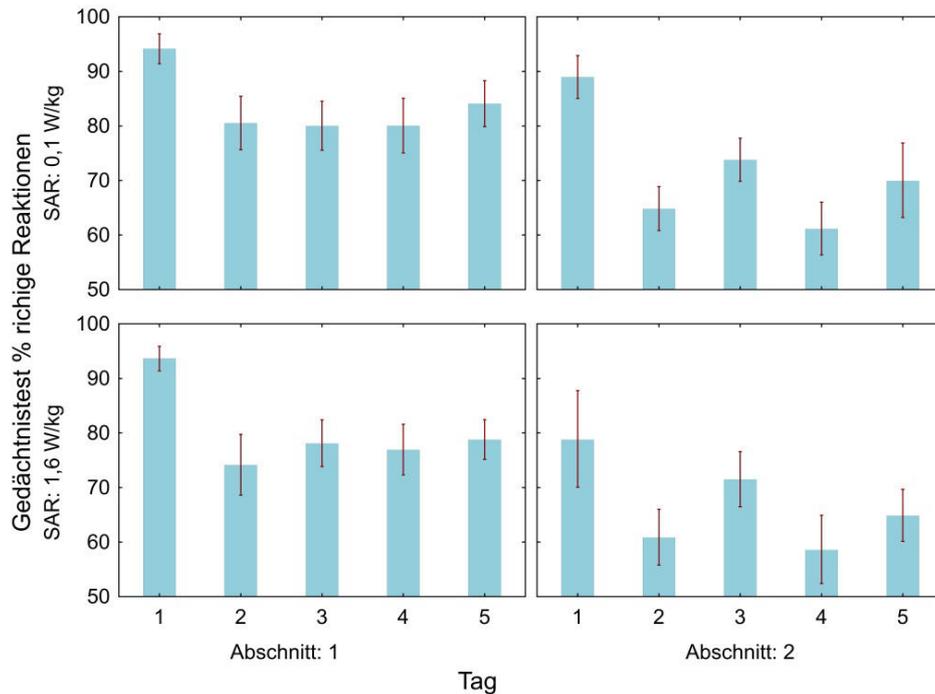


Abbildung 4.17: Gedächtnistest, Anteil (%) richtige Reaktionen und 95% Konfidenzintervalle an den einzelnen Versuchstagen und Abschnitten in den Versuchsgruppen (SAR=0,1 W/kg und 1,6 W/kg).

Tabelle 4.14: Ergebnisse der Analyse der Anzahl richtiger Reaktionen im Gedächtnistest mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	7,36	1	0,007	hoch signifikant
Kopfseite	0,53	1	0,465	n.s.
Tag (1-5)	162,49	4	<0,001	hoch signifikant
Abschnitt (1-2)	157,18	1	<0,001	hoch signifikant
SAR * Kopfseite	2,52	1	0,113	n.s.
SAR * Tag	2,69	4	0,610	n.s.
SAR * Abschnitt	0,22	1	0,641	n.s.
Kopfseite * Tag	5,36	4	0,252	n.s.
Kopfseite * Abschnitt	0,00	1	0,955	n.s.
Tag * Abschnitt	14,73	4	0,005	hoch signifikant
SAR * Kopfseite * Tag	14,37	4	0,006	hoch signifikant
SAR * Kopfseite * Abschnitt	6,67	1	0,010	hoch signifikant
SAR * Tag * Abschnitt	3,81	4	0,433	n.s.
Kopfseite * Tag * Abschnitt	1,12	4	0,892	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag * Abschnitt	2,29	4	0,682	n.s.

### 4.3.7 Eigenzustandsskalierung

Die Eigenzustandsskalierung wurde zu Beginn und am Ende der Exposition an jedem Versuchstag vorgenommen. Dabei wurden vier Faktoren erfasst: Anstrengungsbereitschaft, Spannungslage, Ermüdung und Schläfrigkeit. Die beiden letzten Faktoren sind umgepolt, hohe Werte bedeuten Erholtheit bzw. Wachheit.

Abbildung 4.18 zeigt die Veränderungen der verschiedenen Eigenzustandsskalierungen. Die Anstrengungsbereitschaft blieb über die fünf Versuchstage annähernd gleich, sie nahm aber vom Beginn zum Ende der Versuche ab, wobei diese Abnahme unter der Bedingung mit höherer SAR signifikant schwächer ausfiel. Die Anspannung nahm tendenziell von Tag zu Tag zu, sie war in der Gruppe mit höherer SAR signifikant geringer. Erholtheit und Wachheit nahmen über die Versuchstage leicht zu, von Beginn zu Ende des Versuchs aber signifikant ab. Der Wachheitsabfall war in der Gruppe mit höherer SAR schwächer ausgeprägt, besonders in der zweiten Hälfte der Versuchswoche.

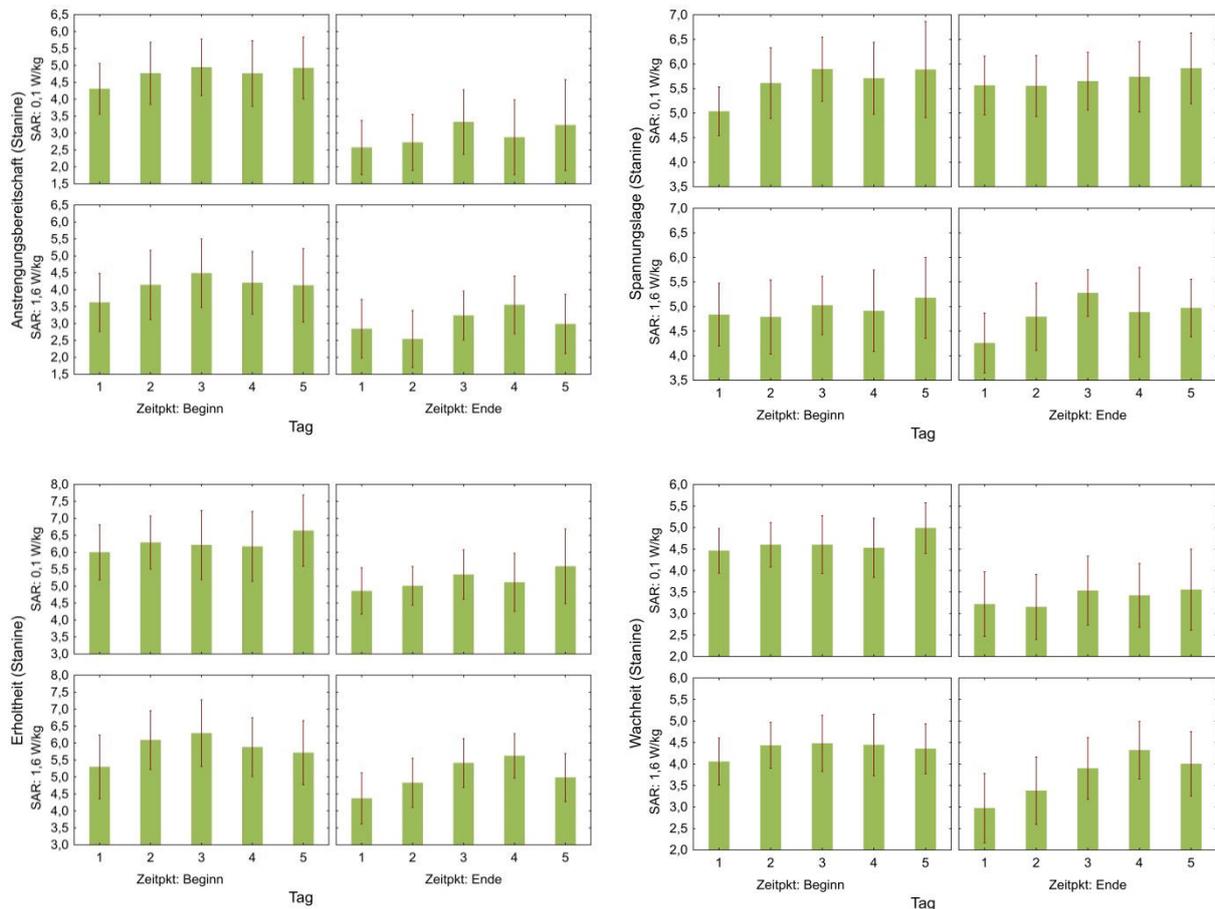


Abbildung 4.18 Ergebnisse der Eigenzustandsskalierungen für Anstrengungsbereitschaft, Spannungslage, Erholtheit und Wachheit (bzw. Schläfrigkeit)

Tabelle 4.15: Ergebnisse der Analyse der vorher-nachher Differenzen des Eigenzustandsfaktors Anstrengungsbereitschaft mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	6,28	1	0,012	signifikant
Kopfseite	0,37	1	0,541	n.s.
Tag (1-5)	3,84	4	0,428	n.s.
SAR * Kopfseite	0,33	1	0,564	n.s.
SAR * Tag	3,94	4	0,414	n.s.
Kopfseite * Tag	6,04	4	0,196	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	16,53	4	0,002	hoch signifikant

Neben dem oben erwähnten Unterschied zwischen den beiden SAR-Bedingungen, war auch der Unterschied zwischen rechter und linker Expositionsseite höherer SAR stärker ausgeprägt, allerdings nur am ersten Versuchstag, wobei bei der linksseitigen Exposition kein Abfall der Anstrengungsbereitschaft auftrat, was sonst bei allen anderen Bedingungen der Fall war.

Tabelle 4.16: Ergebnisse der Analyse der vorher-nachher Differenzen des Eigenzustandsfaktors Spannungslage mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	0,72	1	0,395	n.s.
Kopfseite	0,02	1	0,901	n.s.
Tag (1-5)	0,25	4	0,993	n.s.
SAR * Kopfseite	0,28	1	0,595	n.s.
SAR * Tag	10,90	4	0,028	signifikant
Kopfseite * Tag	3,23	4	0,520	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	2,35	4	0,671	n.s.

Die Änderung der Anspannung von "vor" zu "nach" der Exposition über die Tage verhielt sich zwischen den SAR Bedingungen signifikant unterschiedlich: Bei der niedrigen SAR nahm die Anspannung zu Beginn der Versuchswoche nach der Exposition zu, während bei der höheren SAR die Anspannung abnahm.

Tabelle 4.17: Ergebnisse der Analyse der vorher-nachher Differenzen des Eigenzustandsfaktors Ermüdung mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	0,60	1	0,438	n.s.
Kopfseite	1,62	1	0,203	n.s.
Tag (1-5)	4,19	4	0,381	n.s.
SAR * Kopfseite	2,63	1	0,105	n.s.
SAR * Tag	3,18	4	0,529	n.s.
Kopfseite * Tag	1,98	4	0,739	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	5,50	4	0,240	n.s.

Tabelle 4.18: Ergebnisse der Analyse der vorher-nachher Differenzen des Eigenzustandsfaktors Schläfrigkeit mittels verallgemeinerter Schätzgleichungen

Quelle der Varianz	Prüfgröße	Freiheitsgrade	p-Wert	Signifikanz
SAR	5,67	1	0,017	signifikant
Kopfseite	0,19	1	0,666	n.s.
Tag (1-5)	9,34	4	0,053	Tendenz
SAR * Kopfseite	0,09	1	0,767	n.s.
SAR * Tag	4,57	4	0,334	n.s.
Kopfseite * Tag	3,59	4	0,464	n.s.
SAR * Kopfseite * Tag	12,51	4	0,014	signifikant

Der Zunahme der Schläfrigkeit, war in der Gruppe mit der höheren SAR signifikant stärker ausgeprägt. Über die Woche blieb diese Zunahme bei der Bedingung mit der niedrigeren SAR konstant, während bei hoher SAR diese Zunahme von Tag zu Tag geringer wurde, wobei dieser Effekt bei rechtsseitiger Exposition am stärksten war.(Tabelle 4.18)

#### 4.4 ZUSAMMENFASSUNG: KOGNITIVE TESTS

An der Untersuchung nahmen 41 gesunde Erwachsene (21 Männer und 20 Frauen) im Alter von  $29 \pm 10$  Jahren teil. In einem Absorberraum wurde doppelt verblindet entweder die rechte oder linke Wange mit einem simulierten UMTS-Mobilfunksignal exponiert. Die spezifische Absorptionsrate (SAR) in der Mundhöhlen-Schleimhaut lag bei 0,1 bzw. 1,6 W/kg. 20 Personen wurden per Zufall der Expositionsgruppe mit einer SAR von 0,1 W/kg (9 an der linken, 11 an der rechten Kopfseite) und 21 Personen der Expositionsgruppe mit 1,6 W/kg (10 an der linken, 11 an der rechten Kopfseite) zugeteilt.

Während der Exposition von täglich etwa 2 Stunden Dauer wurden kognitive und Reaktionstests durchgeführt. Bei vielen dieser Tests (einfacher Reaktionstest, Wahlreaktionstest, O2-Test, Wahrnehmungsreaktionstest) traten über die Versuchswoche Lerneffekte im Sinne einer schnelleren Reaktion auf. Dabei war diese zunehmend schnellere Reaktion von einer Abnahme in der Anzahl korrekter Reaktionen begleitet. Im Gegensatz dazu nahmen die Reaktionszeiten bei den Gedächtnistests signifikant und beim Vigilanztest (Daueraufmerksamkeitstest) tendenziell zu, während wie bei den anderen Tests die Zahl richtiger Reaktionen signifikant abnahm.

In Bezug auf die Höhe der Exposition fand sich beim Wahlreaktionstest und beim Wahrnehmungsreaktionstest eine stärkere Abnahme der Reaktionszeiten bei den hoch exponierten Personen verglichen mit den niedrig exponierten. Beim Gedächtnistest war insgesamt die Reaktionszeit bei den höher exponierten kürzer. Die Fehlerrate war beim Wahrnehmungsreaktionstest und beim Gedächtnistest bei den höher Exponierten höher.

Der Eigenzustand und dessen Veränderung zeigten ebenfalls systematische Unterschiede in Abhängigkeit von der Höhe der Exposition. Die Anspannung nahm bei der hohen SAR über den Tag ab, bei der niedrigen zu, ein Effekt der besonders zu Beginn der Expositionsphase (Wochenbeginn) ausgeprägt war. Die Schläfrigkeit zu Zunahme während der Exposition war bei der hohen SAR zu Anfang der Woche stärker ausgeprägt. Diese Zunahme wurde im Laufe der Expositionsphase geringer, während sie bei der niedrigen Exposition annähernd gleich blieb.

Die aktuellen Resultate bestätigen Ergebnisse des ATHEM-1 Projektes, insbesondere hinsichtlich des Trends zu schnelleren Reaktionen und der Abnahme der Anzahl richtiger Reaktionen. Dieser Befund steht auch in Einklang mit internationalen Untersuchungen (siehe Abschnitt 4.1), und bietet eine Erklärung für kontrovers diskutierte Ergebnisse der bisherigen Forschung. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Reaktionszeiten und der Richtigkeit der Reaktionen von der Dauer der Exposition (innerhalb der Untersuchungstage und über die Untersuchungswoche). Ein gewisser Lerneffekt trat bei den meisten kognitiven Tests auf, aber bei einigen Tests zeigte sich ein klarer Effekt der Höhe der Exposition – entweder auf die Stärke des Lerneffektes oder auf das Gesamtniveau der Testleistung. Diese Effekte waren von der Test-Komplexität abhängig. Bei einfacheren Tests beobachteten wir unter Exposition allenfalls eine schnellere, aber qualitativ schlechtere Reaktion. Bei komplexeren Auf-

gaben verringerte sich beides: sowohl die Schnelligkeit als auch die Qualität der Reaktion.



## 5 HUMANE MUNDHÖHLENZELLEN

Titel des Teilprojektes:

### **Experimentelle Untersuchungen zu Auswirkungen von UMTS Mobilfunksignalen auf Zellen der Wangenschleimhaut**

Teilprojektleiter-1

(Probanden-Exposition, Daten-Auswertung):

Ao.Univ.Prof. Dr. Michael Kundi

Mitarbeiter:

Assoz.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Hans-Peter Hutter

Brigitte Piegler (MTA)

Teilprojektleiter-2

(Zell-Untersuchungen):

Ao.Univ.Prof. Dr. Siegfried Knasmüller

Mitarbeiter:

Mag. Halh Al-Serori

Dr. Armen Neseryan

Reportredaktion:

Ao.Univ.Prof. Dr. Michael Kundi

Ao. Univ.Prof. Dr. Siegfried Knasmüller

Ao.Univ.Prof. Dr. Wilhelm Mosgöller (Gesamtprojektkoordinator)

## 5.1 HINTERGRUND

Bei diesem ATHEM-2 Teilprojekt werden Untersuchungen von Anomalien des Zellkernes menschlicher Mundhöhlzellen durch Einwirkung hochfrequenter elektromagnetischer Felder (HF-EMF) durchgeführt.

Untersuchungen von Kleinkernen und anderen Kernanomalien in menschlichen Lymphozyten und anderen Zellen (Mundhöhlzellen, Nasenschleimhautzellen, Urothelzellen etc.) kommen in den letzten Jahren hinsichtlich der Frage eines möglichen Expositionsrisikos eine wachsende Bedeutung zu. Einerseits gibt es nunmehr umfangreiche Richtlinien zur Durchführung dieser Tests,<sup>[75-79]</sup> und andererseits korrelieren die Resultate dieser Tests mit dem Krebsrisiko, wie es in epidemiologischen Studien ermittelt wurde.<sup>[80]</sup> Man kann somit früher (also ohne auf den seltenen Eintritt einer tatsächlichen Krebserkrankung warten zu müssen) Hinweise auf ein erhöhtes Risiko in einer exponierten Gruppe erhalten.

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zu Kernanomalien im Zusammenhang mit der Nutzung von Mobiltelefonen durchgeführt. Kleinere Untersuchungen an ca. 25 Handynutzern und ebenso vielen Kontrollpersonen aus Indien<sup>[81, 82]</sup> ergaben höhere Kleinkernraten in peripheren Lymphozyten bzw. Mundhöhlzellen und erhöhte Zahlen dizentrischer Chromosomen<sup>[83]</sup> bei Handynutzern. Eine größere Untersuchung an 85 Handynutzern und 24 Kontrollen aus Indien<sup>[84]</sup> ergab ebenfalls erhöhte Kleinkernraten in Mundhöhlzellen von Handynutzern und auch eine größere Zahl von so genannten ‚broken eggs‘ und Doppelkernzellen. Eine Felduntersuchung von Mundhöhlzellen aus Deutschland<sup>[85]</sup> fand keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl von Kleinkernen und der Dauer der Nutzung eines Mobiltelefons. Dabei gab es allerdings nur 13 von 131 Personen die kein Handy benutzten, und es waren auch nur 33 Personen, die mehr als 3 Stunden pro Woche mit dem Handy telefonierten. Eine Untersuchung aus Brasilien<sup>[86]</sup> inkludierte 45 Personen, die nach der Dauer der Nutzung pro Woche in drei Gruppen eingeteilt wurden. Es fanden sich keine Unterschiede in den Kleinkernen, aber höhere Raten von Kernanomalien wie beispielsweise ‚broken eggs‘ bei Personen mit intensiverer Handynutzung.

Die Faktenlage zu Veränderungen von Zellen, die von den Handynutzern gewonnen wurden, spricht eher für eine gen- oder gen/zytotoxische Wirkung, aber die Befunde insgesamt sind widersprüchlich und haben eine Reihe von methodischen Schwächen. In allen bisherigen Untersuchungen wurde die von den Probanden berichtete (durchschnittliche) Nutzungsintensität eines Mobiltelefons erfasst, dies bildete die Basis für die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs. Dabei ist einerseits zu berücksichtigen, dass die individuelle Einschätzung der Nutzungsintensität fehlerbehaftet sein kann und andererseits dass die kurz zurückliegende Exposition im Vergleich zur früheren aufgrund der Generationszeit der Mundhöhlzellen von zwei bis drei Wochen unterschiedliche Effekte haben kann. Länger zurückliegende Expositionen können sich auf die Basalzellen auswirken, aus denen die differenzierten Mundhöhlzellen entstehen, während die kurz zurückliegende Exposition die Entwicklung der bereits generierten Tochterzellen der Basalzellen beeinflussen könnte.

Bei der Untersuchung der abgeschälten Mundhöhlzellen wird unter diesen Umständen immer eine Mischung aus chronischer und akuter Exposition beobachtet, wobei kumulative Effekte nicht ausgeschlossen sind.

Welchen Wert eine Person für die durchschnittliche Dauer der Nutzung angibt, richtet sich nach einer individuellen Gewichtung. Die subjektive Schätzung kann also möglicherweise erheblich von der tatsächlichen Nutzung in den letzten zwei bis drei Wochen abweichen. Das größte Problem liegt aber in der Dosimetrie. Die tatsächliche Exposition der Zellen ist von der Art und dem Modell des persönlichen Handys, von der Position des Handys bei der Nutzung und den Empfangsbedingungen am Ort der Nutzung abhängig. Dadurch kommt eine starke Variation der Exposition zustande, die es schwierig macht einen objektiven Vergleich durchzuführen. Ein weiteres Problem der bisher vorgelegten Untersuchungen findet sich in der Verwendung nicht validierter Protokolle für die Durchführung der Untersuchungen.

### **5.1.1 Zellkernanomalien**

Kleinkerne sind intrazelluläre Strukturen, die Chromatin enthalten und von einer eigenen Kernmembran ohne Verbindung zum Zellkern umgeben sind. Sie entstehen während der Zellteilung durch Ausschluss von ganzen Chromosomen (aneugener Effekt) oder Chromatinfragmenten (klastogener Effekt) aus dem Zellkern als Endpunkt einer gentoxischen Schädigung. Sie können auch auftreten wenn bei der Zellteilung eine Störung des so genannten Spindelapparats vorliegt. Andere Anomalien, die gentoxische Effekte anzeigen, sind so genannte nukleäre Sprossen (die z.B. infolge von Genvervielfachung entstehen) und ‚broken eggs‘. Zytotoxische Effekte aber auch eine Kombination von gen- und zytotoxischen Effekte zeigen Doppelkernzellen an. Verschiedene Stufen des Zelluntergangs, der sowohl gentoxische als auch zytotoxische Ursachen haben kann, sind Pyknose, kondensiertes Chromatin, Karyorrhesis und Karyolyse.

In der folgenden Übersicht (Abbildung 5.1) werden die verschiedenen Kernanomalien und ihre möglichen Ursachen schematisch dargestellt.

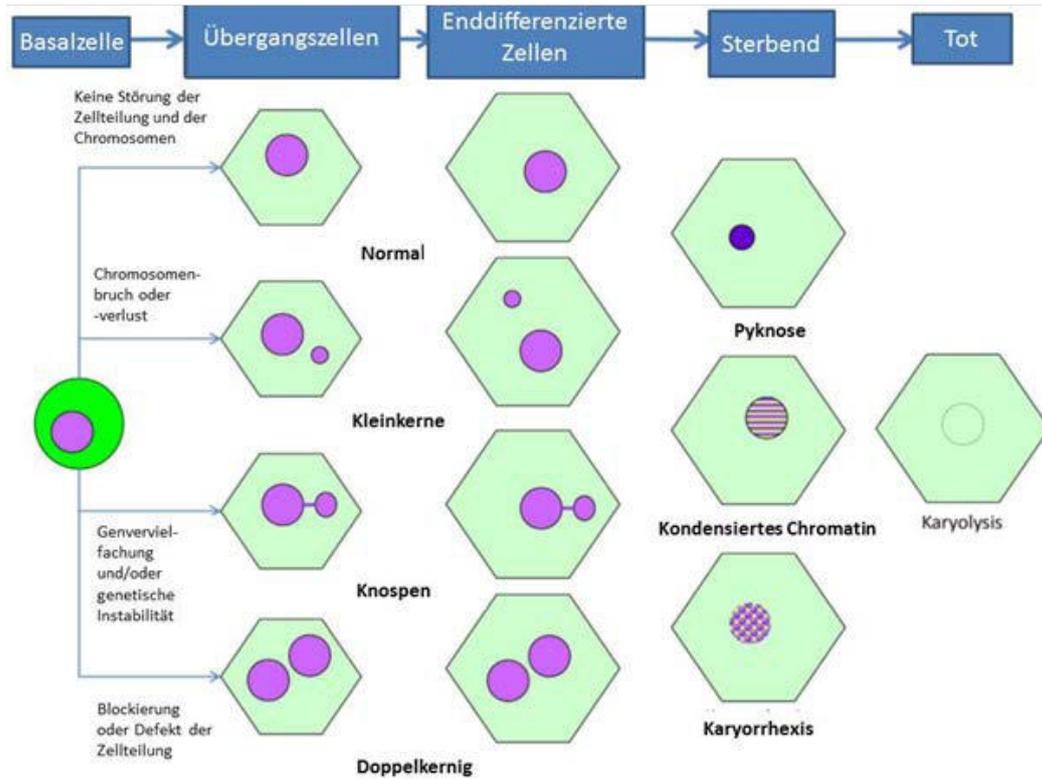


Abbildung 5.1: Übersicht über die Entwicklung von differenzierten Mundhöhlzellen mit und ohne Kernanomalien. Es ist zu beachten, dass Zellen mit Kleinkernen, nukleären Knospen oder doppelkernige Zellen in der weiteren Entwicklung absterben. Eine bereits sterbende Zelle kann allerdings keine neuen genotoxischen Effekte mehr ausbilden.

Beispiele, wie solche Zellen unter dem Mikroskop mit und ohne Fluoreszenzfilter aussehen, sind in Abbildung 5.2 zusammengestellt.

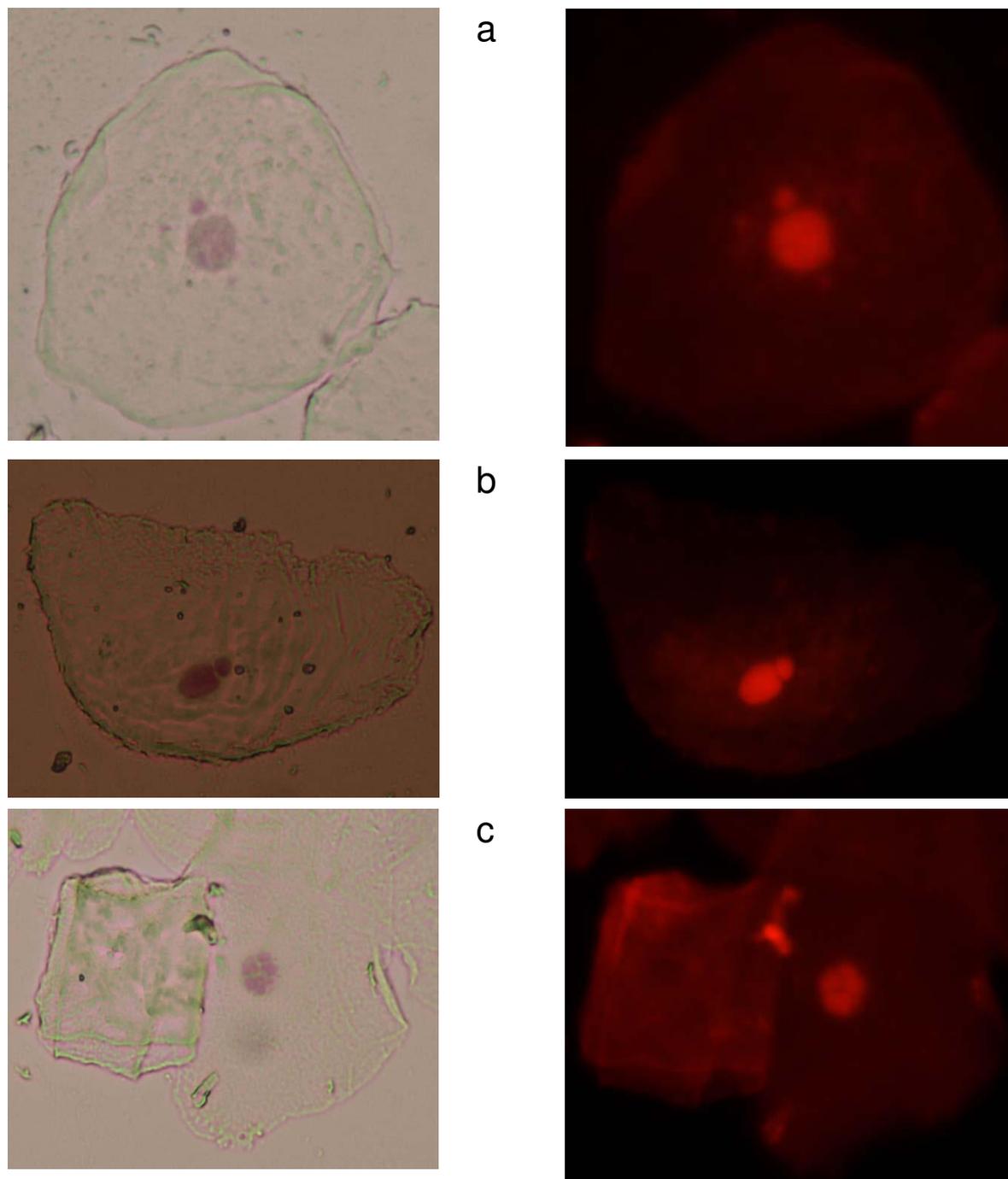


Abbildung 5.2: Beispiele von Mikrofotografien von Mundhöhlzellen. Die DNA wurde mit Feulgen, Zytoplasma mit Light Green gefärbt. Zellen bei 400-facher Vergrößerung unter Transmission (linke Bilder), und Fluoreszenzfilter im Rotbereich (rechte Bilder);  
a) Zelle mit Kleinkern, b) Kernknospe („nukleäre Sprosse“), c) Karyorrhexis (rechte Zelle) und Karyolysis (linke Zelle).

### 5.1.2 Untersuchungsziele

Es wurde ein experimenteller Ansatz verfolgt, der die vorhin genannten methodischen Fragen berücksichtigen sollte. Die wichtigsten Punkte dabei sind:

- Experimentelle Intervention;  
Gezielte Exposition über definierte Zeiträume und Intensitäten im Labor
- Definierter Beobachtungszeitraum von 7 Wochen; Verwendung eines Headsets bei allfälliger Handynutzung durch die Probanden während dieser Zeit
- Doppelt blinde Versuchsdurchführung;  
(weder der Proband noch die Untersucher wissen, welche Seite zum Schein exponiert und welche Seite mit welcher Dosis real exponiert wurde)
- Direkter Vergleich vor zu nach der Exposition; Abnahme der Mundhöhlzellen unmittelbar vor der experimentellen Exposition, 2 und 3 Wochen nach Exposition
- Intraindividuelle Kontrolle durch direkten Vergleich mit den Werten vor Expositionsbeginn und der nicht exponierten Kopfseite
- Durchführung des Cytom-Assays nach einem validierten Protokoll [76]

## 5.2 MATERIAL UND METHODEN

### 5.2.1 Human Exposition Versuchsdesign

Das Untersuchungsdesign ist ein 2x2-Gruppen doppelblinded Untersuchungsdesign. Die Personen wurden nach Zufall den Versuchsbedingungen zugeordnet. Jede Person erhielt täglich zur selben Tageszeit über 5 Tage die zugeordnete Exposition über ca. 1 h 50 min.

Tabelle 5.1. Versuchsschema mit den vier Untersuchungsgruppen, die sich hinsichtlich der Intensität und der Kopfseite, an der die Exposition einwirkte, unterschieden

Exponierte Kopfseite Intensität	Links	Rechts
SAR 0,1 W/kg	A	B
SAR 1,6 W/kg	C	D

Die Personen wurden in einem mit Absorbermaterial ausgestatteten Versuchsraum exponiert, wobei die Antennen am Kopf so fixiert wurden, dass sie ohne Beeinträchtigung der Bewegung längere Zeit weitgehend belastungsfrei getragen werden können. Es befanden sich Antennen an beiden Kopfseiten, sodass weder dem Versuchsleiter noch der Versuchsperson erkennbar war, auf welcher Seite die Exposition stattfand. Der Expositionsablauf ist ident zur Untersuchung aus Abschnitt 0.

### 5.2.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Personen im Alter von 20 bis 60 Jahren beiderlei Geschlechts, die Nichtraucher ohne akute oder chronische Krankheiten waren (was mehrstündigen Versuchsanwesenheit unmöglich gemacht hätte), die möglichst nicht oder weniger als eine Stunde pro Tag mobil telefonieren, wurden in die Studie aufgenommen, sofern sie nach Information über den Studienablauf der Teilnahme schriftlich zustimmten.

Die Teilnehmer wurden informiert, dass sie während zwei Wochen vor dem Experiment bis drei Wochen danach ein Tagebuch führen müssen und falls sie ein Mobiltelefon verwenden nur mit Freisprecheinrichtung telefonieren sollen (falls sie keine solche zur Verfügung hatten, wurde eine zur Verfügung gestellt).

### 5.2.3 Fallzahlermittlung

Für die Fallzahl-Ermittlung (Ermittlung der optimalen Stichprobengröße) wurden folgende Überlegungen und Annahmen berücksichtigt:

1. Wie groß ist der zu erwartende Effekt?
2. Welche Streuung hat die primäre Zielgröße?
3. Welches statistische Signifikanzniveau soll gewählt werden?
4. Welche statistische Mächtigkeit soll die Untersuchung besitzen?

Ad 1. **Effektgröße:** In der Untersuchung von Yadav and Sharma (2008)<sup>[84]</sup> wurden 24 Personen, die angaben kein Mobiltelefon zu benutzen, 85 regelmäßigen Nutzern gegenüber gestellt. Die durchschnittliche tägliche Expositionsdauer war eine Stunde und die Handys hatten laut Herstellerangaben maximale SAR Werte zwischen 0,34 und 0,95 W/kg. Der Unterschied in den Kleinkernraten der Mundhöhlzellen war statistisch hochsignifikant mit einer standardisierten Effektstärke (Cohens d) von 1,64. Die zweite Untersuchung von Hintzsche and Stopper (2010)<sup>[85]</sup> an einer Stichprobe von insgesamt 112 Personen fand 21 Personen, die weniger als 5 Jahre ein Handy benutzten und 91 mit 5 oder mehr Jahren Nutzungsdauer. Der Vergleich dieser Gruppen ergab einen schwachen Effekt von  $d=0,3$ .

Bei der Analyse nach täglicher Nutzungsdauer gab es keine relevanten Unterschiede, aber auch sehr kleine Gruppen (z.T. mit nur einer Person) und insgesamt nur 3 Personen, die das Handy mehr als eine Stunde pro Tag benutzten. Es ergibt sich daher aus der Literaturanalyse keine zuverlässige Schätzung des zu erwartenden Effektes. Wir gehen aufgrund dieser Vorbefunde davon aus, dass unter den kontrollierten experimentellen Bedingungen eine Effektstärke von  $d=1$  detektierbar sein sollte.

Ad 2. **Streuung:** Hinsichtlich der Variation der primären Zielgröße (in diesem Fall der Kleinkernrate) gibt es ausreichende statistische Grundlagen.<sup>[87, 88]</sup> In dem zu erwartenden Bereich von niedrigen bis mittleren Kleinkernraten kann man davon ausgehen, dass die geometrische Streuung über die Personen (weitgehend unabhängig von der absoluten Höhe der Kleinkernraten) etwa 0,8 beträgt.

Ad 3. Als **Signifikanzniveau** wurde konventionsgemäß eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% gewählt ( $p < 0,05$ ).

Ad 4. Die **statistische Mächtigkeit** wurde mit 80% festgelegt.

Auf Basis dieser Annahmen ergibt sich für die Zielgröße, die als Differenz zwischen dem Wert vor und nach Exposition definiert ist, eine Streuung (bei einer Korrelation von 0,75 zwischen den beiden Zeitpunkten) von 0,89 (ausgehend von einer Streuung

der Einzelwerte gemäß Punkt 2 von 0,8). Die korrigierte Effektgröße beträgt demnach 0,9.

Daraus berechnet sich ein kritischer t-Wert von 2,021. Dieser Wert ist auf dem korrigierten 5%-Niveau bei einer Stichprobengröße von insgesamt 21 Personen bei einer Mächtigkeit von 80% signifikant (vgl. Abbildung 5.3).

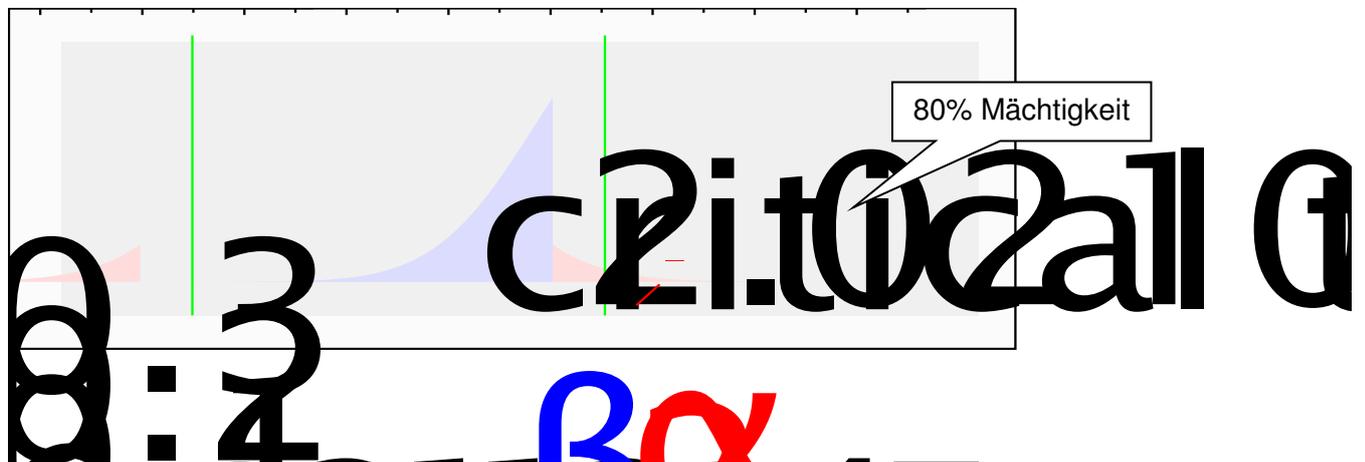


Abbildung 5.3: Plot der Student t-Verteilung mit der Nullhypothese (rot) und der Alternativhypothese (blau) – Plot erstellt mit der Software G\*Power Version 3.1.2.  $\alpha$ : Signifikanzniveau (0,05 = 5 %),  $\beta$ : 1-Mächtigkeit = 0,2.

Bei zwei Expositionsintensitäten waren also insgesamt 42 Personen einzuschließen.

### 5.2.4 Versuchsablauf

Der Ablauf über den gesamten Versuch ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

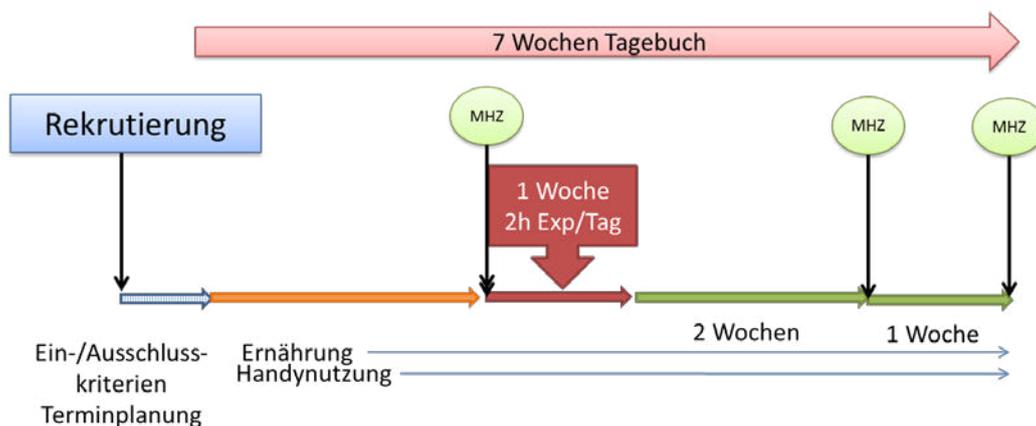


Abbildung 5.4: Schema des Ablaufs für die Probanden.

Nach Rekrutierung erfolgte der Start mit Führen des Tagebuchs zwei Wochen vor der experimentellen Exposition bis drei Wochen danach. Die Entnahme der Mundhöhlzellen (MHZ) erfolgte vor der ersten Exposition am ersten Tag der Expositionswoche sowie zwei und drei Wochen danach.

Der Ablauf des Versuches erfolgte an jedem der fünf Tage mit Exposition nach dem gleichen Schema. Nach einer Akklimation und dem Anlegen des Antennensets wurde verblindet die jeweilige Exposition gestartet. Während der zweistündigen Exposition absolvierten die Personen einer Reihe von Aufgaben und sahen Diashows, die mittels Computer dargeboten wurden. Am ersten Versuchstag legte ein Zufalls-generator fest, ob die linke oder rechte Wange exponiert wird, und ob die niedrige

oder höhere Exposition erfolgen soll. Über die Eingabe des Namens der Versuchsperson erfolgte die entsprechende Exposition dann automatisch nach der Auswahl am ersten Versuchstag

Nach Abnahme der Antennen am Ende der Exposition erfolgte noch eine kurze Befragung zu besonderen Wahrnehmungen. Die gesamte Dauer des Versuchs war etwa 2 ½ Stunden pro Tag. Das Schema wurde täglich von Montag bis Freitag beibehalten. Am letzten Tag wurde für die Abnahme der Mundhöhlzellen nach zwei und drei Wochen Termine vereinbart.

### **5.2.5 Untersuchungspersonen**

Von den planmäßig 42 rekrutierten Personen schied eine Person nach dem ersten Versuchstag aus familiären Gründen aus und konnte aufgrund des engen Zeitplans nicht ersetzt werden.

Von den Teilnehmern waren 21 Männer und 20 Frauen. Das Alter betrug  $29 \pm 10$  Jahre (22 bis 56 Jahre). 7 waren Links- und 34 Rechtshänder. Die Mehrheit (30 Personen) hatten eine AHS abgeschlossen und 9 eine akademische Ausbildung, 2 Personen hatten eine Fachschule absolviert.

20 Personen wurden der niedrigen Exposition (SAR 0,1 W/kg) per Zufall zugeordnet, wobei 9 an der linken und 11 an der rechten Kopfseite exponiert wurden und 21 Personen der hohen Exposition (SAR 1,6 W/kg), wobei 10 an der linken und 11 an der rechten Kopfseite exponiert wurden.

### **5.2.6 Tagebücher**

Die Tagebücher wurden zwei bis drei Wochen vor der Testwoche, während und drei Wochen nach der Testwoche geführt (also insgesamt 6-7 Wochen). Es wurde für jeden Tag die Anzahl der geführten Handygespräche, die Gesamtdauer der Gespräche sowie die Dauer der ohne Freisprecheinrichtung geführten Gespräche dokumentiert.

Der Konsum scharfer Speisen, Zahnfleischbluten und eventuelle andere besondere Vorkommnisse die den Zustand der Mundschleimhaut beeinflussen hätte können, wurden ebenfalls im Tagebuch vermerkt.

2. Woche				3. Woche				4. Woche			
Handytelefonieren ohne Frspr.				Handytelefonieren ohne Frspr.				Handytelefonieren ohne Frspr.			
Datum	Anzahl	Minuten		Datum	Anzahl	Minuten		Datum	Anzahl	Minuten	
Mo 21.01.2013				Mo 28.01.2013				Mo 04.02.2013			
Di 22.01.2013				Di 29.01.2013				Di 05.02.2013			
Mi 23.01.2013				Mi 30.01.2013				Mi 06.02.2013			
Do 24.01.2013				Do 31.01.2013				Do 07.02.2013			
Fr 25.01.2013				Fr 01.02.2013				Fr 08.02.2013			
Sa 26.01.2013				Sa 02.02.2013				Sa 09.02.2013			
So 27.01.2013				So 03.02.2013				So 10.02.2013			
Anmerkungen:				Anmerkungen:				Anmerkungen:			

2. Woche				3. Woche				4. Woche			
Datum	Scharfe Speise	Zahnfl. bluten	Sonst.	Datum	Scharfe Speise	Zahnfl. bluten	Sonst.	Datum	Scharfe Speise	Zahnfl. bluten	Sonst.
Mo 21.01.2013	○	○	○	Mo 28.01.2013	○	○	○	Mo 04.02.2013	○	○	○
Di 22.01.2013	○	○	○	Di 29.01.2013	○	○	○	Di 05.02.2013	○	○	○
Mi 23.01.2013	○	○	○	Mi 30.01.2013	○	○	○	Mi 06.02.2013	○	○	○
Do 24.01.2013	○	○	○	Do 31.01.2013	○	○	○	Do 07.02.2013	○	○	○
Fr 25.01.2013	○	○	○	Fr 01.02.2013	○	○	○	Fr 08.02.2013	○	○	○
Sa 26.01.2013	○	○	○	Sa 02.02.2013	○	○	○	Sa 09.02.2013	○	○	○
So 27.01.2013	○	○	○	So 03.02.2013	○	○	○	So 10.02.2013	○	○	○
Anmerkungen:				Anmerkungen:				Anmerkungen:			

Abbildung 5.5: Beispiel für einen Teil des Tagebuchs zur Handynutzung und zu anderen relevanten Verhaltensweisen und Vorkommnissen. Die Tage für die geplante Laborexposition sind farbig unterlegt.

### 5.2.7 Mundhöhlen-Cytom Assay

Jeweils 2 und 3 Wochen nach der Exposition wurden die Mundhöhlen-Zellen von den Probanden mittels einer Zahnbürste geerntet.<sup>[89]</sup> Die Entnahme der Zellen von der Wangschleimhaut erfolgte getrennt, jeweils von der rechten und linken Wange.

Anschließend wurden die Zellen entsprechend dem Protokoll von Thomas *et al.* (2009)<sup>[76]</sup> vorbereitet. Die Zellen wurden mit einer sterilen Pipette mit einem Tropfen Wasser auf die beiden Enden eines Objektträgers gestrichen und mit einer DNA-spezifischen Färbung (Feulgen) angefärbt. Nach dem Waschen wurde unter fließendem Wasser 3 Minuten gespült und danach mit Schiffschem Reagens im Dunkeln bei Raumtemperatur für 90 Minuten gefärbt. Danach wurden die Objektträger mit 0,2 % (w/v) mit Light Green gegengefärbt.

Die Slides wurden für die blinde Auswertung mit einer Codenummer versehen und dann mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 400x Vergrößerung ausgewertet.

Es wurden im ersten Schritt 1000 differenzierte Zellen und Basalzellen auf alle bekannten Kern-Abweichungen (Kleinkerne, nukleäre Sprossen, ‚broken eggs‘, Doppelkernzellen, kondensiertes Chromatin, karyorhektische, karyolytische und pyknotische Zellen) untersucht. Danach wurden weitere 1000 differenzierte Zellen auf Kleinkerne, nukleäre Sprossen und ‚broken eggs‘ geprüft.

### 5.2.8 Statistische Methoden

Die Zellkernanomalien, die beim Cytom-Assay in 1000 Zellen (zytotoxische Endpunkte) bzw. 2000 (gentoxische Endpunkte) gezählt werden, weisen meist eine so genannte Poisson-Verteilung auf. Deshalb wird bei der Auswertung diese Tatsache durch Anwendung der verallgemeinerten Schätzgleichungen berücksichtigt. Dabei wurde ein Poisson-Modell mit einem log-Link angewandt. Das bedeutet, dass der Parameter  $\lambda$  der Poisson-Verteilung als logarithmische Funktion von Faktoren und Kovariablen angesetzt wird.

#### Exposition mit zwei Intensitäten - und kontralaterale Seite

Im vorliegenden Fall wurden die Analysen in zwei Gruppen (SAR 1,6 und 0,1 W/kg) durchgeführt. Die Resultate 2 und 3 Wochen nach Exposition wurden auf den Zeitpunkt vor der Exposition bezogen. Die kontralaterale Kopfseite wurde als offset-Variable einbezogen, sodass die Schätzwerte als Odds-Ratio ausgedrückt einen Faktor ergeben, um den die Basisrate durch die Exposition erhöht oder erniedrigt wird, wobei gleichzeitig auf die nicht exponierte Kopfseite normiert wird. Als Kovariable wurden Alter und Geschlecht einbezogen. Es wurden paarweise Vergleiche innerhalb der experimentellen Gruppen gegen den Wert vor Exposition durchgeführt, die Bonferroni-korrigiert wurden. Die Abweichung vom Poissonmodell wurde überprüft und im Falle einer Überdispersion (Streuung größer als dem Poissonmodell entspricht) wurde die Analyse mit der negativen Binomialverteilung durchgeführt.

#### Exposition korrespondiert mit Kopfseite der Handynutzung

Zusätzlich wurde anhand der Angaben der Untersuchungspersonen, auf welche Kopfseite sie überwiegend beim Telefonieren das Handy halten, eine Aufteilung in zwei Gruppen vorgenommen:

1. Nicht korrespondierende Fälle, das sind Fälle, bei denen die Kopfseite der zufällig gewählten Exposition nicht mit der Kopfseite der Handynutzung übereinstimmt wurden der einen Gruppe zugeordnet.
2. Korrespondierende Fälle, bei denen eine Übereinstimmung vorlag, der anderen Gruppe.

Dabei wurden Personen, die angaben, beide Kopfseiten gleichhäufig zu nutzen, der korrespondierenden Gruppe zugeordnet, ebenso wie Personen, die kein Mobiltelefon nutzen.

## 5.3 ERGEBNISSE

### 5.3.1 Statistische Auswertung der Tagebücher

Tabelle 5.2 zeigt die durchschnittliche Zahl der Gespräche pro Woche, bzw. die Gesprächsminuten gesamt und die Gesprächsminuten ohne Freisprecheinrichtung pro Woche. Die 7. Woche wurde dabei weggelassen, weil sie wegen der letzten Zellabnahme am Donnerstag oder Freitag unvollständig war.

Tabelle 5.2. Median und Interquartilbereich der Anzahl Gespräche, Gesprächsminuten und Minuten ohne Freisprecheinrichtung pro Woche, für die Expositionsgruppen und Wochen 1 bis 6.

Gruppe	Woche	Anzahl Gespräche	Gesamt-Minuten	Minuten ohne Freisprecheinrichtung
<b>1,6 W/kg, rechts</b>	1	19,0 [16,0-27,0]	66,0 [49,0-130,0]	0,0 [0,0-3,0]
	2	19,0 [13,0-36,0]	116,0 [28,0-189,0]	0,0 [0,0-1,0]
	3	19,0 [13,0-37,0]	86,0 [32,0-134,0]	0,0 [0,0-0,6]
	4	22,0 [13,0-30,0]	116,0 [34,0-167,0]	0,0 [0,0-4,0]
	5	17,0 [11,0-29,0]	66,0 [23,0-163,0]	0,0 [0,0-1,0]
	6	20,0 [16,0-39,0]	98,0 [62,0-152,0]	0,0 [0,0-5,0]
<b>1,6 W/kg, links</b>	1	30,5 [11,5-61,0]	156,0 [41,5-248,3]	0,0 [0,0-3,0]
	2	23,0 [15,3-86,8]	176,0 [16,8-248,3]	0,0 [0,0-1,0]
	3	27,0 [6,8-82,8]	151,0 [11,3-221,8]	0,5 [0,0-1,0]
	4	35,0 [15,0-87,3]	146,5 [64,5-293,3]	0,0 [0,0-2,5]
	5	30,0 [10,5-80,3]	99,0 [37,5-332,0]	0,0 [0,0-4,5]
	6	34,0 [14,3-75,5]	147,5 [36,0-268,3]	0,0 [0,0-3,3]
<b>0,1 W/kg, rechts</b>	1	18,0 [14,0-49,0]	38,0 [33,0-138,0]	0,0 [0,0-1,0]
	2	16,0 [14,0-33,0]	59,0 [26,0-158,0]	0,0 [0,0-3,0]
	3	21,0 [13,0-37,0]	64,0 [33,0-164,0]	0,0 [0,0-1,2]
	4	22,0 [12,0-56,0]	84,0 [33,0-164,0]	0,0 [0,0-4,0]
	5	23,0 [16,0-54,0]	48,0 [27,0-248,0]	0,0 [0,0-2,0]
	6	16,0 [12,0-57,0]	43,0 [23,0-118,0]	0,0 [0,0-0,0]
<b>0,1 W/kg, links</b>	1	16,0 [5,5-24,0]	48,0 [10,0-149,0]	0,0 [0,0-6,5]
	2	10,0 [3,5-23,0]	35,0 [9,5-105,5]	0,0 [0,0-2,5]
	3	16,0 [2,0-37,5]	96,0 [5,0-141,0]	0,0 [0,0-2,1]
	4	8,0 [0,0-30,5]	41,0 [0,0-110,0]	0,0 [0,0-1,0]
	5	9,0 [5,0-31,0]	51,0 [18,5-120,5]	0,0 [0,0-3,5]
	6	10,0 [6,0-29,5]	78,0 [23,0-101,5]	0,0 [0,0-4,0]

Die Zahl der Tage mit Zahnfleischbluten oder scharfem Essen war zu klein, um sie als Durchschnittswerte darstellen zu können. Insgesamt trat scharfes Essen und Zahnfleischblutungen nur an 2 von 100 Personentagen auf.

Die Werte wurden für jede Woche über die vier Gruppen mittels Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis verglichen. In keinem Fall ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied.

### 5.3.2 Statistische Auswertung der üblichen Handynutzung

Die folgende Tabelle zeigt die für die Handynutzung üblicherweise genutzte Kopfseite sowie die außerhalb der 7 Wochen angegebenen Gesprächsminuten pro Monat aufgegliedert nach der im Versuch exponierten Kopfseite.

Tabelle 5.3. Kopfseite der üblichen Handynutzung und durchschnittliche Gesprächsdauer außerhalb der Versuchswochen in Relation zur Kopfseite der experimentellen Exposition

	Exponierte Kopfseite		Gesamt
	Links	Rechts	
<b>Kopfseite der Handynutzung</b>	Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
<b>kein Handy</b>	2 (10,5%)	2 ( 9,1%)	4 ( 9,8%)
<b>beide Seiten gleich</b>	5 (26,3%)	3 (13,6%)	8 (19,5%)
<b>links/überwiegend links</b>	3 (15,8%)	6 (27,3%)	9 (22,0%)
<b>rechts/überwiegend rechts</b>	9 (47,4%)	11 (50,0%)	20 (48,8%)
<b>Summe</b>	19	22	41
<b>Gesprächsminuten/Woche: Median [Interquartilbereich]</b>	360 [5-900]	300 [83-675]	300 [75-900]

Die berichtete Handynutzung außerhalb der Versuchswochen war mit mehr als dreimal so vielen Gesprächsminuten wesentlich intensiver als während der Versuchszeit dokumentiert. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen ist die Nutzung des Handys an der rechten Kopfseite etwas häufiger als an der linken.

### 5.3.3 Statistische Auswertung des Mundhöhlen-Cytom-Assays

#### Ergebnisse zu gentoxischen Endpunkten

Zu den Endpunkten, die gentoxische Effekte anzeigen, gehören insbesondere die Kleinkerne, nukleäre Sprossen und ‚broken eggs‘. Die Ergebnisse zu diesen Endpunkten sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Zunächst wurde geprüft, inwiefern die vorangegangene Handynutzung in Verbindung mit der für die Nutzung üblichen Kopfseite einen Einfluss auf die Ergebnisse vor dem Beginn der experimentellen Exposition hat.

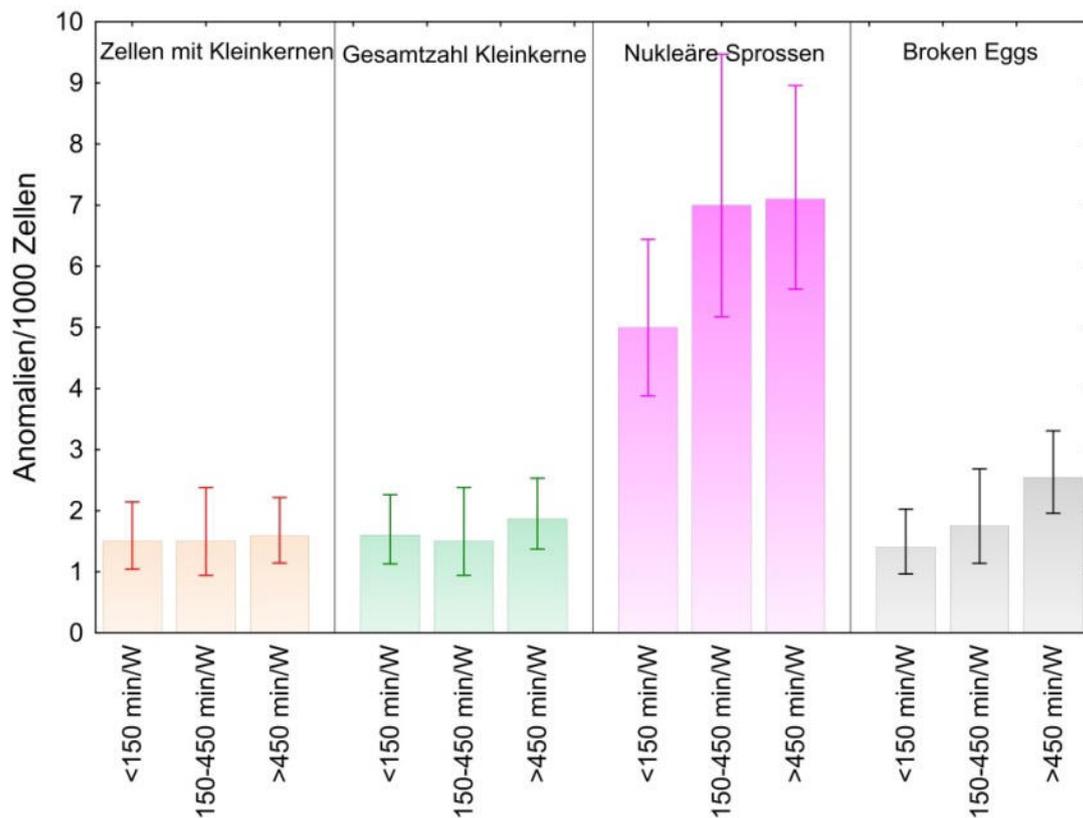


Abbildung 5.6. Anzahl Anomalien, die gentoxische Effekte anzeigen, vor der Exposition in Abhängigkeit von der üblichen Handynutzung (in Minuten pro Woche) an der Kopfseite der üblichen Nutzung

Es zeigte sich, dass die Zahl nukleärer Sprossen und ‚broken eggs‘ signifikant mit der Anzahl durchschnittlicher Gesprächsminuten (<150, 150-450 und >450 min/Woche) zunahm.

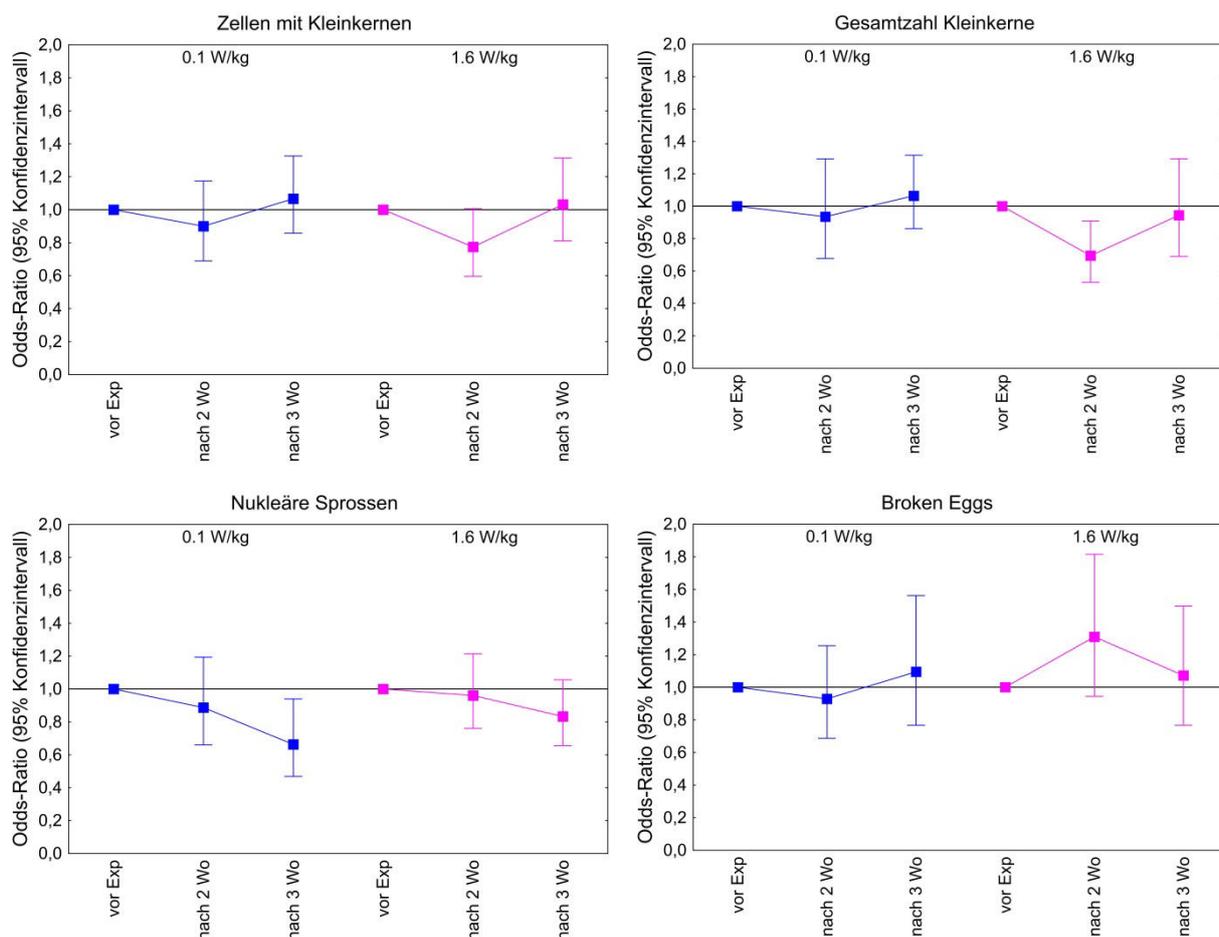


Abbildung 5.7. gentoxische Zellanomalien (Kleinkerne, nukleäre Sprossen, broken eggs) Odds-Ratio und 95% Konfidenzintervalle, 2 und 3 Wochen nach Exposition bei SAR-Werten von 0,1 oder 1,6 W/kg relativ zu den Werten vor Exposition und zur kontralateralen Kopfseite

Bei der Gesamtzahl der Kleinkerne trat zwei Wochen nach Exposition eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Werten vor Exposition und zur kontralateralen Seite auf. Bei nukleären Sprossen trat eine Reduktion im Vergleich zu den Werten vor der Exposition nach drei Wochen auf, wobei diese Reduktion bei der niedrigeren Exposition signifikant war. Keine systematischen Effekte traten bei ‚broken eggs‘ auf.

Die Stratifizierung in die Gruppen mit korrespondierender und nicht korrespondierender Expositionsseite kann Aufschluss über mögliche modifizierende Wirkungen der Handynutzung außerhalb der experimentellen Exposition geben.

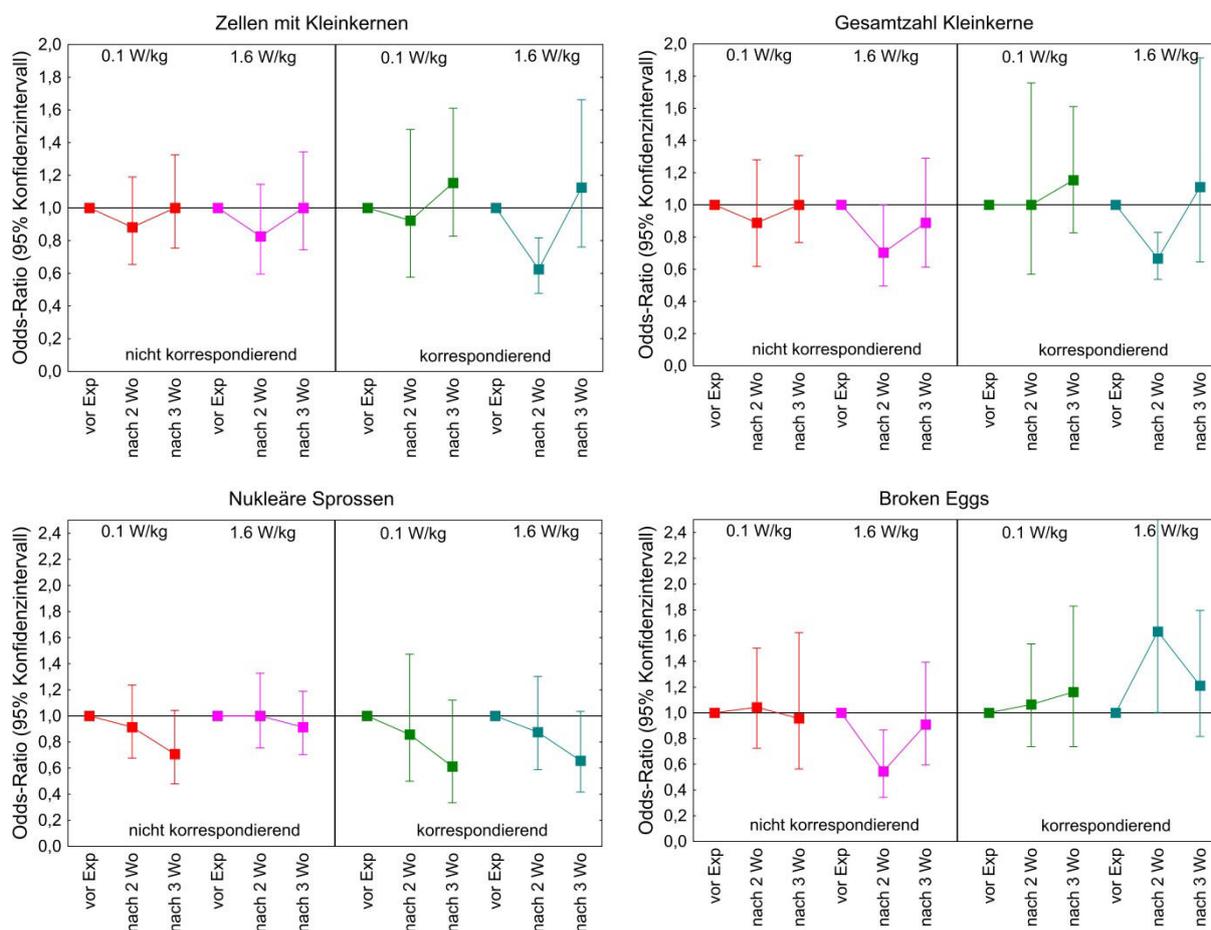


Abbildung 5.8. gentoxische Zellanomalien, Expositionsseite der Handynutzung. Odds-Ratio (und 95% Konfidenzintervalle) für die gentoxischen Zellanomalien (Kleinkerne, nukleäre Sprossen und ‚broken eggs‘) 2 und 3 Wochen nach Exposition bei SAR-Werten von 0,1 oder 1,6 W/kg relativ zu den Werten vor Exposition und zur kontralateralen Kopfseite; stratifiziert nach der Übereinstimmung der Expositionsseite mit der Kopfseite der Handynutzung.

Bei den Kleinkernen und nukleären Sprossen sind die Effekte bei den Probanden mit korrespondierender Exposition stärker ausgeprägt. Bei den ‚broken eggs‘ war die in der Gesamtauswertung dargestellte Reduktion nur bei den Personen mit nicht korrespondierender Expositionsseite zu beobachten, während in der Gruppe mit Exposition an der Kopfseite, die der üblichen Nutzung entspricht, sogar ein (nicht signifikanter) Anstieg aufgetreten war.

Tabelle 5.4 fasst die statistische Auswertung der gentoxischen Endpunkte zusammen.

Tabelle 5.4. Signifikanzprüfung der gentoxischen Endpunkte für die Faktoren: Wochen (2. und 3. Woche gegen Wert vor Exposition), Korrespondenz der Kopfseite der Exposition mit der üblichen Handynutzung und deren Wechselwirkung im Poisson-Modell. Angegeben sind die Wald-Chi<sup>2</sup> Werte als Prüfgröße und - in Klammer - der zugehörige p-Wert für die Signifikanzprüfung. **Fettdruck** zeigt signifikante Ergebnisse an.

SAR	Anomalie	Wochen (W)	Korresp. (K)	W*K
<b>0,1 W/kg</b>	Zellen mit Kleinkernen	1,95 (0,378)	0,04 (0,844)	0,46 (0,796)
<b>1,6 W/kg</b>	Zellen mit Kleinkernen	29,59 ( <b>&lt;0,001</b> )	3,80 (0,051)	7,09 ( <b>0,029</b> )
<b>0,1 W/kg</b>	Gesamtzahl Kleinkerne	0,93 (0,629)	0,00 (0,946)	0,44 (0,804)
<b>1,6 W/kg</b>	Gesamtzahl Kleinkerne	15,87 ( <b>&lt;0,001</b> )	3,62 (0,057)	0,82 (0,665)
<b>0,1 W/kg</b>	Nukleäre Sprossen	6,08 ( <b>0,048</b> )	0,07 (0,794)	0,16 (0,924)
<b>1,6 W/kg</b>	Nukleäre Sprossen	4,22 (0,121)	8,92 ( <b>0,003</b> )	1,60 (0,450)
<b>0,1 W/kg</b>	'broken eggs'	3,29 (0,193)	0,69 (0,407)	2,09 (0,352)
<b>1,6 W/kg</b>	'broken eggs'	6,24 ( <b>0,044</b> )	0,10 (0,756)	7,65 ( <b>0,022</b> )

## Ergebnisse zu zytotoxischen Endpunkten

Endpunkte, die eher zytotoxische Effekte anzeigen, sind Doppelkerne, kondensiertes Chromatin, Karyorrhesis, Karyolyse und Pyknose. Die Ergebnisse zu diesen Endpunkten sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

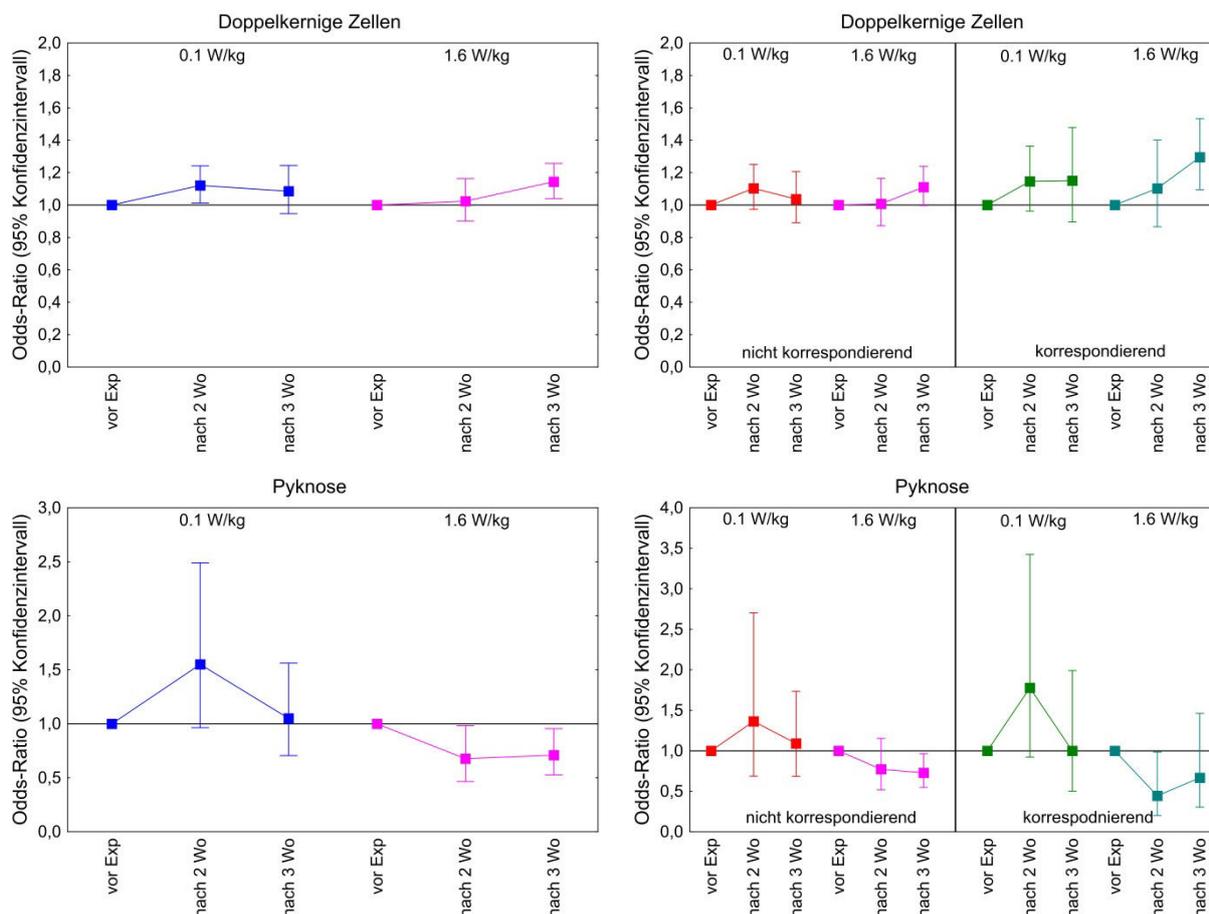


Abbildung 5.9. zytotoxischen Zellanomalien, nach Kopfseite der Handynutzung  
Odds-Ratio (und 95% Konfidenzintervalle) für die zytotoxischen Zellanomalien (doppelkernige Zellen und Pyknose) 2 und 3 Wochen nach Exposition bei SAR-Werten von 0,1 oder 1,6 W/kg relativ zu den Werten vor Exposition und zur kontralateralen Kopfseite insgesamt (linke Spalte); stratifiziert nach der Übereinstimmung der Expositionsseite mit der Kopfseite der Handynutzung (rechte Spalte).

Die doppelkernigen Zellen nahmen bei der höheren Exposition (SAR 1,6 W/kg) nach 3 Wochen signifikant zu, wobei dieser Effekt bei der Gruppe mit korrespondierender Exposition ausgeprägter war. Umgekehrt nahm die Zahl pyknotischer Zellen nach 2 und 3 Wochen signifikant ab, wobei auch hier der Effekt bei der dem Handygebrauch korrespondierenden Exposition stärker ausgeprägt, aber aufgrund der höheren Streuung nur beim 2-Wochenwert signifikant war.

Sowohl Zellen mit kondensiertem Chromatin als auch karyorrhektische Zellen nahmen 2 und 3 Wochen nach Exposition zu, wobei diese Zunahme der Karyorrhesis bei der höheren Exposition stärker war. Beide Anstiege waren in der Gruppe mit korrespondierender Exposition stärker ausgeprägt, wobei dieser Unterschied bei Zellen mit kondensiertem Chromatin bei der SAR von 1,6 W/kg statistisch signifikant war.

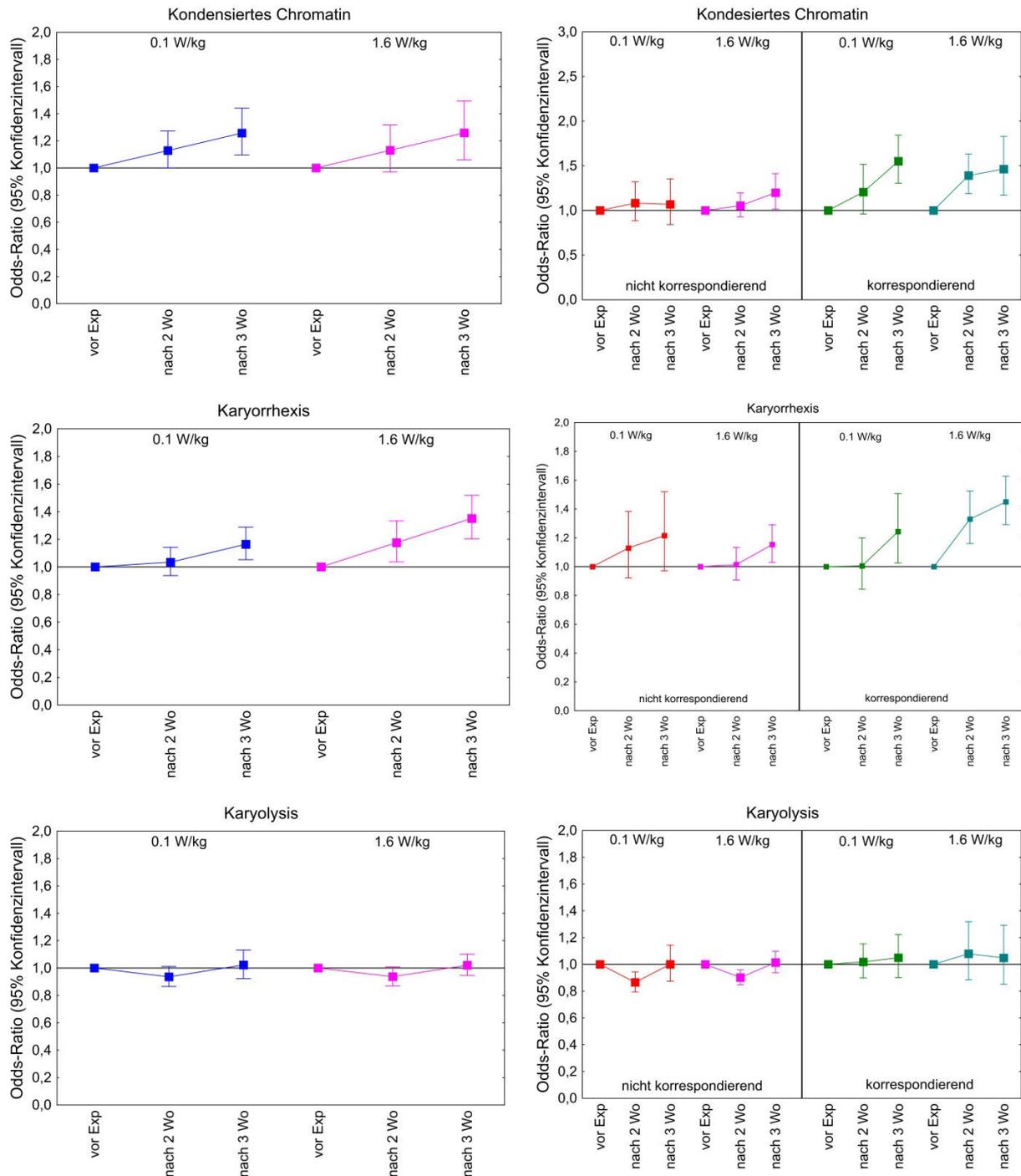


Abbildung 5.10. zytotoxische Zellanomalien, nach Kopfseite der Handynutzung  
 Odds-Ratio (und 95% Konfidenzintervalle) für die zytotoxischen Zellanomalien (kondensiertes Chromatin, Karyorrhexis, Karyolyse) 2 und 3 Wochen nach Exposition bei SAR-Werten von 0,1 oder 1,6 W/kg relativ zu den Werten vor Exposition und zur kontralateralen Kopfseite insgesamt (linke Spalte); stratifiziert nach der Übereinstimmung der Expositionsseite mit der Kopfseite der Handynutzung (rechte Spalte).

Die Karyolyse nahm nach 2 Wochen eher ab, nach 3 Wochen trat kein Unterschied zum Ausgangswert mehr auf. Die Abnahme nach 2 Wochen war in der Gruppe mit nicht-korrespondierender Exposition statistisch signifikant.

Tabelle 5.5 fasst die statistische Auswertung aller zytotoxischen Endpunkte zusammen.

Tabelle 5.5. Signifikanzprüfung der zytotoxischen Endpunkte für die Faktoren: Wochen (2. und 3. Woche gegen Wert vor Exposition), Korrespondenz der Kopfseite der Exposition mit der üblichen Handynutzung und deren Wechselwirkung im Poisson-Modell. Angegeben sind die Wald-Chi<sup>2</sup> Werte als Prüfgröße und – in Klammer - der zugehörige p-Wert für die Signifikanzprüfung. **Fettdruck** zeigt signifikante Ergebnisse an.

SAR	Anomalie	Wochen (W)	Korresp. (K)	W*K
<b>0,1 W/kg</b>	Doppelkernige Zellen	5,07 (0,079)	0,20 (0,651)	0,57 (0,752)
<b>1,6 W/kg</b>	Doppelkernige Zellen	13,44 ( <b>0,001</b> )	6,12 ( <b>0,013</b> )	2,27 (0,322)
<b>0,1 W/kg</b>	Karyorrhesis	26,52 (< <b>0,001</b> )	0,08 (0,782)	6,11 ( <b>0,047</b> )
<b>1,6 W/kg</b>	Karyorrhesis	8,31 ( <b>0,016</b> )	4,46 ( <b>0,035</b> )	0,97 (0,614)
<b>0,1 W/kg</b>	Karyolyse	6,24 ( <b>0,044</b> )	0,45 (0,504)	5,59 (0,061)
<b>1,6 W/kg</b>	Karyolyse	0,98 (0,612)	0,77 (0,381)	4,12 (0,127)
<b>0,1 W/kg</b>	Kondensiertes Chromatin	11,56 ( <b>0,003</b> )	0,16 (0,685)	7,40 ( <b>0,025</b> )
<b>1,6 W/kg</b>	Kondensiertes Chromatin	16,93 (< <b>0,001</b> )	0,04 (0,849)	7,80 ( <b>0,020</b> )
<b>0,1 W/kg</b>	Pyknose	4,56 (0,102)	0,04 (0,848)	0,74 (0,691)
<b>1,6 W/kg</b>	Pyknose	6,54 ( <b>0,038</b> )	0,03 (0,854)	2,69 (0,261)

## 5.4 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

In einem doppelblinden experimentellen Ansatz wurden gesunde Erwachsene in einem Absorberraum an der rechten oder linken Wangenseite mit einem simulierten UMTS Mobilfunksignal mit einer spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 0,1 oder 1,6 W/kg exponiert. 20 Personen wurden mit einer SAR von 0,1 W/kg (9 an der linken, 11 an der rechten Kopfseite) und 21 Personen mit 1,6 W/kg (10 an der linken, 11 an der rechten Kopfseite) exponiert. Die Auswahl der Expositionsparameter erfolgte per Zufallsgenerator. Die Exposition erfolgte jeweils von Montag bis Freitag täglich zur selben Zeit für ca. 2 Stunden.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Zellkernanomalien, die gen- bzw. zytotoxische Effekte anzeigen, waren komplex und nicht nur von den experimentellen Bedingungen, sondern teilweise auch von der üblichen Handynutzung der Teilnehmer abhängig. Dabei hatte die Kopfseite der üblichen Handynutzung in einem Drittel der untersuchten Anomalien einen modifizierenden Effekt auf die Ergebnisse.

Bei den Kernanomalien, die auf einen expositionsbedingten gentoxischen Effekt hindeuten, beobachteten wir zumeist eine Reduktion 2 Wochen nach Exposition (Abbildung 5.8).

Mit wenig Ausnahmen (karyolytische und pyknotische Zellen) trat bei allen zytotoxische Effekte anzeigenden Anomalien insbesondere bei der höheren Exposition (SAR: 1,6 W/kg) ein signifikanter Anstieg auf, der in den meisten Fällen in der Gruppe mit korrespondierender Exposition in verstärktem Ausmaß auftrat (Abbildung 5.10). Karyolyse tritt als letzter Schritt von Nekrose und Apoptose (Zelltod bzw. programmierter Zelltod) auf und ist bei Mundhöhlzellen grundsätzlich der Endpunkt der Entwicklung, bevor sie auf natürlichem Weg vom Epithel abgeschilfert werden. Pyknotische Zellen können als apoptotische Zellen mit extremer Chromatinkondensation aufgefasst werden. Zellen mit kondensiertem Chromatin können in Karyorrhexis oder in Pyknose übergehen, letzteres ist weit seltener und es ist unklar, welche Faktoren dafür verantwortlich sind.

Die Ergebnisse des Cytom-Assays zeigen insgesamt gesehen das Bild einer Störung der Zellintegrität, die sich vor allem in den zytotoxischen Endpunkten manifestiert. Allerdings sind Zellen im Endstadium des Zelluntergangs (karyolytische Zellen) seltener aufgetreten, was darauf hindeutet, dass die Anomalien Reparatur- bzw. Kompensationsversuche reflektieren. In karyorrhektischen Zellen oder solchen mit kondensiertem Chromatin ist das genetische Material inaktiviert. In diesem Kontext sind die teilweise reduzierten Zahlen von Zellen mit gentoxischen Effekten bedeutsam, denn es gibt eine indirekte Proportionalität zwischen der Häufigkeit zytotoxischer und gentoxischer Anomalien. Eine Zelle, die zytotoxische Einflüsse zu kompensieren versucht, wobei das Scheitern dieser Versuche sich als Pyknose oder Karyolyse darstellt, steht für gentoxische Einflüsse nicht zur Verfügung. Hingegen kann eine Zelle, deren Chromatin in kondensierter, inaktiver Form vorliegt, wieder in den Normalzustand mit dekondensierter DNA zurückkehren.

Wie die Ergebnisse des Cytom-Assays vor Beginn der experimentellen Exposition (siehe Abbildung 5.6) in Abhängigkeit vom Ausmaß der Handynutzung andeuten, könnte langfristig gesehen die Zahl gentoxischer Anomalien zunehmen. Man muss berücksichtigen, dass die im Cytom-Assay beobachteten Zellanomalien auf zwei Wegen zustande kommen können: erstens können sowohl gentoxische Einflüsse während der Zellteilung an der Basalzellschicht – etwa zwei bis vier Wochen bevor die Zelle die oberste Schleimhautschicht erreicht – als auch zytotoxische Einflüsse in der frühen Entwicklungsphase (Übergangsphase zur enddifferenzierten Epithelzelle) die Zellintegrität stören. Dies würde das in der abgenommenen Zellschicht beobachtete Bild liefern. Zweitens kann die Exposition die Zellen der Basalschicht beeinträchtigen, wodurch – sofern diese Beeinträchtigung bis zur nächsten Zellteilung durch Reparatur nicht rückgängig gemacht wird – die bei der Zellteilung entstehende Tochterzellen diese Beeinträchtigung ebenfalls aufweisen wird. Eine Basalzelle, die einem gentoxischen Einfluss ausgesetzt war, aber noch fähig ist, Tochterzellen zu generieren, kann bei den enddifferenzierten Tochterzellen einen gentoxischen Endpunkt aufweisen, normal erscheinen oder mit einem zytotoxischen Endpunkt beobachtet werden, denn eine Störung der DNA kann die Zelle dazu veranlassen, das Programm der Apoptose auszulösen.

Die stärkeren Effekte in der Gruppe der Personen, bei denen die Exposition während der experimentellen Woche an derselben Kopfseite standfand, an die sie das Handy üblicherweise halten (doppelkernige Zellen in Abbildung 5.9; kondensiertes Chromatin & Karyorrhexis in Abbildung 5.10), sprechen dafür, dass bei regelmäßig wiederholter Handynutzung in einem gewissen Ausmaß kumulative Effekte stattfinden. Diese über den Effekt der experimentellen Exposition hinausgehenden Auswirkungen waren zwar schwächer ausgeprägt als die Effekte der experimentellen Exposition, aber ausreichend, um Unterschiede in früheren Untersuchungen zu erklären.

## **6 GENETISCHE TOXIKOLOGIE**

# **Gentoxikologische Untersuchungen zur Risikofeststellung für mögliche Langzeitfolgen beruflicher Exposition**

Leiter des Teilprojektes

Ao. Univ.Prof. Dr. Siegfried Knasmüller

Sachbearbeiter:

Mag. Halh Al-Serori

Biostatistik

Ao. Univ.Prof. Dr. Michael Kundi

## 6.1 HINTERGRUND

Die Fragestellungen dieses Teilprojekts wurden aus den Ergebnissen des ATHEM-1 Projektes (2002-2008) und aus der international publizierten Forschung mit Stand 2011 heraus entwickelt. Während des Projektes ergaben sich einige Modifikationen, wie etwa die Aufnahme von zusätzlichen Glioblastom-Zellen und die Einbeziehung von Untersuchungen spezifischer DNA-Reparaturmechanismen in das Untersuchungsprogramm.

Alle Experimente zielten darauf ab, mögliche gentoxische Auswirkungen der Exposition zu hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) auf die menschliche DNA zu untersuchen.

### 6.1.1 Was ist DNA ?

Die DNA im Zellkern ist der Speicher der Erbinformation. Die einzelnen Abschnitte codieren die Information des Bauplans und der Funktion einer Zelle bzw. eines Organismus. Biochemisch gesehen ist DNA ein Doppelstrang-Biopolymer. Jeder Einzelstrang besteht aus sogenannten Nukleotiden, die wiederum aus einer Phosphat-Desoxyribose und einer von vier Basen (Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin) bestehen. Man kann sich den DNA-Doppelstrang wie eine Leiter vorstellen, die Quersprossen entstehen durch die exakte Paarung von zwei komplementären Basen, die durch Wasserstoffbrücken verbunden sind. Es paaren sich stets eine Purin-Base (Adenin oder Guanin) mit einer Pyrimidin-Base (Thymin oder Cytosin). Trotz verschiedener Größe der Basen ist der Abstand der beiden Stränge (vergleichbar den seitlichen Streben einer Leiter) ident, weil immer ein Purin mit einem Pyrimidin gepaart wird, nämlich Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin.<sup>[90]</sup>

Die DNA enthält Gen-Abschnitte. In diesen codiert die Basenabfolge (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin) eine für die Zelle lesbare Information. Dieser „genetische Code“ funktioniert vergleichbar mit der Abfolge von Buchstaben (A, B, C, ...) die in der richtigen Reihenfolge ein sinnvolles Wort ergeben. So wie in unserer Sprache kann der Austausch oder das Fehlen eines Buchstaben den Wortsinn verändern. („Brot“ wird durch Austausch oder Fehlen eines Buchstabens etwa zu Boot, Brxt, rot). Dabei kann dieser Austausch ein verändertes aber sinnvolles ‚Wort‘ (wie im Beispiel Boot, rot) oder ein sinnloses Wort (im Beispiel Brxt) ergeben. In jeden Fall geht die ursprüngliche Information verloren.

In der DNA ändert das Fehlen oder der Austausch einer Base den betroffenen genetischen Code. Falls diese Änderung nicht vor oder während der Replikation repariert wird, dann ist das Gen mutiert. Dabei kann diese Mutation (wie im Beispiel des Wortes Brxt) ein sinnloses Ergebnis („nonsense“) zeigen, d.h. das Genprodukt ist für Zelle und Körper unbrauchbar. Alternativ entsteht eine Sinnveränderung („missense“ aus Brot wird Boot), die ein verändertes Protein kodiert.<sup>[91]</sup>

### 6.1.2 DNA Schäden / Läsionen

Es gibt unterschiedliche Arten der DNA Schädigung („Läsion“) mit verschiedenen Ursachen. Kombiniert auftretend können sie ihre Wirkungen verstärken. Daher sind

es meist das Zusammentreffen und die Kombination von mehreren Einflüssen, und eher selten Einzelfaktoren, die zu Läsionen führen.

Bei hochenergetischer Strahlung stehen meist indirekte Schäden durch Oxidation der Basen im Vordergrund. Oxidierte Basen machen die DNA „brüchig“. Zelleigene DNA Reparaturmechanismen erkennen oxidierte DNA-Basen und beseitigen diese Läsionen.

Im Zuge der DNA-Reparatur kommt es in der Regel zur völligen Wiederherstellung der DNA-Sequenzen und des genetischen Codes (*Restitutio ad integrum*). Es passieren bei dieser Reparatur aber auch Fehler. Diese führen zum Verlust von Basen und anderen Störungen des DNA Moleküls und Veränderungen der genetischen Information. Auch wenn DNA-Schäden und Läsionen reparabel sind, zieht eine häufige Läsions-Reparatur ein erhöhtes Risiko nach sich, aufgrund geänderter Basenabfolgen genetische Codes zu verändern.<sup>[92]</sup>

In diesem Teil-Projekt wurden mögliche Effekte der HF-EMF Exposition auf die DNA, insbesondere expositionsbedingte Oxidation der Erbsubstanz, und Effekte auf die DNA Reparatur untersucht.

## 6.2 VERWENDETE METHODEN

Alle in diesem Teilprojekt durchgeführten Untersuchungen wurden mit Zellkulturen *in vitro* durchgeführt

### 6.2.1 Herkunft der Zelllinien

Die Zelllinien wurden von verschiedenen Institutionen bezogen und tiefgekühlt gelagert (Tabelle 6.1).

Vor der Anzucht für die Expositionsexperimente wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen untersucht und entsprechend einem Standardprotokoll auf Mykoplasmenbefall geprüft.

## 6.2.2 Kultivierung der Zellen:

Die Zellen wurden bei 37°C, in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> im jeweiligen für die Zelllinie typischen Medium kultiviert.

Tabelle 6.1: Herkunft und Kultivierung untersuchter Zelllinien

Zell-Typ	Zelllinie	Herkunft	Medium
Mundhöhlenschleimhaut-Epithel	TR-146	Dept. Dermatology, Harvard Medical School, USA	Dulbecco Medium mit 10% fötalem Rinderserum kultiviert.
Neuroblastom	SH-SY5Y	Inst. f. Neurophysiologie und Neuropharmakologie, Medizinische Universität Wien, Österreich	Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM): Ham's F12 (1:1-Mischung) mit 2 mM L-Glutamin und 12% fötalem Rinderserum kultiviert.
Leberkarzinom	HepG2	Centre for Human Safety & Health, Universität Leiden, Holland	Eagle's Minimal Essential Medium, mit 1.0 mM Natrium pyruvate und 10 % fötales Rinderserum
Fibroblastenzell-linie	ES-1	Inst. f. Arbeitsmedizin d. Medizinischen Universität Wien, Österreich	Dulbecco Medium mit 10% fötalem Rinderserum kultiviert
Glioblastom	U-87	National Institute of Biology, Ljubljana, Slowenien	Minimum Essential Medium mit 2 mM L-Glutamin, 0.1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA), 1,0 mM Natriumpyruvat und 10% fötalem Rinderserum kultiviert.
Glioblastom Stammzelle	NCH421k		Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM): Ham's F12 (1:1-Mischung) mit 2 mM L-Glutamin, 12% fötalem Rinderserum, B-27 Supplement, Heparin, bFGF und EGF
Glioblastom	U373		Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM): Ham's F12 (1:1-Mischung) mit 2 mM L-Glutamin und 10% fötalem Rinderserum kultiviert.
Glioblastom	U251		

### 6.2.3 Allgemeiner *in vitro* Versuchsansatz

Typischerweise wurden drei Petrischalen mit je  $5 \times 10^5$  frisch ausgesäten Zellen nach einer Anwuchszeit von 24 Stunden für 6, 16, oder 24 Stunden mit Feldintensitäten entsprechend einem SAR Wert von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg gegenüber UMTS Feldern exponiert.

Bei jedem Experiment wurde stets eine scheinexponierte (Negativ-) Kontrolle mitgeführt. Die Proben waren bei den nachfolgenden Laborarbeiten verblindet. Die Entblindung (Zuordnung welche Zellen real und welche Zellen scheinexponiert waren) erfolgte nach der Auswertung.

Als zentrale Methode zur Feststellung von DNA Brüchen oder DNA-Läsionen kam der „Comet-Assay“ zur Anwendung. Dieser wurde je nach Fragestellung abgewandelt und ausgeführt als:

- Standard Comet Assay
- FPG-Comet Assay (Vorbehandlung mit FPG)
- Endo-III Comet Assay (Vorbehandlung mit Endo-III)
- $H_2O_2$  Comet Assay (Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid)

### 6.2.4 Nachweis von Einzel und Doppelstrangbrüche (Standard Comet Assay)

Der Comet Assay wurde in der von Tice et al.<sup>[93]</sup> erweiterten Form (sogenannter alkalischer Comet Assay) durchgeführt, um Einzel- und Doppelstrangbrüche zu detektieren. Die Zellen werden dabei in Agarose-Gel (Kohlenhydrat-Netzwerk: für die Elektrophorese in Pufferlösung aufgekochtes Polysaccharid) eingebettet und nachfolgend lysiert (d.h. die Zell-Membranen werden aufgelöst).

#### Wie funktioniert ein Comet Assay?

Nach der HF-EMF Exposition und Vorbehandlung (z.B. mit FPG, Endo-III,  $H_2O_2$ ) taucht man die lysierten Zellen in einen Elektrolytpuffer und legt Spannung an. Negativ geladene Teilchen (z.B. gebrochene DNA-Stränge) wandern in die Richtung des Pluspoles. Die Wanderstrecke korreliert mit der Größe der DNA Bruchstücke. Je kleiner ein Bruchstück ist, umso weiter wandert es ins Gel. Intakte DNA verbleibt im Zellkern, sie ist zu groß, um ins Gel wandern zu können. Die anschließende DNA Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff liefert von geschädigten Zellen Bilder, die an Kometen erinnern.

Die intakten Zellkerne und die Kometen, die infolge von Strangbrüchen entstehen, können in einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Diese mikroskopisch kleinen Strukturen (runde oder kometenartige Gebilde) werden mit einer Spezialkamera abgelichtet. Die Verteilung der Lichtintensität zwischen Kern (intakte DNA) oder Schweif (fragmentierte DNA) wird mittels Computersoftware automatisiert bestimmt<sup>[93]</sup> (siehe Abbildung 6.1).

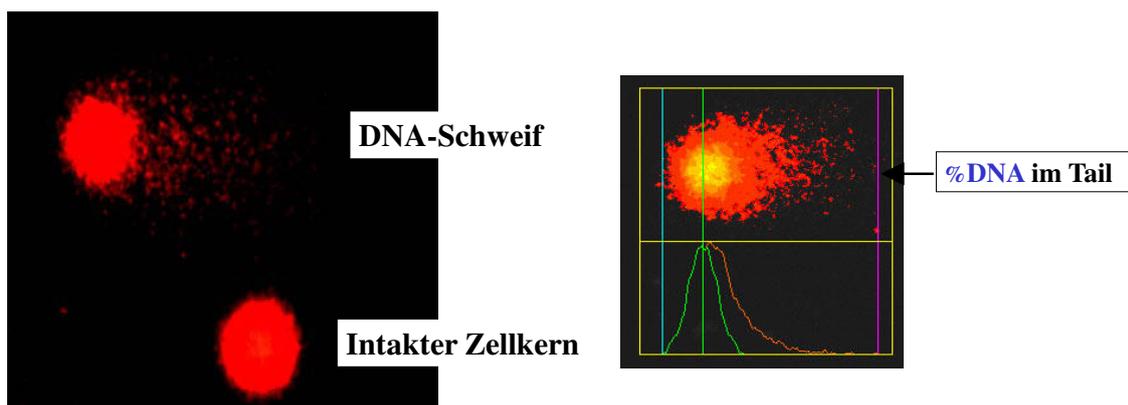


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Auswertung von „Kometen“, mit mit einem Computer Auswerteprogramm (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden entwickelt, um auf Basis von Kern und Kometenschweifbildern die Strangbrüche zu quantifizieren. Man zog zunächst die Länge des Schweifs als Maß für die Fragmentierung der DNA heran. Dieser Parameter berücksichtigt jedoch nicht die Menge an DNA im Kometenschweif. Es hat sich nämlich gezeigt, dass die Größe der Bruchstücke nicht unbedingt mit der Stärke des Effekts korreliert. Alternativ wird häufig das so genannte „Tailmoment“ verwendet. Es berücksichtigt beides, sowohl die Länge des Schweifs als auch die Menge an DNA im Schweif, und ergibt sich als Produkt aus DNA Menge im Schweif und Schweiflänge (analog zum Drehmoment in der Statik als Kraft mal Länge des Kraftarms). Auch dieses Maß hat sich als nicht optimal herausgestellt, weil sich unter den Bedingungen des Assays die Menge an DNA nicht einfach absolut messen lässt. Die Stärke der messbaren Fluoreszenz hängt nämlich auch von der unterschiedlichen Tiefe der Einbettung der Zellen im Gel ab und nicht allein von der DNA-Menge.<sup>[94]</sup>

Heute verwendet man meist die sogenannte „Tailintensität“ („% DNA in tail“ oder zu Deutsch „% DNA im Schweif“). Dieser Wert ist weitgehend unabhängig von der Tiefenposition im Gel und den lokalen Variationen der Fluoreszenz. Es wird dabei die Stärke der Fluoreszenz im Schweif (DNA-Bruchstücke) sowie im Kern (mit intakter DNA) gemessen. Die Tailintensität ergibt sich dann als Prozentsatz der Fluoreszenz im Bereich des Schweifs zu der Gesamtfluoreszenz. Dieser Wert reicht von 0%, wenn kein Schweif vorhanden ist, bis zu 100%, wenn die gesamte DNA ins Gel gewandert ist. Letzteres kann bei apoptotischen (abgestorbenen oder sterbenden) Zellen auftreten, wenn bereits vor der Zellaufbereitung für den Comet Assay die Kernmembran aufgelöst und die DNA abgebaut (in Bruchstücke zerlegt) wurde.<sup>[94]</sup>

### Zahl der analysierten Zellen pro Experiment

Bei Computer-unterstützten Messungen hat sich in der Praxis die Analyse von 50 Zellen pro Auswertung als Kompromiss zwischen Arbeitsaufwand und Genauigkeit bewährt.<sup>[93]</sup> Diese Anzahl reicht aus, um eine hinreichend präzise Messung der Tailintensität zu erhalten. Der Messfehler liegt je nach genauem Experimentablauf zwischen  $\pm 1\%$  bis  $\pm 7\%$ . Eine höhere Zellzahl zu messen, würde im Allgemeinen ange-

sichts der biologischen und experimentellen Variabilität, die diesen Messfehler bei weitem überschreiten, den Aufwand kaum rechtfertigen.

Im Rahmen des Projekts wurden pro Expositionsversuch mindestens drei Objektträger aus demselben Versuch unabhängig voneinander gemessen.

### **Generation der Datensätze**

Nach der Exposition, der Vorbehandlung und der Einzelzellelektrophorese wurden der Standard Comet Assay mit einem computergestützten automatisierten Auswerteprogramm (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK) ausgewertet.

Die Übertragung der Daten aus den von Comet Assay IV erzeugten Messdatenfiles erfolgte automatisiert (mittels eines Excel-Makros). Dabei wurden sämtliche Tailintensität-Werte (*% DNA im Schweif*) ausgelesen und der jeweiligen Expositions- und Versuchsbedingung aufgrund der Dateikennung zugeordnet (Zelllinie, SAR-Wert, bestrahlt/unbestrahlt, Vorbehandlung: Standard/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/FPG/Endo-III, und Nummer des Objektträgers).

Aus den von jedem Objektträger 50 erhobenen Werten (Tailintensität) wurde nach Ausschluss der apoptotischen Zellen (100% *DNA im Schweif*) der Median berechnet. Dieser gilt als optimaler Parameter zur Charakterisierung der Messwerte. Da allerdings die Apoptoserate (Zahl der abgestorbenen Zellen) in den einzelnen Experimenten sehr gering war, kam es durch diese Datenbereinigung zu keinen relevanten Veränderungen der Datensätze.

### **6.2.5 Messung der DNA Oxidation**

Um zu ermitteln, ob oxidierte Basen auftreten (als eine Form der DNA-Läsion, die Strangbrüche begünstigen würde), kann man die DNA mit sogenannten Restriktionsenzymen behandeln. Diese erkennen die oxidierten Basen entlang des DNA Stranges und schneiden die DNA an diesen Stellen, rufen also Strangbrüche dort hervor, wo DNA-Basen oxidiert waren. Diese experimentell erzeugten Strangbrüche können anschließend mit dem Standard Comet Assay Verfahren erfasst werden. Um die oxidierten DNA-Basen (Purine & Pyrimidine) zu ermitteln, wird die Tailintensität ohne Enzym-Behandlung (= nur mit Enzympuffer) von jener nach Enzym-Behandlung abgezogen. Das Ergebnis ist dann proportional dem Anteil oxidierter Basen, gibt also zusätzliche Informationen über das Ausmaß und die Art der Oxidation (oxidierte Purine oder Pyrimidine) der DNA.

Dazu wurden die Zellen nach der Exposition auf Objektträger aufgetragen, über Nacht lysiert und anschließend mit Restriktions-Enzymen behandelt, gefolgt von Elektrophorese und der Detektion von *% DNA im Schweif* (Strangbrüche). Es kamen zwei „Oxidation erkennende“ Restriktionsenzyme zum Einsatz:

- FPG (Formamido-Pyrimidin-Glycosylase) zur Detektion oxidierter Purine und
- Endonuklease III (im Folgenden Endo-III abgekürzt) zur Detektion oxidierter Pyrimidine.

Weiters wurden zur Untersuchung der Frage, ob die HF-EMF Exposition zu einer stärkeren Anfälligkeit gegenüber oxidativen Schädigungen geführt hat beim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay die Zellen mit Wasserstoffperoxid vorbehandelt.

### 6.2.6 Bestimmung der DNA-Reparatur

Es gibt verschiedene und spezifische Arten der DNA-Reparatur, die jeweils einen bestimmten DNA-Schaden beheben. Die Kapazität der so genannte Basen-Exzisions-Reparatur (BER) und der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) kann mit einem Verfahren untersucht werden, das Einzelgel-Elektrophorese-Messungen wie beim Comet Assay einschließt. Im Rahmen des Projektes ermöglichte diese Methodik einen tieferen Einblick, welchen Einfluss die HF-EMF Exposition auf die DNA-Reparaturaktivität ausübt.

Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) agiert an kleinen DNA-Läsionen, an denen einzelne Basen geschädigt sind. Das Enzym DNA-Glycosylase trennt die betroffene Base aus dem DNA-Strang heraus, wodurch eine a-basische Stelle entsteht. Diese DNA-Abschnitte stellen ein "Mutationsrisiko" für die Zelle dar, denn bei jeder Replikation kann an einer basenfreien Stelle unter Umständen ein falsches Nukleotid eingebaut werden. Mit Hilfe einer Endonuklease, die den a-basischen Abschnitt entfernt, wird der Schaden behoben. Die Lücke wird durch eine DNA-Polymerase verschlossen und schließlich durch eine Ligase versiegelt.

Wenn es in diesem komplexen Ablauf zum Einbau falscher Nukleotide kommt, wird die Geometrie der DNA verändert. Es kommt dann zur Lösung der Wasserstoffbrücken des Nukleotids im DNA-Doppelstrang, was die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) auf den Plan ruft. Bei tierischen und menschlichen Zellen erkennt das Enzym Exonuklease die Schadstellen und sorgt für die Entfernung des geschädigten Nukleotids und von ca. 30 Nukleotiden seitlich der Schadstelle. Anschließend wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase ein neuer DNA-Strang synthetisiert und durch eine Ligase geschlossen (Abbildung 6.2).<sup>[95]</sup>

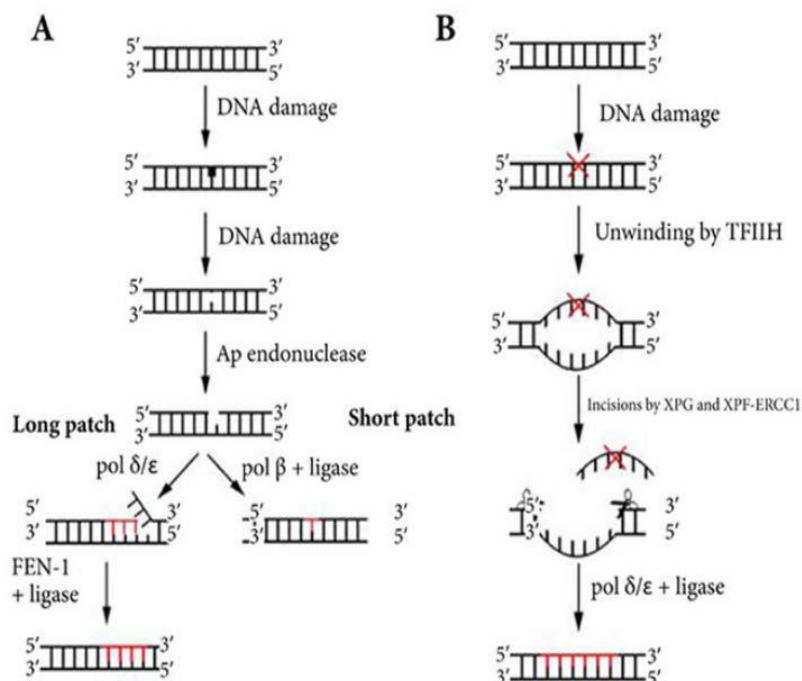


Abbildung 6.2: DNA-Reparatur - vereinfachtes Schema:

Basen-Excisions-Reparatur (BER) und Nucleotid-Excisions-Reparatur (NER) nach <sup>[96]</sup>.

(A) Bei der BER wird der DNA-Schaden zuerst durch das Enzym DNA Glycosylase entfernt, was einen Einzelstrangbruch hervorruft. Dann wird durch die DNA Polymerase entweder eines oder mehrere Nucleotide synthetisiert (short patch oder long patch BER). Das Reparaturprotein FEN-1 entfernt überschüssige DNA, eine so genannte Ligase versiegelt die alte DNA mit dem neu gebildeten Stück.

(B) NER: Nachdem die DNA-Läsion erkannt wurde, wird die dicht gepackte DNA durch den Transkriptionsfaktor II H (TFIIH) entspiralisiert. Als nächstes werden vor und nach der Schadstelle durch die Reparaturproteine XPG and XPF-ERCC1 Einschnitte vorgenommen. Danach kann das schadhafte DNA Segment entfernt werden. Die dadurch entstandene Lücke wird von der DNA Polymerase mit neuer DNA gefüllt. Wie bei der BER braucht es zum Abschluss eine DNA Ligase um die Stelle zu versiegeln.

In den hier berichteten Untersuchungen wurden Protokolle für Einzelzell-Gelelektrophorese-Tests (Comet Assay-Verfahren) eingesetzt, um die Reparaturaktivität von Testzellen - mit und ohne EMF Exposition - zu untersuchen. Diese Methoden wurden von A. Collins <sup>[97]</sup> entwickelt und basieren darauf, dass primäre Schäden in Zellen induziert werden, die spezifisch für einen bestimmten Reparaturtyp sind. Das heißt sie werden ausschließlich durch entweder BER oder NER beseitigt. Die Aktivität dieser Reparaturvorgänge wurde mit Zusatz eines Extrakts der bestrahlten oder unbestrahlten Zellen gemessen. Das gibt Aufschluss darüber, ob in diesen real- oder schein-exponierten Zellen die für diese Reparaturvorgänge notwendigen Enzyme in höherer oder niedrigerer Konzentration vorhanden sind. Eine höhere Konzentration könnte auftreten, wenn durch die Detektion spezifischer DNA-Schäden die Neusynthese angeregt wurde, niedrigere Konzentrationen würden auftreten, wenn diese Enzyme vor einer Neusynthese verbraucht wurden.

Abbildung 6.3 zeigt schematisch den Versuchsablauf. Reporterzellen (z.B. humane Leber-Zelllinie HepG2) werden mit UV-Licht behandelt, um Nucleotid-Läsionen für die Testung des NER Systems zu bewirken. Zur Untersuchung des BER Systems

werden die Reporterzellen mit Ro 19-8022 (Photosensibilisierung) behandelt. Anschließend werden die Reporterzellen auf Objektträger aufgetragen.

Parallel dazu werden Testzellen (in unseren Untersuchungen die Glioblastom-Zelllinien U251 und U87) mit unterschiedlichen EMF-Intensitäten real oder scheinexponiert. Nach der Exposition werden aus den Testzellen die Proteine isoliert. Anschließend werden die Reporterzellen mit den Protein-Extrakten der Testzellen inkubiert, damit allfällig vermehrt oder vermindert vorhandene Reparaturenzyme der Testzellen DNA-Fragmente in den Reporterzellen hervorrufen. Denn bei dieser *in vitro* Inkubation stehen keine Ersatzbausteine (DNA-Basen) zur Verfügung, um Läsionen tatsächlich zu reparieren. Die Reparatur wird lediglich eingeleitet, indem die Proteine der Testzellen an den Läsionen in den Reporterzellen die DNA schneiden. Anstelle des unmittelbar folgenden Einbaus von DNA-Basen, um die eingeleitete Reparatur abzuschließen, bleiben die DNA-Abschnitte an den Läsionen geschnitten und können anschließend mit den Standard Comet Assay Verfahren gemessen werden. Die Messung der DNA Bruchstücke in den Reporterzellen reflektiert direkt die Menge und/oder Aktivität der DNA (schneidenden) Reparatur Enzyme in den real und scheinexponierten Testzellen.

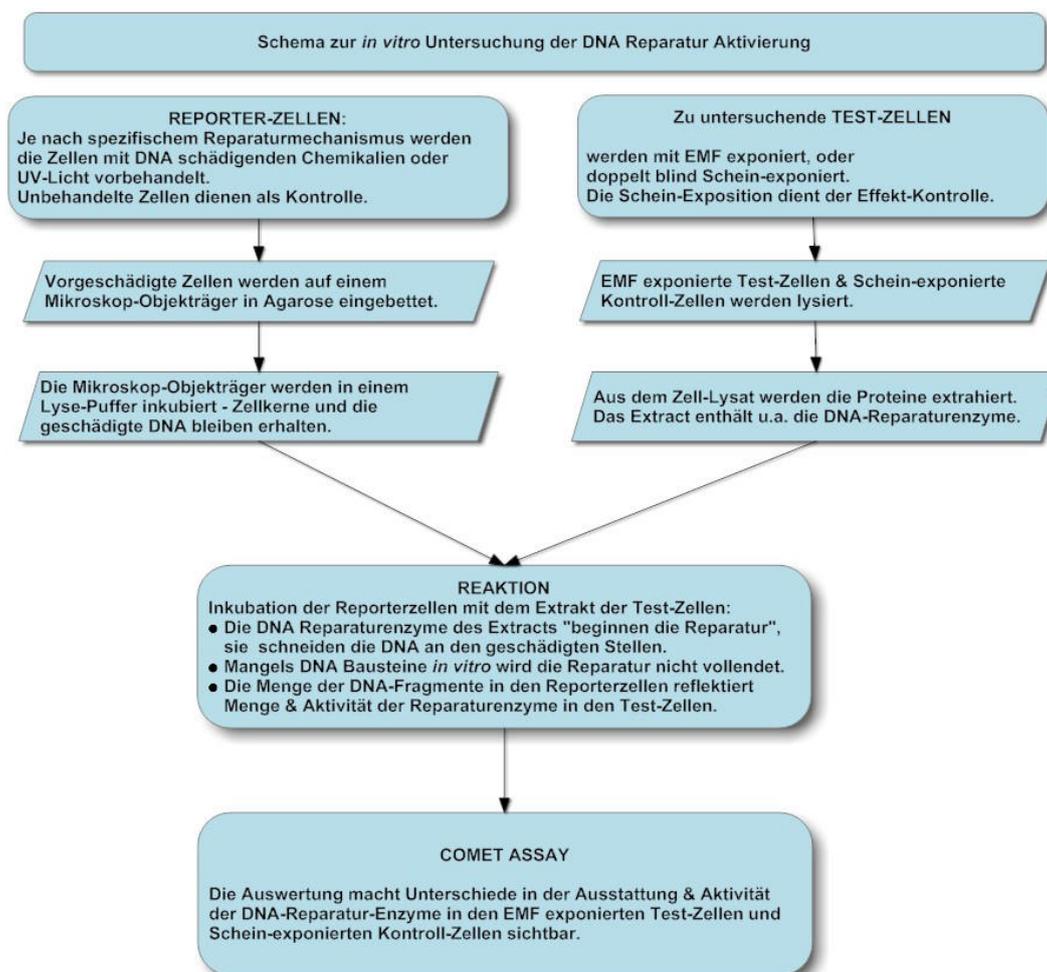


Abbildung 6.3: Experimentschema zur Darstellung spezifischer DNA Reparatursysteme. Zur Messung der durch UMTS-Exposition induzierten Änderungen wurde über den Vergleich von real- und scheinexponierten Zellen erfasst, ob EMF-Exposition spezifische Reparaturmechanismen beeinflusst.

### 6.2.7 Kleinkernanalyse Methode

Typische permanente (nicht mehr reparable oder nicht reparierte) Chromosomenschäden führen zu DNA-Bruchstücken, die bei einer Zellteilung nicht mehr korrekt auf die Tochterkerne aufgeteilt, und als sogenannte Mikrokerne sichtbar werden.

Um die akute EMF-expositionsbedingte Entstehung von Mikrokerneln zu untersuchen, wurde der Zytokinese-Block Test herangezogen.<sup>[98]</sup> Dabei werden im Anschluss an die Bestrahlung die Zellkulturen mit Cytochalasin-B versetzt, um während der regulären Zellteilung (Mitose) nach Aufteilung des genetischen Materials auf die entstehenden Tochterzellen die Trennung der Tochterzellen zu hemmen. Durch diese Blockierung entstehen Zellen mit zwei Kernen, sogenannte „binukleare“ Zellen (BiN). Die Blockierung verhindert aber auch, dass Chromosomenfragmente in den Zellkernen verschwinden, sie liegen dann als Mikrokerne sichtbar im Zytoplasma, und sie sind ein Beleg dafür, dass ein DNA-Bruch nicht erfolgreich repariert werden konnte. Mit der Zytokinese-Block Methode werden alle Zellen, die nach dem Ende der EMF-Exposition eine Mitose durchlaufen hätten, als BiN (Zellen mit zwei Kernen) sichtbar. In diesen BiN Zellen können entstandene Mikrokerne gut beobachtet und gezählt werden, darum werden für die Untersuchung von Mikrokerneln nur BiN Zellen herangezogen.

Nach Exposition mit HF-EMF und Aufbereitung der Zellen wurde die Anzahl der mononukleären Zellen (MonoN), der binukleären Zellen (BiN) und der multinukleären Zellen (MultiN) bestimmt und der Mitotische Index (CBPI) berechnet. Zusätzlich wurde unter den binukleären Zellen die Anzahl der Zellen mit Kleinkern (BiN MNi), mit nukleären Brücken „bridges“ (NPB), und mit Kern-Knospe „Bud“ (NBUD) bestimmt. Außerdem wurden Beobachtungen protokolliert, die über Zelltod Auskunft geben (nekrotische und apoptotische Zellen). Die Kleinkernanalyse wurde anhand des Protokolls von Fenech (2007) durchgeführt.<sup>[99]</sup>

## 6.2.8 Statistische Verfahren

### Vorbereitung der Tailintensität-Daten

Pro Expositionsversuch wurden im Allgemeinen jeweils drei Kulturschalen exponiert und scheinexponiert, von jeder ein Präparat (Objektträger) hergestellt und davon jeweils 50 Zellen computerunterstützt ausgewertet.

Da die Variabilität der Prozentwerte (Tailintensität) mit dem Durchschnittswert korreliert, wurde für die weitere statistische Auswertung eine Arcussinustransformation durchgeführt. Dies geschah gemäß folgender Formel:

$$Tr(\%DNA_{imSchweif}) = ArcSin(\sqrt{\%DNA_{imSchweif} / 100})$$

Diese Transformation beseitigt die Korrelation zwischen Mittelwert und Varianz der Tailintensität-Werte und schafft valide Voraussetzungen für die im Folgenden angewandten statistischen Verfahren zur Hypothesenprüfung.

### Analyse der Tailintensität-Werte

Nach den statistischen Berechnungen wurden die transformierten Werte wieder auf Tailintensität rücktransformiert, um mit den Daten internationaler Forscherteams vergleichbar zu bleiben.

Die statistische Prüfung erfolgte unter Einbeziehung der Daten aus allen Durchgängen des Experiments zu einer Zelllinie mittels Varianzanalyse (ANOVA). Die Faktoren dieser Analyse waren beispielsweise:

- die Exposition (bestrahlt/unbestrahlt) und für die meisten Experimente auch
- SAR (spezifische Absorptionsrate, meist mit Werten zwischen 0,25 und 1,0 W/kg)

Da in jedem Experiment die unbestrahlte Kontrolle für jede einzelne Expositionintensität (SAR) durchgeführt wurde, erfolgte die Prüfung des Unterschieds zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen immer innerhalb des jeweiligen Versuchs mittels linearer Kontraste (also pro Experiment: direkter Vergleich von real und scheinexponiert).

Im Fall eines signifikanten Unterschieds bei einem Signifikanzniveau von 5% wurde dies in den jeweiligen Grafiken (Abbildungen) mit einem Stern markiert. In den Abbildungen werden – wenn nicht in der Legende anders beschrieben - jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Tailintensität (*% DNA im Schweif*) angegeben.

Für jeden Versuch gibt es relevante Quellen der Varianz (bestimmende Einflussgrößen für Unterschiede). Diese sind beispielsweise:

- **Exposition** (bestrahlt/unbestrahlt),  
Ist der Effekt (Unterschied) davon abhängig, ob ein HF-Feld vorlag (bestrahlt wurde)?
- **SAR** (z.B. 0,25/0,5/1,0 W/kg)  
besteht ein Unterschied je nach Intensität der EMF-Exposition?
- sowie **Wechselwirkung zwischen Exposition und SAR**  
ist der Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen von der SAR abhängig?

Anhand der folgenden Beispieltabelle wird erläutert, wie die Ergebnisse der Signifikanzprüfung im Allgemeinen berichtet werden.

Tabelle 6.2: Beispiel für die im Abschnitt ‚Ergebnisse‘ berichteten Resultate der Signifikanzprüfung mittels ANOVA

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	2,980	0,066	Tendenz
Exposition	1 / 30	1,792	0,191	n.s.
SAR * Exposition	2 / 30	3,662	0,038	signifikant

Für jede Quelle der Varianz werden die so genannten statistischen Freiheitsgrade für den Zähler (FG-1) und den Nenner (FG-2) angegeben, einfach weil die statistische Prüfgröße F ein Varianzverhältnis reflektiert. Wenn beide Gruppen gleich sind, also beide Varianzanteile (im Zähler und die im Nenner) ein und dieselbe Varianz anzeigen, ist in diesem Fall der Erwartungswert der Prüfgröße F gleich 1.

Besteht ein Effekt der jeweiligen Quelle der Varianz, dann ist deren Varianzanteil größer als die Varianz im Nenner und die Prüfgröße F ist größer als 1. Im nächsten Rechenschritt wird geprüft ob der Effekt über Zufallsschwankungen hinausgeht, indem die Wahrscheinlichkeit ermittelt wird (Spalte p-Wert) einen so großen oder noch größeren Wert von F unter der Annahme der Nullhypothese (kein Effekt) zu finden. Ist diese Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,05, dann verwirft man die Nullhypothese. Dabei wird konventionell ein p-Wert kleiner als 0,01 als ‚hoch signifikant‘ (abgekürzt: ‚hoch sign.‘), und ein p-Wert kleiner als 0,1 als ‚Tendenz‘ bezeichnet. p-Werte größer als 0,1 werden als ‚nicht signifikant‘ (abgekürzt: ‚n.s.‘) angesehen.

Es können folgende unterschiedliche Ergebnisse der Signifikanzprüfung auftreten:

- keine der drei Varianzquellen ist signifikant (Abbildung 6.4 A);
- nur die Exposition ist signifikant (Abbildung 6.4 B), bestrahlte und unbestrahlte Zellen unterscheiden sich in der Tailintensität;
- nur die SAR ist signifikant (Abbildung 6.4 C); die Tailintensität bei bestrahlten sowie unbestrahlten Zellen unterscheidet sich bei unterschiedlichen Intensitäten, ein solcher Effekt geht meist auf andere Einflüsse als die Exposition zurück.
- nur die Wechselwirkung (SAR \* Exposition) ist signifikant (Abbildung 6.4 D); der Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen hängt von der SAR ab, was für eine Bedeutung der Exposition spricht. Dieses Ergebnis kann z.B. auftreten, wenn es eine untere oder obere Schwelle für das Auftreten von Strangbrüchen gibt.
- sowohl die Exposition als auch die SAR sind signifikant (Abbildung 6.4 E); es gibt sowohl Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen als auch Unterschiede zwischen den Effekten unterschiedlicher Intensitäten der Bestrahlung, der Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten bleibt aber über die verschiedenen Bestrahlungsintensitäten gleich.
- sowohl die Exposition als auch die Wechselwirkung (SAR \* Exposition) sind signifikant (Abbildung 6.4 F); es gibt einen Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen und dieser Unterschied hängt von der SAR ab, aber dabei gleicht der Expositionseffekt den Intensitätseffekt aus, sodass der Faktor SAR als Hauptfaktor nicht in Erscheinung tritt.
- sowohl die SAR als auch die Wechselwirkung (SAR \* Exposition) sind signifikant (Abbildung 6.4 G); es gibt einen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten, aber dieser Unterschied hängt davon ab, ob es bestrahlte oder unbestrahlte Zellen sind, dabei gleicht der SAR-Effekt den Expositionseffekt aus, sodass der Faktor Exposition als Hauptfaktor nicht in Erscheinung tritt.
- alle drei Quellen der Varianz sind signifikant (Abbildung 6.4 H). Es gibt einen Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen, der von der Bestrahlungsintensität abhängt, dabei wird der Intensitätseffekt nicht ausgeglichen und tritt als Haupteffekt in Erscheinung.

Die folgende Abbildung 6.4 zeigt an **fiktiven Beispielen**, unter welchen Umständen diese Resultate der Signifikanzprüfung auftreten können.

Eine Wechselwirkung (SAR \* Exposition) tritt auf, wenn es von der SAR abhängt, ob ein Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen besteht (Abbildung 6.4 Beispiel: D, F, G und H).

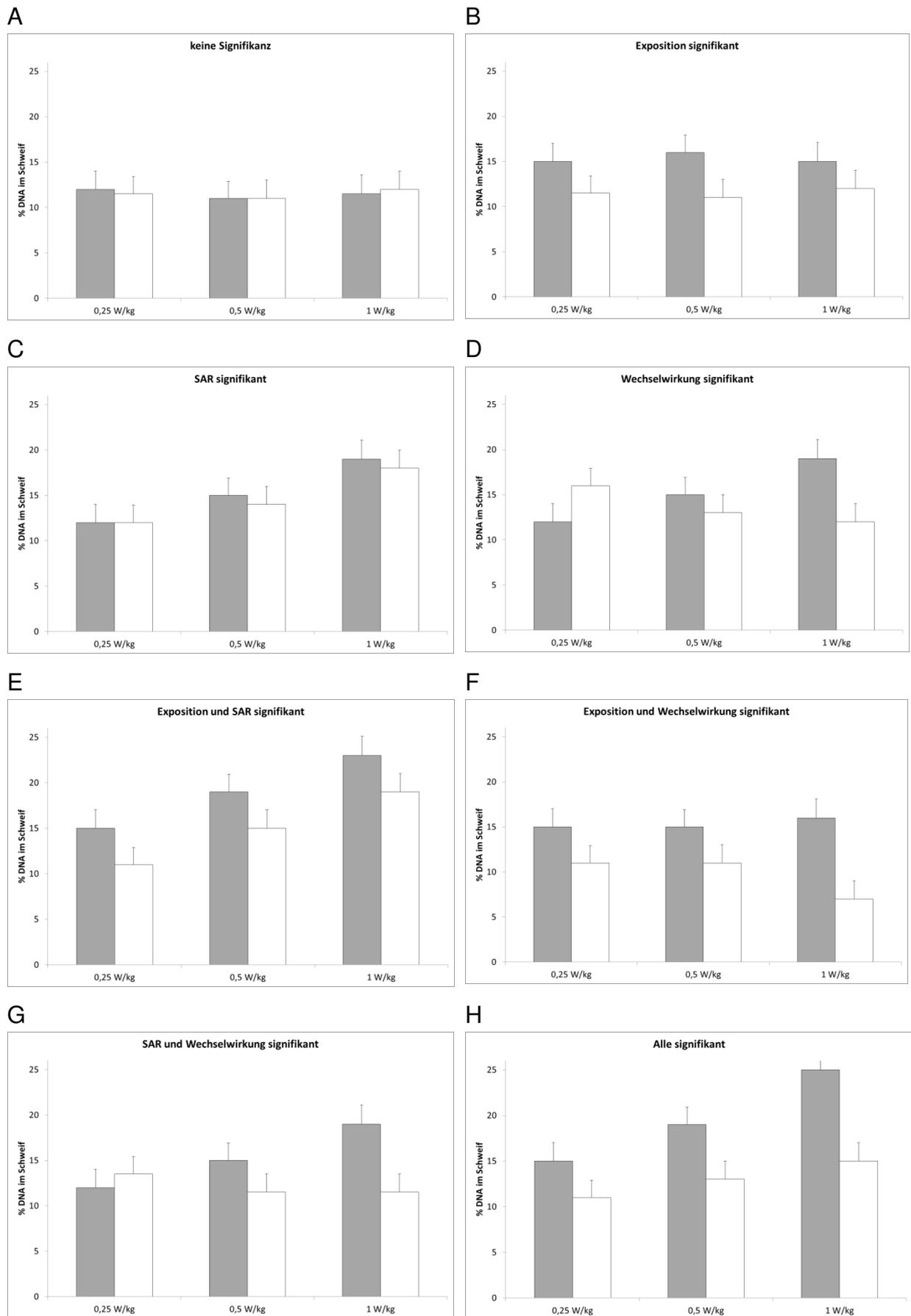


Abbildung 6.4: Fiktive (mögliche) Ergebnisse der Signifikanzprüfung, beispielhaft-

## 6.3 ERGEBNISSE

Im gesamten *in vitro* Projekt-Teil wurden alle Experimente mit einem UMTS-Signal durchgeführt. Die nähere Signal-Spezifikation findet sich in Abschnitt 0.

### 6.3.1 Sensible und nicht sensible Zelllinien

Die Ergebnisse der ersten Expositionsserie sollten primär der Feststellung dienen, ob und welche Zelllinie auf die Exposition mit HF-EMF DNA-Läsionen zeigt. Zelllinien die Effekte zeigten, wurden anschließend für weiterführende Experimente herangezogen, um die zellulären Mechanismen der expositionsbedingten DNA-Läsionen zu erforschen.

In der ersten Expositionsserie wurden fünf verschiedene Zelllinien untersucht. Vier Zelllinien wurden vom Forscherteam erstmals ausgewählt, eine Zelllinie (ES-1) war schon beim vorausgegangenen ATHEM-1 Projekt untersucht worden.

Folgende fünf Zelllinien wurden in der ersten Versuchsreihe exponiert und untersucht:

- Epithelzelllinie der Mundhöhlenschleimhaut, TR-146
- Neuroblastom-Zelllinie, SH-SY5Y
- die Leberkarzinom-Zelllinie HepG2
- Fibroblasten-Zelllinie, ES-1
- Glioblastom-Zelllinie, U-87

Bei der ersten Expositions-Serie wurden die Zellen durchgehend standardmäßig kultiviert.

Die Exposition erfolgte folgendermaßen:

- UMTS Signal
- SAR: 1,0 W/kg
- Expositionsdauer: 16 Stunden.

Nach der Exposition erfolgten folgende Behandlungen der Zellen:

1. Ohne Vorbehandlung = Comet Assay Standard Bedingung, zur Feststellung expositionsbedingter DNA Brüche,
2. Vorbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Feststellung, ob HF-Exposition eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber oxidativen Schädigungen bewirkt.
3. Vorbehandlung mit dem Enzym FPG, zur Feststellung, ob HF-EMF Exposition in der zellulären DNA oxidierte Purin-Basen vermehrt.
4. Vorbehandlung mit Endonuklease III, zur Feststellung, ob HF-EMF Exposition in der zellulären DNA oxidierte Pyrimidin-Basen vermehrt.

Für die statistische Analyse wurden die Messwerte % DNA im Schweif herangezogen.

### Standard Comet Assay - DNA Brüche

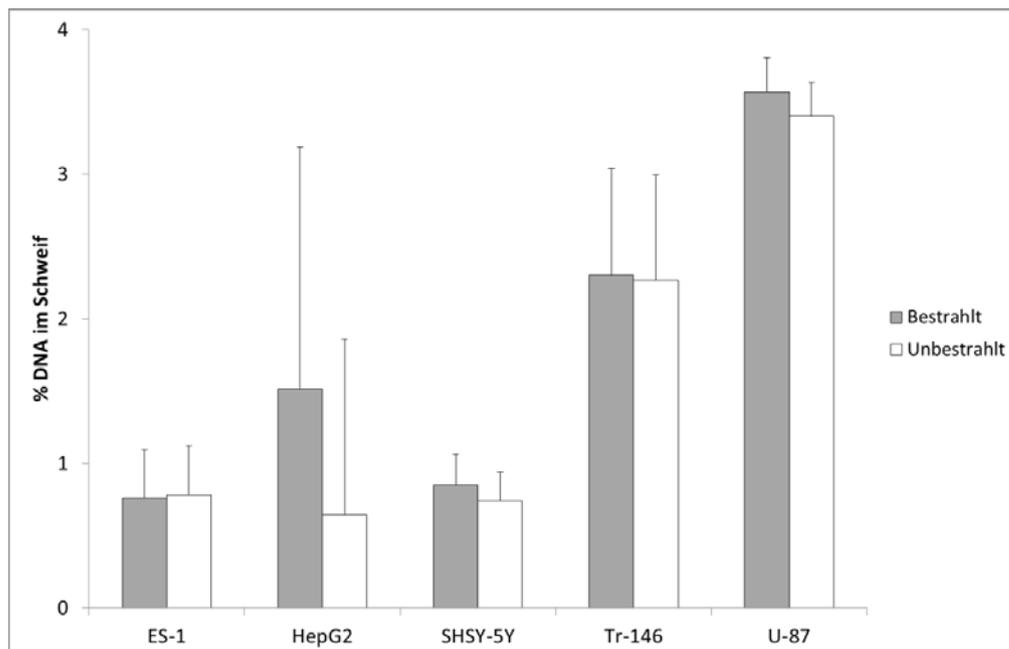


Abbildung 6.5: Standard Comet Assay, Einzel- und Doppelstrang-Brüche. Fünf Zelllinien wurden mit UMTS (1,0 W/kg, 16 Std) exponiert („Bestrahlt“) und scheinexponiert („Unbestrahlt“). Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an.

### Oxidierete Purinbasen (FPG Vorbehandlung)

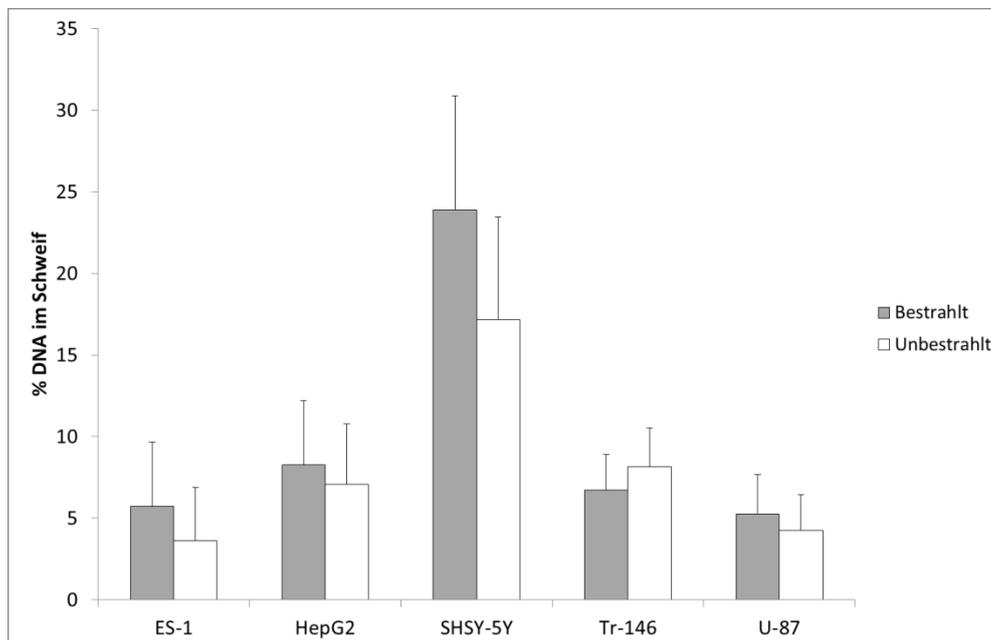


Abbildung 6.6: FPG Comet Assay, zur Detektion oxidierter Purinbasen der DNA. Fünf Zelllinien wurden mit UMTS (1,0 W/kg, 16 Std) exponiert („Bestrahlt“) und scheinexponiert („Unbestrahlt“). Nach der Exposition wurden die Zellen eingefroren, um sie in einem Arbeitsgang gemeinsam mit dem Enzym FPG vorzubehandeln, um zu ermitteln, ob die EMF-Exposition zu vermehrter Oxidation von Purinbasen führte. Es fand sich in dieser orientierenden Untersuchung bei keiner Zelllinie ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen.

### Oxidierter Pyrimidin Basen (Endo-III Vorbehandlung)

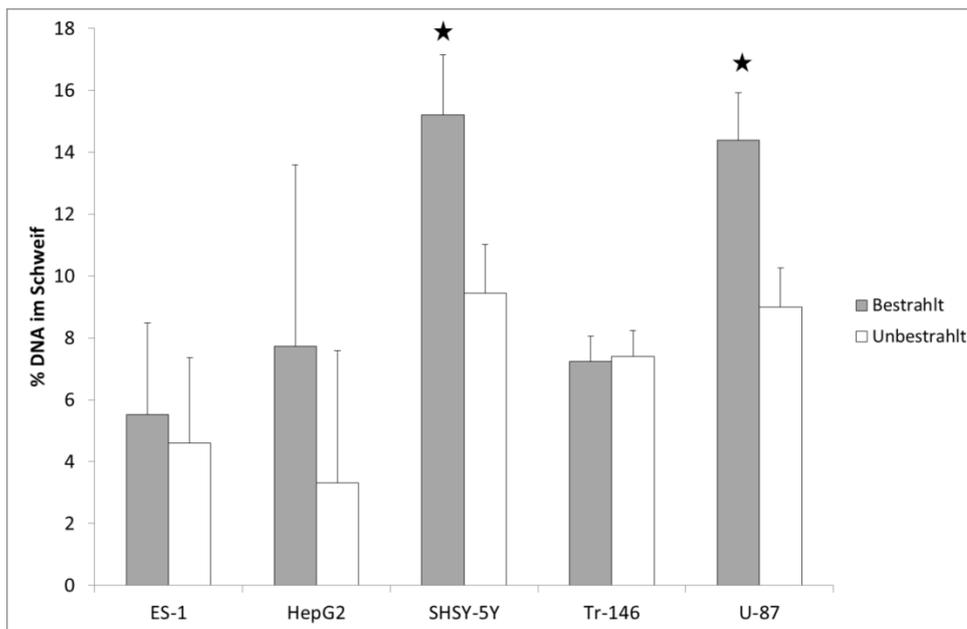


Abbildung 6.7: Endo-III Comet Assay; Detektion oxidierter Pyrimidinbasen der DNA. Fünf Zelllinien wurden exponiert (1,0 W/kg, 16 Std) und scheinexponiert („Unbestrahlt“) und eingefroren, um anschließend die Zellkerne in einem Arbeitsgang gemeinsam mit dem Enzym Endo III zu behandeln, um zu ermitteln, ob die Exposition zur vermehrten Oxidation von Pyrimidinbasen führte. Es fanden sich in dieser orientierenden Untersuchung signifikante Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten SHSY-5Y Zellen und U87 Glioblastomzellen; Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen; signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

### Oxidationsempfindlichkeit ( $H_2O_2$ Vorbehandlung)

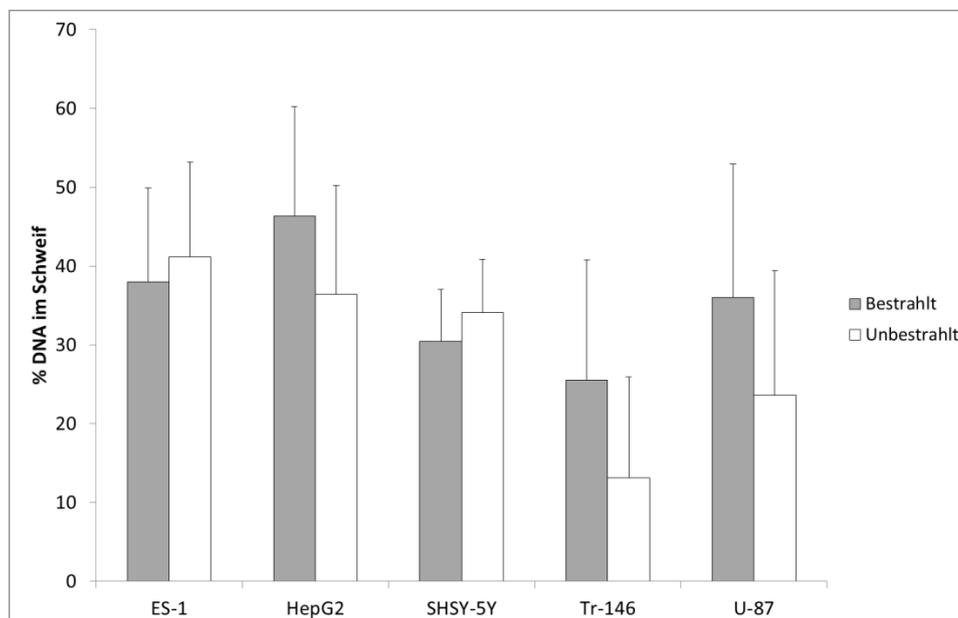


Abbildung 6.8:  $H_2O_2$ -Comet Assay; Sensibilität gegenüber Sauerstoff Radikalen. Fünf Zelllinien wurden exponiert (1,0 W/kg, 16 Std) exponiert und scheinexponiert („Unbestrahlt“); Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen; Nach der Exposition wurden die Zellen eingefroren, um sie dann in einem Arbeitsgang gemeinsam mit  $H_2O_2$  vorzubehandeln, um zu ermitteln, ob die Exposition zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden führt. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen.

Bei der Leber-Karzinom-Zelllinie HepG2 ergaben sich bei allen experimentellen Bedingungen höhere Werte für *%-DNA im Schweif* bei den bestrahlten im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen. Besonders ausgeprägt war der Unterschied bei der Standardbedingung und bei Anwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Endo-III. Zur Absicherung der Ergebnisse, wegen der auffälligen Streuungen und weil es sich um das erste Experiment handelte, wurde der Versuch für die Bedingungen Standard Comet Assay und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Comet Assay wiederholt, allerdings ohne den Effekt zu reproduzieren (die Abbildung 6.5 und die Abbildung 6.8 zeigen die Zusammenfassung beider Experimente).

Beim Wiederholungsexperiment zeigte sich ein ähnlicher, aber weniger stark ausgeprägter Unterschied bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen. Kein Unterschied konnte unter der Standardbedingung ermittelt werden. Es wurde daher der Schluss gezogen, dass die Ergebnisse in dieser Zelllinie nicht robust sind.

### Zusammenfassung der ersten Expositionsserie zur „Wahl sensibler Zellen“

Tabelle 6.3: Zusammenfassung der ersten Expositionsserie (UMTS, 1,0 W/kg, 16 Std)

Zelllinie	Behandlung (Endpunkt)	Mehr Effekt bei bestrahlt B / unbestrahlt U	p-Wert	Sigifikanz
ES-1 Fibroblasten	Standard	U	0,936	n.s.
ES-1 Fibroblasten	Endo-III	B	0,660	n.s.
ES-1 Fibroblasten	FPG	B	0,407	n.s.
ES-1 Fibroblasten	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	U	0,642	n.s.
TR-146, Mundhöhlen Epithel	Standard	B	0,950	n.s.
TR-146, Mundhöhlen Epithel	Endo-III	U	0,794	n.s.
TR-146, Mundhöhlen Epithel	FPG	U	0,409	n.s.
TR-146, Mundhöhlen Epithel	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	B	0,092	Tendenz
U-87 Glioblastom Zellen	Standard	B	0,424	n.s.
U-87 Glioblastom Zellen	Endo-III	B	<0,001	hoch signifikant
U-87 Glioblastom Zellen	FPG	B	0,561	n.s.
U-87 Glioblastom Zellen	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	B	0,169	n.s.
SHSY5Y, Neuroblastom	Standard	B	0,502	n.s.
SHSY5Y, Neuroblastom	Endo-III	B	<0,001	hoch signifikant
SHSY5Y, Neuroblastom	FPG	B	0,192	n.s.
SHSY5Y, Neuroblastom	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	U	0,335	n.s.
HepG2 Leberkarzinom	Standard Wiederh.	B U	0,004 0,243	hoch signifikant n.s.
HepG2 Leberkarzinom	Endo-III	B	0,105	n.s.
HepG2 Leberkarzinom	FPG	B	0,572	n.s.
HepG2 Leberkarzinom	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Wiederh.	B B	0,068 0,211	Tendenz n.s.

Bei den ES-1 Fibroblasten erbrachte weder die Standard Methode noch eine Vorbehandlung signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Bei der U-87 Glioblastom Zelllinie waren die Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen - also der Expositions-Effekt - am stärksten ausgeprägt.

### 6.3.2 Drei weitere Glioblastom-Zelllinien

Aufgrund von Hinweisen in der internationalen Literatur, dass möglicherweise jahrelange Exposition gegenüber HF-EMF die Entstehung von Hirntumoren begünstigt, und weil bei der ersten Versuchsreihe die Glioblastom-Zelllinie U-87 am sensibelsten reagierte, wurden zusätzlich drei weitere Glioblastom-Zelllinien - darunter eine Stammzelllinie - beschafft und untersucht.

Die zusätzlichen Glioblastom-Zelllinien waren:

- NCH421k (Tumor-Stammzelllinie)
- U373
- U251

Wie bei der vorangegangenen Experiment-Serie, wurden die Zellen standardmäßig kultiviert.

Die Exposition erfolgte folgendermaßen:

- UMTS Signal
- SAR: 3 Stufen
  - 0,25 W/kg,
  - 0,5 W/kg, und
  - 1,0 W/kg.
- Expositionsdauer: 16 Stunden.

Die Untersuchungsmethoden waren verglichen mit der ersten Versuchsserie (Abschnitt 6.3.1) unverändert.

Nach der Exposition erfolgten folgende Behandlungen der Zellen:

1. Ohne Vorbehandlung = Comet Assay Standard Bedingung, zur Feststellung expositionsbedingter DNA Brüche.
2. Vorbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Feststellung, ob HF-Exposition eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber oxidativen Schädigungen bewirkt.
3. Vorbehandlung mit dem Enzym FPG, zur Feststellung ob HF-EMF Exposition in der zellulären DNA oxidierte Purin-Basen vermehrt.
4. Vorbehandlung mit Endonuklease III, zur Feststellung ob HF-EMF Exposition in der zellulären DNA oxidierte Pyrimidin-Basen vermehrt.

Für die Statistische Analyse wurde der Parameter *% DNA im Schweif* herangezogen. Pro Messpunkt wurden jeweils drei Kulturschalen angesetzt und real und scheinexponiert. Pro Kulturschale wurde ein Objektträger hergestellt, davon wurden jeweils 50 Zellen ausgewertet.

## NCH421k Stammzelle

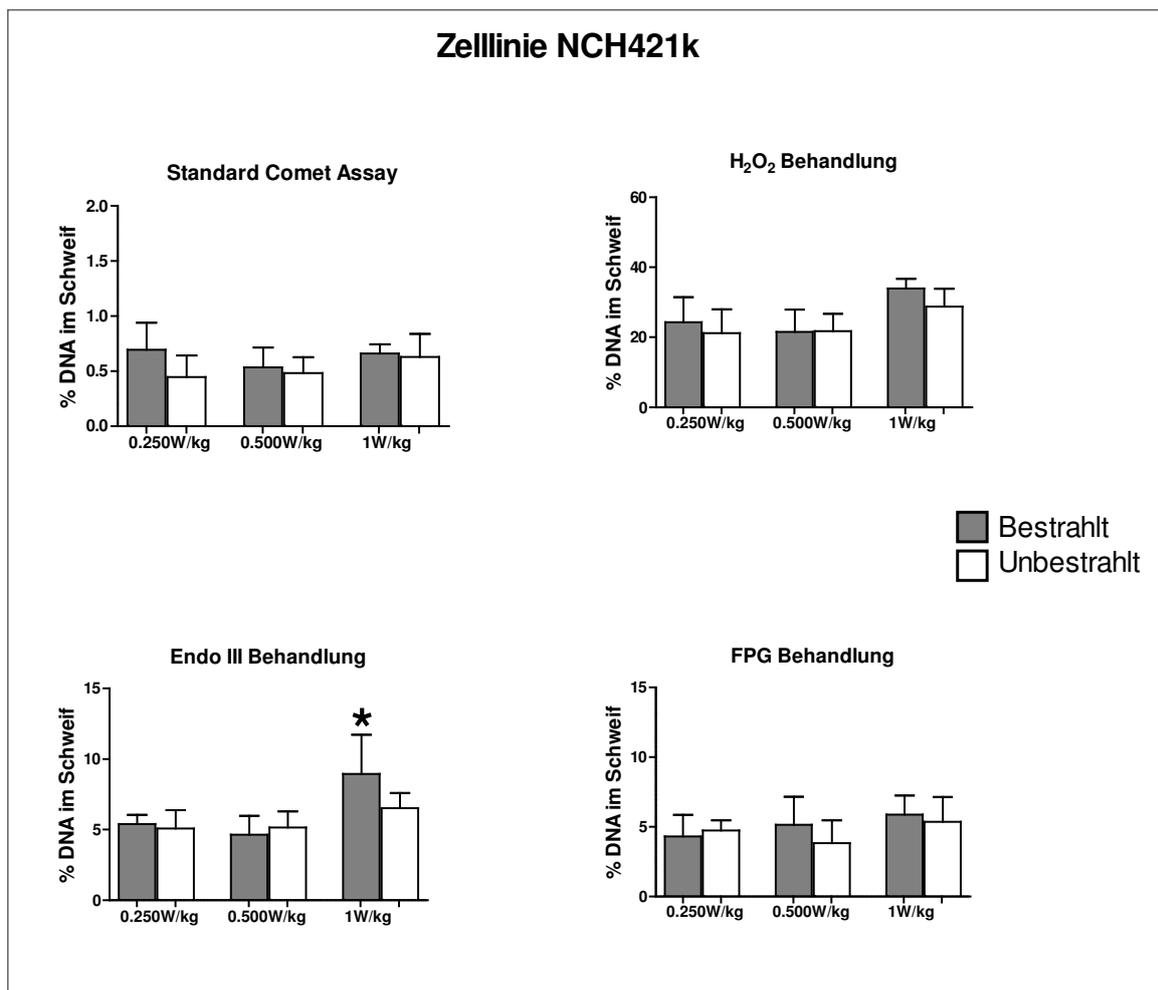


Abbildung 6.9: Glioblastom-Stammzelllinie, NCH421k; 16 Stunden UMTS Exposition mit unterschiedlicher SAR. Standard Comet Assay: DNA Brüche, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung: Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen, Endo III-Behandlung: oxidierte Pyrimidinbasen der DNA; FPG-Behandlung: oxidierte Purinbasen der DNA. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Es ergaben sich unter nahezu allen Bedingungen höhere Werte der Tailintensitäten bei den bestrahlten im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen, statistische Signifikanz erreichte dieser Unterschied aber nur bei den mit 1,0 W/kg UMTS-bestrahlten Zellen nach Endo-III Behandlung (★).

Wie in Abschnitt 6.2.8 ausgeführt, erfolgt die Prüfung der systematischen Abhängigkeit der Ergebnisse von der Exposition (bestrahlt/unbestrahlt), der Intensität (SAR) sowie deren Wechselwirkung (SAR \* Exposition) mittels Varianzanalyse. Deren Ergebnisse sind in den Tabelle 6.4 bis Tabelle 6.7 dargestellt.

Die Signifikanz bei der Bedingung Endo-III für den Faktor SAR (Tabelle 6.4) geht auf die höheren Werte bei der SAR-Bedingung 1,0 W/kg zurück. Bei dieser SAR trat auch ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen auf, was die statistische Tendenz bei der Prüfung der Wechselwirkung (SAR \* Exposition) erklärt (Tabelle 6.4).

Die weiteren Bedingungen zeigen keine signifikanten Effekte. Eine statistische Tendenz wurde für den Faktor ‚SAR‘ bei der Bedingung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabelle 6.6) ermittelt, die ebenfalls auf die höheren Werte bei der SAR von 1,0 W/kg zurückgeht (Abbildung 6.9). Da hier auch die scheinexponierten Zellen etwas höhere Werte zeigten, ist dieser Effekt nicht oder nicht ausschließlich auf die Exposition zurückzuführen.

Tabelle 6.4: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Endo-III Comet Assay zu Detektion oxidierter Pyrimidinbasen; NCH421k Glioblastom-Stammzelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	13,795	<0,001	hoch signifikant
Exposition?	1 / 30	1,683	0,204	n.s.
SAR * Exposition	2 / 30	2,821	0,075	Tendenz

Tabelle 6.5: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG Comet Assay zur Detektion oxidierter Purinbasen; NCH421k Glioblastom-Stammzelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 27	2,119	0,140	n.s.
Exposition?	1 / 27	0,917	0,347	n.s.
SAR * Exposition	2 / 27	1,393	0,265	n.s.

Tabelle 6.6: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden; NCH421k Glioblastom-Stammzelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 26	3,065	0,064	Tendenz
Exposition?	1 / 26	0,140	0,711	n.s.
SAR * Exposition	2 / 26	0,168	0,846	n.s.

Tabelle 6.7: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; NCH421k Glioblastomstammzelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 28	1,227	0,309	n.s.
Exposition?	1 / 28	2,533	0,123	n.s.
SAR * Exposition	2 / 28	0,933	0,405	n.s.

## U251 Glioblastom-Zelllinie

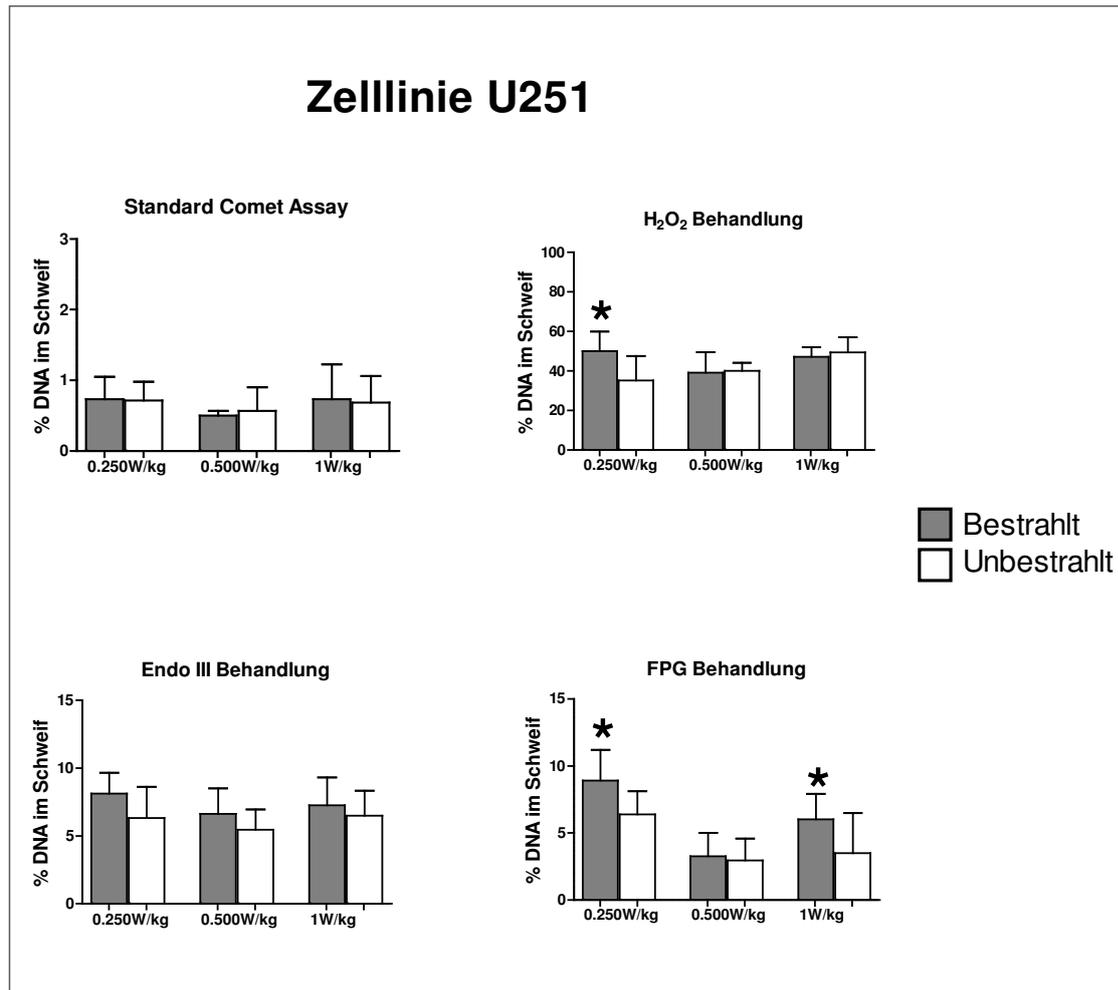


Abbildung 6.10: Glioblastom-Zelllinie U251; 16 Stunden UMTS Exposition mit unterschiedlicher SAR. Standard Comet Assay: DNA Brüche, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung – Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen, Endo-III Behandlung – oxidierte Pyrimidinbasen der DNA; FPG Behandlung - oxidierte Purinbasen der DNA. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Auch bei der Glioblastom-Zelllinie U251 waren die höheren Werte der Tailintensität (% DNA im Schweif) häufiger bei den bestrahlten im Vergleich zu den scheinexponierten unbestrahlten Kontrollen aufgetreten. Signifikante Unterschiede fanden sich bei der niedrigsten Exposition (SAR 0,25 W/kg) der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder FPG behandelten Zellen sowie bei der höchsten Exposition (SAR 1,0 W/kg) der mit FPG behandelten Zellen (Abbildung 6.10).

Die statistische Prüfung aller experimenteller Faktoren ergab für die FPG vorbehandelten Zellen ein signifikantes Ergebnis für die SAR und die Exposition. Dies geht darauf zurück, dass im Vergleich zur mittleren Exposition (0,5 W/kg) die beiden anderen Expositionen höhere Tailintensitäten ergaben, wobei auch insgesamt ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen auftrat (Tabelle

6.9). Tendenziell trat auch bei Endo III ein Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen auf (Tabelle 6.8).

Tabelle 6.8: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Endo III-Comet Assay zur Detektion oxydierter Pyrimidinbasen; U251 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	1,056	0,361	n.s.
Exposition?	1 / 30	4,008	0,054	Tendenz
SAR * Exposition	2 / 30	0,220	0,804	n.s.

Tabelle 6.9: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG-Comet Assay zur Detektion oxidierter Purinbasen; U251 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	15,296	<0,001	hoch signifikant
Exposition?	1 / 30	5,120	0,031	signifikant
SAR * Exposition	2 / 30	0,874	0,427	n.s.

Bei der Auswertung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assays ergab sich eine signifikante Wechselwirkung (SAR \* Exposition), die auf den gegenüber den Bedingungen SAR 0,5 und 1,0 W/kg bei 0,25 W/kg aufgetretenen höheren Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen zurückgeht. Der Standard Comet Assay lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Proben ( Tabelle 6.11) beobachtet werden.

Tabelle 6.10: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativer Schädigung; U251 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	2,980	0,066	Tendenz
Exposition?	1 / 30	1,792	0,191	n.s.
SAR * Exposition	2 / 30	3,662	0,038	signifikant

Tabelle 6.11: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; U251 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	1,136	0,335	n.s.
Exposition?	1 / 30	0,001	0,981	n.s.
SAR * Exposition	2 / 30	0,016	0,984	n.s.

## U373 Glioblastom-Zelllinie

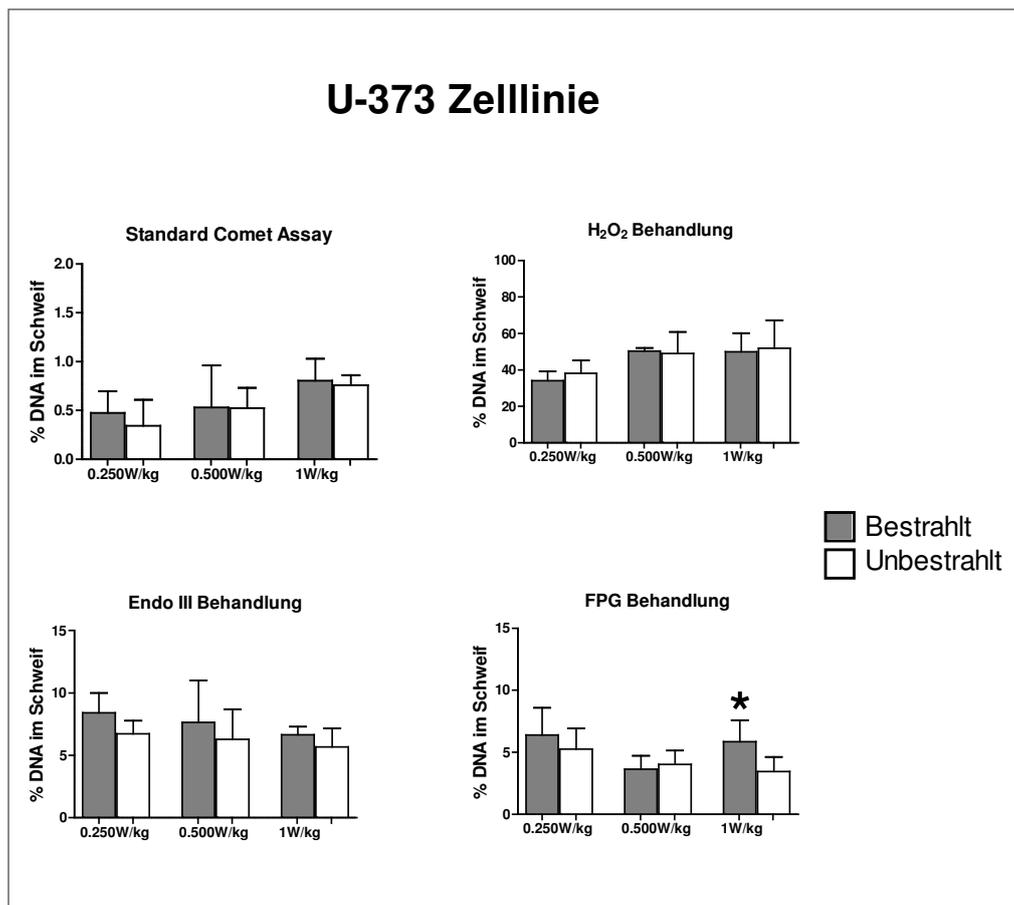


Abbildung 6.11: Glioblastom-Zelllinie, U373; 16 Stunden UMTS Exposition mit unterschiedlicher SAR. Standard Comet Assay: DNA Brüche, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung: Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen, Endo-III Behandlung: oxidierte Pyrimidinbasen der DNA; FPG Behandlung: oxidierte Purinbasen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallel Messungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Bei dieser Glioblastom-Zelllinie traten nur geringe Unterschiede auf, wobei nur bei den FPG behandelten Zellen bei der höchsten Exposition (SAR 1,0 W/kg) ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und Kontrollzellen auftrat.

Bei der Gesamtanalyse mittels ANOVA ergab sich bei den mit Endo-III behandelten Zellen kein signifikanter Effekt (Tabelle 6.12). Beim Standard Comet Assay sowie bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorbehandelten Zellen war allein der Faktor SAR signifikant (Tabelle 6.14 und Tabelle 6.15), was darin begründet ist, dass sowohl die bestrahlten Zellen als auch die unbestrahlten Kontrollen mit zunehmender Exposition zunehmende Tailintensitäten aufwiesen und daher dieser Effekt nicht auf die Bestrahlung zurückgeführt werden kann. Beim FPG Comet Assay war ebenfalls ein signifikanter Effekt der SAR aufgetreten (Tabelle 6.13), der in Verbindung mit einem tendenziellen Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen auf die Exposition zurückgeführt werden könnte. Ähnlich wie bei der Zelllinie U251 war auch bei dieser Zelllinie die mittlere Intensität (0,5 W/kg) mit der niedrigsten Tailintensität unter der FPG Behandlung verbunden.

Tabelle 6.12: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Vorbehandlung mit Endo III, Oxidation von Pyrimidinbasen; U373 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	0,876	0,427	n.s.
Exposition?	1 / 30	2,306	0,139	n.s.
SAR * Exposition	2 / 30	0,152	0,860	n.s.

Tabelle 6.13: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG Comet Assay zur Detektion oxidierter Purinbasen; U373 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	4,336	0,022	signifikant
Exposition?	1 / 30	3,558	0,069	Tendenz
SAR * Exposition	2 / 30	2,411	0,107	n.s.

Tabelle 6.14: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden; U373 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 30	8,663	0,001	hoch signifikant
Exposition?	1 / 30	0,242	0,626	n.s.
SAR * Exposition	2 / 30	0,239	0,789	n.s.

Tabelle 6.15: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach dem Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; U373 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 29	6,480	0,005	hoch signifikant
Exposition?	1 / 29	0,388	0,538	n.s.
SAR * Exposition	2 / 29	0,504	0,609	n.s.

### 6.3.3 SAR Abhängigkeit der DNA Brüche

Aufgrund von Hinweisen in der internationalen Literatur, dass möglicherweise die biologischen Wirkungen der Exposition zu HF-EMF Felder nicht linear mit der Intensität (SAR) korreliert, wurden zwei Zelllinien bei drei bzw. vier SAR-Werten untersucht.

Die beiden Zelllinien waren:

- Glioblastom-Zelllinie, U87
- Fibroblasten-Zelllinie, ES-1

Wie bei den vorangegangenen Experiment-Serien, wurden die Zellen standardmäßig (37° C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre, gesättigte Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Die Exposition erfolgte folgendermaßen:

- UMTS Signal
- SAR: 3 oder 4 Stufen
  - 0,25 W/kg,
  - 0,50 W/kg (nur bei U87)
  - 1,00 W/kg, und
  - 1,50 W/kg (nur bei ES-1)
  - 2,00 W/kg (nur bei ES-1)
- Expositionsdauer: 16 Stunden.

Die anschließenden zellulären Untersuchungen waren verglichen mit der ersten und zweiten Versuchsserie (Abschnitt 6.3.1) unverändert.

Nach der Exposition erfolgten bei der Glioblastom-Zelllinie folgende Behandlungen der Zellen:

1. Ohne Vorbehandlung = Comet Assay Standard Bedingung, zur Feststellung expositionsbedingter DNA Brüche,
2. Vorbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Feststellung, ob HF-Exposition eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber oxidativen Schädigungen bewirkt,
3. Vorbehandlung mit dem Enzym FPG, zur Feststellung ob HF-EMF Exposition in der zellulären DNA oxidierte Purin-Basen vermehrt,
4. Vorbehandlung mit Endonuklease III, zur Feststellung ob HF-EMF Exposition in der zellulären DNA oxidierte Pyrimidin-Basen vermehrt.

Bei den Fibroblasten (ES-1) wurden die Vorbehandlungen mit Restriktionsenzyme FPG und Endo-III zur Feststellung von oxidierten DNA-Basen nicht angewandt, weil bereits in den ersten Experimentserien bei diesen experimentellen Bedingungen keine Unterschiede zwischen Schein- und real exponierten Zellen fanden (Abschnitt 6.3.1).

Somit erfolgten bei den Fibroblasten nach der Exposition nur die oben unter Punkt 1 und 2 angegebenen Behandlungen.

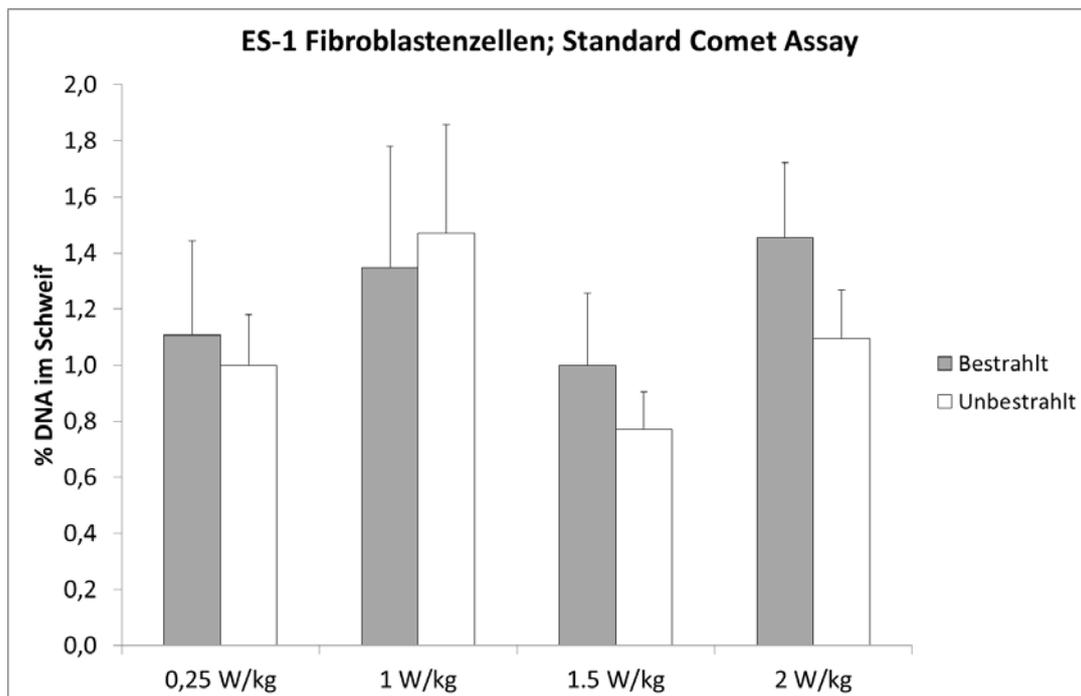
**Fibroblasten-Zelllinie ES-1**

Abbildung 6.12: Fibroblasten-Zelllinie ES-1. Standardbedingung des Comet Assays. UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 2 W/kg. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an.

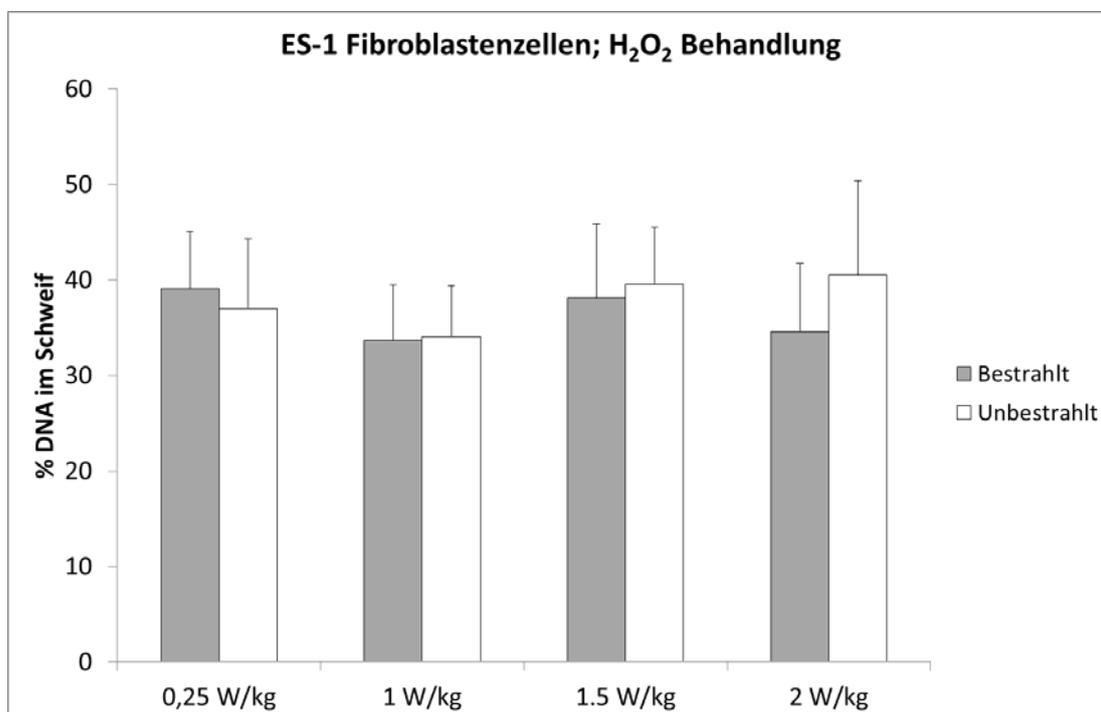


Abbildung 6.13: Fibroblasten-Zelllinie ES-1, Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sensibilität gegenüber oxidativen Schäden. UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 2 W/kg. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ersten Experiments fanden sich bei der Fibroblasten-Zelllinie ES-1 bei keiner der Bedingungen signifikante Unterschiede

zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Ebenso zeigte die Gesamtanalyse der Daten mittels Varianzanalyse (Tabelle 6.16 und Tabelle 6.17), dass weder die Intensität der Exposition noch der Unterschied zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen oder die Wechselwirkung statistisch signifikant waren.

Tabelle 6.16: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach dem Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; ES-1 Fibroblastenzellen, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 1, 1,5 oder 2 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	3/62	1,592	0,200	n.s.
Exposition?	1/62	0,657	0,421	n.s.
SAR * Exposition	3/62	0,293	0,831	n.s.

Tabelle 6.17: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden; ES-1 Fibroblastenzellen, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 1, 1,5 oder 2 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	3/62	0,203	0,894	n.s.
Exposition?	1/62	0,081	0,777	n.s.
SAR * Exposition	3/62	0,116	0,950	n.s.

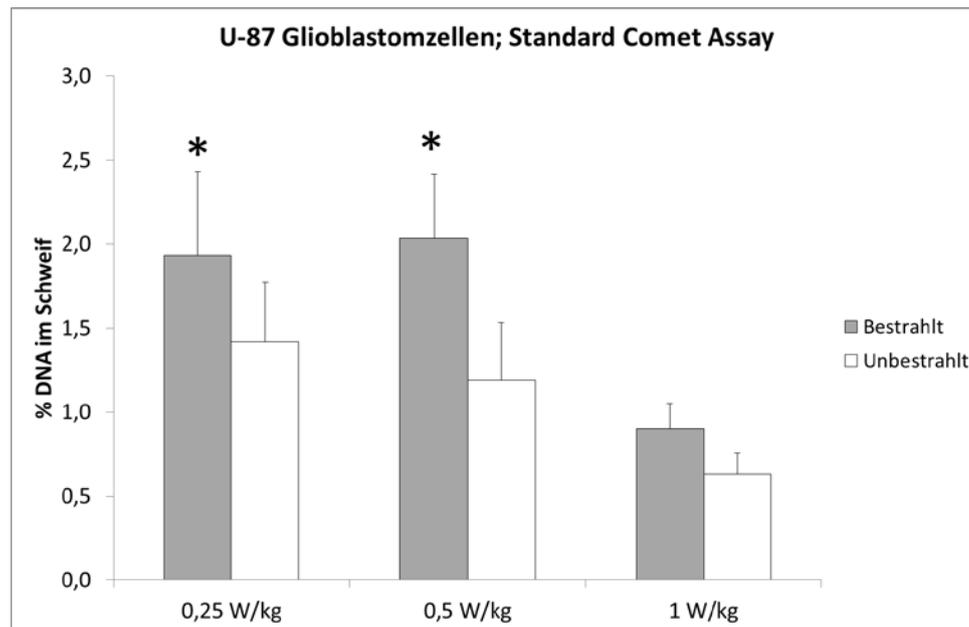
**Glioblastom-Zelllinie U-87**

Abbildung 6.14: Glioblastom-Zelllinie U87. Standardbedingung des Comet Assays. UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

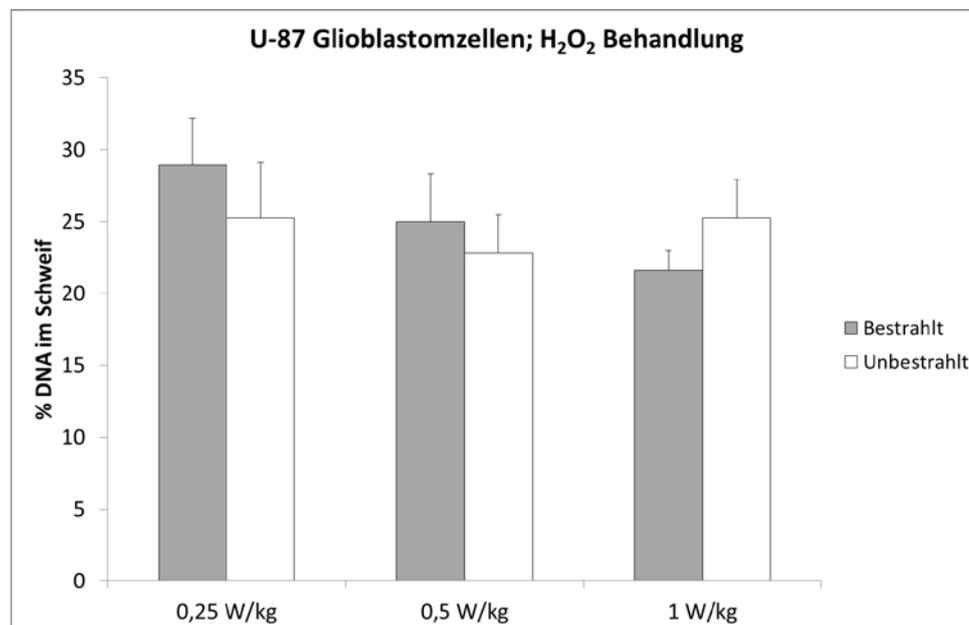


Abbildung 6.15: Glioblastom-Zelllinie U87. Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Prüfung der Sensibilität gegenüber oxidativen Schäden. UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an.

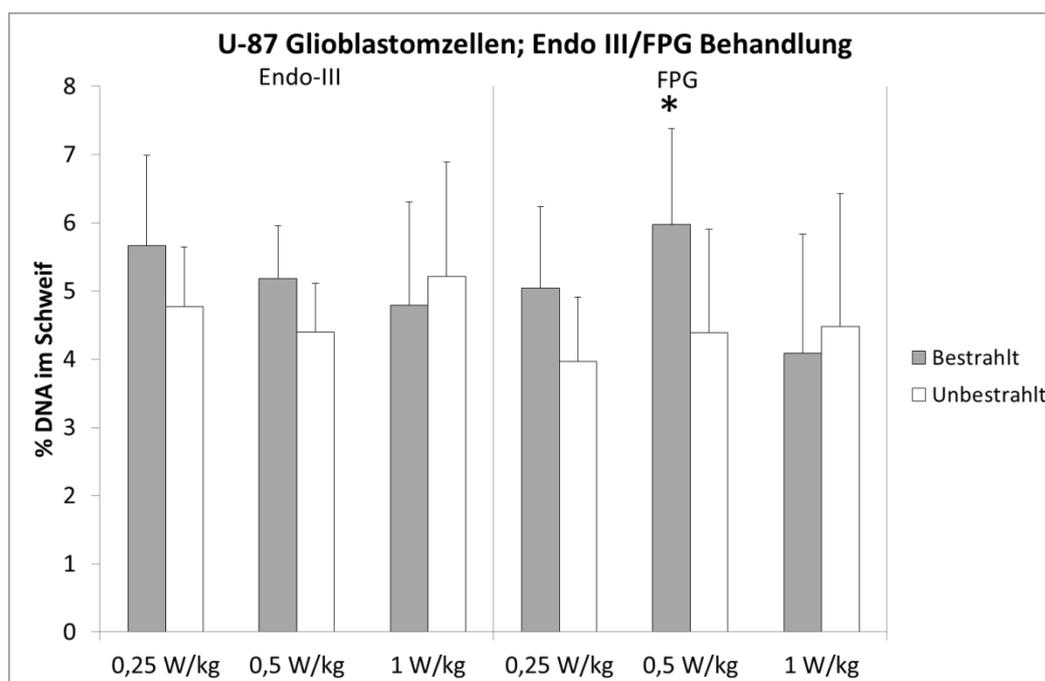


Abbildung 6.16: Glioblastom-Zelllinie U87, oxidierte Pyrimidin- bzw. Purin-Basen. Behandlung mit Endo-III bzw. FPG, nach UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert.

Signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen traten bei der Standardbedingung bei einer SAR von 0,25 und 0,5 W/kg sowie bei FPG behandelten Zellen bei 0,5 W/kg auf.

Die Varianzanalyse nach Standard Comet Assay (Tabelle 6.18) ergab demgemäß einen signifikanten Effekt der Exposition, während bei den FPG behandelten Zellen (Tabelle 6.21) der Effekt bei der SAR von 0,5 W/kg nicht ausreichte, um statistisch einen signifikanten Expositionseffekt über alle Intensitäten festzustellen.

Bei der Standardbedingung war der Faktor SAR signifikant, allerdings ergab sich eine inverse Dosisabhängigkeit mit höheren Werten der Tailintensität bei niedriger SAR. Wie die Resultate bei den unbestrahlten Zellen zeigen, geht dieser Effekt zumindest teilweise auf Unterschiede zwischen den Experimenten mit verschiedener SAR zurück. Da aber bei der höheren SAR auch die Differenz zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen geringer ist, kann diesem Unterschied zwischen den Experimenten auch ein echter Dosiseffekt überlagert sein.

Solche Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit abnehmendem Effekt bei zunehmender Dosis sind möglich, wenn die Exposition Gegenregulationen aktiviert (z. B. Reparaturmechanismen induziert).

Tabelle 6.18: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; U87 Glioblastomzelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheitsgrade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/54	13,209	0,000	hoch signifikant
Exposition?	1/54	6,741	0,012	Signifikant
SAR * Exposition	2/54	0,230	0,795	n.s.

Tabelle 6.19: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden; U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheitsgrade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/52	0,595	0,555	n.s.
Exposition?	1/52	0,175	0,678	n.s.
SAR * Exposition	2/52	0,789	0,460	n.s.

Tabelle 6.20: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Endo-III Comet Assay zur Detektion oxidiertes von Pyrimidinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheitsgrade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/52	0,128	0,880	n.s.
Exposition?	1/52	0,000	0,995	n.s.
SAR * Exposition	2/52	0,390	0,679	n.s.

Tabelle 6.21: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG Comet Assay zur Detektion oxidiertes Purinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheitsgrade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/46	2,831	0,069	Tendenz
Exposition?	1/46	1,749	0,193	n.s.
SAR * Exposition	2/46	0,885	0,419	n.s.

## **SAR-Abhängigkeit - Zusammenfassung**

Hinweise auf expositionsbedingte DNA-Schäden ergaben sich bei der Zelllinie U-87, nicht jedoch bei der ES-1 Zelllinie. Bei den U87-Zellen traten sowohl unter Standardbedingung (Messung von DNA Brüchen) als auch nach Vorbehandlung mit dem Restriktionsenzym FPG (Messung oxidierter Purinbasen) signifikante DNA-Läsionen auf.

Eine Intensitätsabhängigkeit wurde nicht eindeutig ermittelt. Es gab zwar Hinweise auf eine U-förmige Abhängigkeit mit stärkeren Effekten bei der niedrigen und der hohen Expositionen, die jedoch nicht konsistent über die Versuche auftrat.

### **6.3.4 Dauer der Exposition**

Aufgrund von Hinweisen in der internationalen Literatur und den eigenen Vorerfahrungen, dass DNA Schädigungen nicht unmittelbar nach Beginn der Exposition, sondern erst nach einer gewissen Verzögerung (Latenzzeit) auftreten, wurden bei einer Zelllinie drei unterschiedliche Expositionsdauern untersucht.

#### **Methodik**

Um zu untersuchen, ob die bereits beobachteten Effekte in der Glioblastom-Zelllinie U87 zeitabhängig sind, wurden **U87 Glioblastom -Zellen** mit unterschiedlicher SAR (Bestrahlungs-Intensität) für unterschiedlich lange Zeiten exponiert.

Nach der Exposition wurden die Zellen tiefgefroren, um sie gemeinsam in einem Arbeitsgang untersuchen zu können. Diese Vorgangsweise reduziert die Variabilität durch die Arbeitsschritte im Labor. Nach dem Auftauen wurden Comet Assays unter Standardbedingungen, mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung und nach Behandlung mit den Restriktionsenzymen FPG und Endo-III durchgeführt.

Die unterschiedlichen Expositionszeiten waren:

- 6 Stunden
- 16 Stunden
- 24 Stunden

Wie bei den vorangegangenen Experiment-Serien, wurden die Zellen standardmäßig (37° C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre, gesättigte Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Die Exposition erfolgte bei jeder Expositionsdauer folgendermaßen:

- UMTS Signal
- SAR: 3 Stufen
  - 0,25 W/kg,
  - 0,50 W/kg, und
  - 1,00 W/kg

Der Untersuchungsablauf war wie bei den vorangegangenen Experimenten.

### Zeitabhängigkeit – Überblick

In den Abbildungen 1.16-1.19 sind die Ergebnisse der Experimente in denen die Zeitabhängigkeit der Exposition untersucht wurde graphisch dargestellt.

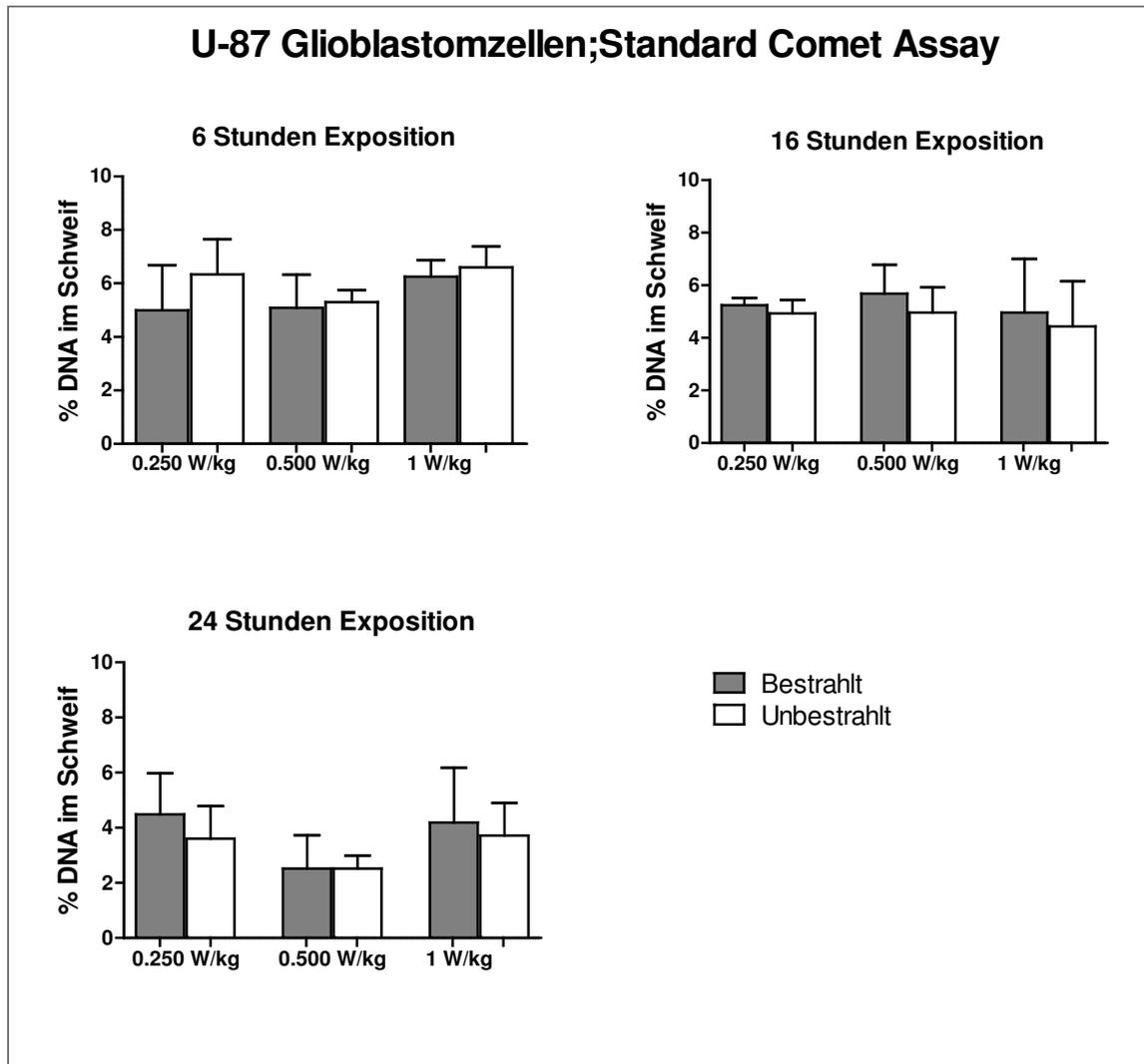


Abbildung 6.17: Glioblastom-Zelllinie U87. Standardbedingung des Comet Assays. UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg bei Expositionsdauern von 6, 16 und 24 Stunden. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an.

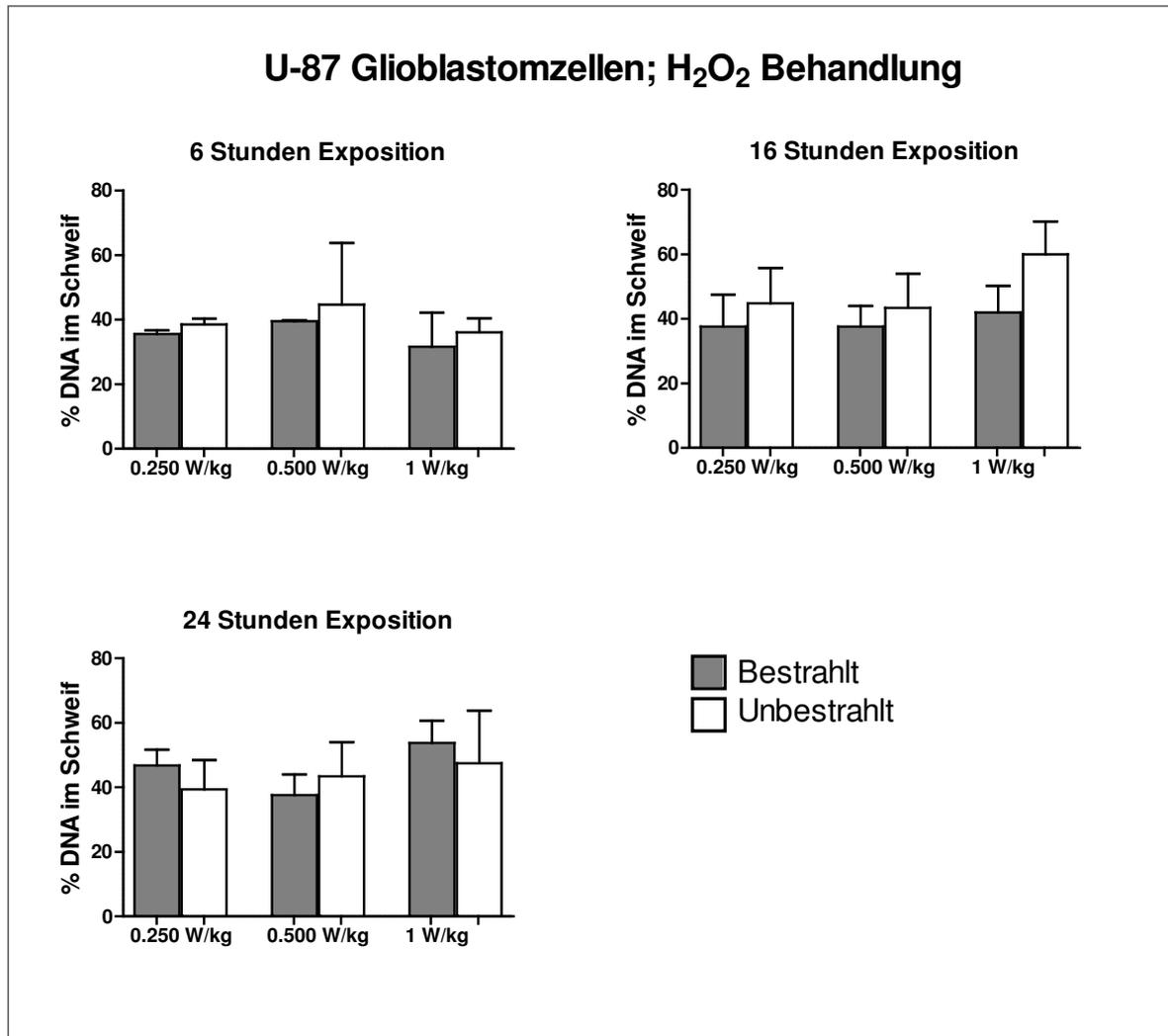


Abbildung 6.18: Glioblastom-Zelllinie U87. Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. nach UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg bei Expositionsdauern von 6, 16 und 24 Stunden. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an.

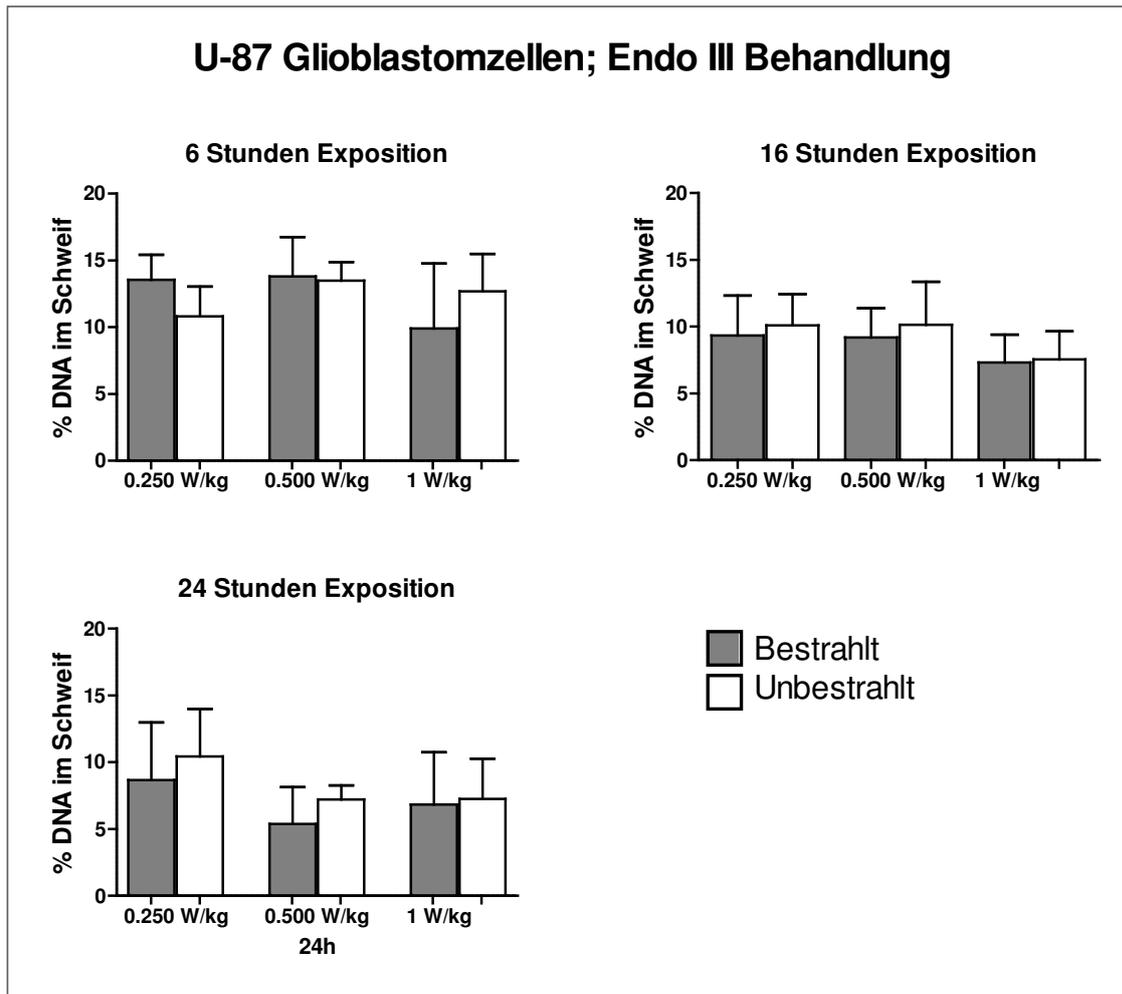


Abbildung 6.19: Glioblastom-Zelllinie U87, Behandlung mit Endo III. UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg bei Expositionsdauern von 6, 16 und 24 Stunden. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an.

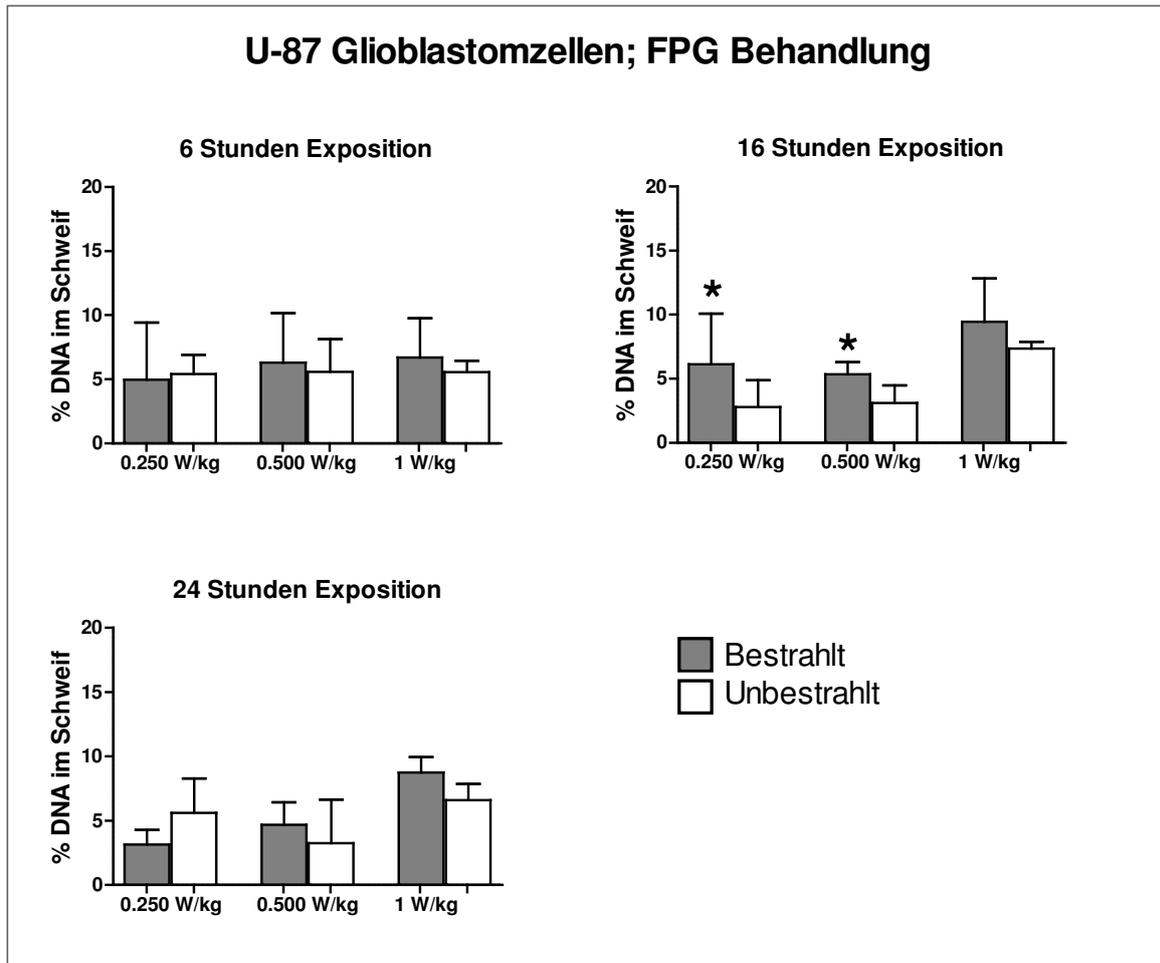


Abbildung 6.20: Glioblastom-Zelllinie U87; FPG-Comet Assay nach UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg bei Expositionsdauern von 6, 16 und 24 Stunden. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit \* markiert.

### Detaillierte Auswertung

#### 6-stündige Exposition

Bei 6-stündiger Exposition gab es bei keiner der untersuchten Bedingungen einen signifikanten Effekt der Exposition.

Tabelle 6.22: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Vorbehandlung mit Endo III, Oxidation von Pyrimidinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 6 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	1,338	0,299	n.s.
Exposition?	1 / 12	0,002	0,967	n.s.
SAR * Exposition	2 / 12	1,827	0,203	n.s.

Tabelle 6.23: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG-Comet Assay zur Detektion oxidierter Purinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 6 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 11	0,485	0,628	n.s.
Exposition?	1 / 11	0,214	0,652	n.s.
SAR * Exposition	2 / 11	0,500	0,620	n.s.

Tabelle 6.24: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden; U87 Glioblastom-Zelllinie, 6 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	1,179	0,341	n.s.
Exposition?	1 / 12	0,885	0,365	n.s.
SAR * Exposition	2 / 12	0,019	0,981	n.s.

Tabelle 6.25: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 6 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	1,811	0,205	n.s.
Exposition?	1 / 12	1,496	0,245	n.s.
SAR * Exposition	2 / 12	0,470	0,636	n.s.

### 16-stündiger Exposition

Bei der 16-stündigen Exposition zeigte sich ähnlich wie bei den früheren Experimenten ein signifikanter Effekt der Exposition nach FPG-Comet Assay (Abbildung 6.20). Auch bei der Varianzanalyse ergab sich ein signifikanter Effekt der Exposition sowie der Intensität (SAR), wobei ebenso wie bei dem vorangegangenen Experiment die niedrigste und höchste Exposition zu höheren Tailintensitäten führten als die mittlere. Beim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Comet Assay zeigten sich nach der 16-stündigen Exposition im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen bei diesem Experiment niedrigere Tailintensitäten.

Tabelle 6.26: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Endo III-Comet Assay zur Detektion oxidierter Pyrimidinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	1,644	0,234	n.s.
Exposition?	1 / 12	0,272	0,612	n.s.
SAR * Exposition	2 / 12	0,038	0,962	n.s.

Tabelle 6.27: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG Comet Assay zur Detektion oxidierter Purinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	16,006	0,004	hoch signifikant
Exposition?	1 / 12	4,474	0,067	Tendenz
SAR * Exposition	2 / 12	0,236	0,640	n.s.

Tabelle 6.28: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden; U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	2,253	0,148	n.s.
Exposition?	1 / 12	5,263	0,041	signifikant
SAR * Exposition	2 / 12	0,738	0,499	n.s.

Tabelle 6.29: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach dem Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; U87 Glioblastomzelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Frei- heitsgrade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	0,511	0,612	n.s.
Exposition?	1 / 12	0,735	0,408	n.s.
SAR * Exposition	2 / 12	0,036	0,965	n.s.

### 24-stündiger Exposition

Wie bei 16-stündiger Exposition waren nach 24 Stunden Bestrahlung und FPG Comet Assay Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen aufgetreten. Unter diesen Bedingungen trat auch ein signifikanter Effekt der Intensität auf, wobei aber bei den bestrahlten Zellen die Tailintensität mit zunehmender SAR zunahm. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein signifikanter Effekt der Intensität, wobei aber die mittlere Intensität den niedrigsten Wert aufwies (Abbildung 6.18).

Tabelle 6.30: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Vorbehandlung mit Endo III zur Detektion oxidierter Pyrimidinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 24 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	2,476	0,126	n.s.
Exposition?	1 / 12	0,754	0,402	n.s.
SAR * Exposition	2 / 12	0,090	0,915	n.s.

Tabelle 6.31: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG Comet Assay zur Detektion oxidierter Purinbasen; U87 Glioblastom-Zelllinie, 24 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	19,381	0,002	hoch signifikant
Exposition?	1 / 12	3,485	0,099	Tendenz
SAR * Exposition	2 / 12	0,005	0,945	n.s.

Tabelle 6.32: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Comet Assay zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden; U87 Glioblastom-Zelllinie, 24 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	4,778	0,030	signifikant
Exposition?	1 / 12	3,100	0,099	Tendenz
SAR * Exposition	2 / 12	0,046	0,955	n.s.

Tabelle 6.33: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach dem Standard Comet Assay zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen; U87 Glioblastomzelllinie, 24 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist- Freiheits- grade FG-1 / FG-2	Statist. Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2 / 12	2,749	0,104	n.s.
Exposition?	1 / 12	0,334	0,574	n.s.
SAR * Exposition	2 / 12	0,180	0,838	n.s.

### Zusammenfassung der Experimentserie zur Expositionsdauer

In Experimenten zur Feststellung von oxidierten Pyrimidinbasen in der DNA (Endo III Vorbehandlung) fanden sich bei keiner Expositionsdauer und bei keiner Expositionsintensität (SAR) signifikante Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen.

Bei den Experimenten zur Feststellung von oxidierten Purinbasen in der DNA (Enzym FPG) fanden sich expositionsbedingte DNA-Läsionen bei 16 und 24 Stunden Exposition.

Es ergab sich ein signifikanter Anstieg der % DNA im Schweif mit zunehmender Intensität der Exposition bei 24 Stunden und bei 16 Stunden Exposition ein eher U-förmiger Zusammenhang mit expositionsbedingt höheren Werten bei der höchsten und niedrigsten Intensität.

Bei Experimenten zur Feststellung der Empfindlichkeit gegenüber Oxidation (Vorbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zeigte sich kein signifikanter Effekt der Bestrahlung außer bei der Bedingung mit 24 Stunden Bestrahlung, wobei ein signifikanter Effekt der Intensität mit höheren Werten bei der niedrigsten und höchsten Exposition auftrat.

### 6.3.5 Zellstress durch Serumentzug

Ziel dieser Experimentserie war es festzustellen, ob die HF-EMF-Exposition in Kombination mit einem durch Serumentzug experimentell erzeugten Zellstress mehr DNA-Strangbrüche bewirkt als Normalbedingungen.

Mehrere Überlegungen und Befunde begründen diese Fragestellung:

- Selbst bei ionisierender Strahlung (Röntgen-, Gamma-Strahlung, sogenannte *low*-LET Strahlung, d.h. Strahlung mit niedriger linearer Energieübertragung) wird nur ein Teil der Läsionen durch direkte Wechselwirkung mit der DNA erzeugt. Oft wird der größere Teil indirekt z.B. durch die Erzeugung von Radikalen in der Nähe der DNA hervorgerufen.
- Serumentzug bedeutet für die Zellen eine Form von Zellstress. Dabei wird die Synthese von Faktoren angeregt, die ansonsten durch das Serum zur Verfügung gestellt werden. Die gesteigerte Syntheseaktivität (metabolische Aktivität) könnte mit der Exposition gegenüber Umweltfaktoren wie beispielsweise HF-EMF zusammenwirken.
- Zellstress ist eine häufige Folge von Umwelteinflüssen, und
- Zellstress kann im Labor experimentell erzeugt werden.

### 6.3.6 Ziel, Testprinzip und methodischer Überblick

Bei *in vitro* kultivierten Zellen bedeutet Serumentzug eine Stresssituation, welche die „Fitness“ der Zelle beeinträchtigt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass Zellen, die in serumfreiem Medium kultiviert werden, empfindlicher auf DNA schädigende Einflüsse reagieren. Daher wurden für diese Fragestellung die Zellen unter Serumentzug kultiviert und dann mit HF-EMF bestrahlt.

Im Unterschied zu den vorangegangenen Experiment-Serien, wurden die Zellen in einem Medium ohne Serumzusatz aber ansonsten standardmäßig (37° C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre, gesättigte Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Um sicherzustellen, dass die gestressten Zellen vital sind, wurden jeweils vor der Expositionsserie die Vitalität überprüft.

#### Bestimmung der Zell-Vitalität

Dazu wurden die Zellen von der Wachstumsunterlage abgelöst (trypsiniert), in 2 ml Medium aufgenommen und davon eine Probe von 20 µl in einer so genannten Neubauer Zählkammer ausgezählt, um die Zellzahl insgesamt zu bestimmen. Es wurden pro Kulturschale  $5 \cdot 10^5$  mit und ohne Serum unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, gesättigt feuchte Atmosphäre) inkubiert und über einen Zeitraum von sieben Tagen alle 24 Stunden die Zellzahl von jeweils drei Schalen ausgezählt und in einer Wachstumskurve eingetragen.

Der Anteil lebender und in der Kultur abgestorbenen Zellen wurde durch das Trypanblau- Ausschluss-Verfahren ermittelt. In allen Untersuchungen war die Vitalität der Zellen nach der Exposition  $\geq 80$  %. Nach der Bestimmung der Proliferationsrate und der Zellvitalität wurden die Expositionsexperimente durchgeführt.

Es wurden zwei Zelllinien getestet:

- Glioblastom-Zelllinie U87
- Glioblastom-Zelllinie U251

Die Expositionszeiten waren jeweils 16 Stunden und die stressende Kulturbedingung bestand für 5 Tage plus 16 Stunden Exposition.

Die HF-EMF-Exposition erfolgte jeweils mit UMTS Signal und einer SAR in drei Abstufungen

- SAR 0,25 W/kg
- SAR 0,50 W/kg, und
- SAR 1,00 W/kg

Die anschließenden DNA-Untersuchungen waren verglichen mit den vorangegangenen Versuchsserien unverändert:

#### **Vitalität der Zellen vor der EMF Exposition**

Nach Anzüchtung und 2-3 Passagen wurden die Zellen nach 5 Tagen im serumfreien Medium 16 Stunden exponiert (oder schein-exponiert).

Abbildung 6.21 A und C zeigt die Überlebenskurve der Zellen unter Serumentzug. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Die Zahl der Zellen nahm bei Kultivierung in serumfreiem Medium innerhalb der 5-Tage um etwa 18-25% ab. Dieser Effekt wurde bei beiden Zelllinien detektiert. Im Gegensatz dazu stiegen die Zellzahlen im gleichen Zeitraum bei Serumzugabe auf das sechsfache bzw. dreifache an. Auch die Vitalität der Zellen wurde durch den Serumentzug beeinflusst (

Abbildung 6.21 B und D). Während zu Beginn der Inkubation die Vitalität im Bereich von 97-99% lag, sank sie nach 5 Tagen auf ca. 80% ab; nach 7 Tagen waren nur noch 32% Vitalität bei der Zelllinie U87 und 22% bei der Zelllinie U251 feststellbar.

Es ist bekannt, dass es bei zu niedriger Vitalität (unter der 80% Grenze) im Comet Assay zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann.<sup>[4]</sup> Um die Vitalität nicht unter die kritische Grenze von 80% fallen zu lassen, wurden die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse nach 5-tägigem Serumentzug und EMF-Exposition erzielt. Bei der Auswertung wurden nur Zellen mit intaktem Zellkern berücksichtigt. Es kann angenommen werden, dass diese vor der Aufbereitung für die Analyse vital waren.

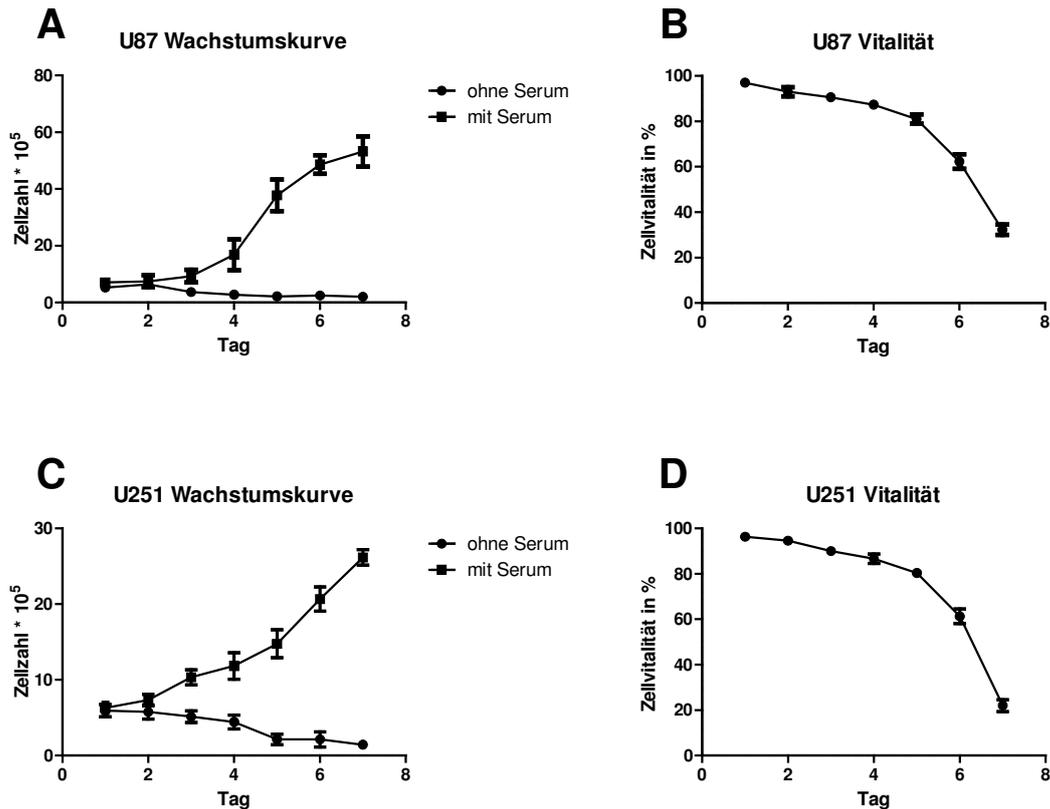


Abbildung 6.21: Ermittlung von Zellteilung (A und C) sowie Vitalität (B und D) der Glioblastom-Zelllinien U87 und U251 im serumhaltigen und serumfreien Medium. Pro Schale wurden  $5 \times 10^5$  Zellen angesetzt. Die Zählungen erfolgten in einem Abstand von 24 Stunden über einen Zeitraum von sieben Tagen. Die Abbildungen geben pro Zeitpunkt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei Kultur-Schalen wieder.

### Ergebnisse der Expositionsexperimente

Die Ergebnisse, die mit beiden Zelllinien unter Standardbedingungen erhalten wurden, sind in

Abbildung 6.22 zusammenfassend dargestellt.

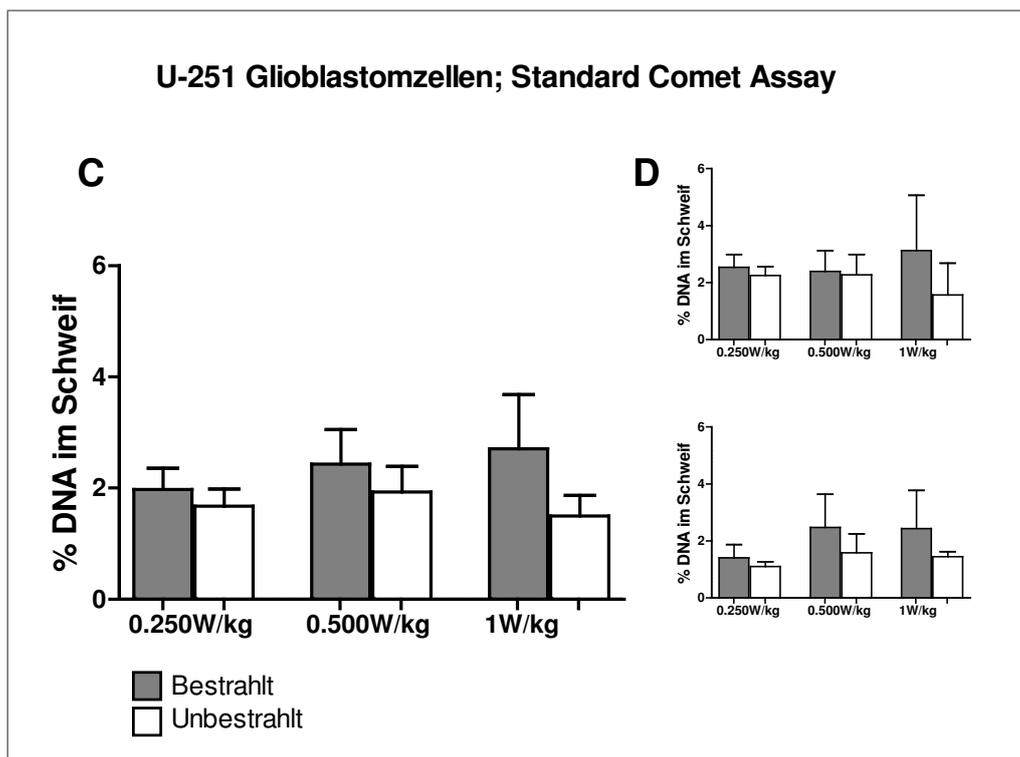
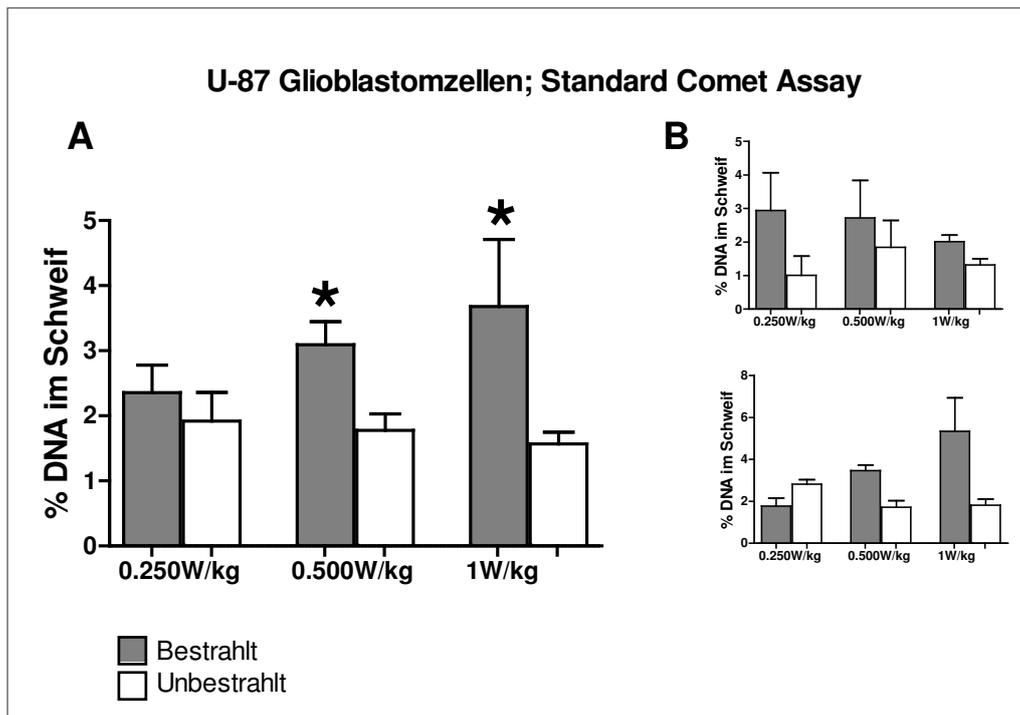


Abbildung 6.22: Gestresste Glioblastom-Zelllinien: Zelllinie U87 (Gesamtergebnis A; und Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten B); und U251 (Gesamtergebnis C; und Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten D). Standardbedingung des Comet Assays; UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg bei einer Expositionsdauer von 16 Stunden; % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen nach 5 Tagen Serumentzug. Die Balken geben die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Parallelmessungen an. Signifikante Unterschiede (★) nur für das Gesamtergebnis dargestellt.

Bei der Glioblastom-Zelllinie U87 ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen bei einer SAR von 0,5 und 1,0 W/kg. Die anschließende Varianzanalyse zeigte einen Gesamteffekt der Bestrahlung an (Tabelle 6.34). Bei der Glioblastom-Zelllinie U251 waren auch bei allen Versuchen höhere Tailintensitäten bei den exponierten Zellen im Vergleich zu den scheinexponierten aufgetreten (

Abbildung 6.22), diese expositionsbedingten Unterschiede waren aber nicht groß genug um statistische Signifikanz zu erreichen (vgl. statistische Daten in Tabelle 6.35).

Tabelle 6.34: U87 Glioblastom-Zelllinie unter Serumentzug; Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Standard Comet Assay, nach 5 Tagen Serumentzug und 16 Stunden UMTS Exposition (0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR).

Quelle der Varianz	Statist.Freiheitsgrade FG1/FG2	Statist.Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/30	0,39	0,681	n.s.
Exposition	1/30	10,23	0,003	hoch signifikant
SAR * Exposition	2/30	0,95	0,397	n.s.

Tabelle 6.35: U251 Glioblastom-Zelllinie unter Serumentzug; Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Standard Comet Assay nach 5 Tagen Serumentzug und 16 Stunden UMTS Exposition (0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR).

Quelle der Varianz	Statist.Freiheitsgrade FG1/FG2	Statist.Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/28	0,16	0,851	n.s.
Exposition	1/28	1,77	0,194	n.s.
SAR * Exposition	2/28	0,23	0,794	n.s.

**Oxidierete Pyrimidinbasen (Endo-III Behandlung)**

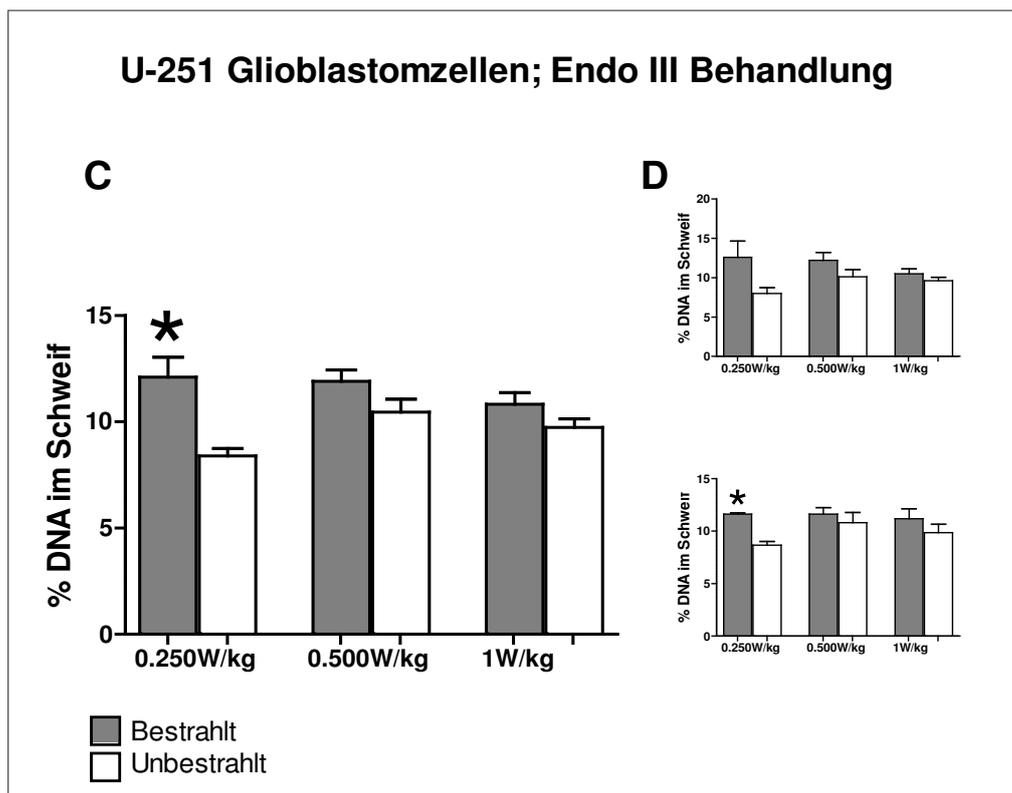
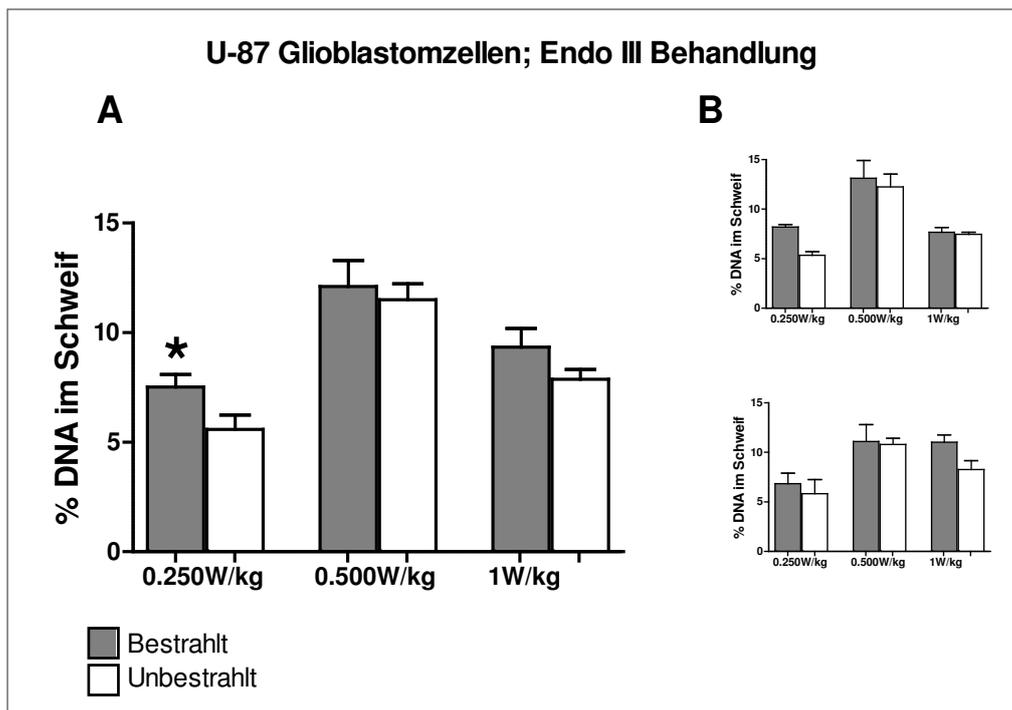


Abbildung 6.23: Gestresste Glioblastom-Zelllinien, oxidierte Pyrimidinbasen. U87 (Gesamtergebnis A, und Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten B); U251-Zellen (Gesamtergebnis C, Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten D); UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg bei einer Expositionsdauer von 16 Stunden; Behandlung mit Endo-III; % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen nach 5 Tagen Serumentzug. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Signifikante Unterschiede (★) nur für das Gesamtergebnis dargestellt.

Signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen ergaben sich sowohl bei der Zelllinie U87 als auch bei U251. Bei beiden Zelllinien war auch insgesamt bei der Varianzanalyse ein signifikanter Effekt der Bestrahlung aufgetreten (Tabelle 6.36 und Tabelle 6.37). Bei der Zelllinie U87 war auch der Faktor SAR signifikant, was auf den höheren Wert der % DNA im Schweif bei der SAR von 0,5 W/kg im Vergleich zu 0,25 W/kg zurückgeht (Tabelle 6.36). Bei der Zelllinie U251 war die SAR \* Exposition statistisch signifikant, was durch den stärkeren Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen bei der SAR von 0,25 W/kg im Vergleich zu den beiden anderen SAR-Werten bedingt ist (Tabelle 6.37).

Tabelle 6.36: U87 Glioblastom-Zelllinie, Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach Endo-III Comet Assay, nach 5 Tagen Serumentzug und 16 Stunden UMTS Exposition (0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR).

Quelle der Varianz	Statist.Freiheitsgrade FG1/FG2	Statist.Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/30	25,39	<0,001	hoch signifikant
Exposition	1/30	5,12	0,031	signifikant
SAR * Exposition	2/30	0,77	0,473	n.s.

Tabelle 6.37: U251 Glioblastom-Zelllinie, Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA), nach Endo-III Comet Assay; nach 5 Tagen Serumentzug und 16 Stunden UMTS Exposition (0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR).

	Statist.Freiheitsgrade FG1/FG2	Statist.Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/29	2,11	0,139	n.s.
Exposition	1/29	6,34	0,018	signifikant
SAR * Exposition	2/29	10,63	<0,001	hoch signifikant

**Oxidierete Purinbasen (FPG Behandlung)**

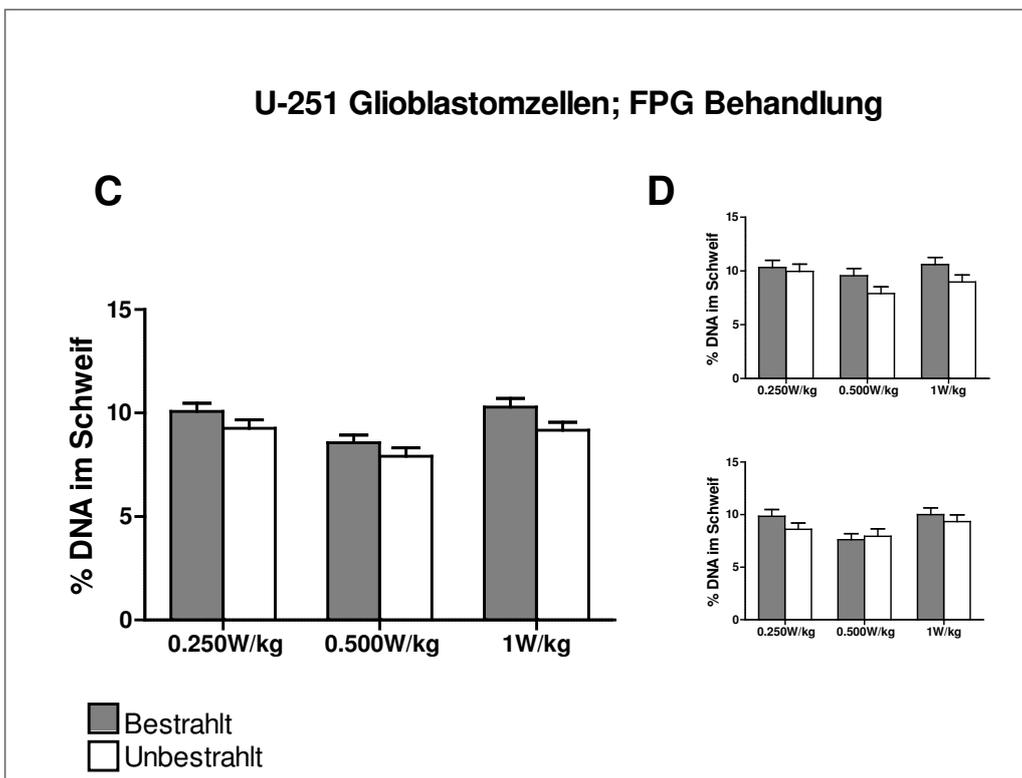
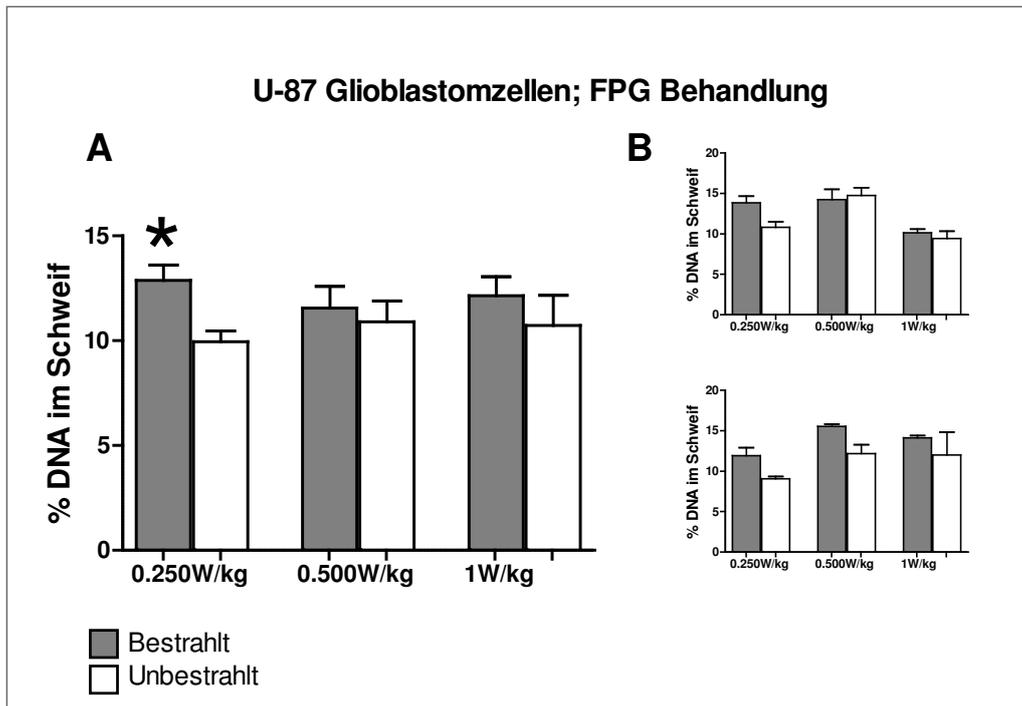


Abbildung 6.24: gestresste Glioblastom-Zelllinien, Oxidierte Purinbasen U87-Zellen (Gesamtergebnis A, Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten B); U251-Zellen (Gesamtergebnis C, Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten D); UMTS Exposition bei SAR Werten von 0,25 W/kg bis 1,0 W/kg bei einer Expositionsdauer von 16 Stunden. FPG Comet Assay; % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen nach 5 Tagen Serumentzug. Signifikante Unterschiede (★) nur für das Gesamtergebnis dargestellt.

Bei der Zelllinie U87 ergab die Bestrahlung bei einer SAR von 0,25 W/kg signifikant höhere Werte der Tailintensität im Vergleich zu den schein-exponierten Zellen (Abbildung 6.24). Die Varianzanalyse zeigt für beide Glioblastom-Zelllinien (U87 und U251) einen signifikanten Effekt der Exposition (Tabelle 6.38 und Tabelle 6.39). Bei der Zelllinie U251 war zusätzlich auch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen SAR-Intensitäten aufgetreten, wobei die Exposition bei einer SAR von 0,5 W/kg signifikant niedrigere Werte als es sich bei den beiden anderen Intensitäten ergab (Tabelle 6.39).

Tabelle 6.38: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG Comet Assay, Bestrahlung nach 5 Tagen Serumentzug; U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist.Freiheitsgrade FG1/FG2	Statist.Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/30	0,00	0,999	n.s.
Exposition	1/30	5,46	0,026	signifikant
SAR * Exposition	2/30	1,14	0,333	n.s.

Tabelle 6.39: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) nach FPG Comet Assay, Bestrahlung nach 5 Tagen Serumentzug; U251 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert mit 0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg SAR.

Quelle der Varianz	Statist.Freiheitsgrade FG1/FG2	Statist.Prüfgröße F	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/29	7,27	0,003	hoch signifikant
Exposition	1/29	5,71	0,024	signifikant
SAR * Exposition	2/29	0,12	0,884	n.s.

### Zusammenfassung der Ergebnisse zum Zellstress

Im Unterschied zu den Experimenten mit Serumzugabe war bei den Versuchen unter Serumentzug auch unter Standardbedingungen (d.h. ohne Einsatz von Restriktionsenzymen oder oxidativem Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ein signifikanter Effekt bei der Exposition mit UMTS-Signalen aufgetreten. Dieser war bei der Zelllinie U87 stärker ausgeprägt. Bei der Zelllinie U251 führte die Exposition bei allen SAR-Werten zu höheren % DNA im Schweif als die Scheinexposition, aber diese Unterschiede erreichten nicht statistische Signifikanz.

Bei Behandlung mit den Restriktionsenzymen Endo-III und FPG ergaben sich bei beiden Zelllinien signifikante Effekte der Exposition aber keine klare Dosisabhängigkeit im Sinne einer Zunahme des Effekts mit zunehmender SAR. Es hat eher den Anschein, als wären oxidierte Basen häufiger bei niedrigen Expositionen aufgetreten.

### 6.3.7 Erholung nach Serumentzug und UMTS Exposition

Beim ATHEM-1 Projekt wurden in Proteinuntersuchungen Hinweise gefunden, dass sich expositionsbedingte Effekte nach zwei Stunden zurückbilden. Nun sollte im Rahmen dieses Teilprojektes nachuntersucht werden, ob und gegebenenfalls wie lange nach Ende der Exposition, sich expositionsbedingte DNA-Brüche zurückbilden, bzw. nicht mehr feststellbar sind.

#### Testprinzip und Methodischer Überblick

Für diese Fragestellung wurden die Zellen vorerst wie in Abschnitt 6.3.5 unter Serumentzug kultiviert, und dann mit HF-EMF bestrahlt.

Die Kultur unter Serumentzug erfolgte für fünf Tage

Es wurden zwei Zelllinien getestet:

- Glioblastom-Zelllinie U87
- Glioblastom-Zelllinie U251

Die Exposition erfolgte mit UMTS Signal und einer SAR von 1,0 W/kg für jeweils 16 Stunden.

Nach der Exposition erhielten die Zellen das übliche Medium mit Serum für eine Erholungsphase von

- 0 Stunden
- 1 Stunde
- 2 Stunden

Die anschließenden DNA-Untersuchungen erfolgten ohne Vorbehandlung mit dem Standard Comet Assay, zur Feststellung expositionsbedingter DNA Brüche.

#### Ergebnisse

Die Ergebnisse die mit beiden Zelllinien erhalten wurden, sind in Abbildung 6.25 zusammengefasst. Durch "Serumentzug" und UMTS-Exposition (1W/kg) wurde in beiden Zelllinien U87 und U251 eine Erhöhung der Tailintensität gefunden. Nach 1-stündiger Erholungsphase (Standardmedium mit Serum) war das Ausmaß der DNA-Schädigung deutlich reduziert. Nach zwei Stunden wurden keine der HF-EMF Exposition zuordenbaren Schäden detektiert.

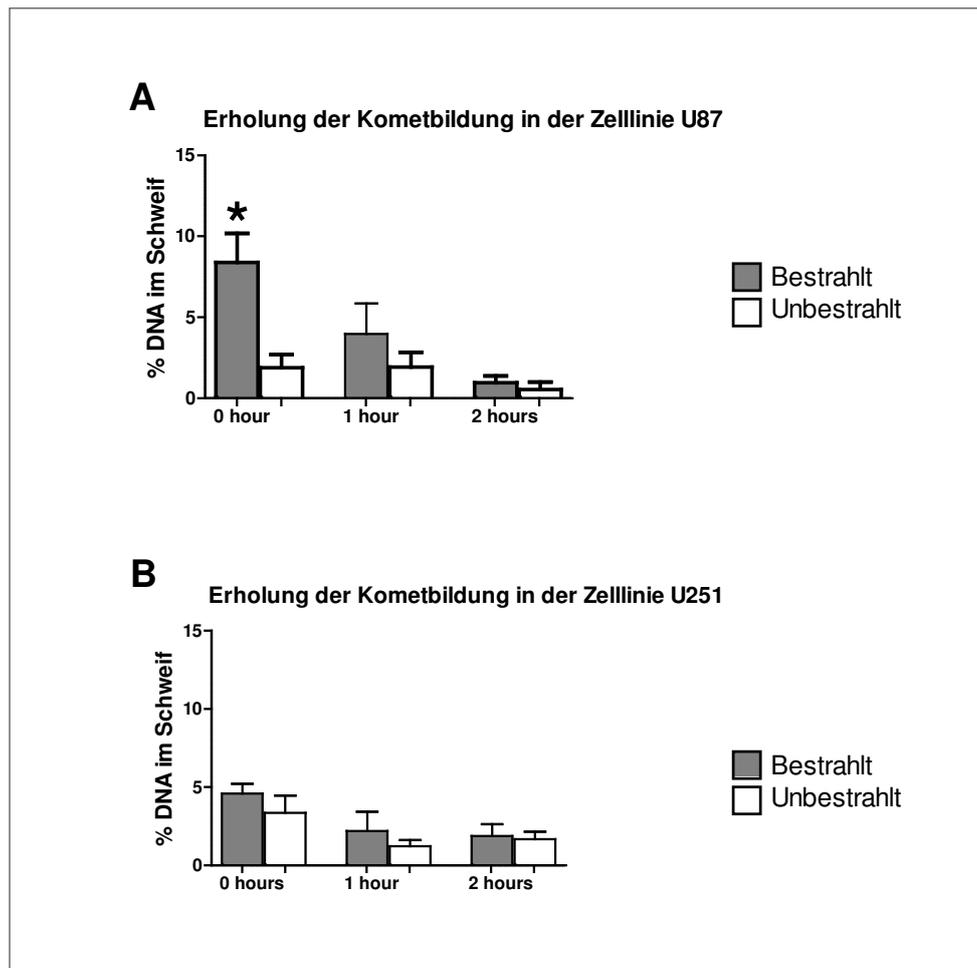


Abbildung 6.25: Glioblastom-Zelllinien U87 und U251, Erholungszeit bei Standardbedingung des Comet Assays. UMTS Exposition bei einer SAR von 1,0 W/kg und einer Expositionsdauer von 16 Stunden. % DNA im Schweif bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen nach 5 Tagen Serumentzug und anschließender Exposition ohne und mit darauf folgender Erholung von 1 und 2 Stunden mit Serumzusatz. Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Wie beim vorangegangenen Experiment trat auch in dieser Versuchsserie zur Untersuchung der Erholung ein signifikanter Expositionseffekt bei der Zelllinie U87 auf (Tabelle 6.40), während bei der Zelllinie U251 nur eine statistische Tendenz in Richtung höherer Tailintensitäten bei den exponierten Zellen aufgetreten war (Tabelle 6.41).

Bei beiden Zelllinien ergab sich jedoch nach Serumentzug und UMTS-Exposition eine signifikante Reduktion der Tailintensität nach 1- und 2- stündiger Erholung.

Tabelle 6.40: U87 Glioblastom-Zelllinie nach 5 Tagen Serumentzug; 16 Stunden UMTS exponiert bei 1,0 W/kg SAR und darauf folgender Erholung unter Serumzusatz für 0, 1 oder 2 Stunden; Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) für die Bedingung „Standard Comet Assay“.

Quelle der Varianz	FG1/FG2	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
Stunden	2/48	21,852	<0,001	hoch signifikant
Exposition	1/48	24,657	<0,001	hoch signifikant
SAR * Exposition	2/48	5,637	0,019	signifikant

Tabelle 6.41: U251 Glioblastom-Zelllinie, nach 5 Tagen Serumentzug; 16 Stunden UMTS exponiert bei 1,0 W/kg SAR und darauf folgender Erholung unter Serumzusatz für 0, 1 oder 2 Stunden. Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) für für die Bedingung „Standard Comet Assay“.

Quelle der Varianz	FG1/FG2	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
Stunden	2/48	12,697	0,001	hoch signifikant
Exposition	1/48	3,593	0,082	Tendenz
SAR * Exposition	2/48	0,465	0,639	n.s.

### 6.3.8 Expositionseinfluss auf Basen- und Nukleotid- Exzisions Reparatur

Da Schäden der Erbsubstanz auf zellulärer Ebene zu Mutationen bis hin zum Zelltod führen, entstanden im Laufe der Evolution Reparaturmechanismen für die DNA, die solche Schäden, wie sie z.B. spontan oder durch Exposition zu Strahlung entstehen, beseitigen. Zu den wichtigsten Reparatursystemen zählen die Basen- und die Nukleotid-Exzision-Reparatur (BER und NER).

Ziel dieser Experimentserie war es herauszufinden, ob durch UMTS Strahlung in Glioblastom-Zelllinien diese DNA Reparaturmechanismen beeinflusst werden.

#### Vorgangsweise

Für diesen Test benötigt man zwei Zelllinien. In den so genannten Reporter-Zellen wurden Schäden induziert, die spezifisch eines der Reparatursysteme (BER/NER) aktivieren. Für die NER-Untersuchungen kamen UV Bestrahlung (Stratalinker®, Stratagene, LaJolla, CA, USA) zum Einsatz. Für BER-Untersuchungen wurden die Reporterzellen mit einem Photosensibilisator *Ro 19-8022* ([R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol], Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz) inkubiert.

Anschließend wurden die Kerne der Reporter-Zellen isoliert und auf Objektträger aufgetragen, um sie dort mit zytoplasmatischen Proteinen jener Zellen, die mit UMTS-Feldern exponiert waren zu inkubieren. Bei der nachfolgende Elektrophorese reflektiert das Auftreten von Kometen infolge der Wanderung fragmentierter DNA (höhere Tailintensität) direkt die Menge und Aktivität von expositionsbedingt vermehrten Reparatur-Proteinen, spezifisch für das jeweilige Reparatursystem.

Es wurden zwei Glioblastom-Zelllinien verwendet (U87 und U251).

Die anschließend dargestellten Ergebnisse wurden mit drei unabhängig erfolgten Einzelerperimenten ermittelt. Pro Einzelerperiment wurden 3 Kulturschalen parallel angesetzt und gemeinsam EMF-exponiert. Eine zusätzliche Negativ-Kontrolle liefern Reporterzellen, die lediglich mit Enzympuffer behandelt wurden. Die Positivkontrollen wurden in Reporterzellen erhalten, deren Zellkerne mit DNA-fragmentierenden Restriktionsenzymen (Endo IV) vorbehandelt wurden.

### Ergebnisse zu NER Aktivität

Die Ergebnisse zur Induktion von Nukleotid Exzisionsreparaturproteinen (NER) sind in

Abbildung 6.26 und Abbildung 6.27 zusammengefasst

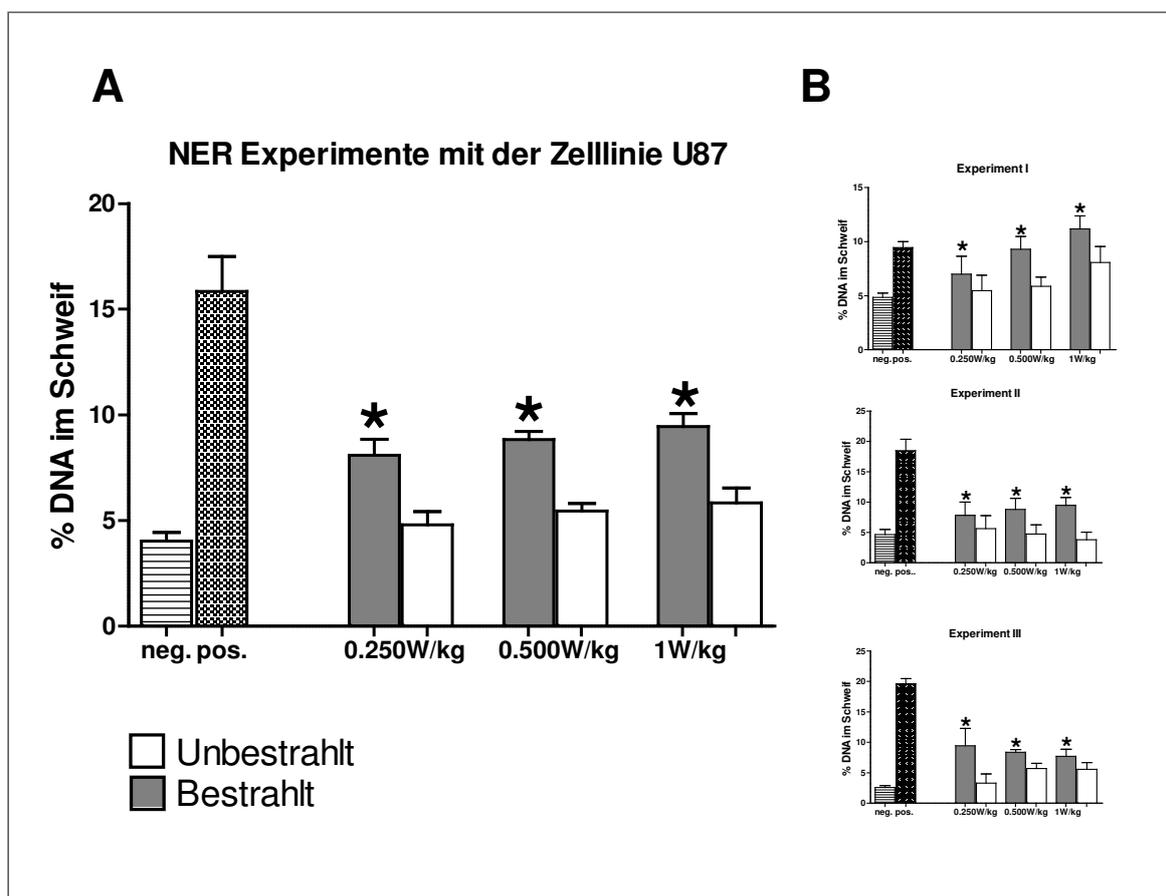


Abbildung 6.26: NER bei Glioblastom-Zelllinie U87.

UMTS Exposition bei einer SAR von 0,25 bis 1,0 W/kg der Glioblastomzellen und einer Expositionsdauer von 16 Stunden. % *DNA im Schweif* der Reporterzellen (HepG2 Zellen) inkubiert mit Proteinextrakt der bestrahlten und unbestrahlten Glioblastom-Testzellen. (Gesamtergebnis - A, Ergebnisse dreier unabhängiger Einzelerperimente - B). Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse zur Negativkontrolle (Puffer) und Positivkontrolle (Endo IV-Vorbehandlung). Die Balken geben die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Die Abbildung 6.27 zeigt den Effekt von EMF induzierten NER-Proteinen in der zweiten Glioblastom-Zelllinie U251.

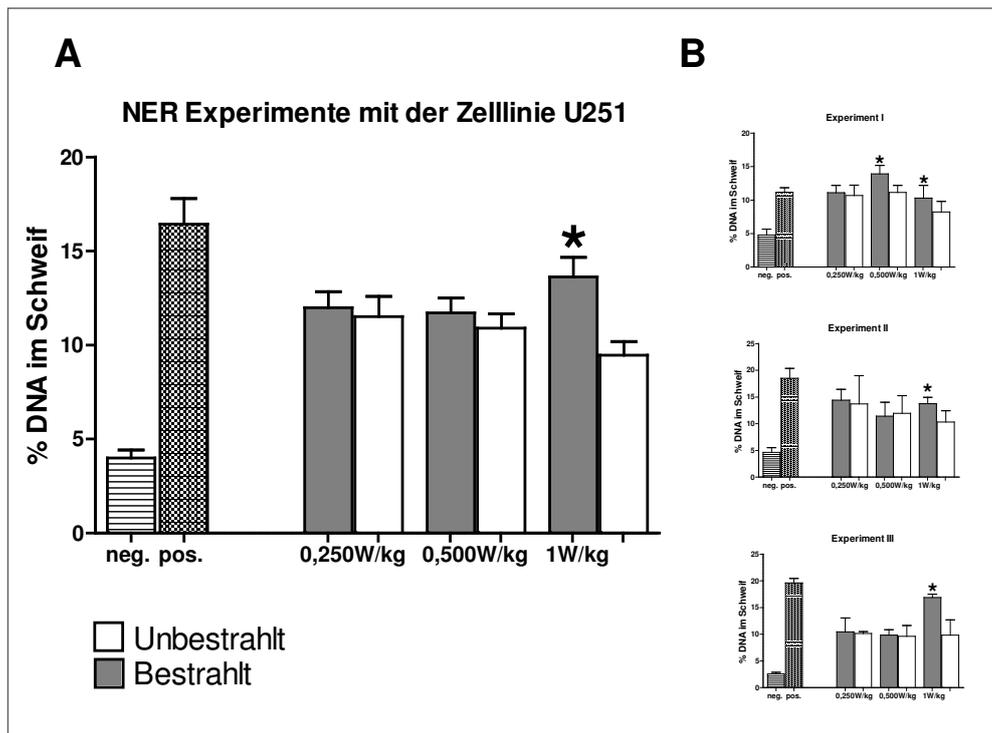


Abbildung 6.27: NER bei Glioblastom-Zelllinie U251. UMTS Exposition bei einer SAR von 0,25 bis 1,0 W/kg der Glioblastomzellen und einer Expositionsdauer von 16 Stunden. % DNA im Schweif der NER Reporterzellen (HepG2 Zellen) inkubiert mit Proteinextrakt der bestrahlten und unbestrahlten Glioblastom-Testzellen. (Gesamtergebnis A, Ergebnisse dreier unabhängiger Einzelversuche B). Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse der Negativkontrolle (Puffer) und Positivkontrolle (Endo IV-Vorbehandlung). Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Bei den Experimenten mit der Glioblastom-Zelllinie U87 ergab sich bei allen drei Intensitäten der UMTS-Exposition eine signifikant höhere Tailintensität bei den Reporterzellen, die mit Proteinen der bestrahlten Zellen inkubiert wurden. Auch bei der Zelllinie U251 war bei allen Expositionen die Tailintensität der Reporterzellen, die mit den Proteinen der bestrahlten Zellen behandelt wurden, höher. Statistisch signifikant war es nur bei der höchsten Intensität (SAR 1,0 W/kg). Demgemäß ergab auch die Gesamtauswertung mittels Varianzanalyse bei beiden Zelllinien einen signifikanten Expositionseffekt.

Tabelle 6.42: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) der Daten zur expositionsbedingten NER Aktivität. U87 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert bei 0,25, 0,5 und 1,0 W/kg SAR und darauf folgender Inkubation der HepG2 Reporterzellen mit deren Proteinextrakt.

Quelle der Varianz	FG1/FG2	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/48	2,873	0,066	Tendenz
Exposition	1/48	48,378	<0,001	hoch signifikant
SAR * Exposition	2/48	0,088	0,916	n.s.

Tabelle 6.43: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) der Daten zur NER Aktivität. U251 Glioblastom-Zelllinie, 16 Stunden UMTS exponiert bei 0,25, 0,5 und 1,0 W/kg SAR und darauf folgender Inkubation der HepG2 Reporterzellen mit deren Proteinextrakt.

Quelle der Varianz	FG1/FG2	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/48	0,092	0,913	n.s.
Exposition	1/48	6,479	0,014	signifikant
SAR * Exposition	2/48	2,416	0,100	n.s.

### Ergebnisse zur BER Aktivität

Die Resultate beider Zelllinien sind summarisch in der Abbildung 6.28 dargestellt.

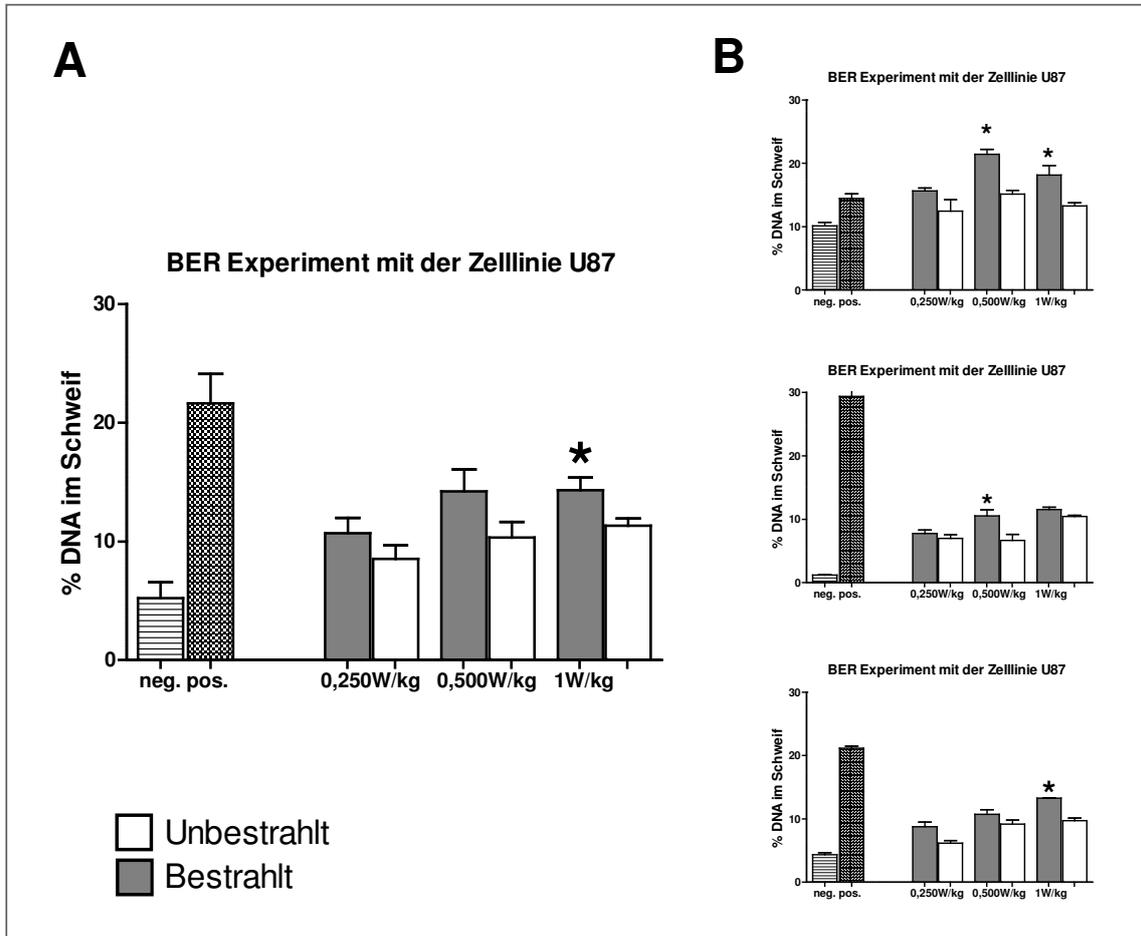


Abbildung 6.28: BER - Reparatursystem: Glioblastom-Zelllinien U87.

UMTS Exposition bei einer SAR von 0,25 bis 1,0 W/kg der Glioblastomzellen und einer Expositionsdauer von 16 Stunden. Tailintensität der BER Reporterzellen (HepG2 Zellen) inkubiert mit Proteinextrakt der bestrahlten und unbestrahlten Glioblastom-Testzellen (Gesamtergebnis A, Ergebnisse dreier unabhängiger Einzelversuche B). Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse der Negativkontrolle (Puffer) und Positivkontrolle (Endo IV). Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

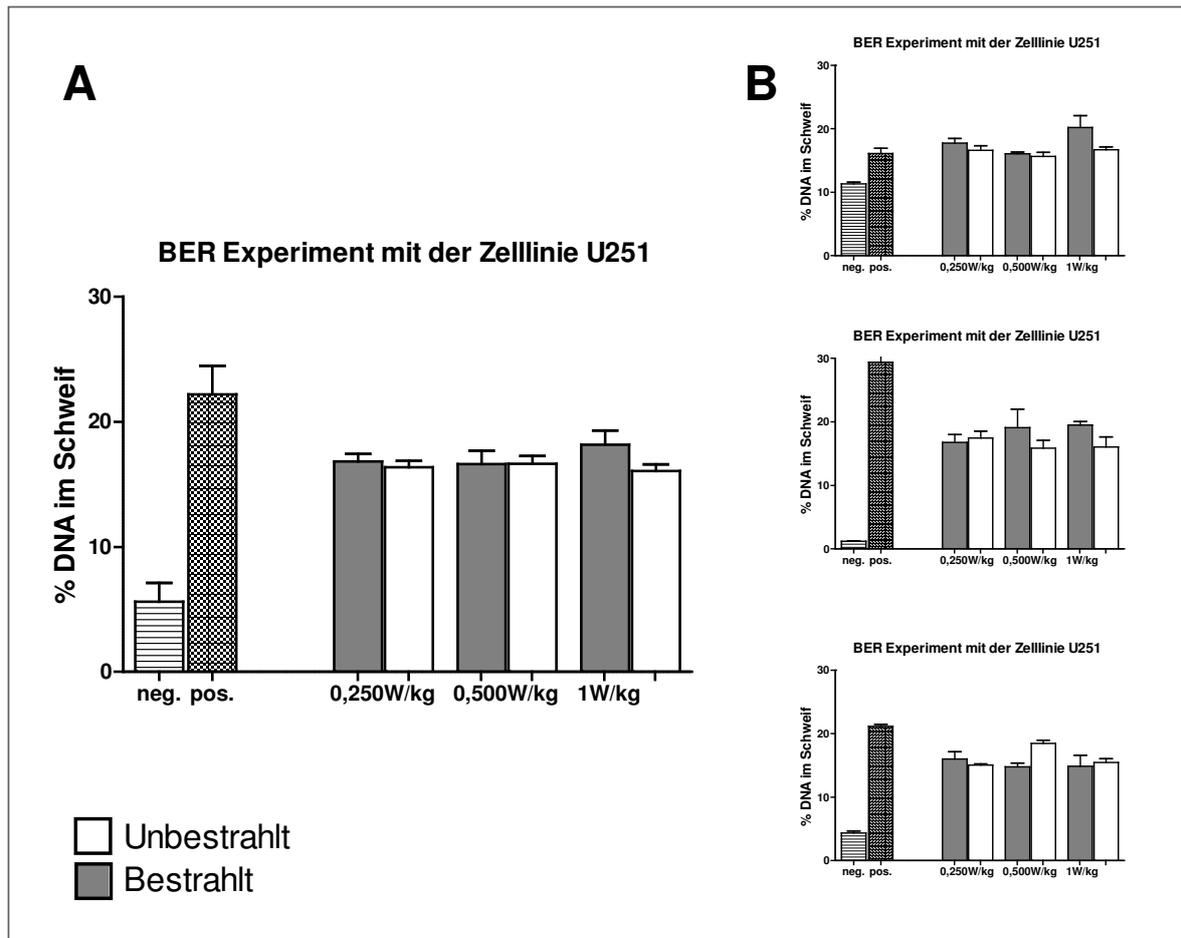


Abbildung 6.29: BER – Reparatursystem: Glioblastom-Zelllinien U251  
UMTS Exposition bei einer SAR von 0,25 bis 1,0 W/kg der Glioblastomzellen und einer Expositionsdauer von 16 Stunden. Tailintensität der BER Reporterzellen (HepG2 Zellen) inkubiert mit Proteinextrakt der bestrahlten und unbestrahlten Glioblastom-Testzellen (Gesamtergebnis A, Ergebnisse dreier unabhängiger Einzelversuche B). Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse der Negativkontrolle (Puffer) und Positivkontrolle (Endo IV). Die Balken geben die Mittelwerte und Standard-Abweichungen von drei Parallelmessungen an. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Die Untersuchung der BER Aktivität in den HepG2 Reporterzellen ergab bei Einsatz der Proteine der U87 Glioblastomzellen einen signifikanten Expositionseffekt bei einer SAR von 1,0 W/kg. Ebenfalls signifikant war bei der Gesamtprüfung durch Varianzanalyse der Faktor Exposition (Tabelle 6.44). Darüber hinaus wurde bei Einsatz des Proteinextrakts der U87 Glioblastomzellen ein signifikanter Dosisseffekt ermittelt.

Auch nach Exposition bei einer SAR von 1,0 W/kg und Einsatz des Proteinextrakts der exponierten (bestrahlten) U251 Glioblastomzellen ergaben sich deutlich aber statistisch nicht signifikant höhere Tailintensitäten der HepG2 Reporterzellen (Abbildung 6.28 und Tabelle 6.45).

Tabelle 6.44: BER-Reparatursystem, U87 Glioblastom-Zellen wurden 16 Stunden UMTS exponiert (0,25, 0,5 & 1,0 W/kg SAR) oder scheinexponiert; dann wurden die Proteine extrahiert und die HepG2 Reporterzellen mit den Extrakten inkubiert. Bei dieser Vorbehandlung reflektiert das Ergebnis der Comet Assays die Menge und/oder Aktivität der BER Reparaturproteine in Real- und Schein-exponierten Glioblastomzellen.

Quelle der Varianz	FG1/FG2	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/48	22,260	<0,001	hoch signifikant
Exposition	1/48	25,721	<0,001	hoch signifikant
SAR * Exposition	2/48	0,268	0,766	n.s.

Tabelle 6.45: BER-Reparatursystem, U251 Glioblastom-Zellen wurden 16 Stunden UMTS exponiert (0,25, 0,5 & 1,0 W/kg SAR) oder scheinexponiert; darauf wurden die Proteine extrahiert und die HepG2 Reporterzellen mit den Extrakten inkubiert.

Quelle der Varianz	FG1/FG2	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
SAR	2/48	0,388	0,680	n.s.
Exposition	1/48	1,257	0,267	n.s.
SAR * Exposition	2/48	1,069	0,351	n.s.

### Zusammenfassung der Ergebnisse zur DNA Reparatur

Die Experimentserie zur Frage des Einflusses der UMTS Exposition im Bereich von 0,25 bis 1,0 W/kg SAR ergab klare Hinweise auf eine Induktion von Reparaturenzymen insbesondere der Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Die U87 Glioblastomzellen zeigten deutlich stärkere Effekte als die Zelllinie U251. Das steht im Einklang mit den anderen in den vorangegangenen Experimenten dargestellten Ergebnissen zu diesen Zelllinien. Zur Basenexzisionsreparatur (BER) weisen die Ergebnisse ebenfalls auf eine expositionsabhängige Induktion dieses Reparaturpfads hin, aber dieser Befund erreichte erst bei höheren SAR-Werten statistische Signifikanz.

### 6.3.9 Mikrokerne *in vitro*

Die bisherigen Befunde zeigten, dass die EMF-Exposition insbesondere in vorbelasteten (gestressten) Zellen zu DNA Läsionen führen kann. Weil aber in Abschnitt 6.3.8 gezeigt wurde, dass die Exposition der Zellen auch die Menge oder Aktivität spezifischer Proteine der DNA Reparatur erhöht, ist es naheliegend zu untersuchen, ob die mittels Comet Assay ermittelten DNA Brüche repariert werden, oder alternativ dazu führen, dass es zu bleibenden Chromosomenschäden kommt.

Für die Untersuchung von expositionsbedingten Chromosomenschäden durch **Kleinkern-Analyse** wurden zwei Zelllinien herangezogen

- Glioblastom-Zelllinie U87
- Glioblastom-Zelllinie U251.

Als positive Kontrolle wurde Behandlung mit Mitomycin C (0,01µg/ml, Sigma-Aldrich Chemicals Co., USA) über 16 Stunden hinzugefügt.<sup>[98, 100]</sup>

Die Zellen wurden standardmäßig (37° C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre, gesättigte Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Die Exposition erfolgte folgendermaßen:

- UMTS Signal
- SAR: 3 Stufen
  - SAR 0,25 W/kg,
  - SAR 0,50 W/kg,
  - SAR 1,00 W/kg

Es wurden je Expositionsbedingung zwei unabhängige Experimente mit 16-stündiger UMTS Bestrahlung durchgeführt.

### Kleinkern-Analyse in den Zelllinien U87 und U251

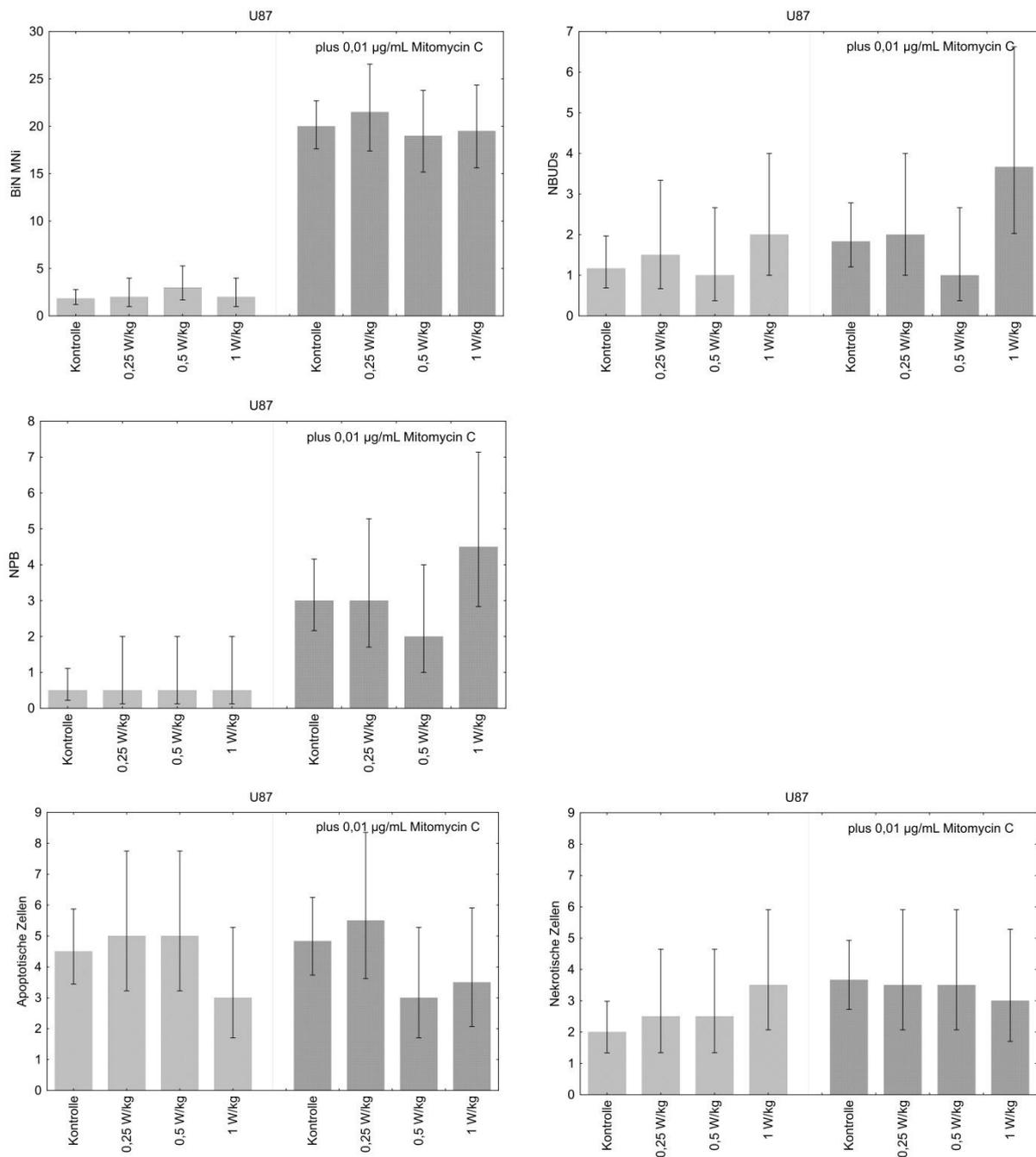


Abbildung 6.30: U87 Glioblastom-Zelllinie, Anzahl zellulärer Anomalien, bei jeweils 1000 ausgezählten Zellen, unbestrahlte Zellen (Kontrolle) und solche die mit einer SAR von 0,25 bis 1,0 W/kg 16 Stunden lang exponiert waren, mit und ohne Koexposition zu 0,01 µg/mL Mitomycin-C als Positiv-Kontrolle. Ausgewertet wurden Kleinkerne in binukleären Zellen (BiN-MN), nukleare Knospen (NBUDs), nukleare Brücken (NPB), apoptotische und nekrotische Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle.

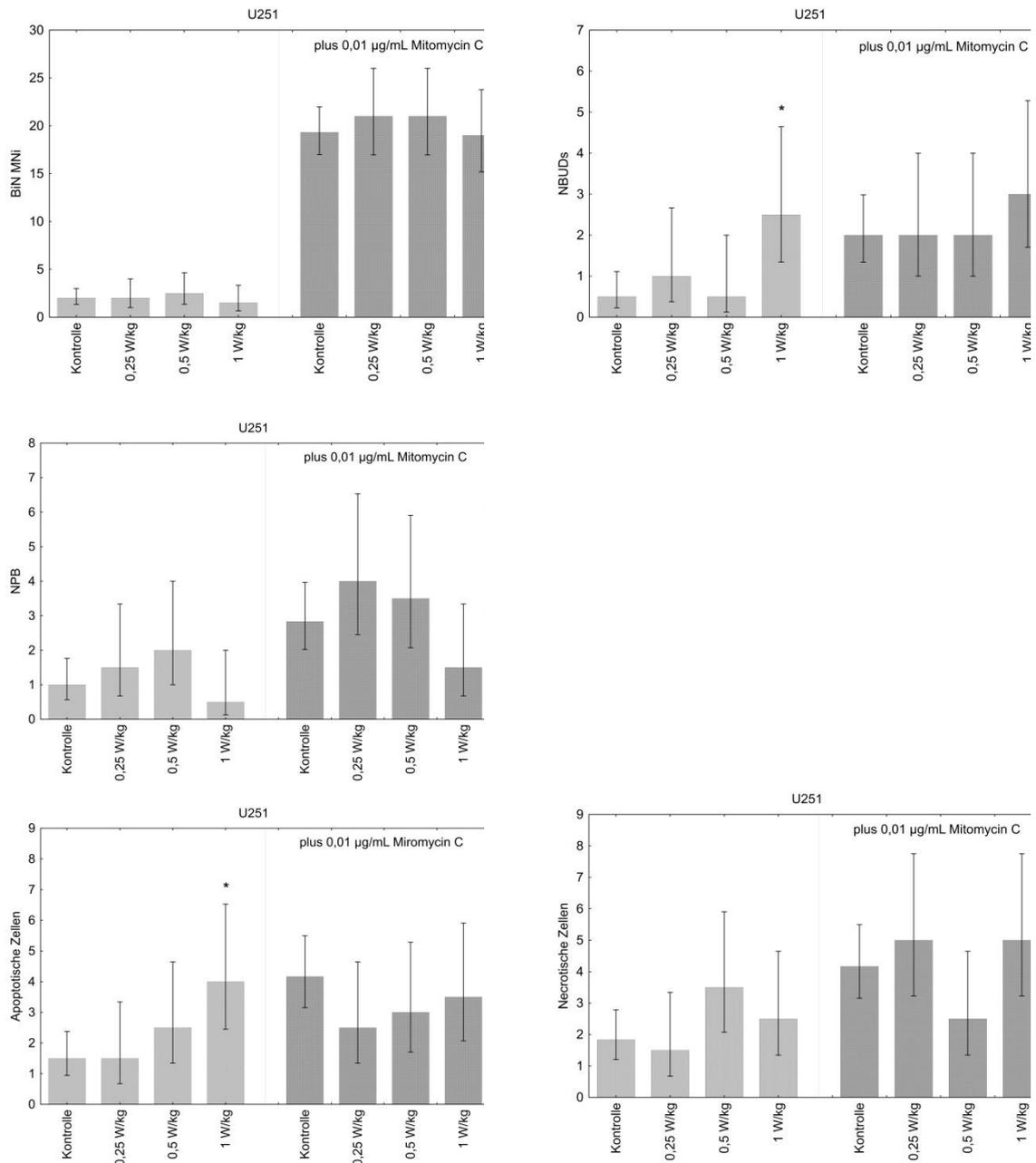


Abbildung 6.31: U251 Glioblastomzelllinie, Anzahl zellulärer Anomalien, bei jeweils 1000 ausgezählten Zellen; unbestrahlte (Kontrollen) und mit einer SAR von 0,25 bis 1,0 W/kg SAR 16 Stunden UMTS-bestrahlte Zellen mit und ohne Koexposition mit 0,01 µg/mL Mitomycin-C. Ausgewertet wurden Kleinkerne in binukleären Zellen (BiN MN), nukleare Knospen (NBUDs), nukleare Brücken (NPB), apoptotische und nekrotische Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit ★ markiert.

Für die statistische Auswertung der zellulären Anomalien wurde zum Unterschied zu der Vorgangsweise beim Comet Assay das verallgemeinerte lineare Modell (GLM) für Poisson-verteilte Variablen und einem log-Link (d.h. der Annahme, dass der Logarithmus des Parameters der Poisson-Verteilung eine lineare Funktion der unabhängigen Variablen ist) angewendet.

Es zeigte sich, dass mit zwei Ausnahmen zwischen den UMTS exponierten und nicht exponierten Zellen kein Unterschied in der Häufigkeit zellulärer Anomalien bestand (Tabelle 6.46).

Tabelle 6.46: U87 und U251 Glioblastomzellen; 16 Stunden UMTS exponiert (0,25, 0,5 oder 1,0 W/kg) bzw. scheinexponiert; jeweils mit oder ohne Zugabe von Mitomycin C (0,01 µg/mL) ins Kulturmedium; als Endpunkt wurde die Häufigkeit verschiedener Anomalien erhoben [nekrotische Zellen, apoptotische Zellen, Kleinkerne (BIN MN), nukleare Knospen (NBUDs) und nukleare Brücken (NPB)]. Die statistische Prüfung erfolgte mittels verallgemeinertem linearem Modell (Prüfgröße: Wald Chi<sup>2</sup> bei 3 Freiheitsgraden (FG) und zugehörigem p-Wert).

Zelllinie	Mitomycin-C	Endpunkt	Wald Chi <sup>2</sup> (FG=3)	p-Wert	Signifikanz
U87	Ohne	Nekrotische Zellen	2,77	0,428	n.s.
U87	Mit	Nekrotische Zellen	0,38	0,944	n.s.
U251	Ohne	Nekrotische Zellen	4,75	0,191	n.s.
U251	Mit	Nekrotische Zellen	3,89	0,273	n.s.
U87	Ohne	Apoptot. Zellen	2,41	0,491	n.s.
U87	Mit	Apoptot. Zellen	4,04	0,257	n.s.
U251	Ohne	Apoptot. Zellen	9,35	0,025	signifikant
U251	Mit	Apoptot. Zellen	2,79	0,424	n.s.
U87	Ohne	BIN MN	1,97	0,580	n.s.
U87	Mit	BIN MN	0,70	0,873	n.s.
U251	Ohne	BIN MN	0,99	0,804	n.s.
U251	Mit	BIN MN	0,84	0,840	n.s.
U87	Ohne	NPB	0,00	1,000	n.s.
U87	Mit	NPB	4,05	0,256	n.s.
U251	Ohne	NPB	4,24	0,237	n.s.
U251	Mit	NPB	4,64	0,200	n.s.
U87	Ohne	NBUDs	1,95	0,582	n.s.
U87	Mit	NBUDs	6,04	0,110	n.s.
U251	Ohne	NBUDs	11,64	0,009	Hoch signifikant
U251	Mit	NBUDs	1,52	0,678	n.s.

## 6.4 ZUSAMMENFASSUNG: *IN VITRO* GENTOXIKOLOGIE

Dieses Teilprojekt fokussierte auf *in vitro* Untersuchungen, um Befunde aus dem ATHEM-1-Projekt nachzuuntersuchen. Nachdem sich in der ersten Experimentserie bestätigte, dass es sensible und nicht-sensible Zellen gibt, war es naheliegend auf die zu Grunde liegenden Mechanismen einzugehen.

Eine zentrale Fragestellung war: „Wie können schwache elektromagnetische Felder (HF-EMF) zu DNA-Brüchen führen?“ und „Welche Rolle spielt die zelleigene DNA-Reparatur?“

Methodisch kam der sogenannte Standard-Comet-Assay zur Anwendung. Je nach Fragestellung wurde die Vorbehandlung der Zellen modifiziert. Für die Frage nach oxidativer Veränderung der DNA wurden die exponierten Zellen mit den läsionsspezifischen Enzymen FPG oder Endo-III vorbehandelt. Um festzustellen, ob die gefundenen oxidativen Veränderungen in der DNA zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikale im Allgemeinen führen, wurden Zellen einer Vorbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoff-Peroxid) ausgesetzt. Nach den Expositionsexperimenten, Vorbehandlungen und nach der Durchführung der Comet-Assays wurden die Erhebungen computerassiiert durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse der ersten Experimentserie wurden drei weitere Glioblastom-Zelllinien in das Untersuchungsprogramm aufgenommen. Von diesen drei Zelllinien fand sich bei zwei letztlich keine Empfindlichkeit gegenüber HF-EMF Exposition, während bei einer Glioblastom-Zelllinie expositionsbedingte Effekte auftraten.

Zur Frage, ob die Empfindlichkeit von der Expositionsdauer abhängt, zeigte sich, dass bei 6 Stunden Exposition keine signifikanten DNA-Veränderungen auftraten. Unter Serum-Entzug, also unter stressenden Bedingungen, bestätigte sich, dass Stress die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber HF-EMF verstärkt.

Bereits nach einer Stunde Erholungszeit waren DNA-Brüche allerdings erheblich reduziert. Wie schon im Report des ATHEM-1 Projektes beschrieben, waren nach zwei Stunden Erholung die festgestellten DNA-Brüche nicht mehr messbar.

Um zu untersuchen, ob es bereits nach einer akuten Exposition bereits zur Ausbildung von Mikrokernen kommt (Hinweis auf akute permanente DNA-Schädigung) führten wir ein Kleinkern-Experiment durch und stellten fest, dass eine einmalige 16 stündige Exposition zu keinen bleibenden DNA-Schäden führt.

Zusammenfassend hat sich in diesem Teil-Projekt bestätigt, dass es einerseits Zelllinien gibt, die gegenüber der Exposition zu HF-EMF nicht sensibel reagieren, aber andererseits auch sensible Zellen welche nach längerer Exposition DNA-Läsionen aufweisen. Die weiterführende Untersuchung mit den empfindlichsten Zellen erbrachte Hinweise auf die Rolle der DNA-Oxidation als Läsionsmechanismus. Auch zeigte sich, dass bei diesen Zellen unter Exposition von UMTS Signalen die Bildung von speziellen Proteinen zu DNA-Reparatur aktiviert wird.

## 7 PROJEKT-ZUSAMMENFASSUNG DES KOORDINATORS

Ao. Univ.Prof. Dr. Wilhelm Mosgöller

So wie beim Vorgängerprojekt ATHEM-1 wurde bei ATHEM-2 systematisch untersucht, ob - und welche - Folgen nach Exposition von Zellen mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) des Mobilfunks auftreten. Wie zuvor fanden wir unempfindliche und empfindliche Zelllinien und analysierten in empfindlichen Zelllinien die zellulären Mechanismen hinter den gefundenen DNA-Läsionen (DNA-Schäden).

Zwei Mechanismen, die expositionsbedingte DNA-Läsionen erklären zeichnen sich ab. Erstens: oxidative DNA-Schäden, sowie zweitens: Interaktion mit der zelleigenen DNA-Reparatur. Die Projekt-Ergebnisse können Widersprüche in der Literatur – nämlich dass expositionsbedingte DNA-Läsionen gefunden wurden oder auch nicht - als scheinbar erklären.

### 7.1 EXPOSITIONSANLAGE FÜR DOPPELT VERBLINDETE HUMAN-EXPOSITION

Um die *in vitro* Messergebnisse auch *in vivo* am Menschen zu überprüfen, wurden parallel zu den Laboruntersuchungen freiwillige Probanden mit der gleichen Art von HF-EMF (einem UMTS Mobilfunk-Signal) exponiert wie die Zellen *in vitro*. Die Anlage für die doppelt verblindete Probanden-Exposition stammt aus dem Forschungszentrum Seibersdorf (siehe Abschnitt 0). Sie wurde für Untersuchungen mit den höchst möglichen wissenschaftlichen Standards für objektive Untersuchungen gerüstet. Exposition und Auswertung erfolgten prospektiv, randomisiert, kontrolliert, und doppelt blind. Weder der Proband noch Versuchsleiter oder Probenanalytiker wussten über die aktuelle Situation (exponierte Seite, Höhe der Dosis) Bescheid.

Die Signalintensität wurde für die möglichst exakte Exposition der Epithelzellen in der Wangenschleimhaut berechnet. Es war dadurch möglich die Expositionsintensitäten auf die Mundhöhlenzellen abzustimmen und Expositionsbedingungen zu wählen, wie sie beim Telefonieren mit dem Mobiltelefon an der Schläfe unter den darunter liegenden Geweben vorkommen. Der Vergleich der Zellproben auf der linken und rechten Wangenschleimhaut vor und nach der Exposition erlaubt den direkten Rückschluss auf Effekte elektromagnetischer Feldexposition bei den Zellen der Mundschleimhaut.

Die wesentlichsten Qualitätsmerkmale der Expositionsanlage waren die technisch maximal erreichbare Qualität der Dosimetrie und einer Validierung der Expositions-Antenne. Für die Berechnung der Signalstärke wurden anatomische Gewebemodelle miteinbezogen. Um die doppelt blinde Exposition zu wahren, wurden die Expositionsdaten so lange unter Verschluss gehalten, bis die biologischen Experimente ausgewertet waren.

## 7.2 KOGNITIVE EFFEKTE

Im Zuge der Exposition der freiwilligen Probanden bot sich die Gelegenheit die Untersuchung kognitive Auswirkungen der Exposition durch standardisierte Tests, wie sie bereits im ATHEM-1 Projekt erfolgt sind zu wiederholen. Während die Probanden mit definierten UMTS Signalen an der Wange exponiert wurden, erfolgte unweigerlich auch eine geringe Exposition von Gehirnregionen. Während der Exposition wurden einfache und komplexere so genannte Wahl-Reaktionstests, ein Wahrnehmungs-Reaktionstest, eine standardisierte Testserie zur Messung der Vigilanz, ein Gedächtnistest, und eine Eigenzustandsskalierung (also eine subjektive Einschätzung des eigenen Zustands) vorgenommen. Die statistische Auswertung dieser Tests konzentrierte sich auf die Reaktionszeit und die Richtigkeit der Reaktionen während der Exposition.

Es bestätigten sich wesentliche Befunde aus dem ATHEM-1 Projekt. Es zeigte sich eine Tendenz dahingehend, dass die Reaktionszeit unter der HF-EMF Exposition sich verringerte, allerdings um den Preis, dass die Fehlerrate zunahm. Die unter Exposition verkürzte Reaktionszeit steht im Einklang mit international publizierten Untersuchungen. Dies könnte oberflächlich betrachtet sogar als günstiger Effekt gedeutet werden, was allerdings durch die qualitative Verschlechterung der Probandenentscheidungen aufgrund der Exposition zu HF-EMF relativiert wird.

Übertragen auf den Arbeitsalltag bedeuten diese Ergebnisse, dass Vermeiden von Telefonieren während des Autolenkens oder Bedienens einer Maschine durchaus sinnvoll ist. Die Ergebnisse sind relevant für jede Art von Beschäftigung und Situationen bei denen Reaktionszeit und Reaktionsqualität eine Rolle spielen.

## 7.3 HUMANEXPERIMENTE ZUR GEN- UND ZYTOTOXIZITÄT

Die exponierten Probanden spendeten vor der Exposition sowie zwei und drei Wochen nach der Expositionsphase Mundhöhlenzellen für Labor-Analysen.

Während beim normalen Gebrauch von Mobilfunkgeräten die Exposition der Mundschleimhaut eher unbekannt ist, wurde für diese spezifische Projekt-Fragestellung die Expositionsanlage so konstruiert, dass die Exposition der Mundschleimhautzellen in der Mundhöhle möglichst genau bestimmt war.

Die Zellen, welche vor und nach der Exposition von der linken und rechten Wangenseite entnommen wurden, kamen zur zytogenetischen und zytotoxischen Labor-Analyse. Zum Zeitpunkt der Exposition und der Laboranalysen war unbekannt, ob der Zufallsgenerator die linke oder rechte Wangenseite für die Exposition auswählte. Unterschiede zwischen den Zellproben vor und nach der Exposition auf der unbestrahlten Seite sind ein Maß für die natürliche Variabilität in diesem Experiment. Hingegen sind Unterschiede auf der bestrahlten Seite die über die natürliche Variabilität hinausgehen ein Hinweis auf den Effekt der Bestrahlung.

Im Gegensatz zu ähnlichen bisher publizierten Untersuchungen bei denen unterschiedlich große Probandenzahlen analysiert wurden, handelte es sich bei dieser Untersuchung um eine prospektiv geplante, randomisierte Studie. Zum Zeitpunkt der

Experimentplanung gab es wenige Arbeiten mit ähnlicher Fragestellung, diese wurden herangezogen um eine klassische Experimentplanung mit geplanter Studiengröße und sogenannter Studien-Mächtigkeit vorzunehmen. Bei den publizierten Feld-Studien fanden sich eine Reihe von Unsicherheiten die man unter kontrollierten Versuchs-Bedingungen umgehen kann. Eine der vermiedenen Unsicherheiten liegt darin, dass bei den meisten Mobiltelefonen nicht bekannt ist, welche Strahlungsintensität bei den später untersuchten Zellen tatsächlich ankam, und man darauf angewiesen ist, das Telefonverhalten der untersuchten Personen nach subjektiver Einschätzung zu erfragen.

Die vorliegenden Untersuchungen zu Kern- und Zellanomalien nach Exposition mit elektromagnetischen Feldern sind bedeutend, weil nicht nur Veränderungen am Zellkern sondern der ganzen Zelle erfasst werden. Dabei wird unter anderem erfasst, ob ein Teil der DNA-Läsionen nicht mehr repariert wird und zu bleibenden Veränderungen des Genoms und des Zellkernes führt. Solche Ergebnisse würden also einen Zellschaden darstellen, den die Zelle nicht mehr reparieren kann.

Bei der statistischen Analyse des Unterschiedes vor und nach der Exposition (bzw. exponierte und nicht exponierte Seite) bietet es zusätzliche Information, wenn man konsistente Unterschiede in Abhängigkeit der Intensität gewinnt. Ein weiterer methodischer Ansatz waren die Tagebuchaufzeichnungen der Versuchspersonen. Sucht man kumulative Effekte und analysiert, ob die zufällige vom Computer gewählte Expositionsseite mit der bevorzugten Kopf-Seite des Handy-Gebrauchs zusammenfällt, so fanden sich diskrete Hinweise, dass die Exposition auf der bevorzugten Seite von Vieltelefonierern eine höhere Rate an Zellveränderungen verursacht als auf der gegenüberliegenden Seite.

Die Ergebnisse der zytogenetischen und zytotoxischen Untersuchungen zeigen insgesamt ein Bild der Beeinflussung von zellulären Vorgängen auch *in vivo*. Die Beobachtung, dass die expositionsbedingten Effekte bei Vieltelefonierern stärker zutage treten, weist darauf hin, dass die expositionsbedingten Zellveränderungen sich im Laufe der Zeit addieren (akkumulieren) können. Dieser Hinweis bedarf jedoch noch einer Bestätigung in einer die Fragestellung direkt reflektierenden Studie.

## **7.4 DNA LÄSIONEN UND MECHANISMEN**

Das umfangreichste Teilprojekt des vorliegenden ATHEM-2 Forschungsprogrammes befasste sich mit genetischen Veränderungen und gentoxikologischen Auswirkungen der Exposition von Zellen *in vitro*. Bereits lange vor Projektbeginn war in der internationalen Literatur beschrieben, dass Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern, auch bei Intensitätsniveaus im athermischen Bereich, mit DNA-Läsionen korrelieren kann.<sup>[4]</sup>

### **7.4.1 Es gibt sensitive und nicht sensitive Zellen**

Beim ATHEM-1 Projekt zeigte sich, dass es bezüglich der DNA-Läsionen empfindliche Zellen gibt, also solche die auf HF-EMF Exposition reagieren. Darüber hinaus existieren Zelllinien welche auf die Exposition mit elektromagnetischen Feldern nicht

reagieren <sup>[6]</sup>. Expositionsbedingte DNA-Brüche wurden allerdings nicht nur an Zellen *in vitro* beobachtet sondern auch an exponierten Tieren *in vivo*.<sup>[101, 102]</sup>

Um ein Schlüsselergebnis aus dem ATHEM-1 Projekt noch einmal zu beleuchten wurden in einer ersten Experimentserie fünf Zelllinien *in vitro* untersucht. Auch wenn die expositionsbedingten DNA-Läsionen bei den ATHEM-2 *in vitro* Untersuchungen durchgehend geringer ausfielen, bestätigte sich der Befund aus dem Vorprojekt, dass es empfindliche und nicht empfindliche Zellen gibt (siehe Abschnitt 6.3.1). Da eine Glioblastom-Zelllinie (Hirntumorzellen) unter den empfindlichen Zellen war, wurden drei weitere Glioblastom-Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass die Empfindlichkeit bei sensiblen Zellen zwar reproduzierbar ist, aber nicht alle Glioblastom-Zelllinien gleichermaßen empfindlich sind (siehe Abschnitt 6.3.2).

#### 7.4.2 Zeitschwelle

Die *in vitro* Experimente zeigten, dass DNA-Läsionen erst auftreten wenn die Exposition über längere Zeit einwirkt. Bei der kürzesten angewandten Expositionsdauer (6 Stunden) fanden sich keine HF-EMF expositionsbedingten Wirkungen (Tabelle 6.22 bis Tabelle 6.25). Verlängert man allerdings die Expositionsdauer treten expositionsbedingt sigifikante Wirkungen auf (Tabelle 6.27, Tabelle 6.28, Tabelle 6.31, Tabelle 6.32).

Allein die Existenz einer Latenzzeit, also einer Zeitspanne zwischen Beginn der Exposition und Auftreten von DNA-Läsionen, ist ein klares Indiz dafür, dass den beobachteten DNA-Läsionen unter EMF-Exposition ein anderer zellulärer Mechanismus zu Grunde liegt als der Wirkung von radioaktiver Bestrahlung. Die Existenz einer Latenzzeit kann widersprüchliche Befunde der Vergangenheit als scheinbar erklären, wenn nur kurze Expositionszeiten untersucht werden. Die Latenzzeit bei HF-EMF Exposition betrug je nach Untersuchungsmodell zwanzig Minuten,<sup>[9]</sup> 2 oder 4 Stunden,<sup>[7]</sup> oder 16 Stunden.<sup>[8]</sup> Unsere aktuellen Beobachtungen (Abschnitt 6.3.4) reihen sich in diese bisher publizierten Befunde ein.

#### 7.4.3 Oxidative DNA-Läsionen

Weiterführende Untersuchungen erbrachten klare Hinweise dahingehend, dass die Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern die Oxidationsrate der DNA bei einigen aber nicht bei allen Zelllinien erhöht (siehe Abschnitt 6.3.1). Oxidierte DNA gilt als DNA-Läsion, und ist ein bekannter Faktor der DNA-Strangbrüche begünstigt. Dieser Projekt-Befund, aber auch eine Fülle von mittlerweile international publizierten Untersuchungen bestätigen, dass expositionsbedingte DNA-Brüche nicht durch direkte Einwirkung zu Stande kommen, sondern über den indirekten Mechanismus der DNA-Oxidation, welche die DNA-Stränge „brüchig“ macht. Yakymenko *et al.* (2015)<sup>[103]</sup> beschreiben in einer zusammenschauenden Übersichts-Publikation (Review), dass EMF Exposition zu oxidativen Vorgängen in den Zellen führt. Von 100 Studien die oxidative Effekte nach Exposition zu niedrig dosierten EMF untersuchten beschrieben 93 einen Zusammenhang. Die in diesem Projekt beobachtete expositionsbedingte DNA-Oxidation erklärt plausibel, warum Felder, die eigentlich zu

schwach sind chemische Bindungen zwischen DNA-Bausteinen zu lösen dennoch zu einer erhöhten DNA-Bruchrate führen können.

#### **7.4.4 Dosis-Wirkungsbeziehung**

Es ist bisher nicht gelungen einen sogenannten SAR-Schwellenwert bei Langzeit-Exposition zu finden. Vereinzelt Hinweise auf stärkere Effekte bei der niedrigen und/oder der hohen Expositionen traten nicht konsistent auf. Die expositionsbedingten DNA-Läsionen zeigten keine klare Dosis-Wirkungsbeziehung.

#### **7.4.5 Rolle der Zellaktivität**

Für die Untersuchung der Rolle von metabolischer Zellaktivität, aber auch um die Wirkung von kombinierten Umwelteinflüssen zu untersuchen wurden die Zellen durch Serumentzug einem experimentell erzeugten Zellstress ausgesetzt und dann mit HF-EMF exponiert. Serumentzug bedeutet für die Zellen eine Situation in der die Synthese von Faktoren angeregt wird, die normalerweise durch das Nährmedium zur Verfügung gestellt werden. Die Folge ist eine experimentell gesteigerte Syntheseaktivität (metabolische Aktivität), die auch eine Art Stress für die Zelle bedeutet.

Die Kombination von Zellaktivierung durch Serumentzug (Zellstress) und der Exposition mit HF-EMF, führte konsistent zur erhöhten Empfindlichkeit gegenüber der Exposition. In 34 von 36 Einzelexperimenten lag die DNA-Läsionsrate nach HF-EMF-Exposition über der von den scheinexponierten Zellen. Bereits beim ATHEM-1 Projekt fanden sich Hinweise dahingehend, dass eine Zellaktivierung die Empfindlichkeit gegenüber HF-EMF Exposition erhöht. Während ruhende Lymphocyten unter HF-EMF Exposition unverändert blieben, reagierten aktivierte Lymphocyten mit einer diskreten Erhöhung der Proteinsyntheserate<sup>[7]</sup>.

Diese Beobachtungen könnten für Kinder und Jugendliche relevant sein, da deren Organismus einen höheren Anteil an metabolisch aktiven Zellen enthält. Aus der höheren noch erwartbaren Lebensdauer ergeben sich daher weitere Argumente für Vorsorgemaßen, um mögliche Langzeitriskien für diese Personengruppen zu minimieren.

#### **7.4.6 Wirkverstärkung, synergistische Effekte**

Die Zusammenschau von Ergebnissen aus den Jahren 1995 und 1996<sup>[3, 4]</sup> und deren Replikationsversuche<sup>[104]</sup> begründen den Hinweis, dass bei Labor-Ratten bestimmte Narkosemittel mit HF-Exposition zusammenwirken um die DNA-Läsionsrate zu erhöhen.

Ein starkes Beispiel für synergistische Wirkung mit HF-EMF liefern die Untersuchungen von Tillmann *et al.* (2010)<sup>[105]</sup> Die Autoren fanden, dass HF-EMF eine Wirk-Verstärkung einer krebserregenden Substanz (Ethylnitrosoharnstoff) bei jenen Labor-Ratten, die mit einer niedrigen Dosis von 4,8 W/m<sup>2</sup> HF-EMF (UMTS-Signal) exponiert waren hervorruft. Diese Untersuchung wurde unabhängig wiederholt<sup>[106]</sup> und bestätigt.

In diesem Kontext ist auch die in ATHEM-2 durchgeführte HF-EMF Exposition von Zellen, die durch Serumentzug in den Zustand von Zellstress versetzt worden sind zu sehen. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Exposition reproduzierbar synergistisch wirkt und DNA-Läsionen verstärkt auftraten (Abschnitt 6.3.5).

#### **7.4.7 Erholungszeit nach Expositionsende**

Franzellitti *et al.* (2010)<sup>[8]</sup> beschreiben, dass die expositionsbedingten DNA-Brüche sich nach ca. zwei Stunden wieder reparieren. Dieses Ergebnis passt stimmig zu einem Befund aus dem ATHEM-1 Projekt. Die dort gefundenen Proteinveränderungen waren ebenfalls zwei Stunden nach Ende der Exposition nicht mehr feststellbar.<sup>[7]</sup> Auch beim aktuellen ATHEM-2 Projekt zeigt sich nun, dass ab Beendigung der Exposition nach ca. zwei Stunden Erholungszeit die DNA-Läsionen nicht mehr messbar sind (siehe Abbildung 6.25).

#### **7.4.8 Rolle der DNA Reparatur**

Um herauszufinden ob HF-EMF in Form eines UMTS-Signals in Glioblastom-Zelllinien die DNA-Reparaturmechanismen beeinflussen kann, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt bei dem zwei Zelllinien zum Einsatz kommen. Die DNA der sogenannten Reporter-Zelllinie wurde kontrolliert vorgeschädigt. Parallel dazu wurde die eigentlich zu untersuchende Zelllinie den HF-EMF (UMTS-Signalen) ausgesetzt. Anschließend wurden aus diesen Zellen sämtliche Proteine extrahiert, sodass sich im Extrakt unter anderem auch die DNA-Reparaturproteine befinden. Behandelt man mit diesem Protein-Extrakt die Reporterzellen, so zeigt sich, dass die Proteinextrakte aus den exponierten Zellen eine signifikant höhere DNA-Reparaturaktivität entfalten. Solcherart ist der wissenschaftliche Nachweis geführt, dass HF-EMF Exposition die zelluläre DNA-Reparatur aktivieren kann.

Dieser Befund kann bedeuten, dass die Zelle einen Schutzmechanismus aktiviert, nachdem die DNA-Läsionen auftreten und „bemerkt“ werden. Es ist aber auch ein stimmiger Nachweis, dass es durch die HF-EMF Exposition tatsächlich zu DNA-Läsionen kam, einfach weil es sich bei der Aktivierung des jeweiligen Reparatursystems um eine sehr spezifische Reaktion auf vorhandene DNA-Läsionen handelt. Das verwendete Experimentssystem erlaubt auch zu messen, welches der spezifischen DNA-Reparatursysteme aktiviert wird, nämlich entweder die Reparatur von DNA-Basen oder die Reparatur von so genannten DNA-Nukleotiden (siehe Abschnitt 6.3.8).

Nach diesen Beobachtungen wurde untersucht, ob es zu bleibenden Schäden der DNA kommt, oder alternativ die aktivierten Reparatursysteme diese verhindern können.

Für diese abschließende Untersuchung wurde der sogenannte Mikrokern Assay angewandt. Dabei werden gezielt Chromosomenfragmente in der Zelle aufgespürt, als Beweis dafür, dass nicht mehr reparierbare Chromosomenschäden vorliegen. Es wurden dafür zwei Glioblastom-Zelllinien 16 Stunden lang mit unterschiedlichen Signalintensitäten exponiert. Bei der statistischen Analyse zeigte sich mit wenigen

Ausnahmen, dass zwischen den UMTS-exponierten und nicht exponierten Proben kein Unterschied in der Häufigkeit von Mikrokernen oder zellulären Anomalien auftrat (Abschnitt 6.3.9). Dieses Ergebnis bedeutet, dass die große Mehrheit der expositionsbedingten DNA-Brüche durch die Zelle repariert werden kann, und dass eine akute Einzel-Exposition kaum oder keine messbare, bleibende DNA-Schäden verursacht.

In diesem Zusammenhang sind allerdings Hinweise auf die Möglichkeit der Akkumulation kleinster aber dauerhafter DNA-Schäden bedeutsam. Sie rechtfertigen Maßnahmen zur Minimierung der Exposition, wie z.B. Empfehlungen zur umsichtigen Nutzung von HF-EMF und Tipps zur Handy-Nutzung, die gemäß einer Präventionsstrategie mögliche Langzeitfolgen minimieren sollen.

## **7.5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK**

In diesem Projekt sind sowohl bei den Untersuchungen zu Kognition wie auch zellbiologisch betrachtet signifikante Wirkungen der Exposition gegenüber HF-EMF aufgetreten. Darüber hinaus beobachteten wir wesentliche zelluläre Mechanismen, die die DNA-Läsionen als plausibel bestätigen können. Die wichtigsten Beobachtungen sind:

1. Exposition mit hochfrequenten Feldern kann zu oxidativen Läsionen der DNA führen
2. Es kommen in der Folge hochspezifische Reparaturmechanismen zum Einsatz

Die Expositionsexperimente an freiwilligen Probanden erbrachten Hinweise, dass die Exposition zelluläre Veränderungen bewirkt. Die Veränderungen waren bei Probanden die eher viel telefonieren stärker ausgeprägt. Dies kann als Hinweis für die Akkumulation von HF-EMF expositionsbedingten Zellveränderungen gelten. Die Maßnahmen zur Reduktion eines damit verbundenen möglichen Risikos, werden im folgenden Abschnitt 0 diskutiert.



## 8 SCHLUSSFOLGERUNGEN ZU PRÄVENTIVMAßNAHMEN

Dipl.-Ing. Dr. Hamid Molla-Djafari

### 8.1 SCHUTZ- UND PRÄVENTIONSMAßNAHMEN IN ELEKTROMAGNETISCHEN FELDERN

Die Schutz- und Präventionsmaßnahmen in elektromagnetischen Feldern (EMF) im Hochfrequenzbereich kann man je nach Wirkungsmechanismus der Strahlung (thermisch, athermisch) in zwei Arten unterteilen. Sie sind allgemein gültig und nicht zwangsläufig nur auf Mobiltelefonie anzuwenden. Es gibt 1.) die allgemeinen Schutzmaßnahmen vor thermisch induzierten gesundheitlichen Schäden und 2.) die Vorsorgemaßnahmen im Hinblick auf mögliche Beeinträchtigungen der Gesundheit durch athermische Wirkungen von EMF. Für beide Fälle gilt die sogenannte „3A-Regel“ welche die wichtigsten Aspekte des Schutzes aufzählt: **Abstand**, **Aufenthalt** (Exponiertheit), **Abschirmung**.

### 8.2 ALLGEMEINE SCHUTZMAßNAHMEN IN ELEKTROMAGNETISCHEN FELDERN

Die allgemeinen Schutzmaßnahmen in EMF werden nach drei Kategorien unterschieden:

#### 8.2.1 Maßnahmen für Betroffene (beruflich Exponierte und Allgemeinbevölkerung)

Generell gilt: Als erste Maßnahme sollte die Exposition vermieden werden. Weil das oft nicht möglich ist, muss die „3A-Regel“ beachtet werden.

Der **Abstand** zu Strahlenquellen soll so groß wie möglich sein, weil die Feldstärke mit dem Abstand, je nach Quellenart und Geometrie der Quelle, mit  $1/r$  bis  $1/r^3$  abnimmt.

Die **Dauer des Aufenthalts** im exponierten Bereich ist so kurz wie möglich zu halten. Dies geschieht durch Verlassen des exponierten Bereiches oder durch Ausschalten der Strahlenquelle. In beiden Fällen wird die Expositionsdauer verringert. Wenn die obigen Maßnahmen nicht ausreichen oder nicht durchführbar sind, kann durch **Abschirmung** die Exposition reduziert werden. Dabei kann entweder die Strahlenquelle oder der Aufenthaltsbereich mit geeigneten Materialien abgeschirmt werden. Für besondere Situationen gibt es zum Abschirmen einer Person Schutzkleidungen, die wie ein Faraday'scher Käfig wirken und die Strahlenintensität dämpfen. Zur Abschirmung von Räumen oder Quellen ist bei der Wahl des Abschirmmaterials die Frequenz der Strahlung ausschlaggebend. Während Metalle wie z.B. Kupfer und Aluminium im Hochfrequenzbereich eine hohe Schirmdämpfung aufweisen, wirken sie im Niederfrequenzbereich überhaupt nicht. Dort müssen Stoffe mit hoher magnetischer Permeabilität eingesetzt werden.

Bei Personen mit aktiven medizinischen Implantaten (wie z.B. ein Herzschrittmacher) muss der Fall gesondert mit dem Produzenten des Implantats evaluiert werden. Herzschrittmacherträger sollen das Berühren geladener Objekte vermeiden.

### **8.2.2 Maßnahmen für den Produzenten**

Durch konstruktuelle Maßnahmen - z.B. Optimierung der Elektroden bzw. Antenne, Abschirmung der Zuleitungen u.ä. - kann die abgestrahlte Leistung reduziert werden. Auch durch bauliche Maßnahmen, etwa bessere Abschirmung der Quellen und Anbringung von Zugangsbarrieren, können die Immissionen verringert werden.

### **8.2.3 Maßnahmen für Anlagen- und Geräte-Betreiber**

Auch die Anlagen- und Geräte-Betreiber können durch Optimierungsmaßnahmen an der Strahlenquelle oder Sendeeinheit (z.B. Verwendung geeigneter Antennen und Elektroden) oder Reduzierung der Sendeleistung bzw. Drehung der Sendeantenne (z.B. bei Mobilfunkbasisstationen) zu einer erheblichen Reduzierung der Immissionen im betrachteten Aufenthaltsort beitragen. Solche technischen Maßnahmen sind den organisatorischen Maßnahmen vorzuziehen.

Die organisatorischen Maßnahmen für den **Betreiber einer Sendeanlage** sind:

- Erhöhung des Abstandes zwischen Emittent und Betroffenen
- Anbringung von Warnschildern für Herzschrittmacherträger und Implantat-Träger (am Gerät, von Weitem gut sichtbar und am Eingang zum Aufstellungsort des Gerätes)
- Arbeitsverbot für Herzschrittmacherträger an Geräten mit hohen EMF-Emissionen
- Zutrittsverbot für Räume mit hoher Feld-Intensität
- Schulung des Personals betreffend Gefahren von EMF

Bei Sendeanlagen gibt es auch technische Maßnahmen:

- Begrenzung der ausgestrahlten Leistung (EIRP) auf das benötigte Maß
- Änderung/Optimierung der Hauptstrahlrichtung
- Veränderung des Öffnungswinkels
- Änderung des Antennengewinns
- Änderung des Neigungswinkels
- Änderung der Montagehöhe.

Wenn alle oberen Möglichkeiten nicht zum Erfolg führen:

- Minimierung durch nachgewiesenen wirksame Abschirmmaßnahmen.

### 8.3 VORSORGEABNAHMEN BEI DER BENÜTZUNG VON HANDYS

1. Verwenden der Freisprech-Funktion (**Lautsprecher**). Dadurch muss das Handy nicht am Ohr gehalten werden. Die Strahlung nimmt mit dem Abstand zum Handy stark ab. Bei vielen modernen Handys ist bei bis zu ca. 2 Metern (und mehr) Abstand zwischen Handy und Ohr ein Gespräch ohne Qualitätsverlust zu führen.
2. Wahl eines Mobiltelefons mit **niedriger SAR** und niedrigem Connect-Strahlungsfaktor. Es können im Internet vor dem Kauf eines Handys dessen Strahlungseigenschaften studiert werden. Neben SAR-Wert in W/kg (Spezifische Absorptionsrate) ist auch der sogenannte Connect-Strahlungsfaktor von Interesse, der die Spitzenwerte der Handy-Abstrahlung berücksichtigt. Im Zweifelsfall sollte sich der Verbraucher stärker an den Connect-Strahlungsfaktoren orientieren. Allgemeine Informationen dazu finden sich auf der Webseite „[www.handywerte.de](http://www.handywerte.de)“, wo man für zahlreiche Handys die Strahlungseigenschaften findet.
3. Eingeschaltetes Mobiltelefon **in die Tasche** geben und nicht am Körper tragen. Dies vor allem, wenn die Person in Bewegung ist (z.B. im Zug oder Auto, Bewegung zwischen mehreren Basisstationen).
4. Im **Auto** die **Lautsprecher-Funktion** oder **Headset** mit z.B. **Bluetooth** benutzen, besser eine Freisprecheinrichtung mit Außenantenne verwenden. Telefonieren im Auto kann ohne Außenantenne die Exposition deutlich erhöhen (im Vergleich zur Situation außerhalb des Autos).
5. **Nicht bei schlechtem Empfang** telefonieren (im Keller oder Aufzug). Bei schlechtem Empfang muss das Handy seine Leistung erhöhen, um die Verbindung zur Basisstation aufzubauen bzw. aufrechtzuerhalten.
6. **Kein stundenlanges** Telefonieren. Biologische Effekte treten erst auf, nachdem eine gewisse Zeit verstrichen ist.
7. Benützen Sie für lange Gespräche das **Festnetz**.
8. Halten Sie während des **Verbindungsaufbaus** das **Handy nicht** an den **Kopf**.
9. Schreiben Sie eine **SMS** anstatt zu telefonieren.
10. Nachdem die Wirkungen ca. 2 Stunden nach Ende der Exposition nicht mehr erkennbar sind, erscheinen expositionsfreie **Pausen** angezeigt.



## 9 ZITIERTE LITERATUR

1. IARC, *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields*. 2002: IARC. 429.
2. IARC, *Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Non-ionizing radiation, Part II: Radiofrequency electromagnetic fields*. Vol. 102. 2013, Lyon, France IARC Press.
3. Lai, H. and N.P. Singh, *Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation*. *Int.J.Radiat.Biol.*, 1996. **69**(4): p. 513-521.
4. Lai, H. and N.P. Singh, *Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells*. *Bioelectromagnetics*, 1995. **16**(3): p. 207-210.
5. Diem, E., C. Schwarz, F. Adlkofer, O. Jahn, and H. Rüdiger, *Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro*. *Mutat.Res.*, 2005. **583**(2): p. 178-183.
6. Schwarz, C., E. Kratochvil, A. Pilger, N. Kuster, F. Adlkofer, and H.W. Rudiger, *Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1,950 MHz) induce genotoxic effects in vitro in human fibroblasts but not in lymphocytes*. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 2008. **81**(6): p. 755-767.
7. Gerner, C., V. Haudek, U. Schandl, E. Bayer, N. Gundacker, H.P. Hutter, and W. Mosgoeller, *Increased protein synthesis by cells exposed to a 1,800-MHz radio-frequency mobile phone electromagnetic field, detected by proteome profiling*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2010. **83**(6): p. 691-702.
8. Franzellitti, S., P. Valbonesi, N. Ciancaglini, C. Biondi, A. Contin, F. Bersani, and E. Fabbri, *Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay*. *Mutat Res*, 2010. **683**(1-2): p. 35-42.
9. Campisi, A., M. Gulino, R. Acquaviva, P. Bellia, G. Raciti, R. Grasso, F. Musumeci, A. Vanella, and A. Triglia, *Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field*. *Neurosci Lett*, 2010. **473**(1): p. 52-5.
10. Xu, S., Z. Zhou, L. Zhang, Z. Yu, W. Zhang, Y. Wang, X. Wang, M. Li, Y. Chen, C. Chen, M. He, G. Zhang, and M. Zhong, *Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons*. *Brain Res*, 2010. **1311**: p. 189-96.
11. Tomruk, A., G. Guler, and A.S. Dincel, *The influence of 1800 MHz GSM-like signals on hepatic oxidative DNA and lipid damage in nonpregnant, pregnant, and newly born rabbits*. *Cell Biochem Biophys*, 2010. **56**(1): p. 39-47.

12. Guler, G., Z. Turkozer, E. Ozgur, A. Tomruk, N. Seyhan, and C. Karasu, *Protein oxidation under extremely low frequency electric field in guinea pigs. Effect of N-acetyl-L-cysteine treatment*. Gen Physiol Biophys, 2009. **28**(1): p. 47-55.
13. Zhang, D.Y., Z.P. Xu, H. Chiang, D.Q. Lu, and Q.L. Zeng, *Effects of GSM 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on DNA damage in Chinese hamster lung cells*. Zhonghua Yu Fang Yi.Xue.Za Zhi., 2006. **40**(3): p. 149-152.
14. Sakuma, N., Y. Komatsubara, H. Takeda, H. Hirose, M. Sekijima, T. Nojima, and J. Miyakoshi, *DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations*. Bioelectromagnetics, 2006. **27**(1): p. 51-57.
15. Zeni, O., M. Romano, A. Perrotta, M.B. Lioi, R. Barbieri, G. d'Ambrosio, R. Massa, and M.R. Scarfi, *Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute in vitro exposure to 900 MHz radiofrequency fields*. Bioelectromagnetics, 2005. **26**(4): p. 258-265.
16. Chemeris, N.K., A.B. Gapeyev, N.P. Sirota, O.Y. Gudkova, N.V. Kornienko, A.V. Tankanag, I.V. Konovalov, M.E. Buzoverya, V.G. Suvorov, and V.A. Logunov, *DNA damage in frog erythrocytes after in vitro exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field* 5. Mutat.Res., 2004. **558**(1-2): p. 27-34.
17. Vijayalaxmi, N. Mohan, M.L. Meltz, and M.A. Wittler, *Proliferation and cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450 MHz radiofrequency radiation*. Int.J.Radiat.Biol, 1997. **72**(6): p. 751-757.
18. Vijayalaxmi, W.F. Pickard, K.S. Bisht, T.J. Prihoda, M.L. Meltz, M.C. LaRegina, J.L. Roti Roti, W.L. Straube, and E.G. Moros, *Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells of rats exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation 1*. Int J.Radiat.Biol., 2001. **77**(11): p. 1109-1115.
19. Vijayalaxmi, L.B.Z., M.L. Meltz, W.F. Pickard, K.S. Bisht, J.L. Roti Roti, W. Straube, and E.G. Moros, *Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835.62 MHz, FDMA)*. Radiation Research, 2001. **155**(1): p. 113-121.
20. McNamee, J.P., P.V. Bellier, G.B. Gajda, B.F. Lavalley, E.P. Lemay, L. Marro, and A. Thansandote, *DNA damage in human leukocytes after acute in vitro exposure to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field*. Radiation Research, 2002. **158**(4): p. 534-537.
21. McNamee, J.P., P.V. Bellier, G.B. Gajda, S.M. Miller, E.P. Lemay, B.F. Lavalley, L. Marro, and A. Thansandote, *DNA damage and micronucleus induction in human leukocytes after acute in vitro exposure to a 1.9 GHz continuous-wave radiofrequency field*. Radiation Research, 2002. **158**(4): p. 523-533.
22. Tice, R.R., G.G. Hook, M. Donner, D.I. McRee, and A.W. Guy, *Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells*. Bioelectromagnetics, 2002. **23**(2): p. 113-126.
23. Zeni, O., A. Schiavoni, A. Perrotta, D. Forigo, M. Deplano, and M.R. Scarfi, *Evaluation of genotoxic effects in human leukocytes after in vitro exposure to 1950 MHz UMTS radiofrequency field*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(3): p. 177-184.

24. Stronati, L., A. Testa, J. Moquet, A. Edwards, E. Cordelli, P. Villani, C. Marino, A.M. Fresegna, M. Appolloni, and D. Lloyd, *935 MHz cellular phone radiation. An in vitro study of genotoxicity in human lymphocytes*. *Int.J.Radiat.Biol*, 2006. **82**(5): p. 339-346.
25. Vijayalaxmi, L.B.Z., *Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2.45 GHz or 8.2 GHz radiofrequency radiation*. *Radiation Research*, 2006. **166**(3): p. 532-538.
26. Kim, J.Y., S.Y. Hong, Y.M. Lee, S.A. Yu, W.S. Koh, J.R. Hong, T. Son, S.K. Chang, and M. Lee, *In vitro assessment of clastogenicity of mobile-phone radiation (835 MHz) using the alkaline comet assay and chromosomal aberration test*. *Environ.Toxicol.*, 2008. **23**(3): p. 319-327.
27. Marinelli, F., S.D. La, G. Ciccioiti, L. Cattini, C. Trimarchi, S. Putti, A. Zamparelli, L. Giuliani, G. Tomassetti, and C. Cinti, *Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between pro-apoptotic and pro-survival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells*. *J.Cell Physiol*, 2004. **198**(2): p. 324-332.
28. Schuderer, J., *EMF-Risk Assessment: "In vitro" Research and Sleep Studies in Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich 2005*, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich Zürich
29. Gabriel, S., R.W. Lau, and C. Gabriel, *The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues*. *Phys Med Biol*, 1996. **41**(11): p. 2271-93.
30. Preece, A.W., G. Iwi, A. Davies-Smith, K. Wesnes, S. Butler, E. Lim, and A. Varey, *Effect of a 915-MHz simulated mobile phone signal on cognitive function in man*. *Int J Radiat Biol*, 1999. **75**(4): p. 447-56.
31. Koivisto, M., C.M. Krause, A. Revonsuo, M. Laine, and H. Hamalainen, *The effects of electromagnetic field emitted by GSM phones on working memory*. *NeuroReport*, 2000. **11**(8): p. 1641-1643.
32. Koivisto, M., A. Revonsuo, C. Krause, C. Haarala, L. Sillanmaki, M. Laine, and H. Hamalainen, *Effects of 902 MHz electromagnetic field emitted by cellular telephones on response times in humans*. *Neuroreport*, 2000. **11**(2): p. 413-5.
33. Jech, R., K. Sonka, E. Ruzicka, A. Nebuzelsky, J. Bohm, M. Juklickova, and S. Nevsimalova, *Electromagnetic field of mobile phones affects visual event related potential in patients with narcolepsy*. *Bioelectromagnetics*, 2001. **22**(7): p. 519-28.
34. Edelstyn, N. and A. Oldershaw, *The acute effects of exposure to the electromagnetic field emitted by mobile phones on human attention*. *Neuroreport*, 2002. **13**(1): p. 119-21.
35. Lass, J., V. Tuulik, R. Ferenets, R. Riisalo, and H. Hinrikus, *Effects of 7 Hz-modulated 450 MHz electromagnetic radiation on human performance in visual memory tasks*. *Int J Radiat Biol*, 2002. **78**(10): p. 937-44.
36. Lee, T.M., P.K. Lam, L.T. Yee, and C.C. Chan, *The effect of the duration of exposure to the electromagnetic field emitted by mobile phones on human attention*. *Neuroreport*, 2003. **14**(10): p. 1361-4.

37. Smythe, J.W. and B. Costall, *Mobile phone use facilitates memory in male, but not female, subjects*. Neuroreport, 2003. **14**(2): p. 243-6.
38. Haarala, C., L. Bjornberg, M. Ek, M. Laine, A. Revonsuo, M. Koivisto, and H. Hamalainen, *Effect of a 902 MHz electromagnetic field emitted by mobile phones on human cognitive function: A replication study*. Bioelectromagnetics, 2003. **24**(4): p. 283-8.
39. Haarala, C., M. Ek, L. Bjornberg, M. Laine, A. Revonsuo, M. Koivisto, and H. Hamalainen, *902 MHz mobile phone does not affect short term memory in humans*. Bioelectromagnetics, 2004. **25**(6): p. 452-6.
40. Curcio, G., M. Ferrara, L. De Gennaro, R. Cristiani, G. D'Inzeo, and M. Bertini, *Time-course of electromagnetic field effects on human performance and tympanic temperature*. Neuroreport, 2004. **15**(1): p. 161-4.
41. Hinrichs, H. and H.J. Heinze, *Effects of GSM electromagnetic field on the MEG during an encoding-retrieval task*. Neuroreport, 2004. **15**(7): p. 1191-4.
42. Hamblin, D.L., A.W. Wood, R.J. Croft, and C. Stough, *Examining the effects of electromagnetic fields emitted by GSM mobile phones on human event-related potentials and performance during an auditory task*. Clin Neurophysiol, 2004. **115**(1): p. 171-8.
43. Krause, C.M., C. Haarala, L. Sillanmaki, M. Koivisto, K. Alanko, A. Revonsuo, M. Laine, and H. Hamalainen, *Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during an auditory memory task: a double blind replication study*. Bioelectromagnetics, 2004. **25**(1): p. 33-40.
44. Maier, R., S.E. Greter, and N. Maier, *Effects of pulsed electromagnetic fields on cognitive processes - a pilot study on pulsed field interference with cognitive regeneration*. Acta Neurol Scand, 2004. **110**(1): p. 46-52.
45. Schmid, G., C. Sauter, R. Stepansky, I.S. Lobentanz, and J. Zeitlhofer, *No influence on selected parameters of human visual perception of 1970 MHz UMTS-like exposure*. Bioelectromagnetics, 2005. **26**(4): p. 243-250.
46. Besset, A., F. Espa, Y. Dauvilliers, M. Billiard, and R. De Seze, *No effect on cognitive function from daily mobile phone use*. Bioelectromagnetics, 2005. **26**(2): p. 102-108.
47. Preece, A.W., S. Goodfellow, M.G. Wright, S.R. Butler, E.J. Dunn, Y. Johnson, T.C. Manktelow, and K. Wesnes, *Effect of 902 MHz mobile phone transmission on cognitive function in children*. Bioelectromagnetics, 2005. **Suppl 7**: p. S138-43.
48. Vecchio, F., P. Buffo, S. Sergio, D. Iacoviello, P.M. Rossini, and C. Babiloni, *Mobile phone emission modulates event-related desynchronization of alpha rhythms and cognitive-motor performance in healthy humans*. Clin Neurophysiol, 2012. **123**(1): p. 121-8.
49. Curcio, G., D. Nardo, M.G. Perrucci, P. Pasqualetti, T.L. Chen, C. Del Gratta, G.L. Romani, and P.M. Rossini, *Effects of mobile phone signals over BOLD response while performing a cognitive task*. Clin Neurophysiol, 2012. **123**(1): p. 129-36.

50. Haarala, C., M. Bergman, M. Laine, A. Revonsuo, M. Koivisto, and H. Hamalainen, *Electromagnetic field emitted by 902 MHz mobile phones shows no effects on children's cognitive function*. *Bioelectromagnetics*, 2005. **Suppl 7**: p. S144-50.
51. Keetley, V., A.W. Wood, J. Spong, and C. Stough, *Neuropsychological sequelae of digital mobile phone exposure in humans*. *Neuropsychologia*, 2006. **44**(10): p. 1843-1848.
52. Russo, R., E. Fox, C. Cinel, A. Boldini, M.A. Defeyter, D. Mirshekar-Syahkal, and A. Mehta, *Does acute exposure to mobile phones affect human attention?* *Bioelectromagnetics*, 2006. **27**(3): p. 215-220.
53. Wilen, J., A. Johansson, N. Kalezic, E. Lyskov, and M. Sandstrom, *Psychophysiological tests and provocation of subjects with mobile phone related symptoms*. *Bioelectromagnetics*, 2006. **27**(3): p. 204-214.
54. Regel, S.J., S. Negovetic, M. Roosli, V. Berdinas, J. Schuderer, A. Huss, U. Lott, N. Kuster, and P. Achermann, *UMTS base station-like exposure, well-being, and cognitive performance*. *Environ Health Perspect*, 2006. **114**(8): p. 1270-5.
55. Eliyahu, I., R. Luria, R. Hareuveny, M. Margalio, N. Meiran, and G. Shani, *Effects of radiofrequency radiation emitted by cellular telephones on the cognitive functions of humans*. *Bioelectromagnetics*, 2006. **27**(2): p. 119-126.
56. Hamblin, D.L., R.J. Croft, A.W. Wood, C. Stough, and J. Spong, *The sensitivity of human event-related potentials and reaction time to mobile phone emitted electromagnetic fields*. *Bioelectromagnetics*, 2006. **27**(4): p. 265-273.
57. Terao, Y., T. Okano, T. Furubayashi, and Y. Ugawa, *Effects of thirty-minute mobile phone use on visuo-motor reaction time*. *Clin Neurophysiol*, 2006. **117**(11): p. 2504-11.
58. Haarala, C., F. Takio, T. Rintee, M. Laine, M. Koivisto, A. Revonsuo, and H. Hamalainen, *Pulsed and continuous wave mobile phone exposure over left versus right hemisphere: effects on human cognitive function*. *Bioelectromagnetics*, 2007. **28**(4): p. 289-295.
59. Cinel, C., A. Boldini, R. Russo, and E. Fox, *Effects of mobile phone electromagnetic fields on an auditory order threshold task*. *Bioelectromagnetics*, 2007. **28**(6): p. 493-496.
60. Fritzer, G., R. Goder, L. Friege, J. Wachter, V. Hansen, D. Hinze-Selch, and J.B. Aldenhoff, *Effects of short- and long-term pulsed radiofrequency electromagnetic fields on night sleep and cognitive functions in healthy subjects*. *Bioelectromagnetics*, 2007. **28**(4): p. 316-325.
61. Regel, S.J., G. Tinguely, J. Schuderer, M. Adam, N. Kuster, H.P. Landolt, and P. Achermann, *Pulsed radio-frequency electromagnetic fields: dose-dependent effects on sleep, the sleep EEG and cognitive performance*. *J Sleep Res*, 2007. **16**(3): p. 253-8.
62. Curcio, G., E. Valentini, F. Moroni, M. Ferrara, L. De Gennaro, and M. Bertini, *Psychomotor performance is not influenced by brief repeated exposures to mobile phones*. *Bioelectromagnetics*, 2008. **29**(3): p. 237-41.

63. Kleinlogel, H., T. Dierks, T. Koenig, H. Lehmann, A. Minder, and R. Berz, *Effects of weak mobile phone - electromagnetic fields (GSM, UMTS) on event related potentials and cognitive functions*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(6): p. 488-97.
64. Leung, S., R.J. Croft, R.J. McKenzie, S. Iskra, B. Silber, N.R. Cooper, B. O'Neill, V. Cropley, A. Diaz-Trujillo, D. Hamblin, and D. Simpson, *Effects of 2G and 3G mobile phones on performance and electrophysiology in adolescents, young adults and older adults*. Clin Neurophysiol, 2011. **122**(11): p. 2203-16.
65. Riddervold, I.S., G.F. Pedersen, N.T. Andersen, A.D. Pedersen, J.B. Andersen, R. Zachariae, L. Molhave, T. Sigsgaard, and S.K. Kjaergaard, *Cognitive function and symptoms in adults and adolescents in relation to rf radiation from UMTS base stations*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(4): p. 257-67.
66. Luria, R., I. Eliyahu, R. Hareuveny, M. Margaliot, and N. Meiran, *Cognitive effects of radiation emitted by cellular phones: the influence of exposure side and time*. Bioelectromagnetics, 2009. **30**(3): p. 198-204.
67. Wiholm, C., A. Lowden, N. Kuster, L. Hillert, B.B. Arnetz, T. Akerstedt, and S.D. Moffat, *Mobile phone exposure and spatial memory*. Bioelectromagnetics, 2009. **30**(1): p. 59-65.
68. Riddervold, I.S., S.K. Kjaergaard, G.F. Pedersen, N.T. Andersen, O. Franek, A.D. Pedersen, T. Sigsgaard, R. Zachariae, L. Molhave, and J.B. Andersen, *No effect of TETRA hand portable transmission signals on human cognitive function and symptoms*. Bioelectromagnetics, 2010. **31**(5): p. 380-90.
69. Sauter, C., H. Dorn, A. Bahr, M.L. Hansen, A. Peter, M. Bajbouj, and H. Danker-Hopfe, *Effects of exposure to electromagnetic fields emitted by GSM 900 and WCDMA mobile phones on cognitive function in young male subjects*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(3): p. 179-90.
70. Wallace, D., S. Eltiti, A. Ridgewell, K. Garner, R. Russo, F. Sepulveda, S. Walker, T. Quinlan, S. Dudley, S. Maung, R. Deeble, and E. Fox, *Cognitive and physiological responses in humans exposed to a TETRA base station signal in relation to perceived electromagnetic hypersensitivity*. Bioelectromagnetics, 2012. **33**(1): p. 23-39.
71. Schmid, M.R., M. Murbach, C. Lustenberger, M. Maire, N. Kuster, P. Achermann, and S.P. Loughran, *Sleep EEG alterations: effects of pulsed magnetic fields versus pulse-modulated radio frequency electromagnetic fields*. J Sleep Res, 2012. **21**(6): p. 620-9.
72. Loughran, S.P., D.C. Benz, M.R. Schmid, M. Murbach, N. Kuster, and P. Achermann, *No increased sensitivity in brain activity of adolescents exposed to mobile phone-like emissions*. Clin Neurophysiol, 2013. **124**(7): p. 1303-8.
73. Sauter, C., T. Eggert, H. Dorn, G. Schmid, T. Bolz, A. Marasanov, M.L. Hansen, A. Peter, and H. Danker-Hopfe, *Do signals of a hand-held TETRA transmitter affect cognitive performance, well-being, mood or somatic complaints in healthy young men? Results of a randomized double-blind cross-over provocation study*. Environ Res, 2015. **140**: p. 85-94.
74. Malek, F., K.A. Rani, H.A. Rahim, and M.H. Omar, *Effect of Short-Term Mobile Phone Base Station Exposure on Cognitive Performance, Body Temperature, Heart Rate and Blood Pressure of Malaysians*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13206.

75. Thomas, P. and M. Fenech, *Buccal micronucleus cytome assay*. Methods Mol Biol, 2011. **682**: p. 235-48.
76. Thomas, P., N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, and M. Fenech, *Buccal micronucleus cytome assay*. Nat Protoc, 2009. **4**(6): p. 825-37.
77. Thomas, P. and M. Fenech, *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes*. Methods Mol Biol, 2011. **682**: p. 217-34.
78. Bolognesi, C., S. Knasmueller, A. Nersesyan, P. Thomas, and M. Fenech, *The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery*. Mutat Res, 2013. **753**(2): p. 100-13.
79. Nersesyan, A., M. Kundi, M. Fenech, C. Bolognesi, M. Misik, G. Wultsch, M. Hartmann, and S. Knasmueller, *Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2014. **762**: p. 37-51.
80. Bonassi, S., R. El-Zein, C. Bolognesi, and M. Fenech, *Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 93-100.
81. Gandhi, G. and P. Singh, *Cytogenetic damage in mobile phone users: preliminary data*. Int J Hum Genet, 2005. **5**(4): p. 259-265.
82. Gandhi, G. and Anita, *Genetic damage in mobile phone users: some preliminary findings*. Int J Hum Genet. , 2005. **11**(2): p. 99-104.
83. Gadhia, P., T. Shah, A. Mistry, M. Pithawala, and D. Tamakuwala, *A preliminary study to assess possible chromosomal damage among users of digital mobile phones*. Electromagn. Biol Med. , 2003. **22**(2-3): p. 149-159.
84. Yadav, A.S. and M.K. Sharma, *Increased frequency of micronucleated exfoliated cells among humans exposed in vivo to mobile telephone radiations*. Mutat.Res., 2008. **650**(2): p. 175-180.
85. Hintzsche, H. and H. Stopper, *Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users*. Toxicol Lett, 2010. **193**(1): p. 124-30.
86. Souza Lda, C., M. Cerqueira Ede, and J.R. Meireles, *Assessment of nuclear abnormalities in exfoliated cells from the oral epithelium of mobile phone users*. Electromagn Biol Med, 2014. **33**(2): p. 98-102.
87. Ceppi, M., F. Gallo, and S. Bonassi, *Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 247-52.
88. Fenech, M., N. Holland, E. Zeiger, W.P. Chang, S. Burgaz, P. Thomas, C. Bolognesi, S. Knasmueller, M. Kirsch-Volders, and S. Bonassi, *The HUMN and HUMNXL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 239-45.

89. Tolbert, P.E., C.M. Shy, and J.W. Allen, *Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development*. *Mutat Res*, 1992. **271**(1): p. 69-77.
90. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. *Nature*, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
91. Crick, F.H., S. Brenner, Watstobi.Rj, and L. Barnett, *General Nature of Genetic Code for Proteins*. *Nature*, 1961. **192**(480): p. 1227-&.
92. Branzei, D. and M. Foiani, *Regulation of DNA repair throughout the cell cycle*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008. **9**(4): p. 297-308.
93. Tice, R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, and Y.F. Sasaki, *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. *Environ Mol Mutagen*, 2000. **35**(3): p. 206-21.
94. Dhawan, A., D. Anderson, and Royal Society of Chemistry (Great Britain). *The comet assay in toxicology*. *Issues in toxicology*,. 2009, Cambridge: RSC Pub. xvi, 461 p.
95. Friedberg, E.C., *How nucleotide excision repair protects against cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2001. **1**(1): p. 22-33.
96. Julsing, J.R. and G.J. Peters, *Methylation of DNA repair genes and the efficacy of DNA targeted anticancer treatment*. *Oncology Discovery*, 2014. **2**(1).
97. Collins, A.R. and A. Azqueta, *DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay*. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2012. **736**(1-2): p. 122-129.
98. Garriott, M.L., J.B. Phelps, and W.P. Hoffman, *A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity*. *Mutat Res*, 2002. **517**(1-2): p. 123-34.
99. Fenech, M., *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(5): p. 1084-104.
100. Lorge, E., V. Thybaud, M.J. Aardema, J. Oliver, A. Wakata, G. Lorenzon, and D. Marzin, *SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study*. *Mutat Res*, 2006. **607**(1): p. 13-36.
101. Kesari, K.K., S. Kumar, J. Nirala, M.H. Siddiqui, and J. Behari, *Biophysical evaluation of radiofrequency electromagnetic field effects on male reproductive pattern*. *Cell Biochem Biophys*, 2013. **65**(2): p. 85-96.
102. Kesari, K.K., J. Behari, and S. Kumar, *Mutagenic response of 2.45 GHz radiation exposure on rat brain*. *Int J Radiat Biol*, 2010. **86**(4): p. 334-43.
103. Yakymenko, I., O. Tsybulin, E. Sidorik, D. Henshel, O. Kyrylenko, and S. Kyrylenko, *Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation*. *Electromagn Biol Med*, 2015: p. 1-16.

104. Malyapa, R.S., E.W. Ahern, C. Bi, W.L. Straube, M. Laregina, W.F. Pickard, and J.L. Roti Roti, *DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia*. Radiation Research, 1998. **149**(6): p. 637-645.
105. Tillmann, T., H. Ernst, J. Streckert, Y. Zhou, F. Taugner, V. Hansen, and C. Dasenbrock, *Indication of cocarcinogenic potential of chronic UMTS-modulated radiofrequency exposure in an ethylnitrosourea mouse model*. Int J Radiat Biol, 2010. **86**(7): p. 529-41.
106. Lerchl, A., M. Klose, K. Grote, A.F. Wilhelm, O. Spathmann, T. Fiedler, J. Streckert, V. Hansen, and M. Clemens, *Tumor promotion by exposure to radiofrequency electromagnetic fields below exposure limits for humans*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **459**(4): p. 585-90.







# ATHEM-2

## Untersuchung athermischer Wirkungen elektromagnetischer Felder im Mobilfunkbereich

Allgemeine Unfallversicherungsanstalt  
Adalbert-Stifter-Strasse 65  
1200 Vienna  
Austria  
DVR: 0024163

Foto: Richard Reichhart