

„Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Energy (REFLEX) Using Sensitive In Vitro Methods“

Vorausschickende Bemerkungen des Herausgebers:

Zu dem in der Öffentlichkeit viel diskutierten REFLEX-Programm zur Risikobewertung elektromagnetischer Felder liegt inzwischen ein Abschlussbericht vor. Eine profunde Genetikerin, Frau Vijayalaxmi aus der Abteilung für Strahlungs-Onkologie der Universität Texas (USA) hat diesen Bericht durchgearbeitet und kritisch bewertet. Sie ist als Autorin zahlreicher Publikationen auf diesem Gebiet sehr genau mit den Methoden vertraut und hat in den vergangenen Jahren nicht nur auf Tagungen und bei persönlichen Gesprächen Kontakt mit den ausführenden Wissenschaftlern dieses Programms gehabt, sondern auch die Gelegenheit genutzt, unmittelbar Einsicht in laufende Arbeiten in verschiedenen Labors zu nehmen. Der Bericht ist im knappen Stil einer Rezension geschrieben, wie sie üblicherweise von Peer-Reviewed-Zeitschriften verlangt wird. Deshalb mag er dem Außenstehenden in manchen Passagen schwer verständlich sein. Trotz wertender Attribute, die in solchen Rezensionen verlangt werden, verzichtet er auf Polemik. Wir haben uns bemüht, den Text so zu übersetzen, dass Wertung und Aussage unverändert blieben. Einige Attribute sind in englischer Diktion der deutschen Übertragung in Klammern beigefügt. Der Bericht ist im Original unter info@fgf.de erhältlich. Wir betrachten die Publikation dieses Gutachtens als einen Beitrag zur Diskussion, ähnlich wie die vielen Berichte zu diesem Projekt in den Medien.

Kritisch zur Untersuchung im Abschlussbe

Vijayalaxmi

Die folgende Analyse befasst sich ausschließlich mit den im REFLEX-Schlussbericht dargestellten Ergebnissen zu DNA-Einzelstrangbrüchen (ESB), DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), Chromosomenaberrationen (CA) und Mikrokernen (MN) in Säugerzellen nach in vitro-Exposition mit extrem niederfrequenten elektromagnetischen Feldern (ELF-EMF) und Hochfrequenzfeldern (RF-EMF).





Die Anmerkungen zur Bewertung von DNA-Schädigungen im Bericht 2004 der REFLEX-Studie

Zusammenfassung

Zunächst einmal ist festzuhalten, dass der bekannte Mechanismus der Einwirkung von ELF-EMF einerseits und RF-EMF andererseits auf biologisches Material unterschiedlich ist: Im ersten Falle geht es um die Induktion elektrischer Ströme, im zweiten um eine Wärmeerzeugung bzw. einen Temperaturanstieg. Die Kenntnis solcher Wirkmechanismen ist entscheidend, um einen Kausalzusammenhang zwischen ELF-EMF bzw. RF-EMF-Exposition und der Entstehung von Krankheiten festzustellen. Solche in vitro-Studien sind durchaus relevant und bieten mehrere Vorteile: Sie können (a) in kontrollierter Umgebung durchgeführt werden, sie sind (b) geeignet, zur Auffindung 'potenzieller' Wirkmechanismen, können (c) große Probenmengen umfassen und (d) in relativ kurzer Zeit eine große Menge an Daten hervorbringen. Eine in vitro-Exposition, besonders einer kontinuierlich wachsenden Zellkultur, kann jedoch nie eine 'reale' Lebenssituation imitieren und daher sind die Ergebnisse auch nicht unmittelbar auf die Exposition von Menschen in ihrem Lebensumfeld oder am Arbeitsplatz übertragbar.

Die folgenden vier Wissenschaftler leiteten im Rahmen des REFLEX-Projekts die Experimente in denen es zu bestimmen galt, ob die Exposition frisch entnommener und/oder kontinuierlich wachsender Kulturen von Säugerzellen mit ELF-EMF und/oder RF-EMF in vitro möglicherweise schädigende Einflüsse auf ESB, DSB, CA und/oder MN hat: (1) Rudolf Tauber, Berlin, (2) Hugo Rüdiger, Wien, (3) Anna Wobus, Gatersleben/Deutschland, und (4) Angeles Trillo, Madrid.

Rudolf Tauber (Teilnehmer 2), Berlin

(1) In den Experimenten wurden HL-60 Zellen benutzt. Dies ist eine kontinuierlich wachsende Zelllinie, abgeleitet von einem an Leukämie (Krebs) erkrankten menschlichen Patienten. Insofern können HL-60 Zellen NICHT als 'normale' Zellen betrachtet werden. Dennoch ist die Verwendung von HL-60 Zellen in RF-EMF-Studien durchaus von Bedeutung. Allerdings wäre die Einbeziehung eines 'normalen', den HL-60 Zellen entsprechenden Zelltyps in die Experimente hilfreich gewesen, um festzustellen, ob sich normale Zellen und Krebszellen in ihrer Reaktion auf eine RF-EMF-Exposition unterscheiden.

(2) Eine detaillierte Information über die genaue Anzahl der Zellen in der S-Phase (zyklisierende Zellen) und Zellen in der Apoptose (anstelle von Dot-Plots in Abbildung 80, 81 und 82) wäre hilfreich gewesen, um das Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen RF-EMF-befeldeten und scheinbefeldeten Zellen anzuzeigen. Diese Angaben sind wichtig, um die Daten und die Schlussfolgerungen aus dem Comet-Assay zu bewerten.

(3) Da die große Mehrheit der HL-60-Zellen bekanntlich aneuploid ist, liegt die berichtete MN-Rate in den scheinexponierten Kontrollen sehr niedrig, bei ~4/1000 binuklearer Zellen, d. h. in <1 von 100 Metaphasen der ersten Zellteilung treten bei aneuploiden Zellen Brüche oder Fragmentierungen auf.

Hugo Rüdiger (Teilnehmer 3), Wien, Österreich

(1) Eine Zell-Spezifität biologischer Reaktionen auf chemische, biologische und/oder physikalische Agen-

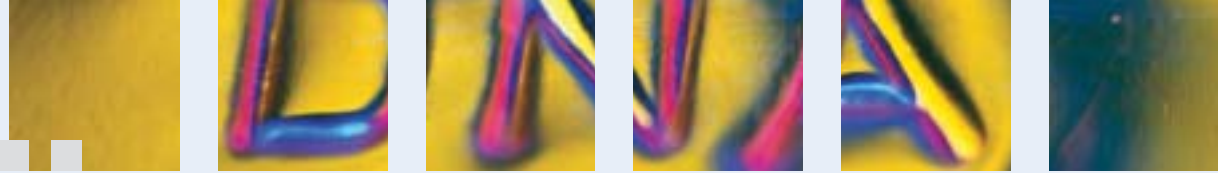
zien ist häufig zu beobachten. Epidemiologische Erhebungen, die einen Zusammenhang zwischen ELF-EMF-Exposition und Leukämie (Paragraph 1.0, Einleitung) aufzeigen, müssten zu der Annahme führen, dass Lymphozyten aus menschlichem Blut die Angriffspunkte ELF-EMF-induzierter Genotoxizität sind. Das Ausbleiben einer Zunahme primärer DNA-Schädigungen (ESB/DSB) in Lymphozyten aus menschlichem Blut nach ELF-EMF-Exposition ist daher nicht nur verwunderlich (intriguing), sondern auch sehr verwirrend (puzzling). (2) Kulturen menschlicher diploider Fibroblasten und SV40-transformierte Granulosazellen von Ratten wurden in der Studie verwendet. Bekanntlich sind die während der kontinuierlichen Wachstumsphase kultivierter Fibroblasten und SV40-transformierter Zellen auftretenden veränderten Eigenschaften in der Regel nicht in frisch entnommenen Zellen zu beobachten. Daher kann es sein, dass die Reaktion dieser ELF-EMF- oder RF-EMF-befeldeten kultivierten Zellen nicht mit denen frisch entnommener Zellen übereinstimmt.

(3) Die Untersuchung und Auswertung der dem Blut eines einzelnen Spenders entnommenen peripheren Lymphozyten und Monozyten lässt die Bestimmung interindividueller Schwankungen nicht zu.

(4) Ergebnisse entsprechender Positivkontrollzellen (alle Tabellen und Abbildungen) und scheinbefeldeter Zellen (ein Teil der Tabellen und Abbildungen) sind nicht enthalten. Daten solcher Zellen sind jedoch nicht nur wesentlich, sondern nach den GLP (Good Laboratory Practice)-Regeln auch unabdingbar für einen stichhaltigen Vergleich zwischen ELF-EMF- und RF-EMF-exponierten Zellen.

(5) Comet-Assay: (a) Zur Bestimmung von DSB wurde eine stark vereinfachte Version des neutralen Comet-Assay verwendet. Das Verfahren verzichtete auf eine Behandlung mit Proteinase K und Ribonuklease A (*Lai and Singh, Int J Radiat Biol, 69, 513-521, 1996; Bioelectromagnetics, 18, 156-165, 1997*) zur Zerstörung der Proteine und Auflösung der Kernmatrix, so dass die Doppelstrangbrüche auch aus den Supercoiles der DNA in den Kometenschweif wandern können. Folglich könnten die Resultate aus dem neutralen Comet-Assay ebenso wie die Interpretation dieser

Daten fehlerhaft sein (may not be accurate). (b) In allen Experimenten wurden kontinuierlich wachsende Zellen mit einer Dauer des Zellzyklus von 24 bis 30 Stunden verwendet (mit Ausnahme der Lymphozyten aus menschlichem Blut, Abbildungen 20 und 21). Während einer verlängerten ELF-EMF-, RF-EMF- und Scheinbefeldung (besonders 24 Stunden) tritt eine Anzahl 'normaler' Zellen in einen Prozess semikonservativer DNA-Synthese mit mehreren 'Replikationsgabeln' (zyklierende Zellen) ein. Im Comet-Assay löst sich die DNA leichter von solchen Replikationsgabeln ab und erscheint in Form von Strangbrüchen im Kometenschweif. Das Ergebnis sind 'normale zyklierende Zellen' mit 'zunehmender Schweiflänge', die so 'geschädigte Zellen' imitieren. Die Zahl der zyklierenden Zellen für die einzelnen Expositionsbedingungen wird nicht bestimmt. Eine mögliche Änderung im Zellzyklus bei ELF-EMF- und RF-EMF-befeldeten Zellen (bezogen auf scheinbefeldete Zellen), falls dies auftritt, würde zu dem Resultat führen, dass 'zyklierende Zellen' als 'geschädigte Zellen' klassifiziert werden, was sich wiederum auf die Multiplikationsmethode zur 'Ableitung' des Tailfaktors auswirkt (Zellen des Typs Ax2,5, Bx12,5, Cx30,0, Dx67,5 und Ex97,5). (c) Das mitochondriale Membranpotential (MMP) wurde gemessen und als Parameter gewertet, der eine Apoptose anzeigt (d.h. Zellen mit stark fragmentierter DNA). Im Comet-Assay zeigen apoptotische Zellen zahlreiche DNA-Strangbrüche, und solche Zellen sind zweifellos der Kategorie E zuzuordnen, was wiederum einen starken Einfluss auf die Multiplikationsmethode (Ex97,5) zur 'Ableitung' des 'Tailfaktors' haben wird. (i) Detaillierte Daten zum MMP in ELF-EMF-exponierten Zellen sind in Paragraph 3.1.1.1 nicht dargestellt. Die Varianzen in der Expression von mitochondrialen und ribosomalen Genen in menschlichen Fibroblasten waren hoch (Paragraph 3.1.4.6). (ii) Die Ergebnisse zum MMP von RF-EMF ausgesetzten Zellen sind nicht konsistent (Paragraph 3.2.1.2). Es wird zusammenfassend festgestellt, dass ein indirekter Effekt der RF-EMF-Exposition auf die Apoptose durch Modulation der Expression verschiedener Gene und Proteine nicht ausgeschlossen werden kann (Paragraph 3.2.3.6). Somit bleiben die Fragen nach dem Zusam-



menhang der Wirkungen von EFL-EMF und RF-EMF mit MMP/Apoptose ungeklärt: Eine definitive Antworten ist jedoch zentral für die Gesamtbeurteilung der Ergebnisse des Comet-Assay. (d) Die zur Ableitung des 'Tailfaktors' für die Zellen der Kategorien A, B, C, D und E benutzte Multiplikationsmethode, $\times 2,5$, $\times 12,5$, $\times 30,0$, $\times 67,5$ und $\times 97,5$, ist extrem willkürlich. Ein 'potentieller' Anstieg der Zahl der 'zyklierenden Zellen' (mit durch die Replikationsgabeln induzierten Strangbrüchen) und der 'apoptotischen Zellen' (mit mehreren fragmentierten DNA) in ELF-EMF- und RF-EMF-exponierten Proben (bezogen auf scheinbefeldete Proben) wird mit Sicherheit zu einer Fehlklassifizierung als 'geschädigte Zellen' führen. Mit jedem Prozent einer Erhöhung der Zahl apoptotischer Zellen (als 'E' klassifiziert) in ELF-EMF- und RF-EMF-befeldeten Zellen wird der 'Tailfaktor' um einen Punkt steigen. (e) Der 'Tailfaktor' als Maß für ESB und DSB wurde bisher von keiner anderen Forschergruppe weltweit (die den Comet-Assay anwendet) validiert. Die Multiplikationsmethode und der 'abgeleitete' Tailfaktor lassen erhebliche Zweifel an den Daten und der Auswertung des Comet-Assay insgesamt aufkommen. (f) Angesichts des Anstiegs von ESB/DSB in ELF-EMF-exponierten Zellen bereits bei einer Feldstärke von $35 \mu\text{T}$ gestaltet sich die Extrapolation der Gesamtergebnisse auf gesundheitsschädigende Wirkungen im Menschen schwierig, zumal die ELF-EMF-Exposition von Menschen in durchschnittlichen Wohngebieten bei weit niedrigeren Feldstärken bestehen bleibt, $<1 \mu\text{T}$ (*Lancet*, 354, 1925-1931, 1999).

(6) Chromosomenaberrationen (CA): (a) Von einem Zusatz von Bromodesoxyuridin zum Kulturmedium – einem Hilfsmittel zur Unterscheidung der Zellen in der ersten, zweiten oder späteren mitotischen Metaphase – ist nicht die Rede. Da es Usus ist, die Zellen nur dann auf CA zu untersuchen, wenn sie sich in der ersten mitotischen Metaphase befinden wird nicht klar, was die Zellen in der ersten mitotischen Metaphase von denen der Metaphase der zweiten oder späterer Teilung unterscheidet. (b) 'Gaps' sind in der Regel die 'nicht eingefärbten/achromatischen' Regionen der Chromosomen und werden im Allgemeinen nicht als 'schwere Aberration', wie z.B. Brüche und

azentrische Fragmente, betrachtet. Typischerweise werden 'gaps' in Chromosomen sichtbar, die nicht ausreichend in einer Methanol/Essigsäure-Mischung fixiert sind. Metaphasen mit 'gaps' von 24% bis 58% (Tabellen 6 und 21) sind für Analysen nicht akzeptabel und lassen keine Schlussfolgerungen zu. (c) Die in der Literatur berichtete Rate von Chromatid- bzw. Chromosombrüchen in 'normalen Zellen' kann bis zu 2% betragen. Insofern kann die für ELF-EMF-befeldete Zellen berichtete Rate von 2,2% für Chromosomenbrüche (Tabelle 6) als 'normal' bewertet werden.

(7) Mikrokerne (MN): (i) Einige der fragmentierten DNA in apoptotischen Zellen könnten von unzureichend geschulten oder unbeaufsichtigten einzelnen Mitarbeitern unter Umständen fälschlich als MN klassifiziert worden sein. (ii) Es überrascht doch sehr, dass die Zahl der MN für scheinbefeldete Zellen (0,5/100 Zellen), Zellen der Positivkontrolle (16,8/100 Zellen) und der negativen Kontrolle (0,4/100 Zellen) in den Abbildungen 14 (ELF-EMF-Experiment) und 95 (RF-EMF-Experiment) übereinstimmt. Für ELF-EMF- und RF-EMF-Befeldungen scheinen dieselben Daten benutzt worden zu sein. Sollte dies zutreffen, dann handelt es sich um eine extrem undurchsichtige Zweifachverwendung derselben Daten.

(8) Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Insgesamt 24.000 Metaphasen wurden auf den Objektträgern für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Sonden für 22 Autosome + X und Y Chromosome für die Analyse von 1000 Metaphasen für jedes Chromosom) untersucht. Die Arbeit am Mikroskop war extrem aufwendig und zeitraubend. Warum die detaillierten Daten nicht im Bericht enthalten sind, bleibt unklar.

(9) Reevaluierung in unabhängigen Labors: Die in APPENDIX-I aufgeführten Ergebnisse unterscheiden sich dramatisch bezogen auf die verschiedenen unabhängigen Labors. Variationen in den Markierungstechniken und der Zahl der untersuchten Zellen können nicht der Grund für solch signifikante Unterschiede in den Daten sein (vielleicht fehlte eine einvernehmliche Vereinbarung zu den Kriterien/Methoden der Evaluierung der Präparate, oder sie war unzureichend). Vor allem aber konnten die Zellen der Positivkontrolle aufgrund der niedrigen Zahl verwertbarer



Zellen entweder nicht ausgewertet werden oder aber sie zeigten nicht den erwarteten Anstieg in der Anzahl von MN. Somit sind die Daten insgesamt nicht für einen Vergleich mit den zuvor berichteten Befunden Hugo Rüdigers (Teilnehmer 3) geeignet; aussagekräftige Schlussfolgerungen können nicht gezogen werden. Die Reevaluierung ist ineffektiv und wenig ergiebig.

Anna Wobus (Teilnehmerin 4), Gatersleben, Deutschland

(1) Auch hier treffen die kritischen Anmerkungen zu den Comet-Daten zu. Es bleibt unklar, warum die detaillierten Daten nicht in Tabellen oder Schaubildern dargestellt wurden.

Albert Kolb (Teilnehmer 7), Hannover, Deutschland

(1) Auch hier treffen die kritischen Anmerkungen zu den Comet-Daten zu. Es bleibt unklar, warum die aus CHO-Zellen und HeLa-Zellen gewonnenen detaillierten Daten nicht im Bericht enthalten sind.

Gesamtbeurteilung

(1) Die Schlussfolgerungen des REFLEX-Berichts sind strittig (debatable), da ein Teil der Daten fragwürdig ist.

(2) Das Fehlen wesentlicher bzw. detaillierter Informationen zu 'zyklierenden' und 'apoptotischen' Zellen machte die Verwendung 'abgeleiteter' Tailfaktoren als Maß für DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche (ESB/DSB) im Comet-Assay fragwürdig.

(3) Viele Fragen ergeben sich auch bezüglich der vorgestellten Daten zur Chromosomen-Aberration (CA).

(4) Ein Teil der fragmentierten DNA in apoptotischen Zellen könnte von unzureichend geschulten Mitarbeitern auch fälschlich als Mikrokerne (MN) klassifiziert worden sein.

(5) Schwer verständlich (discomforting) sind die dramatischen Abweichungen zwischen den im APPENDIX-I aufgeführten Reevaluierungen der Versuchsdaten durch verschiedene unabhängige Labors. Dies könnte vielleicht ein Hinweis darauf sein, dass die Primärbefunde im günstigsten Falle nicht eindeutig, im ungünstigsten Falle fehlerhaft sind.

(6) Diese nicht erwarteten Ergebnisse erfordern auf jeden Fall unabhängige Replikationen.

*Vijayalaxmi, Ph.D. Department of Radiation Oncology,
University of Texas Health Science Center/USA.*