

5 Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit erlauben Aussagen zum Einfluß von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf biologische Eigenschaften exponierter Zellen zu treffen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, daß die Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern zu keiner Änderung der Zellteilungsgeschwindigkeit führt. Diese Aussagen gründen sich auf die Messung der Verdopplungszeit und der Thymidinkinase-Aktivität in exponierten Zellen.

5.1 Verdopplungszeiten der Zellen ohne TPA-Behandlung

Die Verdopplungszeiten von HL60-Zellen, die nicht mit TPA behandelt wurden, schwankten sowohl bei den Versuchen, in denen die Zellen mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern exponiert wurden, als auch bei den nicht exponierten Kontrollen in relativ engen Grenzen zwischen 26,0 Stunden und 34,5 Stunden. Bei diesen Untersuchungen wurden die Zellen mit unterschiedlichen SAR-Werten zwischen 617 und 1.336 mW/kg und für unterschiedliche Zeiten zwischen 24 bis 72 Stunden exponiert.

Diese Streuung läßt sich auf die physiologische Variationsbreite biologischer Systeme zurückführen, die durch verschiedenartige Einflüsse bedingt sind, denen die Zellen ausgesetzt werden. Dazu gehören Schwankungen in den Kulturbedingungen, beispielsweise bedingt durch Medienwechsel und die damit einhergehende, wenn auch leichte Veränderung in der Zusammensetzung der Zellkulturmedien oder die Einflüsse der Zentrifugation von Zellen während der Passagierung. Weiterhin lassen sich die leichten Schwankungen der Verdopplungszeiten innerhalb ansonsten identisch behandelter Zellen damit erklären, dass in den Versuchen die Zellen nicht nach Synchronisation eingesetzt wurden, was vor allem Unterschiede zwischen den Versuchsserien erklärt, insbesondere bei längeren Zeiträumen zwischen den Serien oder bei Chargenwechsel der Zellen.

Um Unterschiede innerhalb der Testserien möglichst gering zu halten, wurden Kontrollzellen und exponierte Zellen stets gleich behandelt. Weiterhin wurden für die einzelnen Versuche die Zellen gemeinsam kultiviert und erst unmittelbar vor dem Versuch in die Gruppe exponierter Zellen bzw. Kontrollzellen aufgeteilt. Unterschiede der Verdopplungszeiten, die innerhalb einer

Testserie zwischen Kontrollzellen und exponierten Zellen nachweisbar waren, waren daher eindeutig auf die Exposition der Zellen zurückzuführen.

In der Zusammenfassung aller Versuche traten bei den unterschiedlichen Expositionsbedingungen insgesamt keine Unterschiede der Verdopplungszeiten zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen auf. Allerdings traten bei einzelnen Serien Unterschiede der Verdopplungszeiten auf, die auch statistisch signifikant waren. So bei einer von insgesamt 6 Versuchsserien, in denen HL60-Zellen bei einem SAR-Wert von 617 mW/kg für 48 Stunden exponiert wurden (Tabelle B im Anhang, Serie 6). Auch bei einer Exposition bei einem SAR-Wert von 617 mW/kg für 72 Stunden fand sich in einer von 6 Serien eine statistisch signifikante Verkürzung der Verdopplungszeit der exponierten Zellen (Tabelle C im Anhang, Serie 2). In jeder der 3 Serien, bei denen ein Einfluss der Exposition auf die Verdopplungszeiten nachzuweisen waren (d.h. 1 Serie bei 1.336 mW/kg und 24 Stunden Exposition, 1 Serie bei 617 mW/kg für 48 Stunden und 1 Serie bei 617 mW/kg für 72 Stunden) waren die Verdopplungszeiten etwa um 1,5 Stunden kürzer als die Verdopplungszeiten der jeweils zugehörigen Kontrollzellen. Abgesehen von diesen 3 Testserien, in denen ein Einfluss der Exposition auf die Verdopplungszeiten nachweisbar war, waren jedoch bei den weiteren 32 Testserien dieser Arbeit, in denen HL60-Zellen exponiert wurden, keine signifikanten Unterschiede der Verdopplungszeiten zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen festzustellen.

Auch in den Untersuchungen mit BL70-Zellen, die nicht mit TPA behandelt wurden und die mit 1.114 mW/kg über 24 Stunden exponiert wurden, fanden sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede für Verdopplungszeiten zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen. Lediglich in 2 von 9 Testserien fanden sich leichte statistisch signifikante Unterschiede. Im Unterschied zu HL60-Zellen waren in diesen beiden Versuchsserien die Verdopplungszeiten der exponierten Zellen jedoch länger als die der Kontrollzellen.

Zusammenfassend fanden sich somit weder bei HL60-Zellen noch bei BL70-Zellen Unterschiede in den Verdopplungszeiten exponierter und nicht exponierter Zellen.

5.2 Aktivität der Thymidinkinase der Zellen ohne TPA-Applikation

Die extrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten der HL60-Zellen (Exposition bei einem SAR von 617 mW/kg für 24 Stunden) lagen im Vergleich zu den intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten der HL60-Zellen wesentlich niedriger und entsprachen den Bereichen früherer Untersuchungen mit HL60-Zellen (82). Die Mittelwerte der einzelnen Testserien lagen zwischen 10,9 und 15,0 U/l bei den Kontrollzellen und zwischen 11,3 und 16,4 bei den exponierten Zellen. Außer in der ersten Serie ($p=0,01$) gab es keine Unterschiede zwischen den Thymidinkinase-Aktivitäten der exponierten Zellen und der Kontrollzellen.

Die Bereiche der intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten der HL60-Zellen ohne TPA-Applikation zeigten eine wesentlich breitere Streuung. Bei den nicht exponierten Zellen lagen die Mittelwerte der einzelnen Testserien in einem Bereich von 28 bis 137 U/l, bei den exponierten Zellen von 29 bis 149 U/l. Innerhalb der einzelnen Testserien waren die Thymidinkinase-Aktivitäten jedoch relativ konstant.

Bei den verschiedenen Versuchsanordnungen traten wie bei den Verdopplungszeiten auch bei den Thymidinkinase-Aktivitäten nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen auf, so bei der Exposition der HL60-Zellen bei einem SAR-Wert von 617 mW/kg für 48 Stunden in der zweiten von sechs Testserien ($p=0,0015$).

Bei den Untersuchungen mit einem SAR-Wert von 1336 mW/kg für 24 Stunden fanden sich bei zwei der vier Testserien signifikante Unterschiede der intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten zwischen nicht exponierten HL60-Kontrollzellen und exponierten HL60-Zellen. Der Mittelwert der Thymidinkinase-Aktivitäten der nicht exponierten Kontrollzellen betrug in der Serie 2 42,8 U/l, der Mittelwert der exponierten HL60-Zellen betrug 56,5 U/l und lag damit höher als bei den übrigen Serien dieser Versuchsanordnung. Bei der Testserie 3 betrug der Mittelwert der intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten der Kontrollzellen 43,2 U/l, der Mittelwert der exponierten Zellen 47,7 U/l. Die Mittelwerte lagen damit im Bereich der übrigen Serien (Mittelwert der TK der exponierten Zellen in Serie 4: 47,6 U/l). Bei Betrachtung aller Einzelwerte ergab sich hier als einziger Versuchsreihe insgesamt ein signifikanter Unterschied.

In allen anderen einzelnen Testserien mit HL60-Zellen ohne TPA-Behandlung als auch den Versuchsreihen insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Thymidinkinase-Aktivitäten der exponierten Zellen und den Kontrollzellen, auch nicht in den Wiederho-

lungsuntersuchungen mit einem nach Reparatur der zwischenzeitlich defekten Expositionsanlage erzielten SAR-Wert von 1114 mW/kg.

Die teilweise großen Unterschiede der Thymidinkinase-Aktivitäten zwischen den verschiedenen Versuchsanordnungen sind wie die Unterschiede der Verdopplungszeiten dadurch begründet, daß die Zellen nicht synchronisiert waren, das heißt, die Zellen befanden sich in verschiedenen Zellzyklusphasen, in denen die Thymidinkinase-Aktivitäten unterschiedlich sind (83).

Auf die Gesamtbeurteilung eines möglichen Einflusses elektromagnetischer Felder hatten diese Unterschiede der Zellzyklusphasen keinen Einfluß. Für diese Beurteilung war jeweils der Vergleich exponierter Zellen und Kontrollzellen in einem Experiment heranzuziehen. Da diese Zellen jeweils aus dem gleichen Zellpool stammten, stimmte die Verteilung der Zellen, die sich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befanden, bei Kontrollen und exponierten Zellen überein. In der Mehrzahl der Experimente wiesen exponierte und nicht exponierte Zellen keine Unterschiede der Thymidinkinase-Aktivität auf.

Innerhalb der verschiedenen Versuchsanordnungen waren die Thymidinkinase-Aktivitäten dagegen vergleichbar, da die einzelnen Testserien einer Versuchsanordnung meist in kurzer zeitlicher Abfolge durchgeführt wurden.

Die Untersuchungen mit BL70-Zellen bestätigten die mit den HL60-Zellen gefundenen Ergebnisse. Insgesamt ergaben sich auch keine signifikanten Unterschiede der intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten zwischen den exponierten und nicht exponierten BL70-Zellen, die nicht mit TPA behandelt waren. Im Vergleich zwischen HL60 und BL70-Zellen zeigte sich, daß die intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten der BL70-Zellen niedriger waren als die der HL60-Zellen.

5.3 Auswirkungen der TPA-Applikation

Der Vergleich der Verdopplungszeiten von TPA-behandelten HL60-Zellen mit unbehandelten HL60-Zellen zeigte deutliche und hochsignifikante Unterschiede. Die Verdopplungszeiten wurden durch den Einfluß des TPA teilweise zweifach verlängert (siehe Abbildung 10). Ursache für die Verlängerung der Verdopplungszeit ist die Verlängerung der G1- oder der G2-Phase des Zellzyklus durch TPA (74, 84, 85).

Dagegen waren bei den mit TPA-behandelten und exponierten Zellen im Vergleich zu den TPA-behandelten, nicht exponierten Zellen keine Effekte der Exposition nachweisbar.

Bei den TPA-behandelten Zellen wiesen die Verdopplungszeiten innerhalb einzelner Serien teilweise eine große Streubreite auf, was durch Zellaggregate infolge der TPA-Wirkung erklärt werden konnte, welche die Zellzählung erschwerten.

Die Untersuchungen mit BL70-Zellen bestätigten im wesentlichen die mit den HL60-Zellen gefundenen Ergebnisse. Die Unterschiede der Verdopplungszeiten zwischen den mit TPA behandelten und den nicht behandelten BL70-Zellen waren zwar nicht so groß wie bei den HL60-Zellen, jedoch trotzdem deutlich. Abgesehen von der ersten Testserie waren die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$, siehe Tabellen G1-3 im Anhang).

Dagegen unterschieden sich die Verdopplungszeiten zwischen den exponierten und nicht exponierten BL70-Zellen mit TPA-Applikation bis auf die Testreihe 9 (MW der Kontrollzellen 35,78 h, MW der exponierten Zellen 38,78 h, $p = 0,01$) ebenfalls nicht.

Der Effekt des TPA auf die intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten zeigte sich bei den HL60-Zellen besonders deutlich, teilweise waren die intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten um über 90 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verringert (siehe Abbildung 17), während bei den BL70-Zellen die Reduktion bei ca. 50 – 70 % lag.

Zwischen den mit TPA-behandelten exponierten HL60-Zellen im Vergleich zu den TPA-behandelten, nicht exponierten Zellen waren auch hinsichtlich der Thymidinkinase-Aktivitäten keine Unterschiede nachweisbar. Bei den Untersuchungen von BL70-Zellen mit TPA-Applikation waren in Testserie 2 die TK-Aktivitäten der Kontrollzellen zwar signifikant niedriger als die der exponierten Zellen (MW 9,2 bzw. 10,7 U/l, $p = 0,049$), insgesamt ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied der TK-Aktivitäten bei den mit TPA behandelten BL70-Zellen (Abbildung 18).

5.4 Verdopplungszeiten im Zusammenhang mit den Thymidinkinase-Aktivitäten

Da die einzelnen signifikanten Unterschiede in den Verdopplungszeiten und Thymidinkinase-Aktivitäten zwischen exponierten und nicht exponierten Zellen nur in einzelnen Testserien auftraten und Unterschiede nicht von der Position in der GTEM-Zelle abhingen, ist ein Temperatur-

oder Positionseffekt in der GTEM-Zelle auszuschließen. Zudem wurde in den Experimenten die Temperatur, wie oben beschrieben, fortlaufend kontrolliert und am Ende jeden Versuchs nochmals manuell in einem Röhrchen überprüft.

Betrachtet man die signifikanten Unterschiede der Verdopplungszeiten und Thymidinkinase-Aktivitäten zwischen exponierten und nicht exponierten HL60 und BL70-Zellen, so zeigt sich, daß die einzelnen signifikanten Unterschiede nicht im Zusammenhang auftraten. Bei keiner im Mittel signifikant kürzeren Verdopplungszeit der exponierten Zellen im Vergleich zu den nicht exponierten Kontrollzellen trat gleichzeitig eine im Mittel signifikant höhere Thymidinkinase-Aktivität auf, auch nicht bei dem SAR-Wert von 1336 mW/kg, bei dem sich signifikant höhere TK-Aktivitäten der exponierten Zellen fanden.

Die einzelnen signifikanten Unterschiede waren nicht eindeutig und reproduzierbar. So betrachtet waren keine Effekte durch die Feldeinwirkung vorhanden.

Dagegen ließen sich klare Unterschiede zwischen unbehandelten und TPA-behandelten HL60- und BL70-Zellen nachweisen. Die Verdopplungszeiten der TPA-behandelten Zellen waren verlängert, gleichzeitig waren die Thymidinkinase-Aktivitäten dieser Zellen herabgesetzt. Beide Veränderungen korrelierten miteinander.

5.5 Bewertung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Verdopplungszeiten exponierter humaner Zellen gemessen. Entsprechende Untersuchungen waren vor dem Beginn dieser Arbeit nicht durchgeführt worden. Die Messung des Einflusses elektromagnetischer Felder auf die Verdopplungszeiten erschien wichtig, da die Verdopplungszeiten die Proliferationsrate der Zellen widerspiegeln, die wiederum von vielfältigsten endogenen und exogenen Steuerungssignalen der Zelle kontrolliert wird. Veränderungen der Verdopplungsrate sollten somit potenzielle Einflüsse elektromagnetischer Felder auf unterschiedlichste Ebenen des Zellstoffwechsels widerspiegeln, beispielsweise die Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren, die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, von Calciumkanälen, die Aktivierung oder Hemmung von Proteinkinasen, die Aktivierung von Onkogenen, die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder Störungen der Struktur und Funktion von Proteinen. Weiterhin wurde der

Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Zellen anhand der Aktivität der Tymidinkinase gemessen, welche ebenfalls die Proliferationsaktivität der Zellen widerspiegelt. Ein Effekt der Exposition könnte sich theoretisch entweder in einer Verkürzung der Verdopplungszeit, also beschleunigtem Wachstum, oder in einer Verlängerung der Verdopplungszeit, also verzögertem Wachstum, der exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen äußern. Analog dazu müsste die Tymidinkinaseaktivität bei einer Verkürzung der Verdopplungszeit zunehmen entsprechend dem vermehrten Bedarf der Synthese von DNS bzw. bei einer Verlängerung abnehmen, da sich in diesem Fall die DNS-Replikation vermindert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern keinen Einfluss auf die Verdopplungszeiten der hier untersuchten HL60- und BL70-Zellen hat. Während zum Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Verdopplungszeiten von Zellen keine entsprechenden Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen vorliegen, haben mehrere Arbeitsgruppen den Einfluss elektromagnetischer Felder auf Teilaspekte zellulärer Kontroll- und Signalmechanismen untersucht.

So untersuchten Ivaschuk et al. die Expression von c-fos und c-jun in PC12-Ratten-Phäochromocytom-Zellen nach Vorbehandlung mit NGF (Nerve Growth Factor). In den Versuchen wurden die Zellen mit hochfrequenten Elektromagnetfeldern mit 836,55 MHz (North America Digital Cellular Telephone Standard) bei verschiedenen Leistungsflussdichten für 20, 40 und 60 Minuten mit 20 Minuten intermittierender Pause exponiert. In diesen Untersuchungen, bei denen die Expressionsrate mittels Northern Blot ermittelt wurde, fanden sich keine Unterschiede in der Exposition von c-fos, wobei allerdings detektierbare c-fos-mRNA-Konzentrationen lediglich in den für 20 Minuten exponierten Zellen nachweisbar waren, so dass Aussagen über einen möglichen Einfluss bei längerer Exposition für 40 und 60 Minuten nicht möglich waren. Die Exposition von c-jun fand sich nach 20-minütiger Exposition bei 9 mW/cm^2 um ca. 40 % vermindert (42).

Campbell et al. untersuchten mit NGF vorbehandelte PC12-Zellen, die mit sinusoidalen 60-Hz-Magnetfeldern bei unterschiedlichen magnetischen Flussdichten exponiert wurden. In den so behandelten Zellen fanden diese Autoren keine Veränderung der c-fos-Expression. In weiteren Experimenten stimulierten diese Autoren die Expression von c-fos vor der Exposition gegenüber Magnetfeldern mittels Forskolin und Phorbolestern. Lediglich in einzelnen dieser Experimente

ließ sich eine Steigerung der c-fos-Expression nachweisen, während in der Mehrzahl der Experimente auch nach Stimulation der c-fos-Expression kein Einfluss elektromagnetischer Felder nachweisbar war (36).

Fanelli et al. untersuchten den anti-apoptotischen Effekt von magnetischen Feldern auf verschiedene Zellarten (U937 monozytäre Zellen, CEM T-Lymphozyten-Zell-Linie, Leukozyten aus dem peripheren Blut [PBL], Ratten-Thymozyten und EBV-Burkitt-Lymphomzellen), die mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Substanzen wie Puromycin, dem Topoisomeraseinhibitor Etoposid und H_2O_2 oder mit Hitzeschock bei $43^\circ C$ vorbehandelt wurden. Dabei spielt der Kalzium-Flux als Mediator der intrazellulären Signalkaskade eine entscheidende Rolle bei der Apoptose. So konnte gezeigt werden, daß die Magnetfeldexposition den Kalzium-Influx bei U937- und CEM-Zellen erhöht und so die Apoptose reduziert. Dagegen wirkt der Kalzium-Influx bei Ratten-Thymozyten, PBL und EBV-Burkitt-Lymphomzellen proapoptotisch (37).

Holian et al. prüften die Wirkung von 60 Hz-Feldern allein und in Kombination mit PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetat) auf HL60-Zellen und untersuchten die Aktivität und Verteilung der Proteinkinase C. Dabei fand sich bei alleiniger PMA-Behandlung und in Kombination mit Exposition in einem elektromagnetischen Feld eine Verminderung der cytosolischen und eine gleichzeitige Zunahme der partikulären Proteinkinase C, während bei alleiniger Exposition nur eine Abnahme der Cytosol-Fraktion erfolgte und die Zunahme der Partikular-Fraktion, anders als bei gleichzeitiger Behandlung mit PMA, ausblieb (29).

Dagegen fanden Tunistra et al. sowohl bei isolierter Exposition mit 60 Hz-Feldern als auch in Kombination mit PMA keine Änderung der Proteinkinase C-Aktivität von HL60-Zellen. Nach Vorbehandlung mit einer suboptimalen PMA-Konzentration und anschließender Exposition im Elektromagnetfeld und gleichzeitiger PMA-Behandlung fanden auch diese Autoren eine Abnahme der Aktivität der PKC in der Cytosol-Fraktion und eine Zunahme in der Membran-Fraktion (35).

Andere Untersuchungen beschäftigten sich dagegen mit Gesamteffekten der Elektromagnetfeld-Wirkung, insbesondere auch bei HF-Feldern.

So fanden Lai und Singh in Hirnzellen von Ratten, die 2 Stunden in vivo mit HF-Feldern von 2450 MHz bei einem SAR-Wert von 600 oder 1200 mW/kg exponiert wurden, DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche (86).

Balzer-Kubiczek und Harrison exponierten Fibroblasten (C3H/10T^{1/2}-Zellen) für 24 h bei 2450 MHz (mit 120 Hz gepulst) allein, sowie bei gleichzeitiger Behandlung mit TPA oder / und Röntgenstrahlung. Die HF-Exposition allein führte zu keinem Effekt auf die Transformation der Zellen, während in Kombination mit TPA sich eine signifikante Zunahme der Transformationsfrequenz fand (87).

Meltz, Walker und Erwin fanden keinen Effekt von HF-Feldern (350, 850 und 1200 MHz bei verschiedenen SAR-Werten) auf die Induktion der DNA-Reparatur durch UV-Strahlung bei normalen humanen Fibroblasten (88).

McRee und MacNichols analysierten den Schwesterchromatidaustausch in Knochenmarkzellen von Mäusen nach 28tägiger Mikrowellen-Exposition (2450 MHz, SAR 21 W/kg) und fanden im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen keine statistisch signifikanten Unterschiede (89).

Die Verlängerung der Verdopplungszeit und die gleichzeitige Verminderung der Thymidinkinase-Aktivität bei den mit TPA behandelten HL60- und BL70-Zellen ist der Beweis für verlangsamtes Wachstum der Zellen. Bei Genom-Schädigungen durch UV-Licht oder Röntgenstrahlen kommt es in der geschädigten Zelle durch eine Zunahme von p53, was die Aktivierung des Gens für den CDK-Inhibitor p21 bewirkt, zu einem Zellzyklus-Stop in der G1-Phase oder zur Apoptose (71). Auch TPA führt wahrscheinlich durch die Expression von p21 und eine Hypophosphorylierung des Rb-Proteins zu einer Wachstumsverlangsamung. Diese Wachstumsverlangsamung ist bei unseren Untersuchungen sowohl der HL60-Zellen als auch der BL70-Zellen mit TPA-Applikation sehr deutlich. Das beweist, daß die untersuchten bereits transformierten Zellen, sehr wohl in der Lage sind, auf den Einfluß von Tumor-Promotoren zu reagieren (85, 90). Dagegen führte bei unseren Experimenten die Hochfrequenz-Exposition zu keinem solchen Effekt, weder bei alleiniger HF-Exposition, noch bei HF-Exposition mit zusätzlicher TPA-Applikation.

Ein Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf einzelne Signalwege von Zellen scheint möglich zu sein. Hierbei scheinen sich jedoch unterschiedliche Zellarten in ihrer Sensitivität gegenüber elektromagnetischen Feldern zu unterscheiden. Die Befunde der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass zumindest in den hier untersuchten HL60- und BL70-Zellen solche möglichen Effekte elektromagnetischer Felder auf Signalwege zu keiner biologisch nachweisbaren Veränderung der Zellproliferation führen.