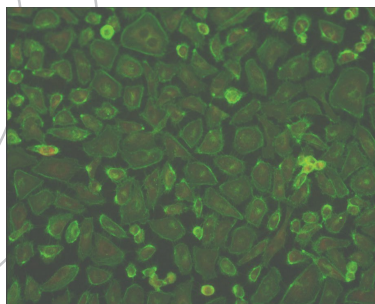
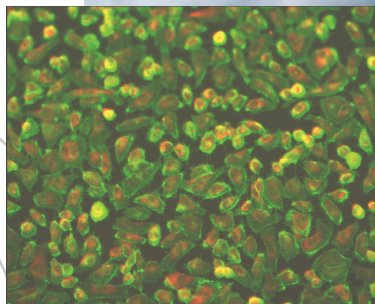
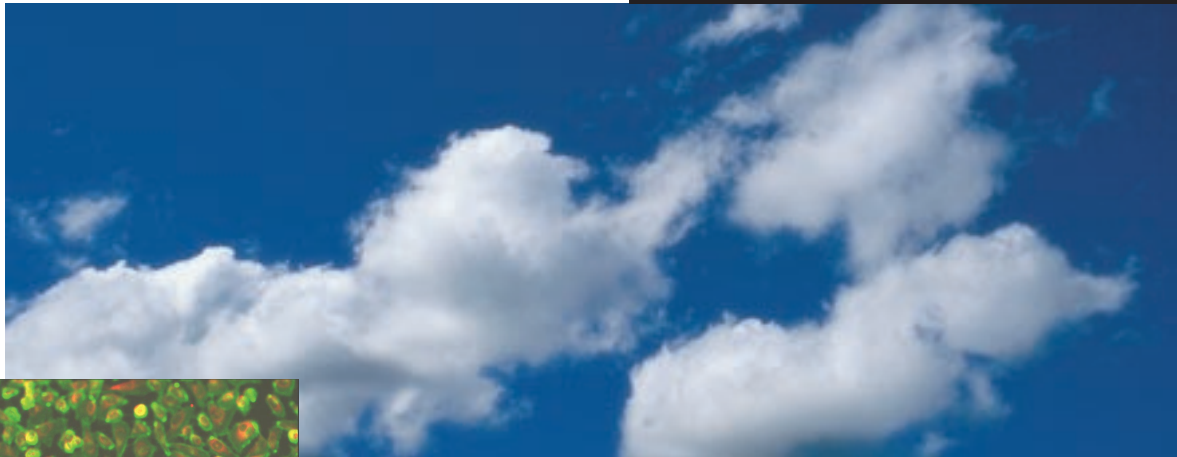


Edition Wissenschaft

Forschungsgemeinschaft Funk e. V. · G 14515 · Ausgabe Nr. 20 · Nov. 2003



Rainer Meyer

In vitro-Studien zu
biologischen Wirkungen
hochfrequenter Felder aus
den Jahren 1997 bis 2002

Edition
Wissenschaft



Forschungsgemeinschaft Funk

Liebe Leserinnen, liebe Leser,

Als dritter und letzter Beitrag aus der Reihe der 10-Jahres-Feier-Vorträge wird nunmehr der aktualisierte Bericht zu den „In-vitro-Studien zu biologischen Wirkungen hochfrequenter Felder aus den Jahren 1997 bis 2002“ von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer, Universität Bonn vorgelegt.

Die Erfahrung mit der Durchführung von Forschungsprojekten hat gezeigt, dass neue Forschungsprojekte nur sinnvoll initiiert werden können, wenn ihnen eine umfassende Literaturstudie vorausgeht.

Prof. Meyer hat – aus seiner persönlichen Sicht – alle wichtigen In-vitro-Arbeiten der Jahre 1997 bis 2002 zu seiner Urteilsbildung herangezogen. So umfasst der Bericht Studien an isolierten Organen, Geweben oder Zellen. Der Autor hat die Anordnung seines Berichts entsprechend den Schritten der Entstehung der Tumore gewählt. Bei aller wissenschaftlichen Exaktheit wurde bei Abfassen des Berichts auch auf Verständlichkeit für den „Nicht-Biologen“ großer Wert gelegt.

Für eine Übersicht zu In-vitro-Studien wird auf EDITION WISSENSCHAFT Nr. 19 verwiesen. Wir denken, dass zusammen mit den Ausführungen von Prof. Glaser (siehe FGF-10-Jahres-Festschrift) und den technischen Empfehlungen von Dr. Streckert zum Einsatz geeigneter Expositionseinrichtungen für In-vitro- bzw. in-vitro Experimente (siehe EDITION WISSENSCHAFT Nr.18) ein wertvoller Beitrag zur Erforschung der biologischen Wirkungen von elektromagnetischen Feldern gegeben wurde und für zukünftige Projekte als Basis benutzt werden kann.

Herzlichst
Gerd Friedrich

1. Einleitung	4
2. Interaktion von Feldern mit dem Genom	6
2.1. Gehirnzellen	6
2.2. Bindegewebszellen	7
2.3. Lymphozyten und andere Blutzellen	7
3. Promotion	11
3.1. Signalsysteme	11
3.1.1. Kalzium	11
3.1.2. Proto-Onkogene	12
3.2. Zellvermehrung	14
3.2.1. Ornithindecaboxylase	14
3.2.2. Zellteilungsgeschwindigkeit	14
4. Metastasierung	11
4.1. Hitzeschockproteine	16
4.2. Blut-Hirn-Schranke	18
5. Schlussfolgerungen	20
Literatur	22
Zusammenfassung	24
Impressum	26

Rainer Meyer

In vitro Studien zu biologischen Wirkungen hochfrequenter Felder aus den Jahren 1997 bis 2002

1. Einleitung

Mit der Einführung der GSM-Mobilfunknetze vor ca. zehn Jahren ist die Frage, ob hochfrequente elektromagnetische (HF) Felder den Menschen gesundheitlich beeinträchtigen können, mehr und mehr in das Bewusstsein der Bevölkerung getreten. Sowohl die für den Aufbau der Netze notwendigen Basisstationen wie auch die Handgeräte stehen im Verdacht, schädlich zu sein. Auch vergleichbare technische Geräte wie die schnurlosen DECT-Telefone werden von vielen Menschen zunehmend kritisch gesehen. Zusätzlich intensiviert worden ist die Diskussion durch die Einführung von sogenannten Vorsorge-Werten in der Schweiz, die deutlich unter den in Deutschland gültigen Grenzwerten liegen. Schon lange vor der Einführung der GSM-Netze war die Bevölkerung durch Radio- und Fernsehsender sowie andere Funkanwendungen HF-Feldern ausgesetzt. Auch bei der Diathermie-Behandlung in der Medizin werden HF-Felder zur lokalen Erwärmung von Gewebe seit vielen Jahrzehnten gezielt einge-

setzt. Daher gibt es schon lange Untersuchungen zur Interaktion von HF-Feldern mit Organismen und biologischem Gewebe. Eine hervorragende Übersicht über das Gebiet der Wirkung elektromagnetischer Felder liefert Leitgeb (2000). Seit der Einrichtung der GSM-Netze sind umfangreiche neue Untersuchungsprogramme auf diesem Gebiet initiiert worden. Auch in den kommenden Jahren werden diese Studien intensiv weitergeführt werden und es werden gerade durch die Einführung der UMTS-Technologie noch zahlreiche Studien hinzukommen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt also ca. zehn Jahre nach der breiten Einführung des GSM-Mobilfunks erscheint es jedoch lohnend, eine Zwischenbilanz an Hand der bisher vorgelegten Studien zu ziehen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Studien, die an isolierten Organen, Geweben oder isolierten Zellen durchgeführt wurden, sogenannte *in vitro*-Studien. Es wurden im wesentlichen Studien berücksichtigt, die nach 1997 erschienen sind, die meisten älteren Studien sind in einem

früheren Übersichtsartikel (Meyer, 1999) zusammengefasst. Bei einigen Themenbereichen werden zur Abrundung des Gesamtbildes auch Tierexperimente mit besprochen. Besondere Aktualität erhält dieser Übersichtsartikel durch eine kürzlich veröffentlichte epidemiologische Studie (Hardell et al., 2002), in der die Benutzer von Analog-, GSM- und Schnurlos-Telefonen bezüglich des Auftretens von Hirntumoren untersucht wurden. Es handelte sich um eine Fall-Kontrollstudie mit 1429 Fällen und 1470 Kontrollen verteilt auf mehrere Untergruppen:

1. Analoge Mobiltelefone;
2. Digitale Mobiltelefone;
3. Schnurlos-Telefone.

Diese drei Hauptgruppen wurden jeweils in Subgruppen unterteilt entsprechend der Dauer, über die die betrachteten Personen die Telefone benutzten, nämlich länger als ein Jahr, länger als fünf Jahre oder länger als 10 Jahre. In der Gruppe der Langzeitbenutzer analoger Mobilfunktelefone (> 10 Jahre) haben die Autoren ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten von Hirntumoren entdeckt („odds ratio“ 1,8). Diese Personen

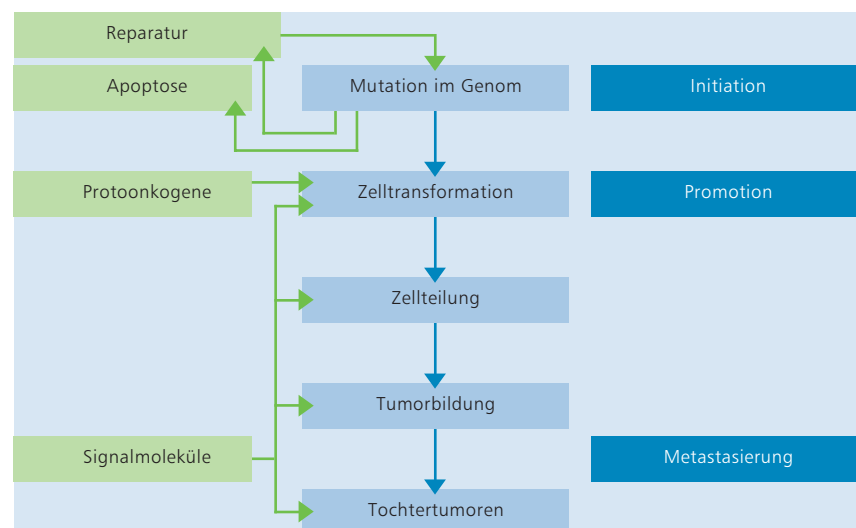
litten also 1,8 mal häufiger an einem Hirntumor als die aus der Kontrollgruppe. Betrachtet man ausschließlich die Tumore auf der Seite des Kopfes, an die das Telefon üblicherweise gehalten wird, dann steigt die „odds ratio“ auf 2,5, während auf der anderen Seite Kopfes keine Risikoerhöhung festgestellt wurde. Untersucht man das Auftreten des „Akustikus Neurinoms“ also eines Tumors im Bereich des Hörnervs, dann steigt die „odds ratio“ schon auf 3,5. Der Hörnerv liegt in dem Bereich des Kopfes, in dem beim Telefonieren die höchsten SAR-Werte (Spezifische Absorptions-Rate) zu erwarten sind, in dem also auch die stärkste Erwärmung auftritt. In keiner der anderen Gruppen ließen sich signifikant erhöhte Risiken nachweisen. Man muss jedoch einschränkend feststellen, dass in der Gruppe der Benutzer digitaler Mobiltelefone noch keine Langzeitznutzer enthalten waren, da diese Geräte noch nicht so lange auf dem Markt sind. Eine einzelne epidemiologische Studie ist sicher noch kein Grund zur Beunruhigung; denn diese Studie beschränkt sich auf Skandinavien und in der kritischen Gruppe waren insgesamt nur 72 Personen. Der von Hardell et al. publizierte Befund muss durch weitere Studien erhärtet werden. Allerdings kann man diese Studie zum Anlass nehmen, die neueren *in vitro* Studien einmal unter dem Aspekt einer Beeinflussung von Tumoren zu betrachten.

Ein ganz grobes Schema der Tumor-Entstehung (Abb. 1) geht davon aus, dass zunächst eine Schädigung (Mutation) des Genoms eintreten muss. Eine Mutation kann durch Reparaturmechanismen wieder behoben werden, so dass sie sich nicht auswirkt. Eine Mutation wird

sich erst auswirken, wenn das oder die entsprechenden mutierten Gene exprimiert (in Proteine übersetzt) werden. Dies wird unter Umständen nie geschehen. Wird das mutierte Gen exprimiert, so kann ein funktionsuntüchtiges Protein entstehen. Dies kann ganz unterschiedliche Folgen haben, evtl. gar keine, wenn andere Proteine den Defekt kompensieren können. Möglicherweise geht die Zelle unter, weil sie ohne das Protein nicht lebensfähig ist. In der Zelle kann bei Schädigung auch ein Selbstmordprogramm (Apoptose) ausgelöst werden. Sollten das oder

die mutierten Gene Proteine codieren, die bei der Steuerung der Zellteilung eine Rolle spielen, dann kann eine ungehemmte Zellteilung (Entartung) eintreten. Daraus kann dann ein Tumor entstehen. Bei diesen Vorgängen spielen vielfältige Signalmoleküle eine Rolle. Ein nächster Schritt wäre dann ein Auswandern von Zellen aus dem Tumor und die Bildung von Tochtertumoren (Metastasen). Dieses komplexe Schema soll für diese Übersicht von *in vitro* Studien als Leitfaden dienen, um die vielen Arbeiten in eine gewisse Ordnung zu bringen.

Entstehung von Tumoren



Quelle: Meyer

Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema zum mehrstufigen Ablauf von Tumorerkrankungen. Dieses Schema diente hier dazu, vielfältigen Studien zu gliedern, indem sie den verschiedenen Punkten zugeordnet wurden. Der erste Schritt, eine Mutation des Genoms, wird als **Initiation** bezeichnet. Dies kann zum programmierten Zelltod (Apoptose) oder auch zum ungeordneten Zelluntergang (Nekrose) führen. Möglicherweise wird die Mutation auch wieder repariert. Falls die mutierte Zelle weiterexistiert, kann sie eventuell entarten, wenn die **Mutation in einem Bereich des Genoms liegt, das für die Zellvermehrung wichtig ist z. B. einem Proto-Onkongen.** Der Vorgang der Entartung fällt unter die **Promotion** genannte Phase. Damit aus den sich teilenden Zellen tatsächlich ein Tumor wird, müssen noch weitere **Voraussetzungen erfüllt werden, wie z.B. das Einsprossen von Blutgefäßen in den sich bildenden Zellhaufen.**

Schließlich können sich durch das Auswandern von Tumorzellen noch Tochtertumoren bilden. **Alle diese Vorgänge werden durch viele verschiedene Signalmoleküle gesteuert.** Diese Abbildung wurde in der zugrunde liegenden Präsentation zum 10 jährigen Bestehen der Forschungsgemeinschaft Funk gezeigt.

2. Interaktion von Feldern mit dem Genom

Der Logik der Tumorentstehung folgend sollen zunächst Arbeiten referiert werden, die sich mit mutagener (Erbgut verändernder) Wirkung von HF-Feldern beschäftigen. Elektromagnetische Felder, die wir unter dem Begriff „ionisierende Strahlung“ zusammenfassen (Röntgenstrahlung und radioaktive Strahlung), enthalten pro Quant so viel Energie, dass ein Elektron aus einem Atom herausgeschlagen werden kann. Zurück bleibt ein Ion (geladenes Atom).

Da Elektronen an der Bildung chemischer Bindungen in Molekülen beteiligt sind, kann die Strahlung eine Bindung beschädigen. Auch kann es zur Bildung sogenannter freier Radikale kommen, die ein Elektron zuviel enthalten und sehr reaktionsfreudig sind.

All diese Vorgänge können zu einer Zerstörung der Desoxyribonukleinsäure-Kette (Desoxyribonucleic acid: DNA) des genetischen Materials führen und so mutagen wirken. Dazu sind Felder mit hoher Frequenz und niedriger Wellenlänge erforderlich. Vereinfachend kann man sagen, HF-Felder, die in ihrer Frequenz oberhalb der des sichtbaren Lichtes liegen, also ultraviolette und ionisierende Strahlung, können chemische Bindungen zerstören. Die Frequenzen der für die Informationsübertragung genutzten Felder sind erheblich geringer als die des sichtbaren Lichtes. Theoretisch sollten sie also nicht mutagen wirken können, trotzdem sind derartige Wirkungen immer wieder vermutet worden.

2.1 Gehirnzellen

Insbesondere Studien an Hirnzellen sind natürlich für die Frage, ob die Ergebnisse der epidemiologischen Studie von Hardell et al. (2002) sich mit anderer Methodik untermauern lassen, von Bedeutung. Solche Studien werden in diesem Kapitel behandelt. Obwohl die Feldexposition bei einigen der im Folgenden vorgestellten Studien *in vivo*, also an lebenden Tieren, vorgenommen wurde, sollen sie hier besprochen werden, da ihre Ergebnisse auch für *in vitro* Studien wichtig sind.

Lai und Singh berichteten (1995), dass in Ratten, die für zwei Stunden in einem Hohlleiter in 2450 MHz Feldern von 1 oder 2 mW/cm², Ganzkörper-SAR 0,6 bzw. 1,2 W/kg, exponiert wurden, in Hirnzellen die Brüche in einem einzelnen Strang der DNA zunehmen. Die Untersuchungen wurden mit der Technik des „alkaline comet assay“ durchgeführt. Es wurden gepulste und kontinuierliche Felder angewendet. Die Gehirne der Tiere wurden entweder sofort nach der Exposition oder vier Stunden später entnommen. Erstaunlicherweise waren die DNA-Brüche nach 4 Stunden ausgeprägter. Ähnliche Ergebnisse haben Lai und Singh nochmals 1996 publiziert (Lai und Singh, 1996A). Diese überraschenden Befunde blieben natürlich nicht unwidersprochen, in einem Kommentar machte Williams (1996) darauf aufmerksam, dass ein solches Verhalten unerklärlich sei, da die Reparaturenzyme der Zelle eigentlich nach vier Stunden schon einiges repariert haben müssten, wie man aus Untersuchungen an chemisch oder durch ionisierende Strahlung induzierten Chromosomenschäden wisse. In ihrer Entgegnung führen Lai und Singh (1996B) an, dass ein Verhal-

ten, wie in ihren Experimenten, nämlich ein mit der Zeit zunehmender Anstieg der Chromosomenschäden nach der Exposition im schädigenden Umfeld, auch von anderen gesehen wurde. Sie glauben, dass dieser Effekt auf die mit zwei Stunden relativ lange Exposition zurückzuführen ist. In einer Folgearbeit haben die gleichen Autoren versucht, den Wirkmechanismus über den die Felder auf die DNA einwirken, aufzuklären. Sie konnten die Wirkung des HF-Feldes durch Injektion von Substanzen, die freie Radikale fangen wie Melatonin, blockieren (Lai und Singh, 1997). Daraus folgern die Autoren, dass durch die Einwirkung der HF-Felder im Gehirn der Tiere freie Radikale produziert werden.

Die Ergebnisse von Lai und Singh stehen in Widerspruch zu denen von Malyapa et al. (1998). Diese Autoren haben Ratten ebenfalls für 2 Stunden einem unmodulierten 2450 MHz Feld mit einem SAR-Wert von 1,2 W/kg ausgesetzt. Dann wurden die Tiere entweder durch CO₂-Vergiftung oder mittels einer Guillotine getötet. Anschließend wurden die Gehirne entnommen. Kortex-Zellen und Zellen aus dem Hippocampus wurden getrennt mit der Technik des „alkaline comet assay“ auf DNA Veränderungen untersucht. Es ließ sich kein Einfluss des Feldes nachweisen. Bei den Tieren, die durch CO₂-Vergiftung eingeschlafert worden waren, war die Streuung der Proben wesentlich größer als bei denen, die mit der Guillotine getötet worden waren. CO₂-Vergiftung ist von Lai und Singh angewendet worden, was nach Meinung von Malyapa et al. (1998) möglicherweise zu einer artefiziellen Veränderung geführt haben könnte. Das kann man jedoch bestenfalls als

einen Verdacht ansehen, da sowohl die Kontrollen als auch die exponierten Tiere bei Lai und Singh gleich behandelt worden sind.

In einer vorhergehenden reinen *in vitro* Studie haben Malyapa et al. (1997A) untersucht wie Glioblastomzellen der Linie U87MG, Zellen eines menschlichen Hirntumors aus Gliazellen auf eine 2 stündige Exposition in einem 2450 MHz Feld mit SAR-Werten von 0,7 und 1,9 W/kg reagieren. In der gleichen Untersuchung wurden auch C3H 10T $\frac{1}{2}$ Zellen mit untersucht. Das ist eine Zelllinie, aus Bindegewebszellen von C3H-Mäusen. Nach der Exposition konnten die Zellen für 4 Stunden „ruhen“, wie auch bei Lai und Singh. Die anschließend durchgeführte DNA-Untersuchung mit der „alkaline comet assay“ Methode konnte keinen Einfluss des Feldes nachweisen. Diese Studie wurde um eine erweitert, in der die gleichen Zellen Feldern der amerikanischen Mobilfunknormen ausgesetzt wurden, 835,62 MHz „frequency-modulated continuous-wave“ (FMCW) und „code-division multiple-access“ (CDMA) mit einem SAR-Wert von 0,6 W/kg bei unterschiedlichen Bestrahlungszeiten von bis zu 24 Stunden (Malyapa et al., 1997B). Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, bei der Zellen Gammastrahlung von 137 Cs ausgesetzt wurden. Die Mobilfunkfelder hatten keinen Einfluss auf die mit der „alkaline comet assay“ Methode untersuchte DNA. Die drei Studien von Malyapa et al. (1997A + B, 1998) sprechen also gegen die Ergebnisse von Lai und Singh, die seit 1998 ihre eigenen Befunde auf diesem Gebiet nicht weiter erhärtet haben.

Erwähnt werden muss im Zusammenhang mit den Arbeiten von Lai

und Singh eine Studie von Vijayalaxmi et al. (2000), in der menschliches peripheres Blut untersucht wurde. Die Autoren haben das zeitliche Schema der Feldexposition (2450 MHz, SAR-Wert ca. 2 W/kg) und auch die Auswertung mit dem „alkaline comet assay“ an die Studien von Lai und Singh angepasst. Allerdings fanden sie keinen Feldeinfluss.

2.2 Bindegewebszellen

Schon in den zwei im Kapitel 2.1 vorgestellten *in vitro* Studien von Malyapa et al. (1997A + B) wurden Bindegewebszellen, C3H 10T $\frac{1}{2}$ Zellen, mit untersucht. Es ließ sich kein Einfluss der 2450 MHz Felder und der FDMA- bzw. CDMA-Felder nachweisen. In einer zusätzlichen Studie von der gleichen Arbeitsgruppe wurde die Wirkung von Mobilfunkfeldern mit höheren SAR-Werten, 3,2 – 5,1 W/kg an den C3H 10T $\frac{1}{2}$ Zellen getestet (Li et al., 2001). Die Expositionsdauern lagen bei 2, 4 und 24 Stunden, wobei die Zellen aus der 2 Stunden Gruppe noch 4 Stunden nach der Exposition ruhen durften. In keiner der Gruppen ließ sich mit dem „alkaline comet assay“ ein DNA-Schaden nachweisen. Dies bedeutet, dass unter diesen Bedingungen auch Felder oberhalb der Grenzwerte keinen DNA-Schaden induzieren. Als weitere Untermauerung dieser Befunde wurde von der Arbeitsgruppe ein Test auf „neoplastische Transformation“ an den C3H 10T $\frac{1}{2}$ Zellen durchgeführt (Roti Roti et al., 2001). Dabei wurden wieder FDMA- bzw. CDMA-Felder von 0,6 W/kg eingesetzt, diesmal allerdings 7 Tage lang. Anschließend an die Exposition hatten die Zellen 42 Tage Zeit weiter zu wachsen, es ließ sich kein transformierender Einfluss der

FDMA- und CDMA-Felder zeigen. Auch nach vorheriger Transformation mit ionisierenden Strahlen und einer daran anschließenden 42tägigen Exposition im HF-Feld zeigte sich kein zusätzlicher Einfluss des HF-Feldes.

2.3 Lymphozyten und andere Blutzellen

Ein großer Teil der Untersuchungen zur Mutagenität von HF-Feldern wurde an Lymphozyten durchgeführt. Dies hängt einerseits damit zusammen, dass Lymphozyten leicht zu isolieren und zu vermehren sind, und andererseits damit, dass das Auftreten von Leukämie auch immer wieder mit elektromagnetischen Feldern in Zusammenhang gebracht wurde. Zytogenetische Techniken wie Quantifizierung von Mikrokerne oder Chromosomenaberrationen, wie z.B. Schwesterchromatidaustausche (vgl. Abb. 2), sind hier häufig angewendet worden. Mikrokerne entstehen, wenn die Chromosomenverteilung bei der Zellteilung nicht regulär abläuft. Chromosomenreste, die nicht in die entstehenden Zellkerne der zwei Tochterzellen integriert werden können, bilden dann oft einen mikroskopisch sichtbaren Mikrokern. Die Häufigkeit von Mikrokernen wird durch mutagene Substanzen erhöht. Daher wird das vermehrte Auftreten von Mikrokerne als Anzeichen für mutagene Einflüsse gewertet. In diesem Kapitel werden einige ältere Studien mit besprochen, da sie zum Verständnis der neueren Arbeiten wichtig sind. (Abb. siehe Seite 8)

In einer Studie aus (1992) von Garaj-Vrhovac et al. wurden Blutproben für 10, 30 und 60 min in einem 7,7 GHz Feld von 0,5, 10 und 30 mW/cm² exponiert. Die Auswertung der Mikrokerne und der

Chromosomenaberrationen ergab unter Feldeinwirkung eine Zunahme. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Studie von Maes et al. (1993) unter einem 2450 MHz Feld, das mit 50 Hz gepulst wurde (Puls/Pause Verhältnis 1/3). Das Feld war so eingestellt, das die Proben durch das Feld auf 36°C geheizt wurden, dazu war ein SAR von ca. 75 W/kg notwendig. Die Autoren interpretieren dies als normotherme Exposition, da ja nur Körpertemperatur erreicht wurde, eine eher gewagte Interpretation. Sie finden nach 120 minütiger Exposition einen signifikanten Anstieg der Mikrokerne und der Chromosomenaberrationen, nicht aber der Schwesterchromatidaustausche. Nach 30 minütiger Exposition wurde keine Wirkung nachgewiesen. In einer zweiten Studie aus der gleichen Gruppe wurden GSM Felder für 2 h auf Blutkulturen angewendet Maes et al. (1995). Der SAR-Wert ist hier unklar, die Temperatur lag allerdings nur bei 17°C. Auch in dieser Studie zeigte sich nach Befeldung ein Anstieg der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen. Beide Studien beinhalten allerdings nur Blut von sehr wenigen Spendern die aus 1993 nur von zwei und die aus 1995 von sechs Personen.

1996 hat dieselbe Arbeitsgruppe eine Untersuchung zur kombinierten Wirkung von HF-Feldern und eines chemischen Mutagens des Mitomycin C publiziert (Maes et al., 1996). Die Proben, kultivierte Blutzellen, wurden in 5 cm Entfernung von einer Antenne einer Basisstation positioniert und bei 17°C gehalten. Die Antenne strahlte 954 MHz ab und der SAR-Wert in der Probe betrug ca. 1,5 W/kg. Die Proben wurden für 2 h exponiert. Die alleinige Exposition im Feld veränderte die Häufigkeit der Schwesterchroma-

tidaustausche nicht. Die Gabe von Mitomycin C verursachte dosisabhängig einen Anstieg dieses Parameters. Dieser Anstieg wurde größer, wenn die Proben vor der Mitomycin C Gabe dem Feld ausgesetzt waren. In einer weiteren Studie wurden wieder Vollblutkulturen allein und in Kombination mit Mitomycin C einem HF-Feld ausgesetzt, diesmal jedoch unter definierten Feldbedingungen in einer transversalen elektromagnetischen Zelle (TEM-Zelle; Maes et al., 1997). Die Blutkulturen wurden für zwei Stunden einem Feld von 935,2 MHz ohne Pulsung (CW) bei einem SAR-Wert von 0.3-0.4 W/kg ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 72 h kultiviert und danach wurden die standardisierten zytogenetischen Parameter Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausch und Proliferationsindex ausgewertet. Zusätzlich wurde noch der oben schon erwähnte „alkaline comet assay“ für Einzelstrangbrüche an der DNA durchgeführt. Eine Gruppe von Proben wurde nach dem Aufenthalt im Feld während der Kultur einer Konzentration von 0,01 µg/ml Mitomycin C ausgesetzt. Als Kontrollen dienten scheinexponierte Kulturen, mit ionisierender Strahlung behandelte Kulturen und solche, die nur Mitomycin C ausgesetzt waren. Es wurden Blutkulturen von vier männlichen oder weiblichen Spendern angelegt. Der Einsatz der ionisierenden Strahlung wie auch die Kultur in Anwesenheit von Mitomycin C führten zu den erwarteten positiven Befunden in den cytogenetischen Tests. Der Aufenthalt im HF-Feld allein hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Lymphozyten. Im Parameter Schwesterchromatidaustausch zeigte sich in der Gruppe, die nach der Feldexposition mit Mitomy-



Abbildung 2: Abbildung zum Schwesterchromatidaustausch. Ein Chromosom besteht aus einem Desoxyribonukleinsäuredoppelstrang. Entlang dieser beiden komplementären Stränge wird bei der Zellteilung jeweils ein neuer Strang synthetisiert, so dass schließlich zwei identische Schwesterchromatiden aus Doppelsträngen entstehen. Zur Erkennung der Schwesterchromatiden ist es erforderlich, jeweils eines zu markieren. Das lässt sich durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die Chromosomen-DNS während zwei aufeinanderfolgenden Zellteilungen erreichen. Ein Schwesterchromatid erscheint dann dunkel und eines hell. Beide hängen im Bild am Centromer noch zusammen. Die Pfeilspitzen zeigen jeweils einen Austausch zwischen den beiden Schwesterchromatiden an, die dunkle Markierung wechselt dort auf die helle Seite.

cin C behandelt worden war, ein leichter Anstieg gegenüber den nur mit Mitomycin C behandelten Proben. Die Autoren selbst bezeichnen dies als einen sehr schwachen Effekt.

In einer weiteren Arbeit aus dieser Arbeitsgruppe wurden wieder Blutkulturen einem Feld einer Mobilfunkantenne diesmal eines Autos für 2 h ausgesetzt (Maes et al., 2000) und es wurden die gleichen zytogenetischen Parameter ausgewertet wie in Maes et al. (1997) allerdings ohne den „alkaline comet assay“. Die Parameter des Feldes waren 455,7 MHz bei einem SAR 6,5 W/kg in 5 cm Entfernung von der Antenne. Es zeigte sich kein Einfluss des Feldes weder auf die Zellen, die nur im Feld waren, noch auf solche, die anschließend mit Mitomycin C behandelt wurden. Die Autoren schreiben selbst, dass diese Ergebnisse nicht die Hypothese einer synergistischen Wirkung von HF-Feld und chemischen Mutagenen unterstützen. Ein bemerkenswerter Befund, da genau diese Hypothese von den gleichen Autoren in den vorherigen Studien vertreten wurde. Die neueste Studie aus dieser Arbeitsgruppe ist zugleich auch die ausführlichste (Maes et al., 2001). Die Autoren führen eine vergleichbare Untersuchung durch wie die vorher beschriebenen, allerdings setzen sie eine TEM-Zelle ein, so dass definierte Fernfeldbedingungen herrschen, 900 MHz SAR-Werte 0,4, 2,0, 3,5, 5,5 und 10 W/kg. Es wurden drei Signalformen eingesetzt CW, GSM-Signal wie bei einer Unterhaltung und GSM-Signal wie im „stand by“. Die Expositionsdauer betrug wieder 2 h an die sich eine Kultur von 48 h anschloss, wobei je ein Teil der Proben (2 und 3,5 W/kg) während dieser Zeit Mitomycin C

oder einer Röntgenstrahlung von 1 Gy ausgesetzt wurde. Die Anwendung des HF-Feldes allein hatte bei keinem SAR-Wert einen Einfluss auf die ausgewerteten zytogenetischen Parameter. Die mutagene Wirkung der ionisierenden Strahlung zeigte sich in der Auswertung der entsprechenden Proben, wobei die vorherige Exposition im HF-Feld keinen zusätzlichen Einfluss hatte. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich auch bei der Anwendung von Mitomycin C, Mitomycin C hatte eine mutagene Wirkung, die nicht durch den vorherigen Aufenthalt im HF-Feld beeinflusst wurde. Die Autoren schreiben in ihrer Diskussion, dass ein synergistischer Einfluss von HF-Feldern, wie er in den Arbeiten von 1996 und 1997 (Maes et al., 1996; 1997) auftrat, hier nicht gezeigt werden konnte.

Den Arbeiten der Arbeitsgruppe um Maes wurde hier besonders breiter Raum eingeräumt, da sie die meisten positiven Befunde zur Interaktion von HF-Feldern mit zytogenetischen Parametern von Lymphozyten publiziert haben. Allerdings wurden diese positiven Befunde unter relativ unbestimmten Feldbedingungen erzielt und konnten in den neueren umfangreicheren Arbeiten nicht mehr reproduziert werden. Meiner Ansicht nach sind die älteren Befunde damit widerlegt, oder die Ergebnisse müssen zumindest sehr stark in Zweifel gezogen werden. Im Zusammenhang mit den Studien von der Arbeitsgruppe Maes sollte man auch erwähnen, dass schon früher Kombinationsstudien von HF-Feldern mit Mitomycin C vorgenommen wurden (Ciaravino et al., 1987; Meltz et al., 1987). Unter einem HF-Feld von 2450 MHz bei einem SAR-Wert von 30 W/kg wurden Maus Leukämiezellen der Linie L5178Y im

Nahfeld einer Hornantenne 4 h exponiert mit und ohne Mitomycin C (Meltz et al., 1987). Eine ähnliche Untersuchung wurde auch an der Hamster Ovarzelllinie CHO durchgeführt (Ciaravino et al., 1987). Bei diesen Studien ergab sich weder ein Einfluss des HF-Feldes allein noch in Kombination mit dem Mutagen. Beim Vergleich dieser Studien mit denen von Maes muss man berücksichtigen, dass die genannten älteren Studien nicht an menschlichen peripheren Lymphozyten vorgenommen wurden.

Allerdings stehen die positiven Befunde von Maes et al. nicht ganz allein, es gibt noch neuere Arbeiten zu diesem Gebiet, die positive Ergebnisse zeigen. In einer umfangreichen Arbeit haben Tice et al. (2002) den Einfluss von mehreren Feldkonfigurationen 837 MHz mit 12,5 kHz sinusförmig moduliert oder pulsformig mit 217 Hz (TDMA und CDMA) und 1909,8 MHz 217 Hz pulsformig moduliert GSM bei einer Expositionsdauer von jeweils 3 und 24 h in vier SAR-Wertstufen zwischen 1 und 10 W/kg meist 1, 2,5 5, 10 W/kg auf Vollblutkulturen untersucht. Es wurden zytogenetische Parameter und der „alkaline comet assay“ betrachtet. In der sehr umfangreichen Untersuchung wurden positive Befunde nur nach 24 h Exposition bei den SAR-Werten von 5 und 10 W/kg bezüglich des Parameters Mikrokernbildung gefunden. Diese Bedingungen liegen oberhalb der Grenzwerte trotzdem ein bemerkenswerter Befund, der einer weiteren Überprüfung wert ist. In einer ganz neuen Studie wurde ein bisher wenig beachteter zytogenetischer Parameter die „Aneuploidie“ d.h. der Verlust von Chromosomen an menschlichen Lymphozyten verfolgt (Mashevich et

al., 2003). Die Zellen wurden in Kulturflaschen exponiert, der mittlere SAR-Wert lag je nach Versuch zwischen 1,6 und 8,8 W/kg. Es zeigte sich dosisabhängig ein zunehmender Verlust des Chromosoms 17. Eine Interpretation dieser Befunde erscheint zum momentanen Zeitpunkt schwierig, da die Arbeit noch sehr neu ist. Gegenüber den hier sehr breit behandelten Arbeiten mit positiven Befunden steht eine überwiegende Anzahl von Publikationen, die keinen Einfluss von HF-Feldern auf die zytogenetischen Messgrößen in Lymphozyten oder anderen Blutzellen nachweisen konnten. Allein in dem hier betrachteten Zeitraum sind dazu eine Reihe von Arbeiten erschienen. In einer Arbeit von Antonoupoulos et al. (1997) wurden menschliche periphere Lymphozyten vergleichbar wie bei Maes et al. untersucht. Getestet wurden Felder von 380 MHz (SAR 80 mW/kg; Frequenz und Pulsmuster entsprechen dem digitalen Polizeifunk) 900 MHz GSM Pulsmuster (SAR 200 mW/kg) und 1800 MHz GSM (SAR 1,7 W/kg). Die Vollblutkulturen wurden für 48, 52, 56, 64 und 68 h im Hohlleiter exponiert. Die untersuchten Endpunkte waren die Geschwindigkeit der Zellteilung (Proliferationsindex) und der Schwesterchromatidaustausch. Es ließ sich kein Einfluss der HF-Felder zeigen. Es muss erwähnt werden, dass dieser Studie das Blut von 15 Spendern zugrunde lag und nicht nur wenige Spender wie bei vielen anderen Publikationen. In einer ganzen Serie von Studien haben sich Vijayalaxmi et al. von 1997 bis 2001 mit der Frage der Mutagenität von HF-Feldern beschäftigt. Zuerst soll eine Tierstudie erwähnt werden, die wegen der

langen Expositionszeiten bemerkenswert ist (Vijayalaxmi et al. 1997A). Mäuse, die wegen eines Virus besonders leicht ein Mammakarzinom entwickeln, wurden für 18 Monate, 7 Tage in der Woche, täglich 20 h einem HF-Feld von 2450 MHz mit einem SAR-Wert von 1 W/kg ausgesetzt. 62 Tiere waren im Feld 58 dienten als Kontrollen, 7 wurden als Positivkontrollen mit Mitomycin C behandelt. Untersucht wurde die Häufigkeit von Mikrokernen in polychromatischen Erythrozyten. Dies erscheint zunächst überraschend, da Erythrozyten normalerweise keinen Zellkern mehr haben. Das Prinzip des Testes beruht darauf, dass sich entwickelnde Erythrozyten ihren Zellkern ausstoßen, nicht jedoch Mikrokerne, die sich bei der letzten Teilung der Vorläuferzellen, Erythroblasten, gebildet haben. Besonders in jungen Erythrozyten findet man diese Mikrokerne noch. Junge Erythrozyten enthalten noch viel ribosomale RNA, die sich gut färben lässt. Solche Erythrozyten werden daher als polychromatisch bezeichnet. Im peripheren Blut der Maus finden sich ca. 3% polychromatische Erythrozyten. Im Knochenmark trifft dies auf ca. 50% zu. Diese Zellen wurden auf das Auftreten von Mikrokernen hin ausgewertet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen üblichen Mutagenitätstest, der Parameter sprach auch sehr deutlich auf die Gabe von Mitomycin C an. Weder Erythrozyten aus dem peripheren Blut noch aus dem Knochenmark wiesen nach der langen Zeit im Feld eine erhöhte Frequenz von Mikrokernen auf. Eine ganz ähnliche Tierstudie wurde später an 16 Ratten vorgenommen (Vijayalaxmi et al., 2001C). Acht Tiere wurden für 24 h in einem 2450 MHz Feld mit einem SAR-Wert

von 12 W/kg in Hohlleitern exponiert, acht wurden scheinexponiert und vier mit Mitomycin C stimuliert. Ausgewertet wurden wieder die polychromatischen Erythrozyten in Bezug auf Mikrokerne. Ein Einfluss des Feldes wurde nicht festgestellt. In einer Serie von Studien an peripherem menschlichem Blut wurden von Vijayalaxmi et al. (1997B; 2000; 2001A; 2001B) unterschiedliche HF-Felder auf ihre Mutagenität hin getestet. Die biologischen Endpunkte der Studien aus 1997B, 2001A und 2001B waren der Proliferationsindex, Chromosomenschäden, zweikernige Zellen und Mikrokerne. Als Positivkontrolle diente jeweils eine Bestrahlung mit Gamma Strahlen (150 cGy), die die einzelnen Parameter in der erwarteten Weise beeinflusste. In der ersten Studie (Vijayalaxmi et al., 1997B) wurden die Zellen für 90 min zusammenhängend oder in drei 30 minütigen Blöcken einem 2450 MHz Feld mit einem SAR-Wert von ca. 12,5 W/kg ausgesetzt. In der Studie (Vijayalaxmi et al., 2001A) wurde ein 835,62 MHz Feld mit FDMA Modulation mit einem SAR-Wert von ca. 5 W/kg für 24 h getestet und in einer zweiten Studie (Vijayalaxmi et al., 2001B) wurde ein 847,74 MHz Feld mit CDMA Modulation mit einem SAR-Wert von 5,5 W/kg für 24 h angewendet. In keiner der Studien zeigte sich ein Einfluss der HF-Felder auf einen der untersuchten Parameter. In der Studie aus 2000 (Vijayalaxmi et al., 2000) wurde das Blut für 2 h einem 2450 MHz Feld mit einem SAR-Wert von ca. 2 W/kg ausgesetzt. Anschließend konnten die Zellen für 4 h ruhen. Dieses Schema wurde den Studien von Lai und Singh angepasst. Daher wurde hier auch der „alkaline comet assay“ als Untersu-

chungsmethode eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten mit Gammastrahlung bestrahlte Proben. In den Proben, die dem HF-Feld ausgesetzt gewesen waren zeigte sich kein Effekt des Feldes, in den Positivkontrollen ließen sich deutliche Einflüsse nachweisen.

Eine Studie an menschlichem peripherem Blut führten auch McNamee et al. (2002) mit einem 1900 MHz Feld durch. Dabei lagen die SAR-Werte je nach Versuch zwischen 0 und 10 W/kg und die Dauer der Feldexposition bei 2 h. In Leukozyten wurden die Untersuchungen mit dem „alkaline comet assay“ durchgeführt und es ließ sich kein Einfluss des Feldes nachweisen, ebenso wenig wie auf die Häufigkeit von Mikrokernen.

Ein im wesentlichen negatives Ergebnis bezüglich des Auftretens von Mikrokernen lieferte auch eine Studie an menschlichen Lymphozyten von d'Ambrosio et al. (2002). Die Kulturen wurden für nur 15 min einem unmoduliertem Feld von 1748 MHz mit einem SAR-Wert von ca. 5 W/kg ausgesetzt. Allerdings ergab sich bei Amplitudenmodulation ein Einfluss.

3. Promotion

3.1 Signalsysteme

Innerhalb von Zellen gibt es eine Vielzahl von Signalsystemen mit deren Hilfe die Reaktionen der Zelle auf äußere Reize gesteuert werden. Signalsysteme können sehr schnell sein, es werden nur wenige Millisekunden für die Aktivierung und das Abklingen eines Signals benötigt wie z.B. die Aktionspotentiale in erregbaren Zellen, oder Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration, $[Ca^{2+}]_i$. Dem stehen intermediäre Signale gegenüber wie z.B. Phosphorylierungsreaktionen, d.h. Enzyme werden mit einer Phosphatgruppe versehen und auf diese Weise aktiviert. Langsame Signalsysteme bedeuten, dass Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, diese schalten Gene ein und die Gene werden in neue Proteine überführt. Diese neuen Proteine verleihen der Zelle neue Eigenschaften. Häufig sind Signalwege sehr komplex, sie beginnen mit einem schnellen Signal und enden schließlich in einer veränderten Genexpression. Auch die Zellteilung wird über mehrstufige Signalkaskaden eingeleitet, daher ist die Beeinflussung von Signalsystemen hier in dem Kapitel Promotion untergebracht, obwohl viele Signalsysteme nicht zur Zellteilung führen, sondern völlig andere Wirkungen haben.

3.1.1 Kalzium

Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ stellen ein wichtiges intrazelluläres Signalsystem dar, welches z.B. zelluläre Bewegung, Muskelkontraktion, Herzschlag, Signalübertragung zwischen Nervenzellen, Hormonfreisetzung und Zellteilung steuern kann. Daher ist der Einfluss von HF-Feldern auf die Kalziumhomöostase schon

häufig untersucht worden, besonders in der Zeit zwischen 1978 und 1991. Bei diesen Studien wurden im wesentlichen sinusförmig modulierte HF-Felder angewendet. Die entsprechenden Arbeiten sind in dem Übersichtsartikel Meyer (1999) ausführlich beschrieben. Die Untersuchungen zur Interaktion von HF-Feldern mit der Kalziumhomöostase wurden in den letzten Jahren um Studien zur Wirkung von Feldern des Mobilfunks erweitert. An isolierten Herzmuskelzellen des Meerschweinchens wurde erstmals die intrazelluläre Kalziumkonzentration, $[Ca^{2+}]_i$, während der Anwesenheit von HF-Feldern direkt gemessen (Wolke et al., 1996). Bei einem SAR-Wert von ca. 15 mW/kg wurden bei 900, 1300 und 1800 MHz Trägerfrequenz die Pulsmuster des GSM-Standards (217 Hz, Puls/Pause-Verhältnis 1/8, 100% Pulshöhe) getestet. Daneben wurde bei 900 MHz auch ein kontinuierliches Feld sowie Pulsraten von 16 und 50 Hz sowie 30 kHz getestet. Z.T. wurden Zellen depolarisiert und dann dem Feld (900 MHz, GSM-Standard) ausgesetzt. Unter keiner der Bedingungen konnte ein Einfluss der Anwesenheit eines Feldes auf die $[Ca^{2+}]_i$ nachgewiesen werden. Diese Arbeit diente nicht dazu, die älteren Arbeiten zu überprüfen, sondern war speziell auf die Wirkung der im Mobilfunk eingesetzten Frequenzen ausgerichtet. Es konnten mit dieser Technik keine Hinweise für eine Beeinflussbarkeit der Kalziumhomöostase gezeigt werden.

In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe (Linz et al., 1999), wurde mit Hilfe der „patch clamp“-Technik in der „whole cell“ Konfiguration der Einfluss von Feldern des Mobilfunks auf das Membranpotential, die Aktionspotentiale sowie den L-Typ Ca^{2+} -Strom und die Kaliumleit-

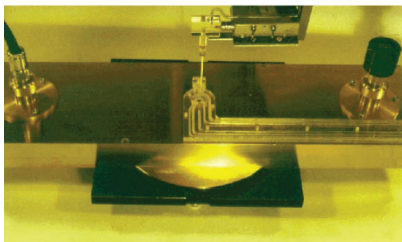


Abb. 3 A: Expositionseinrichtung zur elektrophysiologischen Untersuchung isolierter Herzmuskelzellen aus Linz et al. (1999). Es handelt sich um einen Hohlleiter in den eine spezielle Versuchskammer eingebracht wird. Die Versuchskammer ist zur besseren Darstellung aus dem Hohlleiter entnommen und in der korrekten Anordnung oben aufgelegt. Der Hohlleiter hat an der Oberseite eine Bohrung, durch die eine Glasmikroelektrode (im Bild oberhalb der Versuchskammer) von außen eingebracht werden kann. Genau gegenüber unter den Zellen befindet sich eine weitere Bohrung in der unteren Wand des Hohlleiters. Diese ist durch ein sehr engmaschiges Kupfergitter (elektronenmikroskopischer Objektträger) abgedeckt. Durch die Maschen im Kupfernetzchen kann man die Zellen mikroskopisch betrachten. Dies ist notwendig, um die Elektrode exakt auf eine Zelle aufzusetzen.

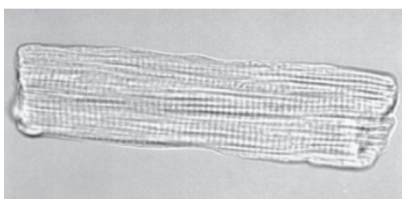


Abb. 3 B: Mikroskopisches Bild einer isolierten Herzmuskelzelle des Meerschweinchens. Die Querstreifung entsteht durch die regelmäßige Anordnung der Proteine Aktin und Myosin, die die Verkürzung der Zelle und damit auch den Herzschlag verursachen. Die Querstreifung hat eine Periodizität von ca. $2 \mu\text{m}$, die Zelle ist ca. $120 \mu\text{m}$ lang.

fähigkeit von Herzmuskelzellen des Meerschweinchens und der Ratte untersucht (Abb. 3). Auf keinen der gemessenen Parameter konnte unter den Messbedingungen 900 und 1800 MHz gepulst nach dem GSM-Muster unter SAR-Werten zwischen 80 und 500 mW/kg ein Einfluss nachgewiesen werden. Es ist im Rahmen dieser Studie wichtig zu erwähnen, dass eine Veränderung des an die Zelloberfläche gebundenen Ca^{2+} auch eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des L-Typ Ca^{2+} -Stromes gefolgt wäre (Abb. 3).

Mit einer ähnlichen Technik wie in der Studie von Wolke et al. (1996) wurde eine Untersuchung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an menschlichen T-Lymphozyten der Zelllinie Jurkat vorgenommen (Cranfield et al., 2001). Die Zellen wurden für 10 min einem Feld von 915 MHz (SAR 2 W/kg) gepulst entsprechend der GSM Norm oder kontinuierliches Feld ausgesetzt. Zusätzlich wurden die Zellen mit Phytohämagglutinin stimuliert, wodurch eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgelöst wird bzw. wiederkehrende Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sogenannte Kalziumtransienten. Auch unter diesen Bedingungen wurde die Wirkung des Feldes getestet. Das Feld hatte auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der unstimulierten Zellen keinen Einfluss, allerdings änderte sich unter dem gepulsten Feld die Frequenz der Kalziumtransienten der stimulierten Zellen. Trotzdem schlussfolgern die Autoren, dass es keinen klaren Hinweis für eine Beeinflussung der Kalziumsignale der Lymphozyten durch HF-Felder gibt.

3.1.2 Proto-Onkogene

Proto-Onkogene werden bei Stress, Zellwachstum und Zellvermehrung angeschaltet. Der Nachweis einer Anschaltung von Proto-Onkogenen kann daher als sehr früher Hinweis

für eine bevorstehende Zellteilung angesehen werden, auch wenn die eigentliche Zellteilung oft gar nicht eingeleitet wird. Umgekehrt gilt jedoch, dass Proto-Onkogene vermehrt in entarteten Zellen exprimiert werden. Eine wichtige Eigenschaft der Proto-Onkogene besteht darin, dass sie durch geringfügige Mutationen in ein Onkogen umgewandelt werden können, welches dann eine Zelle transformieren kann, also in eine entartete Zelle eine Krebszelle überführen kann. Trotzdem erfolgte die Einordnung unter der Signalmolekülen, da die Proteine, die sie codieren, häufig Signalmoleküle sind.

Von besonderem Interesse ist natürlich die Expression von Proto-Onkogenen in neuronalen Zellen. Eine Untersuchung dazu wurde von Ivaschuk et al. (1997) an der Nervenzelllinie PC12 vorgelegt. Die Zellen wurden durch NGF, „nerve cell growth factor“, stimuliert und einem TDMA-Feld mit 0,09, 0,9 und 9 mW/cm² in einer TEM-Zelle für 20, 40 und 60 min ausgesetzt. Bei 0,9 mW/cm² werden SAR-Werte zwischen 0,5 und 4,8 mW/kg in der TEM-Zelle erreicht. Das Feld wurde nach jeweils 20 min für 20 min ausgeschaltet und dann wieder für 20 min angeschaltet, um so die unterbrochene Exposition beim Telefonieren zu simulieren. Es wurde kein Einfluß auf die Expression des Proto-Onkogen *c-fos* festgestellt werden, aber die Expression des Proto-Onkogen *c-jun* wurde bei dem höchsten SAR nach 20 min Exposition um 40 % reduziert. Diese Reduktion ist nach Meinung der Autoren möglicherweise ohne physiologische Relevanz. In einem Tierversuch haben Fritze et al. (1997B) die Expression von Protoonkogenen im Rattengehirn verfolgt. Die Ratten wurden in einer

„Karussell-Expositionsapparatur“ (Burkhardt et al., 1997) für 4 h einem GSM-Feld ausgesetzt, welches von einem modifizierten GSM-Telefon gesendet wurde. Die Tiere sind dabei in Kunststoffröhren untergebracht, die wie die Speichen eines Rades um eine im Zentrum stehende Antenne angeordnet sind. Die Köpfe der Tiere sind an der Seite der Rohre, die der Antenne zugewandt sind. 150 Ratten waren in fünf Gruppen von je 30 Tieren aufgeteilt. Eine Gruppe bildete die Käfigkontrolle, eine Gruppe wurde scheinexponiert, eine wurde bei einem SAR-Wert von 0,3 W/kg exponiert, eine mit 1,5 W/kg und eine mit 7,5 W/kg. Wobei die Gruppe bei 7,5 W/kg in einem kontinuierlichen Feld war, während die beiden anderen einem GSM-Feld ausgesetzt waren. Die Tiere wurden mit *in situ* Hybridisierung unter anderem auf *c-fos* und *c-jun* m-RNA (Boten-Ribonukleinsäure) Expression in verschiedenen Hirnarealen untersucht (Kleinhirn, Rinde, Striatum, Hippocampus, Riechhirn und piriformer Kortex, der auch an der Geruchsverarbeitung beteiligt ist). Ein weiteres Zielgen codiert das „glial fibrillary acidic protein (GFAP)“. Dieses dient als Marker für eine Aktivierung der Astrozyten, die zu den Gliazellen des Zentralnervensystems gehören. Es wird besonders bei einer Verletzung des Hirngewebes gebildet. Außerdem wurde der Feldeinfluss auf das „heat shock“ Protein 70 verfolgt, dies wird in dem späteren Kapitel über die „heat shock“ Proteine gesondert besprochen. Die *in situ* Hybridisierung wurde an Tieren durchgeführt, die sofort nach der Exposition untersucht wurden. Zusätzlich wurden die FOS und JUN Proteine 24 h nach Exposition immunzytochemisch nachgewiesen und sieben Tage nach

der Exposition wurde dann noch die Zellvermehrung und Expression einiger Marker der Glia ausgewertet. Die *c-jun* Expression wurde in keiner Gruppe beeinflusst, die *c-fos* Expression erschien in einigen Hirnarealen der scheinexponierten und der exponierten Tiere gegenüber den Käfigkontrollen leicht erhöht, was möglicherweise auf die Immobilisierung in der Versuchsapparatur zurückzuführen ist. Zwischen den scheinexponierten und den exponierten Tieren gab es keine Unterschiede, d.h. die Exposition im Feld hatte keinen Einfluss.

In einer Tierstudie haben Morrissey et al. (1999) die *c-fos* Expression unter der Einwirkung von Feldern des Iridium Satellitentelefonensystems im Gehirn von Mäusen untersucht (Abb. 4). Die Autoren haben eine ähnliche Karussell-Expositionsapparatur eingesetzt wie die bei Burkhardt et al. (1997) beschriebene (Swicord et al., 1999). Es wurden acht Gruppen mit je 5-15 Tieren gebildet, davon wurden fünf für eine Stunde dem Feld ausgesetzt (1600 MHz mit 11 Hz gepulst „duty cycle“ 4:1, Pulsdauer 9,2 ms; mittlere SAR-Werte im Gehirn 0,35, 0,7, 1,7, 4,3, 11,2 W/kg, der höchste Wert war ein CW-Feld). Die akut untersuchten Bereiche des Gehirns waren ca. 30% niedrigeren SAR-Werten ausgesetzt als die angegebenen mittleren Werte. Drei Gruppen dienten als Kontrollen eine wurde scheinexponiert, eine verblieb im Käfig und bei einer wurden die *c-fos* Expression durch eine orale Lindangabe ausgelöst. Ab lokalen SAR-Werten von mehr als 2,75 W/kg wurde eine signifikant erhöhte *c-fos* Expression gezeigt. Man muss allerdings berücksichtigen, dass unter diesen Bedingungen ein Ganzkörper SAR von 2,5 W/kg vorliegt also

deutlich über den üblichen Grenzwerten. Die Autoren interpretieren die Effekte als thermisch. Neben den dargestellten Untersuchungen an neuronalen Zellen und Geweben wurden auch Experimente an anderen Zelltypen zur Expression von Onkogenen vorgenommen. In einer *in vitro* Studie an C3H 10T $\frac{1}{2}$ Zellen, eine Bindegewebszelllinie der Maus, die schon früher erwähnt wurde, wurde die Expression der Proto-Onkogene *c-fos* und *c-jun* sowie die DNA-Bindungsfähigkeit der Transkriptionsfaktoren AP1, AP2 und NF- κ B unter dem Einfluss von HF-Feldern verfolgt (Goswami et al., 1999). Die Felder entsprachen dem „frequency-modulated continuous wave“ (FMCW) Muster bei 835,62 MHz und dem „code division multiple access“ (CDMA) Muster bei 847,74 MHz. Die Zellen wurden in einer radialen Wellenleitung bei einem SAR-Wert von 0,6 W/kg für 24 h dem jeweiligen Feld ausgesetzt. Der Einfluss der Felder auf die Zellen wurde getestet, während sich die Zellen in unterschiedlichen physiologischen Zuständen befanden, 1. zu Beginn, 2. während, 3. am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Die Zellen waren jeweils für 4 Tage im Feld. Zusätzlich wurden Zellen durch 48 stündigen Serumentzug in eine Hungerphase gebracht. Die letzten 24 h dieser Hungerphase verbrachten die Zellen im Feld. Dann wurden die Zellen durch Serumgabe stimuliert und in unterschiedlichen Zeiten nach der Stimulation untersucht (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 5 h). Bei zwei Feldkonfigurationen, vier physiologischen Zuständen z.T. mit Zeitreihen und sechs untersuchten Indikatoren ergeben sich ohne Kontrollen schon eine Vielzahl von Untersuchungsgruppen. In allen diesen Gruppen zeigte sich kein Einfluss des Feldes

mit zwei Ausnahmen bei denen sich ein leichter signifikanter Anstieg der *c-fos* Expression ergab und zwar während und am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Nach Meinung der Autoren zeigt dies die prinzipielle Möglichkeit von HF-Feldern, Genexpression zu beeinflussen, eine generelle Stressantwort konnte jedoch nicht ausgelöst werden.

Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B wie die Onkogene durch zellulären Stress aktiviert wird, soll eine Arbeit, die sich ausschließlich mit der Interaktion von gepulsten HF-Feldern mit NF- κ B beschäftigt, hier besprochen werden (Natarajan et al., 2002). Bei der Arbeit kam es darauf an, möglichst starke Pulse zu erzeugen, da die Wirkung der Pulsung getestet werden sollte. Die Trägerfrequenz von 8,2 GHz wurde

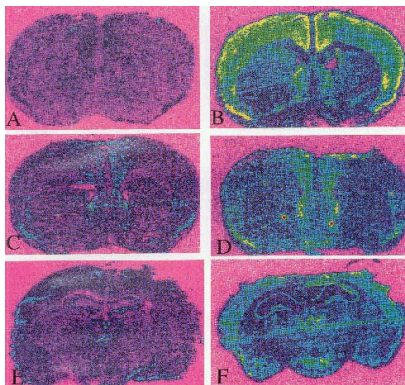


Abb. 4: Schnitte durch die Gehirne verschiedener Mäuse aus Morrissey et al. (1999). Die Expression des Proto-Onkogens *c-fos* ist durch eine radioaktive Markierung sichtbar gemacht. Die Verteilung der Radioaktivität wurde anschließend in Falschfarben im Computer dargestellt. A. Gehirnschnitt einer unbehandelten Maus, B. Gehirnschnitt einer Maus, die Lindan eingenommen hat. Lindan induziert die Expression von *c-fos* (Positivkontrolle), C. Gehirnschnitt einer scheinexponierten Maus, D. Gehirnschnitt einer Maus, die einem Feld eines SARs von 7,79 W/kg ausgesetzt war. E., F. vergleichbar C. und D. jedoch Schnitte aus einer anderen Region des Gehirns.

ausgewählt, da hier eine Strahlungsquelle verfügbar war, die eine entsprechende Pulsung zuließ. Die Pulsdauer war 2,2 μ s bei einer Wiederholungsfrequenz von 1000 Hz. Die Leistungsrelation zwischen Puls und Pause war 455:1. Es wurden menschliche Monozyten dem Feld für 90 min ausgesetzt, wobei der mittlere SAR-Wert in der Kulturflasche bei $10,8 \pm 7,1$ W/kg betrug. Dies zeigt einerseits eine recht große Inhomogenität des Feldes, und andererseits ergeben sich an einigen Stellen der Kulturflasche SAR-Werte deutlich im thermischen Bereich. Insofern kann die beobachtete Steigerung der NF- κ B Bindung an die DNA (3,6 fach) auf Erwärmung zurückzuführen sein. Menschliche T-Lymphozyten der Zelllinie Jurkat und Leydig Zellen der Linie TM3 wurden in einer Studie einem 50 MHz Feld ausgesetzt, welches mit 16 Hz sinusförmig moduliert war (Romano-Spica et al., 2000). Diese Art der Feldmodulation wurde gewählt, da damit eine Beeinflussung Kalzium abhängiger Signalwege besonders effektiv möglich sein soll. Die dieser Theorie zugrundeliegenden älteren Arbeiten sind in Meyer (1999) ausführlich besprochen. In beiden Zellarten führte die 16 Hz Modulation zu einer erhöhten Expression des *ets1* Onkogenes. Die Autoren sehen ihr Ergebnis als eine Bestätigung der älteren Befunde zur Beeinflussung der Kalziumhomöostase mit neuer Technik an. Eine Beeinflussung der Proto-Onkogene durch HF-Felder erscheint nach diesen Studien prinzipiell möglich. Allerdings tritt dieser Einfluss regelmäßig erst bei SAR-Werten im thermischen Bereich auf. Hier sollten die bestehenden Grenzwerte allerdings Schutz bieten.

3.2 Zellvermehrung

3.2.1 Ornithindecaboxylase

Ein wichtiger Marker für die DNA Replikation und damit die Zellvermehrung ist die Ornithindecaboxylase, ODC (Abb. 5). Dieses Enzym wird bei Zellen, die in eine unkontrollierte Vermehrung übergehen, vorher hochreguliert (Auvinen et al., 1992). Es kann also als Marker für entartete Zellen dienen. Ein Zusammenhang zwischen der Einwirkung niederfrequenter Magnetfelder und der ODC-Aktivität ist schon vielfältig beschrieben worden (Tabelle in: Mullins et al., 1999).

Einige Arbeiten beschäftigen sich auch mit dem Einfluss von HF-Feldern auf die ODC-Aktivität. In einer ersten Arbeit setzten Byus et al. (1988) drei Zelllinien, nämlich Leber- und Ovarkarzinomzellen sowie Melanomzellen, einem 450 MHz Feld, 16 Hz sinusförmig amplitudenmoduliert mit einer Leistungsflussdichte von 1 mW/cm² für eine 1 Stunde aus. In allen Zelllinien wurde ein signifikanter Anstieg, bis 50%, der ODC-Aktivität induziert. Auch die durch Phorbolster stimulierte ODC-Aktivität ließ sich durch das Feld weiter steigern.

In einer Untersuchung von Penafiel et al. (1997) wurde der Einfluss von 835 MHz Feldern auf die ODC-Aktivität in kultivierten Bindegewebszellen der Maus, Zelllinie L929, untersucht. Es wurden eine ganze Reihe von Modulationsmustern getestet unter anderem Frequenz-, Amplituden- und Pulsmodulation. Die Frequenz- und die Pulsmodulation entsprachen den US-Normen für Mobiltelefone (AMPS und TDMA). Die SAR-Werte schwankten zwischen 1 und 3 W/kg je nach Lage in der TEM-Zelle. Die Expositionszeiten

wurden zwischen 2 und 24 Stunden variiert. Bei 16 und 60 Hz Amplitudenmodulation bei 50 Hz Pulsung und bei Pulsung nach dem TDMA Standard kam es zu einem Anstieg der ODC-Aktivität auf das 1,5 - 2 fache. Frequenzmodulierte Signale wie auch CW-Felder waren weitgehend wirkungslos. Die Autoren bestätigen damit Befunde aus ihrer älteren Arbeit (Litovitz et al., 1993), in der sie bei 8 h Exposition keinen Effekt von CW-Feldern gefunden haben. Penafiel et al. (1997) interpretieren ihre Befunde so, dass eine regelmäßige niederfrequente Veränderung des hochfrequenten Trägers wesentlich für die Steigerung der ODC-Aktivität ist. Diese Interpretation wird durch eine weitere Studie aus der gleichen Arbeitsgruppe aus dem gleichen Jahr noch untermauert (Litovitz et al., 1997), denn die Autoren haben hier HF-Feldbedingungen (SAR 2,5 W/kg, 8 h, Frequenz 835MHz, Pulsung 50 Hz (nach dem Digital Advanced Mobile Phone System Muster) eingestellt, unter denen die ODC Aktivität in den L929 Zellen deutlich ansteigt. Dieser Anstieg ließ sich durch eine Überlagerung des gepulsten HF-Signals mit Rauschen verhindern. Leider haben die Autoren nach diesen Studien nicht weiter über die Induktion der ODC Aktivität durch HF-Felder gearbeitet, sondern sich den Einflüssen niederfrequenter Magnetfelder auf die ODC Aktivität (Farrell et al., 1998; Mullins et al., 1999) zugewendet. Auch andere Arbeitsgruppen haben diese Befunde bisher nicht weiterverfolgt, so dass sie nicht unabhängig reproduziert wurden.

3.2.2 Zellteilungs-geschwindigkeit

Einige der Studien, die im Kapitel 2.3 vorgestellt wurden, beinhalten nicht nur zytogenetische Untersuchungen, z.T. ist auch die Zellteilungsgeschwindigkeit beobachtet worden (Antonopoulos et al. 1997, d'Ambrosio et al., 2002). In einer Studie an C3H 10T $\frac{1}{2}$ Zellen, eine

Bindegewebszelllinie der Maus, und an menschlichen U87MG Zellen, eine Glioblastoma Zelllinie, wurde der Einfluss von 835,62 Feldern und 847,74 MHz CDMA-Feldern auf die Zellvermehrung getestet (Higashikubo et al., 2001). Die Zellen wurden z.T. kurzzeitig bis 13 h oder langandauernd 24, 48, 72, 96 h in den Feldern kultiviert unter einem SAR-

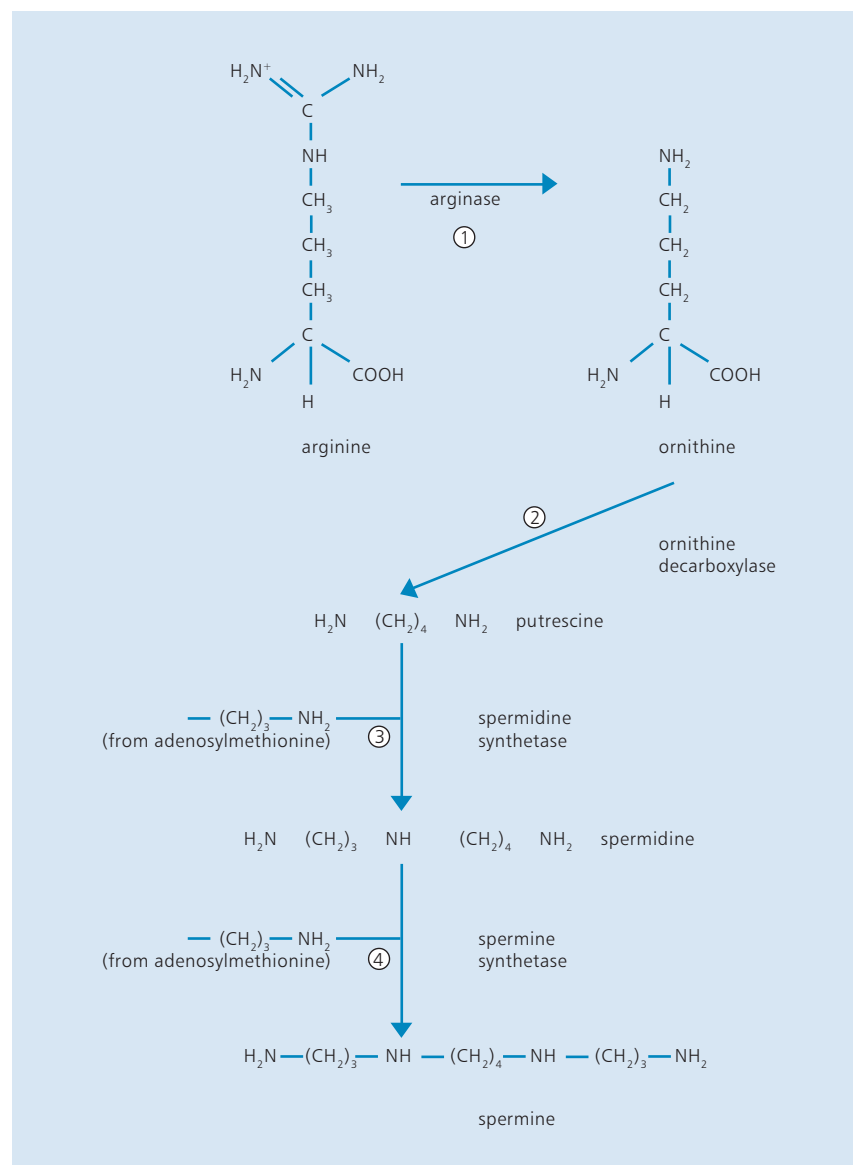


Abb. 5: Stoffwechselweg, bei dem das Enzym Ornithindecarboxylase eine wichtige Funktion hat. Im ersten Schritt wird aus der Aminosäure Arginin durch Abspaltung der endständigen CN_2H_4 -Gruppe die Aminosäure Ornithin gebildet. Die Ornithindecarboxylase spaltet die endständige Carboxylgruppe, CO_2H , ab, es entsteht das Amin Putrescin, welches in zwei weiteren Schritten in Spermin umgewandelt wird.

Wert von 0,6 W/kg. Die Teilung der Zellen wurden untersucht, indem der Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) verfolgt wurde (vgl. Abb.2). Bei keiner der Zelllinien in keiner der Proben ließ sich ein Einfluss der Exposition im Feld auf die Zellteilung nachweisen.

4. Metastasierung

Nur wenn Zellen aus einem Tumor auswandern können und über das Gefäßsystem in andere Gewebe eindringen können, können Metastasen, Tochtergeschwülste, gebildet werden. Dies stellt eine der hauptsächlichsten Gefahren bei Krebserkrankungen dar. Selbstverständlich ist dieser Vorgang sehr komplex und wird von vielen Steuerungssignalen in Zellen und von vielen Eigenschaften der auswandernden Zellen beeinflusst. Insgesamt sind die Vorgänge bei der Bildung von Metastasen vielfältig und hängen stark von der Art des primären Tumors ab. Viele der beteiligten Vorgänge sind noch wenig verstanden. Daher ist die Zuordnung von Experimenten zu diesem Kapitel sehr schwierig und nicht eindeutig. Die Beweglichkeit von Zellen trägt dazu bei, diese wird von Kalziumsignalen gesteuert. Entsprechende Versuche wurden hier unter Signalsystemen eingeordnet. Die beiden hier unter diesem Kapitel eingeordneten Experimentklassen nämlich die Hitzeschockproteine, „heat shock“-Proteine, hsp, und die Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke wurden hier zusammengefasst, da eine Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke den Durchtritt von Zellen erleichtern könnte, und die Expression von hsp möglicherweise die Permeabilisierung der Blut-Hirn-

Schranke begünstigen könnte. Diese Einordnung ist also nicht eindeutig, und bedeutet auch nicht, dass eine Expression von hsp generell eine Metastasierung fördert, sondern es handelt sich primär um einen Schutzmechanismus, wie unten erläutert wird.

4.1 Hitzeschockproteine

In den letzten Jahren hat sich ein neues sehr interessantes Forschungsfeld etabliert, nämlich der potentielle Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf „heat shock“-Proteine, hsp. Zellen reagieren normalerweise auf Hitzeeinwirkung indem sie Transkription und Translation der meisten Gene einstellen. Es werden jedoch Hitzeschockgene angeschaltet und „heat shock“-Proteine synthetisiert. Die hsp verbessern die Überlebenschancen bei erhöhter Temperatur. Eine der Hauptfunktionen der hsp ist die Verhinderung unerwünschter Wechselbeziehungen zwischen Proteinen, die zur Proteinaggregation und fehlerhafter Faltung führen könnten. Hsp erleichtern die korrekte Faltung von Proteinen.

Eine Reihe von Untersuchungen zur Interaktion von niederfrequenten Magnetfeldern mit Hitzeschockproteinen sind in letzten Jahren erschienen. Da die Wirkung niederfrequenter Felder nicht im Fokus dieses Artikels steht, sollen sie hier nur kurz besprochen werden. Die Arbeitsgruppe um Blank und Goodman hat in einer Serie von Studien einen Anstieg von hsp70 unter dem Einfluss von 60 Hz Magnetfeldern (8 μ T) gezeigt (Lin et al., 1997; 1998; 1999). In einer weiteren Studie wird versucht, den Anstieg von hsp70 unter 60 Hz Magnetfeldern zu maximieren, um die anschließende Schutzfunktion während

chirurgischen Eingriffen nutzen zu können (Han et al., 1998).

Der Idee eine Schutzwirkung auszulösen, folgten auch DiCarlo et al. (1998; 1999) als sie Hühnerembryonen einem magnetischen Feld (60 Hz, 4, 6, 8 oder 10 μ T) für 20 min aussetzten. Nach einer Stunde Erholungszeit wurden die Embryos unter anoxischer Atmosphäre (1% O₂) gehalten bis nur 40% der Kontrollen noch Herzschlag zeigten. Die Embryonen, die vorher dem Feld ausgesetzt waren, zeigten eine signifikant verbesserte Überlebensrate (68,7%). Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch durch eine vorherige Erwärmung anstatt des Aufenthaltes im Feld erzielen. Hitzeschockproteine selbst wurden in dieser Studie nicht gemessen, jedoch werden die Ergebnisse als Folge einer „heat shock“-Proteinexpression gedeutet (DiCarlo et al., 1999). Der Zusammenhang zwischen hsp70 und HF-Feldern des Mobilfunks wurde erstmals in der Studie von Fritze et al. (1997B) untersucht (vgl. Kap. 3.1.2). Daher wird der Versuchsaufbau hier nicht näher beschrieben. An den gleichen Präparaten, an denen auch die Induktion der Proto-Onkogene verfolgt worden ist, wurde die Transkription von hsp70 mRNA mit *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Untersucht wurden wieder die gleichen Hirnregionen: Cerebellum (Kleinhirn), Cortex (Rinde), Hippocampus, Entorhinaler Cortex (Riechhirn), Striatum, Piriformer Cortex. Nach 4 h Stunden im Feld ließ sich bei einem SAR-Wert von 7,5 W/kg eine signifikante Erhöhung der mRNA für hsp70 im Cerebellum und im Hippocampus nachweisen. Allerdings zeigte sich keinerlei Dosisabhängigkeit; denn weder bei einem SAR von 0,3 noch von 1,5 W/kg ergab sich gegenüber

den Kontrollen eine Tendenz zum Anstieg. Bei dem Nachweis des Proteins, also dem endgültigen Produkt der Proteinbiosynthese, ließ sich kein Anstieg des hsp70 zeigen. Dies muss nicht bedeuten, dass ein Widerspruch zur Messung der mRNA besteht, sondern kann auch durch eine kürzere Lebenszeit der mRNA erklärbar sein. Allerdings ist der Proteinnachweis mit Antikörpern im Schnittpräparat nicht so empfindlich wie der mRNA Nachweis. Trotzdem darf man die negativen Ergebnisse im Proteinnachweis nicht unterschätzen; denn die in der sehr sorgfältig durchgeführten Studie eingebauten Positivkontrollen zum Proteinnachweis zeigten einen deutlichen Anstieg des hsp70. Die Technik des Proteinnachweises war also in Ordnung.

Da die Expression von hsp einen Mechanismus darstellt, mit dem Zellen auf vielerlei Stress antworten, wurde ein Wurm, *Caenorhabditis elegans*, genetisch so verändert, dass er bei Induktion eines hsp ein anderes leicht nachweisbares Protein synthetisiert (ein beta-Galactosidase Reporter steht unter der Kontrolle eines hsp16-Promotors). Vor dem Hintergrund, dass möglicherweise auch HF-Felder die Expression von hsp induzieren könnten, setzten Daniells et al. (1998) den Wurm in einer TEM-Zelle für 2, 4, 8, 16 h unmodulierten HF-Feldern von 300 und 750 MHz aus. Signifikante Induktion des Reporters wurde nur nach 2 und 16 h erzielt. Das Feld selbst ist nicht angegeben, sondern nur die Einstellungen am Sender, so dass die Feldverhältnisse in der TEM-Zelle nicht eindeutig sind. Insgesamt ein etwas unklares Ergebnis. In einer zweiten Studie aus der gleichen Arbeitsgruppe wurde derselbe Aufbau wieder mit dem veränderten

Wurm eingesetzt (de Pomerai et al., 2000). In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines unmodulierten 750 MHz Feldes mit einem SAR von 0,001 W/kg bei verschiedenen Temperaturen auf die Expression des hsp16 getestet. Ohne Anwesenheit des Feldes zeigte sich ein deutlicher Anstieg des hsp16 ab 25°C, wobei ein drastischer Anstieg erst ab 27°C eintrat. Nach 18 h Exposition im 750 MHz Feld zeigte sich schon bei 24,5°C ein drastischer Anstieg des hsp16, der sich bei 25° und 25,5° noch weiter steigerte. Nach Exposition im Feld stieg die hsp16 Expression so stark an, dass sie bei 25,5°C deutlich höhere Werte erreichte als bei 28°C ohne Feld. Eine Erwärmung der Proben durch das Feld konnten die Autoren an Hand von Temperaturmessungen ausschließen. Sie interpretieren den durch das Feld verstärkten Anstieg der hsp16 Expression als einen athermischen Einfluss des HF-Feldes. Bei diesen Experimenten handelt es sich um einen interessanten neuen Ansatz in der HF-Forschung. In wieweit diese Befunde auf die Situation einer Person, die ein Mobiltelefon einsetzt, übertragbar sind, muss noch diskutiert werden. Zunächst sollten die Befunde durch eine Reproduktion abgesichert werden. Zusätzlich erscheint es lohnend, diese Ergebnisse um Untersuchungen bei anderen Feldkonfigurationen zu erweitern.

In Relation zu der Studie von de Pomerai et al. (2000) zeigen die Ergebnisse einer anderen Studie zu „heat shock“-Proteinen die Spannweite möglicher Ergebnisse (Tian et al., 2002). In der Studie von Tian et al. (2002) wurden Zellen einer Linie eines menschlichen Tumors des Nervensystems, nämlich Gliazellen, untersucht. Es wurde die Expression

von hsp70 nach einer Exposition im unmodulierten 2,45 MHz Feld bei SAR-Werten von 5, 20, 50, 100 W/kg verfolgt. Bei SAR-Werten von mehr als 20 W/kg kam es zu einem zeitabhängigen Anstieg der Expression von hsp70. Ein SAR-Wert von mehr als 20 W/kg ist jedoch weit oberhalb der Grenzwerte und spielt so für Betrachtungen von gesundheitsschädlichen Wirkungen des Mobilfunks keine Rolle.

Die Arbeitsgruppe um Litovitz hat an ihrer Hühnerembryonenpräparation eine Arbeit zur Wirkung von 915 MHz-Feldern auf hsp70 publiziert (Shallom et al., 2002). Eine Steigerung der Expression von hsp70 trat nach zwei Stunden im Feld ein. Nach der Exposition im Feld waren die Embryonen resistenter gegen Hitze-stress (nachgewiesen durch höhere Überlebensraten). Ein bemerkenswertes Ergebnis, da es eine Schutzwirkung des Mobiltelefonierens zeigen könnte.

Eine sehr interessante Studie zu „heat shock“ Proteinen haben Leszczynski et al. (2002) vorgelegt. Sie haben die Wirkung von 900 MHz GSM-Feldern mit einem SAR von 2 W/kg (gemessen und simuliert) auf kultivierte Endothelzellen der Linie EA.hy926 untersucht. Endothelzellen kleiden Blutgefäße aus. Große Blutgefäße sind noch zusätzlich von weiteren Zelllagen wie glatten Muskelzellen umgeben. Bei kleinsten Gefäßen den sogenannten Kapillaren besteht die Gefäßwand nur aus einer Lage Endothelzellen. Die Endothelzellen bestimmen also die Durchlässigkeit der Gefäßwand der Kapillaren. Die Feldexposition erfolgte in einem Hohlleiter für jeweils eine Stunde, wobei die Temperatur auf $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$ stabilisiert war. In der Studie wurde die Expression und die Phosphorylierung von hsp27 ver-

folgt. Die Expression wurde einmal mit Immunfluoreszenz an ganzen Zellen gezeigt und zum anderen an Proteinextrakten der Zellen mit „western-blot“ Analyse. Auch die Phosphorylierung von hsp27 wurde in „western-blot“ demonstriert. Die von den Autoren publizierten Immunfluoreszenzbilder sind nicht quantifiziert und auch nicht sehr aussagekräftig. Freundlicherweise haben die Autoren uns für diesen Beitrag neue technisch bessere und damit aussagekräftigere Bilder zur Verfügung gestellt (vgl. Abb.6). In den „western-blot“ Analysen ließ sich ein zeitabhängiger Anstieg auf 150% der Expression im Vergleich zu den scheinexponierten Zellen zeigen. Dieser Anstieg trat nur direkt nach der Exposition auf, bereits eine Stunde später war das hsp27 auf die Kontrollkonzentration zurückgegangen. Parallel mit der hsp27 Expression wurde die Expression der p38 „mitogen activated protein kinase“ p38MAPK hochreguliert. Die p38MAPK kann hsp27 mit einer

Phosphatgruppe versehen und damit aktivieren. Dies ist eine Erklärung für die beobachtete durch die Feldexposition hervorgerufene zusätzliche Phosphorylierung von hsp27. In einer Folgestudie hat Leszczynski (2002) die Befunde reproduziert und überzeugende Immunfluoreszenzbilder zur HF-Feld induzierten hsp27 Expression gezeigt (ähnlich den hier gezeigten vgl. Abb. 6). Darüber hinaus konnte er hier zeigen, dass der nächste Schritt die in der Signaltransduktionskette eine Veränderung des Aktgerüsts in der Zelle durch das Feld ausgelöst werden kann. Diese Publikation auf einer Kongress-CD stellt sicherlich nur einen Zwischenschritt zur Publikation weiterer Ergebnisse in diese Richtung dar. Die hier vorgestellten Arbeiten zur Induktion von „heat shock“-Proteinen durch HF-Felder sind insofern bemerkenswert, als hier ein Befund vorliegt, der sich unterschiedlichen Systemen zeigte. Die verschiedenen Arbeiten unterstützen sich gegensei-

tig. Klassische Reproduktionsstudien fehlen allerdings noch. Die Ergebnisse an den Endothelzellen werden gemeinsam mit den Befunden zur Blut-Hirn-Schranke nochmals in einem größeren Zusammenhang erläutert.

4.2 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke wird durch eine besondere Ausdifferenzierung der Wand der Blutgefäße im Bereich des Zentralnervensystems, ZNS, gebildet. Die normale Gefäßwand lässt den Durchtritt von relativ hochmolekularen Substanzen in das Gewebe zu. Im Bereich des ZNS sind die Blutgefäße durch spezielle Zellkontakte (tight junctions) zwischen den die Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen besonders gut abgedichtet. Eine zweite Abdichtung wird durch Gliazellen (Astrozyten) gebildet. Diese Barriere schützt die Neurone vor vielfältigen biologischen und chemischen Einflüssen. Schon seit einigen Jahrzehnten wird vermutet,

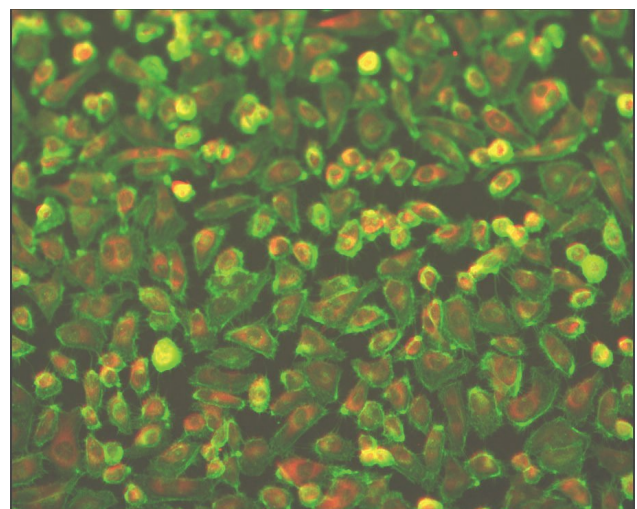
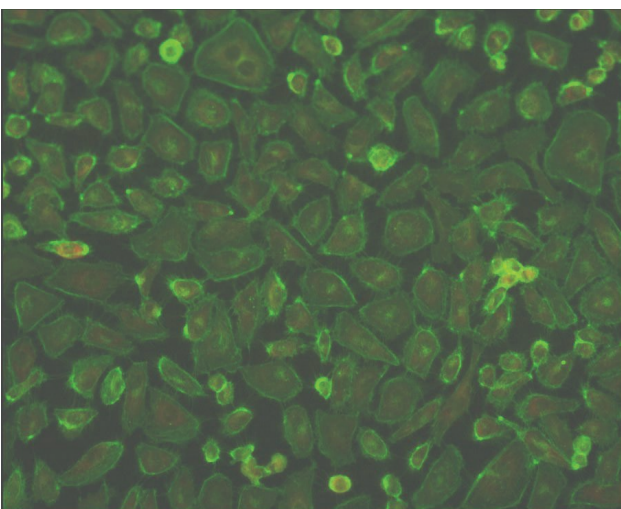


Abb. 6: Kultivierte Endothelzellen der menschlichen Linie EA.hy926. Die Zellen wurden für 1 h in der Expositionseinrichtung inkubiert, entweder als Scheinexposition (Feld ausgeschaltet; linkes Bild), oder bei eingeschaltetem Feld (1800 MHz, SAR 2 W/kg; rechtes Bild). Die Zellen wurden danach gefärbt (Immunfluoreszenz). Elemente des Zellskelettes (Stressfasern) fluoreszieren grün und das „heat shock“ Protein 27 rot. Nach der Exposition im Feld tritt das Hsp27 deutlich stärker hervor. (Die Bilder wurden freundlicherweise von D. Leszczynski und H. Tammio von der STUK-Radiation and Nuclear Safety, Radiobiology Laboratory, Laipatie 4, 00880 Helsinki, Finnland zur Verfügung gestellt).

dass die Blut-Hirn-Schranke durch HF-Felder permeabilisiert werden kann. Selbstverständlich ließe sich eine Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke sehr gut in das Szenario einbauen, dass HF-Felder Hirntumoren begünstigen.

Zum besseren Verständnis des Umfeldes einer *in vitro* Studie zur Blut-Hirn-Schranke sollen hier auch einige tierexperimentelle Studien vorgestellt werden. In den siebziger und achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts sind eine Reihe von Studien zur Einwirkung von HF-Feldern auf die Blut-Hirn-Schranke erschienen. Als Mitte der achtziger Jahre gezeigt worden war, dass die früheren Ergebnisse am ehesten auf Erwärmung zurückzuführen waren, war diese Fragestellung für einige Jahre nicht mehr aktuell. Durch eine Tierstudie von Salford et al. (1994) und durch eine zweite erweiterte aus der gleichen Gruppe (Persson et al., 1997) wurde die Diskussion wieder belebt. Die schwedische Arbeitsgruppe um Salford und Persson hat insgesamt 630 Ratten im 915 MHz Feld für 2 – 960 min bei SAR-Werten zwischen $4 \cdot 10^{-4}$ und 8,3 W/kg exponiert und 372 Tiere scheinexponiert. Es wurden ganz unterschiedliche Modulationsfrequenzen (4, 8, 16, 50 Hz) oder Pulsung 217 Hz entsprechend GSM getestet. Als Zeichen für eine Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke wurde im Hirnschnitt nachweisbares Albumin angesehen. 17% der Kontrolltiere zeigten Albumin im Hirnschnitt und 39% der exponierten Tiere, wobei alle exponierten Tiere unabhängig von der Feldcharakteristik zusammengefasst wurden. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen SAR-Wert und der Anzahl der Tiere mit permeabilisierter Blut-Hirn-Schranke konnte nicht gezeigt

werden. Im Gegenteil die meisten betroffenen Tiere fanden sich in den Gruppen mit den niedrigsten SAR-Werten. Trotz der eindrucksvollen Tierzahlen und der vielen untersuchten Feldparameter sind die Ergebnisse sehr uneinheitlich und schwer zu interpretieren. Sie bedürfen sicherlich zunächst weiterer Bestätigungen. Eine bisher nur als Kongressbeitrag veröffentlichte Bestätigung dieser Befunde haben Töre et al. (2001) geliefert.

Kürzlich erschien eine weitere Studie der gleichen Gruppe (Salford et al., 2003). In dieser Studie wurden 32 Ratten in 4 Gruppen à 8 Tiere für 2 h in Feldern von 2, 20 und 200 mW/kg bzw. in Scheinexposition gehalten. Das Feld wurde von einem modifizierten GSM-Telefon erzeugt und in eine TEM-Zelle eingespeist. Die Tiere wurden 50 Tage nach der Exposition getötet und auf Albumin mit Antikörpern im Bereich des neuronalen Gewebes des Gehirns untersucht. Erstaunlicherweise zeigen sich auch 50 Tage nach der Exposition noch Albuminflecken und mit Cresyl violett färbbare Neurone, die geschrumpft aussahen. Bei den Neuronen deutet sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung an. Die Autoren können den überraschenden Befund einer noch 50 Tage nach der Exposition andauernden Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke nicht erklären. Ein solcher Befund wäre, wenn er sich reproduzieren ließe und auch auf Menschen übertragbar wäre, sicherlich irritierend. Zunächst ist dieser Befund jedoch wegen der noch sehr geringen Tierzahlen als fragwürdig anzusehen. Insgesamt besteht hier noch erheblicher Forschungsbedarf.

In einer Studie, die sich einer ähnlichen Nachweisttechnik jedoch einer anderen Expositionsapparatur

bediente, wurden Ratten 915 MHz GSM Feldern unterschiedlicher SAR-Werte (0,3, 1,5, 7,5 W/kg) für 4 h ausgesetzt (Fritze et al., 1997A). Es gab drei Gruppen von je 20 Tieren, solche, die nicht in der Expositionsapparatur waren (Käfigkontrollen), scheinexponierte Tiere, und exponierte Tiere. Während die Käfigkontrollen praktisch keine Zeichen einer Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke aufwiesen, zeigten die scheinexponierten Tiere eine leichte Erhöhung von Albumin. Bei den exponierten Tieren war das Albumin generell etwas erhöht, erreichte jedoch erst bei der Gruppe, die den höchsten Feldern (7,5 W/kg) ausgesetzt war, Signifikanz. Da die Tierzahlen in den einzelnen Gruppen nicht sehr groß waren, ist die Trennschärfe der Arbeit nicht sehr hoch und eine Signifikanz wird erst bei einem deutlichen Effekt erreicht, möglicherweise wären die Einflüsse bei niedrigeren SAR-Werten mit größeren Tierzahlen auch signifikant geworden. Bemerkenswert ist, dass die Ergebnisse eher eine Dosisabhängigkeit zeigen als die Befunde der schwedischen Arbeitsgruppe. Eigentlich weisen die Ergebnisse von Fritze et al. (1997A) meiner Ansicht nach eher in die Richtung eines schwachen Einflusses der HF-Felder, auch wenn sie von den Autoren anders interpretiert werden. Zwei kleinere Studien mit 24 Ratten (Tsurita et al., 2000) bzw. 30 Mäusen (Finnie et al., 2001) zeigten keine Einflüsse von HF-Feldern, aufgrund der sehr niedrigen Tierzahlen sollen sie hier nicht näher besprochen werden. Neben den oben beschriebenen Ganztierstudien besteht auch die Möglichkeit, die Wirkungen von HF-Feldern auf die Blut-Hirn-Schranke in einem *in vitro* System zu untersu-

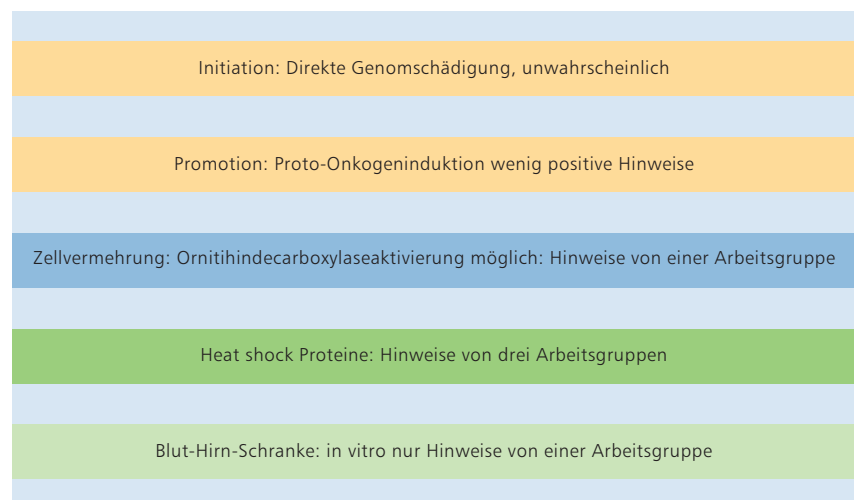
chen (Schirmacher et al., 2000). Dazu wurde die Blut-Hirn-Schranke in einem Zellkulturmodell nachgebildet. Endothelzellen aus Hirnkapillaren des Schweins sind das Analogon der Wand des Blutgefäßes und Astrozyten aus dem Gehirn der Ratten übernehmen die Funktion der Gliazellen. Zunächst werden die Astrozyten auf einer Membran mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm angezogen. Nach drei Wochen werden die Endothelzellen auf der anderen Seite der Membran ausgesät. Die kultivierten Zellen wachsen jeweils in einer einzelligen Schicht (Monolayer), untereinander bilden sie die für die Blut-Hirn-Schranke typischen Zellkontakte aus. Anschließend platziert man auf der Seite der Endothelzellen ¹⁴C markierte Saccharose und misst die Diffusion durch die zwei Zellschichten. Dieser Versuch wurde in einem Hohlleiter unter 1800 MHz bei GSM-Pulsung und einem SAR-Wert von 0,3 W/kg ausgeführt. Die Kulturen wurden für zwei und vier Tage dem Feld ausgesetzt. Es ergab sich eine signifikant erhöhte Permeabilität der exponierten Kulturen.

Aus heutiger Sicht muss man folgern, dass sowohl die Tierversuche als auch die *in vitro* Studie eher in die Richtung einer Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke deuten. Die positiven Befunde (Persson et al., 1997; Salford et al., 2003; Schirmacher et al., 2000) sind alle nicht reproduziert. Sie stehen einem intermediären Befund (Fritze et al., 1997A) und zwei negativen Befunden (Tsurita et al., 2000; Finnie et al., 2001) gegenüber, wobei den negativen Befunden aufgrund der geringen Tierzahlen nur eine geringe Bedeutung zuzumessen ist.

5. Schlussfolgerungen

Auch wenn die hier vorgestellten Befunde zur Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke noch kein einheitliches Bild bieten, so können sie jedoch in Zusammenhang mit den Befunden zur Induktion der „heat shock“-Proteine gesehen werden. Einen derartigen Zusammenhang haben French et al. (2001) hergestellt. Die hsp stellen einen Schutzmechanismus dar. Allerdings kann die chronische Expression von hsp Krebs promovierend wirken. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass Mobiltelefonieren als wiederholte Belastung zu einer chronischen Expression der hsp führt und somit Krebs promovierend wirkt. Die Untersuchungen von Leszczynski (Leszczynski, 2002; Leszczynski et al., 2002) folgen der Hypothese von French et al. (2001) und wenden sie auf das Zentralnervensystem und die Blut-Hirn-Schranke an. Die gezeigte HF-Feld abhängige Induktion der Expression von p38MAPK und hsp27

findet in kultivierten Endothelzellen statt. Die Endothelzellen bilden ein verändertes Zytoskelett aus (Leszczynski, 2002), sie ziehen Ausläufer ein und dadurch könnten Lücken in der Endothelzellschicht entstehen. Sollten die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligten Endothelzellen sich genauso verhalten, so würde dies eine Permeabilisierung dieser Schranke begünstigen oder verursachen. Dies könnte die Ergebnisse der Arbeiten zur Blut-Hirn-Schranke erklären. Eine Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke würde könnte dann Tumor promovierend oder kopromovierend wirken. Die hsp könnten auch im neuronalen Gewebe selbst gebildet werden. Hier würden sie die Apoptose behindern, d.h. in entarteten Zellen würde das zelluläre Selbstmordprogramm nicht mehr so leicht ausgelöst und entartete Zellen wären in der Lage, länger zu überleben und sich häufiger zu teilen. Mit dieser Theorie ließe sich dann auch das vermehrte Auftreten von Hirntumoren,



Quelle: Meyer

Abb. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Artikels, die als Folie in der zugrunde liegenden Präsentation zum 10 jährigen Bestehen der Forschungsgemeinschaft Funk gezeigt wurde.

wie es in der Studie von Hardell et al. 2002 beobachtet wurde, zwanglos erklären. Diese Hypothese stellt ein in sich logisches Denkmodell dar, um einen Wirkmechanismus von HF-Feldern auf Tiere und Menschen zu erklären. Eine solche Hypothese bedarf jedoch der Überprüfung in verschiedenen Stufen. Der primäre Interaktionsmechanismus über den die HF-Felder die p38MAPK aktivieren und die Expression von hsp induzieren ist noch völlig unklar. Ob die Induktion der Expression von hsp in Endothelzellen auch *in vivo* also im intakten Organismus eintritt, ist nicht klar. Die bisherigen Befunde zur Permeabilisierung der Blut-Hirnschranke sind nicht wissenschaftlich abgesichert. Es fehlen Hinweise, die eine gesteigerte Expression von hsp in neuronalen Zellen zeigen. Die Studie von Fritze et al. (1997B) fand eine Induktion der Expression von hsp70 im Rattenhirn erst bei einem SAR-Wert von 7.5 W/kg statt, deutlich über dem was mit einem Mobiltelefon zu erreichen ist. Auch der Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von hsp und Hirntumoren ist keineswegs gesichert. An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die tierexperimentellen Studien, die eine Hirntumor induzierende sowie promovierende Wirkung von HF-Feldern untersucht haben, alle keinen Zusammenhang zwischen HF-Feldern und Tumorentwicklung gezeigt haben (Adey et al., 1999; 2000; Zook und Simmens, 2001). Die Hypothese von French et al. (2001) und die von Leszczynski et al. (2002) erweiterte Form ist von einer Verifizierung weit entfernt, sie kann allerdings als ein sehr interessanter Leitfaden für Experimente dienen.

Literatur

- Adey WR, Byus CV, Cain CD, Higgins RJ, Jones RA, Kean CJ, Kuster N, MacMurray A, Stagg RB, Zimmerman G (2000) Spontaneous and nitrosurea-induced primary tumors of the central nervous system in Fischer 344 rats exposed to frequency-modulated microwave fields. *Cancer Res* 60, 1857-1863.
- Adey WR, Byus CV, Cain CD, Higgins RJ, Jones RA, Kean CJ, Kuster N, MacMurray A, Stagg RB, Zimmerman G (1999) Spontaneous and nitrosurea-induced primary tumors of the central nervous system in Fischer 344 rats chronically exposed to 836 MHz modulated microwaves. *Rad Res* 152, 293-302.
- d'Ambrosio G, Massa R, Scarfi MR, Zeni O (2002) Cytogenetic damage in human lymphocytes following GSM phase modulated microwave exposure. *Bioelectromagnetics* 23, 7-13.
- Antonopoulos A, Eisenbrandt H, Obe G (1997) Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 395, 209-214.
- Auvinen M, Paasinen A, Anderson LC, Hölttä E (1992) Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360, 355-358.
- Burkhardt M, Spinelli Y, Kuster N (1997) Exposure setup to test effects of wireless communications systems on the CNS. *Health Phys* 73, 770-778.
- Byus CV, Kartun K, Pieper S, Adey WR (1988) Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells is exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester tumor promoters. *Cancer Res* 48, 4222-4226.
- Ciaravino V, Meltz ML, Erwin DN (1987) Effects of radiofrequency radiation and simultaneous exposure with mitomycin C on the frequency of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Environ Mutagen* 9, 393-399.
- Cranfield CG, Wood AW, Anderson V, Menezes KG (2001) Effects of mobile phone type signals on calcium levels within human leukaemic T-cells (Jurkat cells). *Int J Radiat Biol* 77, 1207-1217.
- Daniells C, Duce I, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, de Pomerai D (1998) Transgenic nematodes as biomonitors of microwave-induced stress. *Mutat Res* 399, 55-64.
- Di Carlo AL, Farrell JM, Litovitz TA (1998) A simple experiment to study electromagnetic field effects: protection induced by short-term exposures to 60 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 19, 498-500.
- Di Carlo AL, Farrell JM, Litovitz TA (1999) Myocardial protection conferred by electromagnetic fields. *Circ Res* 99, 813-816.
- Farrell JM, Litovitz TL, Penafiel M, Montrose CJ, Doinov P, Barber M, Brown KM, Litovitz TA (1997) The effect of pulsed and sinusoidal magnetic fields on the morphology of developing chick embryos. *Bioelectromagnetics* 18, 431-438.
- Finnie JW, Blumbers PC, Manavis J, Utteridge TD, Gebksi V, Swift JG, Vernon-Roberts B, Kuchel TR (2001) Effect of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* 33, 338-340.
- French PW, Penny R, Laurence JA, McKenzie DR (2001) Mobile phones, heat shock and cancer. *Differentiation* 67, 93-97.
- Fritze K, Sommer C, Schmitz B, Mies G, Hossmann KA, Kiessling M, Wiessner C (1997A) Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 4, 465-470.
- Fritze K, Wiessner C, Kuster N, Sommer C, Gass P, Hermann DM, Kiessling M, Hossmann KA (1997B) Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain. *Neuroscience* 81, 627-639.
- Garaj-Vrhovac V, Fucic A, Horvat D (1992) The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vitro. *Mutat Res* 281, 181-186.
- Goswami PC, Albee LD, Parsian AJ, Baty JD, Moros EG, Pickard WF, Roti Roti JL, Hunt CR (1999) Proto-oncogene mRNA levels and activities of multiple transcription factors in C3H 10T $\frac{1}{2}$ murine embryonic fibroblasts exposed to 835.62 and 847.74 MHz cellular phone communication frequency radiation. *Radiat Res* 151, 300-309.
- Han L, Lin H, Head M, Jin M, Blank M, Goodman R (1998) Application of magnetic field-induced heat shock protein 70 for presurgical cytoprotection. *J Cell Biochem* 71, 577-583.
- Hardell L, Hallquist A, Mild KH, Carlberg M, Pahlson A, Lilja A (2002) Cellular and cordless telephones and the risk for brain tumors. *Eur J Cancer Prev* 11, 377-386.
- Higashikubo R, Ragouzis M, Moros EG, Straube WL, Roti Roti JL (2001) Radiofrequency electromagnetic fields do not alter the cell cycle progression of C3H 10t and U87MG cells. *Radiat Res* 156, 786-795.
- Ivaschuk OI, Jones RA, Ishida-Jones T, Haggren W, Adey WR (1997) Exposure of nerve growth factor-treated PC12 rat pheochromocytoma cells to a modulated radiofrequency field at 836.55 MHz: effects on c-jun and c-fos expression. *Bioelectromagnetics* 18, 223-229.
- Lai H, Singh NP (1995) Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 16, 207-210.
- Lai H, Singh NP (1996A) Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int J Radiat Biol* 69, 513-521.
- Lai H, Singh NP (1996B) Reply to „comment on acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells“. *Bioelectromagnetics* 16, 207-210.
- Lai H, Singh NP (1997) Melatonin and a spin trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 18, 446-454.
- Leitgeb N (2000) Machen elektromagnetische Felder krank? Strahlen, Wellen, Felder und ihre Auswirkungen auf unsere Gesundheit. Springer-Verlag Wien New York.
- Leszczynski D (2002) Effect of GSM mobile phone radiation on blood-brain barrier. *Proceed URSI General Assembly*. Electronic Publication Leszczynski D, Joensuu S, Reivinen J, Kuokka R (2002) Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70, 120-129.
- Li L, Bisht KS, LaGroye I, Zhang P, Straube WL, Moros EG, Roti Roti JL (2001) Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed in vitro to radiofrequency fields at SARs of 3-5 W/kg. *Radiat Res* 156, 328-332.
- Lin H, Opler M, Head M, Blank M, Goodman R (1997) Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells. *J Cell Biochem* 66, 482-488.
- Lin H, Head M, Blank M, Han L, Jin M, Goodman R (1998) Myc-mediated transactivation of HSP70 expression following exposure to magnetic fields. *J Cell Biochem* 69, 181-188.
- Lin H, Blank M, Goodman R (1999) A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. *J Cell Biochem* 75, 170-176.
- Linz JW, Westphalen C v, Streckert J, Hansen V, Meyer R (1999) Membrane potential and membrane currents of isolated heart muscle cells exposed to pulsed high-frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 20, 497-511.
- Litovitz TA, Krause D, Penafiel M, Elson EC, Mullins JM (1993) The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity. *Bioelectromagnetics* 14, 395-403.
- Litovitz TA, Penafiel M, Farrel JM, Krause D, Meister R, Mullins JM (1997) Bioeffects induced by exposure to microwaves are mitigated by superposition of ELF noise. *Bioelectromagnetics* 18, 422-430.
- Maes A, Verschaeve L, Arroyo A, De Wagter C, Vercruyssen L (1993) In vitro cytogenetic effects of 2450 MHz waves on human peripheral blood lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 14, 495-501.
- Maes A, Collier M, Slaets D, Verschaeve L (1995) Cytogenetic effects of microwaves from mobile communication frequencies (954 MHz). *Electro- Magnetobiol* 14, 91-98.
- Maes A, Collier M, Slaets D, Verschaeve L (1996) 954 MHz microwaves enhance mutagenic properties of mitomycin C. *Environ Mol Mutag* 28, 26-30.
- Maes A, Collier M, Van Gorp U, Vandoninck S, Verschaeve L (1997) Cytogenetic effects of 935.2-MHz (GSM) microwaves alone and in combination with mitomycin. *Mut Res* 393, 151-156.

- Maes A, Collier M, Verschaeve L (2000) Cytogenetic investigations on microwaves emitted by a 455.7 MHz car phone. *Folia Biol (Praha)*, 46, 175 – 180.
- Maes A, Collier M, Verschaeve L. (2001) Cytogenetic effects of 900 MHz (GSM) microwaves on human lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 22, 91-96.
- Malyapa RS, Ahern EW, Straube WL, Moros EG, Pickard WF, Roti-Roti JL (1997A) Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation. *Radiat Res* 148, 608-617.
- Malyapa RS, Ahern EW, Straube WL, Moros EG, Pickard WF, Roti-Roti JL (1997B) Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz). *Radiat Res* 148, 618-627.
- Malyapa RS, Ahern EW, Bi C, Straube WL, LaRegina M, Pickard WF, Roti-Roti JL (1998) DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. *Radiat Res* 149, 637-645.
- Mashevich M, Folkman D, Kesar A, Barbul A, Korenstein R, Jerby E, Avivi L (2003) Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. *Bioelectromagnetics* 24, 82-90.
- McNamee JP, Bellier PV, Gajda GB, Lavallee BF, Lemay EP, Marro L, Thansandote A (2002) DNA damage in human leukocytes after acute in vitro exposure to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat Res* 158, 534-537.
- Meltz ML, Eagan P, Erwin DN (1989) Absence of mutagenic interaction between microwaves and mitomycin C in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 13, 294-303
- Meyer R (1999) *In vitro* und *in vivo* Studien zu biologischen Wirkungen von hochfrequenten Feldern. In: Veröffentlichungen der Strahlenschutzkommission (SSK) Band 38. Funkanwendungen - Technische Perspektiven biologische Wirkungen und Schutzmaßnahmen. (Hrsg.) Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Urban & Fischer, München, Jena, 58-102.
- Morrissey JJ, Raney S, Heasley E, Rathinavelu P, Dauphinee M, Fallon JH (1999) Iridium exposure increases *c-fos* in the mouse brain only at levels which likely result in tissue heating. *Neuroscience* 92, 1539-1546.
- Mullins JM, Penafiel LM, Juutilainen J, Litovitz TA (1999) Dose-response of electromagnetic field-enhanced ornithine decarboxylase activity. *Bioelectrochem Bioenerg* 48, 193-199.
- Natarajan M, Vijayalaxmi, Szilagyil M, Roldan FN, Meltz ML (2002) NF- κ B DNA-binding activity after high peak power pulsed microwave (8.2 GHz) exposure of normal human monocytes. *Bioelectromagnetics* 23, 271-277.
- Penafiel ML, Litovitz T, Krause D, Desta A, Mullins JM (1997) Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells. *Bioelectromagnetics* 18, 132-141.
- Persson BRR, Salford LG, Brun A (1997) Blood-brain barrier permeability in rats exposed to electromagnetic fields used in wireless communication. *Wireless Netw* 3, 455-461.
- Pomerai, de D, Daniells C, David H, Allan J, Duce I, Mutwakil M, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, Jones D, Candido P (2000) Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature* 405, 417-418.
- Romano-Spica V, Mucci N, Ursini CL, Ianni A, Bhat NK (2000) Ets1 oncogene induction by ELF-modulated 50 MHz radiofrequency electromagnetic field. *Bioelectromagnetics* 21, 8-18.
- Roti Roti JL, Malyapa RS, Bisht KS, Ahern KS, Moros EG, Pikard WF, Straube WL (2001) Neoplastic transformation in C3H 10T $\frac{1}{2}$ cells after exposure to 835.52 MHz FDMA and 847.74 MHz CDMA radiations. *Radiat Res* 155, 239-247.
- Salford LG, Brun A, Stureson K, Eberhardt JJ, Persson BRR (1994) Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Micros Res Tech* 27, 535-542.
- Salford LG, Brun A, Eberhardt JL, Malmgren L, Persson BRR (2003) Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health (Electronic Publication <http://dx.doi.org/doi:10.1289/ehp.6039>)*.
- Schirmacher A, Winters S, Fischer S, Goetze J, Galla HJ, Kullnick U, Ringelstein EB, Stögbauer F (2000) Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood-brain barrier in vitro. *Bioelectromagnetics* 21, 338-345.
- Shallom JM, Di Carlo AL, Ko D, Penafiel LM, Nakai A, Litovitz TA (2002) Microwave exposure induces Hsp70 and confers protection against hypoxia in chick embryos. *J Cell Biochem* 6, 490-496.
- Swicord M, Morrissey JJ, Zakharia D, Ballen M, Balzano Q (1999) Dosimetry in mice exposed to radiofrequency microwaves in a carousel irradiator. *Bioelectromagnetics* 20, 42-47.
- Tian F, Nakahara T, Wake K, Taki M, Miyakoshi J (2002) Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields induces hsp70 at a high SAR of more than 20 W/kg but not at 5 W/kg in human glioma MO54 cells. *Int J Radiat Biol* 78, 433-440.
- Tice RR, Hook GG, Donner M, McRee DI, Guy AW (2002) Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics* 23, 113-126.
- Töre F, Dulou P-F, Haro E, Veyret B, Aubineau P (2001) Two-hour exposure to 2 W/kg, 900 MHz GSM microwaves induces plasma protein extravasation in rat brain. In: *Proceed 5th Int Cong EBEA* (Hietanen M, Jokela K, Juutilainen J eds.), 43-45.
- Tsurita G, Nagawa H, Ueno S, Watanabe S, Taki M (2000) Biological and morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field. *Bioelectromagnetics* 21, 364-371
- Vijayalaxmi, Frei MR, Dusch SJ, Guel V, Meltz ML, Jauchem JR (1997A) Frequency of micronuclei in the peripheral blood and bone marrow of cancer-prone mice chronically exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. *Rad Res* 147, 495-500.
- Vijayalaxmi, Mohan N, Meltz ML, Wittler MA (1997B) Proliferation and cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450 MHz radiofrequency radiation. *Int J Radiat Biol*.72, 751-757.
- Vijayalaxmi, Leal BZ, Szilagyil M, Prihoda TJ, Meltz ML (2000) Primary DNA damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450 MHz radiofrequency radiation. *Radiat Res* 153, 479-486.
- Vijayalaxmi, Pickard WF, Bisht KS, Prihoda TJ, Meltz ML, LaRegina MC, Roti Roti JL, Straube WL, Moros EG (2001) Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells of rats exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. *Int J Radiat Biol* 77, 1109-1115.
- Vijayalaxmi, Bisht KS, Pickard WF, Meltz ML, Roti Roti JL, Moros EG (2001) Chromosome damage and micronucleus formation in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (847.74 MHz, CDMA). *Radiat Res*.156, 430-432.
- Vijayalaxmi, Leal BZ, Meltz ML, Pickard WF, Bisht KS, Roti Roti JL, Straube WL, Moros EG (2001) Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835.62 MHz, FDMA). *Radiat Res*.155, 113-121.
- Williams, GM (1996) Comment on „Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells“. *Bioelectromagnetics* 16, 207-210.
- Wolke S, Neibig U, Elsner R, Gollnick F, Meyer R (1996) Calcium homeostasis of isolated heart muscle cells exposed to pulsed high-frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 17, 144-153.
- Zook BC, Simmens SJ (2001) The effects of 860 MHz radiofrequency radiation on the induction or promotion of brain tumors and other neoplasms in rats. *Radiat Res* 155, 572-583.

Rainer Meyer

Physiologisches Institut des Universitätsklinikums Bonn der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

***In vitro* studies on biological effects of radiofrequency fields between 1997 and 2002**

After more than ten years of mobile phone distribution of the GSM standard (D and E nets), there is still doubt in the general population regarding the harmlessness of this technology to health. Consequently, in recent years numerous studies on effects of radio-frequency fields – RF fields – on the organism have been performed; a trend continuing to present. The aim of this survey is to present studies from the years 1997 to 2002 conducted in isolated organs, tissues, or cells, so-called *in vitro* studies. For a better understanding of this issue, the many available studies from the recent past were classified according to the steps of cancer development. This classification was based upon a 2002 epidemiological study describing an association between long-term application of analogue mobile phones and brain tumor initiation. Very often, the first step of tumor initiation is a mutation in the genome (alteration of genetic material) of a cell. Radioactive radiation will generate such alterations with a certain probability. Though RF fields cannot lead to the same results, they have repeatedly been suspected of doing so. A solid majority of the numerous investigations on this issue showed negative results irrespective of the applied method, used cell types or test parameters. In 1996 and 1997,

several studies performed in the rat brain received a lot of attention, however they could neither be reproduced by other working groups nor be confirmed by similar test approaches. Neither the idea of RF fields potentially intensifying mutagenic effects of chemical substances could be verified. To the contrary, even earlier positive results of a Belgian working group found in lymphocytes could not be confirmed by themselves when using refined test approaches.

The second step of tumor initiation, unrestricted cell division, can occur when the damaged genes are transcribed and translated into proteins. The occurrence and the control of these processes is dependent on many signaling systems. Thus, the information on investigations into different cellular signaling systems is summed up in one chapter. One important signaling system performing various tasks is the alteration of the intracellular calcium concentration. However, evidence for an effect from RF fields was found neither in cardiac muscle cells nor in lymphocytes. Proto-oncogenes are genes which often are activated by stress or during cell division. They also are more strongly expressed in abnormally proliferating cells. They can be transformed into oncogenes by slight mutations which can lead to

unrestricted division of a cell. Proteins developing during proto-oncogene transcription often are signaling molecules. The survey presents both *in vitro* studies as well as animals tests since only joint presentation enables to provide a useful overview. According to the relevant studies, effects on proto-oncogenes from RF fields seem to be principally possible. However, these RF field effects regularly occur only at SARs in the thermal range, i.e. above limit values.

When cells divide, previously certain molecules have to be synthesized. The activity of the enzyme ornithine decarboxylase is seen as a marker of this process. Therefore, a working group performed a series of experiments examining the influence of RF fields on this enzyme. Results indicate a susceptibility of this enzyme to RF fields. The results were never reproduced by others, though. Moreover, the respective working group did not follow up on this issue. However, cell division rates at RF field exposure were examined for many different cell types without finding evidence for a field influence.

The next step in cancerous diseases, the development of metastases, is very complex and depending on very many control signals. In the corresponding paragraph, studies on heat-shock proteins and on the

blood-brain barrier are summed up. Blood-brain barrier permeabilization potentially is favored by heat-shock proteins making cell transport through the blood-brain barrier easier. Heat-shock protein development as a protection mechanism is increased after exposure to high temperatures or other stressors. Consequently, it has been hypothesized that the synthesis of these proteins could also be triggered by RF fields. At SARs distinctly above limit values, different systems showed RF-dependent heat-shock protein development. One study performed in cultivated endothelial cells should especially be mentioned in this context, since an induction of heat-shock proteins was shown at SARs close to the limit value. Endothelial cells provide the lining of blood capillaries and thus are part of the structure of the blood-brain barrier. Though another working group also could find an induction of heat-shock proteins, differences between the two investigations are so big that they do not reinforce each other's results. For investigating the blood-brain barrier itself, several working groups performed animal tests. Only one of the investigations could – even if repeatedly – prove a permeabilization of the blood-brain barrier at exposure to different RF fields in a rat model. An *in vitro* cell culture

model of the blood-brain barrier showed the same effects. However, to date these can only be seen as single findings. The studies referred to do not indicate health dangers from RF fields as are used by mobile radio.

Prof. Meyer
Universität Bonn
Institut f. Physiologie II
Wilhelmstr. 31
53111 Bonn
email: meyer@physio.uni-bonn.de

Impressum

Edition Wissenschaft der FGF e. V.



Herausgeber: Forschungsgemeinschaft Funk e. V., Rathausgasse 11a,
D-53111 Bonn, Telefon: 0228 / 72 62 2-0, Telefax: 0228 / 72 62 21 1
E-Mail: info@fgf.de, <http://www.fgf.de>

Redaktion: Gerd Friedrich (verantw.), Gudrun Westendörpf

Layout: setz it. Richert GmbH, Sankt Augustin

Die vorliegende Studie wurde im Auftrag der Forschungsgemeinschaft Funk e. V. durchgeführt. Die Berichte geben die Meinungen der Autoren wieder und stellen daher nicht unbedingt auch die Meinung der FGF dar.