



VERUM
STIFTUNG FÜR VERHALTEN UND UMWELT

Stiftung VERUM
Josephspitalstraße 15/IV
80331 München
Tel. +49 (0)89 207040-142
verum@verum-foundation.de
<http://www.verum-foundation.de>

REFLEX

Risikobewertung der möglichen Umweltgefahren energiearmer elektromagnetischer Feldern mit Hilfe empfindlicher *in vitro* Methoden

Vertragsnummer: QLK4-CT-1999-01574

Dauer: 1. Februar 2000 – 31. Mai 2004

Gesamte Projektkosten: 3.149.621 EUR | **Zuschuss der EU:** 2.059.450 EUR

Vertragspartner: VERUM - Stiftung für Verhalten und Umwelt, München, Deutschland | Freie Universität Berlin, Deutschland | Medizinische Universität Wien, Österreich | Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Deutschland | INSALUD - Instituto Nacional de la Salud, Madrid, Spanien | STUK - Radiation and Nuclear Safety Authority, Helsinki, Finnland | Leibniz-Universität Hannover, Deutschland | Università degli Studi di Bologna, Italien | ENSCPB - Ecole Nationale Supérieure de Chimie et Physique de Bordeaux, Frankreich | IT'IS - Foundation for Research on Information Technologies in Society, Zürich, Schweiz | Università degli Studi di Milano, Italien | RZPD - Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Heidelberg, Deutschland

ZIEL: Die Wirkung von elektromagnetischen Feldern (EMF) auf die menschliche Gesundheit wird in den Industrienationen kontrovers diskutiert. Bisher haben epidemiologische Studien und Tierexperimente sich widersprechende Daten geliefert und damit noch mehr Unsicherheit erzeugt hinsichtlich einer möglicherweise gesundheitsschädlichen Wirkung. Dies hat besonders in europäischen Staaten mit hoher Bevölkerungsdichte zu Kontroversen mit der Industrie geführt, und zwar wegen der Allgegenwart von EMF sowohl in der Infrastruktur und als auch in Konsumgütern. Die Kontroversen bewirken, dass die Errichtung von Anlagen erschwert wird, Menschen wegziehen, Schulen geschlossen werden und Hochspannungsleitungen verlegt werden müssen, und dies alles zu immensen Kosten. Ein Zusammenhang zwischen EMF und Krankheit kann nur bewiesen werden, wenn wir die grundlegenden Mechanismen, die möglicherweise durch EMF ausgelöst werden, genau kennen. Auf der Suche nach diesen Mechanismen wurden im REFLEX-Projekt bewährte Methoden aus der Toxikologie und der Molekularbiologie angewandt, um die zellulären und subzellulären Reaktionen lebender Zellen, die *in vitro* EMF ausgesetzt wurden, zu untersuchen.

FORSCHUNGSVERLAUF UND ERGEBNISSE: Die Stärke von REFLEX basierte in erster Linie auf der Einführung einer gemeinsamen technischen Plattform für die niederfrequente (NF) und die hochfrequente (HF) EMF-Exposition, die die Wiederholung von positiven Ergebnissen in allen beteiligten Labors erlaubte. Des Weiteren basierte sie auf der Einführung der so genannten post-genomischen Technologien (DNA-Microarrays, Proteomik), die es ermöglichten, eine sehr große Anzahl potenzieller Wirkungen auf die Zelle gleichzeitig zu untersuchen, und zwar ohne Voreingenommenheit hinsichtlich der Mechanismen. Die Daten, die wir während des Projektes erhielten, zeigen, dass NF-EMF gentoxische Wirkungen auf primäre Zellkulturen von menschlichen Fibroblasten und auf weitere Zelllinien haben. Die Ergebnisse erhielten wir in zwei der beteiligten Labors und sie wurden in zwei Labors außerhalb des Projektes bestätigt, während ein weiteres Labor die genannten Wirkungen nicht beobachten konnte. NF-EMF führte zu signifikanten DNA-Strangbrüchen bei der sehr niedrigen Flussdichte von 35 μ T. Die Zunahme von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA und das vermehrte Auftreten von Mikronuklei zeigten eine eindeutige Wechselbeziehung zwischen Intensität und Dauer der NF-EMF-Exposition. Überraschenderweise wurde diese gentoxische Wirkung nur beobachtet, wenn Zellen einem intermittierendem NF-EMF ausgesetzt waren, nicht aber bei kontinuierlicher Exposition. Die Reaktionen von Fibroblasten unter NF-EMF nahmen sowohl bei Zellen von älteren Spendern als auch bei Zellen mit besonderen genetischen Reparaturdefekten zu. Reaktionen unterschieden sich auch bei anderen Zelltypen, die untersucht wurden. Insbesondere Lymphozyten von erwachsenen Spendern reagierten nicht. Bei menschlichen Fibroblasten wurden nach NF-EMF-Exposition Chromosomenabweichungen festgestellt. Die

Labors machten folgende Beobachtungen: (1) NF-EMF mit einer Flussdichte von ungefähr 2 mT reguliert die Expression von frühen Genen wie p21, c-jun und egr-1 in embryonalen, p53-defizienten Mäuse-Stammzellen nach oben, jedoch nicht in gesunden Wildtypzellen, (2) NF-EMF mit einer Flussdichte von 0,1 mT steigerte die Ausbreitungsrate von Neuroblastomazellen und (3) NF-EMF mit einer Flussdichte von 0,8 mT förderte die Differenzierung von Mäusestammzellen zu Kardiomyozyten. Jedoch konnten keine klar erkennbaren und eindeutigen Wirkungen von NF-EMF auf DNA-Synthese, Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Zellausbreitung und Apoptose (Zelltod) entdeckt werden.

Unsere Daten zeigen, dass HF-EMF in Fibroblasten, Granulosazellen und HL60-Zellen gentoxische Wirkungen hervorrufen. Zellen reagierten auf HF-EMF und einer spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 0,3 bis 2 W/kg mit einer signifikanten Steigerung der Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA und vermehrten Mikronuklei. In Fibroblasten wurden nach HF-EMF-Exposition Chromosomenabweichungen beobachtet. HF-EMF mit einer SAR von 1,5 W/kg regulierte die Expression neuronaler Gene in neuronalen Vorläuferzellen nach unten und in frühen Genen von embryonalen, p53-defizienten Mäuse-Stammzellen nach oben, aber nicht in Wildtypzellen. Proteomik-Analysen bei menschlichen Endothelzellen zeigten, dass die HF-EMF-Exposition die Expression und Phosphorylierung von zahlreichen, weitgehend unbekanntem Proteinen verändert. Dazu gehört das Hitzeschock-Protein hsp27, welches zelluläre Stressreaktionen anzeigt. Wir fanden keinen Nachweis, dass HF-EMF Prozesse wie Zellausbreitung, Apoptose oder die Funktion von Immunzellen beeinflusst.

Für beide, NF- und HF-EMF, weisen die Ergebnisse der speziellen Arrays für das menschliche Genom und die Proteomik-Analyse darauf hin, dass EMF mehrere Gruppen von Genen, die eine Rolle spielen bei Zellteilung, Zellausbreitung und Zelldifferenzierung, aktivieren können. Die biologische Bedeutung dieser Befunde kann zurzeit noch nicht bewertet werden.

NUTZEN: Die REFLEX-Ergebnisse sind ein wichtiger Beitrag für die bereits bestehenden Daten zu gentoxischen und phänotypischen Wirkungen von sowohl NF- als auch HF-EMF auf Zellsysteme *in vitro*. Sie schließen weder aus noch bestätigen sie ein durch EMF verursachtes Gesundheitsrisiko. Das Projekt war auch nicht dafür geplant. Sein Wert besteht in der Bereitstellung neuer Daten, die es ermöglichen, die Mechanismen der EMF-Wirkungen in Zukunft besser zu erforschen. Außerdem liefern die REFLEX-Ergebnisse neue Informationen für die Risikoabschätzung durch WHO, IARC und ICNIRP.

PUBLIKATIONEN (Gruppenleiter hervorgehoben):

2000

Platero C, Verbiest K, Úbeda A, **Trillo MA**, Gonsalvez J, Bartolomé J (2000) Platform opened for the processing and management of bio-medical images. XXI Jornadas of Automática:1-7.

2002

Ivancsits S, Diem E, **Rüdiger HW**, Jahn O (2002) Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 519(1-2):1-13.

Leszczynski D, Joenväärä R, Reivinen R, Kuokka R (2002) Non-thermal activation of hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70(2-3):120-9.

Platero C, **Trillo MA**, Úbeda A (2002) Processing of biochemical images for the study of the influence of GSM electromagnetic radiation on neural stem cells. XXIII Jornada of Automática:1-7.

2003

Ivancsits S, Diem E, Jahn O, **Rüdiger HW** (2003) Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose dependent way. *Int Arch Occup Env Health* 76(6):431-6.

Ivancsits S, Diem E, Jahn O, **Rüdiger HW** (2003) Age-related effects on induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to electromagnetic fields. *Mech Age Dev* 124(7):847-50.

Schuderer J, **Kuster N** (2003) Effect of the meniscus at the solid/liquid interface on the SAR distribution in petri dishes and flasks. *Bio-electromagnetics* 24(2):103-8.

2004

Capri M, Mesirca P, Remondini D, Carosella S, Pasi S, Castellani G, Franceschi C, **Bersani F** (2004) 50 Hz sinusoidal magnetic fields do not affect human lymphocyte activation and proliferation *in vitro*. *Phys Biol* 1(3-4):211-9.

Capri M, Scarcella E, Bianchi E, Fumelli C, Mesircas P, Agostini C, Remondini D, Schuderer J, Kuster N, Franceschi C, **Bersani F** (2004) 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors. *Int J Radiat Biol* 80(6):389-97.

Czyz J, Guan K, Zeng Q, Nikolova T, Meister A, Schönborn F, Schuderer J, **Kuster N**, **Wobus AM** (2004) High frequency electromagnetic fields affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics* 25(4):296-307.

Czyz J, Nikolova T, Schuderer J, **Kuster N**, **Wobus AM** (2004) Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of embryonic stem cells – the role of tumour suppressor p53. *Mutat Res* 557(1):63-74.

Leszczynski D, Nylund R, Joenväärä S, Reivinen J (2004) Applicability of discovery science-approach to determine biological effects of mobile phone radiation. *Proteomics* 4(2):426-31.

Nylund R, **Leszczynski D** (2004) Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation. *Proteomics* 4(5):1359-65.

Pilger A, Ivancsits S, Diem E, Steffens M, Kolb HA, **Rüdiger HW** (2004) No effects of intermittent 50 Hz EMF on cytoplasmic free calcium and on the mitochondrial membrane potential in human diploid fibroblasts. *Radiat Envir Biophys* 43(3):203-7.

Schuderer J, Schmid T, Urban G, **Kuster N** (2004) Novel high resolution temperature probe for RF dosimetry. *Physics Med Biol* 49(6):N83-92.

Schuderer J, Samaras T, Oesch W, Spät D, **Kuster N** (2004) High peak SAR exposure unit with tight exposure and environmental control for in vitro experiments at 1800 MHz. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 52(8):2057-66.

Schuderer J, Spät D, Samaras T, Oesch W, **Kuster N** (2004) In vitro exposure systems for RF exposures at 900 MHz. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 52(8):2067-75.

Schuderer J, Oesch W, Felber N, **Kuster N** (2004) In vitro exposure apparatus for ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 25(8):582-91.

Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Mesirca P, Remondini D, **Bersani F** (2004) Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields. *The FASEB J* 19(1):155-7.

2005

Diem E, Jahn O, **Rüdiger HW** (2005) Non-thermal DNA breakage by mobile phone radiation in human fibroblasts and transformed GFSH-R17 (rat granulosa) cells in vitro. *Mutat Res* 583(2):178-83.

Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Jahn O, **Rüdiger HW** (2005) Cell type specific genotoxic effects of intermittent extremely low frequency electromagnetic fields. *Mutat Res* 583(2):184-8.

Nikolova T, Czyz J, Rolletschek A, Blyszczuk P, Fuchs J, Jotchev G, Schuderer J, **Kuster N**, **Wobus AM** (2005) Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB J* 19(12):1686-8.

Winker R, Ivancsits S, Pilger A, **Adlkofer F**, **Rüdiger HW** (2005) Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Mutat Res* 585(1-2):43-9.

2006

Antonini RA, Benfante R, Gotti C, Moretti M, **Kuster N**, Schuderer J, **Clementi F**, Fornasari D (2006) Extremely low-frequency electromagnetic field (ELF-EMF) does not affect the expression of alpha3, alpha5 and alpha7 nicotinic receptor subunit genes in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Toxicol Lett* 164(3):268-77.

Nylund R, **Leszczynski D** (2006) Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent. *Proteomics* 6(17):4769-80.

Remondini D, Nylund R, Reivinen J, Poulletier de Gannes F, Veyret B, **Lagroye I**, Haro E, **Trillo AM**, Capri M, Schlatterer K, Gminski R, Fitzner R, **Tauber R**, Schuderer J, **Kuster N**, **Leszczynski D**, **Bersani F**, **Maercker C** (2006) Gene expression changes in human cells after exposure to mobile phone microwaves. *Proteomics* 6(17):4745-54.

2008

Benfante R, Antonini RA, **Kuster N**, Schuderer J, **Maercker C**, **Adlkofer F**, **Clementi F**, Fornasari D (2008) The expression of PHOX2A, PHOX2B and of their target gene dopamine-beta-hydroxylase (Dbeta H) is not modified by exposure to extremely-low-frequency electromagnetic field (ELF-EMF) in a human neuronal model. *Toxicol In Vitro* 22(6):1489-95.